République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Yahia Fares - Médéa
Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de Master En Biologie

Spécialité : ***Microbiologie Appliquée***

Présenté Par:

FERGANI Radhia

Thème :

Etude de l'activité antibactérienne d'un biopolymère

Le Jury composé de :

Dr. EULDJI A.	Université de Médéa	**Présidente**
Dr. TERKMANE N.	Université de Médéa	**Examinatrice**
Dr ARBIA W.	Université de Médéa	**Encadreur**

Année Universitaire ***2019- 2020***

REMERCIMENT

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

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

Dr.ARBIA W.enseignanteà 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 Dr. EULDJI AMEL.enseignante à àl'université Yahia.Ferès de Médéa, en acceptant de présider le jury proposé pour la soutenance de monmémoire.

Je tiens également à remercier.Enseignante Dr.TERLMANE NAILA à l'université de Médéa pour ses remarques

Qu'elle a porté à ce travail en acceptant de l'examiner et de le juger.

Mes vifs remerciements vont à mes chers parents,

et ma sœur Djawida qui m'ont soutenu, dans tous les sens du terme, pourque je concrétise ce travail.

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

loin pour la réussite de ce travail.

Dédicace

je dédie ce modeste travail à :
Mes parents qui ont sacrifiés corps et âmes pour la réussite de mes etude s

Mes très chères sœurs Djawida et Oumaima .

Mon cher frère Mohammed
Ma meilleure copine Hadjer
Ma chère tante Salima et son fils Younes
Ma collègue detravail AtikaSadouki pour m'avoirencouragé.
A mes chères amiesAnfel, Sabiha,Hadjer
Toute la famille Fergani.



تلخيص

خلال هذاالعمل قمنابجلب جزئ حيوي طبيعي مستخرج من موادبحريه وهوالكيتوزان وقمنابتشخصيه بواسطهFTIRوتقييم نشاطه الضد بكتيري

بالاضافه إلىتقييم النشاط البكتيري لكل من منقوع الحرمل والشيح وكذلك زيت الأساسي للشيح والريحان بالاضافه إلى عصيرالثوم والبصل وكلهاعباره عن نباتات معروفه بخصائصهاالعلاجيه الكثيره وعلى حسب النتائج المتحصل عليهاقمنا بتحضيرمزيجبين الكيتوزان وزيت الأساسي للشيح و كذلك تم مزجه مره اخرى مع عصيرالثوم و مره ثانيه مع عصير البصل وتقييم النشاط البكتيري في كل مره لهذاالاخير.

أظهرت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا أن الثوم له نشاط هام كمضاد للميكروبات على جميع البكتيريا المختبرة والتي تتراوح أقطار مناطق التثبيط بين 15- 40 مم. يليه الشيتوزان يظهر نشاطًا مضادًا للميكروبات أقل من عصير الثوم، وتتراوح أقطار مناطق التثبيط من 12 إلى 20 مم. عصير البصل والمزيج لهما قوة منخفضة. أدى الجمع بين عصير الشيتوزان والثوم إلى تحسين النشاط المضاد للميكروبات للكيتوزان ، حيث تتراوح أقطار مناطق التثبيط من 14 إلى 35 ملم. للزيت العطري لنبات الشيح تأثير مثبط قوي ضد السلالات الميكروبية التي تم اختبارها، وهي: *Staphylococcus aureus*، *citrobacter diverus*، *Klebsielle oxytoca*، *E. coli* و *Enterobacter cloacae*حساسة جدًا لـ للزيت العطري لنبات الشيح تأثير. منذ أن أقطار التثبيط بين 15-18 مم.

الكلمات المفتاحيه :كيتوزان. زيت اساسي. منقوع. عصير. نباتات طبيه. نشاط ضدبكتيري

Résumé :

Au cours de ce travail, nous avons apporté une molécule biologique naturelle extraite de matières marines, la chitosane , et nous l'avons diagnostiquée avec FTIR et évalué son activité antibactérienne.

En plus de l'évaluation de l'activité bactérienne de l'infusion de l'harmal et de l'armoise blache , ainsi que de l'huile essentielle d'artémisia et de myrte commun , en plus de jus l'ail et du jus d'oignon, qui sont toutes des plantes connues pour leurs nombreuses propriétés thérapeutiques et selon les résultats obtenus, nous avons préparé un mélange entre chitosane et huile essentielle de l'armoise blanche , et il a également été mélangé Encore une fois avec du jus d'ail et une seconde fois avec du jus d'oignon et en évaluant à chaque fois l'activité bactérienne pour ce dernier

L'étude de l'activité antibacterienne a montré que l'ail a une importante activité antimicrobienne sur toutes les bactéries testées dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 15- 40mm. suivi par le chitosane présente une activité antimicrobienne moins importante que celle de jus d'ail, dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 12 à 20mm. le jus d'oignon et le mélange on tune faible activité. L'association du chitosane- jus d'ail, a permis l'amélioration de l'activité antimicrobienne du chitosane dont les diamètres des zones d'inhibition sont de 14- 35mm. L'huile essentielle de l'armoise blanche présente un effet fort inhibiteur contre les souches microbiennes testées à savoir: *Staphylococcus aureus, citrobacter diversus, Klebsielle oxytoca, E. coli et Enterobacter cloacae* sont très sensibles à l'HE. de l'armoise blanche puisque les diamètres d'inhibition sont compris entre 15-18mm.

Mots-clés: chitosane. Huile essentielle. Infusion .jus. Plantes médicinales. Activité antibactérienne

Abstract : During this work, we brought a natural biological molecule extracted from marine matter, chitosan, and we diagnosed it with FTIR and evaluated its antibacterial activity.

In addition to the evaluation of the bacterial activity of the infusion of harmal and mugwort, as well as essential oil of artemisia and common myrtle, in addition to the juice of garlic and onion juice, which are all plants known for their many therapeutic properties and according to the results obtained, we prepared a mixture between chitosan and essential oil of white mugwort, and it was also mixed again with juice of garlic and a second time with onion juice and each time evaluating the bacterial activity for the latter

The study of the antibacterial activity showed that the garlic has an important antimicrobial activity on all the bacteria tested whose diameters of the zones of inhibition vary from 15- 40mm. followed by chitosan exhibits less antimicrobial activity than that of garlic juice, the diameters of the inhibition zones of which vary from 12 to 20mm. onion juice and mixture have low potency. The combination of chitosan and garlic juice has improved the antimicrobial activity of chitosan, the diameters of the inhibition zones of which are 14-35mm. The essential oil of white mugwort has a strong inhibitory effect against the microbial strains tested, namely: *Staphylococcus aureus, citrobacter diversus, Klebsielle oxytoca, E. coli and Enterobacter cloacae* are very sensitive to EO. mugwort since the inhibition diameters are between 15-18mm.

Keywords: chitosan. Essential oil.soaked. juice. Medicinal plants. Antibacterial activity

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 4

I. 2. 1. Définition de la chitine 4

I. 2. 2. Les sources de chitine 6

I. 3. Les dérivés de la chitine 7

I. 3. 1. Le chitosane 9

I.3. 2. Les propriétés de la chitine et du chitosane 10

I. 3. 3. 1. Les propriétés biologiques 10

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 16

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

II. 3. 6. Activation du système immunitaire 17

II. 3. 7. Activité anticoagulante 17

II. 4. Activité antimicrobienne 18

II. 5. En industrie agro-alimentaire 18

II. 6. En biotechnologie 18

II. 7. Autres applications 19

Chapitre III : Les plantes aromatiques et médicinales

III.1Définition.....21

III .2-Parties de plantes médicinales utilisés 21

III.3-Conseils et préparation des plantes médicinales……..22

III.3.1- La récolte des plantes …….. 22

I I I. 3. 2- Séchage et conservation de la plante…… 22

II.3.2.1-Séchage ……..22

III.3.2.2.Conservation de la plante ……23

II I.3.4- Les différentes modes de préparation de plantes……...23

III.3.5-Les huiles essentielles……...24

III.3.5.1- Historique……...24

III.3.5.2-Définition ……24

III.3.5.3 - Méthodes d'extractions des huiles essentielles:……24

a-Entraînement à la vapeur ……...24

b- L'hydrolisation…….25

c - L'expression à froid…… 25

III-4. exemple de plantes médicinales ……...26

III -4-1- L' armoise blanche……...26

III -4-1-1 :L'huile essentielle d'Artemisia herba ……..26

Composition chimique des huiles essentielles du genre Artemisia ……..27

Intérêt de la plante…….28

III-4.2. Peganum harmala …… …….....29

III -4-2.1Constituants chimique de la plante……..……...30

III-4.2. Utilisation traditionnelle de la plante …….……..30

III-4.3 Myrtus communus (Myrte commun)……31

III-4.1.: Huile essentielle……...31

Chapitre IV Matériel et méthodes

IV. 1. Matériel 34
IV. 1. 1. Matériel biologique 34
IV.1.2. Les milieux de culture 35
IV.2. Les méthodes 35
IV. 2.1.préparation des infusions 35
IV.2.2.préparation des jus d'ail et d'oignon 35
IV.2.3caractérisation du chitosane par spectroscopie infrarouge……35
IV.3.2.3.Etude de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gelose 35

Chapitre V : Résultat et discussion

VI. 1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge 38
IV. 2. Etude de l'activité bacterienne 39
CONCLUSION GÉNÉRALE 44
References Bibliographiques 46
Annexes 56

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
HE	Huile essentielle
G.NAG	Glucosamine et N-acétylglucosamine
NAG	N-acétylglucosamine
PM	poids moléculaire

Liste des figures

Fig I. 1 : Les structures moléculaires : chitine (A) et cellulose (B) ……. 5
(Onar et Sariisik, 2000; Mrunal, 2004)……
Fig I.2. Fabrication de la chitine et de ses dérivés 6
(www. France-chitine.com/fab.e.htm)……
Fig. I.3 : Structure chimique du chitosane (Mrunal, 2004) ……. 25
Fig. III. 1. principe de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Elhaib, 2011)…….. 25
Fig. III. 2. Montage d'hydrodistillation (clevenger) (Smadja, 2009)……. 26
Fig. III. 3. Artméisia herba alba…… 28
Fig. III. 4. Structures chimiques de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles (Khebri, 2011)……. 28
Fig. III. 5. Quelques photos de Peganum harmala et ces graines 29
Fig. III. 6. Deux types d'alcaloïdes de Peganum harmala (Astulla et al., 2008). 30
Fig. III. 7. Fruits, graines, feuille, Fleurs et étamines de Myrtus communis (Reader's Digest 2003)…… 31

Fig. IV. 1. Les flacons des huiles essenielles utilisées (armoise blanche et myrthe commun)……. 38
Figure V. 1. Spectres infrarouge de la chitine et de la chitosane défini……
Fig. V. 2. Evolution des diamètres des zones d'inhibitions des biomolécules étudiées en fonction des souches pathogènes…… 39

Liste des tableaux

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

Tableau III. 1. Les différents composants de l'huile essentielle de myrte

Tableau V. 1. Les différents effets inhibiteurs des molécules étudiées

Introduction Générale

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).

Ainsi d'autres types de biomolécules cette fois ci issus des plantes médicinales ces dernières sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante. Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes …etc.

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve armoise blanche, harmel ; myrthe commun ainsi l'ail et l'oignon. Ces derniers sont largement distribués ; ces plantes médicinales sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques.

Par example *A. herba alba* est largement utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères, les brûlures, la diarrhée,…etc. a constitué le sujet de plusieurs études qui font déterminé leurs compositions chimiques (De Pascual et al .,1984 ; Rauter et al ., 1989 ; Joao et al .,1998 ; Akrout et al., 2001), ainsi que les propriétés biologiques (Memmi et al ., 2007 ; Sefi et al., 2010 ; Akrout et al., 2011).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de différentes biomolécules issues de source animaleet végétale, puis leur mèlange, sur des souches bactériennes.

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 présenteLes plantes aromatiques et médicinales

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).

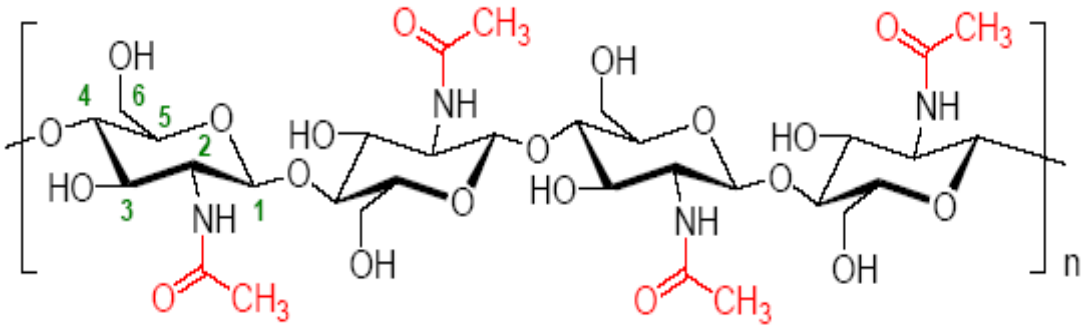
I. 2. La chitine

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

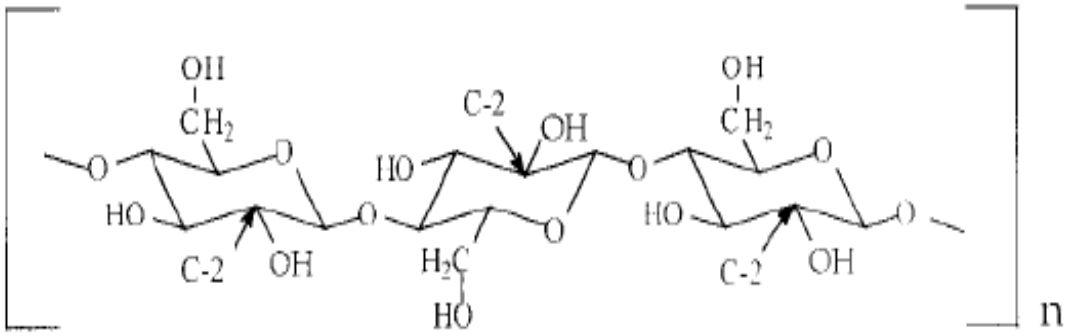


Fig. I. 1. Les structures moléculaires : chitine (A) et cellulose (B) (Onar et Sariisik, 2000;Mrunal, 2004)

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).

La chitine peut être extraite à partir des trois sources à savoir : les crustacés, les micro-organismes et les insectes. Cependant, la principale source de chitine exploitée commercialement demeure néanmoins les carapaces d'invertébrés marins et d'eau douce comme les crevettes, les crabes, les homards et les krills 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).

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.

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).

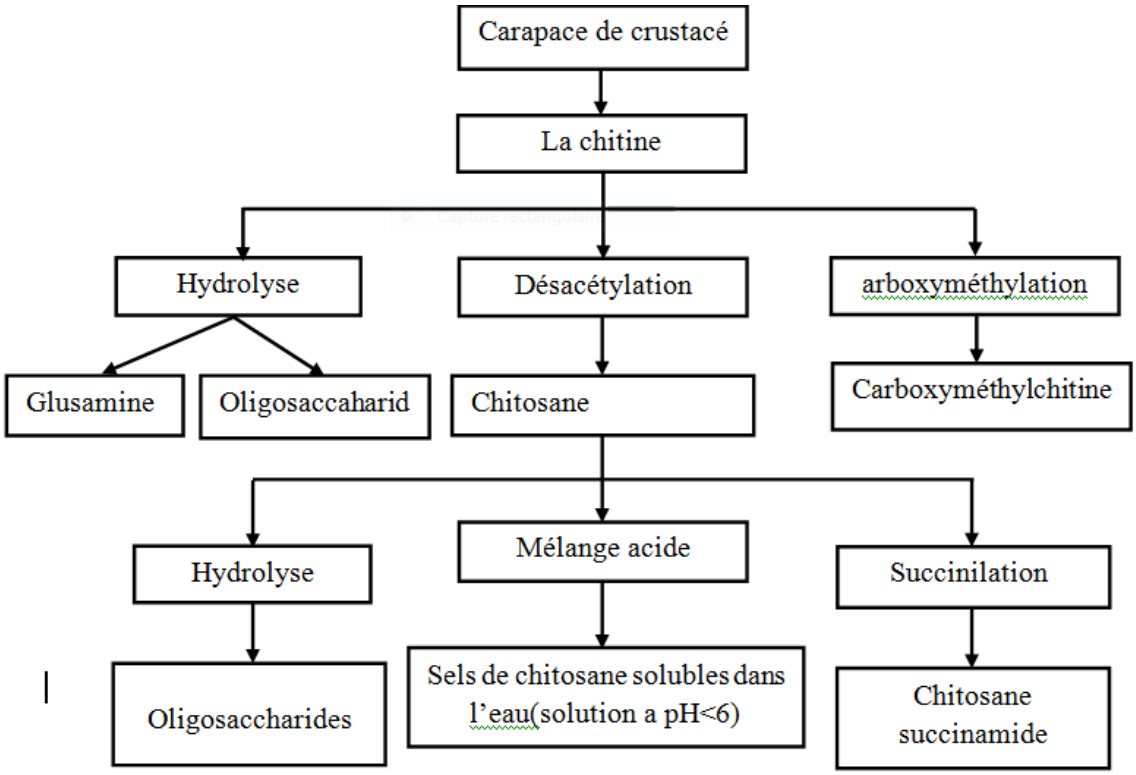


Fig. I. 2. Fabrication de la chitine et de ses dérivés

(www. France-chitine.com/fab.e.htm) .

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. I. 2). 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).

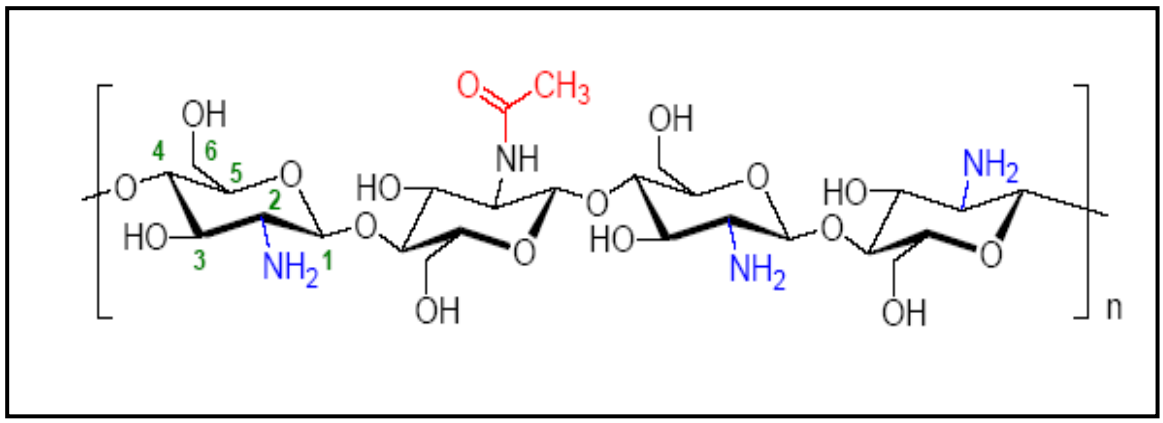


Fig. I.3. Structure chimique du chitosane (Mrunal, 2004)

Le chitosane est comme la chitine, un polysaccharide biodégradable, biocompatible (Begoňa 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 importantes 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, chloroalcoolen 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.

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 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 del'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 plantes aromatiques et médicinales

III. 1. Définition

Les plantes médicinales regroupent toutes les plantes dont l'un de leurs organes contient une ou des substances chimiques qui sont destinées à produire une activité pharmacologique. Elles représentent la forme la plus ancienne et la plus répandue de médication (Halberstein, 2005). Actuellement grâce aux progrès scientifiquex considérables enregistrés depuis la fin du XIX^{ème} siècle (technique d'analyse et extraction... etc.) les plantes médicinales constituent des ressources inestimables qui ont été utilisées pour trouver de nouvelles molécules nécessaire à la mise au point de futurs médicaments (Gurib-Fakim, 2006 ; Harrar,2012). D'après Odile et Daniel (2007), environ plus de 30% des médicaments contiennent des principes actifs d'origine naturelle.

III.2. Parties de plantes médicinales utilisées

Les différentes parties de la même plante médicinale peuvent présenter des constituants chimiques très différents et qui n'ont pas la même action thérapeutique. Généralement, en médecine traditionnelle, la partie qui contient le plus de principes actifs est la plus employée. Les différentes parties de plantes qui peuvent être employées chez la plupart des populations sont ceux qui ont été décrites par Gurib-Fakim, 2006 :

- Racine, les racines peuvent être fibreuses, solide ou charnues

* Rhizome, est une tige ligneuse ou allongée charnue qui pousse généralement horizontalement en dessous du sol, formant des feuilles au-dessus du sol et des racines dans le sol.

* Bulbe, est une pousse souterraine verticale disposant de feuilles modifiées utilisées comme organe de stockage de nourriture par une plante à dormance. Les bulbes les plus populaires en médecine traditionnelle sont l'oignon et l'ail.

* Tubercule, est une structure charnue gonflée, généralement souterraine, qui assure la survie des plantes pendant la saison d'hiver ou en période de sécheresse. Ces organes peuvent être formés sur les racines ou se développent sur les parties aériennes de la plante. La pomme de terre africaine (Hypoxis sp. De la famille Hypoxidaceae) est un exemple bien connu.

- Écorce, l'écorce est la couche protectrice externe d'un tronc d'arbre, elle est souvent riche en toxines (phénols) et principes amers (tanins) ce qui la rend plus protectrice. Exemple : (*Cinchona*sp.,*Rubiaceae*) et (*Cinnamomum camphora* et *C. camphora* , les deux de la famille *Lauraceae*). – Bois, le bois est la tige épaisse ou le bois lui-même. Exemple : *Santalum album* de la famille *Santalaceae*.

- Feuilles, les feuilles peuvent être utilisées seules ou mélangées avec leur pétiole. Exemple : *Ginkgo biloba* de la famille *Ginkgoaceae*.

- Gommes, les gommes sont des composés solides constituent d'un mélange de polysaccharides. Ils sont solubles dans l'eau et partiellement digérés par les êtres humains. Exemple (*AcaciaSenegal*; *Terminalia bentzoe*). Huiles essentielles : Exemple (*Mentha x piperita*; *Cananga odorata*).

- Les parties aériennes,toutes les parties de la plante qui se trouvent au-dessus du sol. Elles sont récoltées, très souvent, lors de la floraison. Exemple : *Hypericum perforatum* de la famille *Hypericaceae*.

- Fleurs,les fleurs sont très utilisées dans la médecine traditionnelle.

- Fruits, Exemple (*Punica granatum ; Citrus* sp). Graines : Exemple (*Ricinus communis*; *Foeniculum vulgare*).

III.3. Conseils et préparation des plantes médicinales

III.3. 1. La récolte des plantes

La récolte des plantes médicinales est une étape très importante, notamment en médecine traditionnelle. Elle doit être effectuée au moment le plus favorable afin de conserver l'efficacité des principes actifs. Certaines plantes peuvent être cueillies toute l'année, mais la plupart doivent être récoltées à un moment précis de leur croissance pour être utilisées immédiatement ou conservées (Larousse des plantes médicinales, 2001). Les auteurs de cette référence (Larousse des plantes médicinales, 2001) ont proposés quelques conseils pour faire une meilleure récolte :

Identifier les plantes, ne jamais cueillir une plante dont on n'est pas sûr.

- Ne pas cueillir les plantes sauvages rares ou inhabituelles.
- Ne pas ramasser de plantes au bord des routes, à proximité des usines ou dans les zones où sont vaporisés des insecticides sur les cultures.
- Utiliser, si possible, un panier ouvert pour y déposer les plantes, ce qui évite de les abîmer.
- Dans la nature, un sac à dos (évitez le Nylon) ou un sac en toile sera plus pratique.
- Récolter uniquement des plantes saines.
- Récolter les plantes par temps sec, plutôt par une matinée bien ensoleillée,

III. 3. 2. Séchage et conservation des plantes

III.3.2.1. Séchage

Le séchage des plantes médicinales est, normalement, effectué juste après la récolte, il permet de réduire la teneur en eau afin de limiter les dégâts dus aux enzymes et autres agents biologiques tels que les moisissures et les microbes. Le séchage doit être rapide et dans un endroit bien aéré et à l'abri de la lumière (Berton, 2001).

III.3.2. 2. Conservation de la plante

II existe diverses méthodes de conservation, les plus courantes et les plus simples étant le séchage à l'air ou au four (Larousse des plantes médicinales, 2001). Les plantes séchées sont coupées grossièrement et disposées dans des bocaux de verre ou dans des sacs en papier, à l'abri de l'air et de la lumière. Les boites en fer sont naturellement proscrites (Berton, 2001). Les plantes séchées peuvent être conservés pendant une année dans de bonnes conditions. Au-delà de cette période, leur pouvoir diminue sensiblement et l'action thérapeutique disparait. C'est pourquoi il faudra renouveler le stock de plants chaque année (Berton, 2001). Il existe également d'autres méthodes pour la conservation des propriétés médicinales des plantes (Larousse des plantes médicinales, 2001) telles que l'aspiration de l'humidité des plantes par un déshumidificateur ou la congélation dans des sacs en plastique.

III.3. 3. Les différentes modes de préparation des plantes

Le mode de préparation d'une plante médicinale est la méthode d'extraction des principes actifs responsables d'action guérisatrice. Il peut avoir un effet sur la quantité ces produits chimiques présents. Les modes de préparation les plus courants sont :

a- Infusion : est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de matière végétale, en laissant reposer la mixture pendant 10-15 minutes (Sofowora, 2010).

b-Décoction : les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus ou moins long, deux ou trois minutes pour les feuilles, les tiges et les fruits ; cinq minutes ou plus pour les écorces et les racines (Pierre et Lis, 2007).

c-Macération : le liquide de macération peut être de l'eau, de l'alcool ou du vinaigre. Dans le cas de la macération à l'eau, les plantes doivent être versées dans le liquide froid ou tiède pendant quelques heures (10 ou12 heures) (Pierre et Lis, 2007). Pour l'alcool, le vinaigre, huiles, cette macération peut se prolonger plusieurs jours sans inconvénients (Pierre et Lis, 2007). Les trois modes de préparation ont été testés par l'équipe de recherche Konkon et al.,(2006) afin d'identifier les groupes de constituants chimiques présentant un intérêt pharmacologique. Ils ont trouvé que la méthode d'extraction utilisée en médecine traditionnelle (décoction) est du point de vue qualitatif aussi efficace que les autres méthodes d'extraction étudiées (macération et infusion).

III.3.5. Les huiles essentielles

III.3.5.1. Bref historique sur les H.E (Weniger, 2011)

- Egypte (4ème millénaire av. J.C) : petites amorphes ayant contenues des essences et parfums retrouvées dans les sarcophages des rois.

- Civilisation arabe (Bagdad, Damas): commerce des épices et des aromates, et perfectionnement dans l'art de la distillation.

- Deux noms à retenir : l'alambic et incontestablement associé à Avicenne (930- 1037), tout comme le vase florentin est associé à Giovanni Baptistadella porta (1540-1615).

- Hermann Boerhave (1668-1738) fut l'un des premiers à décrire les H.E d'un point de vue chimique.

III.3.5.2. Définition

La définition retenue, très proche de celle de la norme ISO 9235, est celle adoptée par la commission de la pharmacopée européenne : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (Afnor, 1986 et Afssaps, 2008).

III.3.5.3. Méthodes d'extractions des huiles essentielles

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première: son état originel et ses caractéristiques, sa nature proprement dite. Le rendement « HE/matière première végétale» peut être extrêmement variable selon les plantes (Desmares et al, 2008). Les huiles essentielles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation et une méthode de pression à froid (Rivera, 2006) :

a-Entraînement à la vapeur

Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable, qui traverse les végétaux et emporte avec elle les molécules aromatiques. La vapeur chargée de l'arôme se condense alors en traversant une cuve réfrigérante pour être récupérée en phase liquide dans un vase florentin (ou essencier) où l'huile essentielle est séparée de l'eau par décantation (Smadja, 2009) (Fig. III. 1).

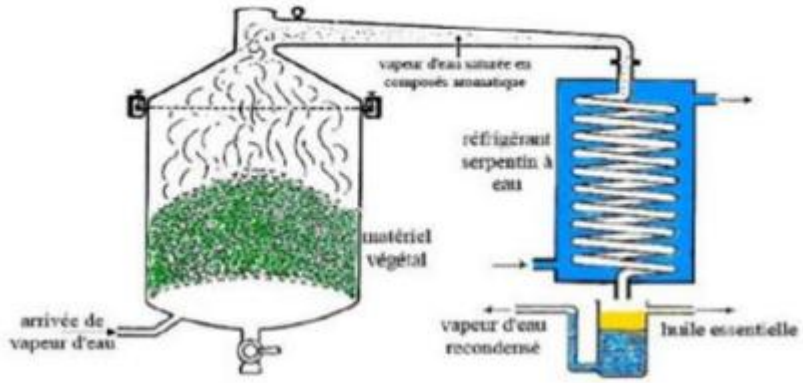


Fig. III. 1. Principe de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Elhaib, 2011)

b - L'hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition (fig. III. 2). Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors la décantation (Rivera, 2006).

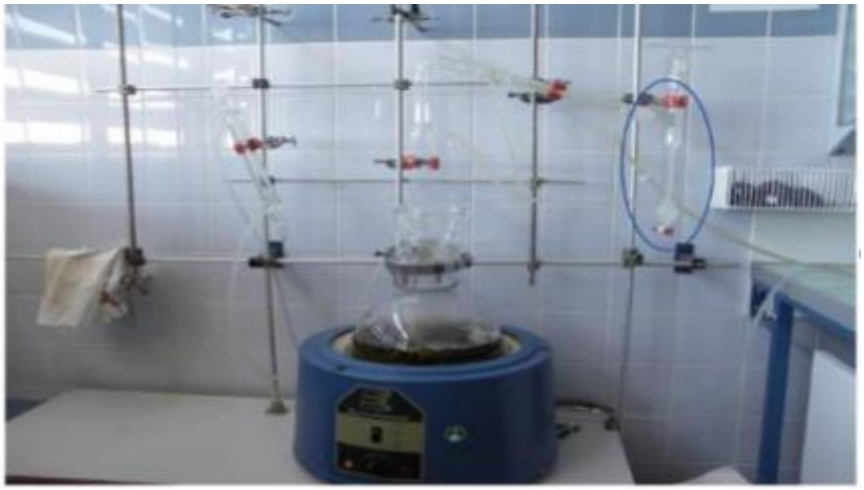


Fig. III. 2. Montage d'hydrodistillation (clevenger) (Smadja, 2009)

c - L'expression à froid

Ce mode d'obtention ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes (*Citrus* spp.) par des procédés mécaniques à température ambiante. L'expression à froid consiste à soumettre la substance végétale à une forte pression à l'aide d'une presse hydraulique (Desmares et al, 2008).

III. 4. Exemple de plantes médicinales

III. 4. 1. L'armoise blanche (fig. III. 3)

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées: c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces (Mucciarelli et Maffei, 2002). Il a été rapporté que le genre Artemisia est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides caféoylquinic, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (Kundan et Anupam., 2010). Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médicine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mirjalili et al ., 2007).

L'*Artémisia* est le nom de guerre des armoises, il provient de celui de la déesse Grecque de la chasse Artémis, la diane des romains, patronne des vierges à cause des bienfaits de cette herbe. *Herba alba* signifie herbe blanche. Plusieurs noms sont attribués à l'armoise blanche tels le thym des steppes,absinthe du désert. En Afrique du nord et en moyen orient, on l'appelle communément Shih"ou "Chih"

C'est une plante vivace qui forme des buissons de 30 à 50 cm, blanche et laineuse, à tiges nombreuses, tomenteuses. Les feuilles sont courtes, généralement pubescentes argentés avec des capitules sessiles de 2-5 fleurs. Ces derniers sont hermaphrodites alors que le fruit est akène. Le réceptacle est nu et la corolle est insérée très obliquement sur l'ovaire (Besanger-beauquesne et al. 1975 Quezel et santa, 1963).



Fig. III. 3. *Artméisia herba alba*

III. 4. 1. 1. Huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

Au cours des dernières décennies, l'huile essentielle de l'armoise blanche a été soigneusement étudiée et la diversité dans la composition de cette huile recueillie dans différents pays a conduit à de nombreux chemotypes. Généralement, l'huile a été en grande partie rapporté

être composée de monoterpènoïdes, principalement oxygénés tels que le 1-8 cinéole, chrysanthenone, α et β thujones et le camphre comme composants majeurs (Mohamed et al., 2010).

Le Maroc détient 90% du marché mondial de l'huile essentielle extraite de l'armoise blanche (Mounni et al., 2013). L'examen de la littérature scientifique disponible publiée sur *A. herba alba* a montré que l'effet antidiabétique de cette plante était similaire à celle de répaglinide et l'insuline ordinaire (Ribnicky et al., 2004; Tastekin et al., 2006). Des essais sur les propriétés insecticides de l'huile essentielle d'*A. herba alba* sont menés dans le cadre de la lutte biologique contre *Euchorthippus albolineatus*, un grand ravageur des cultures agricoles (Zaim et al., 2012). Les résultats obtenus ont montré que cette huile a manifesté une bonne activité acridicide. Ainsi, Sharifian et al. (2012), ont suggéré que l'huile essentielle de l'armoise blanche pourrait avoir un effet potentiel comme agent de contrôle contre *Callosobruchus maculatus* et *Rhyzopertha domonica*.

Composition chimique des huiles essentielles du genre *Artemisia*

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir plusieurs composés à des concentrations différentes. Elles sont caractérisées par 2 à 3 composants principaux à des concentrations assez élevées (20 – 70%). La composition chimique des huiles essentielles extraites à partir de genre *Artemisia* a été largement étudiée dans plusieurs espèces partout dans le monde. L'odeur forte et aromatique de certaines espèces de ce genre est due principalement à la haute concentration de terpènes volatiles. De nombreuses études ont montré que les espèces du genre *Artemisia* affichent des variations intra-spécifiques significatives dans les constituants terpéniques de leurs huiles essentielles. Dans certains cas, la variation dans les composés volatiles de ces plantes peut se produire lors de la croissance de la plante aux différentes altitudes (Abad et al., 2012).

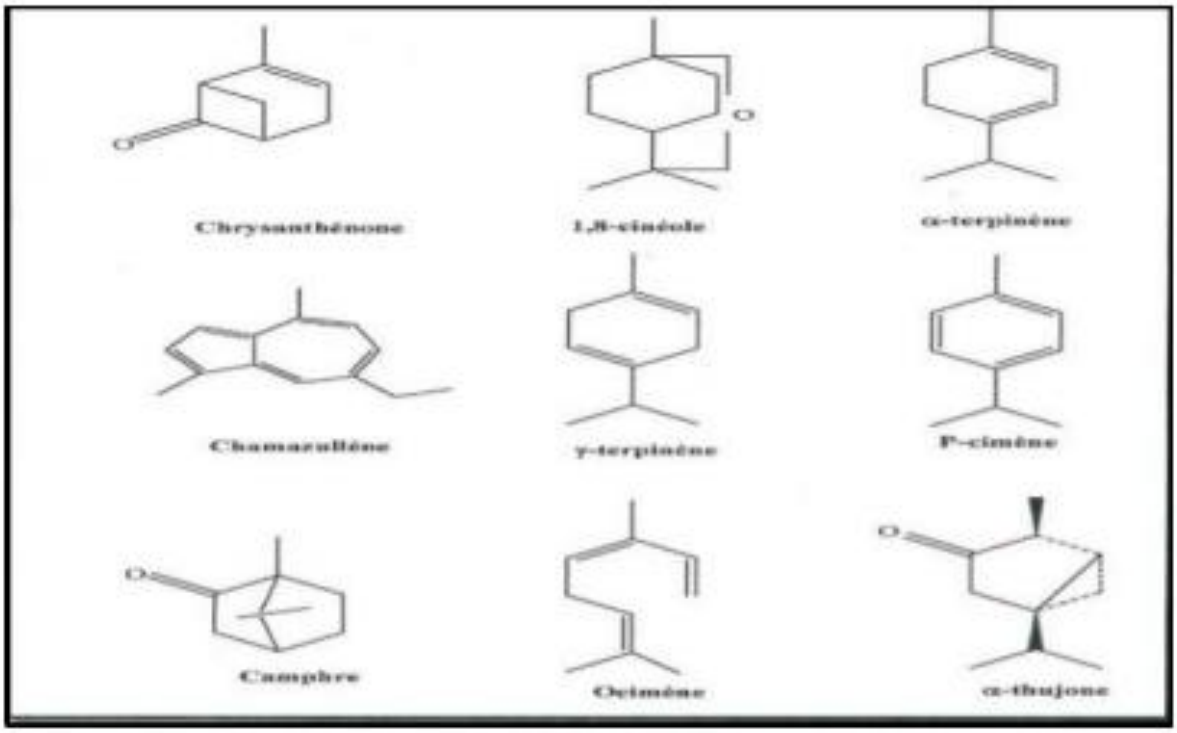


Fig. III. 4. Structures chimiques de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles (Khebri, 2011)

Intérêt de la plante

Les racines d'Armoise blanche ont été employées avec succès en Allemagne contre l'épilepsie. (Hatier, 1989). L'armoise blanche est utilisée comme une plante amère, aromatique, digestive et anticonvulsive, mais son action est un peu plus faible que celle des autres armoises (Grund, 1983). La médecine populaire l'utilise contre les troubles nerveux, les insomnies et dans les soins des maladies féminines. Elle est considérée comme une plante antidiabétique adjuvant dans les soins du diabète (Grund,1983).

A la maison, l'armoise blanche est utilisée comme un remède pour calmer les douleurs abdominales, le foie sous forme de tisane. Elle est vermifuge (élimine le vers : oxyures et ascaris). Elle facilite la digestion, elle est aussi utilisée comme remède contre les troubles intestinaux, la rougeole et les faiblesses musculaires.

Toxicité de la plante

L'armoise blanche est peu broutée au printemps, elle est comme légèrement toxique à cette époque. L'armoise à forte dose est abortive, neurotoxique et hémorragique la tuyone constitue la substance toxique et bioactive dans l'armoise et sa forme la plus toxique est l'alpha-tuyone. Elle a des effets convulsivantes (Aidoud,1983). Elle est interdite aux femmes enceintes

car elle est toxique à dose élevée on doit respecter les doses. Son pollen provoque des diarrhées (Hatier, 1989).

III. 4. 2. *Peganum harmala* L. (Fig. III. 5)

C'est une plante herbacée, vivace, glabre, buissonnante de 30 à 90 cm de hauteur à rhizome épais, à odeur forte, désagréable qui rappelle celle de la rue.

Les tiges dressées, très rameuses disparaissent l'hiver; elles portent des feuilles alternes, découpées en lanières étroites. Les fleurs solitaires, assez grandes (25 à 30 mm), d'un blanc-jaunâtre veinées de vert.

Les graines, nombreuses, petites, anguleuses, subtriangulaires, de couleur marron foncé, dont le tégument externe est réticulé, ont une saveur amère; on les récolte en été, le tégument externe de la graine renferme un pigment rouge connu sous le nom de "Turkey red". Cette plante se développe surtout dans les zones arides, sur les sols sableux et légèrement nitrés (Iserin, 2001).



Fig. III. 5. Quelques photos de Peganum harmala et ces graines.

Elle appartient à la famille des *Zygophyllaceae*, genre *Peganum* et l'éspèce *harmala*. Les noms commun de *Peganum harmala* : Harmel; Armel; L'Harmel (au Maghreb); Bender tiffin en

Tamachek (Touareg); Rue sauvage; Rue verte; Pégane (en France); Harmel Sahari (en Algerie); Bizr el harmel (en Egypte).

Elle est largement distribué à travers le monde, généralement dans la zone méditerranéenne surtout dans les zones sèches en Europe comme l'Espagne, la Russie, Hongrie, en Afrique (Maroc oriental, Sahara septentrional et hauts plateaux Algériens, Tunisie, steppes de la Lybie, déserts d'Egypte), et en Asie, elle est répandue dans les steppes de l'Iran, du Pakistan, du Turkestan jusqu'au Tibet et en Sibérie (Bézanger-Beauquesne et al., 1980).

III. 4. 2. 1. Constituants chimiques de la plante

Parmis les constituants de cette plante ; acides aminés (phénylalanine, valine, proline, thréonine, histidine, acide glutamique), flavonoïdes, coumarines, bases volatiles, tanins, stérols/triterpènes (Al Yahya, 1986). Des alcaloïdes qui ont un taux beaucoup plus élevé dans la graine (3 à 4 %) que dans la racine, la tige (0,36 %) et la feuille (0,52 %), parmis les alcaloides trouver dans la *Peganum harmala* : Harmane ($C_{12}H_{10}$ N_2), Harmaline ($C_{13}H_{14}N_{20}$) (fig. III. 6), Harmine ($C_{13}H_{12}N_{20}$) et Harmalol ($C_{12}H_{12}N_{20}$).La teneur en alcaloïdes s'élève brusquement en été, durant la phase de mûrissement du fruit, au moment de la récolte de la graine. L'harmaline est un méthoxyharmalol et une dihydroharmine, elle constitue les 2/3 des alcaloïdes totaux de la graine (Tahrouch et al., 2002).

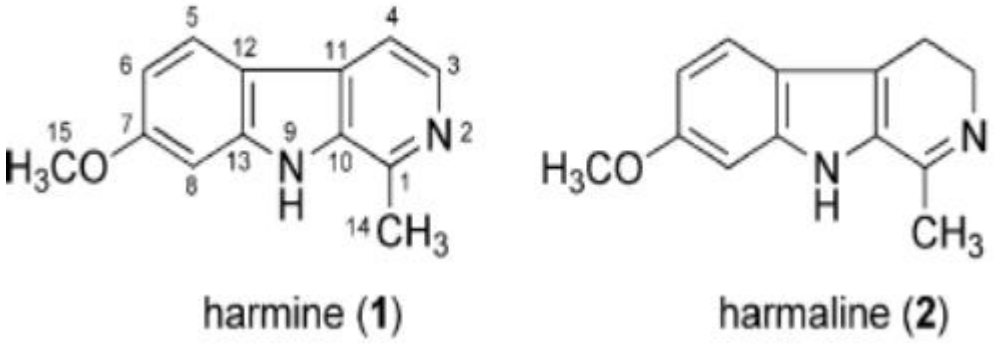


Fig. III. 6. Deux types d'alcaloïdes de Peganum harmala (Astulla et al., 2008).

III. 4. 2. 2. Utilisation traditionnelle de la plante L'Harmel

Elle est trèsutilisée en médecine traditionnelle algérienne et maghrébine pour traiter différents troubles: gynécologiques: emménagogue, abortif, stérilité féminine généraux: hypnotique, antipyrétique, antalgique, antitussif, digestifs: coliques, troubles digestifs (Goel et la., 2009), cutanés: antiseptique et cicatrisant, dermatoses (eczémas) et brûlures, conjonctivites

purulentes et blépharites, alopécie (Monsif et al., 2004), infectieux: tétanos néonatal; anthelminthique; antipaludique; oreillons (Hassani et Hermas, 2008), et aussi utilisé contre autres maladie tel que: diabète, hypertension artérielle, empoisonnement, venins de serpent, le rhumatisme et les problèmes nerveux. L'harmine permet d'atténuer les tremblements de la maladie de Parkinson (Iserin, 2001).

III. 4. 3. *Myrtus communis* (Myrte commun)

Elle appartient à la famille des *Myrtaceae*, genre *Myrtus* et l'éspèce communis. C'est un arbuste de 1 à 2 m de hauteur qui possède des feuilles ovoïdes, lancéolées, à nervation pennée, persistantes, opposées, à très court pétiole, coriaces, d'un vert brillant et qui sont 2 à 3 fois plus longues que large (Fig.III. 7).

Les fleurs, grandes (10-15 mm) (Fig. III. 7) sont blanches, solitaires sur un long pédoncule à l'aisselle des feuilles, très odorantes et pourvues à la base de bractées très petites. Son odeur aromatique forte et particulière est l'un de ses traits de caractère rapidement caduc (Quezel et Santa, 1856).

Les fruits sortent à l'automne, ce sont des baies ovoïdes de 6-8 mm, noires bleuâtres à peau charnue, conservant à leur partie supérieure les restes du calice (Fig.7). Ces fruits sont comestibles mais âpres et astringents.

Les rameaux sont de taille fine, pubescents dans leur jeunesse et de couleur verte qui se transforme rapidement en brun orangé (Fig.III. 7) (Quezel et Santa, 1963 ; Barboni, 2006).



Fig. III. 7. Fruits, graines, feuille, Fleurs et étamines de Myrtus communis (Reader's Digest 2003).

Myrtus communis pousse spontanément et en abondance dans les régions méditerranéennes, commune dans le Tell et sur le littoral du centre (Baba Aissa, 1999; Mimica-Dukic, 2010)

III. 4. 3. 1. Huile essentielle

Les différents composés de l'huile essentielle du myrte sont représentés dans le tableau III. 1.

Tableau III. 1. Les différents composants de l'huile essentielle de myrte

Classes de constituants	Exemple de constituants	Teneur en %
Monoterpènes	Alpha-thujène	0.42
	Alpha-pinène	49.17
	Béta-pinène	0.46
	Delta-3-caréne	0.54
	Para-cyméne	1.77
	Limonène	8.33
	Eucalyptol (1,8-cinéole)	24.28
	Linalol	3.37
	Trans Pinocarveol	0.28
Alcools terpèniques	Alpha-terpineol	2.37
	Acétate de linalyle	1.06
	Acétate d'alpha-terpènyle	0.61
	Acétate de géranyle	2.52
	Methyl-Eugénol	0.58
	Béta-caryophyllène	0.69
	Alpha-humulène	0.26
	Terpinène	0.35
Total		97.56

Chapitre IV
Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail était initialement la recherche de l'efficacité du chitosane contre les bactéries résistantes aux β-lactamines. Et à cause de la pandémie du COVID-19, des changements ont été apporté et on a opté pour l'étude de l'activité antimicrobienne contre des souches pathogènes du chitosane et certaines plamtes médicinales à savoir : l'armoise blanche, l'harmel et deux huiles essentielles (voir section matériels).

IV. 1. Matériel

IV. 1. 1. Matériel biologique

Le Chitosane,obtenupar désacétylation douce, préparé par des étudiantes lors de la préparation de leur master au niveau de laboratoire de biologie, Université de Médéa.

Les huiles essentielles (HE)

HE de l'armoise blanche ;

HE myrthe cmmun achetées de laboratoire vie_bio, Oulad yaich –blida. Ces huiles essentielles sont extraites par entrainementà la vapeur. Elles sont naturelles et pures.

Les plantes utilisées

L'armoise blanche et harmal achetées de chezl'herboriste, Médéa .



Fig. IV. 1. Les flacons des huiles essenielles utilisées (armoise blanche et myrthe commun)

Les souches bactériennes utilisées pour le test de l'activité antibactérienne

Les souches microbiennes testées ont été fournies par le laboratoire central de wilaya de Médéa. Il s'agit des souches sauvages d'*Escherichia coli*(*E. coli*);*Staphylococcus aureus,Citrobacter diversus;Entérococcus* sp., *Enterobacter cloacae; Klebsiella oxytoca; Klebsiella pneumoniae*et *Proteus mirabilise.*

IV.1.2. Les milieux de culture

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

Gélose nutrive : ce mileu permet l'isolement non seléctif dans le but de controler la pureté des souches bacteriénnes fournies ;

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

IV. 2. Les Méthodes

IV. 2.1.Préparation desinfusions

Principe

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le terme désigne aussi les boissons préparées par cette méthode.

Cette opération s'oppose à la décoction, dans laquelle le liquide est maintenu bouillant, et à la macération dans laquelle le liquide est froid. Le solvant n'est pas nécessairement de l'eau, cela peut être également une huile ou un alcool.

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

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

IV. 2. 2. Caractérisation du chitosane par 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. 2.3.Etude de l'activité antibactériennepar 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.

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

- Le chitosane préparé (1%);
- Le jus d'ail ;
- Le jus d'oignon.
- HE. armoise blanche
- Le mélange : chitosane -jus d'ail ;
- Le mélange chitosane -jus d'oignon ;
- Le mélange : chitosane – armoise blanche;
- Les infusions d'armoise blanche, harmal

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.

Chapitre V :
Résultat et discussion

Dans ce travail, on a testé l'efficacité antimicrobienne de plusieurs biomolécules connues pour leurs effets thérapeutiques et antimicrobienne.

V. 1.1. Caractérisation par spectroscopie infrarouge

Les spectres Infrarouge de la chitine et de la chitosane sont présentés dans la figure V.1.

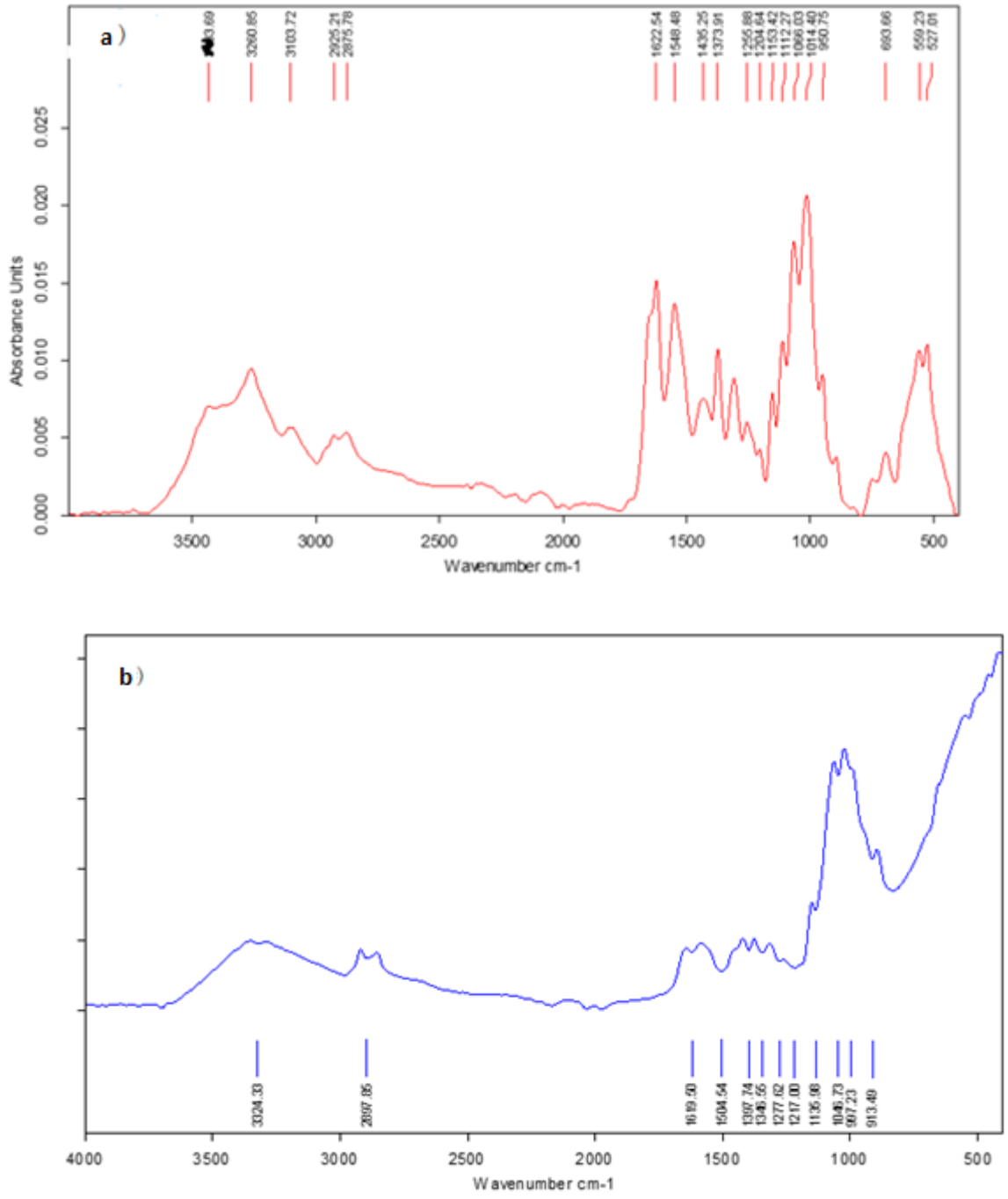


Fig. V. 1.Spectres Infra-rouge de (a) la chitine (b) le chitosane

La figure V. 4b, montre que les intensités des pics à 3103.72cm^{-1} et 3260.85cm^{-1} caractérisant les liaisons d'hydrogène intermoléculaire $C_{(2)}NH$---$O=C_{(7)}$ et $C_{(6)}OH$---

$HOC_{(6)}$respectivement sont bien apparus dans le spectre de la chitine par contre dans l'échantillon traité par la soude sont inexistants (Fig. V.4a). On voit que le pic apparu à 2925.21cm^{-1} correspondant à $–CH_2$est bien apparu dans le spectre de la chitine mais qui est absent dans l'échantillon désacétylé. On voit aussi des pics de l'amine I et de l'amine II correspondant respectivement à 1622.54cm^{-1}et 1548.48cm^{-1}et la disparition de ce dernier dans l'échantillon désacétylé prouve bien qu'ils sont désacétylés.

V. 1. 2. Etude de l'activité antibactérienne

La méthode de diffusion sur milieu gélosé est la technique choisie pour évaluer l'activité antibactérienne. Cette méthode repos sur le pouvoir migratoire des métabolites dans un milieu de culture solide. L'activité antimicrobienne est évaluée en fonction du diamètre (mm) des zones d'inhibition de la croissance microbienne (Cheikh Touhami, 2013).

IL est à noter que les infusions de l'armoise blanche et l'harmel ainsi que l'huile essentielle du myrte commun n'ont présenté aucune activité antimicrobienne dans le cadre de notre travail.

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne de chitosane ainsi que le jus d'ail, jus d'ognon, HE de l'armoise blanche ainsi que les mélanges préparés sont présentés dans la figure V. 2.

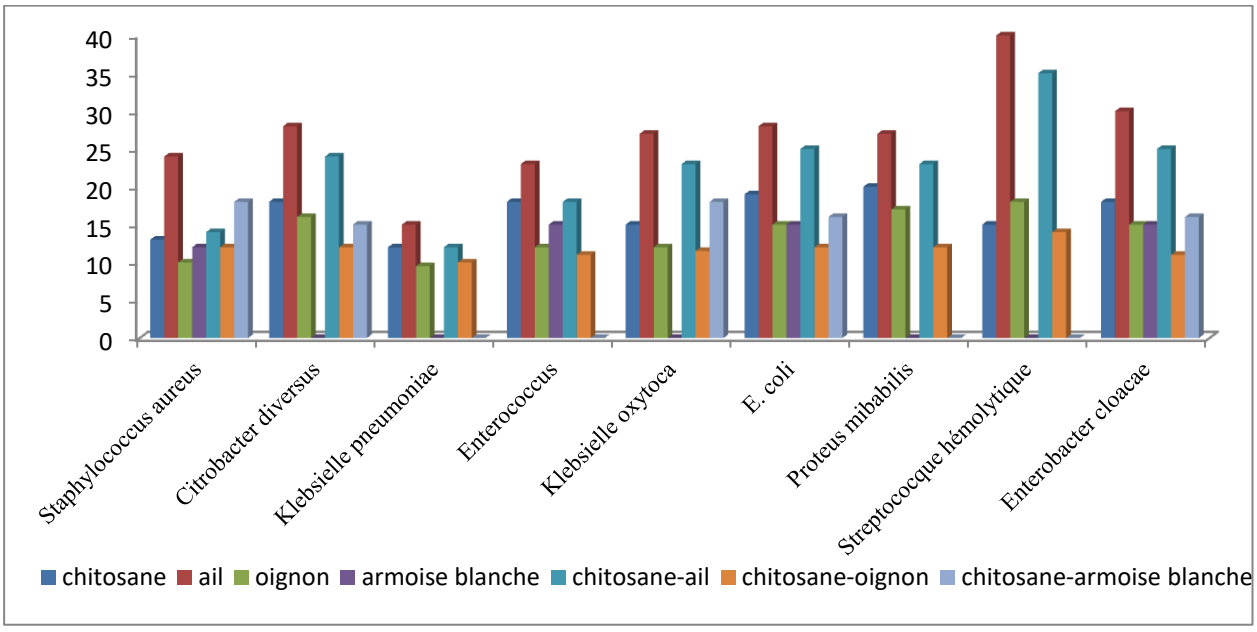


Fig. V. 2. Evolution des diamètres des zones d'inhibitions des biomolécules étudiées en fonction des souches pathogènes

La figure V. 2, montre que le jus d'ail a une importante activité antimicrobienne sur toutes les bactéries testées dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 15- 40mm. Suivi

par le chitosane qui présente une activité antimicrobienne moins importante que celle de jus d'ail, dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 12 à 20mm. Une faible activité antimicrobienne a été obtenue avec le jus d'oignon qui a donné des zones d'inhibition variant de 10 à 18mm de diamètre. Cette activité a diminué encore en mélangeant le jus d'oignon avec le chitosane, avec des zones d'inhibition de 10- 14mm de diamètre. Par contre l'association du chitosane- jus d'ail, a permis l'amélioration de l'activité antimicrobienne du chitosane dont les diamètres des zones d'inhibition sont de 14- 35mm.

Pour l'armoise blanche et le chitosane, on a perdu plusieurs souches donc les tests ont été realize sur *Staphylococcus aureus, citrobacter diversus, Klebsielle oxytoca, E. coli et Enterobacter cloacae.*La figure V. 2, montre que les diamètres d'inhibition d'HE. de l'armoise blanche testé sur les souches sus-citées varie de 12- 15mm. Tandis que, le mélange avec le chitosane a permis l'augmentation de ces diamètres entre 15- 18mm.

La figure V. 2, montre également que streptocoque hémolytique est plus sensible à l'ail ou au mélange ail-chitosane par rapport aux autres bactéries testées.

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.

Le tableau V. 1, résume le type d'effet d'inhibition obtenu avec les différentes molécules testées.

Tableau V. 1. Les différents effets inhibiteurs des molécules étudiées

	Fortement inhibiteur	Modérément inhibiteur	Légèrement inhibiteur	Non inhibiteur
Staphylococcus aureus	L'ail	HE armoise-chitosane	Chitosane, oignon-chitosane,	oignon
Citrobacter diversus	L'ail	Chitosane, Oignon	Oignon-chitosane, HE armoise-chitosane	
Klebsiella pneumoniae	L'ail		Chitosane, ail ail-chitosane, oignon-chitosane	oignon
Enterococcus		Chitosane, l'ail, ail-chitosane	Oignon, oignon-chitosane	
Klebsiella oxytoca		Ail-chitosane, HE. armoise-chitosane	Oignon, oignon-chitosane	
E. coli	L'ail	Chitosane, ail-chitosane, HE armoise-chitosane	Oignon-chitosane	
Proteus mirabilis	L'ail	Chitosane, oignon, ail-chitosane		
Streptocoque hémolytique	L'ail	Oignon		
Enterobacter cloacae	L'ail ; l'ail-chitosane	Chitosane, HE armoise-chitosane		

Concernant l'effet de l'HE de l'armoise blanche et selon Ponce et al., (2003), la sensibilité d'une souche microbienne à une huile essentielle a été classés par le diamètre des halos d'inhibition : non sensible (-) pour les diamètre de moins de 8 mm ; sensible (+) pour les diamètre de 8 à 14 mm ;très sensibles (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensibles (+++) pour les diamètres plus de 20 mm.

Nos résultats montrent que les souches microbiennes testées à savoir : l'huile essentielle de l'armoise *Staphylococcus aureus, citrobacter diversus, Klebsielle oxytoca, E. coli et Enterobacter cloacae*sont très sensibles à l'HE. de l'armoise blanche puisque les diamètres d'inhibition sont compris entre 15-18mm.

Conclusion générale

Conclusion :

L'objectif de ce travail est l'étude de l'activité antimicrobienne de quelques molécules bioloogiques sur des souches pathogènes.

Les résultats de l'analyse infrarouge a confirmé que le biopolymère fourni est du chitosane.

L'étude de l'activité antimicrobienne par diffusion sur milieu gélosé a montré que :

- L'ail a une importante activité antimicrobienne sur toutes les bactéries testées dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 15- 40mm.
- Le chitosane présente une activité antimicrobienne moins importante que celle de jus d'ail, dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 12 à 20mm.
- Une faible activité antimicrobienne a été obtenue avec le jus d'oignon qui a donné des zones d'inhibition variant de 10 à 18mm de diamètre.
- Le mélénge oignon- chitosane a une activité plus faible que le jus d'oignon seul, avec des zones d'inhibition de 10- 14mm de diamètre.
- L'association du chitosane- jus d'ail, a permis l'amélioration de l'activité antimicrobienne du chitosane dont les diamètres des zones d'inhibition sont de 14- 35mm.
- L'huile essentielle de l'armoise blanche présente un effet fort inhibiteur contre les souches microbiennes testées à savoir : *Staphylococcus aureus, citrobacter diversus, Klebsielle oxytoca, E. coli et Enterobacter cloacae* sont très sensibles à l'HE. de l'armoise blanche puisque les diamètres d'inhibition sont compris entre 15-18mm.

Référence Bibliographique

Abad M.J., Bedoya L.M., Apaza L. and Bermejo P. 2012: The Artemisia L. Genus: A review of bioactive essential oil. Molecule; 17: 2542-2566.

AFNOR, 1986: Huiles essentielles. Recueil de normes françaises. Edition Tec&Doc Lavoisier. 2e edition.

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.

Al Yahya M. A. (1986) Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of saudi Arabia. Fitoterapia. 52 (3), 179-182.

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.

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.

Astulla A., Zaima K., Matsuno Y., Hirasawa Y., Ekasari W., Widyawaruyanti A., Zaini N. C. and Morita H. (2008) Alkaloids from the seeds of Peganum harmala showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. J Nat Med. 62, 470–472.

B-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.

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.

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.

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

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

Berton H. (2001) Sorcellerie en Auvergne : Sorciers, guérisseurs, médecine magiques et traditionnelles. Editions De Borée (Clermont-Ferrand), France : 288.

Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. and Trotin F (1980) Plantes médicinales des régions tempérées, Ed.Maloine, Paris. pp: 156.

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.

Boukef K. (1982) Pharmacopée tunisienne traditionnelle: Harmel. Le pharmacien du Maghreb. 2, 38-40.

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.

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.

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.

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.

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.

De Pascual J.T., Gonzalez M.S., Muriel M.R and Bellid I.S. (1984).Phenolic derivatives from Artemisia campestris Subsp Glutinosa.Phytochemistry. 23 (8): 1819-1821.

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.

désertiques méridionale. Tome II Edition. CNRS. Paris. P 636- 637.

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

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.

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

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

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

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.

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

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.

Goel N., Singh N., and Saini R. (2009) Efficient in vitro multiplication of Syrian Rue (Peganum harmala L.) using 6 benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. Nature and Science.7(7), 1545-0740.

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.

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

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

Gurib-Fakim A. (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine. 27: 1-93.

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

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.

Iserin P. (2001) Encyclopedia of Médicinal Plants.La Rousse. (2nd Edition). pp: 244-245.

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

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.

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

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.

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.

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.

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.

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

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.

Kundan S., and Anupam S. (2010). The Genus Artemisia: A Comprehensive Review. J. Pharm. Biol.pp:1-9.

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

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.

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

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

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

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

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

Memmi A., Sansa G., Rjeibi I., El ayeb M., Srairi-Abid N., Bellasfer Z.,and Fekhih A. (2007). Use of medicinal plants against scorpionic and ophidianvenoms. Arch. Inst. Pasteur.Tunis. 84 (1-4): 49-55.

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.

Mirjalili. M.H., Tabatabaei S.M.F., Hadian J., Nejad S.E.,and Sonboli. A. (2007). Phenological Variation of the essential oil of Artemisia scopariafrom Iran. J. Essent. OilRes. 19 : 326–329.

Mohamed A.H., El-Sayed M.A. and Mohamed N.S., 2010: Chemical constituents and biological activities of Artemisia herba alba. Records of natural products; 4: 1-25.

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

Monsif H. R., Ghobadi A. and Iranshahi M. (2004) Antinociceptive effects of Peganum harmala L. alkaloid extract on mouse formalin test. J Pharm Pharmaceu Sci. 7(1), 65- 69.

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.

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.

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

Mucciarelli M and Maffei M. (2002). Artemisia: Introduction to the Genus Vol. 18 Ed Colin W.W. in Taylor & Francis. Ed. London and New York. pp: 10-16.

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

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

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.

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

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.

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

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

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.

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

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.

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-
ol. 6, 257-272

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.

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.

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.

Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., Holley, R.A., 2000b, Inhibition of surface

Ousamu K., Kejji 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.

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

Pierre M., Lis .M (2007) Secrets des plantes. Editions Artemis, Paris 1: 463

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

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.

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.

Quezel et Santa. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie Ed : éditions du centre nationale de la• recherche scientifique .Paris. Tome I. 990p.

Quezel, P ; et Santa, S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des regions

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.

Ribanicky D.M., Poulev A., Oneal J., Wnorowskig G., Mlek D.E., Jager R. and Raskin I., 2004: Toxicological evaluation of the ethanolic extract of A. dracunculus L. for use as a dietary supplement and in functional foods.

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

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

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

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

Sharifian I., Hashemis M., Aghael M. and Alizadeh M., 2012: Insecticidal activity of• essential oil of Artemisia herba alba Asso against three stores product beetles. Baharean biologist 6(2): 90-93.

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.

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.

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

Sofowera A. (2010) Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Economie et Développement. Paris: 384.

spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared

Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., 1992, Antibacterial action of chitosan. Food Biotechn

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.

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

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.

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

Tahrouch S., Rapior; S., Mondolot-Cosson L., Idrissi-Hassani L. A.; Bessière J. M. et **Andary C. (2002)** Peganum harmala: source combinée d'aromes et de colorants. Rev. Biol.

Tsai, G.J., Su, W.H., Ch~n, H.C., Pan, C.L., 2002, Antimicrobial.

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

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.

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.

with chitosan. Int. J. Food Microbiol. 62, 139-148.

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.

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.

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.

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.

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

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

Annexe

A. 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.Gélose nutritive

Usage

Milieu d'isolement courant surtout utilisé pour la recherche de flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR).

Composition

- Extrait de viande : 1,0 g/L
- Extrait de levure : 2,5 g/L
- Peptone : 5,0 g/L
- Chlorure de sodium : 5,0 g/L
- Agar-agar : 15,0 g/L

pH = 7,0

Préparation :

28 g/L (stérilisation à l'autoclave).