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

UNIVERSITÉ DR YAHIA FARES - MÉDÈA
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
DÉPARTEMENT DE GÉNIE DES PROCÉDÉS ET ENVIRONNEMENT

Projet de fin d'étude

Présenté pour l'obtention de Diplômede Master en Génie des Procédés

Specialité:
Pollution Chimique et Gestion Environnementale

Thème:

Production d'un biopolymère antimicrobien

Réalisée par:**FERGANI Radhia** **Dirigée par:** **M^elle^ ARBIA Wassila**

Année Universitaire 2013 – 2014

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier ALLAH le tout puissant pour

m'avoir donné la force et la volonté à finaliser ce travail.

Mm arbia .w enseignante à l'université Yahia.Ferès de Médéa, je tiens à la remercier très vivement de m'avoir encadré, aidé et apporté son soutien à accomplir cette étude tout en ayant bénéficié d'une partie de son savoir-faire, de son expérience et précieux conseils sans

lesquels je n'aurais pas pu terminer ce travail. Ses connaissances

prodiguées constamment ont été extrêmement constructives tout le longde marecherche.

Je suis sensible à l'honneur que me fait Mm CHÉRIFIenseignante à àl'université Yahia.Ferès de Médéa, en acceptant de présider le jury proposé pour la soutenance de monmémoire.

Je tiens également à remercier Mlle karmet said .H et Mlle turkman .N et Mlle Youssef toumi.K

, Enseignantes à l'université de Médéa pour leurs remarques

qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de l'examiner et de le juger.

Mes vifs remerciements vont à mes chers parents, mon frère Salah,

El dine et ma sœur Djawida , et mon collégue bilel Ben hawa qui m'ont soutenu, dans tous les sens du terme, pourque je concrétise ce travail.

Je veux aussi remercier les différentes personnes que j'ai rencontré tout au long de

Mes études et qui ont pu m'aider par leurs soutiens, et leurs conseils entre autres mes

collègues de travail Leila ,Amel ,Amina ,Rachida

Je présente aussi, mes remerciements à toutes personnes qui m'ont aidé de près ou de

loin pour la réussite de ce travail, surtout notre vise recteur de l'université de médéa Msr Kwadik pour son aide.

Dedicaces



je dédie ce modeste travail à :

Mes parents qui ont sacrifiés corps et âmes pour la réussite de mes etude s

Mes très chère s sœur s Djawida et Oumaima .

Mon cher frère Slah eddine qui m'a encourager

Mon cher frère Mohammed

Ma meilleure copine Assia pour m'avoir aidé.

Ma chère tante salima et son fils Younes

Mon collègue de travail Billel pour m'avoir encouragé .

Toutes mes collègues de travail Aziza, Leila, Amel , Amina, Khadija , Farida, Affaf , Hadjer. Ihem. Rachida. Amina

A mes chères cousines Latifa et Loubna et mes chers cousins

Toutes la famille Fergani .



تلخيص:

خلال هدا العمل قمنا بإجراء تجارب نزع جزيء اللأستيل من الكيتين و تمكنا من خلالها من معرفة الشروط اللازمة من حرارة ومدة الحضن وتركيز والكتلة المناسبة للكيتين للحصول على الكيتوزان.

جزيئات الكيتوزان المحصل عليها تم تشخيصها بواسطة FTIR

وقمنا بتقييم خصائصه ضد بكتيرية و ضد فطرية للكتوزان المحصل عليه.

الكلمات المفتاحية :الكتين. الكيتوزان. نزع جزئ الأستيل. ضد بكتيريا. ضد فطرية

Résumé :

Ce présent travail permet de connaitre les conditions nécessaire pour la désacétylation de la chitine après la réalisation de 12 expériences dans les quelles on a modifié la température d'incubation , la concentration, la masse de la chitine .ainsi le temps de la réaction et on a réussi d'avoir 7 polymères de chitosane .

les polymères de chitosanes sont caractérisés par spectroscopie infrarouge (FTIR), et on a choisi 2 polymères issus pour tester l'activité antibacerienne et antifongique .

Mots clés :chitine , chitosane ,désacétylation,antibactérien, antifongique .

Abstract :

The present work allows to know the conditions necessary for the deacetylation of chitin after the achievement of 12 experiments in which we modified the incubation temperature, the concentration, the mass of chitin .so the reaction time and managed to have seven chitosan polymers.

chitosan polymers are characterized by infrared spectroscopy (FTIR), and chose from two polymers tested for activity and anti bacerienne antifungal.

Tags: chitin, chitosan deacetylation, antibacterial, antifungal

La liste des abreviations

A	**absorbance**
ADN	**acide désoxyribonucléique**
ARN_m	**acide ribonucléique messager**
ATCC	**American Type Culture Collection**
DA	**degrés d'acétylation**
DD	**degrés désacétylation**
D.G	**D-Glucosamine**
G.NAG	**Glucosamine et N-acétylglucosamine**
NAG	**N-acétylglucosamine**
PDA	**gélose dextrosée à la pomme de terre**
PM	**poids moléculaire**

Sommaire

Sommaire

Remerciment

Dedicaces

Résumé

La liste des abreviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale : 1

Chapitre I: La chitine et ses dérivés

I. 1. Historique 4

I. 2. La chitine 5

I. 2. 1. Définition de la chitine 5

I. 2. 2. Les sources de chitine 6

I. 3. Les dérivés de la chitine 8

I. 3. 1. Le chitosane 8

I.3. 2. Les propriétés de la chitine et du chitosane 9

I. 3. 3. 1. Les propriétés biologiques 9

I. 3. 3. 2. Les propriétés physico-chimiques : 10

Chapitre II: les applications de chitine et du chitosane

II. 1. En agriculture 14

II. 2. Traitement des eaux usées et protection de l'environnement 15

II. 3. Applications biomédicales et pharmaceutiques 16

II. 3. 1. En chirurgie 16

II. 3. 2. En ingénierie tissulaire 16

II. 3. 3. En ophtalmologie 16

II. 3. 4. Traitement du cancer 17

II. 3. 5. Contrôle de l'hypercholestérolémie et du surplus de poids 17

II. 3. 6. Activation du système immunitaire 18

II. 3. 7. Activité anticoagulante 18

II. 4. Activité antimicrobienne 18

II. 5. En industrie agro-alimentaire 19

II. 6. En biotechnologie 19

II. 7. Autres applications 19

Chapitre III : Les agents: de contaminations

III. 1. Les moisissures 22
III. 1. 1. Définition 22
III.1.2. Identification des moisissures 22
III. 1.3. Principaux genres fongiques 23
III.1.3.1. Le genre Fusarium 23
III.1.3.2. Principales espèces de *Fusarium* 24
III.1.3.3. Importance du genre Fusarium 25
III. 2. Les bactéries 25

Chapitre IV Matériel et méthodes

IV. 1. Matériel 35
IV. 1. 1. Matériel biologique 35
IV.1.2. Les milieux de culture 35
IV. 1.3. Produits chimiques 35
IV.2. Appareillage : 36
IV. 3. Les Méthodes 36
IV. 3. 1 Méthode de préparation du chitosane 36
IV. 3. 2. Méthodes d'analyse 37
IV.3.2.1. Test de solubilité 37
IV.3.2.2. Spectroscopie infrarouge 37
IV.3.2.3.Etude de l'activité antibactérienne et antifongique du surnageant des fermentations lactiques 37

Chapitre V : Résultat et discussion

V. 1. Préparation du chitosane 40
VI. 1.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge 41
V. 1.2. Caractérisation physico-chimique 42
IV. 3. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique des chitosanes préparés 43
CONCLUSION GÉNÉRALE 55
References Bibliographiques 57
Annexes 65

Liste des figures

Fig I. 1 : Les structures moléculaires : chitine (A) et cellulose (B) 5
(Onar et Sariisik, 2000; Mrunal, 2004) 5
Fig. I.2 : Structure chimique du chitosane (Mrunal, 2004) 8
Figure I.2. Fabrication de la chitine et de ses dérivés 11
(www. France-chitine.com/fab.e.htm) 11
Figure III. 1: Vue microscopique de staphylocoque aureus. 26
Figure III .2: vue microscopique *d'E.coli*. 28
Fig. V.1. chitosane (a) soluble (b) non soluble 40
Figure V. 2. Spectres infrarouge des chitosanes obtenus et le chitosane commercial 41
Figure. V. 3. : Résultat de l'activité antibactérienne du (a) chitosane 7 et chitosane 11 contre Staphylococcus aureus 44
Figure. V. 4. : Résultat de l'activité antifongique du (a) chitosane 7 contre *F.culmorum* et (b) chitosane 6 contre *F. verticilloide* 47
Figure. V. 5. : Résultat de l'activité antifongique du chitosane commercial contre *F. verticilloide* 48

Liste des tableaux

Tableau I. 1 : Le pourcentage de chitine chez certains crustacés, insectes, mollusques et champignons (Hobel, 2004).....7

Tableau IV. 1. : La matrice expérimentale. 36

Tableau V.1. Résultats du test de solubilité.....40

Tableau V.2. Les principales bandes d'absorption IR de chitosane commercial et les chitosanes préparés.....42

Tableau V. 3. Les degrés de désacétylation des chitosanes obtenus.....43

Tableau V. 5. : Les zones d'inhibition (mm) des souches fongiques vis-à-vis des différents chitosanes préparés.....49

Introduction générale

Introductiongénérale :

En l'espace d'un siècle, les polymères sont devenus incontournables dans notre vie quotidienne. Ils sont utilisés dans une multitude d'applications et il serait désormais difficile de s'en passer. La plupart des matériaux polymères sont élaborés à partir du pétrole. Cependant, cette ressource est en diminution progressive et l'on atteindra dans les prochaines décennies un pic pour lequel la demande, tirée à la hausse par le développement des pays émergents, sera supérieure à l'offre, faisant grimper toujours plus haut les cours de l'or noir.

En outre, en ce début de siècle, les enjeux sociétaux et environnementaux liés au changement climatique sont très importants. Dans ce contexte, le concept de développement durable est apparu à la fin du XXème siècle. C'est pourquoi les polymères naturels reçoivent un intérêt grandissant auprès du monde académique et industriel. Ils sont en abondance, de nature très variée, et présentent souvent des caractéristiques intéressantes. Cependant, pour pouvoir remplacer à l'avenir une part non négligeable des polymères d'origine fossile par des biopolymères, de nombreux défis sont à relever. De très nombreuses études ont été conduites lors de la dernière décennie afin de développer des biopolymères

plus performants, mais il reste encore du chemin à parcourir afin qu'ils puissent trouver leur place sur le marché concurrentiel des polymères.

Il existe une très grande diversité de biopolymères, parmi lesquels on trouve la famille des polysaccharides tels que le chitosane, issu des produits marins. Ce biopolymère constitue une alternative intéressante dans le cadre du remplacement des polymères issus de la pétrochimie, car il possède des propriétés physicochimiques et biologiques importantes à savoir l'activité antifongique et antibactérienne (Mokrani,2013).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet du chitosane sur deux souches de *Fusarium* champignons phytopathogènes ainsi que trois souches bactériennes.

La réalisation de ce travail a été faite en trois étapes :

- Préparation du chitosane par désacétylation de la chitine commerciale ;
- Caractérisation physico-chimiques des chitosanes obtenus ;
- Etude de l'activité antibactérienne et antifongique.

Introduction générale

Ce mémoire est structuré en deux parties :

1. Une étude bibliographique, organisée en trois chapitres : le premier chapitre présente des généralités sur la chitine, le deuxième chapitre traite les différentes applications de la chitine et le chitosane. Le troisième chapitre présente les différents agents de contamination utilisés dans ce travail.

2. Une étude expérimentale, organisée en deux chapitres: un chapitre est consacré aux produits utilisés, méthodes expérimentales. Un 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 différentes perspectives pour les études futures.

Chapitre I
La chitine et ses dérivés

I. 1. Historique

La chitine fut isolée pour la première fois en 1811 par le Professeur *H. BRACONNOT*, Directeur du jardin botanique de l'Université de Nancy en France.
Il obtient, à partir du champignon *Agaricus volvaccus* (Seda et *al*., 2004), une substance fibreuse résistante aux solutions alcalines concentrées et insoluble dans les solutions acides, telles que l'acide sulfurique. Le composé qu'il nomma «fungine» était, toutefois, un mélange de chitine et d'un autre polysaccharide non azoté (Mrunal, 2004). En 1823, le scientifique Français *ODIER* isola un résidu insoluble et qu'il appela «chitine» (du Grec *Khitōn* qui signifie enveloppe) (Kramer et *al*., 1985) à partir des carapaces de scarabées par des traitements répétés avec des solutions chaudes de KOH (Poirier, 2000).

En 1859, le Professeur *C. ROUGET* a fait subir à la chitine un traitement alcalin produisant ainsi une substance qui est, à la différence de celle-ci, soluble dans les acides. Mais ce n'est qu'en 1894 que *H. SEYLER* nomma cette substance «chitosane» (Mrunal, 2004). En 1879, *LEDDERHOSE* a proposé de produire la chitine avec du glucosamine et de l'acide acétique. Cette composition chimique a été confirmée par *E. GILSON* en 1894 (Kramer, 1985).

La chitine, le chitosane et la cellulose ont été confondus pendant longtemps. En 1886, *TIEMANN* confirma la présence d'un groupement amine sur le carbone 2 de la configuration D-glucose du chitosane. Ce n'est qu'en 1912 que *BARCH* et *VON FÜRTH* conclurent que la chitine était un N-acétyl-D-glucosamine polymérisé (Poirier, 2000).

Durant les années 1930 et 1940, ces biopolymères de glucosamine ont été principalement appliqués dans le domaine médical et le traitement des eaux usées. Mais ce n'est qu'en 1970 que ces polymères ont suscité un réel intérêt ayant pour résultat, la première conférence de chitine-chitosane qui a eu lieu aux Etats-Unis (Boston) en 1977 (Muzzarelli et Riccardo, 1983).

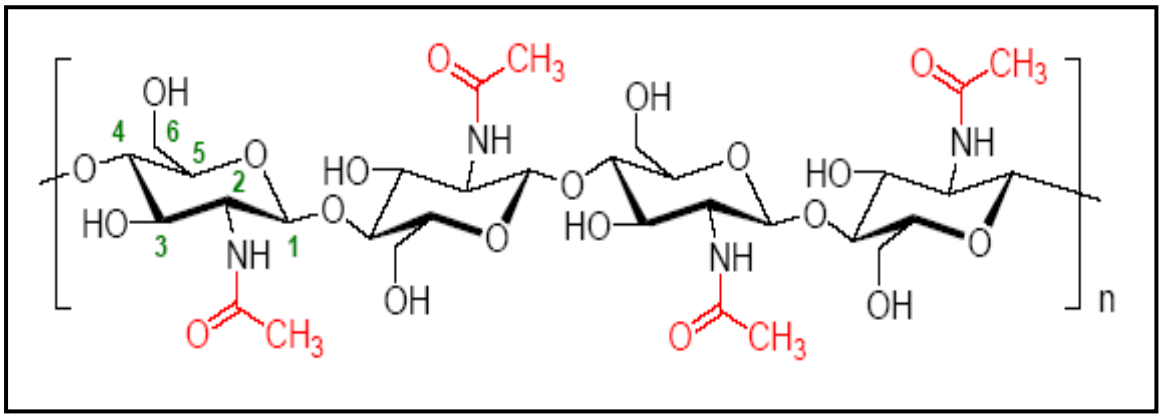
Les travaux de *MUZZARELLI* durant l'année 1980, ont considérablement amélioré la compréhension de ces matériaux. Aujourd'hui, on connaît que la chitine et le chitosane, appelés aussi substances chitineuses, sont des sources renouvelables et abondantes dans la nature, elles font l'objet de plusieurs études et ont retenu l'attention en tant que candidat pour plusieurs applications en médecine (antitumoral, antiviral, antimicrobien,…), dans le traitement des eaux (adsorption des métaux lourds,…), en biotechnologie, etc (Mrunal, 2004).

I. 2. La chitine

I. 2. 1. Définition de la chitine

La chitine est, après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature. C'est un copolymère constitué d'une chaîne linéaire d'unités de 2-acétamido-2-desoxy-D-glucose et 2-amino-2-desoxy-D-glucose $(C_8H_{12}O_5N)_n$avec n>>1(Kramer et *al*., 1985), liées entre elles par des liaisons osidiques β (1-4) (A) (Kittur et *al*., 2002; Andrade et *al*., 2003). Il s'agit donc, d'un composé dont la structure se rapproche de celle de la cellulose (Morimoto et *al*., 2002) (B) (Fig. 1).

A



B

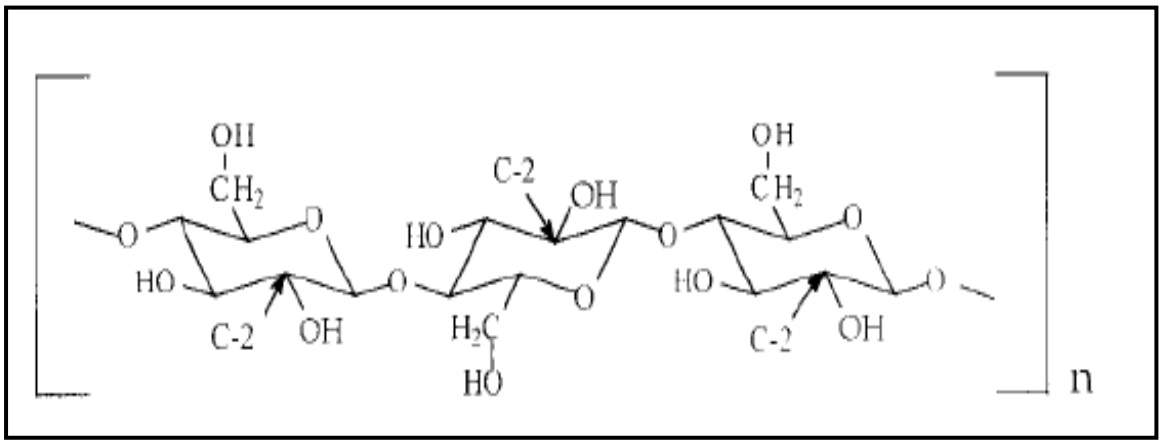


Fig I. 1 : Les structures moléculaires : chitine (A) et cellulose (B) (Onar et Sariisik, 2000;Mrunal, 2004)

La chitine possède une structure cristalline et constitue un réseau de fibres organisées, elle confère une rigidité et une résistance aux organismes qui en contiennent (Montserrat, 2002). Les différents organismes qui la synthétisent sont présents dans de très nombreux écosystèmes, autant terrestres qu'aquatiques. Sa production annuelle par biosynthèse est de 10^{10} à 10^{11} tonnes (Hobel, 2004).

L'analyse aux rayons X montre que la chitine est une substance polymorphe qui se rencontre sous trois formes : α, β, γ et dont la différence réside dans l'orientation des chaînes polysaccharidiques (Tabaoda et *al*., 2003), le degré d'hydratation, la taille de la cellule unitaire et le nombre de chaîne de chitine par cellule unitaire (Merzendorfer and Zimoch, 2003).

La forme α représente la forme la plus répandue et la plus stable dans la nature (Svitil et *al*., 1997). Elle est rencontrée chez les mollusques, les planctons et dans les cuticules des arthropodes tels que les crustacés (crevettes, crabes, langoustes,….) et dans la paroi des champignons (levures et moisissures) (Zhang et *al*., 2000 ; Hobel, 2004).

La forme β représente la forme la moins stable et la plus dégradable de la chitine (Manisara et *al*., 2003). Elle est rencontrée chez les mollusques tels que les calmars, les cocons d'insectes ainsi que la paroi des champignons (Hobel, 2004).

La forme γ rencontrée dans l'estomac du calmar *Loligo* sp (Hobel, 2004) et les cocons des insectes (Falini et *al*., 2003).

I. 2. 2. Les sources de chitine

La chitine se retrouve naturellement dans les téguments d'insectes, de nématodes et d'invertébrés marins. On en retrouve, également, dans la paroi cellulaire de certaines algues et dans la paroi des champignons (Kamst et Spaink, 1999 ;Gogev et *al*., 2003). Cependant, le pourcentage de chitine présente chez ces différents organismes varie en fonction de l'espèce et la région (Mrunal, 2004) (Tableau I. 1).

Tableau I. 1 : Le pourcentage de chitine chez certains crustacés, insectes, mollusques et champignons (Hobel, 2004)

Organismes	% de chitine	Organismes	% de chitine
Crustacés :		*bombyx* (ver de soie)	44,2[c]
cancer (crabe)	72,1[c]	*calleria* (ver à cire)	33,7[c]
carcinus (crabe)	64,2[b]	Mollusques :	
paralithodes (crabe royal)	35,0[b]	Palourde	6,1
callinectes (crabe bleu)		Coquille des huîtres	3,6
crangon (crevette)	14,0[a]	Stylo de calmar	41,0
crevette d'Alaska	69,1[c]	Krill, carapace déprotéinée	40,2
nephros (langouste)	28,0[d]	Champignons :	
homarus (langouste)	69,8[c]	*Aspergillus niger*	42,0[e]
lepas (bernacles)	60- 75[c]	*Penicillium notatum*	18,5[e]
Insectes :	58,3[c]	*Penicillium chrysogenum*	20,1[e]
Periplaneta (cafard)		*Saccharomyces cerevisiae*	2,9[e]
Blatella (cafard)	2,0[d]	*Mucor rouxii*	44,5
Cleoptera (coccinelle)	18,4[c]	*Lactarius vellereus*	19,0
Diptera	27- 35[c]		
Pieris (papillon)	54,8[c]		
	64,0[c]		

a : par rapport au poids frais de l'organisme.

b : par rapport au poids sec de l'organisme.

c : par rapport au poids organique de la cuticule.

d : par rapport au poids total de la cuticule.

e : par rapport au poids sec de la paroi cellulaire.

La chitine peut être extraite à l ir des trois sources à voir : les crustacés, les micro-organismes et les insectes. Cependant, la princi le source de chitine exploitée commercialement demeure néanmoins les carapaces d'inverté és marins et d'eau do me les crevettes, les crabes, les homards et le krill qui sont fournis en grandes quantités par l'industrie de transformation alimentaire des crustacés. Pour ces industries, les téguments sont un véritable déchet et leur utilisation est une forme de revalorisation de la biomasse.

Les champignons utilisés par l'industrie de la fermentation sont une deuxième source de chitine exploitée commercialement. Ces industries produisent, entre autres, des antibiotiques et de l'acide citrique. Dans ce cas, la chitine est extraite des parois des microorganismes après leur utilisation en fermenteur (Plouffe, 1997).

Chez les insectes, la chitine constitue 1,4% du poids frais de l'animal, ce qui explique l'absence d'exploitation (Kiefer, 1999).

I. 3. Les dérivés de la chitine

L'hydrophobicité de la chitine limite son utilisation (Manisara et *al*., 2003 ; Freier et *al*., 2005). Pour y remédier, des dérivés de chitine ont été mis en évidence par modification de sa structure chimique. Ces modifications peuvent être une désacétylation par élimination du radical acétyl, une substitution du polymère avec un composé chimique ou une réaction d'hydrolyse.

La chitine est modifiée pour obtenir des polysaccharides amphiphiles de structure contrôlée qui peuvent être cationiques (chitosane) ou anioniques (carboxyméthyle chitine) (Desbrières, 2003) (Fig. I.2).

I. 3. 1. Le chitosane

Le chitosane est un copolymère cationique, constitué d'unité de β (1-4) 2 amino-2 desoxy–D-glucose (D-glucosamine) et β (1-4) N-acétyl 2- amino 2- desoxy- D- glucose (Graham et Mark, 1995 ; Hitoshi et Yoshihiro, 1999 ; Berger et *al*., 2004) (Fig. 7). Ce polymère est rarement rencontré chez les micro-organismes, sauf chez certains types de champignons tels que les zygomycètes où il se trouve en abondance (Nadarajah et *al*., 2001).

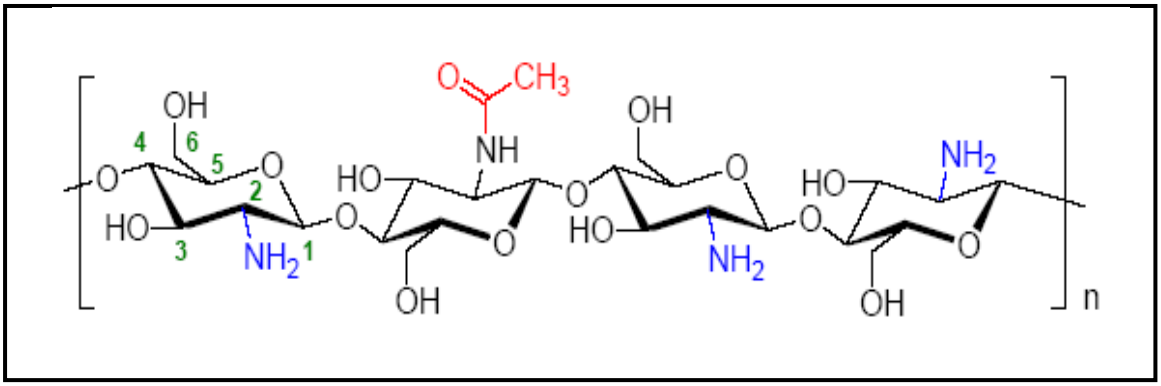


Fig. I.2 : Structure chimique du chitosane (Mrunal, 2004)

Le chitosane est comme la chitine, un polysaccharide biodégradable, biocompatible (Begoña et Ruth, 1997 ; Shobhan et Lawrence, 2000 ; Preynat et *al*., 2003), bioadhésif, non

toxique (Caiqin et *al*., 2004) et non allergénique. Il peut être caractérisé par ses propriétés intrinsèques (pureté, poids moléculaire, viscosité) et le degré de désacétylation (DD) (Lanveer et *al*., 2002). Ce dernier varie entre 70% et 95% alors que son poids moléculaire (PM) varie entre 10-1000 KDa. Ces deux paramètres sont altérés par les conditions de la réaction et la méthode de désacétylation (Säkkinen, 2003) et modifiés par une réaction de réacétylation afin d'abaisser le DD ou une dépolymérisation acide pour diminuer le PM.

Grâce aux grands nombres de groupements aminés protonés (NH_4^+) présents sur les unités glucidiques, le chitosane est soluble dans les acides organiques dilués mais insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques usuels (Säkkinen, 2003 ; Mrunal, 2004). Il se dissout dans l'acide chlorhydrique et les acides organiques tels que l'acide formique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide lactique (Kurita, 2001), et se précipite à pH basique. Pour le rendre soluble dans l'eau, sa structure chimique a été modifiée donnant naissance à des dérivés hydrosolubles tels que : le chitosane succinamide produit par une réaction avec l'acide succinique (Kamiyama et *al*., 1999 ; Hitoshi et Yoshihiro, 1999).

I. 2. 3. Les propriétés de la chitine et du chitosane

La chitine est un polysaccharide azoté, basique, cationique, de couleur blanchâtre et non toxique. Elle est caractérisée par sa rigidité, sa faible réactivité chimique, ses propriétés biologiques et physico-chimiques (Majeti et *al*., 2000 ; Morimoto et *al*., 2002 ; Mrunal, 2004).

I. 2. 3. 1. Les propriétés biologiques

- La 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).

- La biocompatibilité : sa présence dans l'organisme vivant n'induit aucun effet néfaste à la santé du receveur (Foscolo et Phillipon, 1997 ; Bal et *al*., 2006).

- Effets bactériostatique et bactéricide (Morimoto et *al*., 2002).

I. 2. 3. 2. Les propriétés physico-chimiques :

Ces propriétés influencent l'utilisation industrielle de la chitine.

-Le degré d'acétylation (DA) : c'est un des plus importants caractéristiques de la chitine (Muzzarelli et Riccardo, 1980). Il est défini comme étant le nombre de groupe N-acétylglucosamine présent sur le polymère par rapport au nombre total d'unités (Montserrat, 2002).

On parlera de chitine lorsque DA est supérieur à 70% (Kiefer, 1999). Cependant, une désacétylation peut avoir lieu au cours de l'extraction de la chitine, on parle alors du degré de désacétylation qui varie en fonction de l'origine et la méthode d'extraction de la chitine (Kurita, 2001).

Le degré de désacétylation (DD), défini comme étant le nombre de groupes D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités, est relié au DA (DD= 100- DA). C'est un paramètre structural important qui influence les propriétés physico-chimiques de la chitine (poids moléculaire, viscosité, solubilité, l'activité physiologique, la réactivité chimique et la biodégradabilité,….) (Suzuki et *al*., 1990 ; Kittur et *al*., 2002).

Afin de déterminer le degré d'acétylation avec une plus grande précision, plusieurs techniques ont été testées. La technique qui semble la plus adaptée pour une caractérisation rapide est la spectroscopie infrarouge (Muzzarelli et *al*., 1980 ;Montserrat, 2002).

- La solubilité : malgré la similarité structurale, la chitine est insoluble dans les solvants usuellement utilisés pour la cellulose (solutions aqueuses d'hydroxyde de cuprammonium, de cupriethylènediamine et de cadoxen) (Poirier, 2000). Elle est fortement hydrophobe et insoluble dans les solvants organiques usuels à cause de sa structure cristalline (Morimoto et *al*., 2002). Elle se dissout dans quelques solvants corrosifs et toxiques tels que : hexafluoroisopropanol, hexafluoroacétone, chloroalcool

s en présence d'acides minéraux. Elle est également soluble dans l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique et l'acide phosphorique à 78-97% (Yang et *al*., 2004). Cependant, ces solvants provoquent sa dégradation (Gagné, 1993).

Les mélanges N,N- diméthylacétamide (DMAc)/ LiCl et N- méthylpyrrolidone (NMP)/ LiCl utilisés également pour la solubilisation de la chitine furent découverts en 1977.

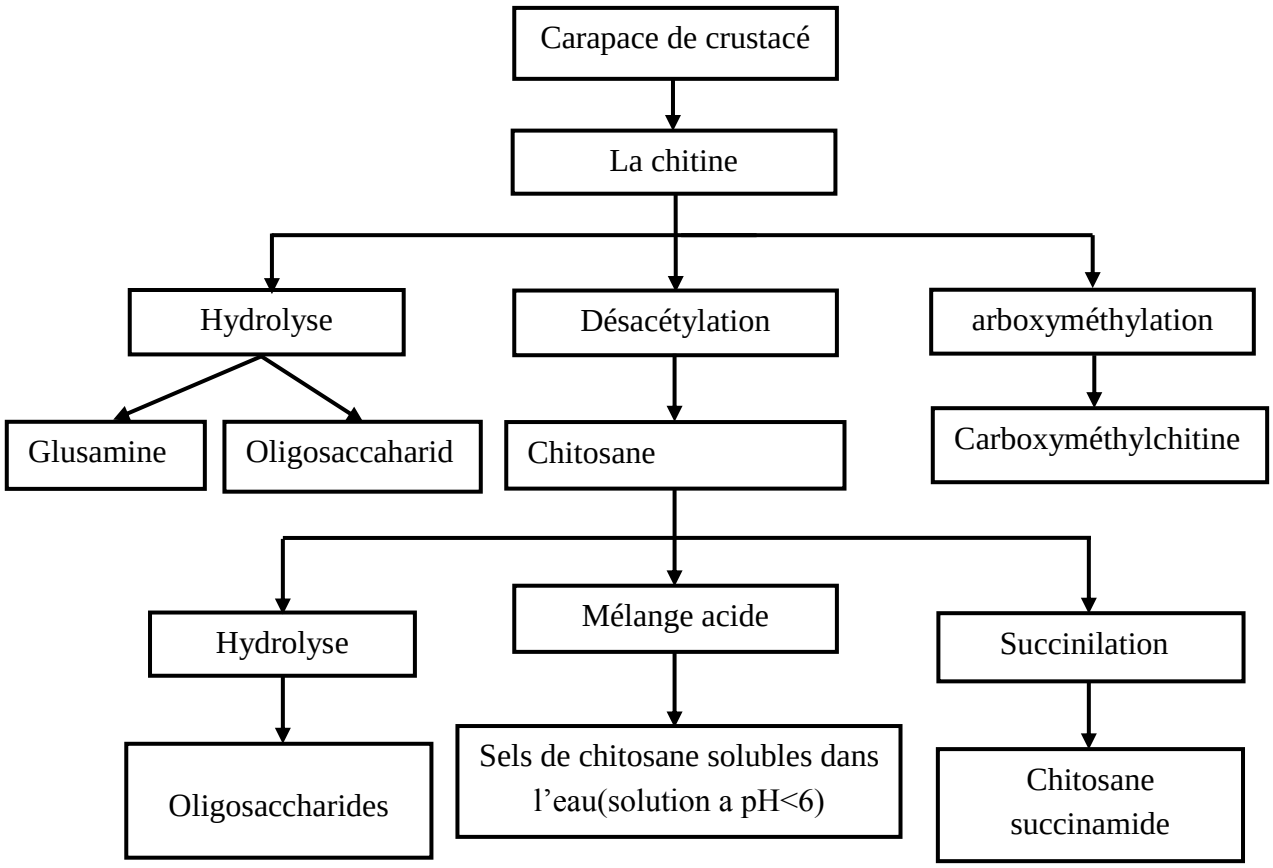


Figure I.2. Fabrication de la chitine et de ses dérivés (www. France-chitine.com/fab.e.htm)

La solubilité de la chitine dans DMAc/ LiCl semble dépendre du degré d'acétylation. Plus le degré d'acétylation est élevé, plus le pourcentage de solubilité est élevé. Cela démontre l'importance du groupement N-acétyl dans le mécanisme de solubilisation.

- Le poids moléculaire : la définition du poids moléculaire des polysaccharides et la compréhension de ses conséquences sur les propriétés physico-chimiques, ont présenté un vrai défi aux chimistes pendant un certain nombre d'années. Dans le cas de la chitine, la connaissance de tel paramètre est très importante pour les usages industriels (Montserrat, 2002). Il varie entre 1,03 et 2,5 MDa (Fernandez-Kim., 2004).

II.2.1. Production de chitosane à partir de la chitine (Processus de désacétylation)

Les techniques actuelles permettent, à partir des déchets, d'aboutir à une déminéralisation et à une déprotéinisation convenables de la carapace et donc à une chitine partiellement purifiée. On peut ensuite, en fonction des exigences, procéder à des purifications supplémentaires afin d'obtenir un produit ultra-pur débarrassé de toute protéine.

En partant de la chitine, on peut également moduler à souhait le degré d'acétylation et la masse molaire du polymère, pour obtenir des chitosanes variés grâce à des hydrolyses basiques contrôlées.

Si l'extraction de la chitine est aujourd'hui facilement réalisable, l'étape la plus délicate reste la désacétylation qui nécessite de substituer suffisamment les groupements acétyles pour aboutir au chitosane, ce qui peut entraîner une réduction excessive de longueur de chaîne du polymère. En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur l'élévation de température, il est donc possible d'obtenir différents chitosanes à partir d'une même chitine. Un DA inférieur à 10% est rarement atteint par un procédé simple, la désacétylation totale nécessite plusieurs étapes. L'échantillon étant soit lavé, soit dissous et reprécipité entre deux cycles.

La désacétylation est généralement effectuée par le traitement avec l'hydroxyde de sodium ou potassium concentré (40- 50%) à une température ≥ 100°C, pendant au moins 30 minutes pour enlever certains ou tous les groupements acétyle de la chitine **(No et Meyers, 1995)**. La désacétylation ne peut pas être réalisée avec un réactif acide **(Muzzarelli, 1977).** Il y a plusieurs facteurs essentiels qui affectent le rendement de désacétylation comme la température, la durée, 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 ces paramètres, l'objectif idéal de désacétylation est de préparer un chitosane qui est non dégradé et parfaitement soluble dans l'acide dilué (acides acétique, lactique, citrique,...).

Chapitre II
Les applications de la chitine et du chitosane

Chapitre II
Les applications de la chitine et du chitosane

La chitine et ses dérivés possèdent une grande valeur économique à cause de leurs activités biologiques et leurs applications industrielles et biomédicales (Pawadee et *al*., 2003). La production et l'utilisation industrielle de la chitine et ses dérivés augmentent continuellement depuis les années 1970. Actuellement, à cause de leurs caractéristiques telles que le poids moléculaire, la charge cationique, leur capacité à stocker la vapeur d'eau, la formation des films et l'adsorption des métaux lourds, la chitine et ses dérivés ont divers champs d'application qui s'étendent de l'agriculture, le traitement d'eau, la fabrication du papier et des produits de beauté, à l'industrie pharmaceutique et la biotechnologie (Harkness et *al*., 2003 ; Preyanat et *al*., 2003).

II. 1. En agriculture

La chitine, le chitosane et leurs oligomères ont des propriétés fortes intéressantes. Ils peuvent, en effet, agir comme éliciteurs des mécanismes de défense des plantes (Leclerc, 1997) et leur confère une résistance systémique face à certains agents phytopathogènes (Bouarab, 2000).

Il a été démontré que le chitosane et ses dérivés, appliqués sur les tissus des plantes provoquent :

1) l'induction de plusieurs mécanismes biologiques, similaires à ceux observés lors de l'infection par des pathogènes (Côté, 1999).
2) la synthèse de plusieurs protéinases telles les chitinases et de certaines protéases inhibitrices.
3) l'accumulation de phytoalexines (Muzzarelli et Riccardo, 1983; Bouarab, 2000; Lateur, 2002).
4) l'augmentation de la lignification dans les tissus.

Les propriétés antifongiques que confèrent la chitine et ses dérivés ont fait l'objet de plusieurs études. Leur mécanisme d'action est un relâchement des molécules de la paroi des champignons, une augmentation de la vacuolation et la désintégration des protoplasmes des hyphes. Ce qui explique pourquoi l'agent pathogène ne peut coloniser les tissus racinaires en présence de chitosane (Bell et *al*., 1998 ; Côté, 1999 ; Laflamme, 2000).

Le chitosane permet également de prolonger le temps de conservation des fraises, des poivrons, des concombres et des tomates (El-Ghaout et *al*., 1992), à cause de sa capacité à former un enrobage semi-perméable (Ait Barka et *al*., 2004) qui modifie l'atmosphère interne des fruits en retardant le vieillissement rapide et le taux de respiration (Amilali, 1999).

Ali et *al* (1997) ont observé, suite à l'ajout de matière organique chitineuse, que les feuilles et les tiges de soja accumulent plus d'azote (Côté, 1999).

II. 2. Traitement des eaux usées et protection de l'environnement

Les rejets industriels colorés présentent un problème de résistance des polluants et constituent un impact pour l'environnement. En effet, la présence dans ces rejets des substances organiques ou minérales non biodégradables, voire toxiques, engendre un impact négatif sur le milieu récepteur (sol, cours d'eau, mer,…) (Gülbahar et *al*., 2007), ce qui impose leur traitement avant de les évacuer dans ce milieu. En particulier, les colorants contenus dans les effluents des textiles nécessitent des techniques physico-chimiques pour les dégrader telles que : la coagulation-floculation, oxydation, ultrafiltration, …). Cependant, l'utilisation de ces techniques reste limitée à cause du coût de traitement élevé ou des difficultés de gestion des boues qui en résultent. L'utilisation des substances chitineuses (chitine et chitosane) pour la décoloration des effluents par adsorption et par coagulation-floculation constitue une alternative aux différentes techniques de dépollution précédemment citées (Joseph et Laszlo, 1994 ; Elisane et *al*., 1998 ; Bribri et *al*., 2005).

La chitine, le chitosane et leurs dérivés sont également caractérisés par leur grande capacité d'adsorber des ions métalliques (Jaroslaw et *al*., 2005) tels que les ions Cd^{2+} (Benguella et Benaissa, 2002), et les ions Cu^{2+} (Bal et *al*., 2006; Taboada et *al*., 2003). Leur capacité à former des complexes avec des ions métalliques a été exploitée au Japon pour la purification des eaux (Shahidi et *al*., 1999).

Les dérivés du chitosane : N- 2-pyridyl- méthyl- chitosane (PMC), N- 2- thiényl-méthyl-chitosane (TMC) et N- 3- méthyl-thiopropyl chitosane (MTPC) peuvent sélectivement adsorber des métaux précieux tels que : l'or (III), palladium (II) et platinium (IV) dans l'acide chlorhydrique (Yoshinari et *al*., 1998). Le pouvoir chélateur de ces substances (Muzzarelli et Riccardo, 1970 ; Laurance et Mansur, 1980) est expliqué par la présence de groupement acétylamine ($NHCOH_3$) et le groupement amine ($-NH_2$) sur les polymères chitine et chitosane, respectivement (Mrunal, 2004).

Selon Bailey et ses collaborateurs (1999), le chitosane possède une affinité exceptionnelle pour l'adsorption des ions métalliques, avec une capacité supérieure à 1mmol de métal/g, pour la plupart des métaux lourds tels que l'arsenic.

En plus des métaux lourds, la chitine et ses dérivés peuvent être utilisés pour l'élimination des nitrates (Jaafari et *al*., 2001) et la pré-concentration du phénol et chlorophénol dans l'eau (Rhee Jae- Seong et *al*., 1998).

II. 3. Applications biomédicales et pharmaceutiques

II. 3. 1. En chirurgie

Les substances chitineuses ont la particularité de résister à la bile, aux jus pancréatiques et aux urines, ce qui justifie la fabrication des fils de suture en chitine (Wachter, 1998).

II. 3. 2. En ingénierie tissulaire

Le chitosane potentialise la différenciation des cellules ostéoprogenitrices et facilite la formation osseuse *in vitro* (Klokkevold, 1995). L'induction de la formation osseuse est aussi observée *in vivo*. Elle semble être favorisée par l'attraction des facteurs de croissance grâce aux propriétés poly cationiques du chitosane. Il constitue aussi un bon agent ostéoconducteur lors des chirurgies dentaires (Côté, 1999).

Dans un modèle de reconstitution tissulaire, Muzzarelli (1999) a montré que l'utilisation du chitosane active les macrophages et stimule les fibroblastes conduisant ainsi, à la formation de tissus vascularisés et physiologiquement normaux qui accélèrent la cicatrisation (Muzzarelli and Riccardo, 1983). Des analyses histologiques après implantation chez le rat, au niveau musculaire, ont montré une bonne tolérance des particules de chitosane par les tissus environnants (Côté, 1999). Il améliore également l'hémostase (Nettles, 2001).

II. 3. 3. En ophtalmologie

Les hydrogels sont de formes semi-solides susceptibles d'augmenter le temps de contact avec les tissus oculaires et d'améliorer la biodisponibilité des médicaments administrés localement comparativement aux collyres conventionnels. 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).

II. 3. 4. Traitement du cancer

Les chitosanes, seuls ou en complexe avec un polymère anionique, sont un excellent support pour le transport et le relarguage lent de principes actifs médicamenteux (Gogev et *al*., 2003 ; Jae-Young et *al*., 2006).

La biodégradabilité de ces biopolymères a permis de fabriquer des dispositifs plus précis, libérant des substances actives à la vitesse et à l'endroit choisis (Foscolo et Phillipon, 1997).

La bio adhésion est aussi une propriété d'utilité non négligeable dans l'utilisation du chitosane dans la libération d'agents thérapeutiques. Elle vise à augmenter le temps de résidence du système polymère/médicament et sa stabilité, par attachement du polymère à la surface ciblée et permettre ainsi une optimisation de l'assimilation médicamenteuse. Cette propriété est conférée par le caractère poly ionique. En fait, plus la densité de charge est importante, meilleure est l'adhésion du polymère (Côté, 1999).

Le chitosane a été abondamment utilisé comme excipient de base pour des formes injectables. La majorité des recherches dans ce domaine est axée sur l'utilisation du polysaccharide dans des formes galéniques de type microsphères ou conjugués macromoléculaires chargés en principes actifs appartenant à la classe des antinéoplasiques (mitoxantrone, 5-fluorourcile, ciplatine,

cytrabine et paclitaxel) (Felt, 1999 ; Anand et Ramesh, 2004).

II. 3. 5. Contrôle de l'hypercholestérolémie et du surplus de poids

Le chitosane a des propriétés hypercholestérolémiantes dans le serum et le foie (Ousamu et *al*., 1994 ;Kim Se-Jae et *al*., 1999), anti-ulcères, anti-arthriques et anti-uricémies. Le chitosane alimentaire réagit dans l'intestin et se lie avec les acides gras et autres lipides comme les triglycérides, les stérols, le cholestérol et les acides biliaires. Ces nouveaux composés chitosane-lipides sont fortement excrétés et réduisent d'autant la réabsorption intestinale (Muzzarelli et Riccardo, 1983 ; Muzzarelli, 1999).

Le chitosane est partiellement métabolisé par les bactéries de l'intestin et libère de la glucosamine et du N-acétyleglucosamine, deux produits reconnus pour soulager l'arthrose (Muzzarelli, 1999).

II. 3. 6. Activation du système immunitaire

Les chitosanes peuvent également déclencher la production du TNFα (Tumor Necrosis Factor) par les monocytes humains via les récepteurs lipopolysaccharidiques (Otterlei et *al*., 1994). En outre, il a été démontré qu'un chitosane partiellement désacétylé augmente l'activité cytolytique des macrophages péritonéaux. Enfin, il stimule également la production d'IL-1 (interleukine-1) par les macrophages péritonéaux chez la souris (Gogev et *al*., 2003).

L'efficacité du chitosane comme adjuvant (substance qui, lorsqu'elle est administrée en même temps qu'un antigène, augmente la réponse immunitaire à cet antigène) en vaccination est bien établie actuellement (Gogev et *al*., 2003). De plus, le chitosane a la capacité d'activer le complément qui intervient dans la défense immunitaire humorale non spécifique (Benesch, 2001).

Outre la formulation soluble de chitosane, de ses sels et dérivés, des nanoparticules et microparticules de chitosane ont été également administrés par voie intranasale (Soane et *al*., 2001). Il a été démontré que des nanoparticules faites de chitosane étaient efficaces pour augmenter l'absorption nasale d'insuline chez le lapin, le rat et le mouton (Gogev et *al*., 2003).

II. 3. 7. Activité anticoagulante

Au niveau sanguin, la chitine, le chitosane et leurs dérivés poly sulfatés ont des propriétés anticoagulantes, grâce à leurs structure proche de l'héparine, ils se comportent comme cette dernière en inhibant directement l'activité de la thrombine (Benesch, 2001 ; Preyanat et *al*., 2003 ; Jayakumar et *al*., 2006), et ne produisent ni hémolyse ni altération des lymphocytes et érythrocytes (Côté, 1999).

II. 4. Activité antimicrobienne

Le chitosane et ses dérivés inhibent la croissance d'une variété de microorganismes (bactéries et champignons). L'avantage que présente ces biopolymères par apport aux autres désinfectants c'est qu'ils soient biodégradables et présentent une faible toxicité vis- à- vis des cellules des mammifères (Xiao et *al*., 2001).

Aujourd'hui, l'activité antimicrobienne du chitosane et ses dérivés est bien déterminée, mais leur mode d'action reste inconnu (Jae-Young et *al*., 2006). Plusieurs mécanismes ont été proposés :

1- Altération de la perméabilité cellulaire en se fixant sur la membrane de la cellule (El- Ghaouth et *al*., 1992).

2- Inhibition de la synthèse protéique par l'interaction du chitosane et l'ADN ce qui bloque la formation de l'ARNm (Xiao et *al*., 2001).

3- A cause de son pouvoir chélateur, le chitosane fixe les ions métalliques inhibant ainsi la production de toxines et la croissance cellulaire (Jae-Young et *al*., 2006).

4- Inhibition de l'activité enzymatique par l'absorption des molécules d'eau (Shahidi et *al*., 1999).

II. 5. En industrie agro-alimentaire

La chitine et ses dérivés : chitosane, N-méthylène phosphonique chitosane (NMPC) et N-Lauryl- N- méthylène phosphonique chitosane (LMPC) sont des biopolymères qui ont la capacité de former des films biodégradables, d'immobiliser les enzymes et préserver les aliments contre la détérioration microbienne (Shahidi et *al*., 1999). Ils sont également utilisés comme additif alimentaire (Agulló et *al*., 2003). Le chitosane a été proposé également dans la composition d'aliments à faible teneur en sucre et en sel.

II. 6. En biotechnologie

Faisant partie des polymères cationiques, le chitosane permettrait la complexation de l'ADN et a le potentiel d'être utilisé en tant que vecteur non viral pour délivrer des gènes (Côté, 1999 ; Suna Özbas-Turan et *al*., 2003). Il a été utilisé également pour l'immobilisation des enzymes (Muzzarelli et Riccardo, 1980) et l'encapsulation des cellules des mammifères (Jinjiang, 1996).

II. 7. Autres applications

Le chitosane peut être appliqué dans l'industrie papetière. Les chimistes ont remarqué que la molécule de chitosane ressemble étonnamment à la cellulose. Il suffit de remplacer les groupements amines (NH_2) du chitosane par des groupements hydroxyles (OH) pour obtenir la cellulose. Des industriels américains comptent bien utiliser les dérivés du chitosane pour la fabrication de pâte à papier (Dubrana, 1992).

Dans l'industrie photographique, le chitosane est utilisé pour récupérer les sels d'argent qui viennent se fixer sur le bio polymère.

En Microbiologie, la chitine peut être utilisée comme source de carbone dans les milieux de culture de bactéries chitinolytiques telles que *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* K-187. Par conséquent, elle induit la production des chitinases (Wang et *al*., 1995 ; Chang et *al*., 2006) qui peuvent être extraites du milieu pour être utilisées comme des biopesticides (Kramer et Muthukrishnan, 1997), des antibactériens et des fongicides (Huang et *al*., 2005).

En outre, les hydrolysats de chitine sont également utilisés comme source de carbone et d'azote pour la production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU) (Ferrer et *al*., 1996 ; Shin et *al*., 2000).

Chapitre III
Les agents de contaminations

III. 1. Les moisissures

III. 1. 1. Définition

Les champignons, ou les mycètes, sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ces derniers peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important. Ces champignons sont appelés couramment «moisissures», véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser des substrats très divers (végétaux, papier, cuir, murs….).Il s'agit d'organismes hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes.

III.1.2. Identification des moisissures

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères culturaux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

a) Identification morphologique

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères culturaux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,…) (Cahagnier et Richard-Molard,1998).

b) Critères d'identification macroscopique

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).

La taille des colonies : Elle peut-être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor,Rhizopus*).

La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus, Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*).

c) Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998) à savoir : le thalle, les spores, l'aspect des spores, modes de formation des conidies, mode de groupement des conidies…etc

III. 1.3. Principaux genres fongiques

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus,Penicillium* et *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale. Dans notre travail, on a travaillé avec le genre *Fusarium.*

III.1.3.1. Le genre Fusarium

Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes

. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage.

- Caractères culturaux généraux

Les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA (potato-dextrose-agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37°C.

Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993).

- Morphologie microscopique

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (le nom de *Fusarium* vient du latin « *fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau).

III.1.3.2. Principales espèces de *Fusarium*

Compte tenu de leur fréquence dans les différents substrats, notamment les céréales, de leur potentiel toxinogène et de leur pouvoir pathogène, les principales espèces de *Fusarium* sont:*F. culmorum, F. graminearum, F. oxysporum et F. verticilloides* (*F. moniliforme*).

- *Fusarium culmorum*

Cette moisissure pousse rapidement sur géloses PDA et au malt. Les colonies sont duveteuses, d'abord blanches à jaunâtres ou roses puis ocracées à rouges brunâtre. Le revers est rouge à pourpre.

- *Fusarium verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*)

Ce champignon se développe rapidement sur les milieux classiques de culture (PDA et gélose au malt). Le thalle, d'abord blanc à pêche ou rose saumon, devient vinacé à violet. Le mycélium aérien est dense, floconeux d'aspect poudreux. Le revers peut être violet foncé, lilas, vinacé ou crème.

III.1.3.3. Importance du genre Fusarium

i) Potentiel toxinogène

Le genre *Fusarium* comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines : les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines (Tableau 4).

- *Fusarium poae, F. sporotrichioides, F. crookwellense, F. culmorum, F. graminearum* produisent des trichothécènes de types A et B ;

- *Fusarium verticillioides* (*moniliforme*) et *F. proliferatum* synthétisent les fumonisines ;

- *Fusarium culmorum, F. graminearum F. oxysporum* et *F. sporotrichioides* produisent de la zéaralénone (Pitt, 2000).

ii) Pouvoir pathogène

Les *Fusarium* sont, principalement, des phytopathogènes. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses.

Les*Fusarium* sont généralement impliqués dans la pourriture des racines, tiges et fruits ; dans la dégradation du système vasculaire (Trenholm *et al*., 1988).

Le pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux est varié. Certaines espèces sont à l'origine des kératites et endophtalmies. D'autres espèces (*F. solani, F. moniliforme*) sont impliquées dans des infections systémiques (Guarro et Gene, 1992)

- *Fusarium verticillioides* peut être un agent de fusarioses disséminées chez les patients infectés par le HIV (Duran *et al*., 1989).

III. 2. Les bactéries

***Staphylocoques aureus* (AATCC 25923):**

- **Morphologie:**

Staphylocoque aureus est, comme tous les staphylocoques, une coque à Gram positif d'un diamètre d'environ 1 micromètre apparaissant en amas à l'examen microscopique. Il est immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique.

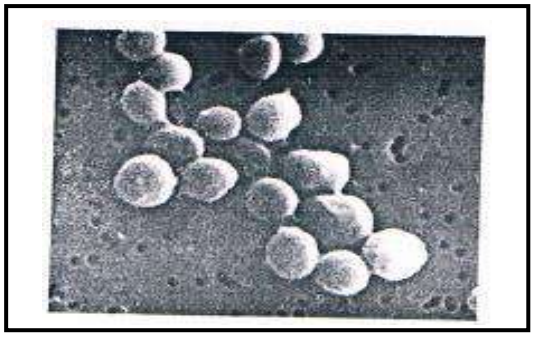


Figure III. 1: Vue microscopique de staphylocoque aureus.

o **Caractères de culture:**

Il se cultive facilement sur milieux ordinaires en aérobiose comme en anaérobiose en formant, sur milieux solides, des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune or d'où l'appellation Staphylococcus aureus **ou** staphylocoque "doré".

En milieu liquide, il produit, dans le bouillon, un trouble homogène. Il n'a pas d'exigences particulières. Si les conditions idéales de croissance sont une température de

37°C et un pH de *7,5,* de grandes variations sont tolérées. Comme tous les Micrococacceae, il se multiplie dans des milieux contenant une forte concentration de NaC1 *(5* à 10 g pour cent). Il est capable de transformer de nombreux substrats, notamment les sucres, ce qui na guère d'intérêt pratique sauf en ce qui concerne le mannitol (un polyalcool) que St. aureus peut fermenter contrairement à la plupart des SCN.

o **Équipement enzymatique:**

Outre ceux nécessaires aux fonctions métaboliques décrites ci-dessus, diverses enzymes peuvent être mis en évidence chez Staphylococcus aureus t catalase qui existe chez tous les Micrococacceae, coagulase, désoxyribonucléase, phosphatase, hyaluronidase, fibrinolysine, lipase et protéolysines qui caractérisent St. aureus.

La présence d'une coagulase identifie, en pratique courante l'espèce aureus. Il existe une coagulase libre et une coagulase liée. La coagulase libre est une protéine diffusible, réagissant comme la prothrombine et coagulant, en quelques heures, le plasma citraté de l'homme ou du lapin. La forme liée, ou dumping factor réagit directement avec le fibrinogène, entraînant l'agglutination des staphylocoques quand on les mélange à un plasma. L'activité de toutes ces enzymes explique, en partie, la

physiopathologie de l'infection staphylococcique ; leur recherche est, par ailleurs, utile pour la classification et le typage des souches.

O Pouvoir pathogène chez l'homme:

Staphylococcus aureus est d'abord un germe pyogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses ; il "surinfecte" souvent les plaies négligées. Les principales staphylococcies cutanées focales sont dues à la pénétration des germes au niveau des annexes de la peau (follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares) ou dans les muqueuses à l'occasion d'une plaie, même minime. Elles donnent lieu à des folliculites, furoncles, sycosis, anthrax, orgelets, hydrosadénites, panaris, onyxis périonyxis, impétigo, et abcès à localisations variées (sein, fesse, marge de l'anus, aisselle, aine ...) Plus rares sont les conjonctivites, angines, phlegmons de l'amygdale, otites ou sinusites. Ces infections cutanéo-muqueuses sont parfois le point de départ de suppurations profondes ou d'infections générales

o **Épidémiologie:**

Le principal "réservoir de virus" est la peau et les muqueuses de l'homme, qu'il soit malade ou bien-portant puisqu'on trouve, pan-ni les sujets indemnes de toute infection, 30 à *50%* de porteurs sains. On le trouve en particulier dans les narines. C'est une affinité du germe pour l'épithélium narinaire et le pouvoir d'y adhérer durablement qui explique sa prévalence dans le nez. La transmission manuportée est le mode essentiel de transmission et le réservoir nasal recontaminant rapidement les mains assure la pérennité de la transmission. Le portage intestinal est assez fréquent et n'a pas beaucoup de signification pathologique.

*o***Immunité:**

La fréquence du portage sain chez l'homme implique l'existence d'une immunité naturelle dont le support n'est pas encore bien établi. Puisque les staphylocoques sont des bactéries à multiplication extracellulaire (BME), la phagocytose est probablement le mécanisme le plus efficace. Une diminution des capacités phagocytaires des granulocytes se traduit par des infections staphylococciques fréquentes et récidivantes (granulomatose septique). Des anticorps apparaissent au cours des infections staphylococciques mais leur rôle protecteur est incertain (Staphylocoque <http ;//anne decoster free.fr /staph/staph/htm)

> Escherichia coli : (ATCC 35218):

Escherichia coli autrement appelé colibacille ou E. cou, est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain. Découverte en 1885 par Théodore Escherich, dans des selles de nourrissons, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'E. coli peuvent être pathogènes.

o**Description**

E. coli est un bacille pathogène gram négatif de la famille des entérobactéries. C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud. Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent l'accouchement. L'E. coli constitue alors tout au long de la vie de l'hôte l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin. E. coli est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour: en effet, l'ancienneté de sa découverte et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 ^{o}c dans un mileu riche) en font un outil d'étude aisé. La profusion de publications scientifiques qui la mentionnent en témoigne, et elle joue le rôle de « cheval de labour» dans tous les laboratoires de biologie moléculaire.

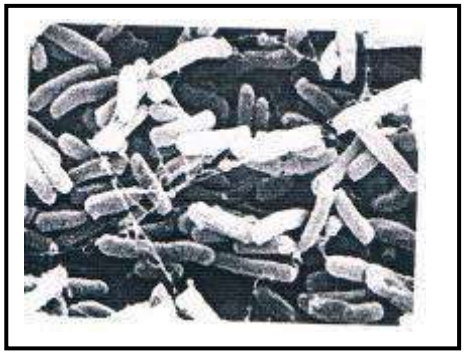


Figure III .2: vue microscopique *d'E.coli*.

o **Historiques:**

Théodore Escherich, en observant la fréquence des diarrhées néonatales, avait déjà posé la question de l'implication du colibacille dans les entérites. Après la deuxième guerre mondiale, les connaissances ont convergé pour établir le concept de virulence de certaines souches de E. coli. Dans les années 1950, de nombreuses souches d E. coli ont été incriminées en tant qu'agent étiologique de diarrhées infantiles. On sait maintenant que certaines souches «spécialisées» d'E. coli sont associées à des pathologies très diverses

(y compris extra-intestinales), tant chez l'homme que chez l'animal ; diarrhées, gastro-entérites, infections du tractus urinaire, méningites, septicémies, «maladie des hamburgers», le syndrome hémolytique et urémique etc. Mis à part cela, la plupart des souches d'E. coli sont bénéfiques et même essentielles. En prévention, .une surveillance nationale des SI-TU a lieu au Centre National de Référence des E. cou, situé dans l'unité de Biodiversité des Bactéries Pathogènes Émergentes à l'Institut Pasteur, qui est chargé d'étudier les souches pathogènes.

Depuis les années 1950, les bactériologistes ont essayé, grâce aux différences antigéniques de E. coli, de subdiviser l'espèce en sérotypes en immunisant des lapins avec des antigènes somatiques et flagellaires. La sérotypie reste la méthode la plus utilisée et la plus utile encore actuellement. Le sérotype est la combinaison des deux antigènes, somatique O et flagellaire H, (exemples: *0157:H7* et 0111:1-18), alors que le .ˢérogroupe n'est déterminé que par l'antigène O (exemple: *0157*, 0111). Cependant le .erotype n'est pas suffisant pour caractériser les E. coli pathogènes. Il est nécessaire de bien étudier chaque sérotype, qui n'est pas nécessairement relié à la pathogénicité.

O Critères d'identification *de E. coli:*

C'est une bactérie de la famille des Enterobacteriaceae ne possédant pas de désaminase, ce qui exclut les genres Proteus, Morganella et Providencia (typiquement ex-tribu des Proteae). Elle fermente le glucose par la voie des acides mixtes (Rouge de méthyle +, VP -) ce qui exclut les genres Kiebsiella, Enterobacter, Hafnia et Serratia (typiquement groupe des KEHS, ex-tribu des Klebsielleae).

De plus,

- Fermentation du lactose, du mannitol;
- Production d'indole à partir du tryptophane;
- Ne possède pas d'uréase;
- Ne produit pas d' H2S;
- Incapable d'assimiler le citrate en aérobiose.
- ONPG+
- TDA-
- Uréase-
- Indole +++
- VP- .(http://fr.wikipedia .org/wiki/Esherichia coli)

- ***Psodomonas aeruginosa* (ATCC 27853)**

Description : autrement connu sous le nom de **bacille pyocyanique**, **bacille du pus bleu** ou **pyo**, est une bactériegram-négative du genre *Pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles.

Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est — avec d'autres bactéries à gram-négatif — de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés).

Habitat : Germe ubiquitaire, vivant dans les sols et en milieu humide (nuages, robinets, bouchons), très résistant à de nombreuxantiseptiques, fréquent en milieu hospitalier, entraînant l'apparition (du fait de sa résistance aux antibiotiques) de véritables souches d'hôpital. Elle peut survivre dans de l'eau distillée ou salée, voire se développer dans certaines solutions antiseptiques ou antibiotiques.

Elle fait partie des germes couramment recherchés lorsque l'on procède à une analyse microbiologique d'un échantillon d'eau.

On pense qu'elle se renouvelle dans les hôpitaux via les fruits, plantes et légumes qui y entrent, c'est une des raisons qui explique pourquoi fleurs et plantes vertes sont interdites dans les chambres d'hôpitaux.

- Pouvoir pathogéne : Les formes de pathologie qu'elle engendre sont diverses : infection de l'œil, des plaies (surtout brûlures et plaies opératoires), desurines (surtout après sondages), gastro-intestinales et des poumons (par exemple après bronchoscopie), des méningites d'inoculation, des septicémies comme stade terminal d'infections graves ou complication chez des malades soumis à un traitement immunodépresseur, des leucémiques, etc. Elle induit facilement des infections systémiques chez les immunodéprimés (par une chimiothérapie ou par le sida) et chez les victimes de brûlures et de fibrose kystique (mucoviscidose).

- **Antibiorésistance et traitement :**

- *P. aeruginosa* est une bactérie robuste, naturellement très résistante aux antibiotiques et s'adaptant rapidement aux attaques médicamenteuses.

Sans sélection ni renforcement par des antibiothérapies antérieures, elle ne sera souvent sensible qu'à quelques antibiotiques : ticarcilline avec acide clavulanique, gentamicine, ciprofloxacine, ceftazidime, et pipéracilline seule ou avec ajout de tazobactam et acide borique. En 2008, les fluoroquinolones, la gentamicine ou l'imipénem sont encore efficaces, mais uniquement sur quelques souches bactériennes.

Si le patient a récemment reçu plusieurs antibiotiques, la bactérie sera vraisemblablement encore plus résistante et d'autant plus dangereuse. Cette antibiorésistance a été partiellement attribuée à des « pompes de flux » dans son biofilm, expulsant activement les composants antimicrobiens.P aeruginosa est également connue pour s'attaquer aux proteines duox composé de base du systeme de défense du poumon.

- **Contagion** :

Cette bactérie semble pouvoir être facilement véhiculée par l'eau, par l'air et par des particules (poussières) ou surfaces contaminées (fomites). La facilité de la contagion s'explique par son caractère ubiquiste, et — en milieu hospitalier — par le fait qu'elle peut facilement transférer ou acquérir des gènes de « *résistance antibiotique* » à partir d'autres bactéries de souches proches, mais aussi d'espèces plus éloignées.

- **Identification :**

Comme d'autres *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* sécrète un certain nombre de pigments : entre autres la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune-vert fluorescent) et la pyorubine(brun-rouge). *In vivo* elle sécrète aussi un biofilm, principal agent de sa résistance. C'est une bactérie lactose négative, c'est-à-dire dépourvue d'enzymes dégradant le lactose, pourvue d'une odeur de seringa (fleur de la famille des Philadelphacées encore appelée "jasmin des poètes") *in vitro*. Une reconnaissance préliminaire en laboratoire identifie ses colonies sur les géloses de type MacConkey (géloses contenant entre autres du lactose) à leur apparence de perles beiges, alors que les colonies de bactéries lactose positivessont roses. Pour une identification assurée, on recherche la présence des enzymes de type oxydase (élastase et protéase parmi d'autres) que cette bactérie sécrète. La production des deux pigments pyocyanine et fluorescéine, et la température de croissance optimale de 42 °C confirme l'identification.

P. aeruginosa utilise des flagelles pour la mobilité, des systèmes introduisant des protéines effecteurs dans les cellules hôtes, et un lipopolysaccharide qui supprime les réponses

immunitaires des hôtes en plus d'intervenir directement dans l'établissement d'infections persistantes[3].

Parmi les sécrétions de *P. aeruginosa*, on trouve donc des protéines (élastase et protéase) qui détruisent l'intégrité des tissus de l'hôte en dégradant leurs protéines telles que l'élastine, le collagène et les transférines. On trouve aussi des toxines de poids moléculaire faible comme la pyocyanine, affectant différents types de sites dans la cellule hôte.

P. aeruginosa cause également de la corrosion microbienne dans le diesel et le carburant d'aviation (microorganismes utilisant l'hydrocarbone). Il crée des masses gélatineuses sombres parfois appelées à tort « algues ».

Chez les plantes, *P. aeruginosa* induit des symptômes de pourriture molle (*soft rot*) chez l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) et lalaitue (*Lactuca sativa*) . C'est un agent pathogène puissant chez *Arabidopsis* et chez certains animaux: *Caenorhabditis elegans*,*Drosophila* et *Galleria mellonella*. Les associations de facteurs de virulence sont les mêmes pour les infections végétales et animales.

- **Identification de la souche :**

Ce sont des bacilles Gram -, souvent isolés à ciliature polaire. Cette bactérie possède l'oxydase.

- Elle est de type respiratoire A.S.
- VAG Oxydative.
- Elle est nitrate réductase +++.
- Glucose -.
- Elle ne produit pas d'H_2S.
- Elle utilise le mannitol.
- Elle utilise l'ion citrate comme seule source de carbone.
- Elle est gélatinase +.
- ADH+, Uréase+, Indole-, TDA-.

Des milieux d'isolements comme Muller-Hinton ou Cetrimide, sont aussi utilisés. Sur Muller-Hinton, la production de fluorescéine (pigment coloré diffusible de couleur verte) par la bactérie est observable. Sur Cetrimide, la production de la pyocyanine (pigment coloré diffusible

de couleur bleu) par la bactérie peut être vue, comme la résistance au cétrimide(antiseptique) et à l'acide nalidixique (antibiotique).

Des tests King A et King B peut être également pratiqués pour voir la production de pyocyanine et defluorescéinerespectivement. (http://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa).

Chapitre IV
Matériel et méthodes

IV. 1. Matériel

IV. 1. 1. Matériel biologique

- Biopolymères

La chitine commerciale (crabes) sigma aldrich ;

Le chitosane commercial produit Sigma- AIdrich.

- Les souches microbiennes

***Les bactéries pathogènes pour le test de l'activité antibactérienne**

Les souches microbiennes testées ont été fournies par le laboratoire central de l'hopital de Médéa. Il s'agit des souches *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Staphylococcus aureus* (ATCC25923).

***Les champignons pathogènes pour le test de l'activité antifongique**

Les deux champignons testés sont fournis gracieusement par le laboratoire de phytopathologie de l'INA il s'agit de *Fusarium comularum* et *Fusarium verticillioides.*

IV.1.2. Les milieux de culture

La composition des différents milieux utilisés au cours de notre étude est reportée dans l'annexe

- PDA (Potato Dextrose Agar)

Le milieu gélosé pomme de terre-glucose (pH 5,6) a permis le repiquage des souches fusariennes mais aussi la réalisation des tests d'inhibition. Le milieu est stérilisé par autoclave110°C pendant 20 min

- **Muller- Hinton** : ce milieu a permis la réalisation des tests d'inhibition (l'activité antibactérienne). .

IV. 1.3. Produits chimiques

- L'hydroxyde de sodium (NaOH) FLUKA ;

- L'acide acétique glacial 99,8 % REACHIM.

IV.2. Appareillage :

- Etuve de 70c° de marque Memert

- Autoclave de marque Memert

- Spectrophotomètre Infrarouge a transformation Fourier de marque SHIMADZU

IV. 3. Les Méthodes

IV. 3. 1 Méthode de préparation du chitosane

- **Mode opératoire** : on pese la chitine commercial puis on la dissout dans une solution de NaOH bien définit et on incube le mélange a une concentration et une durée bien pricise.

Les expériences étaient planifiées selon la matrice exprimentale représenté sur le tableau IV.1

Tableau IV. 1. : La matrice expérimentale.

N°	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	+	+	+	-	+
2	-	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+
4	+	-	-	+	+
5	-	+	-	-	+
6	+	-	+	-	-
7	+	+	-	+	-
8	-	-	-	-	-
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0

X_1 concentration du NaOH [30 40 50%]

X_2 Quantité de la chitine [1 3 5g]

X_3 volume du NaOH [50 100 150 ml]

X_4 temps de la réaction [20 jours 25 jours 30 jours]

X_5 température de la réaction [20 30 40°C]

IV. 3. 2. Méthodes d'analyse

IV.3.2.1. 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% .

IV.3.2.2. Spectroscopie infrarouge

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Réalisé au niveau du laboratoire d'analyse physico-chimique du Hall de technologie de l'Université de Médéa **.**

IV.3.2.3.Etude de l'activité antibactérienne et antifongique du surnageant des fermentations lactiques

-Activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose

Principe

C'est une méthode qualitative permettant de tester l'existence de l'activité antimicrobienne, qui se traduit par la formation d'une zone d'inhibition autour du disque contenant la substance à tester.

Mode opératoire

- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur 3 colonies pures et bien isolées et les faire suspendre dans un tube contenant 3ml d'eau physiologique stérile ;

- Trompé un écouvillon stérile dans la suspension de la souche à tester ;

- Ensemencer une boite de Pétri coulée précédemment par le milieu Muller Hinton en utilisant l'écouvillon après avoir l'essorer sur la paroi de tube ;

- A l'aide d'une pince stérile, tromper les disques, de 9mm de diamètres, stériles dans la solution à étudier ;

- Placer 4 à 5 disques en papier de 9mm de diamètre dans chaque boite ensemencée en nappe ;

- Les boites sont incubées à 37°C pendant 18- 24h.

- La lecture consiste à observer l'apparition des zones d'inhibition et mesurer les diamètres de ces zones en millimètre à l'aide d'une règle à l'extérieur de la boite.

- Etude de l'activité antifongique

Principe

Cette étude a été réalisée par la méthode des puits qui se traduit également par l'apparition des zones d'inhibition autour des puits contenant la substance à tester.

Milieu de culture.

Mode opératoire

- Les souches du *Fusarium* sont cultivées en boite de Pétri, sur milieu PDA gélosé et incubées à température ambiante pendant 5jours ;
- A partir du milieu solide on découpe trois disques et on ensemence un milieu PDA liquide.
- Incubation à température ambiante pendant 5 jours ;
- Cette culture (suspension de spores) va servir à ensemencer, par écouvillonnage, des boites de Pétri précédemment coulées avec du PDA gélosé ;
- laisser sécher à température ambiante pendant 15mn ;
- A l'aide d'une pipette pasteur, réaliser 4 à 5 puits ;
- Remplir les puits avec 100 µl de la substance à tester ;
- Incuber à température ambiante pendant 5jours ;
- La lecture se fait par observation de l'apparition des zones d'inhibition et la mesure du diamètre de cette zone.

Chapitre V
Résultat et discussion

V. 1. Préparation du chitosane

La préparation du chitosane passe par une désacétylation de la chitine en utilisant une solution concentrée de NaOH. La réalisation de nos expériences planifiées selon une matrice de plan d'expériences nous permis d'obtenir 12 biopolymères.

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

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V.1.

Tableau V.1. Résultats du test de solubilité

Le chitosane	Solubilité
Chit. 1	Soluble
Chit. 2	Non soluble
Chit. 3	Non soluble
Chit. 4	Non soluble
Chit. 5	Non soluble
Chit. 6	Soluble
Chit. 7	Soluble
Chit. 8	Non soluble
Chit. 9	Soluble
Chit. 10	Soluble
Chit. 11	Soluble
Chit. 12	Soluble
Chit. commer	Soluble

a) b)



Fig. V.1. chitosane (a) soluble (b) non soluble

Le tableau montre que les polymères issus des expériences N°1, N°6, N°7, N°9, N°10, N°11 et N°12 sont solubles, ce qui nous pousse à les appeler chitosane.

VI. 1.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Les résultats de l'analyse par spectroscopie infrarouge des chitosanes obtenus sont présentés dans la figure V.2.

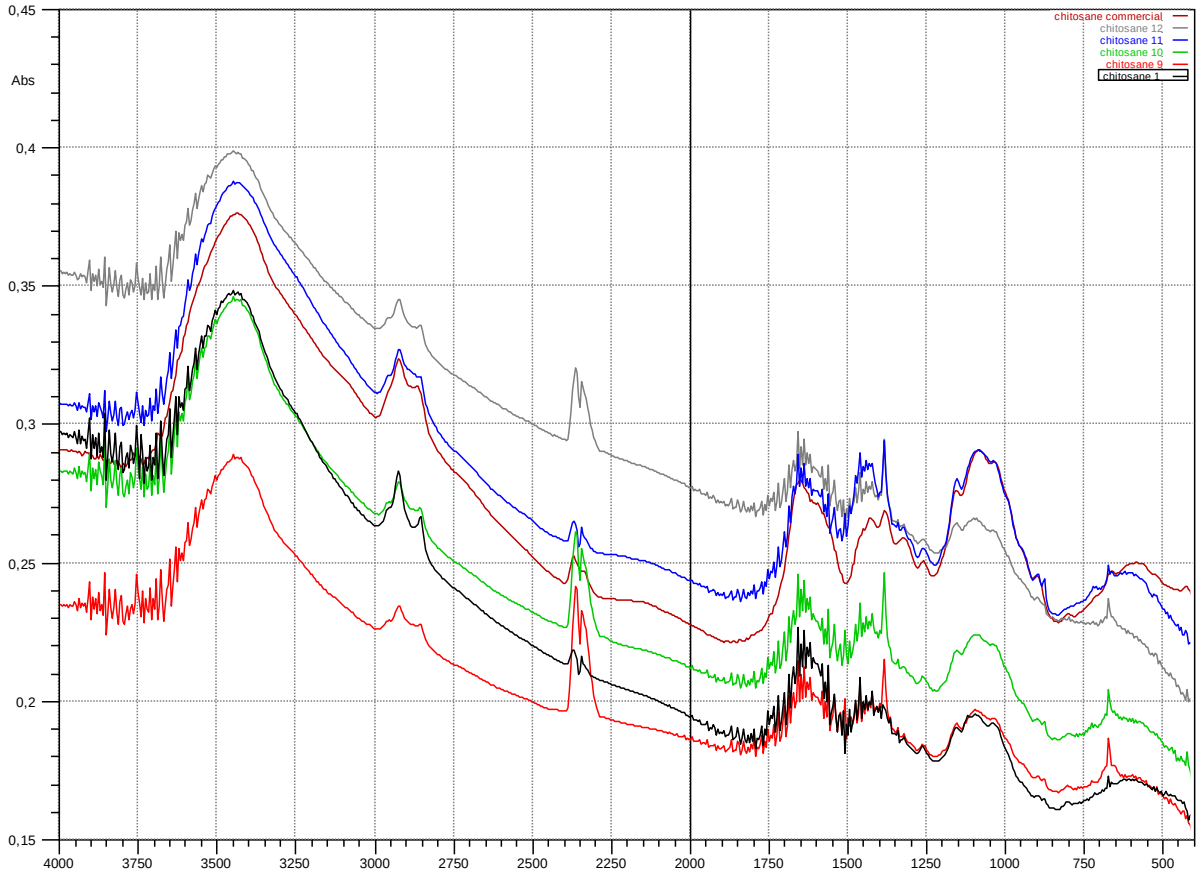


Figure V. 2. Spectres infrarouge des chitosanes obtenus et le chitosane commercial

La figure V. 2. montre qu'il y a une similarité entre les chitosanes obtenus et le chitosane commercial.

D'après les spectres prèsentès ,on remarque qu'il y'a une grande similaritè entre le spéctres de chitosane commercial et les autres polymères. Les memes pic caractéristiques du chitosane commerciale sont présentés dans la figure V.2. Ce qui nous confirme que les polymères issuent des expériences N° 1,6,7,9,10,11,12 sont des chitosanes.

Tableau V.2. Les principales bandes d'absorption IR de chitosane commercial et les chitosanes préparés

Bandes d'absorption IR cm^{-1}						**Liaisons**
Chit 1	**Chit9**	**Chit10**	**Chit11**	**Chit12**	**Chitosane commerciale**	
+	+	+	+	+	3480	C-H et N-H
+	+	+	+	+	1020	C-OH
+	+	+	+	+	2923et 1421	C-H
+	+	+	+	+	1310	C-N
+	+	+	+	+	1637	Amide I (C=O)
+	+	+	+	+	1091-1154	C-O-C
+	+	+	+	+	1381	CH_2 et CH_3
+	+	+	+	+	1601	Amide II (N-H)

(présent+,absent-)

V. 1.2. Caractérisation physico-chimique

Les propriétés physico-chimiques les plus importants du chitosane sont : le poids moléculaire, la viscosité et le degré de désacétylation (DD). Dans le cas de notre travail, on a pu faire seulement le DD. Les valeurs des DD de chitosane sont déterminées à l'aide des spectres FTIR des chitoanes par les formules suivantes :

$$A13\ 20/A1420 = 0.3822 + \mathbf{0.03\ 133.DA}$$

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau V. 3.

Tableau V. 3. Les degrés de désacétylation des chitosanes obtenus

Le chitosane	DD
Chit. 1	83,39
Chit. 6	82,59
Chit. 7	82,62
Chit. 9	82,92
Chit. 10	83,17
Chit. 11	83,38
Chit. 12	82,55
Chit. Commercial	81,69

Le tableau montre que les chitosanes préparés possèdent des DD qui varient entre 82 et 83%, et qui est proche de celui du chitosane commercial qui est de l'ordre de 81%. Ce qui nous laisse conclure que la désacétylation réalisée dans notre travail est efficace et que les conditions choisies peuvent être utilisé pour la production du chitosane.

IV. 3. Etude de l'activité antibactérienne et antifongique des chitosanes préparés

La méthode des antibiogrammes est la technique choisie pour évaluer l'activité antibactérienne et la méthode des puits pour évaluer l'activité antifongique des surnageants testés. Ces méthodes reposent sur le pouvoir migratoire des métabolites dans un milieu de culture solide. L'activité antimicrobienne des surnageants est évaluée en fonction du diamètre (mm) des zones d'inhibition de la croissance microbienne (Cheikh Touhami, 2013).

L'estimation de l'activité antimicrobienne des extraits des plantes (naturels) est basée sur une échelle de mesure mise en place par Meena et Sethi, 1994 et Ela et al., 1996 (Cheikh Touhami, 2013). Ils sont classés le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 4 classes (Cheikh Touhami, 2013) :

1. Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28 mm;

2. modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 16 mm et 28 mm;

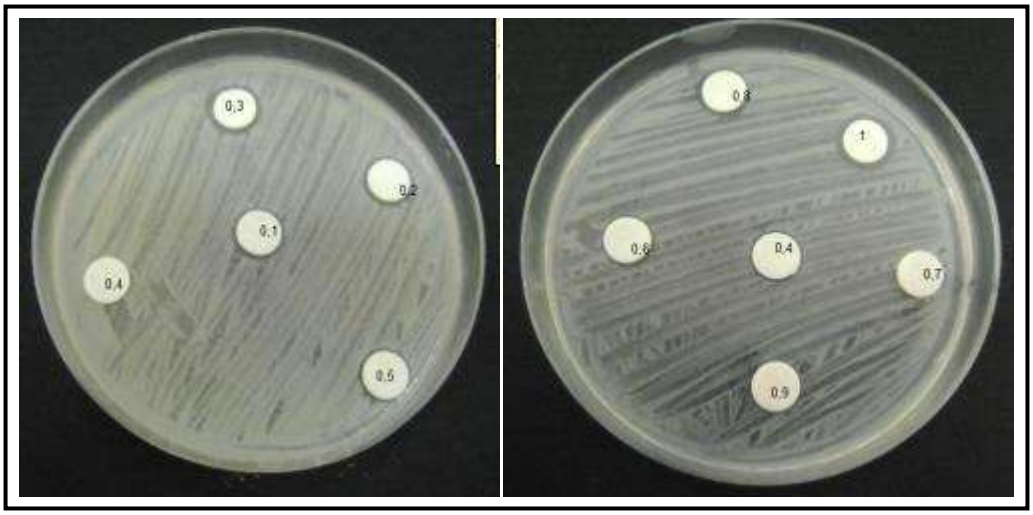
3. Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 10 mm et 16 mm;

4. Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm.

Dans le cas de notre étude on a suivi la même échelle puisqu'il s'agit de substance naturelle issue de l'activité d'un microorganisme.

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des chitosanes préparés nous a permis d'obtenir les résultats suivants (Fig. V. 3). Ainsi, les diamètres des zones d'inhibition sont présentés dans le tableau N° 4

a)



b)



Figure. V. 3. : Résultat de l'activité antibactérienne du (a) chitosane 7 et (b) chitosane 11 contre *Staphylococcus aureus*

Tableau N° V.4 : les zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes vis-à-vis les différents chitosanes

	Concentration (g/l)	***Staphylococcus aureus***	***Echerichia coli***	***Pseudomonas aeruginosa***
Chitosane commercial	0.1	0	10	Tres faible
	0.2	0	11	Tres faible
	0.3	0	0	Tres faible
	0.4	0	12	Tresfaible
	0.5	0	11	11
	0.6	11	10	10
	0.7	13	0	0
	0.8	14	15	10
	0.9	12	11	16
	1	10	11	22
Chitosane 7	0.1	11	12	0
	0.2	11	0	0
	0.3	12	10	0
	0.4	11	11	0
	0.5	11	0	10
	0.6	11	0	11
	0.7	0	15	0
	0.8	11	13	0
	0.9	0	12	11
	1	12	12	13
Chitosane 11	0.1	10	0	0
	0.2	13	11	0
	0.3	12	11	0
	0.4	15	10	0
	0.5	14	11	10
	0.6	11	14	11
	0.7	0	14	9
	0.8	0	12	13
	0.9	12	12	10
	1	13	1	14

Le tableau N° V.4 montre que le chitosane commercial est :

- Pour les *Staphylococcus aureus, E.coli* les diamètres d'inhibition varient entre 0 et 15 mm donc le chitosane est légèrement inhibiteur de ces deux germes. Pour *Pseudomonas aerugenosa,* les diamètres d'inhibition atteignent 22mm donc on peut dire qu'il est modérément inhibiteur.

Le chitosane 7 :

Pour *S.aureus* : les diamètres d'inhibition varient entre 0 et 12 mm donc on dit que le chitosane 7 est faiblement inhibiteur de *S.aureus*

- Pour *E .coli* : les diamètres d'inhibition varient entre 0 et 15 mm donc on dit que le chitosane 7 est légèrement inhibiteur de E.coli

- Pour *P.aerugenosa* les diamètres d'inhibitions varient entre 0 et 13 mm dans ce cas le chitosane 7est légerment inhibiteur de *P. aerugenosa.*

Le chitosane 11

- Pour *Staphylococcus aureus* les diamètres d'inhibition de chitosane 11 varient entre 0et 15 mm ce qui nous conduit a dire que le chitosane 11 est légèrement inhibiteur de *Staphylococcusaureus.*

- Pour *E .coli* les diamètres d'inhibition de chitosane 11 varient entre 0 et 14mm donc on dit que le chitosane 11 est légèrement inhibiteur de *E.coli*.

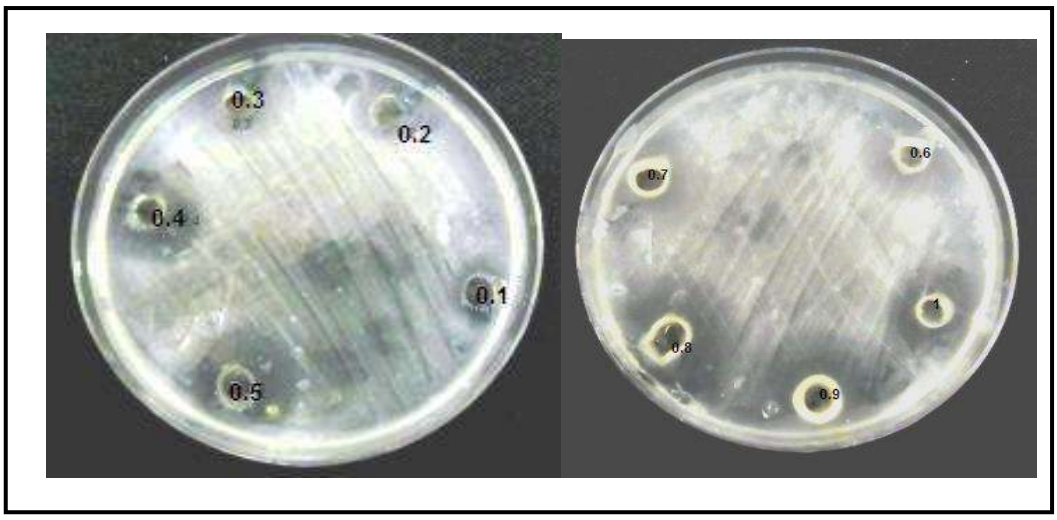
- pour *P.aerugenosa* les diamètres d'inhibitions varie entre 0et 14 mm dans ce cas le chitosane 11 est légèrement inhibiteur au *P.aerugenosa*

D'après ces résultats en déduit que :

- *L'activité antbaicterienne du chitosane varie en fonction des bactéries cibles*
- Son effet bactéricide est plus fort contre les bactéries gram positif que les bactéries gram négatif
- Concentration de chitosane surperieur à 0,5% était suffisante pour obtenir l'inactivation complète de *S. aureus ,P. aerugenos* Et à 0.1% pour *E.coli.Les* mêmes conclusions sont obtenues par Darmadji et Izumoto (1994), qui ont étudié l'effet antimicrobien du chitosane sur la conservation de la viande.

Les résultats de l'étude de l'activité antifongiques des chitosanes préparés nous a permis d'obtenir les résultats suivants (Fig.V.4.5). Ainsi, les diamètres des zones d'inhibition sont présentés dans le tableau N° V.5

a)



b)



Figure. V. 4. : Résultat de l'activité antifongique du (a) chitosane 7 contre *F.culmorum* et (b) chitosane 6 contre *F. verticilloide*

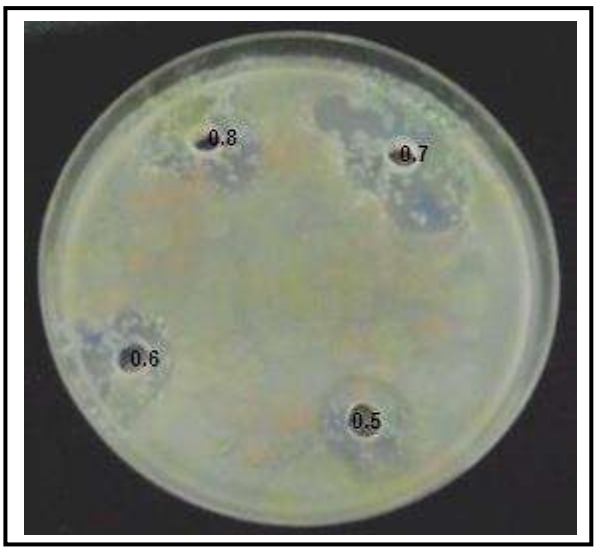


Figure. V. 5. : Résultat de l'activité antifongique du chitosane commercial contre *F. verticilloide*

Tableau V. 5. : Les zones d'inhibition (mm) des souches fongiques vis-à-vis des différents chitosanes préparés

	Concentration (g/l)	*Fusarium culmorum*	*Fusarium Verticilloides*
Chitosane commercial	0.1	0	0
	0.2	0	0
	0.3	0	12
	0.4	0	0
	0.5	0	12
	0.6	0	12
	0.7	12	
	0.8	0	12
	0.9	20	35
	1	22	22
Chitosane 7	0.1	11	0
	0.2	11	0
	0.3	12	0
	0.4	11	0
	0.5	11	0
	0.6	11	0
	0.7	0	0
	0.8	11	0
	0.9	0	0
	1	12	0
Chitosane 11	0.1	0	0
	0.2	0	0
	0.3	0	0
	0.4	0	0
	0.5	0	0
	0.6	12	0
	0.7	12	0
	0.8	12	0
	0.9	20	0
	1	0	0

Le tableau N° montre que le chitosane commercial est :

- Pour *F.culmorum* les diamètres d'inhibition varient entre 0 et 22 mm donc le chitosane commercial est modérément inhibiteur de . *F.culmorum*

-Pour *F*, verticilloide les diamètres d'inhibition atteignent 35mm donc on peut dire qu'il est fortement inhibiteur.de ce champignon.

Le chitosane 7 :

- Pour *F.culmorum*: les diamètres d'inhibition varient entre 0 et 12 mm donc on dit que le chitosane 7 est faiblement inhibiteur de *F.culmorum.*

- Pour *F*, verticilloide : les diamètres d'inhibitions sont nuls donc le chitosane 7 est non inhibiteur de. *F*, verticilloide.

Le chitosane 11

- Pour *F.culmorum :* les diamètres d'inhibition de chitosane 11 varient entre 0-20 ce qui nous conduit a dire que le chitosane 11 est modérément inhibiteur de *F.culmorum*

- Pour*F.verticilloide* : les diamètres d'inhibition de chitosane 11 varient sont nuls donc on dit que le chitosane 11 est non inhibiteur inhibiteur de .*F. verticilloide*

D'après ces résultats en déduit que :

- Concentration de chitosane de 0.6% peut inhiber la croissance alors que une 1% était suffisante pour obtenir l'inactivation complète de *F.culmorum*
- Concentration de chitosane commercial surperieur à 0,2% était suffisante pour obtenir l'inactivation complète. *F.verticilloide*
- Absence totale de l'activité fongique pour le chitosane 7 et 11 pour *F.verticilloide*

Discussion

Le mécanisme exact de l'action antimicrobienne du chitosane est encore inconnu mais certains mécanismes ont été proposés. L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement (Chen *et al.,*1996). L'interaction crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire (Shahidi *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 carbone C_2 (structure polycationique 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.*, 2000).

En ce qui concerne l'activité antifongique, le chitosane peut interagir avec la membrane des cellules pour altérer leur perméabilité. Par exemple, la fermentation avec la levure boulangère est inhibée par certains cations, qui agissent sur la surface des cellules de la levure en empêchant l'entrée du glucose. L'analyse par absorption UV a indiqué que le chitosane provoque considérablement une perte de matériels protéiques de *Pythium oaroecandrum* (Rabea *et al.*, 2003).

Le chitosane agit aussi comme un agent chélatant qui forme des complexes avec les traces de métaux et ainsi il inhibe la production des toxines et la croissance des champignons (Cuero et al, 1991).

Liu et al. (2000) ont rapporté que l'efficacité antibactérienne du chitosane augmente avec l'augmentation de sa masse molaire, de son degré de désacétylation et de sa concentration employée. En ce qui concerne l'influence du pH, l'activité antibactérienne du chitosane est plus efficace à pH faible. En plus, Sudharsan *et al*. (1992) ont également rapporté que le chitosane et ses dérivés n'ont pas d'effet bactéricide à pH 7, dû à la présence d'une proportion importante de groupements amine non chargés et à la faible solubilité du chitosane.

En outre, Ouattara *et al.* (2000) et No *et al.* (2002) ont montré que le chitosane pur a une activité antimicrobienne plus importante que le chitosane oligomère et ont montré que son effet bactéricide est plus fort contre les bactéries gram positif que les bactéries gram négatif.

Wang (1992) a observé que la concentration allant de 1 à 1,5 % de chitosane peut inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus* après deux jours en incubation dans un milieu de pH 5,5 et 6,5. De plus, Chang *et al.*, (1989) ont trouvé que la concentration de chitosane ≥ 0,5% était suffisante pour obtenir l'inactivation complète *de S. aureus*. Les mêmes conclusions sont obtenues par Darmadji et Izumoto (1994), qui ont étudié l'effet antimicrobien du chitosane sur la conservation de la viande.

Simpson *et al.* (1997) ont étudié, par ailleurs, l'effet antimicrobien des différentes cultures des bactéries présentes dans les crevettes brutes, avec différentes concentrations de chitosane. D'après leur étude, une quantité minimale de 0,02% de chitosane est nécessaire pour avoir l'effet bactéricide contre *Bacillus cereus*. Le même résultat a été obtenu par Chang *et al.* (1989).

De nombreuses études ont aussi montré l'effet du chitosane sur l'inhibition d'*Escherichia coli*. Wang (1992) a observé l'inactivation complète après deux jours en incubation avec 0,5 ou 1,0% (w/v) de chitosane dans un bouillon de viande à pH 5,5. Il a aussi rapporté que l'inactivation complète peut être atteinte après le premier jour avec une concentration de chitosane supérieure à 1% (w/v) en bouillon de viande. Alors que, Darmadji et Izumimoto (1994) et Simpson *et al* (1997) ont rapporté qu'une concentration ≥0,1 % doit être utilisée pour inhiber la croissance de *Escherichia coli*. Ces différents résultats seraient dus aux différents degrés d'acétylation du chitosane employé.

Il semble qu'il y ait une corrélation entre les propriétés physico-chimiques du chitosane et de ses dérivés avec l'activité antimicrobienne. Shin *et al.* (2001) ont trouvé que 0,5% du chitosane avec la masse molaire de 100 et 210 kg/mol inhibe effectivement *Staphylococcus aureus*, alors que 1,0 % est nécessaire avec le chitosane de masse molaire 1,8 kg/mol. Ce résultat est en accord avec Liu et al (2001) qui ont montré que l'activité antimicrobienne du chitosane augmente pour la gamme des masses molaires allant de 5 à 91,6 kg/mol. Cependant, pour la gamme des hautes masses molaires (de 91,6 à 1080 kg/mol), l'activité antimicrobienne diminue avec l'augmentation de la masse molaire. Par ailleurs, Ouattara *et al.* (2000) ont aussi rapporté que le chitosane ayant la masse molaire de 1671 – 1106 kg/mol est moins efficace que celui de 746 – 470 kg/mol. Normalement, l'activité antimicrobienne du chitosane est plus efficace avec l'augmentation de masse molaire d'où un nombre de groupements amine plus important. Par contre, il est possible que la solubilité du chitosane diminue avec l'augmentation de masse molaire. No *et al* (2002) ont également noté que l'activité antimicrobienne du chitosane varie en fonction de ses masses molaires et des bactéries cibles.

L'effet antifongique du chitosane sur la croissance in vitro des champignons pathogènes dans les cerises a été examiné par El Ghouth *et al.* (1992). D'après cette étude, le chitosane (avec DA≤ 7,2%) peut diminuer la croissance radiale de *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonifer* où l'effet d'inhibition est plus fort avec la plus grande concentration employée. En outre, ces auteurs ont confirmé l'efficacité du grand nombre de groupes de charge positive. Une baisse

d'activité a été observée avec N,O-carboxyméthylchitosane comparée à celle du chitosane pur. Dans une étude in vivo, El Ghaouth *et al*. (1992) ont rapporté qu'un début de l'infection des fruits enrobés par le chitosane a lieu après 5 jours de conditionnement (T =13°C), alors qu'il se produit après 1 jour pour le témoin. Après 14 jours du conditionnement (T=13°C), l'enrobage du chitosane à 15 mg/mL empêche la pourriture des cerises provoquée par les champignons et la maturation est normale (aucune apparence de l'infection fongique).

Roller et Covill (1999) ont rapporté que la concentration du chitosane de 1 g/L peut diminuer la vitesse de croissance de *Mucor racemosus* et une solution 5g/L peut empêcher complètement le développement de trois souches de *Byssochlamys sp*, dans un milieu agar à 25°C pendant 3 semaines. La présence du chitosane dans un jus de pomme (pH 3,4) de concentration allant de 0,1 à 5 g/L inhibe la croissance de huit levures à 25°C. Parmi les fongiques se trouvant dans les boissons gazeuses, la souche la plus sensible est *Zygosaccharomyces bailii* alors que la plus résistante est *Saccharomycodes ludwigii*.

Conclusion générale

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail est la production d'un biopolymère : le chitosane et étudier son activité antimicrobienne contre deux souches de champignons phytopathogène et trois souches bactériennes.

Dans la première partie de ce mémoire, on a pu produire le chitosane par désacétylation de la chitine. Ce résultat a été confirmé par le test de solubilité qui a montré que les biopolymères issus des expériences N° N°1, N°6, N°7, N°9, N°10, N°11 et N°12 sont des chitosanes. Ce résultat est confirmé par l'analyse par spectroscopie infrarouge qui a montré une similarité entre les spectres des chitosanes obtenus et celui du chitosane commercial.

La caractérisation physico-chimique des chitosanes préparés possèdent des DD qui varient entre 82 et 83%, et qui est proche de celui du chitosane commercial qui est de l'ordre de 81%. Ce qui nous laisse conclure que la désacétylation réalisée dans notre travail est efficace et que les conditions choisies peuvent être utilisé pour la production du chitosane.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, on a testé l'activité antibactérienne et antifongique des deux polymères produits par l'expérience N°7 et N°11 et le chitosane commercial, en utilisant deux méthodes : la méthode des antibiogrammes pour évaluer l'activité antibactérienne et la méthode des puits pour évaluer l'activité antifongique. Les résultats obtenus ont montré que :

-Le chitosane commercial est :

Légèrement inhibiteur pour *Staphylococcus aerus* et*E.coli.* Et qu'il est modérément inhibiteur pour *P .aerugenosa*

- Le chitosane 7 :

Légèrement inhibiteur de *E.coli*, légerment inhibiteur de *P. aerugenosa* et faiblement inhibiteur de *S.aureus*

Le chitosane 11

Légèrement inhibiteur de *Staphylococcusaureus, E.coli et P.aerugenosa*

Concernat l'activité anti fongique on a trouvé :

Le chitosane commercial est modérément inhibiteur de .*F.culmorum et*fortement inhibiteur du *F.verticilloides.*

Conclution générale

Le chitosane 7 est faiblement inhibiteur de *F.culmorum* et non inhibiteur de. *F*, verticilloide

Le chitosane 11 est modérément inhibiteur de *F.culmorum* est non inhibiteur de *F. verticilloide.*

En conclusion, d'après nos résultats on peut dire que les réactions de désacétylation ont été réalisées dans de bonnes et que les chitosanes obtenus sont similaires au chitosane commercial et présentent des activités antimicrobiennes intéressantes.

References Bibliographiques

1) -Agulló E., Rodriguez M. S., Ramos V. and Albertengo L., 2003. **Present and future role of chitin and chitosan in food.Macromol. Biosci., 3, 521-530.**

2-Ait Barka E., Eullaffroy P., Clément C. and Vernet G. 2004.**Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera L.* against *Botrytics cinerea*. Plant Cell. Rep. 22, 608-614.**

3-Amilali M.,1999. **Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO_2, O_2). Mémoire de maîtrise en sciences. Faculté d'agriculture, Alimentation et consommation, Université de Laval, Canada.**

4- Anand B. D. and Ramesh P., 2004. **Developement and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. The AAPS J., 6 (3) article 27.**

5- Andrade V. S., Benicio de Barros N., Kazutaka F. and Galba M.de Campos- Takaki, 2003. **Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides (Mucor javanicus IFO 4570)* a factorial study. Rev Iberoam Micol; 20, 149-153.**

6- Bal Y., Bal K. E., Laarabi- Bouamrane O. and Lallam A., 2006**. Copper (II) uptake by Pleurotus mutilus biomass, chitin and chitosan. Mineral Eng., 19 (14), 1456- 1458.**

7- Bell A. A., Hubbard J. C. And Li L., 1998. **Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of Fusarium Yellows of Celery. Plant Disease. 82 (3), 322-328.**

8- Benesch J., 2001. **Null Ellipsometry and protein adsorption to model biomaterials. Linköping studies in Science and Technology.**

9- Benguella B., Benaissa H., 2002. **Effects of competing cations on cadmium biosorption by chitin. Colloids Surf Part A. Physicochem. Eng. Aspects, 201, 143-150.**

10- Berger J., Reist M., Mayer J. M. Felt O. Peppas N. A. and Gurny R., 2004. **Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. Europ. J. of Pharmac. and Biopharmac., 57, 19-34.**

11- Bouarab K., 2000. **Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante- pathogène dans le système Chondrus crispus Acrochaeteoperculata. Thèse de Doctorat de l'University Paris 6.**

9-Bribri A., Hafad H., El- Krati M. and Lançar I. T., 2005.**Valorisation de certaines substances naturelles pour la décoloration des rejets liquides. 3ème Journée Internationale des Géosciences de l'environnement, El- Jadida.**

10-Cahagnier B., Richard-Molard D., **(1998), Analyse mycologique in *Moisissures desaliments peu hydratés*, Ed. Tec & Doc, p 140-158**

11-Caiqin Q., Qi X., Huirong L., Mu F., Yi L., Xinyou C. and Qiang L., 2004.**Calorometric studies of the action of chitosan- N-2- hydroxypropyl thrimethyl ammonium chloride on the growth of micoorganisms. Int. J. of Biol. Macromol., 34, 121-126.**

12-Chang Wen- Teish, Yu- Chung Chen and Chia-Ling Jao, 2006. **Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. Bioures. Technol., 98 (6), 1224- 1230.**

13-Chen, M.C., Yeh, G.H.C., Chiang, B.H., 1996, Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. J. Food Process Preserv. 20, 379-390.

12- Chih- Min Wen, Chien- Sheng Tseng, Chih- Yu Cheng and Yaw- Kuen Li, 2002. **Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. Biotechnol. Appl. Biochem. 35, 213-219.**

13- Côté N., 1999. **Impact agronomique de l'application de composts à base de résidus chitineux. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.**

14- Chermette R., Bussieras J.,(1993), **Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort**

15- Desbrières J., 2003. **Amphiphilic derivatives of chitin and chitosan : Rheological and tensioactive properties. European symposium: Biopolymers: Health, Cosmetic & food applications. Polymerix 21-22 May 2003, Rennes, France.**

16- **.** Duran J.A., Malvar A., Pereiro M., Pereiro Jr. M., (1989),***Fusarium moniliforme*** **keratitis,** ***Acta ophthalmol., Scand*****. 67, 710-713**

14-Dubrana D., 1992.**Chimie industrielle : Les industriels se mettent au homard.Sciences et vie.**

15-El- Ghaout A., Arul J., Asselin A., Benhamou N, 1992.**Antifungal activity of chitosan on two post- harvest pathogen of strawberry fruits. Phytopath ; 82, 398-402.**

16-Elisane Longhinotti, Fabida Pozza, Ligia Furlan, Maria de nazaré de M. Sanchez, Marilene Klug, Mauro C. M. Laranjeira and Valfredo T. Favere, 1998.**Adsorption of anionic dyes on the biopolymer chitin. J. Braz. Chem. Soc., 9 (5), 435-440.**

17-Falini G., Weiner S. and Addadi L., 2003. **Chitin- silk fibroin interactions : relevance to calcium carbonate formation in invertebrates. Calci. Tiss. Int., 72 (5).**

18-Felt O., 1999. **Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de doctorat d'état. Université de Genève.**

17- Fernandez- Kim S. O.,2004. **Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Thesis of the Louisiana State University.**

18- Ferrer J., Paez G, Marmol Z., Ramones E., Garcia H. and C. F. Forster, 1996. **Acid hydrolysis of shrimp shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. Biores. Techno., 57, 55-60.**

19- Foscolo J. and Phillipon P., 1997.**Des molécules qui miment le vivant. Biofutur 171, 14-17.**

20- Freier T., Montenegro R., Koh H. S. and Shoichet M. S., 2005. **Chitin- based tubes for tissue engineering in the nervous system. Biomaterials, 26, 4624-4632.**

21- Gagné Nellie, 1993. **Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. Master of Sciences. McGill University, Montreal.**

22- Gogev S., Versali M.- F.and Thiry E., 2003.**Les chitosanes- nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. Ann. Méd. Vét., 147, 343-350.**

23- Graham G. Allan and Mark P., 1995. **Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. Carbohy. Resea., 277, 257-272.**

24- Guarro J., Gene J., (1992)**, Fusarium infections, Criteria for the identification of the responsible species,** ***Mycoses*****, 35, 109-114**

25- Gülbahar Akkaya, Ilhan Uzun and Fuat Güzel, 2007. **Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitin. Dyes and pigments 73, 168- 177.**

26- Hirotoshi E., Yasuaki T., Noriaki O., Toshihiro K. and Toshiki W., 2004**. A crustacean Ca^{2+} - binding protein with a glutamate- rich sequence promotes $CaCO_3$ crystalization. Biochem. J., 384, 159-167.**

27- Hitoshi S. and Yoshihiro S., 1999. **Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N- acetylated or N- alkylated partially deacetylated chitins. Carbohy. Polymers, 39, 127-138.**

28- Hobel C. F. V., 2004. **Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. PhD thesis, University of Iceland.**

29- Huang C-J., Wang T-K., Chung S-C. and Chen C-Y., 2005. **Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28- 9. J. of Biochem. and Mol. Biolo., 38 (1), 82-88.**

30- Jae- Young Je and Se- Kwon Kim, 2006. **Antimicrobial action of novel chitin derivative. Biochimia et Biophysica Acta, 1760, 104-109.**

***28*- Jayakumar R., Nwe N., Tokura S. and Tamura H., 2006. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. International Journal of biological macromolecules. Int. J. Biol. Macromol., 40 (3), 175- 181.**

29-Jinjiang L., 1996. **The colloidal and liquid crystal properties of surface modified chitin crystallites. Thesis of Doctor of Philosophy. Mc Gill University. Montreal, Quebec, Canada.**

30-Joseph A. Laszlo, 1994. **Removing acid dyes from textile wastewater using biomass for decolorization. American Dyestuff Reporter.**

31-Jung W. J., Jo G. H., Kuk J. H., Kim K. Y. and Park R. D., 2005b. **Extraction of chitin from red crab shell waste by cofermentation with *Lactobacillus paracasei sub sp. tolerans sub sp. tolerans kctc- 3074* and *Serratia marcescens FS-3*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71 (2), 234-237.**

32-Jung W. J., Kuk J. H., Kim K. Y. and Park R. D., 2005a. **Demineralization of red crab shell waste by lactic acid bacteria fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67 (6), 851-854.**

33- Kamiyama K., Onishi H. and Machida Y., 1999. **Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol- chitosan in normal and tumor- bearing mice. Biol. and phama. bull. 22 (2), 179-186.**

34-Kamst E. and Spaink P. H., 1999. **Functional domains in the chitin oligosaccharide synthase NodC and related β- polysaccharide synthases. Trends in Glycosc. and Glycotechno., 11 (60), 187-199.**

35-Kiefer, 1999. **Le chitosane : http://www.France.com/kiefer/Es.htm.**

36-Kim S- J., Kang S- Y., Park J- G., Park S- L., Lee Y- D. and ko Y- H., 1999. **Effects of chitooligisaccharides on Crabon tetrachloride induced liver injuryrats: http:/www.kunpoong.co.fr.kr/PDF/eng/Effect_of_Carbon_Liver_injury_in_rats.PDF.**

37-Kittur F. S., Harish P. K. V., Udaya S. K., Tharanathan R. N., 2002. **Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning colorimetry carbohydrate polymers. 49, 185-193.**

38-Klokkevold P. R., 1995. **The effet of Poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan (chitosan) on osteogenesis in-vitro. Master of Science in Oral Biology, University of California, Los Angeles.**

39-Kramer K. J. and Muthukrishnan S., 1997. **Insect chitinase : Molecular biology and potential use as biopesticides. Insect. Biochem. Molecular. Biol., 27, 887-900.**

40-Kramer K. J., Carol D- T. and Daizo K., 1985. **Chitin metabolism in insects, In: Kerkut G. A. and Gilbert L. I. Comprehensive insect physiology biochemestry and pharmacology. 3: Integument, respiration and circulation, 625. Prgamon Press Oxford. New York. Toronto. Sydney. Paris. Frankfurt.**

41- Kurita K., 2001. **Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. Prog. Polym. Sci., 26, 1921-1971.**

42- Lanveer A. K., Kok K. P. and Hung S. C., 2002. **Reporting degree of deactylation values of chitosan: the influence of analytical methods. J Pharm Pharmaceutic Sci., 5 (3), 205-212**

43- Lateur M., 2000. **Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 6 (2), 67- 77.**

44- Laura Ramírez- Coutiño, María del Carmen Marín- Cervantes, Sergio Huerta, Sergio Revah and Keiko Shirai, 2006.**Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. Process Biochemistry, 41, 1106-1110.**

45- Laurance D. Hall and Mansur Yalpani, 1980. **Enhancement of the metal- chelating properties of chitin and chtoisan. Preliminary Communication Carbohydrate Research, 83, C_5-C_7.**

46- Leclerc H., Gaillard J- L. and Michel S., 1995.**Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. 535. Doin éditeurs, Paris.**

47- Leclerc Ph., 1997. **Caractérisation microbiologique des composts à base de résidus chitineux. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.**

48- Liu, H., Du, Y., Wang, X., Sun, L., 2004**, Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. Int J Food Microbiol. 95, 147-155.**

48- Majeti N. V. Ravi Kumar, 2000.**A review of chitin and chitosan applications. React. & Func. Poly. 46, 1-27.**

49-Manisara P., Ratana R. and Pitt S., 2003. **Characterisation of beta- chitin/ poly (vinyl alcohl) blend films. Polymer testing, 22, 381- 387.**

50-Merzendorfer Hans and Lars Zimoch, 2003. **Chitin metabolism in insects : structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. The J. of Experiment. Biol. 206, 4393- 4412.**

51- MOKRANI N.,2013. **Preparation et etude du comportement de membrane biopolymere alginate de soduim / chitosane .Memoire de magister .Université M'hamed bougara boumerdes**

51-Montserrat R. P., 2002. **Developpement of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals. Memdria presentada per optar al grau de doctor en ciencies quimiques- Menicio doctor Europeu.**

52-Morfin I., Hazot P., Guillot F., Soler C., Korwin-Zmijowska C., Tahiri K., Chevalier X., Corvol M. and Domard A., 2002. **Percolating hydrogels for tissue engineering. Europ. Cells and Materials, 4. suppl., 55- 56.**

53-Morimoto M., Saimoto H. and Yoshihiro S., 2002. **Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. Trends in Glycosc. and Glycotechno., 14 (78), 205- 222.**

54- Mrunal R. T., 2004.**Synthesis and antibacterial assessment of water- soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. Doctor of philosophy. Louisiana State University.**

55-Muzzarelli A. A. Riccardo, 1980. **Immobilzation of enzymes on chitin and chitosan. Enzyme Microb. Technol., 2, 177- 184.**

49- Muzzarelli A. A. Riccardo, 1988. **Carboxymethylated chitins and chitosans. Carbohy. Polym., 8, 1-21.**

50- Muzzarelli A. A. Riccardo, Fabio Tanfani, Gianfranco Scarpini and Giuseppe Laterza, 1980. **The degree of acetylation of chitin by gas chromatography and infrared spectroscopy. J. of Biochem. and Biophy. Methods, 2, 299-306.**

51- Muzzarelli A. A. Riccardo, Marco Tomasetti and Pierluca Ilari, 1994. **Depolymerisation of chitosan with the aid of papain. Enz. Microb. Technol., 16, 110- 114.**

52- Muzzarelli A. and A. Riccardo, 1970. **Uptake of Nitrosyl 106- Ruthenium on chitin and chitosan from waste solutions and polluted sea- water. Wat. Resea. Pergamon Press, 4, 451-455.**

53- Muzzarelli A. and A. Riccardo, 1983. **Chitin an dits derivatives : New trends of applied research. Carbohy. Polym., (3), 53- 75.**

54- Muzzarelli R. A. A., 1999. **Clinical and biochemical evaluation of chitosan for hypercholesterolemia and overweight control. Chitin and chitosanases. Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland.**

55- Nadarajah K., Kader J., Mohd M. and Paul D. C., 2001. **Production of chitosan by fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4 (3), 263- 265.**

56- Nettles D. L., 2001. **Evaluation of chitosan as a cell scaffolding material for cartilage tissue engineering. Master of Science. Mississipi State University.**

57- No H. K., Meyers S. P. and Lee K. S., 1989. **Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. Journal of agricultural and food chemistry. 37 (3), 575- 579.**

58-No, H.K., Park, N˜Y., Lee, S.H., Meyers, S.P., 2002, **Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int 1 Food Microbiol. 74, 65-**

59-Onar N. and Sariisik M., 2000. **Using and properties biofibers based on chitin and chitosan on medical applications:**Otterlei M., Varum K. M., Ryan L. and Espevik T., 1994.**Characterization of binding and TNF- alpha- inducing ability of chitosans on monocyts: the involvement of CD 14. Vaccine, 12, 825-832.**

60-Ousamu K., Kejjï D., Youji I. and Eiichi K., 1994. **Increasing effect of a chitosan and ascorbic acid mixture on fecal dietary fat excretion. Biotech. Biochem, 58(9), 1617-1620.**

61-Pawadee M., Malinee P., Thanawit P.and Junya P., 2003. **Heterogenous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. Carbohy. Polym., 52, 119-123.**

62-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**

63-Poirier Martin, 2000. **Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,N-Diméthylacétamide/ chlorure de lithium. Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université Laval, Canada.**

64-Preyanat V., Warayut S., Watchara K., Damrus S. and Prachya K., 2003. **Anticoagulant activities of the chitosan plysulfate synthesized from marine crab shell by semi- heterogenous conditions. Science Asia, 29, 115-120.**

65-Pitt J.I., (2000), **Toxigenic fungi and mycotoxins, Br. Med. Bull., 56 (1), 184 - 192.**

66-Ouattara, B., Sabato, S.F., Lacroix, M., 2001, Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (Penaeus spp.). Int.1. Food Microbiol. 68, 1-9.

67-Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A., Holley, R.A., 2000a**, Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. 1. Food Sci.**

65, 768-773.

68-Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., Holley, R.A., 2000b, **Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepare**d with chitosan. Int. J. Food Microbiol. 62, 139-148.

69-Rabea, E.I., Badawy, M.E., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W., 2003, Chitosan as **antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromol. 4, 1457-1465.**

70- Roberts, G.A.F., and Domszy, J.G. **« Determination of the viscornetric constants for chitosan », Int. J. Biol. Macromol., vol 4, n°6, 1982, p: *374-377***

71- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M.,Owen, M., Fletcher, H., 2002, **Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. Meat Sci.** 62, 165-177.

72-Rhee J-S., Jung M-W. and Paeng K-J., 1998. **Evaluation of chitin and chitosan as a sorbent for the preconcentration of phenol and chlorophenols in water. Analytical sciences. 14, 1089-1092.**

73-Roderick Bain, 1998. **Microencapsulation of prawn feed using chitin. Undergraduate thesis. University of Queensland.**

74- Säkkinen M., 2003. **Biophamaceutical evaluation of microcrystalline chitosan as release-rate- controlling hydropholic polymer in granules for gastro- retentive drug delivery. University of Helsinski.**

75- Seda Alper, Sebnam Harsa, Yekta Goksungur and Ali Fazil Yenidunya, 2004. **Fungal chitosan production from molasses. Biotechnology: www.b5srl.com.**

76-Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.-J., 1999, **Food applications of chitin and chitosans.Trends in Food Sci. Technol. 10,37-51.**

77-Shahidi F., Janak K. V. A. and Jeon Y-J., 1999. **Food applications of chitin and chitosans. Tends in Food Sci. and Techno., (10), 37-51**

78-Shigemasa Y., Saito K., Sashiwa H. and Saimoto H., 1994. **Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. Int. J. Biol. Macromol., 16 (1) : 43-49.**

79-Shin H. P., Lee J-H. and Hong K. L., 2000. **Purification and characterization of chitinase from a Marine Bacterium*, Vibrio sp. 98CJ11027*. The J. of Microbiol., 38 (4), 224- 229.**

80- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., 1992, Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnol. 6, 257-272

Shobhan S.and Lawrence H. B., 2000. **Chitosan as an enhabling excipient for drug delivery systems I. Molecular modification. International Macromole., 27, 181- 186.**

81- Suna Ö- T., Cenk A., Levent K., Meral K- U. and Jülide A., 2003. **Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non- viral gene delivery vehicle. J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 6(1), 27-32.**

82- Suzuki S., Watanabe T., Mikami T. and Suzuki M., 1990. **Proccedings of the 5th International Conference on chitin and chitosan, USA, 96- 105.**

83- Svitil L. A., Sinéad M., Ni C., Jessica A. M., and Kirchman D. L., 1997. **Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium vibrio harveyi growing on different forms of chitin. Appl. and Environ. Microb. 68 (2), 408-413.**

84- Taboada E., Gustavo C. and Galo C., 2003. **Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. J. Chil. Chem. Soc. 48 (1).**

85- **Tsai, G.J., Su, W.H.,** Ch˜n, **H.C., Pan, C.L., 2002, Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. Fish. Sci. 68, 170-177.**

86- **Trenholm H.L., Prelusky D.B., Young J.C., Miller J.D., (1988), Reducing Mycotoxins in Animal Feeds, *Agriculture Canada*, A63, 1827-1988**

87- Wachter R., 1998. **Chitosan- more than just skin protection. Abriged version of a paper presented at the "Seminar der arbeitsgemeinschaft für pharmazeutische verfahrenstechnik (APV) in Marburg from 30th september to 1st october.**

88- Wang SL., Chang WT. and Lu M. C., 1995. **Production of chitinase by *Pseudomonas aeruginosa K- 187* using shrimp and crab shell powder as a carbon source. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B, (2), 105-112.**

89- Wee Young-Jung, Hyang- Ok Kim, Jong- Sun Yun and Hwa- Won Ryu, 2006. **Pilot- Scale lactic acid production via batch culturing of *Lactobacillus sp. RKY2* using corn steep liquor as a nitrogen source. Food Technol. Biotechnol. 44 (2), 293-298.**

90- **www.France-chitine.com/fab.e.htm**

91- Xiao F. L., Yun L. G., Dong Z. Y., Zhi L. and Kang D. Y., 2001. **Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. Journal of applied polymer science, 79, 1324- 1335.**

92- Yang J-K., Shih I-L., Tzeng Y-M. and Wang S-L., 2000. **Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme and microbial technology, 26, 406- 413.**

93- Yang Y- P., Xu X- H., Chen H- F., 2004.**Treatment of chitin-producing wastewater by micro- electrolysis- contact oxidization. Journal of Zhejiang University Science. 5 (4): 436- 440.**

94- Yoshinari B., Naohiko M., Kohishiro S. and Yoshinobu K., 1998. **Selective adsorption of mercury (II) on chitosan derivatives from hydrochloric acid. Analytical sciences, 14, 687- 690.**

95- **Staphylocoque <http ;//anne decoster free.fr /staph/staph/htm) http://fr.wikipedia .org/wiki/Esherichia coli) (http://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa**

Annexes

A. La gélose Mueller-Hinton :

La **gélose Mueller-Hinton** est une gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard

Composition :

- infusion de viande de bœuf : 300,0 ml
- peptone de caséine : 17,5 g
- amidon de maïs : 1,5 g
- agar : 17,0 g
- pH = 7,4

Préparation

38 g par litre. Stérilisation à l'autoclave. Pour préparer ce milieu il faut peser 38g de poudre et la mélanger dans 1L d'eau. Il faut homogénéiser puis chauffer en agitant. Il faut porter à ébullition pendant environ une minute. Ensuite il faut stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 minutes à 116°C.

B.La gélose dextrosée à la pomme de terre : (en abrégé « PDA », pour *Potato dextrose agar*) est un milieu de culture microbiologique courant produit à base d'infusion de pomme de terre et de dextrose.

Utilisation :

C'est le milieu de culture le plus largement utilisé pour cultiver des champignons et des bactéries qui attaquent les plantes vivantes ou la matière organique végétale en décomposition.

Préparation :

L'infusion de pomme de terre se prépare en faisant bouillir dans l'eau 200 g de pommes de terre tranchées (lavées mais non pelées) pendant 30 minutes à 1h puis en laissant décanter le bouillon obtenu ou en le filtrant à travers un coton à fromage. On dilue ensuite en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final d'un litre. Puis on ajoute 20 g de dextrose et autant d'agar-agar en poudre avant une stérilisation par autoclave à 100 kPa pendant 15 minutes