

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L 'AQUACULTURE

N°/SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

HALLA Nacera & CHAIB Karima

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN HYDROBIOLOGIE ET CONTINENTALE

Spécialité:

EXPLOITATION ET PROTECTION DES RESSOURCES MARINES VIVANTES

THÈME

Contribution à purification de la chitine à partir des coproduits de crevette rouge: caractérisation des produits et optimisation de procédé.

Soutenue publiquement le/06/2017

DEVANT LE JURY

Président :	Mr. MEZZALI.	Pr. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Encadreur :	M. SOUALILID	Pr. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Examineur :	Mr. BOUZAZA	MAA Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Co. Encadreur :	M.OULHIZ.A	MAA Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions « الله » qui nous a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements

à notre encadreur le *Pr SOUALILI. D* pour la confiance qu'elle nous a accordée en

Acceptant cet encadrement

Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire et pour son aide,

Ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous remercions *Pr. MEZALI*. Pour avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.

Nous remercions *Mr BOUZAZA*, qui a accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous tenons aussi à remercier *M^{lle} Oulhiz A* pour avoir consacré beaucoup de son temps malgré ses nombreuses obligations et nous avoir dirigé et orienté dans la réalisation de ce mémoire.

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de chimie et particulièrement *Balekhalfa Mohamed*, sans oublier *Azouz Radwane et Souane Abd el kader* pour leurs patientes, leur aide précieuse et ses valeureux conseils.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce travail.

A vous tous, un grand Merci

H. Nacera

CH. Karima

Dédicaces

Au vrais sens de l'amour, je dédie ce modeste travail, ce fruit de plusieurs années:

Aux personnes les plus chères au monde *mes chers parents*.

A ma très chère Maman «*Kheira*»

La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie, qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

A mon très cher Papa «*Laadjal*»

Qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices qui tu as consacré pour mon éducation et ma formation. C'est grâce à vous que je suis arrivée aujourd'hui à ce niveau d'étude.

A mes chères frères : *Mohamed, Ali, Djelali, Lakhdar*, et surtout *Saïd*.

A mes chères sœurs : *Bakhta, Cherifa, et Djameia*.

A *Khouloud, Rawane, Wiam, Dina, Ghizlane*.

A tout la famille «*Halla*».

A mon binôme *CHAIB Karima*, qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A toutes les personnes que j'ai oublié de citer, à tous les étudiantes de 2^{ème} année master Exploitation et protection des ressources marines vivantes.

Enfin à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

Nacera

Dédicaces

Au vrais sens de l'amour, je dédie ce modeste travail, ce fruit de plusieurs années:

Aux personnes les plus chères au monde mes chers parents.

Ama très chère Maman saida fatima

La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie, qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

Amon très cher Papa charef

Qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices qui tu as consacré pour mon éducation et ma formation. C'est grâce à vous que je suis arrivée aujourd'hui à ce niveau d'étude.

Ames chères frères : Kadour, Abd raouf, Mohamed

Ames chères sœurs : Nadjat, Fatma, Imane et I nasse

Atout la famille « Chaib » .

Amon binôme Halla Nacera

A tout mies amis surtout Haddou Fairouz , Bessghire Djamilia et Chibani Fethi

*Atoutes les personnes que j'ai oublié de citer, à tous les étudiantes de 2^{ème} année
master*

Exploitation et protection des ressources marines vivantes.

Enfin à tous ceux que j'aime et qui m'aiment

Chaib karima

Liste des Abréviations

AWDT : Agar Well Diffusion Test.

ATCC : American type culture collection.

BHIB : bouillon cœur cerveau .

BHI : Brain Heart Infusion .

DA : Degré d'acétylation.

DD : Degré de désacétylation .

DO : Densité optique .

MRS : De Man ; Rogosa et Sharpe, 1960

PM : poids moléculaire .

PH : potentiel H hydrogène .

PCA : Plate Count Agar .

PDA : Potato Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée et gélosée.

TGEA : tryptone Glucose Extrait de viande Agar .

OGA : Gélose à l'oxytétracycline glucose

UFC : Unité Formant Colonies .

Liste de tableaux

Chapitre I

Partie 1 : Généralités sur crevette rouge

Tableau 01: Tableau récapitulatif des clés de détermination d'*Aristeus antennatus* (R ISSO 1816).....4

Chapitre I

Partie II : Chitine et Chitosan

Tableau 02 : Sources potentielles de chitine (Tolaimate et al, 2003).....15

Chapitre II

Résultats et discussions

Tableau 0 3: Caractères organoleptiques de la chitine et du chitosane extrait.....63

Tableau 04: Rendement massique de chitine et chitosane d'après les deux méthodes d'extraction.....63

Tableau 05 : représente le degré d'acétylation de chitosane (DA) dans les deux méthodes.....65

Tableau 06: Corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à PH 6 (Thanou et Junginger, 2005).....65

Tableau 07 : l'analyse biochimique des teneurs de l'hydrolysats chimique.....66

Tableau 08: Variabilité de la teneur en eau contenue dans le déchet de différentes espèces de crevettes68

Tableau 09 : variabilité de la teneur en cendre contenue dans le déchet de la crevettes.....	68
Tableau 10 : variabilité de la teneur en lipides contenue dans le déchet des différentes espèces de crevettes.....	69
Tableau 11 : Variabilité de la teneur en protéines contenue dans le déchet de la crevette.....	69
Tableau 12 : variabilité de des composants contenus dans le déchet de crevette et la chitine	70
Tableau 13: Nombre de colonies de la flore mésophiles obtenue dans les différentes dilutions du chitosane.....	71
Tableau 14: Le pouvoir antimicrobien du chitosane dans différents milieux de culture avec la souche E.coli et leur diamètre d'inhibition.....	76
Tableau 15: Le pouvoir antifongique du chitosane dans différents milieux de culture avec la souche de champignon et leur diamètre d'inhibition.....	80

Listes de figure

Chapitre I

Partie 1 : Généralités sur crevette rouge

<i>Figure 01: Aspect générale d'Aristeus antennatus</i> (RISSO ,1816).....	2
<i>Figure 02 : Schéma représentatif de l'anatomie externe d'Aristeus antennatus</i>	3
<i>Figure 03 a : Rostre du mâle adulte</i> (Kharraz Ali ,2006).....	4
<i>Figure 03 b: Carapace de la femelle(ou du jeune mal)</i> (Kharaz Ali, 2006).....	4
<i>Figure 04 a : Le Pétasma chez le mâle</i> (Kharaz Ali, 2006).....	6
<i>Figure 04 b : L'Oviducte chez la Femelle</i> (Kharraz Ali, 2006).....	6
<i>Figure 05: Cycle biologique d'Aristeus antennatus</i> (RISSO 1816), (in M OTOH, 1981).....	7
<i>Figure 06: Schéma de l'anatomie interne de la crevette rouge Aristeus antennatu</i> (R ISSO, 1816) (H OUSEMAN, 2000).....	9
<i>Figure 07 : Répartition géographique d'Aristeus antennatus</i> (RISSO, 1816). (HOLTHIUS, 1980).....	12

Chapitre I

Partie II : Chitine et Chitosan

<i>Figure 08 : Structure moléculaire de la chitine</i> (Mrunal, 2004).....	16
<i>Figure 09: Représentation générale du chitosane</i> (Mati Baouche, 2012).....	19

Chapitre II

Matériels et méthodes

<i>Figure 10</i> : (A) crevette à l'état fraîche, (B) déchet de crevette (carapace + la tête).....	31
<i>Figure 11</i> : la poudre de déchet de crevette.....	31
<i>Figure 12</i> : minéralisation de l'échantillon.....	36
<i>Figure 13</i> : distillation de l'échantillon.....	36
<i>Figure 14</i> : principe de titrage (A avant, B après titrage).....	37
<i>Figure 15</i> : Séparation des phases.....	38
<i>Figure 16</i> : une rote à vapeur.....	38
<i>Figure 17</i> : schéma récapitulatif de préparation des hydrolysats chimiques.....	41
<i>Figure 18</i> : Processus de déminéralisation avec l'HCL de 1N.....	42
<i>Figure 19</i> : La déprotéinisation avec NaOH de 2.5N à 70 °C, pendant 06 heures, (mousse blanche = protéines éliminée).....	43
<i>Figure 20</i> : Aspect de la chitine après déminéralisation et déprotéinisation ; blanchiment.....	44
<i>Figure 21</i> : Processus de déminéralisation avec l'HCL de 5N.....	45
<i>Figure 22</i> : (A) déprotéinisation avec NaOH de (5%), (B) l'aspect de chitine.....	46
<i>Figure 23</i> : Le chitosane, polymère dérivé de la chitine par désacétylation(Devin, 2015).....	46
<i>Figure 24</i> : Aspect du chitosane après désacétylation.....	47
<i>Figure 25</i> :(A) processus d'extraction de chitosane dans un bain d'huile(B) l'aspect de chitosane....	48
<i>Figure 26</i> : Méthode d'extraction de la chitine et du chitosane par voie chimique.....	49
<i>Figure 27</i> : La solubilisation du chitosane dans l'acide acétique 1 %, à température ambiante, sous agitation constante. (Fig. 31-1) chitosane de méthode 1 et (Fig. 31-2) de méthode 2.....	51
<i>Figure 28</i> : préparation de la solution mère et les dilutions décimale.....	52
<i>Figure 29</i> : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en Puits.....	58

Figure 30 : représente technique de dilution et de dénombrement par des spots.....60

Figure 31: Le mélange de BHIB 15 ml, Chitosane en solution 1666 µl, la souche en suspension

1666 µl.....61

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

<p style="text-align: center;">Chapitre I Partie I : Généralité sur la crevette rouge</p>

I-1- Données générales sur les Crustacés.....	1
I-1-2- Présentation et identification de l'espèce	1
I-1-2-1- Caractères distinctifs et dimorphisme sexuel	3
I-1-2-3-Taxonomie.....	4
I-1-2-3-1- Nom scientifique.....	4
I-1-2-3-2- Position systématique.....	5
I-1-2-3-3 Noms vernaculaire	6
I-1-3- Biologie de l'espèce.....	6
I-1-3-1- Reproduction.....	6
I-1-3-2- Métamorphose.....	7
I-1-3-3- Digestion.....	8
I-1-3-4- Excrétion.....	8
I-1-3-5-Respiration.....	8
I-1-3-6- Locomotion.....	9
I-1-3-7-Système nerveux et sensibilité.....	9
I-1-4- Régime alimentaire et place dans la chaîne trophique.....	10
I-1-5- Qualité nutritive et thérapeutique.....	10
I-1-6-Habitat.....	11
I-1-6-1- Nature du fond.....	11
I-1-6-2- Gamme de profondeurs.....	11

Sommaire

Chapitre I Partie II : La chitine et Le chitosane

I-2- Les Co-produits de crevette.....	13
I-2-1-Définition.....	13
I-2-2- Historique.....	13
I-2-3-Sources de la chitine et du chitosane.....	14
I-2-4- La chitine.....	15
I-2-5- Procédé d'extraction de la chitine.....	16
I-2-5-1 La production de chitine par voie chimique	16
a) La déminéralisation.....	16
b) La déprotéinisation.....	17
c) Blanchiment.....	17
I-2-5-2 Traitements biologique.....	18
I-2-6 Le chitosane.....	18
I-2-7 Propriétés de chitosane.....	19
I-2-7-1 Propriétés physico-chimiques du chitosane.....	19
• I-2-7-1-1 Degré d'acétylation (DA).....	19
• I-2-7-1-2 La viscosité.....	19
• I-2-7-1-3 Solubilité.....	19
I-2-7-2 Propriétés biologique du chitosane.....	20
I-2-7-2 -1 Biodégradabilité.....	20
I-2-7-2 -2 Biocompatibilité.....	20
I-2-7-2 -3 Activité antimicrobienne du chitosane.....	20
I-2-7-2 -4- Activité antioxydant du chitosane.....	22
I-2-8 Les applications de la chitine et du chitosane.....	22

Sommaire

I-2-8-1- Domaine agricole.....	23
I-2-8-2- Domaine cosmétique	23
I-2-8 3-Les applications alimentaires.....	23
I-2-8 -4- Domaines biomédical et pharmaceutique.....	24
I-2-8 -5-Traitement des eaux.....	25

Chapitre I Partie III : Les milieux de culture

III- Les milieux de culture en bactériologie	27
III-1-Définition.....	27
III-2-Principe.....	28
III-3-Les différents types de milieux.....	28
III-3-1-Milieu de culture sélectif.....	28
III-3-2-Milieu semi-synthétique.....	29
III-3-3-Milieu différentiel.....	29
III-3-4-Milieu de culture empirique	29
III-3-5-Milieu de culture enrichi.....	30
III-3-6-Milieu synthétique	30

Chapitre II Matériels et méthodes

II.1. Présentation de l'échantillon.....	31
II-1-1-Prétraitement des échantillons.....	31
II-1-2-Extraction chimique de la chitine.....	32

Sommaire

II-1-2-1 - Première méthode	32
a) Déminéralisation.....	32
b) Déprotéinisation.....	33
c) Blanchiment	34
II-1-2-2 Deuxième méthode.....	34
a) Déminéralisation.....	35
b)Déprotéinisation	35
II-1-3 Préparation du chitosane à partir de la chitine (Processus de déacétylation).....	36
II-1-3-1 Première méthode d'extraction du chitosane	36
II-1-3-2 deuxième méthode d'extraction du chitosane.....	37
II-1-4 Degré d'acétylation (DA) de chitosane	39
II-1-4 -1 Solubilisation du chitosane.....	39
II-1-5-Hydrolysats Chimiques.....	41
II-1-5-1-Hydrolyse acide.....	41
II-1-5-2-Hydrolyse alcaline.....	42
II-1-6-Les analyses biochimiques des échantillons	44
II-1-6-1-La teneur en humidité.....	44
II-1-6-2-La teneur en cendre	45
II-1-6-3 -Teneur en protéines (méthode de kjeldah).....	46
II-1-6-4-Teneur de lipides par la méthode de Folch	50
II-2-Les analyses microbiologiques.....	52
II-2-1-Préparation de la solution mère et les dilutions décimales.....	52
II-2-2-Dénombrement de la flore totale(ou germes aérobies mésophiles totaux)	52

Sommaire

II-2-3-Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d'action	53
II-2-3-1-Les milieux de culture utilisée.....	53
II-2-3-2-Les souche utilisé.....	55
Escherichia coli.....	55
Bactérie lactique.....	56
II-2-3-3-Renouvellement et l'enrichissement la souche pathogène.....	56
II-2-3-4-Méthode de diffusion en puits AWDT (méthode de BarefootKaenhammer, 1983)	56
II-2-3-5-Cinétique de croissance bactérienne mises en contact avec le chitosane la méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disque).....	58
II-2-3-6-Mesure de la densité optique.....	59
II-2-4- Etude de pouvoir antifongique.....	60
Les champignons.....	60
Les levures.....	60
II-2-4-1-Préparation du milieu de culture.....	60
II-2-4-2-Test Antifongique.....	61

Chapitre III

Résultats et discussions

III.1 Analyse des coproduits de la crevette.....	62
III-1-2-Caractères du chitosane extrait.....	62
III -1-3-Solubilité du chitosane	64
III-1- 4- Degré d'acétylation de chitosane (DA).....	65

Sommaire

III.1.5-Analyse biochimique de déchet de crevette (tête et carapace).....	66
III.1-5-1 Analyse biochimique des hydrolysats chimiques.....	66
III-1-5-2- Analyse de la teneur en eau.....	67
III.1.5. 3. Analyse de la teneur en cendres.....	68
III.1.5.4.Analyse de la teneur en lipides.....	68
III.1.5.5. Analyse de la teneur en protéines.....	69
III-1-5-6- Analyse biochimique de la chitine et du chitosane.....	69
III. 2. Résultats de l’analyse microbiologique.....	70
III. 2. 1 Effet sur les germes totaux.....	70
III-2-2-Les milieux de culture modifiées.....	71
III-2-3-Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d’action.....	73
III-2-3-1-Méthode de diffusion en puits AWDT (Barefoot et Kaenhammer, 1983).....	74
III-2-3-2-Cinétique de croissance bactérienne mises en contact avec le chitosane	76
III-2-3-3-Densité optique.....	78
III.-3-Résultat de l’analyse du pouvoir antifongique.....	79

Résumé

Le chitosane, dérivé de la chitine, est retrouvé naturellement dans la paroi des zygomycètes, la paroi de certaines algues vertes et, de façon temporaire, dans la carapace d'arthropodes lors de leur mue (Crini et al. 2009). Néanmoins, la principale source de chitosane demeure la chitine que l'on traite chimiquement par hydrolyse basique (désacétylation). Ce dernier présente des propriétés intéressantes qui peuvent être exploitées dans différents domaines. Omniprésent dans l'industrie sous une forme ou une autre, on retrouve le chitosane en agriculture (pour protéger les plantes), dans l'industrie cosmétique (stabilisant, régénérant cellulaire, antibactérien) ou encore l'industrie du papier (propriétés mécaniques) agroalimentaire, pharmaceutique, médical, traitement des eaux.

Le présent travail s'inscrit dans l'analyse et la détermination de composition biochimique de carapace de crevette rouge *Aristeus antennatus*. La valorisation des coproduits de crustacée et principalement l'étude du pouvoir antifongique et antimicrobien du chitosane extrait à partir des carapaces de crevette. Son extraction a été réalisée par traitement chimique. Concernant les deux pouvoirs, antifongique et antimicrobien. Les résultats sont exprimés par le diamètre des zones d'inhibition par méthode de diffusion en puits AWDT. Dans un premier temps, parmi les résultats obtenus dans le test de AWDT (culture bactérienne en masse) l'inhibition c'est le plus important résultat qui a été observé vis-à-vis de la souche *E. Coli*. Le Test de l'évaluation de la cinétique de croissance mise en contacte avec le chitosane a montré que cette bactérie a été plus sensible au chitosane. Enfin, nos résultats indiquent que le chitosane étudié présente de bonnes activités antifongiques,

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes dans l'utilisation du chitosane comme biopréservateur des aliments.

Mots clés : Carapaces de crevette - Chitine -Désacétylation - Chitosane -Analyse biochimique - Pouvoir antimicrobien - Pouvoir antifongique.

Abstract

Chitosan, derived from chitin, is found naturally in the wall of zygomycetes, the wall of some green algae and temporarily in the carapace of arthropods during moulting (Crini et al., 2009). Nevertheless, the main source of chitosan remains the chitin which is chemically treated by basic hydrolysis (deacetylation). The latter has interesting properties which can be exploited in different fields. It is omnipresent in the industry in one form or another, such as chitosan in agriculture (to protect plants), in the cosmetic industry (stabilizer, cell regenerator, antibacterial agent) or the paper industry (mechanical properties), Pharmaceutical, medical, water treatment.

This work is part of the analysis and determination of the biochemical composition of red shrimp carapace *Aristeus antennatus*. The valorisation of crustacean co-products and mainly the study of the antifungal and antimicrobial power of chitosan extracted from shrimp shells. Its extraction was carried out by chemical treatment. Concerning the two powers, antifungal and antimicrobial. The results are expressed by the diameter of the zones of inhibition by AWDT diffusion method. Initially, among the results obtained in the AWDT test (mass bacterial culture), inhibition is the most important result observed with respect to the E. coli strain. The test of the evaluation of growth kinetics in contact with chitosan showed that this bacterium was more sensitive to chitosan. Finally, our results indicate that the chitosan studied exhibits good antifungal activities,

These results offer interesting insights into the use of chitosan as a food biopreservative.

Key words: Shrimp carapaces - Chitin - Deacetylation - Chitosan - Biochemical analysis - Antimicrobial power - Antifungal power.

Parmi les Crustacées exploitables en milieu continental, les crevettes forment un maillon très important du fait de la place de choix qu'elles occupent dans les échanges commerciaux (FAO/OMS, 2011). Il existe plus de 20 familles différentes de crevettes à travers le monde et plus de 2000 espèces décrites qui sont, pour la plupart inféodées au milieu maritime.

Actuellement, une petite partie des co-produits de crevette est transformée. Ces transformations consistent principalement à la conversion en farine pour l'alimentation animale et à l'extraction de la chitine. Cependant, une étude a montré que la qualité des protéines de ces co-produits est inférieure à celle de la farine de poisson utilisée en alimentation animale (Fanimio *et al*, 2000).

La production de crevettes représente 6 millions de tonnes en 2006, soit environ 5% des 110 millions de tonnes de production mondiale de poissons (FAO, 2009). La crevette ne figure pas parmi les dix catégories de poisson les plus engendrées. Cependant, c'est le produit marin le plus valorisé sur le marché mondial avec une contribution de 16% en valeur.

La valorisation des coproduits conduit à des produits dérivés qui sont utilisés comme matière première ou ingrédient dans d'autres domaines tels que : l'agriculture, l'alimentation humaine et animale, la nutraceutique et pharmaceutique, la cosmétique, le médical... A partir d'un même type de co-produit, il est possible d'obtenir différents produits dérivés : farine, huile, hydrolysats... (Dumay, 2006).

Dans ce contexte, l'un des polysaccharides actuellement, le plus étudié sans conteste, est le chitosane qui est un dérivé de la chitine ; le deuxième composant très abondant dans la nature après la cellulose. Elle est la composante principale d'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamards, ...), des cuticules des insectes. Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries (Tolaimate *et al.*, 2003), ce biopolymère est facilement obtenu par désacétylation de la chitine.

L'objectif principal de cette étude est de valoriser les co-produits de crevette rouge *Aristeus antennatus*. Ce travail s'organisera en 3 chapitres :

Le premier chapitre fait l'état de la revue bibliographique concernant généralités sur crevette rouge *Aristeus antennatus*. Nous présenterons ensuite les différentes voies de valorisation des co-produits de crevette.

Le deuxième chapitre présente le matériel et méthodes sur les déchets de crevette, les expériences effectuées concernant l'analyse des paramètres biochimique et l'activité antimicrobienne et antifongique du chitosane.

Le troisième chapitre représente les résultats et discussion que nous avons obtenue et à la fin on retrouve une conclusion ainsi que les perspectives préconisées pour cette thématique.

I-1- Données générales sur les Crustacés :

Les Crustacés constituent l'une des classes de l'embranchement des Arthropodes (C HARPON, 1999), celle-ci regroupe les animaux au corps segmenté, chaque segment est relié aux autres par des membranes articulaires et porte une paire d'appendices articulés. Leur corps est enfermé dans une cuticule tégumentaire chitineuse sécrétée par l'épiderme (BEAUMONT et CASSIER, 1998). Les Crustacés se distinguent des autres classes par la présence de deux paires d'antennes (antennules et antennes), par la possession des nombreux appendices et, pour ses représentants aquatiques, par des dispositifs spécifiques comme les branchies pour la respiration sous l'eau.

Les 45 000 espèces qui composent cette classe présentent une grande diversité de formes et de modes de vie : on trouve des espèces marines, des espèces dulçaquicoles et des espèces terrestres. Elles sont libres et mobiles ou bien fixées sur un support inerte ou vivant. Certains Crustacés sont parasites ou commensales (C HARPON, 1999).

Les Crustacés ont des appendices possédant de nombreuses fonctions : la respiration, la locomotion, la nage ou l'alimentation. On peut retrouver des membres formant des pinces qui sont particulièrement développées chez certains Décapodes (les Pénéidés, les Caridés, les Astacidés, les Anomoures et les Brachyours). Ils sont fondamentalement constitués de trois régions segmentées : le céphalon, le péréion et le pléon, terminé par le telson.

Cependant, chez certains groupes, un ou plusieurs segments thoraciques s'incorporent à la tête pour former le céphalothorax, comme on peut le voir chez les Décapodes. Bien qu'il existe des Crustacés terrestres et dulçaquicoles ; ces animaux ont surtout colonisé les mers et océans dont ils occupent tous les habitats depuis la zone supralittorale jusqu'aux abysses. On distingue deux groupes : les Crustacés inférieurs ou les Entomostracés et les Crustacés supérieurs ou Malacostracés.

I-1-2- Présentation et identification de l'espèce :

La crevette rouge *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), présente une coloration rouge pâle à vif avec une tonalité bleuâtre sur la carapace (Figure 01). Elle est caractérisée par la présence d'une carapace de nature chitineuse, sécrétée par l'épiderme, et sert aussi d'exosquelette.

Elle est caractérisée par une teneur élevée en chitine, (polysaccharide formant de longues fibres) ; son corps se divise en segments articulés, et une présence d'appendices articulés : les antennules, les antennes, les mandibules (mâchoires antérieures), les maxilles (mâchoires postérieures), les maxillipèdes (pattes-mâchoires), les péréiopodes, les pléopodes (ou pattes locomotrices) et l'uropode (nageoire caudale) (Figure 2).

La crevette rouge *Aristeus antennatus* appartient à la sous classe des Crustacés supérieurs ou Malacostracés, qui comprennent presque toujours 19 segments et appendices : 5 au niveau de la tête, 8 au niveau du thorax et 6 au niveau de l'abdomen (parfois 7), des yeux généralement pédonculés et 5 paires de pattes locomotrices (HOLTHIUS, 1980).

Cette espèce appartient au sous-ordre des Natantia et à la famille des Aristaeidae, elle possède un abdomen bien développé, terminé par une nageoire caudale formée par le telson et les appendices du dernier anneau abdominal.



Figure 01: Aspect générale d'*Aristeus antennatus* (RISSO ,1816).

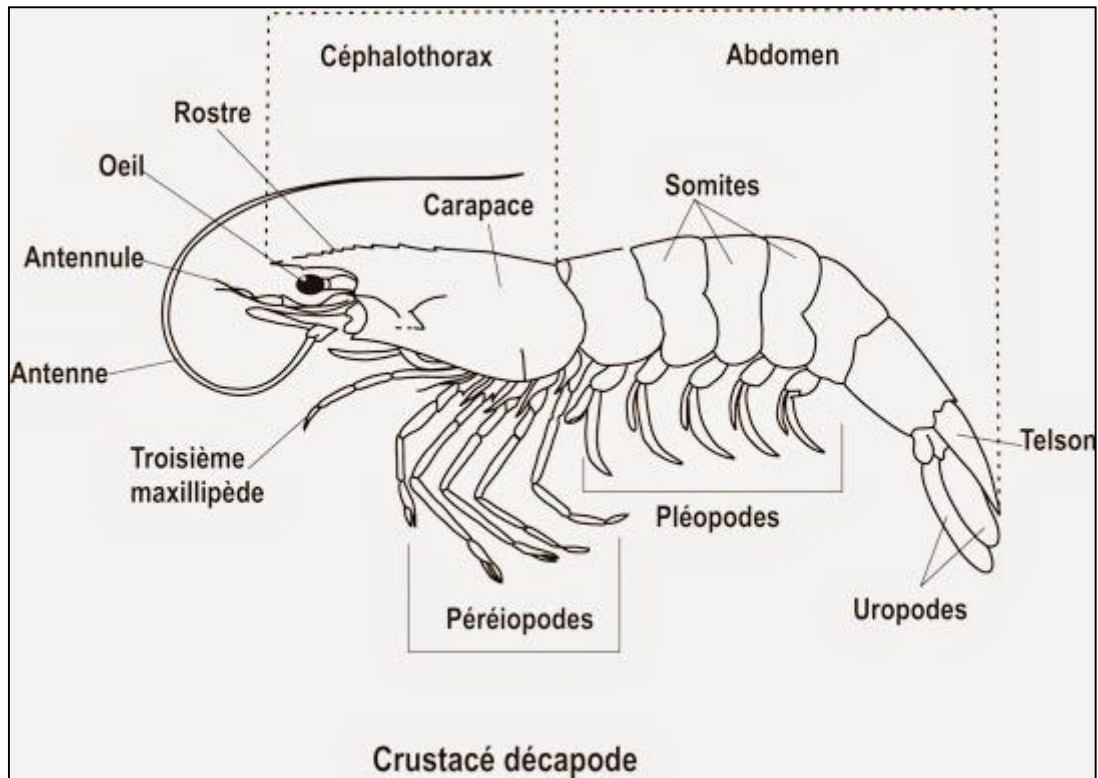


Figure 02 : Schéma représentatif de l'anatomie externe d'*Aristeus antennatus*

(*RISSO, 1816*).

I-1-2-1- Caractères distinctifs et dimorphisme sexuel :

En ce qui concerne la taille, les crevettes présentent un dimorphisme sexuel : les femelles sont plus grandes que les mâles et peuvent atteindre jusqu'à 22 cm, avec un pourcentage de femelles, qui est de 90 %.

Chez cette espèce, le dimorphisme sexuel peut s'observer au niveau du rostre. Chez le mâle adulte, le rostre est court et réduit, dépassant les yeux mais pas l'extrémité distale de l'écaille antennaire, et son bord dorsal est armé de 3 dents avec une pointe terminale fine (Fig.03a). Chez le jeune mâle et chez la femelle, le rostre est très allongé, il dépasse l'écaille antennaire et porte 3 dents sur sa partie basale, sa partie distale est dépourvue de dents et se termine par une pointe effilée, incurvée vers le haut (Fig. 03b). Pour les deux sexes, le bord ventral du rostre est sans dents.

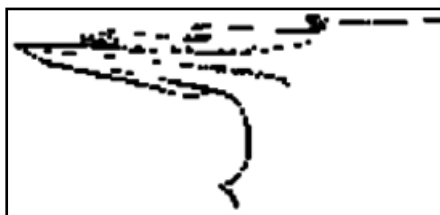


Figure 03 a : Rostre du mâle adulte.
(Kharraz Ali ,2006)

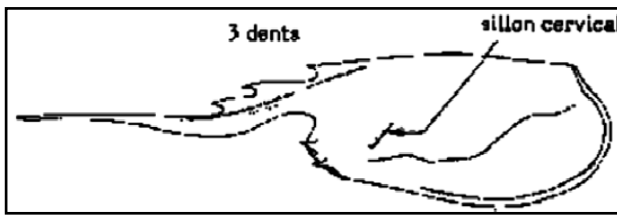


Figure03 b: Carapace de la femelle
(ou du jeune mal) (Kharaz Ali, 2006).

I-1-2-3- Taxonomie :

I-1-2-3-1. Nom scientifique :

Jusqu'à présent il n'existe pas d'autres noms scientifiques par l'espèce étudiée encore en usage à part son nom spécifique *Aristeus antennatus* (RISSO, 1816). Les clés de détermination de l'espèce se résument dans le tableau 01.

Tableau 01 : Tableau récapitulatif des clés de détermination d'*Aristeus antennatus* (R ISSO 1816).

Embranchement	Arthropodes
Sous-embranchement	Antennates
Classe	Crustacés
Sous-classe	Malacostracés : constituent les Crustacés supérieurs possédant 19 paires d'appendices.
Super-ordre	Eucarides
Ordre	Décapodes (LATRELLE, 1802) : se caractérisent par la présence de 05 paires d'appendices thoraciques appelés péréiopodes.
Sous-ordre	Natantia (BURKENROAD, 1963) : ces péréiopodes sont utilisés pour la nage.
Infra-ordre	Penaeidea (RAFINESQUE, 1815) : les pleurons du deuxième segment abdominal recouvrant ceux du troisième, et la troisième paire de péréiopode égale à la deuxième paire avec la présence de l'organe copulateur chez les males au niveau de la première paire de pléopode, appelé pétasma.

Super-famille	Penaeoidea (RAFINESQUE, 1815) : se caractérise par un rostre bien développé, et armé de dents, avec présence de plusieurs branchies, et cinq paires de péréiopodes bien développées munies de pinces pour les trois premières.
Famille	Aristaeidae (WOOD-MASON, 1891) : carapace sans épines post orbitaire, fouets antennulaires libres cylindriques et filiformes. Œil avec un tubercule bien marqué sur le pédoncule, sans écaille à sa base, avec une couleur rouge.
Genre et Espèce	Aristeus (DUVERNOY, 1841) Antennatus (RISSO, 1816) le deuxième segment de l'abdomen ne recouvre pas le premier segment, avec de petites pinces aux trois premières paires de patte, et la présence de trois épines sur le bord supérieur seulement.

I-1-2-3-2. Position systématique :

Plusieurs études, synoptiques et comptes rendus d'expériences relatives à l'espèce, notamment ceux de H OLTHIUS (1980), FICHER et al. (1987) et FALCIACI et al. (1996), fournissent des données sur la taxonomie de l'espèce, qui occupe la position ci-après :

- **Embranchement** : Arthropodes
- **Sous-embranchement** : Antennates
- **Classe** : Crustacés
- **Sous-classe** : Malacostracés
- **Super-ordre** : Eucarides
- **Ordre** : Décapodes (L ATRELLE, 1802)
- **Sous-ordre** : Natantia (BURKENROAD, 1963)
- **Infra-ordre** : Penaeidea (R AFINESQUE, 1815)
- **Super-famille** : Penaeoidea (RAFINESQUE, 1815)
- **Famille** : Aristaeidae(WOOD-MASON, 1891)
- **Genre** : Aristeus (DUVERNOY, 1841)
- **Espèce** : antennatus (RISSO, 1816)

I-1-2-3-3 Noms vernaculaire :

A. antennatus est connue sous les noms vernaculaires suivants qui diffèrent selon les régions :

-**Espagne** : Gamba rosada (nom espagnol officiel), Chorizo blanco, Gamba alistada, Carabinero.

-**France**: Crevette rouge

-**Angleterre**: Red shrimp

- **Italie**: Gambero rosso chiaro, Gámbao rossu-ciâeo (Genova), Ammiru cani (Sicile).

-**Algérie** :Hamra ,Gamba dans l'extrême ouest, algérien,Camroun (قمرون) par rapport à sa forme lunaire .

I-1-3- Biologie de l'espèce :

I-1-3-1. Reproduction :

Chez *A. antennatus* les sexes sont séparés; les glandes génitales, situées au-dessus de l'intestin, forment de longs cordons recourbés latéralement en crosse et unis au niveau du cœur par une bandelette transversale d'où partent les canaux évacuateurs des produits génitaux : les spermiductes chez les et mâles les oviductes chez les femelles (Fig.04a et 04b) (in CAMPILLO, 1994).

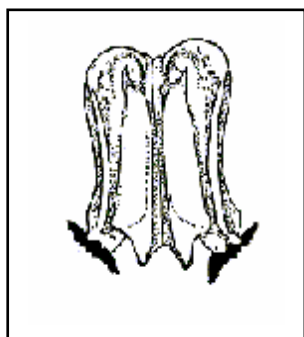


Figure 04 a : Le Pétasma chez le mâle.
(Kharraz Ali, 2006).

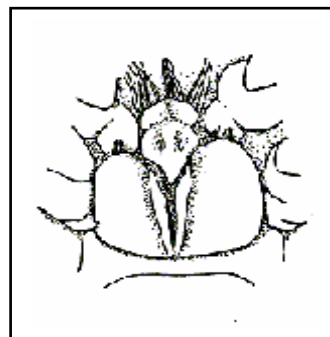


Figure 04 b : L'Oviducte chez la Femelle Kharraz Ali, 2006).

Concernant la reproduction, la période de ponte de cette crevette est estivale allant d'avril à septembre. Le pourcentage des femelles est toujours élevé (de l'ordre de 80%). La taille de première maturité sexuelle des femelles est de 23 millimètres de longueur céphalothoracique en moyenne et la fécondité relative est estimée à 8000 œufs / gramme de poids corporel (in CAMPILLO, 1994).

Cette crevette est gonochorique, c'est-à-dire que les gamètes mâles et femelles sont produits par des individus différents (E CHALIER, 1968). Le mâle expulse des capsules contenant les spermatozoïdes (spermatophores) et les fixe sur l'abdomen femelle face à l'orifice génital. La fécondation a lieu au moment de la ponte et les œufs fécondés sont portés par les pattes abdominales sous l'abdomen de la femelle (SHERIDAN, 1999). Après la période d'incubation l'éclosion aura lieu à un stade larvaire planctonique appelé nauplius. Cette larve va subir des mues accompagnées de métamorphose, à chaque mue, il y a formation de nouveaux anneaux et de nouveaux appendices et apparait des stades larvaires successifs (figure 05).



Figure 05: Cycle biologique d'*Aristeus antennatus* (RISSO 1816), (in M OTOH, 1981).

I-1-3-2. Métamorphose :

Les métamorphoses ou les mues sont sous l'action d'une hormone sécrétée au niveau de la glande maxillaire. Les Crustacés sécrètent aussi une autre hormone, près des pédoncules oculaires, cette autre hormone inhibe la mue. C'est donc par le jeu d'un double contrôle hormonal que les mues ou les métamorphoses se déclenchent (PETIT, 2004).

Après incubation des œufs, les larves "nauplius" libérées dans le milieu mènent une vie pélagique. Ce premier stade larvaire, non segmenté, possède trois paires d'appendices céphaliques qui donneront après métamorphose, un œil médian, des antennes, des antennules, et les mandibules

qui servent à la locomotion. Il peut être libre et planctonique dès ce stade. Le second stade porte le nom de métanauplius et à chaque métamorphose, les larves acquièrent de nouveaux appendices.

Chez les espèces incubatrices, comme *Aristeus antennatus*, le développement se fait au sein de la membrane de l'œuf jusqu'à des stades plus avancés. Le dernier stade larvaire correspond aux larves « zoé » qui constitue la dernière écophase pélagique, puis que les adultes sont démersals. On peut rajouter que la présence de métaux lourds dans l'eau sont réputés particulièrement néfastes pour ces organismes, dont ils entravent sur le long terme le mécanisme de mue.

I-1-3-3. Digestion :

Elle possède un estomac plus ou moins complexe : le moulin gastrique, qui est souvent subdivisé en deux parties, appelées estomac cardiaque et estomac pylorique. Il est prolongé par l'intestin moyen et accompagné d'un important hépatopancréas. La digestion est extracellulaire, mais les processus chimiques ont surtout lieu dans l'intestin moyen, siège de l'absorption, et dans les diverticules hépatopancréatiques (HOUSEMAN, 2000).

I-1-3-4. Excrétion :

Cet appareil est constitué par une paire de glandes antennaires, qui s'ouvrent à la base des appendices correspondants. L'essentiel de l'excrétion est toutefois assuré par les branchies qui éliminent l'ammoniaque et les composés uriques (SCHMIDT –NIELSON, 1998).

I-1-3.5. Respiration:

L'appareil respiratoire est constitué de lamelles ou de filaments branchiaux enfermés dans une cavité branchiale (en position ventro-latérale dans le céphalothorax). La circulation de l'eau est assurée par les battements du scaphognathite du maxille. Les branchies sont en relation avec l'appareil circulatoire pour réaliser les échanges gazeux (HOUSEMAN, 2000).

I-1-3.6. Locomotion :

Elle se déplace en se servant de ses pattes locomotrices pour la marche, et elle se propulse en arrière par un simple coup de queue pour la nage (HOUSEMAN, 2000).

I-1-3.7. Système nerveux et sensibilité :

Une sensibilité s'exerce au niveau des poils sensoriels répartis surtout sur les antennes et antennules mais, aussi, sur toute la surface du corps.

Le système nerveux est de type annélidien, c'est-à-dire qu'il comporte un centre nerveux acronial au niveau du céphalon, parfois appelé archicérébron, suivi de deux centres nerveux par métamère. La masse nerveuse acroniale est située dorsalement, en position supra-oesophagienne ; la chaîne nerveuse est dite ventrale ou sous-intestinale. Du point de vue histologique, le système nerveux présente des neurones, formés de péricaryones (les centres nerveux) et de prolongements cellulaires rites (nombreuses).

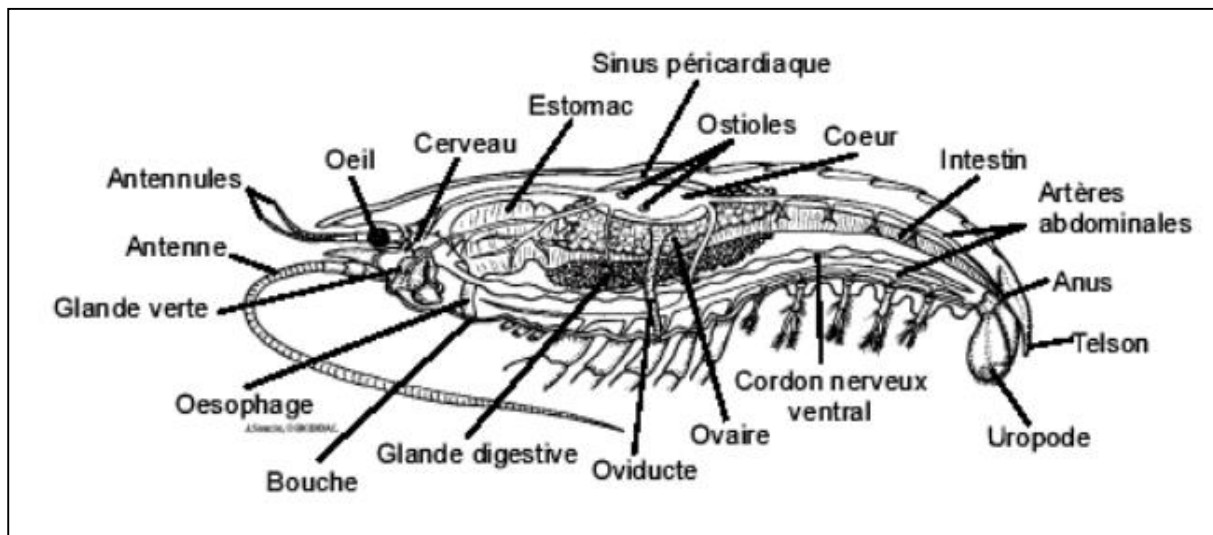


Figure 06: Schéma de l'anatomie interne de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (R ISSO, 1816) (HOUSEMAN, 2000).

I-1-4- Régime alimentaire et place dans la chaîne trophique :

Les larves se nourrissent d'organismes planctoniques par filtration de l'eau. De caractère généralement benthique, cette crevette est détritivore, sa nourriture est principalement constituée de petits invertébrés (Crustacés, Polychètes,...), d'algues mais, aussi, de déchets animaux. Pour la plupart elles sont capables de supporter des jeûnes prolongés.

Toutes les espèces de crevettes semblent subir une forte prédation, exercées par un grand nombre d'animaux marins, essentiellement la Roussette, la Raie et le Merlu. Cette crevette se trouve donc à l'échelon secondaire ou tertiaire de la pyramide trophique.

I-1-5- Qualité nutritive et thérapeutique :

A coté des 20 acides aminés standard, la chair des crevettes offre, aussi, des acides aminés non standard, c'est-à-dire d'autres acides aminés inconnus jusqu'à présent, que synthétisent les crevettes et les autres fruits de mer. La myosine est une protéine contractile du muscle des crevettes riche en lysine. Dans l'organisme des Crustacés, cet acide aminé standard se lie avec l'ion de méthane pour donner la méthyllysine appartenant à la classe des acides aminés non standard.

La plupart de ces nouveaux acides aminés proviennent de la transformation des 20 acides aminés ordinaires (KY et al. 2003). Les enzymes de la crevette en se liant soit à une molécule d'eau, d'alcool, d'oligo-élément ou d'oxygène prélevé de l'eau de mer donne les résultats suivants : La proline se change en hydroxyproline en présence d'une molécule d'eau, et c'est la même chose pour la lysine, qui mute en hydroxylysine que l'on trouve dans le collagène et dans le foie des crustacés.

Citons encore le carboxyglutamate, un acide aminé non conventionnel, son rôle consiste à seconder la prothrombine dans le processus de coagulation. Les personnes qui présentent une fragilité capillaire, avec des taches de bleu apparues dès le moindre choc, tire grand bénéfice en consommant ces produits de la mer (K Y et al. 2003).

L'élastine de nos cartilages, bronches, artères est en partie composée de desmosine, celle-ci appartient aussi à la catégorie des acides aminés non standard. De la chair des crevettes, nos enzymes extraits des éléments de base pour reconstituer nos propres desmosines qui renouvellent l'élastine de nos vaisseaux (K Y et al. 2003).

La sélénocystéine renferme un acide aminé normal, la sérine, et un oligo-élément, le sélénium. Ces deux substances se combinent en sélénocystéine qui fait partie des acides aminés non standard, et qui consiste à neutraliser les électrons et les protons des radicaux libres.

On peut conclure que la consommation de ces crevettes à chair très appréciée n'apporte pas uniquement les 20 acides aminés (plus de 300 acides aminés atypiques) habituels des protéines, mais bien une infinité d'oligopeptides et d'acides aminés non conventionnels et indispensables dont les propriétés protectrices et biologiques sont recherchées par nos enzymes (K Y et al. 2003).

I-1-6. Habitat :

I-1-6-1. Nature du fond :

Pour l'ensemble de la côte algérienne et d'après les données de la campagne acoustique et de chalutage du navire de l'ISTPM «Thalassa » en 1982, et du navire espagnol « Visconde de Esa en 2004 » ainsi que le « M. S Benyahia » en 1984, cette espèce est capturée essentiellement sur les fonds à Isidella (*Isidella elongata*), et en faible quantité à la limite du faciès à Isidella et du faciès à Funiculines (*Funiculina quadrangularis*).

De nuit, du fait de sa remonté nocturne, *A. antennatus* peut être capturée sur des faciès situés à des profondeurs moindres (faciès à Funiculines ou Octocoralliaires).

I-1-6-2. Gamme de profondeurs :

Cette espèce démersale est située sur les biotopes vaseux de la pente continentale entre 400 m et 1500 m de profondeur (LAGARDERE, 1971). Sa température optimale sur fond est de 12° (GHIDALIA et B OURGEOIS, 1961). Par ailleurs, HOLTHUIS (1980) a signalé *Aristeus antennatus* à des profondeurs entre 200 et 1440 m comme habitat et il la situe dans les mêmes régions que celles citées par LAGARDERE (1971).

Les résultats des différentes campagnes, situent l'espèce ciblée sur les côtes algériennes à des profondeurs extrêmes allant de 260 à 820 m de jour avec comme température extrêmes 12.8°C – 13.3° C et de 80 à 650 m de nuit avec comme température 13.3°C à 16°C. Quant aux profondeurs et températures d'abondance optimal, il l'a situe respectivement de jour entre 400 – 650 m de profondeur pour des températures de 13°C - 13.3°C.

Quand à la distribution générale de l'espèce, elle est retrouvée en Atlantique orientale (entre les côtes du Portugal et les îles du Cap Vert) et dans toute la Méditerranée (figure 07).



Figure 07 : Répartition géographique d'*Aristeus antennatus*
(RISSO, 1816). (HOLTHIUS, 1980).

I-2- Les Co-produits de crevette :

I-2-1- Définition :

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Ils sont issus de la transformation des poissons pour la consommation humaine et sont constitués des têtes, des viscères, de la chute de parage (filetage), de la peau, de l'écaille, des arêtes et des queues de poissons. Pour les crevettes, ils engendrent les têtes, la carapace et la queue. Les co-produits marins constituent 30 à 60% des produits entiers et leur valorisation a attiré depuis plusieurs années l'attention des industriels pour un souci de rentabilité économique et de développement durable. En effet, ces matières renferment de nombreuses molécules valorisables notamment des protéines (Ibrahim *et al.*, 1999 ; Heu *et al.*, 2003), lipides (Dumay *et al.*, 2006 ; Dumay, 2006), minéraux, vitamines (Heu *et al.*, 2003), ainsi que d'autres composés bioactifs (Kim *et al.*, 2008), bénéfiques à la santé humaine et animale.

La valorisation des co-produits conduit à des produits dérivés qui sont utilisés comme matière première ou ingrédient dans d'autres domaines tels que l'agriculture, l'alimentation humaine et animale, la nutraceutique et pharmaceutique, la cosmétique, le médical... A partir d'un même type de co-produit, il est possible d'obtenir différents produits dérivés : farine, huile, hydrolysats... (Dumay, 2006).

I-2-2- Historique :

En 1811, le Professeur Henri Braconnot a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon qu'il a appelée fongina, une fraction résistante aux solutions alcalines concentrées (Mekahlia, 2007), Par ailleurs, cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses d'acides (Suyatama, 2006).

Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (scarabées) et a été ensuite nommée chitine par Odier, provient du mot grec *kitos* qui signifie l'enveloppe. En 1859, le Professeur Charles Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement

alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, ce n'est qu'en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler (Jaouen, 1994). En 1930 la structure du chitosane fut déterminée au cours de la thèse d'Albert Hofmann (Delavigne et Robillard, 2014), et en 1940, ces biopolymères la chitine et le chitosane ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau (Attila et al., 2009). Actuellement, la production de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crabes et de crevettes, est économiquement rentable (Kumar, 2000).

I-2-3-Sources de la chitine et du chitosane:

La chitine est le polysaccharide naturel le plus abondant dans la nature après la cellulose (Rinaudo, 2006). Elle est présentée principalement dans les coquilles de mollusques, dans les cuticules des insectes et dans la carapace des crustacés. Associée à des protéines, la chitine contribue à la cohésion des différentes couches qui constituent la coquille des mollusques ou la carapace des arthropodes (Tolaimate et al., 2003).

Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique. Le tableau (01) illustre les différentes sources potentielles de la chitine (Tolaimate et al., 2003).

Tableau 02 : Sources potentielles de chitine (Tolaimate et al., 2003).

Source de chitine	Teneur en chitine (%)
Crabe marbré (<i>Grapsus marmoratus</i>)	10
Crabe rouge (<i>Portunus puber</i>)	10
Le crabe comestible	70
Crabe araignée (<i>Maia squinada</i>)	16
Homard sauterelle (<i>Scyllarus arctus</i>)	25
	32
Langouste (<i>Palinurus vulgarisrus</i>)	44
Crevette (<i>Palaemon fabricius</i>)	20
Seiche (<i>sepia officinalis</i>)	40
Calmar (<i>Loligo vulgaris</i>)	
Champignons (<i>Mucor rouxili</i>)	9,4
	42
(<i>Aspergillus niger</i>)	23,7
(<i>Aspergillus phoenisis</i>)	

Bien que les sources potentielles de la chitine soient très nombreuses, sa principale source exploitée commercialement demeure les carapaces d'invertébrés marins qui sont des sous produits de la transformation alimentaire des crustacés (Shahidi et Abuzaytoun , 2005). Pour ces industries, C'est une forme de revalorisation de la biomasse. Les champignons utilisés par l'industrie des fermentations, sont une deuxième source de chitine exploitée commercialement (Shahidi et Abuzaytoun , 2005). Il s'agit donc d'un autre exemple de revalorisation de la biomasse.

I-2-4- La chitine :

La chitine est un polysaccharide linéaire formé d'unités de N-acétyl-glucosamines liées entres elles par des liens glycosidiques de type ² (1' 4). Le chitosane est un enchaînement de monomères ² -D-glucosamine reliés par une liaison glycosidique (1' 4) (Crini et al., 2009).

Entre 30 et 50 % de l'enveloppe rigide extérieure des arthropodes (arachnides, crustacées, insectes) est composée de chitine. On retrouve également la chitine dans la paroi de plusieurs champignons, algues chlorophycées, et dans certaines bactéries (Bordenave, 2009).

La nature hydrophobe de la chitine la rend insoluble dans l'eau aussi bien que dans la plupart des solvants organiques. Généralement le degré d'acétylation (DA) de la chitine est d'environ 90% (Judith et Voet, 2005). Selon les études de Pernet-Poil-Chevrier (2009) ; Randriamahatody (2011) ; Lemonde et al. (2011); Roberts (1992) ; Shahidi et al. (1999) la chitine est le biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose.

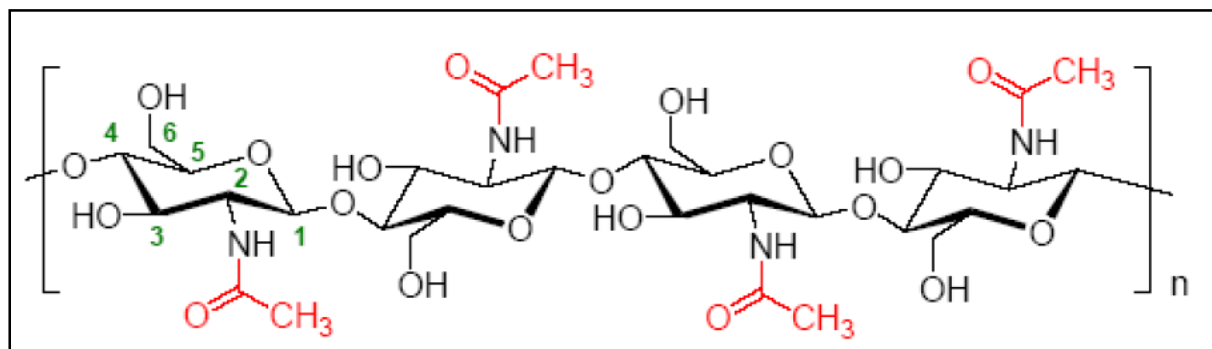


Figure 08 : Structure moléculaire de la chitine (Mrunal, 2004).

I-2-5- Procédé d'extraction de la chitine :

I-2-5-1 La production de chitine par voie chimique :

De nombreuses méthodes ont été développées, afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. L'extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation et un traitement alcalin pour la déprotéinisation. Les autres composés minoritaires sont supposés être entraînés au cours de ces deux réactions (Rao et Stevens, 2005). Ce procédé chimique consomme de grandes quantités d'eau et de réactifs (principalement l'acide chlorhydrique, l'hydroxyde de sodium et des agents de blanchiment) (Crini et al., 2009).

a) La déminéralisation :

La déminéralisation consiste à traiter la carapace par un acide pour éliminer les minéraux (carbonate de calcium et le chlorure de calcium), qui passent en solution sous forme de sels. Pour des raisons économiques, l'acide hydrochloridrique (HCl) est privilégié (Le Roux, 2012).

durant 1 à 48 heures, à la température ambiante, sous agitation afin de solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium (No et al., 1998). Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique.

Les concentrations en HCl rencontrées sont comprises entre 0,5 et 11 N et le ratio entre 1:10 et 1:40 (g/v). La déminéralisation dure entre 15 min et 48 h, de la température ambiante à 50 °C (Tolaimate et al., 2003 ; Al Sagheer et al., 2009).

Il faut prendre garde à la production de mousse, causée par le dégagement de CO₂. Elle peut être limitée par l'ajout d'un agent anti-moussant (No et Hur, 1998). La déminéralisation est suivie par une étape de rinçage car le produit doit atteindre la neutralité avant l'étape suivante de déprotéinisation (Le Roux, 2012).

b) La déprotéinisation :

A l'état naturel, on retrouve la chitine sous la forme Chitinoprotéine (Crini et al., 2009). Les emperat sont éliminées par un traitement basique. Les réactifs employés pour cette étape sont des bases fortes comme l'hydroxyde de potassium (KOH). Le plus courant, pour des raisons d'économie et technique, est l'hydroxyde de sodium (NaOH). La solution d'hydroxyde de sodium (~10 % massique), avec une proportion du solide à la solution 17emperat allant de 1:10 à 1:20 (m/v) est plus efficace pour dissoudre des emperat. La durée du traitement basique est de l'ordre de 0,5 à 72 heures, à hautes 17emperatures (65 – 100 °C) (Crini et al., 2009).

c) Blanchiment :

Le pigment dans les carapaces de crustacées forme un complexe avec la chitine (Crini et al., 2009). Destinée aux applications industrielles, la chitine doit être décolorée. Le blanchiment est un processus souhaitable, souvent réalisé par un traitement avec des agents oxydants (KMnO₄, ou H₂O₂) (Crini et al., 2009). Ce traitement peut éliminer des traces de pigments résiduels comme les caroténoïdes. Il ne doit pas avoir un effet sur les propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane. Il doit être effectué pendant plus d'une heure pour aboutir à un produit blanc acceptable commercialement (No et al., 1989). En utilisant l'acétone, on peut aboutir à une chitine quasiment blanche (No et al., 1989).

I-2-5-2 Traitements biologique :

À l'inverse, un procédé biologique de purification de la chitine répondrait mieux aux enjeux actuels de développement durable. Son empreinte sur l'environnement devrait être réduite car les volumes d'effluents chargés en réactifs chimiques sont plus faibles. Ses conditions plus douces devraient préserver la qualité de la chitine. Enfin elles devraient également favoriser la valorisation des autres constituants, présents dans les coproduits de crustacés. Il s'agit notamment des peptides et des pigments. Par ces voies, les taux de protéines et minéraux résiduels sont plus importants par rapport à l'emploi de l'extraction chimique. Des traitements complémentaires sont souvent nécessaires pour améliorer le degré de pureté en chitine. Enfin, les temps de réaction sont beaucoup plus longs que par la voie chimique (Le Roux, 2012).

I-2-6 Le chitosane :

Le chitosane est un, Copolymère linéaire ² (1-4) de N-acétyl D-glucosamine et de Dglucosamine (fig. 11) (klouj, 2012 ; Felt et al., 1999 ; No et al., 2003), obtenu par désacétylation de la chitine à partir de la carapace des crustacés (crabes, crevettes) par des processus chimiques ou microbiologiques (Tayel et al., 2010) . Dans la nature, le chitosane est rare et n'est présent que dans les parois d'une classe particulière de champignons, les Zygomycètes (Rhizopus, Mucor) (No et al., 2002).

Le chitosane est un produit non toxique et présente une solubilité dans les acides organiques à des pH<6 tels l'acide acétique, formique, lactique, succinique et malique. Cependant, il est insoluble dans l'eau, les milieux alcalins et les solvants organiques (Rabea et al., 2003).

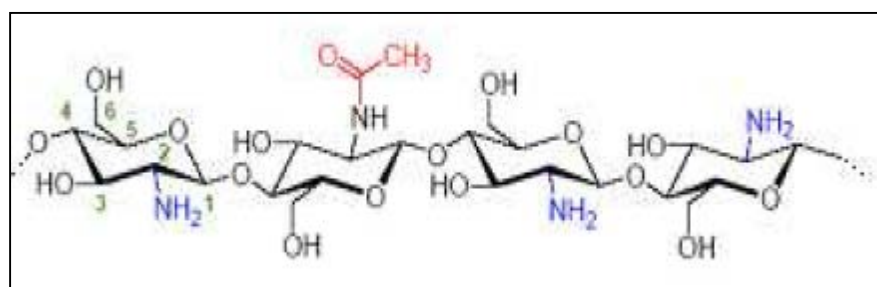


Figure 09: Représentation générale du chitosane (Mati Baouche, 2012).

I-2-7 Propriétés de chitosane :**I-2-7-1 Propriétés physico-chimiques du chitosane :****• I-2-7-1-1 Degré d'acétylation (DA) :**

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré d'acétylation (DA). Le degré d'acétylation présente le taux de groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé. De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DA sur des échantillons solides: la spectroscopie IR (Brugnerotto et al., 2001), l'analyse élémentaire (Kasaai et al., 2000), la RMN solide (Heux et al., 2000), ou sur des échantillons en solution: dosage UV (Maghami et Roberts, 1988), titrage colloïdal (Chen et al., 1997), RMN liquide (Yang et Montgomery, 2000).

• I-2-7-1-2 La viscosité :

La viscosité du chitosane dépend du DD de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante. La viscosité dépend également de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée) (Berth et al., 1998). Il existe différentes méthodes pour déterminer la viscosité, la plus employée est la viscosimétrie (Amiali, 1999).

• I-2-7-1-3 Solubilité :

Le chitosane est typiquement insoluble dans l'eau et les solutions alcalines. Il est cependant, soluble dans les solutions minérales ou organiques diluées, excepté dans l'acide sulfurique et à un moindre degré dans l'acide phosphorique (Chenite et al., 2001).

I-2-7-2 Propriétés biologique du chitosane :**I-2-7-2 -1 Biodégradabilité :**

La biodégradation est assurée par des enzymes hydrolysant le chitosane en oligomères. Cependant, le ou les mécanismes d'action ne sont pas encore clairement définis. Chez l'homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes (Varum et al., 1991) qui dégradent les liaisons ² (1-4) glycosidiques des unités du chitosane en des résidus N-acétylglucosamine et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Un chitosane de DA 50% est ainsi facilement dégradé *in vivo* (lysozymes) dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps (Onishi et Machida, 1999). La dégradation dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharide (DA, masse molaire...) (Ratajska et Boryniec, 1998). L'influence de la structure cristalline, de l'agrégation des N-acétylglucosamines et de leur distribution a été mise en évidence (Shigemasa et al., 1996). Une étude plus approfondie a montré d'abord une augmentation de la susceptibilité enzymatique pour les DA supérieurs à 50% (Kurita, 2006). Cette influence du DA est également constatée, *in vivo* (implantation sous cutanée) (Tomihata et Ikada, 1997).

I-2-7-2 -2 Biocompatibilité :

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance fondamentale pour son utilisation thérapeutique potentielle (Rinova, 1996). Elle est caractérisée principalement par trois propriétés : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité. Le chitosane présente l'avantage de réunir également d'autres propriétés très intéressantes, il agit comme un bactériostatique et un fongistatique (Peh et al., 2006; Shi et al., 2006).

I-2-7-2 -3 Activité antimicrobienne du chitosane :

Le chitosane présente une activité antimicrobienne face aux différents groupes de microorganismes, bactéries, virus, champignons, et levures (Sagoo et al., 2002 ; Juneja et al., 2006 ; Chien et Chou, 2006 ; Rodriguez et al., 2003). En général, les moisissures et les levures sont les plus sensibles au chitosane suivies des bactéries. Seule, la fraction soluble

en milieu acide (pH 5,5) présente une capacité antimicrobienne, aux pH supérieures, le biopolymère est insoluble, ce qui se traduit par une perte drastique de son efficacité (Qin et al., 2006).

L'activité antibactérienne du chitosane est influencée par de nombreux facteurs incluant l'origine biologique du chitosane, le pourcentage de désacétylation, le degré de polymérisation ou le poids moléculaire (PM) (Kendra et Hadwiger, 1984; No et al., 2002).

De plus, le degré de l'effet antimicrobien et le mode d'action varient en fonction de l'organisme ciblé (Gram+/Gram-). La réponse du microorganisme dépend de la structure chimique du chitosane utilisé et des conditions environnementales lors de l'interaction (Cuero, 1999).

Les propriétés fonctionnelles du chitosane sont influencées par le matériel brut utilisé pour sa production et peuvent varier aussi en fonction des espèces, mais également au sein d'une même espèce au cours de variations saisonnières (Skaugrud et Sargent, 1990). Le chitosane provenant de crustacés démontre des mécanismes antibactériens plus diversifiés que le chitosane d'origine microbienne (Cuero, 1999).

Plus le chitosane est désacétylé, plus son activité antimicrobienne est forte (Cuero, 1999), indiquant que les groupes fonctionnels pour l'inhibition de la croissance sont les groupes aminés cationiques (Jumaa et al., 2002; Song et al., 2002; Stössel et Leuba, 1984). Et aussi, plus la concentration en polymères de chitosane est élevée plus l'activité antimicrobienne est observée (Zheng et Zhu, 2003 ; Sekiguchi et al., 1994).

La littérature scientifique (Kong et al., 2010 ; Eaton et al., 2008 ; Zakrzewska et al., 2005 ; Sudarshan et al., 1992 ; Savard et al., 2002 ; Rabea et al., 2003 ; Zivanovic et al., 2004 ; Shahidi et al., 1999 ; Cuq et al., 1995 ; Chen et al., 1996) abonde pour nous donner des hypothèses sur les différentes interactions possibles entre les bactérie et le chitosane, et plus généralement sur le rôle antimicrobien de ce polymère :

- Le chitosane, de par sa nature cationique, interagirait avec la paroi cellulaire anionique des micro-organismes (interactions électrostatiques), le chitosane adhère facilement aux cellules microbiennes puisque les amines chargées positivement agissent avec les charges négatives sur la membrane des cellules libérant ainsi les constituants intracellulaires.
- Le chitosane pourrait chélater des ions métalliques nécessaires à la croissance microbienne ou à la production de toxines.

- Le chitosane pourrait former une liaison spécifique avec les macromolécules du micro-organisme (protéines, électrolytes, ADN, etc.).
- Le chitosane interagit avec la membrane des cellules pour altérer sa perméabilité entravant ainsi l'entrée de certains nutriments.

I-2-7-2 -4. Activité antioxydant du chitosane :

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer la conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle (acides gras essentiels), une détérioration du goût (composés volatils à flaveur caractéristique, rancissement) et même parfois à l'apparition de substances toxiques (Pascal, 1979).

L'utilisation du chitosane comme antimicrobien, notamment dans la filière viande peut également se justifier par son pouvoir antioxydant plus récemment identifié. La viande est en effet une matrice alimentaire très sensible aux phénomènes d'oxydation qui vont toucher principalement les acides gras insaturés et certaines protéines. Ce rancissement se traduit alors par une détérioration de la flaveur et de la couleur de la viande. Les mécanismes mis en jeu dans cette activité antioxydante du chitosane et surtout de certains de ses dérivés comme le carboxyméthyl chitosane sont encore assez mal décrits et semblent être liés d'une part au caractère cationique de ces macromolécules et d'autre part à leur pouvoir chélateur. Ainsi le carboxyméthyl chitosane en chélatant le fer libre issu des hémoprotéines libérées lors du stockage et/ou de la préparation de la viande va fortement ralentir le pouvoir catalyseur de ces ions sur le rancissement. L'action stabilisatrice des fonctions amines du chitosane sur les aldéhydes volatiles issus de la dégradation des acides gras insaturés semble également primordiale (Rao et al., 2008 ; Shahidi et al., 1999 ; Pérez-Mateos, 2007).

I-2-8 Les applications de la chitine et du chitosane :

Le chitosane est un biopolymère d'une importance croissante pour l'industrie et qui a des impacts significatifs sur la recherche et le développement dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, la santé ou encore la protection de l'environnement (Muzzarelli et Muzzarelli, 2003). Nous présentons ici les plus prometteuses :

I-2-8 -1. Domaine agricole :

Le chitosane est reconnu principalement pour être un éliciteur de résistance contre les agents pathogènes chez les plantes (Benhamou et Lafontaine, 1995).

La présence de chitosane comme fertilisant accélère la croissance des plantes et améliore le rendement des cultures (Kumar, 2000). Le chitosane pourrait devenir l'engrais naturel et le pesticide du futur en tant que «bio-pesticide». En effet, l'enrobage de semences des céréales avec le chitosane leur permet de résister aux attaques de champignons et de bactéries pathogènes (Rabea et al., 2003).

De plus, le chitosane permet de conserver les aliments pour bétail et protège les animaux contre des problèmes bactériologiques ou viraux. Il permet également de lutter contre les infections respiratoires qui affectent les troupeaux bovins. Il peut être aussi appliqué sous forme de spray oculaire (Rabea et al., 2003).

I-2-8-2. Domaine cosmétique :

Le chitosane forme à la surface de la peau un film capable de fixer d'autres principes actifs pour la peau tels que des molécules hydratantes, des filtres solaires, des acides organiques...etc. La chitine présente des propriétés similaires. Cela fait d'eux de bons candidats pour des formulations de crèmes et de gels (Crini et al., 2009 ; Jarroux, 2011).

I-2-8 3. Les applications alimentaires :

L'application du chitosane dans le domaine alimentaire est très prometteuse à cause de sa biocompatibilité et sa non-toxicité. En 1992, le département de santé japonais a autorisé l'utilisation de la chitine et de ses dérivés notamment du chitosane en tant qu'ingrédient alimentaire fonctionnel. Ainsi, il a été utilisé au Japon dans des produits alimentaires grâce à ses effets diététiques (Jeon et al., 2002).

Les applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont décrites par Crini (2009) :

- ❖ Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation)
- ❖ Clarification, désacidification et détoxification on des boissons et des liquides alimentaires
- ❖ Activité antibactérienne (préservation des aliments) enrobage alimentaire

- ❖ Effet antioxydant (prévention de l'oxydation)
- ❖ Ingrédient fonctionnel (agent fixateur, capacité prébiotique)
- ❖ Formation de films (emballage).

Les films alimentaires à base de dérivés de chitine sont à la fois une barrière physique et biologique contre les flores d'altération et les contaminations extérieures (Le Roux, 2012). Ces films alimentaires sont également antioxydants (Jeon et al., 2002). Kim et Thomas (2007) ont montré un résultat positif contre l'oxydation des lipides. De nos jours, son utilisation en tant qu'additif alimentaire est la plus connue (Fat blocker), le chitosane inhibe la métabolisation des graisses grâce aux interactions entre ses fonctions amines et les groupements carboxyliques des lipides (Muzzareli, 1996), il est aussi possible de réaliser des films alimentaires comestibles grâce au chitosane (De Moura et al., 2009 ; Cardenas et al., 2008).

I-2-8 -4. Domaines biomédical et pharmaceutique :

Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane (biocompatibilité, bioactivité...) en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques : agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant... Il est également utilisé comme système de libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale (Chaussard, 2002). Il présente en effet de bonnes propriétés muco-adhésives et une absence de toxicité qui le prédisposent à des utilisations en thérapie génique et pour la vaccination (Bacon et al., 2000).

Des études récentes tendent à montrer que le chitosane exerce un effet bénéfique sur le renforcement du système immunitaire (Kumar, 2000). Il s'agirait comme film intestinal et comme fibre. Il inhiberait l'absorption des lipides et des sucres (prévenir les risques de diabète) (Ylitalo et al., 2002), ou activerait directement le déstockage des lipides (Helgason, 2009), et prévient le phénomène de vieillissement (Kumar, 2000).

Dans de nombreuses applications, le chitosane est utilisé sous forme d'hydrogels chargés pour immobiliser des médicaments, des enzymes ou encore des substances thérapeutiques comme les vaccins, les antigènes ou gènes (Prabaharan et Mano, 2005).

Son plus grand intérêt est d'être la matière première pour l'obtention de la glucosamine, un composé vendu pour lutter contre l'arthrose (Crini et al., 2009 ; Jarroux, 2011).

I-2-8 -5. Traitement des eaux :

La plus grande utilisation du chitosane est pour la coagulation/ floculation et pour l'absorption de métaux lourds. Pour capter les métaux lourds en solution dans l'eau, il est souvent conditionné sous forme de billes de quelques millimètres de diamètre, et il joue alors un rôle plus ou moins identique à celui des résines échangeuses d'ions (Crini et al., 2009; Wu et al, 2010). Par rapport à ces dernières, les billes de chitosane ont le pouvoir de capturer les métaux lourds même dans des eaux salées, mais elles ont le défaut de ne pas être aussi sélectives vis-à-vis des métaux et surtout de ne pas être recyclables. Aussi, après un seul usage, peu importe le degré de contamination, elles doivent être entreposées ou traitées convenablement.

De plus, leur résistance mécanique est plus faible que celle des résines synthétiques ou des zéolites. Actuellement, il se développe, surtout en Asie, toute une recherche pour contourner ces défauts en associant le chitosane à des absorbants classiques comme les argiles, l'alumine, les bentonites...etc. Le chitosane est aussi utilisé pour l'adsorption de colorants (Crini, 2008).

III- Les milieux de culture en bactériologie :

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude. En principe, les cellules trouvent dans ce milieu les composants indispensables pour leur multiplication en grand nombre, rapidement, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un genre bactérien ou une famille. Ainsi, selon le but de la culture, il est possible de placer les micro-organismes dans des conditions optimales, ou tout à fait défavorables.

Il se compose d'une base (agar-agar, eau, minéraux...) ainsi que d'un indicateur coloré de pH ou de réaction d'oxydo-réduction pour permettre de formuler des hypothèses sur le genre.

Il existe aussi des bouillons de culture qui possèdent la même fonction, mais ces milieux ne contiennent pas d'agar-agar, ils sont donc totalement liquides.

Cet article détaillera les caractéristiques des milieux de culture se rapportant à la microbiologie. (en) *Washington JA*, Baron's Medical Microbiology (Baron S et al., eds.), Galveston, Univ of Texas Medical Branch, 1996, 4^e éd., relié (ISBN 978-0-9631172-1-2, LCCN 95050499, lire en ligne [archive]), « Principles of Diagnosis ».

III-1-Définition :

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié ce qui implique :

- couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie ;
- présenter un pH voisin du pH optimal ;
- présenter une force ionique optimale (le milieu peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire).

III-2-Principe :

Ces milieux permettent l'étude du métabolisme glucidique pour l'identification des différentes espèces de *Bacillus*.

Dans un milieu peptoné, l'acidification produite par l'attaque des glucides est souvent masquée. En effet pour de nombreuses espèces de *Bacillus*, le métabolisme des glucides se fait par la voie oxydative et donc ce Métabolisme produit peu d'acides. Le métabolisme protéique étant très actif, libère de nombreux produits alcalins.

On doit donc utiliser pour étudier le métabolisme glucidique des milieux pauvres en protéines (peptones).le milieu semi-synthétique répond à ces conditions d'étude car il ne contient pas de peptone. La présentation en demi-pente permet une étude différentielle de la voie d'attaque des glucides (Fermentaire ou oxydative). Pierre-Yves Guillaume Professeur de biotechnologie génie biologique.

III-3-Les différents types de milieux :

Il existe une grande variété de milieux de culture en rapport avec la diversité des exigences nutritives des micro-organismes. On distingue généralement :

III-3-1-Milieu de culture sélectif :

Les milieux de culture dit sélectifs permettent uniquement la culture de certains genres de micro-organismes. Pour cela on ajoute des éléments qui inhibent la croissance des micro-organismes indésirables comme le chlorure de sodium à forte concentration, le thiosulfate de sodium, le cristal violet ou certain antibiotiques etc.

Les éléments ajoutés sont sélectionnés selon les caractéristiques du micro-organisme recherché. Ces milieux sont utilisés pour l'analyse d'un prélèvement polybactérien. Ce milieu permet de sélectionner uniquement en cas de crible positif : Résistance à un antibiotique, la prototrophie etc.

Exemples de milieux sélectifs :

Milieu S-S : Gélose *Salmonella-Shigella*.

Milieu sélectif permettant l'isolement d'entérobactéries pathogènes.

Il est très utilisé pour la recherche de *Salmonella* dans les selles et les denrées alimentaires peu pour les *Shigella* car trop sélectif.

- milieu de Sabouraud : il permet la pousse des mycètes.

La gélose de Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes.

Elle est recommandée essentiellement pour l'isolement des moisissures dans les prélèvements peu chargés en bactéries, les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires, la culture des moisissures en vue de réaliser leur identification.

Dans le cas de prélèvements fortement contaminés, il est préférable d'utiliser la gélose Sabouraud + chloramphénicol .

- gélose Kanamycine - Vancomycine, dite "Kana-Vanco" ou KV : elle empêche la pousse des bactéries à Gram positif (action de la vancomycine) et de la plupart des entérobactéries (action de la Kanamycine). Sur ce milieu, poussent préférentiellement des bactéries anaérobies strictes.

III-3-2-Milieu semi-synthétique :

On ne connaît leur composition exacte que pour certains composants (d'un point de vue quantitatif, pour les produits ayant un intérêt, comme les facteurs de croissance.) Les autres composants étant présents de manière empirique.

III-3-3-Milieu différentiel :

Le milieu de culture dit différentiel ou indicateur' permet de distinguer deux types de microorganismes se développant dans un même milieu. Ce type de milieu utilise certaines caractéristiques biochimiques des microorganismes en présence de certains nutriments ou marqueurs (tel que le rouge neutre, rouge de phénol, l'éosine ou le bleu de méthylène). Ce type de milieu est utilisé pour la détection de microorganismes recombinant dans des lignées bactériennes.

III-3-4-Milieu de culture empirique :

Un milieu de culture dit empirique est un milieu dont on ne connaît pas exactement la composition. Ainsi, dans le milieu type cœur-cerveille, il y a de l'eau, de l'agar-agar, de l'hydrolysate de cœur et de cerveau sans que l'on en connaisse les aspects qualitatifs et

quantitatifs. Il sera donc utilisé uniquement pour la croissance des bactéries. Il n'a pas d'effet sélectif.

III-3-5-Milieu de culture enrichi :

Ils contiennent, outre les composants de base, des composants indispensables aux bactéries, que celles-ci ne peuvent pas synthétiser. Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites exigeantes. Par exemple : les milieux au sang frais (le sang est riche en nutriments divers): Gélose au sang frais ou cuit. Les milieux avec du sérum, du jaune d'œuf : Gélose Baird Parker ou dite BP.

III-3-6-Milieu synthétique :

Ce sont des milieux dont on connaît exactement la composition chimique, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Ils sont utilisés dans la recherche d'une réaction enzymatique précise. Ce sont les milieux plus couramment utilisés. Par exemple : on utilisera le milieu tryptophane pour révéler la présence de tryptophanase (une enzyme) par la production d'indole. Le tryptophane y est en quantités suffisantes pour permettre un résultat interprétable ; il n'en aurait pas été de même si le milieu n'avait contenu que de l'hydrolysate de viande de bœuf.

II.1. Présentation de l'échantillon :

Dans notre étude, nous avons utilisé comme espèce la crevette rouge *Aristeus antennatus*, espèce très demandée dans les restaurants et les pêcheries algériennes et mostaganémoise. L'échantillon a été acheté du grand marché (poissonnerie) de la ville de Mostaganem, nommé « Marché couvert), qui se trouve au centre ville (Derb) Ces crevettes sont généralement pêchées dans la zone de l'Ouest Algérien.

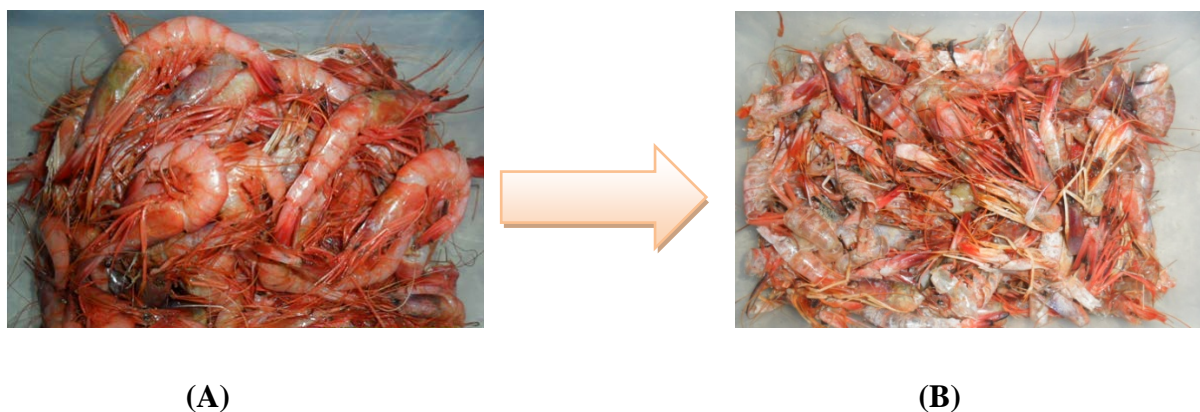


Figure 10 : (A) crevette à l'état fraîche, (B) déchet de crevette (carapace + la tête)

II-1-1-Prétraitement des échantillons :

Les coproduits de la crevette utilisés lors de cette étude sont constitués principalement par la tête entière et les carapaces obtenus après décortication des crevettes pour ensuite les séchés à température ambiante et broyer à l'aide d'un broyeur pour obtenir une poudre. (**fig.11**)



Figure 11 : la poudre de déchet de crevette.

II-1-2-Extraction chimique de la chitine :

De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des carapaces de crustacés. De manière générale, elles consistent à éliminer les minéraux (démminéralisation), les protéines (déprotéinisation).les pigment(blanchiment).

Dans ce cas on a utilisée 02 méthodes différentes :

II-1-2-1 - Première méthode :

a) Démminéralisation

La démminéralisation est généralement réalisée par un traitement acide sous agitation Constante pour solubiliser le carbonate de calcium et le chlorure de calcium. Les acides les plus fréquemment utilisés sont l'acide chlorhydrique et l'acide formique. Les carapaces sèches en poudre sont traitées avec HCL1N et le rapport du solide au solvant est de 1:10 (p/v), c'est-à-dire 1 g de carapaces en poudres pour 10 ml de solvant, sous agitation constante, pendant 1 heure, à température ambiante (fig. 12). Le produit ainsi obtenu est lavé par l'eau du robinet plusieurs fois à la neutralité du PH, ensuite séché à l'étuve à 105°C pendant 48 h.

❖ Manipulation :

- On pesé 80 g de poudre de crevette, ajoutée à 1000ml d'HCL (1N) mettant dans un chauffe ballon à 70°C pendant 1 heure.
- Filtrer et laver l'échantillon pour obtenir PH neutre.
- Mettre l'échantillon dans l'étuve à 105°C pendant 48 heures.



Figure12: Processus de démminéralisation avec l'HCL de 1N.

b) Déprotéinisation :

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (Chitinoprotéine). Les protéines sont éliminées par un traitement basique à l'hydroxyde de sodium (NaOH). La déprotéinisation est faite par un traitement à 2,5 M NaOH (2,5 mol.L⁻¹) au ratio 1:10 (p/v), c'est-à-dire le produit déminéralisé sec pour un volume de 10 fois de NaOH, chauffé pendant 06 heures à 70 °C dans un chauffe ballon (Tolaimate et al., 2003 ; Al Sagheer et al., 2009), (fig.13).

Laver le retenu en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité. La chitine ainsi obtenu est séchée à l'étuve à 50°C pendant 24 heures.

❖ Manipulation :

La chitine retenu de l'étape précédente (déminéralisation) est ajoutée à solution de NaOH de 2.5 N selon le rapport (p/v ,1/10),,on mettant le contenu dans un chauffe ballon à 70°C pendant 06 heures. Laver le retenu en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité. . La chitine ainsi obtenu est séchée à l'étuve à 50°C pendant 24 heures.



Figure 13: La déprotéinisation avec NaOH de 2.5N à 70 °C, pendant 06 heures, (mousse blanche = protéines éliminée).

C) Blanchiment :

Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %, il peut également être mélangé avec du HCl. La durée du traitement est souvent très courte, de l'ordre de quelques minutes (Tolaimate et al. 2003).

❖ Manipulation :

Le blanchiment de la chitine est souvent réalisé par un traitement avec des agents oxydants tel que : le H_2O_2 (2.5N) en masse dans un rapport 1/10(solide /liquide , g/ml) à une température de $30^\circ C$,pendant 3heures.Le mélange est ensuite filtré et lavé plusieurs fois avec l'eau distillée pour éliminer les composants restants afin d'obtenir un milieu neutre de pH. La chitine est ensuite séchée à l'étuve à une température de $70^\circ C$ pendant 24heures et le produit final est de couleur légèrement brune (brunâtre).



Figure 14: Aspect de la chitine après déminéralisation et déprotéinisation ;Blanchiment.

II-1-2-2 Deuxième méthode :

Cette méthode consiste deux étapes, déminéralisation, pour éliminer les minéraux Et déprotéinisation aussi pour l'élimination des protéines .L'étape de blanchiment et négligeable.

❖ Manipulation :

a) Déminéralisation :

-On met dans un bécher 20 g d'échantillon avec une solution de HCL de 5N selon le rapport (1/10) c'est-à-dire 1g d'échantillon dans 10ml de solution sous-agitation pendant une nuit à température ambiante.

-On fait la filtration jusqu'à obtention de pH neutre.

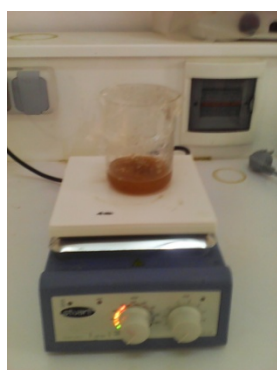


Figure 15 : Processus de déminéralisation avec l'HCL de 5N.

b) Déprotéinisation :

-On récupère toute la quantité d'échantillon de 20g qu'on a obtenu d'étape de déminéralisation, on ajoute 50ml de NaOH (5 %) puis met la solution dans un bécher sous-agitation à température ambiante pendant 4 heures.

-Filtrer la solution pour neutraliser le pH.



(A)



(B)

Figure 16 : (A) déprotéinisation avec NaOH de (5%), (B) l'aspect de chitine.

II-1-3 Préparation du chitosane à partir de la chitine (Processus de désacétylation) :

Des traitements acides et basiques sévères catalysent la désacétylation (Gizatulina, 2005) et aboutissent au chitosane (fig. 17). Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine. Tout comme le procédé d'extraction de la chitine, de nombreuses combinaisons de conditions de désacétylation sont décrites dans la littérature.

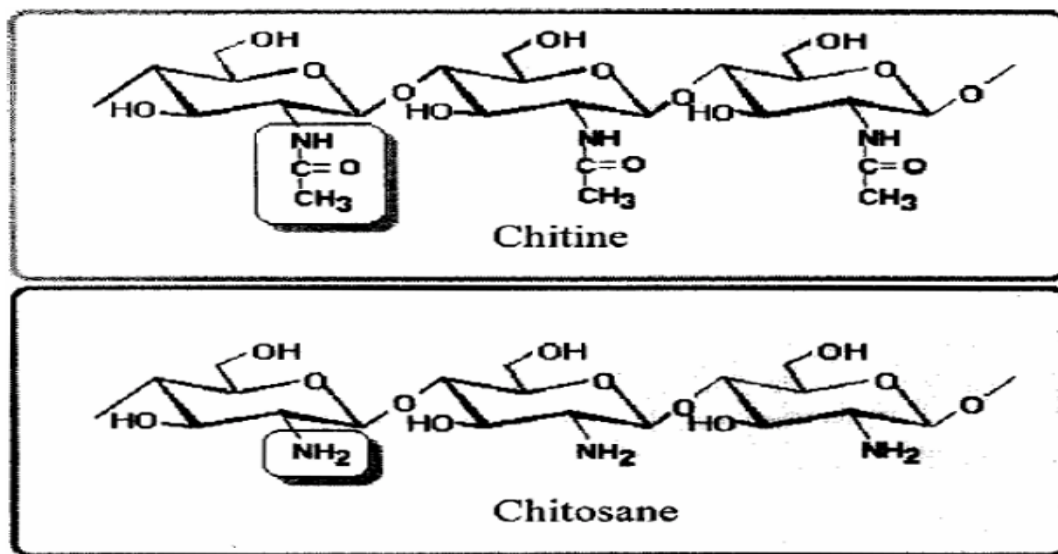


Figure 17 : Le chitosane, polymère dérivé de la chitine par désacétylation (Devin, 2015).

II-1-3-1 Première méthode d'extraction du chitosane :

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine. 05g de chitine est ajoutée à une solution de NaOH concentrée à 40 %, selon un ratio (p/v) de 1:10. Mettre l'échantillon au autoclavage (sous-pression de 0.4 bar /100°C) pendant 03 heures. Le chitosane produit est ensuite filtré et lavé afin d'éliminer la soude résiduelle et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité, puis étuvés à 70 °C pendant 24 heures.



Figure 18: Aspect du chitosane après désacétylation.

II-1-3-2 deuxième méthode d'extraction du chitosane :

Mettre 02g l'échantillon (chitine) dans un bécher puis ajouter une solution de NaOH de 12 N on mettant le mélange dans un bain d'huile dans un plaque chauffant à 140°C pendant 4 heures .Le chitosan produit est ensuite filtré et lavé afin d'éliminer la soude résiduelle et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau du lavage atteigne la neutralité, puis étuvés à 70 °C pendant 24 heures.

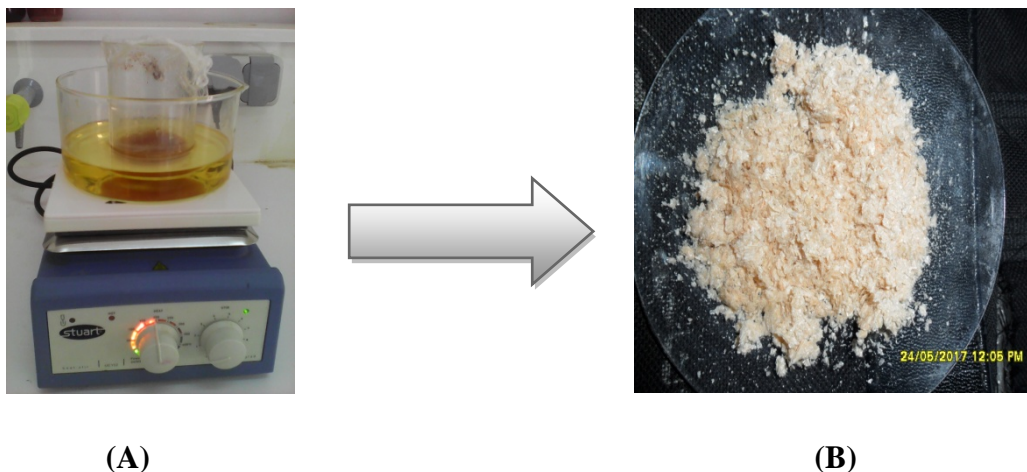


Figure 19 :(A) processus d'extraction de chitosane dans un bain d'huile

(B) l'aspect de chitosane.

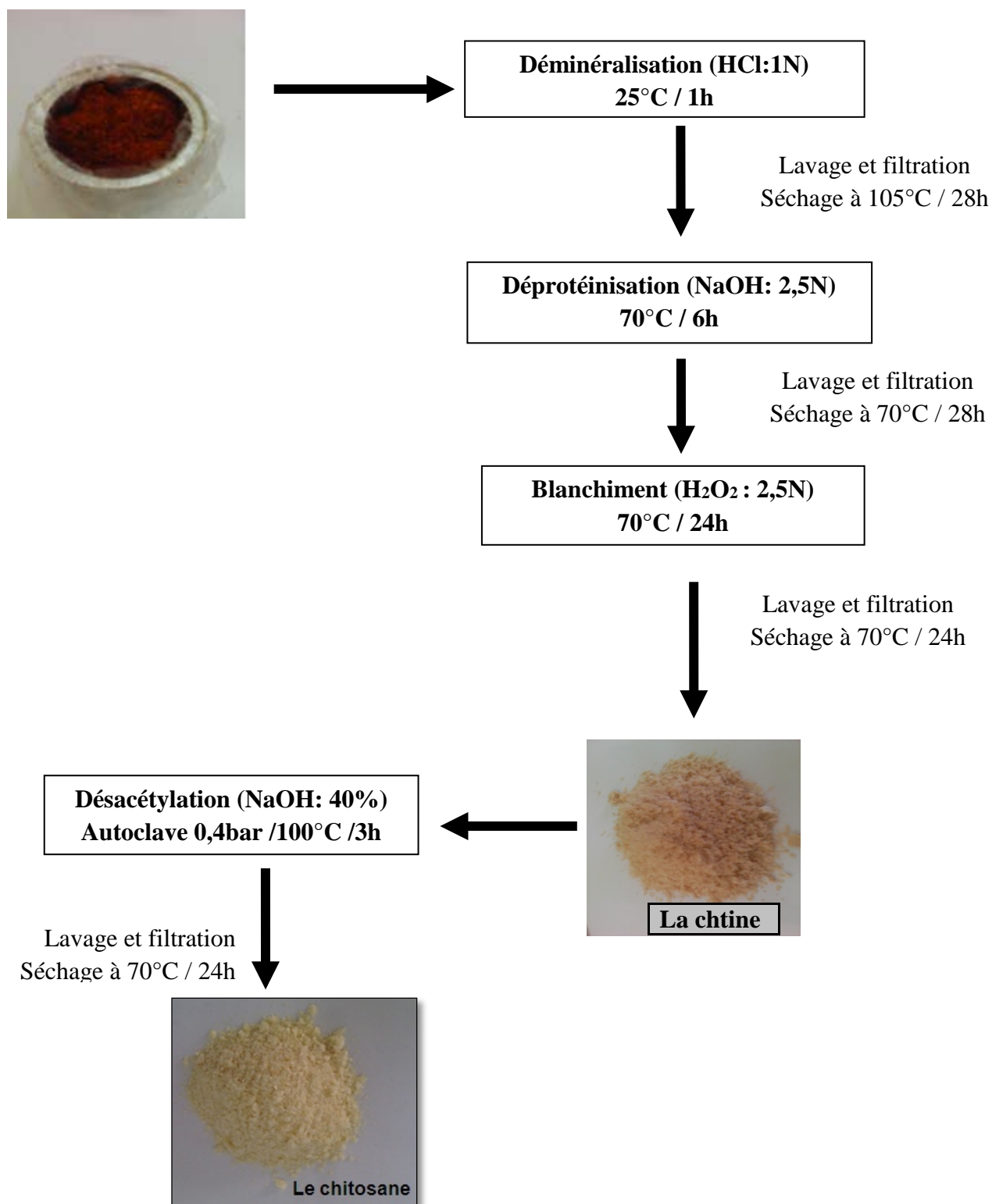


Figure 20 : Méthode d'extraction de la chitine et du chitosane par voie chimique.

II-1-4 Degré d'acétylation (DA) de chitosane :

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré d'acétylation (DA). Le degré d'acétylation présente le taux de groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé. De nombreuses méthodes sont proposées afin de déterminer le DA sur des échantillons solides: la spectroscopie IR (Brugnerotto et al., 2001), l'analyse élémentaire (Kasaai et al., 2000), la RMN solide (Heux et al., 2000), ou sur des échantillons en solution: dosage UV (Maghami et Roberts, 1988), titrage colloïdal (Chen et al., 1997), RMN liquide (Yang et Montgomery, 2000).

Le degré d'acétylation(DA) est le pourcentage d'unités acétylées par rapport au nombre d'unités totales, il peut être déterminé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier(IR-TF) ou par un tirage par une base forte. La frontière entre chitosane et chitine correspond à un DA de 50% : en deçà le composé est nommé chitosane ,au-delà , chitine.

Le chitosane est soluble en milieu acide contrairement à la chitine qui est insoluble. Il est important de faire la distinction entre degré d'acétylation(DA) et le degré de déacétylation (DD) .l'un étant l'inverse de l'autre c'est-à-dire que chitosane ayant un DD de 85% possède de 15% de groupement acétyles et 85% de groupements amines sur ses chaine entre chitosane et chitine correspond à un DA de 50%.

Manipulation:

-On prend 0.1g de notre échantillon (poudre de chitosane aussi pour la chitine) et déposer dans un bécher.

-Ajouter un volume de 25ml de solution de HCl concentré (0.06N)

-Poser le mélange sous-agitation à température ambiante durant une heure , ensuit ajuster avec l'eau distillé à 50ml ,avec la solution NaOH (0.1N) jusqu'à un pH= 3.75 et prendre le premier volume V1,il faut continuer à titrer jusqu'à un pH de 8 est mentionner le deuxième volume V2

II-1-4 -1 Solubilisation du chitosane :

La solution du chitosane est préparée en dissolvant 01 g du chitosane en poudre dans 125ml d'acide acétique (1%), sous agitation constante pendant une nuit à température ambiante jusqu'à sa solubilisation (fig21)

Nous avons utilisée deux différents chitosane (chitosane de méthode 1et de méthode 2)



(1)



(2)

Figure 21 : La solubilisation du chitosane dans l'acide acétique 1 %, à température ambiante, sous agitation constante.

(Fig. 21-1) chitosane de méthode 1 et (Fig. 21-2) de méthode 2

Le calcul :

$Q = (V_{\text{NaOH}} \times 0,1) / (1000 \times M_{\text{cs}})$ = nombre de moles de la fraction aminée du chitosane pour un échantillon de 1g

M_{cs} : masse sèche de chitosane dans la prise d'essai, en g

V_{NaOH} = volume verse en ml de fait que V_{NaOH} est en ml

= Volume versé en ml de NaOH 0,1M entre PH 3,75 et PH 8

La facture 1000 vient du fait que V_{NaOH} est en ml

$$DA = (1 - 16XQ) / (1 + 42XQ)$$

$$DD = (161.16X V_{\text{NaOH}}) / M_{\text{cs}}$$

Et concernant la Chitine et par même principe

$$DD = (203.1925X V_{\text{NaOH}}) / M_{\text{cs}}$$

$$DA = 100 - DD$$

DA : degré d'acétylation

DD : degré désacétylation

II-1-5-Hydrolysats Chimiques:

A l'heure actuelle, des quantités considérables de matériel protéique sont perdues par les industries de transformation du poisson qui ne valorisent guère leurs co-produits ou déchets. L'hydrolyse des protéines est donc une des voies privilégiées de la valorisation de ces co-produits mais pour cela il convient d'adopter une stratégie de récupération de ces protéines présentes afin de pouvoir les utiliser ultérieurement en nutrition humaine ou animale. Cette hydrolyse des protéines, qui peut se faire par voie chimique ou enzymatique, conduit à une grande variété de produits. C'est pour ça, on va valoriser les protéines présentes dans ces coproduits (têtes, arêtes ...)

II-1-5-1-Hydrolyse acide :

Il s'agit d'une hydrolyse où on utilise un acide fort comme la solution de l'acide sulfurique ou HCL .On peut utiliser une solution d'acide faible comme l'acide acétique

❖ Mode d'opérateur :**➤ HCL :**

-On prend 20g de notre échantillon (déchet de crevette) déjà préparé et le déposer dans un bécher de 250ml

-Ajouter à cet échantillon un volume de 50ml de solution de HCL concentré

-Poser le mélange pour l'incuber à 30°C pendant 24 heures

-Réaliser une centrifugation (4000 tour/10 min)

➤ acide acétique :

-On prend 20g de notre échantillon (déchet de crevette) déjà préparé et le déposer dans un bécher de 250ml

-Ajouter à cet échantillon un volume de 50ml d'acide acétique et homogénéiser parfaitement

-Poser le mélange pour l'incuber à 30°C pendant 24 heures

-Réaliser une centrifugation (4000 tour/10 min)

II-1-5-2-Hydrolyse alcaline :

Dans ce type d'hydrolyse, on utilise une solution de soude de NaOH (5N)

❖ Mode d'opérateur :

-Mélanger dans un bécher 20g de l'échantillon avec 40 ml solution de NaOH (5N)

-Autoclaver à 100°C et sous pression (1bar) pendant 10min pour éviter tous risque d'une contamination

-L'incubation se fait à 30°C pendant 24heures

-Réaliser une centrifugation (4000 tour/10 min).

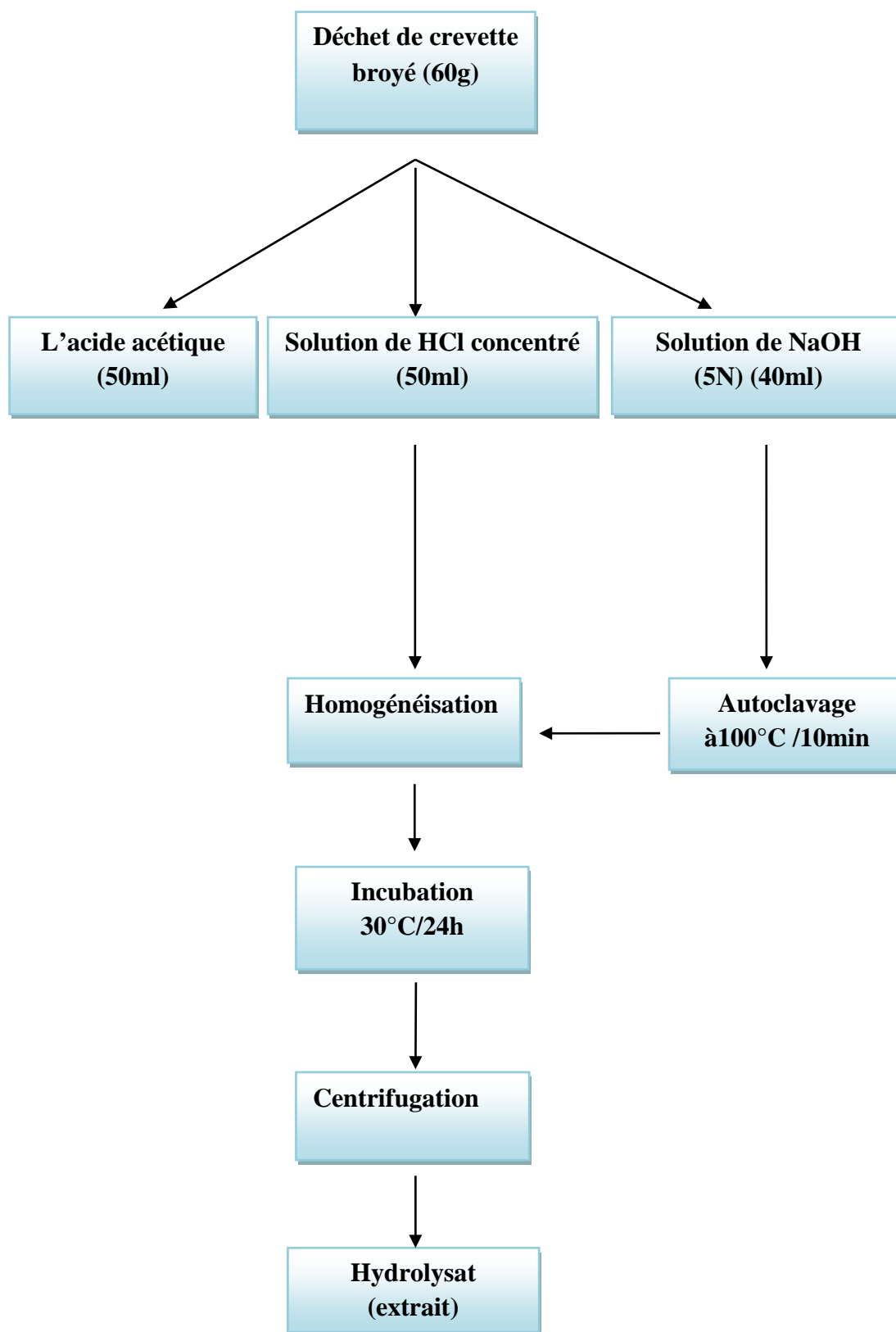


Figure 22: schéma récapitulatif de préparation des hydrolysats chimiques

II-1-6-Les analyses biochimiques des échantillons :

II-1-6-1-La teneur en humidité :

Principe :

La teneur en eau est déterminée dans la matière première et dans les produits d'extraction et enzymatique. La teneur en eau, ou l'humidité, d'un aliment est la quantité d'eau perdue par la substance lorsqu'on l'amène en équilibre vrai avec une pression de vapeur nulle (Humidité relative égale à 0%). La teneur en eau d'un échantillon d'aliment s'exprime en % de la masse d'eau rapportée soit à la masse de matière sèche contenue dans l'échantillon, soit à la masse totale de la matière humide de l'échantillon. (Fasquel et al ;2000).

Elle est basée sur le séchage du produit à une température de 105°C pendant 24h jusqu'à l'obtention d'un point constant à la pression atmosphérique normale. La teneur en eau est déterminée par étuvage des échantillons à 103 °C pendant 24 heures (AOAC, 2005).

❖ Manipulation

- On a réglé le thermostat de l'étuve à 105°C
- Une capsule vide est pesée(M0).Puis on a pesé 2g de l'échantillon qui sont ajoutés dans la capsule et l'ensemble est pesé à nouveau(M1).Puis on l'introduit dans l'étuve à105°C pendant 24 heures.
- Après 24 heure, on retire la capsule et on la place dans le dessiccateur durant d'être repesée à nouveau durant une heure et on fait la pesé (M2)

❖ Calcul :

La teneur en eau est obtenue par la formule qui suit :

$$H\% = \frac{M1-M2}{M1-M0} \times 100$$

M0 : la masse en g de la capsule vide.

M1 : la masse en g de la capsule et les échantillons avant étuvage

M2 : la masse en g de la capsule et les échantillons après étuvage

II-1-6-2-La teneur en cendre :**Principe :**

La teneur en cendres est déterminée par incinération de la matière organique à 550°C pendant une nuit (AOAC, 2005)

❖ Manipulation :

Des capsules d'incinération vides sont pesées. Environ 1g de matière sèche sont ajoutés et la masse de l'ensemble est notée. Les échantillons sont alors soumis à une température de 550°C dans un four à moufle pendant une nuit. Après refroidissement dans un dessiccateur, les capsules contenant les cendres sont pesées à nouveau. Le dosage est réalisé en triplicat pour chaque échantillon.

-On a pesée la capsule d'incinération vide(M0), puis on ajoute 02g de la prise d'essai et la masse de l'ensemble est notée(M1).

-L'échantillon est alors soumis à une température de 500°C dans un four à moufle pendant 8h. On retire la capsule de four après refroidissement dans un dessiccateur(durant 01h), la capsule contenant le cendre est pesé à nouveau(M2)

❖ Calcul :

La teneur en cendres des échantillons est calculée suivant la formule suivante :

$$\text{TC}\% = \frac{M2 - M0}{M1 - M0} \times 100$$

Avec C% : teneur en cendres

M0 : masse en g de la capsule vide

M1 : masse en g de la capsule et les échantillons avant incinération

M2 : masse en g de la capsule avec les cendres (après incinération)

II-1-6-3 -Teneur en protéines (méthode de kjeldah) :

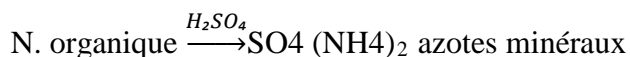
Contrairement aux sucres et aux lipides, les protéines contiennent de l'azote.

Cette propriété sera exploitée dans la méthode de détermination de la teneur en protéines dans les aliments.

La méthode kjeldahl est la méthode de référence pour la détermination des protéines dans les aliments. Il existe deux versions de la méthode qui utilisent le même principe : La méthode macro-Kjeldahl et la méthode micro-Kjeldahl. Elles diffèrent seulement par l'appareillage utilisé et les quantités d'échantillon ; La masse d'échantillon analysée par la méthode macro-Kjeldahl est environ 5 fois plus élevée que celle analysée par la méthode micro-Kjeldahl (Cover, 2007).

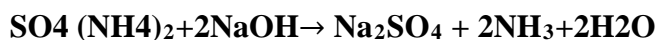
Principe :

La détermination des protéines par la méthode Kjeldahl s'effectue en trois étapes:

Etape1 : digestion ou minéralisation de l'échantillon

Pendant l'étape de la digestion, l'azote protéique est transformé en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique dans l'acide sulfurique concentré à haute température, en présence d'un catalyseur et d'un sel :

- L'acide sulfurique concentré a pour but d'oxyder la matière organique et de transformer l'azote protéique en ammoniac NH_3^- . IL sert également à piéger l'ammoniac gazeux sous la forme de sulfate d'ammonium, par action de la base avec l'acide ;
- L'addition de catalyseur sous forme des sels K_2SO_4 , Cu_2SO_4 et Se a pour but d'élever le point d'ébullition pour accélérer la réaction de minéralisation de la matière organique.

Etape 2 : Distillation de l'ammoniac

↑ *Ammoniac*

Avant de distiller l'ammoniac à la vapeur d'eau, on doit libérer l'ammoniac sous la forme du sel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l'addition d'une solution concentrée de NaOH en excès :

L'ammoniac est ensuite distillé par la vapeur d'eau et piégée dans une solution d'acide borique. L'ammoniac réagit avec l'acide borique pour former des sels borates d'ammonium.

Etape 3 : Titrage de l'ammoniac

L'ammoniac sous la forme de borates d'ammonium est titré directement à l'aide d'une solution standardisée d'acide, tel HCl ou H_2SO_4 et d'un indicateur coloré (rouge de méthyle)

-On fait un blanc en mettant tous les réactifs sauf l'échantillon, pour soustraire l'ammoniac contenu dans les réactifs de l'ammoniac contenu dans les réactifs de l'ammoniac contenu dans l'échantillon.

❖ Manipulation :

Le dosage des protéines se déroule en 3 étapes :

• Minéralisation :

Dans un matras de minéralisation, 0.25g de l'échantillon sont placés. 20ml d'acide sulfurique pure (H_2SO_4 96%) et 05g d'une pastille $[(\text{K}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4) : 5/2 \text{ w/w}]$, le catalyseur de la réaction, sont ensuite ajoutés. Les tubes sont alors fermés hermétiquement et chauffés progressivement jusqu'à 450°C. La minéralisation est terminée lorsque le contenu des tubes devient vert limpide. Le chauffage est alors arrêté et les tubes sont laissés se refroidir. Traverser le liquide dans une fiole de 100ml jusqu'au trait de jauge.



Figure 23: minéralisation de l'échantillon.

· **Distillation :**

Les minéralisés refroidis sont additionnés un volume de 20 d'eau distillée transvaser ce liquide dans un ballon à deux col rodés. Y ajouter la solution de NaOH (33%) jusqu'à obtenir le volume 80ml. Le distillat qui contient l'azote sous forme d'ammoniac est récupéré dans 20ml de solution d'acide borique 4% présence d'indicateur coloré, qui fixe l'ammoniac distillé.

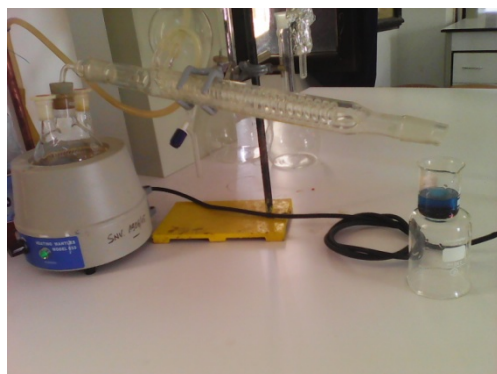


Figure24 : distillation de l'échantillon

• **Titrage :**

Le distillat est titré avec une solution d'acide chlorhydrique 1N, en présence d'un indicateur coloré (rouge de méthyle).

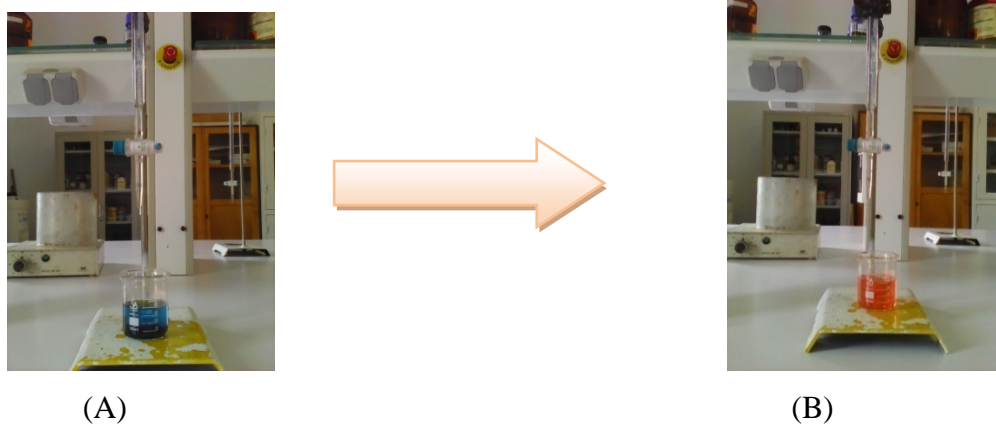


Figure 25 : principe de titrage (A avant, B après titrage).

❖ **Calcul :**

Le pourcentage % d'azote est obtenue par la formule ci-après :

$$N\% = \frac{1.4 \times V}{M} \times 100$$

Avec N% : pourcentage d'azote

V : Volume en ml de la solution d'acide sulfurique HCl 1N titrant le distillat

M : Masse en g de la prise d'essai

La teneur en protéines (P%) d'échantillon est obtenu en utilisant le facteur de conversion

(K)Elle s'écrit :

$$\% \text{Protéines} = K \times N\%$$

K = Facteur de conversion de l'azote en protéine.

K = 6.25 100/16 (origine animale).

II-1-6-4-Teneur de lipides par la méthode de Folch :

Principe :

L'extraction des lipides est basée sur leur solubilité dans les solvants organiques. Pour la méthode de Folch, le méthanol et le chloroforme sont utilisés (Folch *et al.*, 1957).

❖ Manipulation :

Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch et al. (1957). Le solvant organique utilisé est un mélange de méthanol/chloroforme (1:2, v/v). L'échantillon à analyser de 05g et le solvant de 100ml sont introduits dans un erlenmayer. Le mélange est de nouveau laissé sous agitation magnétique. Après une nuit, le produit est filtré avec papier filtre. Le filtrat est introduit dans une ampoule à décanter. La solution est ensuite additionnée de 22 ml volume de NaCl à 0,58 % (w/v) . Le mélange décanse jusqu'à l'obtention d'un système biphasique net durant 6h (figure26)., puis La phase inférieure organique est récupérée dans un ballon préalablement pesé. Puis, le solvant est évaporé au rote à vapeur (pression de 220 bars)(figure 18). Le ballon est enfin repesé. Enfin le poids du ballon est pesé, la teneur en lipides est calculée par la différence de poids.

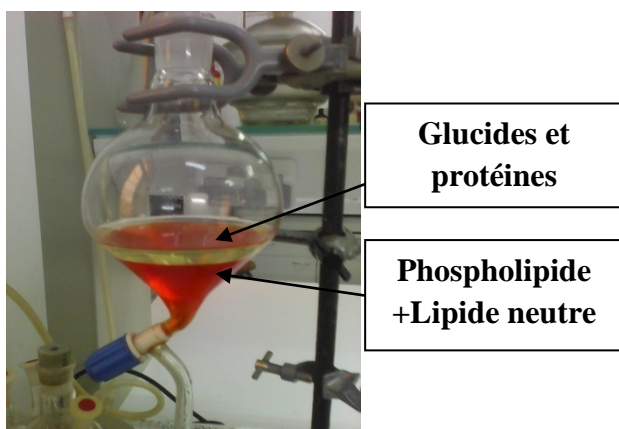


Figure26 : Séparation des phases

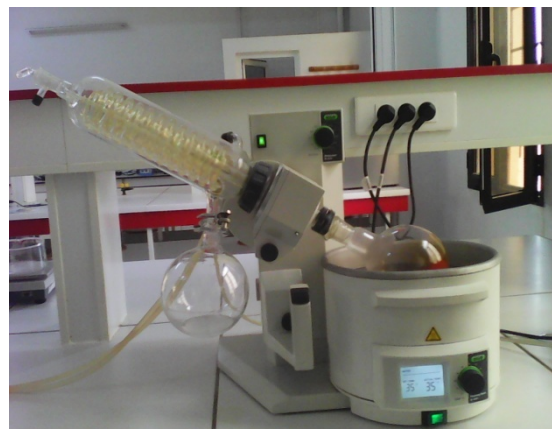


Figure 27: une rote à vapeur

❖ Calcul :

La différence de poids entre le ballon vide et le ballon après évaporation de solvant, qui contient les résidus lipidiques, donne la quantité de lipides contenue dans la prise d'essai. La teneur en lipides est alors obtenue suivant la formule :

$$\% \text{Lipides} = \frac{M2 - M1}{M0} \times 100$$

Où **L%** représente la teneur en matières grasses.

M0 : la masse de la prise d'essai en g.

M1 : la masse du ballon vide en g.

M2 : représente le poids du ballon avec les lipides séché après l'extraction en g .

II-2-Les analyses microbiologiques :

II-2-1-Préparation de la solution mère et les dilutions décimales :

-Introduire dans un tube 10g de l'échantillon (déchet de crevette broyé) + 9ml de diluant ou 1g dans 10ml (eau physiologique), homogénéiser parfaitement .Cette préparation constitue la solution mère

-Prépare la dilution décimale à partir de la solution mère en introduisant 1 ml de la solution mère dans 9 ml de l'eau physiologique

-Recommencer l'opération jusqu'à l'obtention de la dilution souhaitée (jusqu'à 6^{ème} dilution)

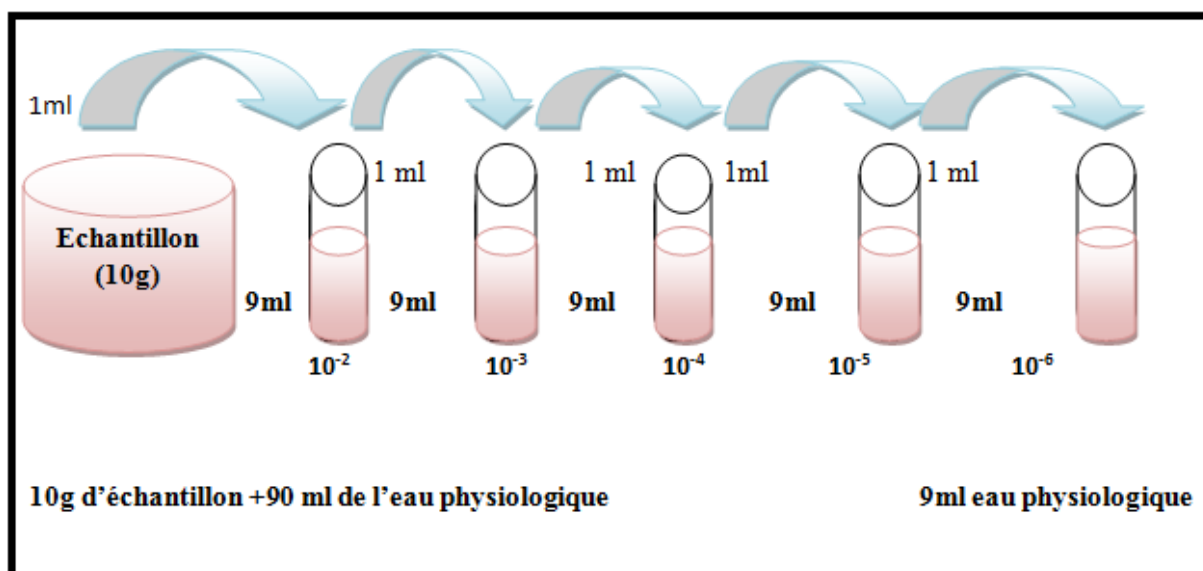


Figure 28 : préparation de la solution mère et les dilutions décimale.

II-2-2-Dénombrement de la flore totale(ou germes aérobies mésophiles totaux) :

Le dénombrement de la flore aérobie mésophiles totale reste la meilleure méthode d'évaluation de la qualité microbiologique de l'échantillon. C'est l'ensemble des micro-organismes aptes se développer sur un milieu nutritif gélosé ou PCA ou TGEA et qui donne des colonies de taille et de forme différentes après incubation de 30°C pendant 24 à 72 heures

Mode d'opérateur :

A partir de dilution de la solution mère préalablement préparée, nous avons inoculé 1ml d'échantillon dans une boîte Pétri stérile. Nous complétons ensuite à une quantité suffisante de la gélose PCA fondue et refroidie à 45°C, puis nous agitions par un mouvement circulaire. L'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 72 heures. On compte toutes les colonies qui se développent quel que soit la taille et la forme.

II-2-3-Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d'action :

Le chitosane est connu principalement pour ses propriétés chélatantes. Cependant, il possède de bonnes propriétés antimicrobiennes. Celles-ci dépendent de plusieurs facteurs : sa nature, son degré de polymérisation, son origine, la composition du substrat et des conditions environnementales comme, par exemple, l'humidité du substrat. Son action antimicrobienne comporte des effets antifongiques, antibactériens et alginiques.

Cette étude a été réalisée par 2 méthodes :

- Méthode de diffusion en puits AWDT (Agar well Diffusion Test),
- L'évaluation de la cinétique de croissance des souches pathogènes en présence du chitosane.

II-2-3-1-Les milieux de culture utilisés :**TGEA (Tryptone Glucose Extrait de viande Agar) :**

Les compositions est comme suite :

Extrait de levure.....1.5g

Tryptone.....03g

Agar.....10g

Eau distillée 500ml

PH = 7±0.2 autoclaves pendant 15 minutes à 120°C.

Préparation le milieu de culture modifié TGEAM pou 100ml d'eau distillée :

- **milieu TGEA1** :(TGEA sans Tryptone, +0,9g de déche de crevette)
- **milieu TGEA2** : (TGEA sans Tryptone, +0,9g de poudre de chitine)
- **milieu TGEA3** : (TGEA sans Tryptone, +0,9g de poudre de chitosane)
- **milieu TGEA4** : (TGEA sans Tryptone, + 0,9g hydrolysate acide sulfurique (Hcl)).
- **milieu TGEA5** : (TGEA sans Tryptone, + 0,9g hydrolysate acide (Acide acétique)).
- **milieu TGEA6** : (TGEA sans Tryptone, + 0,9g hydrolysate alcaline (NaOH)).

MRS (g/500ml) témoin :

Peptone	05g
Extrait de viande	05g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	10g
Tween 80	0,54g
Phosphate dipotassique	01g
Acétate de sodium	2,5g
Citrate de magnésium	0,1g
Sulfate de manganèse	0,025g
Agar agar bactériologique	7,5g
Eau distillée	500ml

- **Préparation le milieu de culture modifié MRSM pou 100ml d'eau distillée :**

- **milieu MRSM1** : (MRS sans peptones, sans extrait de viande, sans extrait de levure +2,5g de déche de crevette)
- **milieu MRSM2** :(MRS sans peptones, sans extrait de viande, sans extrait de levure +2,5g la poudre de chitine)
- **milieu MRSM3** :(MRS sans peptones, sans extrait de viande, sans extrait de levure +2,5g la poudre de chitosane)
- **milieu MRSM4** : (MRS sans peptone, sans extrait de viande, sans extrait de levure + 2,5g hydrolysate acide sulfurique (Hcl)).
- **milieu MRSM5** :(MRS sans peptone, sans extrait de viande, sans extrait de levure + 2,5g hydrolysate acide acétique).

- **milieu MRSM6** : (MRS sans peptone, sans extrait de viande, sans extrait de levure + 2,5g hydrolysate alcaline (NaOH)).

Milieux PCA (Plate Count Agar) pour 1l

Tryptone	5g
Extrait autolytique de levure.....	2,5g
Glucose.....	1g
Agar agar bactériologique.....	12g

Eau physiologiques :

Chlorure de sodium.....	8.5g
Peptone.....	0.5g
Eau distillée.....	1L

Bouillon Cœur-cerveille(BHIB)

Pour vitrification des souches avant chaque essai avec incubation dans l'étuve pendant 24heures à 37°C, et utilisé aussi comme un diluant pour étudier la cinétique de croissance des bactéries

II-2-3-2-Les souche utilisé

Escherichia coli et bactérie lactique, pour comparer le pouvoir antibactérien et antifongique de chitosane

- ***Escherichia coli*** :

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal (Kaper et Nataro, 2004), de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées infantiles et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

➤ **Bactérie lactique :**

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes (Labiouiet al.2005). Ce sont des cellules vivantes, autonomes et procaryotes (Doleyres, 2002), dont le trait commun est leur aptitude à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides.

II-2-3-3-Renouvellement et l'enrichissement la souche pathogène :

Le renouvellement et l'enrichissement est effectuée par ensemencement des souches pathogène dans un bouillon de BHI à 37°C pendant 8 à 12 heures d'incubation avant chaque test d'antagonisme pour obtenir une culture jeune en phase exponentiel. Tous les souche ont été cultivée au moins trois fois avant l'expérience (triple).

II-2-3-4-Méthode de diffusion en puits AWDT (méthode de BarefootKaenhammer, 1983) :

Méthode des puits permet de détecter les inhibitions dues au chitosane solubilisé dans l'acide acétique à 1 % dans deux différents milieux de culture semi solide l'un et LB et l'autre TGEA la souche inhibitrices, *Escherichia coli*, et les champignons, Cette méthode consiste à couler 21 ml de l'un différent milieu (LB et TGEA) avec 1000 µl d'une culture jeune de 24 h d'incubation à 30°C, sur une boîte de pétri. Après solidification à température ambiante dans une zone stérile, des puits sont creusés à l'aide d'un embout jaune stérile. Généralement on réalise 5 puits par boîte de 6 mm de diamètre (chaque test est réalisé en duplicat). Un volume de 80 µl de solution chitosane est mis dans chaque puits (4 puits). Un puit de 80 µl de bouillon BHIB stérile sert comme témoin négatif.

Les boîtes de Pétri sont incubées à +4°C pendant 2 à 4 heures pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (prédiffusion) (Doumandji et al., 2010), et ensuite incubées à 37°C. La présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 18 à 24h d'incubation (Hwanhlem et al. 2011).

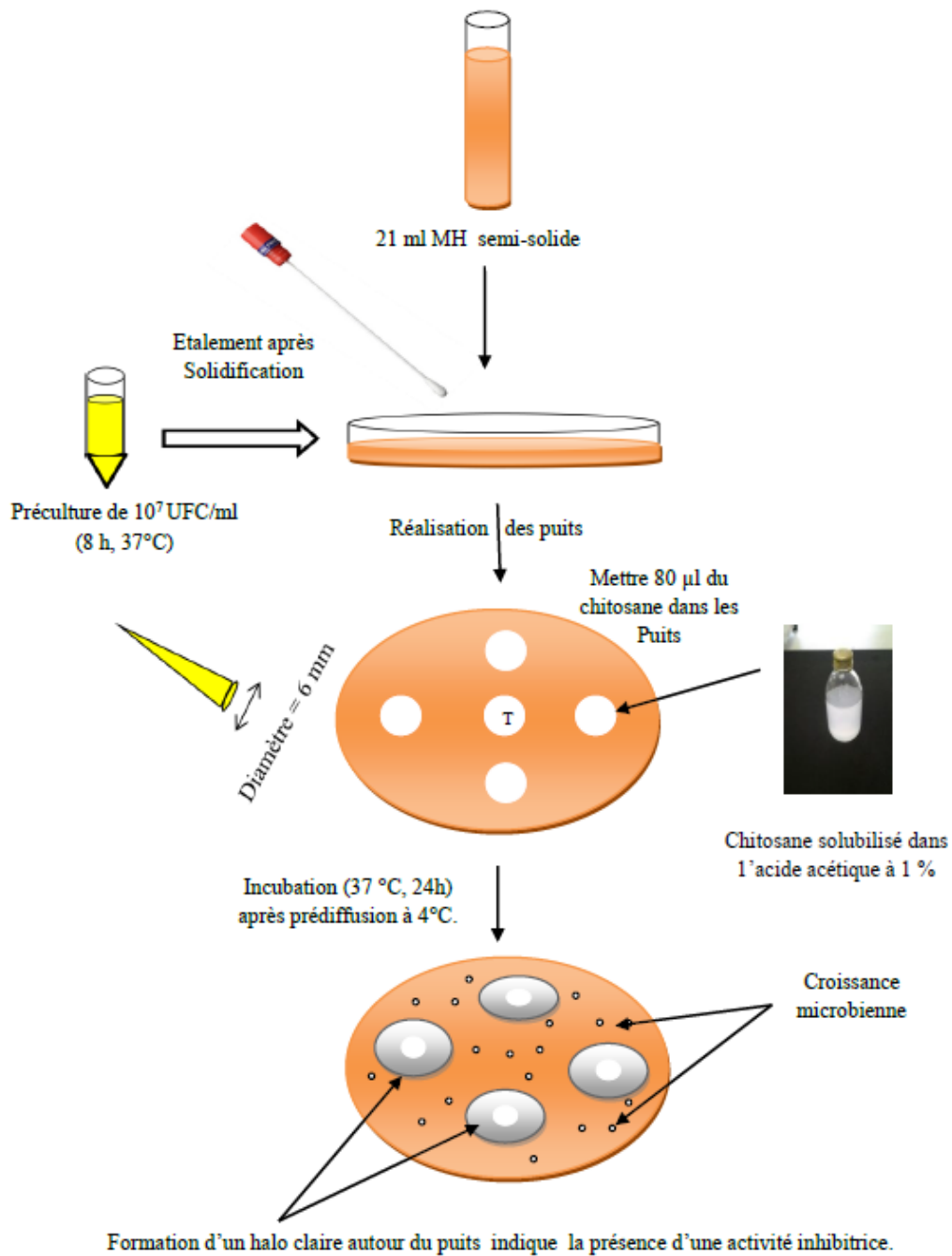


Figure 29: Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en Puits.

II-2-3-5-Cinétique de croissance bactérienne mises en contact avec le chitosane la méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disques):

Pour les tests d'activité antibactérienne par cette méthode, nous avons choisi la souche Pathogène d'*E.coli*.

La souche a été inoculés dans 15 ml de bouillon BHIB, avec 1666 μl du chitosane en solution, une série des dilutions (10^{-1} , 10^{-2} 10^{-6}) dans 450 μl de BHIB a été réalisée, ensuite pour la réalisation de ce protocole, chaque boîte contient TGEA solide est divisée en trois parties, à l'aide d'une micropipette chaque partie d'une boîte de pétrie reçoit exclusivement 02 spots de l'une des différentes dilutions de 10 μl pour chaque spot. Après avoir déposé les différents diluants dans toutes les boîtes, on incube le tout dans l'étuve à 37°C pendant 24h à 48h (fig.34) (Guiraud, 1998).

Dans ce cas on a travaillé avec deux différents chitosane solubilisé avec l'acide acétique de 1% (chitosane de méthode 1 et de méthode 2)

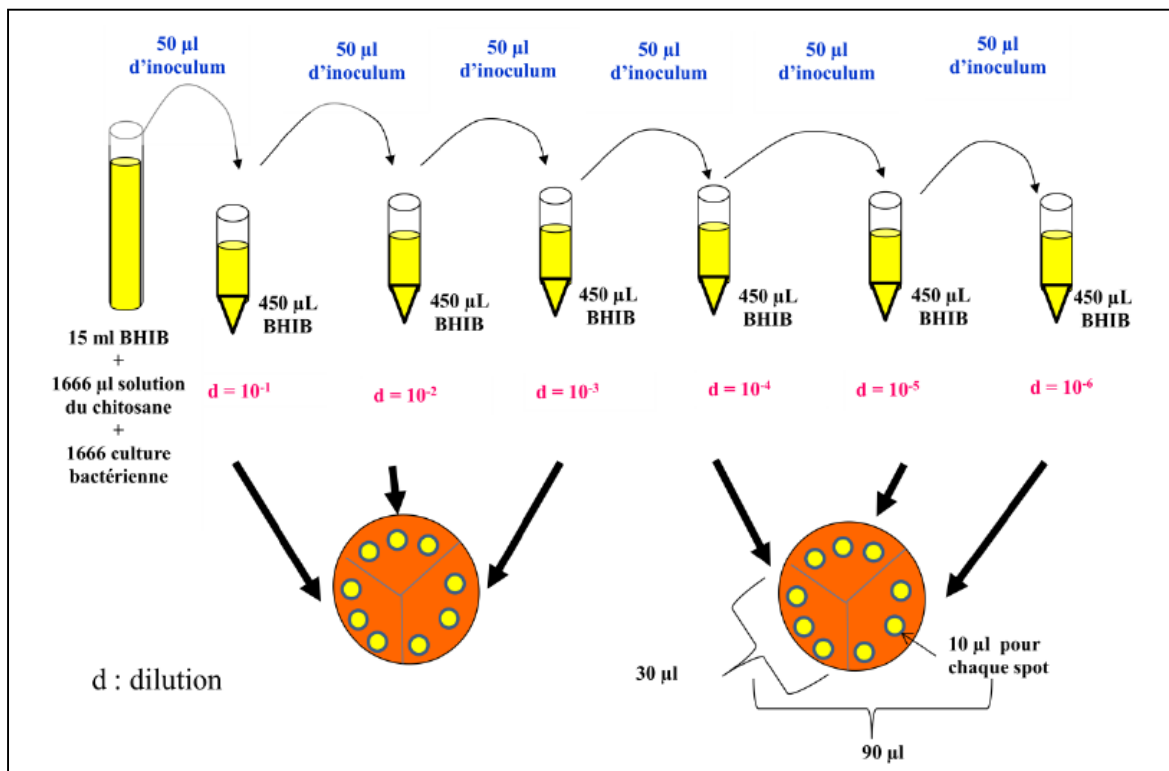


Figure 30 : représente technique de dilution et de dénombrement par des spots.

II-2-3-6-Mesure de la densité optique :

L'étude de l'évolution de la croissance des souches pathogènes a été effectuée dans le milieu BHIB à 37 °C, en aérobiose. La mesure de la densité optique (DO) avec des spectrophotomètres automatiques (JENWAY-7305, Royaume-Uni) à 600 nm permet de suivre en temps réel la croissance de la biomasse bactérienne dans le milieu de culture avec le chitosane. Ainsi, la courbe

$$DO_{600nm} = f(t).$$

La première préculture est réalisée dans 15 mL de bouillon BHI contenue dans un tube ensemencée par 1666 µL de la culture de 107 UFC/ml avec 1666 µL du chitosane en solution (fig.35), ce mélange à été agité par un vortex. Puis étuvées à 37°C pendant 18 heures. La densité optique est mesurée toutes les deux heures d'incubation.

La DO permet d'estimer la biomasse de la culture et non directement sa concentration en cellules viables. Cette détermination se fera par la technique de dénombrement de Guiraud (1998) des unités formant colonies (UFC) sur boîte de milieu gélosé (Molmeret et al., 2010).



Figure 31 : Le mélange de BHIB 15 ml, Chitosane en solution 1666 µl, la souche en suspension 1666 µl.

II-2-4- Etude de pouvoir antifongique :

-Les champignons

Le terme champignon microscopique est un terme très vaste qui regroupe des micro organismes vivants (principalement pluricellulaires) ni végétaux, ni animaux, tels que les moisissures, les rouilles, ou encore les levures. Leur taille varie de 4 à 100 microns (1 micron= 1/1000ème de millimètre) environ.

-Les levures :

La levure est un champignon microscopique, unicellulaire de forme ovoïde ou sphérique. La grande particularité de la levure est qu'il s'agit d'un organisme vivant.

Tout comme celles de l'homme, les cellules de levures sont vivantes et naturelles. Elles ont besoin d'air pour se multiplier, mais l'absence d'air n'est pas non plus sans conséquence sur son développement.

II-2-4-1-Préparation du milieu de culture :

Le PDA (Potato Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée et gélosée),est le milieu de culture utilisé pour l'entretien des souches fongiques et la réalisation des tests antifongiques (Davet et Rouxel, 1997). Les souches fongiques sont conservées dans le milieu PDA bouillon à 25°C.

-Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée et gélosée)

Pomme de terre.....	200g
Dextrose.....	20g
Agar.....	15g
L'eau	1L
PH	5 ± 0,2

Milieu de culture OGA(Gélose à l'oxytétracycline glucose)

Extrait de levure..... 5g

Glucose20g

Agar15g

PH.....7

II-2-4-2-Test Antifongique :

Pour effectuer le test antifongique, nous avons adopté la méthode de puits. :

Essai d'activité antifongique fait dans deux différents milieux de culture semi solide l'un et PDA et l'autre OGA avec 1000 µl d'une culture jeune de 24 h d'incubation à 30°C,(les champignons) ont été coulés dans des boîtes de Pétri (diamètre 60 mm). Après refroidissement et solidification à température ambiante dans une zone stérile, les puits sont

Creusés à l'aide d'un embout jaune stérile. Généralement on réalise 5 puits par boîte de 60 mm de diamètre (chaque test est réalisé en délicat). Un volume de 80 µl de solution chitosane est mis dans chaque puits (4 puits). Un puits de 80µl de bouillon de PDA et l'autre d'OGA stérile sert comme témoin négatif.

Les boîtes de Pétri sont incubées à +4°C pendant 2 à 4 heures pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (prédifusion) (Doumandji et al. 2010), et ensuite incubées à 37°C. La présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 18 à 24h d'incubation (Hwanhlem et al. 2011).

Remarque : nous avons utilisée deux différents chitosane (chitosane de méthode 1et de méthode 2)

III.1 Analyse des coproduits de la crevette :

La matière première utilisée pour cette étude est le déchet (tête et carapace) de crevette rouge *Aristeus antennatus* pêchée au niveau de la cote de Mostaganem. Ces derniers ont été lavés abondamment avec de l'eau de robinet, séchés à température ambiante et broyés pour obtenir une poudre facile à analysée.

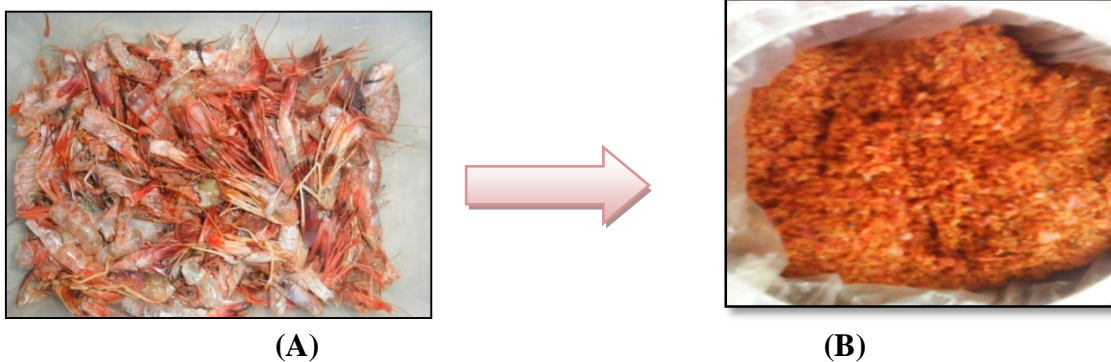


Figure 32 : déchet de crevette (carapace+tête) (A), poudre de crevette après broyage (B)

III.1.1 Analyse de la chitine et du chitosane extraits des coproduits de la crevette :

La production de chitine repose sur la purification de la matière première. L'extraction chimique consiste en un traitement acide avec acide sulfurique HCL pour la déminéralisation et un traitement alcalin avec Hydroxyde de sodium NaOH pour la déprotéinisation. Et la dernière étape c'est le blanchiment avec le peroxyde d'hydrogène (H2O2) seulement pour la première méthode d'extraction, Entre chaque étape, le produit est rincé abondamment à l'eau distillé.

Le chitosane est un copolymère linéaire ² (1-4) de N-acétyl D-glucosamine et de Dglucosamine (klouj, 2012 ; Felt et al., 1999 ; No et al., 2003), obtenu par désacétylation de la chitine à partir de la carapace des crustacés (crabes, crevettes) par des processus chimiques (fig.36) selon les deux méthodes utilisées (par autoclave ou par un bain d'huile).

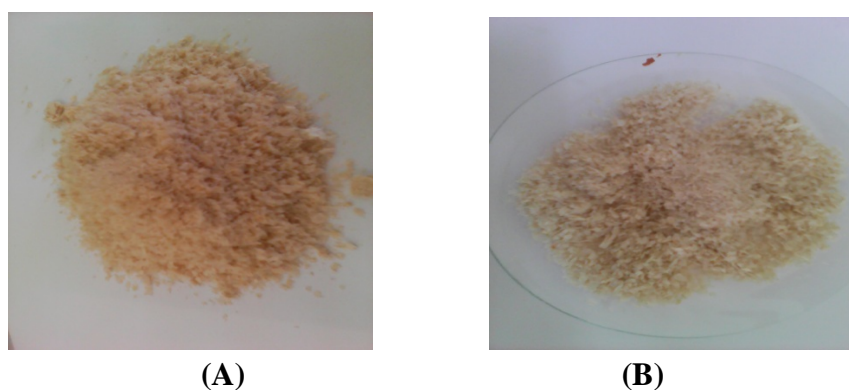


Figure 33: Comparaison visuelle entre (A) La chitine extrait des carapaces de crevette (B) Le chitosane.

Dans les deux méthodes utilisées, le chitosane extrait se présente sous forme de poudre inodore, sans saveur et de couleur blanche.

III-1-2-Caractères du chitosane extrait :

Tableau 0 3: Caractères organoleptiques de la chitine et du chitosane extrait.

Caractères	Chitine	Chitosane
Couleur	Orange brûlé	Brûlé blanc
Aspect	Poudre semi rigide	Poudre semi rigide
Odeur	Inodore	Inodore

Tableau 04: Rendement massique de chitine et chitosane d'après les deux méthodes d'extraction.

	Méthode 1	Méthode 2
La chitine	7.6g	2.25g
Le chitosane	4.09g	1.33g

Le rendement massique d'extraction de chitine par la méthode chimique N°1 est de 7.6g à partir de 100 g d'échantillon soit 7.6 %. Et pour la méthode N°2, on trouve que le rendement massique d'extraction de chitine est de 11.25% à partir de 20 g d'échantillon

Le rendement massique d'extraction du chitosane est de 4.09% soit 100g pour la première méthode. Contrairement avec la deuxième méthode, on a obtenu un rendement massique de 6.65% soit 20g.

Les cuticules de crustacés sont constituées de chitine, protéines et minéraux (essentiellement le carbonate de calcium) (Kurita, 2006). Selon Mignotte et al. (2012), 45 g de matière sèche permettent d'obtenir 8 à 10 g de chitine. La valorisation des déchets issus de l'exploitation marine des crustacés est réalisée par l'extraction à l'échelle industrielle de la chitine par différents traitements effectués sur les coques de crevette et de crabe. En effet, on retrouve entre 15 et 35 % de chitine dans la carapace de diverses espèces de crevettes et de crabes (Brine et al., 1992 ; Kobelke, 1990 ; Muzzarelli et Peter, 1997).

III -1-3-Solubilité du chitosane :

Le chitosane est un produit non toxique et présente une solubilité dans les acides organiques à des $\text{pH} < 6$ tels que l'acide acétique, formique, lactique, succinique et malique. Cependant, il est insoluble dans l'eau, les milieux alcalins et les solvants organiques (Rabea et al., 2003).

La poudre du chitosane est pratiquement totalement insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées. Il est également insoluble dans les solvants purs et les acides concentrés, ou organiques (Kurita, 2006) et soluble dans l'acide acétique à 1 % (fig. 29).

En général, la solubilité du chitosane dépend de la valeur de degré désacétylation (DD), de la force ionique du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire (Rinaudo, 2006). En effet, le chitosane extrait est peu soluble, (Crini et al. 2009) montre que le chitosane est peu soluble lorsque le DD est faible, car les groupes amines sont peu nombreux.

Le calcul :

$Q = (V_{\text{NaOH}} \times 0,1) / (1000 \times M_{\text{cs}})$ = nombre de moles de la fraction aminée du chitosane pour un échantillon de 1g

M_{cs} : masse sèche de chitosane dans la prise d'essai, en g

V_{NaOH} = volume verse en ml de fait que V_{NaOH} est en ml

= Volume versé en ml de NaOH 0,1M entre PH 3,75 et PH 8

La facture 1000 vient du fait que V_{NaOH} est en ml

$$DA = (1 - 16XQ) / (1 + 42XQ)$$

$$DD = (161.16X V_{\text{NaOH}}) / M_{\text{cs}}$$

Et concernant la Chitine et par même principe

$$DD = (203.1925X V_{\text{NaOH}}) / M_{\text{cs}}$$

$$DA = 100 - DD$$

DA : degré d'acétylation

DD : degré désacétylation

III-1- 4- Degré d'acétylation de chitosane (DA) :

Tableau 05 : représente le degré d'acétylation de chitosane (DA) dans les deux méthodes

Méthode 1	Méthode 2
DD%=35.46%	DD%=95%
100-DA=64.55%	100-DA=5%

Le degré d'acétylation(DA) est le pourcentage d'unités acétylées par rapport au nombre d'unités totales, il peut être déterminé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) ou par un tirage par une base forte. La frontière entre chitosane et chitine correspond à un DA de 50% : en deçà le composé est nommé chitosane, au-delà, chitine.

Le chitosane est soluble en milieu acide contrairement à la chitine qui est insoluble. Il est important de faire la distinction entre degré d'acétylation(DA) et le degré de désacétylation (DD) .l'un étant l'inverse de l'autre c'est-à-dire que chitosane ayant un DD de 85% possède de 15% de groupement acétyles et 85% de groupements amines sur ses chaîne entre chitosane et chitine correspond à un DA de 50%.

Tableau 06: Corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à PH 6 (Thanou et Junginger, 2005).

DD (%)	Solubilité du chitosane
e 75	Parfaite
= 50	Moyen
d 40	Faible

Dans notre cas on a trouvé que le degré désacétylation (DD) de chitosane de la méthode 2 est plus efficace, par rapport de méthode 1. Donc le degré d'acétylation (DA) de méthode 2 est 95 % soluble.

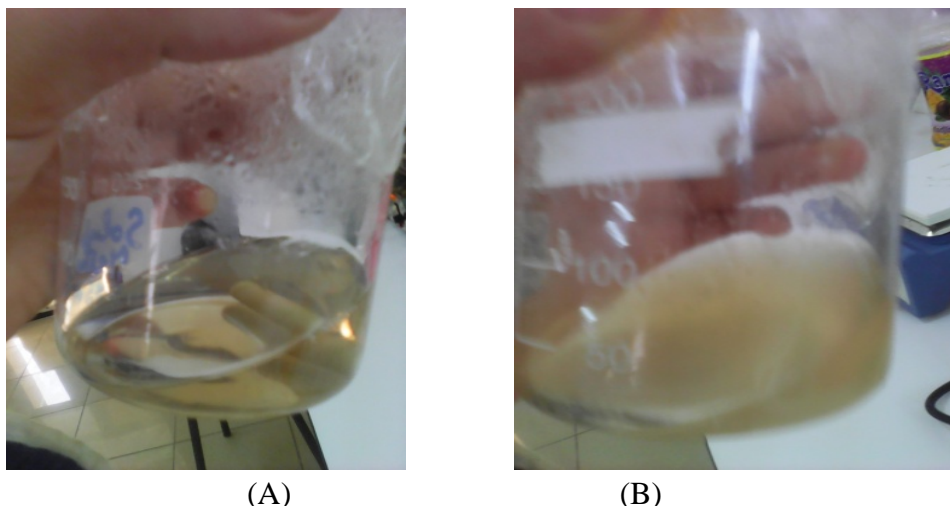


Figure 34 : La solubilité du chitosane dans l'acide acétique à 1 %, fig. 37(A) chitosane de méthode 2 et fig37 (B) chitosane de méthode 1

III.1.5-Analyse biochimique de déchet de crevette (tête et carapace) :

III.1.5-1 Analyse biochimique des hydrolysats chimiques :

Les résultats obtenus dans le tableau 6, montrent que la teneur en humidité estimée en utilisant l'acide acétique qui est de 75%, est la plus élevée par rapport à celle obtenue en utilisant le HCl et le NaOH. Par ailleurs, on remarque que la teneur en cendre obtenue le NaOH, qui est de 18%, et la plus élevée par rapport aux teneurs obtenus en utilisant les autres acides. Quant, à la teneur en lipides et des protéines les valeurs les plus élevées ont été obtenues en utilisant l'acide acétique et restent assez élevées par rapport aux valeurs obtenues en utilisant les autres acides.

Tableau 07 : l'analyse biochimique des teneurs de l'hydrolysat chimique

	Humidité	Cendre	Lipide	Protéine
HCl	44%	5.5%	02,91%	15.31%
Acide acétique	75%	12%	14,16%	48.12%
NaOH	59%	18%	09,16%	17.5%

Discussion :

Dans notre étude de l'analyse des teneurs de l'hydrolysate chimique, la valeur obtenue pour l'évaluation de l'humidité, celle obtenue en utilisant l'acide acétique. Ce dernier a une influence très basse, car c'est un acide faible par rapport HCl et le NaOH. Quant à la teneur des cendres, le HCl a fait une hydrolyse à peu près totale, en addition avec l'opération de séchage, qui a contribué à l'obtention de cette parfaite valeur de 5.5%. De même pour la teneur de lipide obtenue en utilisant l'HCl, la valeur de 02,91% est contraire à celles obtenues par les autres acides, on peut conclure que le HCl a une grande influence dans la délipidation totale.

Par ailleurs, pour les différents types des hydrolysats, les teneurs en protéines obtenues sont faibles. Cette faible teneur obtenue par le NaOH (17,5 %) est liée à la capacité de ce dernier à la déprotinisation de la matière organique. Aussi, l'HCl (15.31%): qui est un acide fort, arrive à briser les liaisons chimiques entre les acides aminés donc réalise la dégradation des protéines. Quant à l'acide acétique, ce dernier montre un taux élevé (48.12%) de protéine puisque il y a un effet très faible (ou nul) sur les protéines.

III-1-5-2- Analyse de la teneur en eau :

On a fait le séchage du déchet de crevette *A. antennatus*, et la teneur en eau contenue dans le déchet, a été évaluée à 29.5 %. Quelle que soit le contenu du déchet de crevette (tête, carapace) qu'on a utilisée. La valeur que l'on a obtenue est inférieure à celle obtenue par Harrat (2016) qui a trouvée une valeur de 35% (Tableau 04). Par ailleurs, la teneur en eau obtenue d'une valeur de 29.5% est supérieure à la celle obtenue par LE ROUX en 2012, pour l'espèce *Penaeus vannamei* dont la carapace contient 20 % d'eau. Cependant, la teneur en eau obtenue par RANDRIAMAHATODY (2011) reste la plus élevée 73%, pour l'espèce, *Penaeus monodon*, et est supérieure à toutes les valeurs estimées pour d'autres espèces (voir le tableau 04)

Tableau 08: Variabilité de la teneur en eau contenue dans le déchet de différentes espèces de crevettes .

Echantillons	Présent travail A . <i>antennatus</i> (Risso,1816)	Mémoire 2016 de Harrat.A . <i>antennatus</i> (Risso,1816)	LE ROUX (2012) <i>penaeus vannamei</i> (Boone,1931)	RANDRIAMAHATODY(2011), <i>Penaeus monodon</i> (Fabricius,1798)
Teneur en eau	29.5%	35%	20%	73%

III.1.5. 3. Analyse de la teneur en cendres :

Le résultat obtenu pour l'évaluation du taux des cendres montre un taux de 16%. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par #Harrat (2016) qui a trouvé 41%, valeur qui reste la plus élevée par rapport à ce qu'on retrouvé dans la littérature.

Tableau 09 : variabilité de la teneur en cendre contenue dans le déchet de la crevettes

Echantillons	Présent travail A . <i>antennatus</i> (Risso,1816)	Mémoire 2016 de Harrat .A . <i>antennatus</i> (Risso,1816)	LE ROUX(2012) <i>Penaeus vannamei</i> (Boone, 1931)	RANDRIAMAHATOD Y(2011) <i>Penaeus monodon</i> (Fabricius, 1798)
Teneur en cendre	16%	41%	19 %	6.56 %

III.1.5.4.Analyse de la teneur en lipides :

Le tableau ci-dessous montre que le taux de lipide obtenu dans notre échantillon (déchet de la crevette A . *antennatus*) est estimé à 10%. Cette valeur est nettement supérieure à celle obtenue chez l'espèce *Penaeus monodon* et l'espèce *Penaeus vannamei*

Tableau 10 : variabilité de la teneur en lipides contenue dans le déchet des différentes espèces de crevettes

Echantillons	Présent travail A . <i>antennatus</i> (Risso,1816)	Mémoire 2016 de Harrat A . <i>antennatus</i> (Risso,1816)	LE ROUX(2012) <i>Penaeus vannamei</i> (Boone,1931)	RANDRIAMAHATODY (2011), <i>Penaeus monodon</i> (Fabricius, 1798)
Teneur en lipide	10%	7.2%	3 .6 %	1.9 %

III.1.5.5. Analyse de la teneur en protéines :

Les résultats obtenus pour le taux de protéines par la méthode Kjeldahl a été évaluée à 25.37%. Cette dernière est supérieure à la valeur obtenue de Harrat 11.7% pour la même espèce, ainsi que celle de RANDRIAMAHATODY(2011), obtenu dans les déchets de *Penaeus monodon*. Par contre, elle reste inférieure à la valeur trouvée par Le ROUX (2012) dans les déchets de *Penaeus vannamei*.

Tableau 11 : Variabilité de la teneur en protéines contenue dans le déchet de la crevette

Echantillons	Présent travail A . <i>antennatus</i> (Risso,1816)	Mémoire 2016 de Harrat A . <i>antennatus</i> (Risso,1816)	LE ROUX (2012) <i>Penaeus vannamei</i> (Boone,1931)	RANDRIAMAHATODY (2011), <i>Penaeus monodon</i>
Teneur en protéines	25.37%	11.7%	42.9%	16%

III-1-5-6- Analyse biochimique de la chitine et du chitosane :

Dans le présent travail, on trouve que les teneurs analysées de la chitine et du chitosane tel que : les teneurs en eau, en cendre, en lipide, et en protéine sont très faibles par rapport à celles évaluées dans la poudre de crevette

Tableau 12 : variabilité de des composants contenus dans le déchet de crevette et la chitine

Teneurs	Eau	Cendre	Lipides	Protéines
Déchet de crevette	29.5%	16.5%	10%	25.37%
Chitine	9%	04%	06,83%	5.4%
Chitosane	9%	4.5%	3,33%	0.43%

Discussion:

Dans cette partie, nous avons procédé à la détermination des caractéristiques biochimiques tel que : la teneur d'humidité, des cendres, des lipides et des protéines dans la poudre de déchets de la crevette, dans la chitine et le chitosane. Les résultats obtenus ont montré qu'il ya une grande variabilité des proportions, cette différence peut être réduite en influençant les étapes d'extraction de chitine et de chitosane, chez ces derniers, on a utilisé différents dosages qui ont eu une influence sur les proportions. Par ailleurs, il est à noter que les proportions des différents constituants varient selon l'espèce, l'âge, le genre et peuvent fluctuer selon les saisons et les conditions environnementales (Tolaimate et al., 2003 ; Shahidi et al., 2002 ; Waldeck et al., 2006 ; Kurita, 2006).

III. 2. Résultats de l'analyse microbiologique :

III. 2. 1 Effet sur les germes totaux :

La flore totale aérobie, encore appelée flore aérobie mésophile, représente l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en présence d'oxygène à une température située entre 25° et 40 °C. Cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'Homme.

Dans nos échantillons, le taux des germes aérobies mésophiles varie au cours des dilutions où l'on peut observer une diminution du nombre de colonies , qui est liée avec le % de dilution (voir le tableau 12) .

L'analyse bactériologique de notre échantillon montre une contamination totale avec $11,41 \cdot 10^4$ de micro-organismes aérobies à 30°C.

Cette flore peut être considérée comme une flore d'altération, car la présence d'une flore mésophile aérobie, revivifiable, abondante indique un processus de dégradation en cours (GUIRAUD, 1998).

Tableau 13: Nombre de colonies de la flore mésophile obtenue dans les différentes dilutions du chitosane.

Dilution	Nombre des colonies
10^{-4}	104.10^4
10^{-5}	52.10^5
10^{-6}	28.10^6

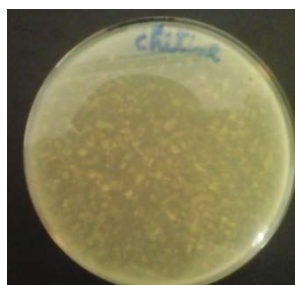
III-2-2-Les milieux de culture modifiées :



Milieu de culture MRS (A)



MRS modifié (B)



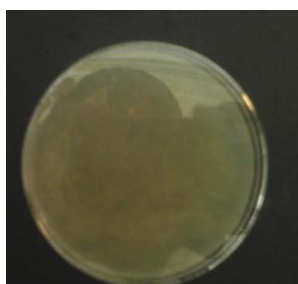
MRS modifié (C)



MRS modifié (D)



MRS modifié (E)



MRS modifié (F)



MRS modifié (G)

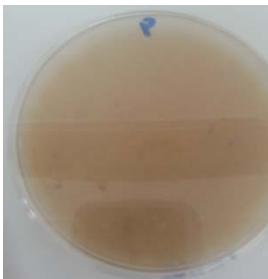
Figure35 : représente les différents milieux de culture modifiés MRS [(A) Témoin, (B) dechet, (C) chitine, (D) chitosane, (E) acide acétique, (F) HCl, (G) NaOH]

On remarque que le milieu de culture modifié MRS de HCl a une croissance très élevée par rapport au milieu de culture modifié de NaOH et acide acétique. Aussi le milieu de culture modifié de déchets très élevé en comparaison avec le milieu de culture modifié de la chitine et chitosane.

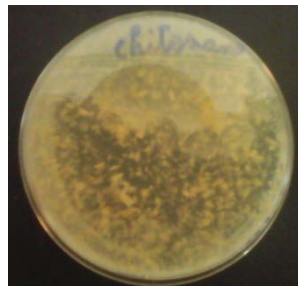
Enfin, on conclut qu'il y a une forte croissance de bactérie concernante bactérie lactique dans le milieu de culture MRS témoin contrairement aux milieux modifiés.



Milieu de culture TGEA (A)



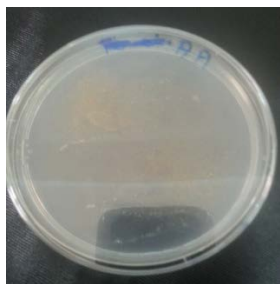
TGEA modifié (B)



TGEA modifié (C)



TGEA modifié (D)



TGEA modifié (E)



TGEA modifié (F)



TGEA modifié (G)

Figure 36: représente les différents milieux de culture modifiés TGEA ((A) Témoin, (B) déchets, (C) chitosane, (D) chitine, (E) acide acétique, (F) HCl, (G) NaOH)

On observe que le milieu de culture modifié TGEA de HCl a une croissance très élevée par rapport le milieu de culture modifié d'NaOH et acide acétique. Aussi le milieu de culture modifié de déchets très élevée en comparaison avec le milieu de culture modifié de la chitine et chitosane.

Enfin, on conclut qu'il y a une forte croissance de bactérie concernant l'*E. coli* dans le milieu de culture TGEA témoin contrairement les autres milieux modifiés.

Discussion :

Dans notre étude de l'analyse microbiologique, on observe qu'il y a une influence plus élevée de HCl dans les deux milieux de culture modifiés MRS et TGEA sur la croissance des bactéries (bactéries lactiques et *E. coli*) car, ce dernier élimine tous les minéraux et ne dégrade pas les protéines par contre les autres acides NaOH et acide acétique.

Pour le milieu de culture modifié de poudre le résultat obtenu nous avons trouvé une croissance très haute par rapport le milieu de culture modifié de chitine et de chitosane dans les deux milieux de culture modifiés MRS et TGEA car, ces derniers ont passé par des étapes de déminéralisation avec HCl et déprotéinisation avec NaOH donc nous avons éliminé tous les sources de protéine qui sont des éléments essentiels à la croissance optimale de ce type de bactérié.

Pour les autres milieux modifiés et après la lecture nous avons remarqué une croissance peu nombreux, on peut conclure que les composés que nous avons remplacé (la poudre de crevette, la chitine, le chitosane, et l'hydrolysate chimique) peut remplacer la tryptone ; extrait de viande et de levure, dans les deux milieux de culture modifiés MRS et TGEA mais pas totalement.

Enfin pour la gélose MRS et TGEA, les souches (*E. coli* et bactérie lactique) sont développées où ils comportent tous les éléments essentiels à la croissance optimale de ce type de bactérié.

III-2-3-Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d'action :

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien du chitosane par la méthode de diffusion en puits AWDT (Agar well Diffusion Test), et aussi par leur évaluation de la cinétique de croissance de souche pathogène mise en contact avec le chitosane. Les milieux qu'on a utilisés pour faire ces tests sont TGEA et LB. L'activité antimicrobienne du chitosane a été

estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant le chitosane à tester vis-à-vis de le germe pathogène *E. coli*.

III-2-3-1-Méthode de diffusion en puits AWDT (Barefoot et Kaenhammer, 1983) :

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antimicrobien.

Les résultats concernant les propriétés antibactériennes ont montré que le chitosane a une influence sur, *E. Coli* par une activité inhibitrice importante.

Tableau 14: Le pouvoir antimicrobien du chitosane dans différents milieux de culture avec la souche *E.coli* et leur diamètre d'inhibition.

Milieux	TGEA	LB
Diamètre d'inhibition	23±5.03	21.5±4.43

La meilleure zone d'inhibition (**23±5.03** mm de diamètre) a été observée pour la souche *E.coli*, dans le milieu TGEA

Selon Barros et coll (2007) :

- ✓ Diamètre inférieurs à 7 mm aucune activité antimicrobienne.
- ✓ Diamètre de 7 à 9.9 mm activité antimicrobienne faible.
- ✓ Diamètre de 10 à 11.9 activités antimicrobiennes modestes.
- ✓ Diamètre de 12 à 15 activités antimicrobienne élevée.

Aucune zone
d'inhibition

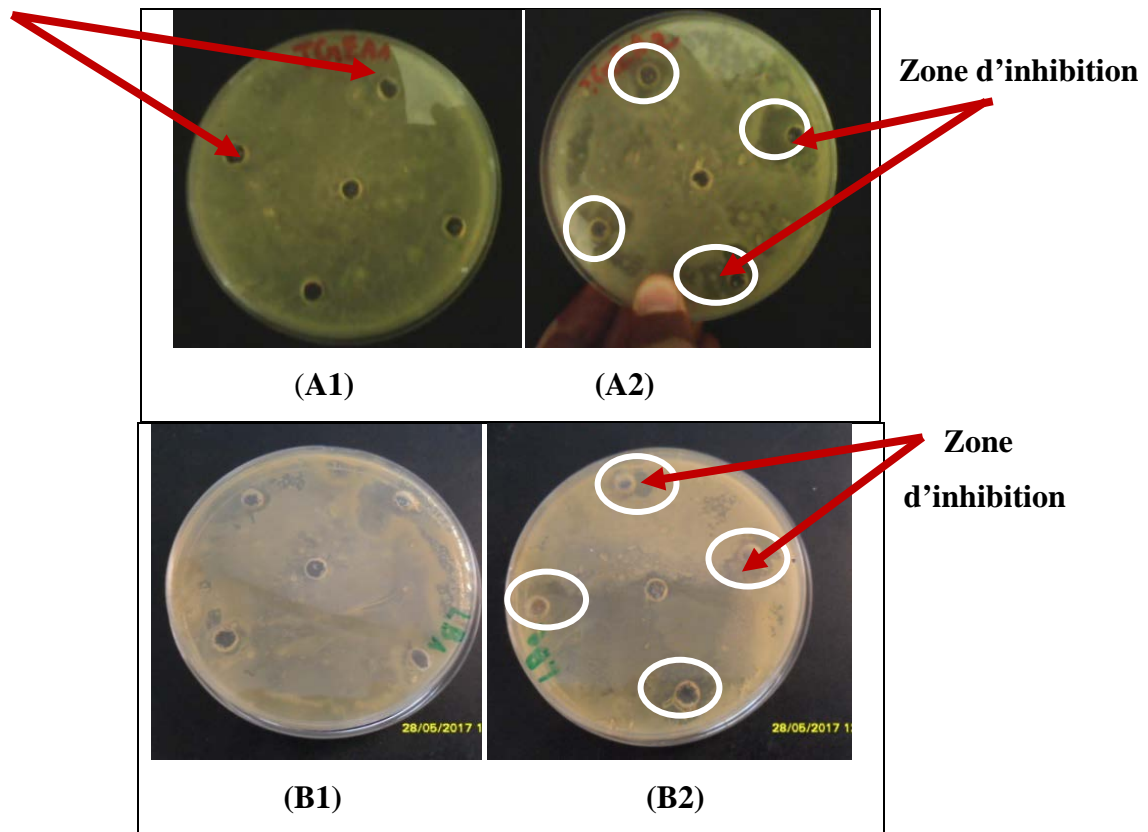


Figure 37: Pouvoir antibactérien du chitosane et son spectre d'action par la méthode de diffusion en puits contre *Escherichia coli* dans deux milieux différents (A) TGEA et (B) LB

Dans l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que : la souche *Escherichia coli* est plus sensible vis-à-vis du chitosane (activité antimicrobienne forte). Le chitosane possède une activité inhibitrice sur la souche *Escherichia coli* marque un diamètre d'inhibition de 23 ± 5.03 mm dans le milieu TGEA et de 21.5 ± 4.43 sur le milieu LB.

Le milieu LB est un milieu sélectif pour enrichissement de tous les types des bactéries par contre le milieu TGEA est un milieu spécifique pour l'*E.coli* seulement.

III-2-3-2-Cinétique de croissance bactérienne mises en contact avec le chitosane :

L'inhibition de la souche bactérienne *E.coli* par le chitosane de méthode 2 commence à partir des premières heures d'incubation.

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, on a trouver qu'il ya une croissances bactérien dans les premiers dilution de (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) au contraire les seconde dilution (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) de chitosane de méthode 2 on a remarqué une zone d'inhibition important .

Dans le chitosane de méthode 1 on a trouver aucun zone d'inhibition de la souche bactérienne *E.coli*.



Figure 38: Cinétique de croissance d'*E. Coli* par méthode des spots mise en contact avec le chitosane, à 0 h d'incubation. (A) chitosane de méthode 2 et (B) chitosane de méthode 1.

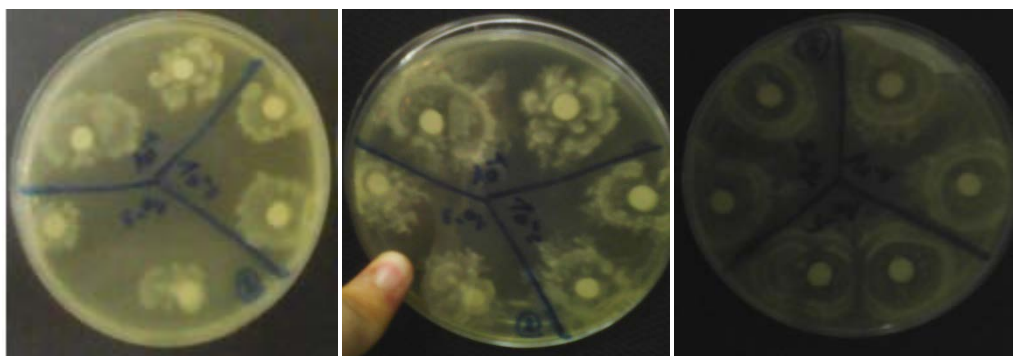
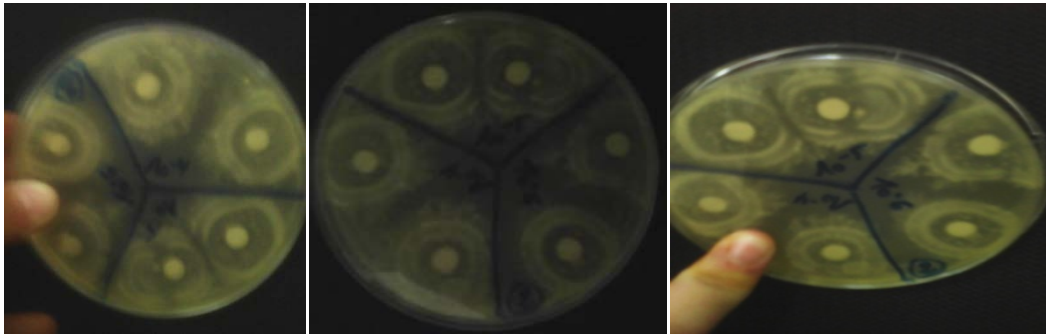


Figure 39: Cinétique de croissance d'*E. Coli* par méthode des spots mise en contact avec le chitosane, de la méthode 2 à 72 h d'incubation entre la dilution 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

Les résultats obtenus dans la figure montrent qu'il y a une relation de cinétique de croissance d'*E. Coli* avec le temps d'incubation.



. **Figure 40** : Cinétique de croissance d'*E. Coli* par méthode des spots mise en contact avec le chitosane, de la méthode 2 à 72 h d'incubation entre la dilution 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

Le résultat obtenu dans la figure montre que dans la dilution de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} on trouve que la zone d'inhibition est plus grande par rapport à la première dilution 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

Après les résultats on conclut que le chitosane de méthode 2 a un effet antibactérien très important que le chitosane de méthode 1. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour lutter contre les intoxications alimentaires en utilisant des potentialités biologiques et les interactions entre les microorganismes afin de réduire ainsi l'effet secondaire indésirable des produits chimiques appelés conservateurs. Le chitosane sera utilisé comme un moyen efficace dans la biopréservation des aliments.

III-2-3-3-Densité optique :

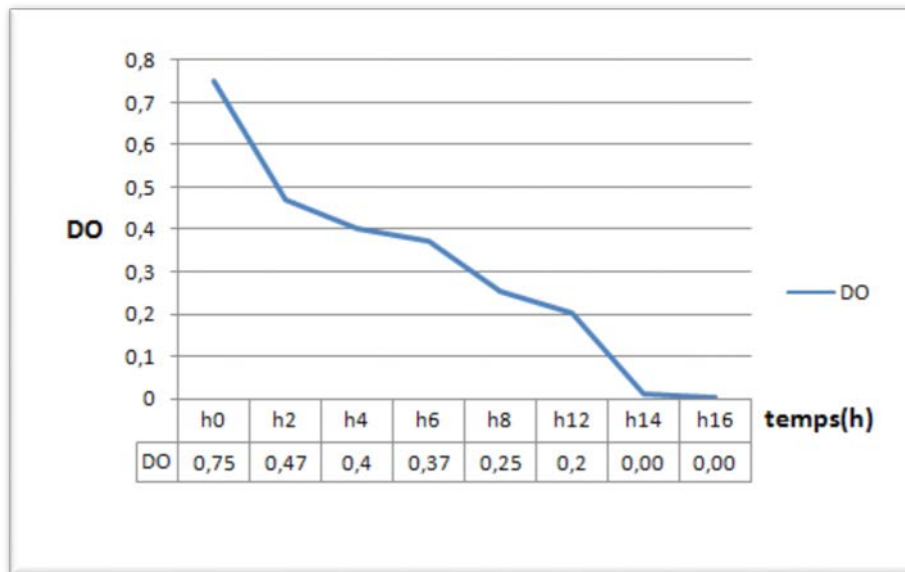


Figure 41: Résultats de la mesure de cinétique de croissance DO — *d'Escherichia coli* mise en contact avec le chitosane de la méthode 1 à 600nm après chaque deux heures d'incubation à 37°C.

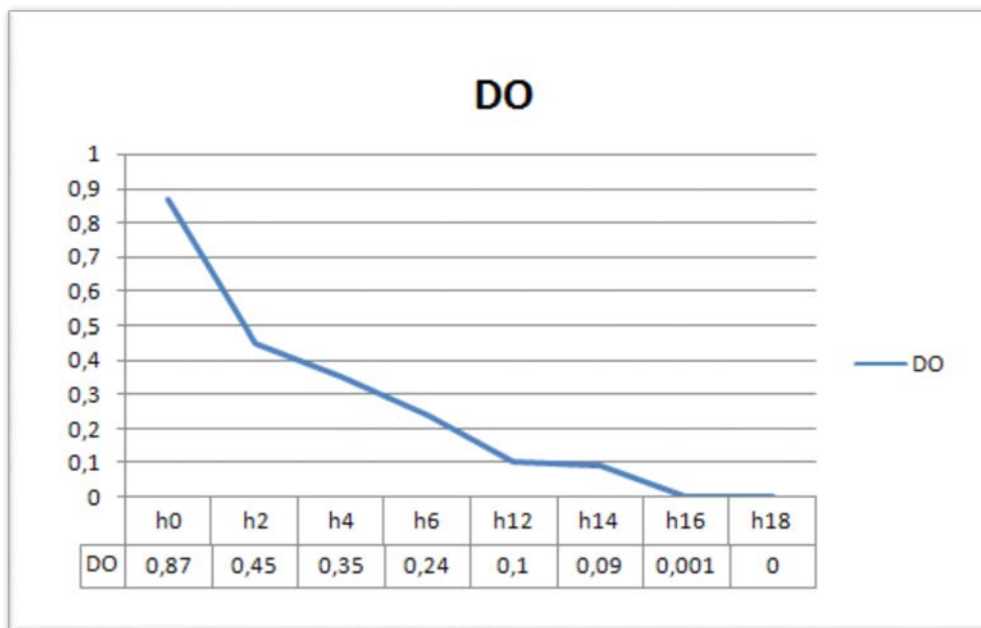


Figure 42: Résultats de la mesure de cinétique de croissance DO — *d'Escherichia coli* mise en contact avec le chitosane de la méthode 2 à 600nm après chaque deux heures d'incubation à 37°C.

Après une culture dans un bouillon de BHI de la souche *Escherichia coli*, le suivi de la croissance par la mesure de la densité optique (600 nm) à des intervalles de temps : 0h, 2h, 4h, 6h, jusqu'à 18 heures d'incubation à 37°C, on observe que la cinétique de croissance varie en fonction du temps.

Dans le courbe on observe que la décroissance de la bactérie *E. coli* car le chitosane de la méthode 2 plus rapide par contre le chitosane de la méthode 1.

Solubilisation de chitosane de la méthode 2 est 95% c'est pour ça qu'on a trouvé le chitosane de la méthode 2 est plus efficace par rapport le chitosane de méthode 1.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur l'activité antibactérienne du chitosane : l'aspect microbien (type de bactéries), le chitosane lui-même (densité de charges positives, le poids moléculaire, DD, la concentration, le caractère hydrophile ou hydrophobe ou la capacité de former des complexes), l'état physique (film, fibre, sphère ou hydrogel) et les facteurs environnementaux (le pH, la température, le temps ou la présence de cations métalliques) (Kong et al, 20

l'activité antibactérienne du chitosane (soluble dans l'acide acétique à 1%) va être influencée par sa solubilité qui elle-même dépend, du degré de déacétylation DD. Lorsque la solubilité du chitosane est optimisée, son activité antibactérienne sera meilleure (Xie et al., 2007).

III.-3-Résultat de l'analyse du pouvoir antifongique :

Tableau 15: Le pouvoir antifongique du chitosane dans différents milieux de culture avec la souche de champignon et leur diamètre d'inhibition.

Milieux	OGA	PDA
Diamètre d'inhibition	29±19.42	28.5±13.10

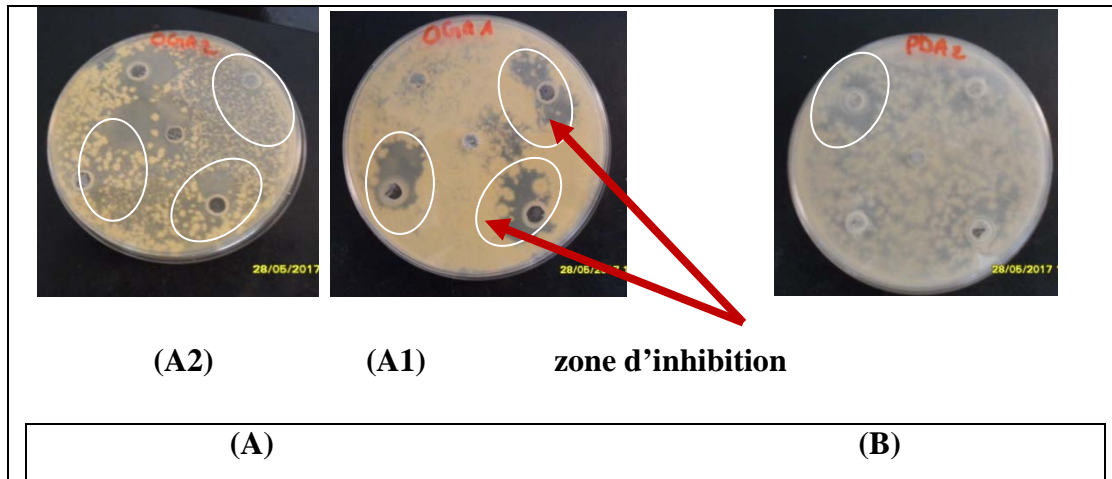


Figure 42: Pouvoir antifongique du chitosane et son spectre d'action par la méthode de diffusion en puits contre les champignons dans deux milieux différents (A) OGA(A1) chitosane de la méthode 1, chitosane de la méthode 2 et (B) PDA

Le chitosane présente des propriétés très intéressantes, il est non-toxique, biodégradable, renouvelable, antibactérien et antifongique. Le chitosane possède une activité inhibitrice sur les champignons marquée par la présence d'un diamètre de 29 ± 19.42 d'inhibition dans le milieu OGA et de 28.5 ± 13.10 dans le milieu de PDA.

L'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance de champignon pour les différents milieux

L'ensemble des essais réalisés au cours de ce travail permet de conclure que le chitosane présente un grand intérêt dans une vaste gamme d'applications industrielles. Notre étude a porté sur l'évaluation de son pouvoir antimicrobien (vis-à-vis de bactéries *E.coli*), et de son pouvoir antifongique (champignon).

Les trois principaux objectifs poursuivis dans ce travail ont été atteints : Le premier objectif était de déterminer la composition chimique de déchet de crevette, de chitine, chitosane, et l'hydrolysat chimique, ainsi en vu des résultats obtenus, on peut conclure qu'il y a une variabilité de la composition chimique des différents coproduits analysés..

Le deuxième objectif était de mettre au point une extraction du chitosane à partir des carapaces de crevette, avec un rendement massique de 6.65g soit 100g pour la première méthode. Par contre, la deuxième méthode d'extraction, le rendement massique a été de 11.25g soit 20g.

Le troisième objectif reposait sur détermination du pouvoir antimicrobien du chitosane contre la souche pathogène *E. coli*, (Gram-) par méthode de diffusion en puits AWDT (culture en masse), La meilleure zone d'inhibition (23 ± 5.03 mm de diamètre) a été observée pour la Souche *E.coli*, dans le milieu TGEA et 21.5 ± 4.43 pour l'autre milieu LB. Donc, le chitosane possède une activité antimicrobienne élevée sur la souche. Aussi, et concernant le pouvoir antifongique de chitosane, l'inhibition est aussi importante et le diamètre de la zone d'inhibition 29 ± 19.42 mm a été observée pour les champignons, dans le milieu TGEA et 28.5 ± 13.10 pour l'autre milieu PDA.

Concernant les propriétés biologiques du chitosane, nous avons évalué la cinétique de croissance de la souche *Escherichia coli* en contact avec le chitosane (culture mixte), chaque 2 heures d'incubation à 37°C pendant 12 heures par Spectrophotomètre UV (600 nm). Selon la mesure de la densité optique à l'aide du Spectrophotomètre ; on observe que la croissance bactérienne de *E. coli* diminue considérablement au contact du chitosane pour atteindre une inhibition total après 10 heures d'incubation.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats montrent l'intérêt du Chitosane, celui-ci présente un pouvoir antimicrobien et antifongique certain c'est un excellent conservateur.

Nous nous proposons d'extraire, de caractériser et d'exploiter les propriétés du chitosane extrait de carapace de crevettes en tant que polymère doté de propriétés antibactériennes et antifongiques intrinsèques et leurs applications sur des produits alimentaires.

-A -

Al Sagheer, F. A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., Elsabee, M.Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf., *Carbohydr Poly* 77(2): 410-419.

Amiali, M. (1999). Caractérisation des films du chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO₂, O₂).

Amiali, M. N., Lacroix, C. & Simard, R. E. (1998). High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration., *World J. Microbiol. Biotechnol* (14): 887-894.

Attila, E., Dominic, P., Wong, W.S., George, H., Robertson. (2009). chitosan, preparation, structure, and Properties.

-B -

Bacon, A., Makin, J., Sizer, P.J., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Ilum, L., Chatfield, S. & Roberts M. (2000). Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens., *Infection and Immunity* (68) :5764-5770

BEAUMONT .A. ET CASSIER .P , 1998 - Biologie animale des protozoire aux métazoaire épithélioneuriens . Edition . Dunod ,paris :2p

Benhamou, N. & Lafontaine, P. J. (1995). Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitorinduced structural responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp., *Radicis-lycopersici*. *Planta* (197) : 89-102.

Bensaha, S. (2010). La décontamination des eaux usées sur un support naturel. Laboratoire de Chimie Inorganique et Environnement. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

Berthe, F. C. J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, P., Thébault, A. & Figueras, A. J. (1998). Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of the life cycle., *Diseases of Aquatic Organisms* (34) : 135-144.

Bordenave, N. (2009). Chitin and chitosan. FS630. Room 3151.

Brine, C. J. & Austin, P. R. (1981). Chitin Isolates: Species Variation in Residual Amino Acids., *Comparative Biochemistry and Physiology B* *Biochemistry & Molecular Biology* 70(2) : 173-178.

Brugnerottoa, J., Lizardib, J., Goycooleab, F.M., ArguÈelles-Monalc, W., DesbrieÁresa, J. & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization., *Polymer* (42) : 356-3580.**Bordenave, N.** (2009). Chitin and chitosan. FS630. Room 3151.

Brine, C. J. & Austin, P. R. (1981). Chitin Isolates: Species Variation in Residual Amino Acids., *Comparative Biochemistry and Physiology B* *Biochemistry & Molecular Biology* 70(2) : 173-178.

Brugnerottoa, J., Lizardib, J., Goycooleab, F.M., ArguÈelles-Monalc, W., DesbrieÁresa, J., Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization., *Polymer* (42) : 356-3580.

Bensaha, S. (2010). La décontamination des eaux usées sur un support naturel. Laboratoire de Chimie Inorganique et Environnement. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

Berthe, F. C. J., Pernas, M., Zerabib, M., Haffner, P., Thébault, A., Figueras, A. J. (1998). Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of the life cycle., *Diseases of Aquatic Organisms* (34) : 135-144.

-C-

Cárdenas, G., Díaz, J., Meléndrez, M. F., Cruzat, C. (2008). Physicochemical properties of edible films from chitosan composites obtained by microwave heating., *Polym Bull* 61(6):737-748.

CHARPON. C., 1999 – Principes de zoologie structure – fonction et évolution . Edition. Dunod, Paris :80p

Chaucheyras-Durand, F., Faqir, F., Ameilbonne, A., Rozand, C. & Martin, C. (2010). Fates of Acid-Resistant and Non-Acid-Resistant Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in Ruminant Digestive Contents in the Absence and Presence of Probiotics., *Appl. Environ. Microbiol* 76(3):640-647

Chaussard, G. (2002). Elaboration de biomatériaux innovants à partir de chitine et chitosane issus de plumes de calmar en vue d'une application biomédicale. Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1.

Chen, W., Adams, R. L., Carubelli, R., Nordquist, R. E. (1997). Laser-Photosensitizer assisted immunotherapy : Anovel modality for cancer treatment., *Cancer Lett* (115) : 25-30.

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 Proc Preserv* 20(5): 379 - 390.

Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions., *Carbohydrate Polymers* 46(1) : 39-47.

Chien, P., Chou, C. (2006). Antifungal activity of chitosan and its application to control postharvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan hayata*)., *Journal of the Science of Food and Agriculture*(86) : 1964–1969.

Crini, G., Badot, P.M., Guibal, E. (2009). Chitine et Chitosane. Du polymère à l'application: Presses universitaires de Franche-Comté.

Cuero, R. G. (1999). Antimicrobial action of exogenous chitosan., *EXS* (87) : 315-333.

Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S. (1995). Edible films and coating as active layers. Dans : *Active Food Packaging*. Rooney, M.L., Ed. Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, pp: 111 - 142.

-D-

Delavigne, N., Robillard, B. (2014). Les dérivées de chitine. Institut Œnologique de Champagne.

Références bibliographiques

De Moura, M. R., Aouada, F. A., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Krochta, J. M., Mattoso, L. H. C. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles., *J. Food Eng* 92(4):448-453.

Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004). New Preservation Technologies: Possibilities and Limitations., *Int. J. Dairy* (14) : 273-285.

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

Durand, P., Golinelli-Pimpaneau, B., Moulleron, S., Badet, B., Badet-Denisot, M. A. (2008). Highlights of glucosamine-6P synthase catalysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 302–317.

Du, Y. J., Zhao, Y. Q., Dai, S. C., Yang, B. (2009). Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity., *Innov. Food Sci. Emerg. Technol* 10(1):103-107.

-E-

Eaton, P., Fernandes, J.C., Pereira, E., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2008). Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*., *Ultramicroscopy*(108):1128–34

ECHALIER. G. (1968) - Biologie des métazoaires . Edition . Armand Colin, paris :11p

-F-

Falcia , L., Minervini, R., (1996). Les guides du naturaliste (WWF) .Guide de homards, crabes, langouste, crevette et autre Crustacés décapodes d'Europe .270p .

Références bibliographiques

Felt, O., Furrer, P., Mayer, J. M., Plazonnet, B., Buri, P., Gurny, R. (1999). Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention., *Int .J. Pharm* (180):185-193.

Ficher, W., Shneider, M., Bauchot, M. L., 1987-Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome in fiche F .A.O d'identification des espèces pour les besoins de pêche Mer Noir, zone de pêche 37.

Freepons, D. E. (1989) . Plant growth regulators derived from chitin. United States Patent. # 4, 812,159.

-H-

Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Versali, M.F. & Rinaudo, M. (2000). Solid State NMR for Detelmination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan., *Biomacromolecules* (1) : 746-751.

Holthius L. B., 1980 – *shrimp and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries.*F .A.O RIR /S 125 vol.1:271p

-I-

Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer. Professionnels de la mer · Rapport annuel 2011.

-J-

Jarroux, N. (2011). Les biopolymères : différentes familles, propriétés et applications. Techniques de l'ingénieur, Paris, Lavoisier., ED. AM 3580-1 à AM 3580-16.

Jaouen, D. (1994). Chitine, Chitosane et Dérivés. Université d'Angers, Angers (France).

Jeon, Y. J., Kamil, J., Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod., *J. Agr. Food Chem* (50) : 5167-5178.

Judith, D. V. & Voet, G. (2005). Livre de Biochimie.

Jumaa, M., Furkert, F.H. & Muller, B.W. (2002). A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (53) : 115-123.

Juneja, V. K., Thippareddi, H., Bari, L., Inatsu, H., Kawamoto, S. & Friedman, M. (2006)., *J. Food Sci* 71.M236.

JJaouen, D. (1994). Chitine, Chitosane et Dérivés. Université d'Angers, Angers (France).

-K-

Kasaai, M. R., Arul, J. & Charlet, C. (2000). Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan., *J. Polym. Sci. Pt B-Polym Phys* 38(19):2591-2598.

Kendra, D. F. & Hadwiger, L.A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solanj* and elicits pisatin formation in *pisum sativum.*, *Experimental mycology* (8) : 276-281.

Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. (1985). Comprehensive insect physiology. Biochemistry and Pharmacology, volume 3., Ed. Pergamon Press, pp : 78-85.

Kim, K.W. & Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. Food Chemistry. (101) 308-313.system., *Journal of Food Lipids* (9) : 57-64.

Klouj, A. (2012). Potentialités des emballages bioactifs pour assurer la sécurité des aliments. The promise of bioactive packaging to ensure food safety.

Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review., *International Journal of Food Microbiology* (144) : 51-63.

Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan : functional biopolymers from marine crustaceans., *Marine Biotechnology* (8) : 203-226.

Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications., *React. Funct. Polym* (46):1–27.

Ky , T., Guilbert, J. M, Didou – Manet, M., 2003 – Petite encyclopédie des fruits de mer, 8^{ème} édition. Ed. : la vague verte, Paris. 212.

-L-

Le Roux, K. (2012). Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé. École Doctorale : Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer.

Lemonde, M., Biasotto, F. & Serge, A. (2011). Biopolymères : Chitine et chitosane, un monde à part., *L'ordre des chimistes du Québec* 26 (3).

Li, J., Du, Y. M., Yang, J. H., Feng, T., Li, A. H. & Chen, P. (2005). Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme., *Polym. Degrad. Stabil*, 87(3):441-448.

-M-

Maghami, G. G., & Roberts, G. A. F. (1988). Evaluation of the viscometric constants for chitosan., *Die Makromolekulare Chemie*, 189 (1) : 195-200.

Mati-Baouche, N. (2012). 1^{ers} essais de caractérisation du chitosane comme matrice pour la conception de panneaux isolants. Projet DEMETHER.

Mekahlia, S. (2007). Le complexe chitosane-cuivre (II) : Synthèse, caractérisation et étude de l'effet de sa structure sur son activité antibactérienne.

Moorjani, M. N., Achutha, V. & Khasim, D. I. (1975). Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste., *J. Food Sci. Technol* (12) :187-189.

Muzzarelli, C., Muzzarelli, R. A. A. (2003). Chitin related food science today (and two centuries ago)., *Agro Food Ind Hi-Tech* 14(5):39-42.

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

- N -

No, H. K., Hur, E. Y. (1998). Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Préparation of Chitin., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (9) : 3844-3846.

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

N.Y. & Meyers, S. P. (2003). Comparison of physicochemical, binding, and antibacterial properties of chitosans prepared without and with deproteinization process., *J. Agric. Food Chem* 51(26):7659-7663.

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

No, H. K., Meyers, S. P. (1995). Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan., *Journal of Aquatic Food Product Technology* 4(2) : 27-52.

-O-

Qin, Y., Zhu, C., Chen, J., Chen, Y., Zhang, C. (2006). The absorption and release of silver and zinc ions by chitosan fibers., *J Appl Polym Sci* (101): 766-71.

Onishi, H., Machida, Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice, *Biomaterials* (20) : 175-182.

-P -

Pascal, G. (1979). Les antioxygènes alimentaires., *Cahier de Nutrition et de Diététique* (14) : 271-290.

Peh, K. S. H., Sodhi, N. S., De Jong, J., Sekercioglu, C. H., Yap, C. A. M., Lim, S. L. H. (2006) Conservation value of degraded habitats for forest birds in southern Peninsular Malaysia., *Diversity and Distributions* (12): 572-581.

PERNET-POIL-CHEVRIER, A. (2009). Nouvelle méthode de préparation de chitooligosaccharides possédant une structure et une architecture contrôlées. L'Université De Lyon.

PETIT H., 2004b . La métamorphose chez les crustacés, un événement spectaculaire . Bio future N°249 : 50 -52p .

P. Fernandes, J.C., Pereira, E., Pintado, M.E. , Malcata, F. X. (2008). Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*., *Ultramicroscopy* (108):1128–34.

Prabaharan, M., Mano, J. F. (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery*. (12) 41-57.

-R -

Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagge, G., Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action., *Biomacromolecules* (4) : 1457-1465.

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

Rao, M. S., Stevens, W. F. (2005). Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan., *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (80) : 1080-1087.

Références bibliographiques

Randriamahatody, Z. (2011). Valorisation biotechnologique des co-produits de crevette : utilisation de la protéolyse enzymatique pour des applications avicoles à Madagascar. Université d'Antananarivo.

Ratajska, M., Boryniec, S. (1998). Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers., *Reactive and fonctionnal polymers* (38): 35-49.

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

Rodríguez, M. S., Ramos, V., Agulló, E. (2003). Antimicrobial Action of Chitosan against Spoilage Organisms in Precooked Pizza., *J Food Sci* 68 (1):271-274.

Rinova, B. (1996). Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers., *Advanced drug delivery reviews* (21): 157-176.

-S-

Sagoo, S., Board, R., Roller, S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products., *Food Microbiol* (19) : 175-182.

Savard, T., Beaulieu, C., Coucher, I., Champagne, C.P. (2002). Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables., *J. Food. Protect* (65):828–833.

Schmidt-Nielson, K. 1998 – Physiologie animale Adaptation et milieu de vie. Ed. Dunod, Paris : 363

Sekiguchi, S., Miura, Y., Kaneko, H., Nishimura, S.L., Nishi, N., Iwase, M., Tokura, S. (1994). Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers. In *Food hydrocolloids: Structures, Properties and Functions*, K. Nishinari, & E. Doi., Ed. New York, Plenum Press, pp : 71-76.

Song, Y., Babiker, E.E., Usui, M., Saito, A., Kato, A. (2002). Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-Isozyme conjugates., *Food Research International* (35) : 459-466.

Références bibliographiques

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans., *Trends in Food science and Technology* (10) : 37-51.

Shi, C., Zhu Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., Cheng, T. (2006). Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine., *Journal of Surgical Research* (133) : 185-192.

Shigemasa, Y., Minami, S. (1996). Applications of chitin and chitosan for biomaterials., *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (17) : 413-420.

Stossel, P., Leuba, L. (1984). Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi., *Journal of Phytopathology - Phytopathologische Zeitschrift* (111) : 82-90.

Skaugrud, O., Sargent, G. (1990). Chitin and chitosan: crustacean biopolymers with potential. Paper presented at: International by-products conference (Anchorage, Alaska).

Sudharshan, N. R., Hoover, D. G., Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan., *Food Biotechnology* (6) : 257-272.

Suyatama, N. E. (2006). Développement de films biodégradable à base de chitosane : étude de mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la comptabilisation

-T-

Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties, *Polymer*. PISSN 0032-3861. (44): 7939–7952.

Tomihata, K., Ikada, Y. (1997). *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives., *Biomaterials*. (18) : 567-575.

Tayel, A.A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., Nickisch-Hartfiel, A. (2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan., *International Journal of Biological Macromolecules* (47) 10-14.

Références bibliographiques

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

-V-

Varum, K. M., Antohonsen, M. W., Grasdalen, H., Smidsrod, O. (1991). Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.L spectroscopy., *Carbohydrate Research* (211) : 17-23.

-W-

Wu, F. C., Tseng, R. L., Juang, R. S. (2010). A review and experimental verification of using chitosan and its derivatives as adsorbents for selected heavy metals ., *Journal of Environmental Management* (91) : 789-806.

-Y-

Yang, B.Y., Montgomery, R. (2000). Degree of acetylation of heteropolysaccharides., *Carbohydr. Res* (323) : 156-162.

Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wuolijoki, E., Ylitalo, P., Lehtimaki, T. (2002). Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan., *Arzneimittelforschung* 52(1):1-7.

Young, D. K., No, H. K., Kim, D. S., Prinyawiwatkul, W. (2007). Physical characteristics of decolorized chitosan as affected by sun drying during chitosan preparation., *Carbohydr Polymers* (69): 707-712.

-Z-

- Zakrzewska, A., Boorsma, Brul, S., Hellingwerf, K. J., Klis, F. M.** (2005). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan., *Eukaryot. Cell* (4): 703–15.
- Zivanovic, S., Basurto, C. C., Chi, S., Davidson, P.M., Weiss, J.** (2004). Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions., *J. Food. Prot* (67):952–959.
- Zheng, L.Y., Zhu, J.F.** (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydr Polymer* (54) : 527-530.

Annexe

Les milieux de culture utilisés :

Milieu de culture MRS Témoin (1000 ml)

- Peptone10g
- Extrait de viande10g
- Extrait de levure05g
- Glucose20 g
- Acétate de sodium05g
- Citrate d'ammonium..... 0,2 g
- Tween 80 1,08 ml
- hydrogénophosphate de potassium02 g
- sulfate de magnésium heptahydraté..... 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté..... 0,05 g
- Agar agar bactériologique.....15 g
- pH =6,8

Les milieux de culture modifiant utilisés pour 100ml

Milieux de culture MRSM1

- déchet de la crevette2,5 g
- Glucose2 g
- Acétate de sodium tri hydraté5 g
- Citrate d'ammonium..... 0,2 g
- Tween 80 0,108 ml
- hydrogénophosphate de potassium0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté..... 0,005 g
- Agar1,5 g
- pH =..... 6,8

Milieux de culture MRSM2

- chitine..... 2,5g
- Glucose..... 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté5 g
- Citrate d'ammonium..... 0,2 g
- Tween 80 0,108 ml
- hydrogénophosphate de potassium0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté..... 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté..... 0,005 g
- Agar agar bactériologique1,5 g
- pH =..... 6,8

Annexe

Milieux de culture MRSM3

- chitosane..... 2,5g
- Glucose..... 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté..... 5 g
- Citrate d'ammonium..... 0,2 g
- Tween 80 0,108 ml
- hydrogénophosphate de potassium0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté..... 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté..... 0,005 g
- Agar agar bactériologique..... 1,5 g
- pH =..... 6,8

Milieux de culture MRSM4

- hydrolysate Acide (Hcl) 2,5g
- Glucose..... 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté 5 g
- Citrate d'ammonium..... 0,2 g
- Tween 80 0,108 ml
- hydrogénophosphate de potassium..... 0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté0,005 g
- Agar agar bactériologique..... 1,5 g
- pH =6,8

Milieux de culture MRSM5

- hydrolysate Acide (Acide Acitique)..... 2,5g
- Glucose2 g
- Acétate de sodium tri hydraté..... 5 g
- Citrate d'ammonium..... 0,2 g
- Tween 80..... 0,108 ml
- hydrogénophosphate de potassium0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté..... 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté..... 0,005 g
- Agar agar bactériologique1,5 g
- pH =6,8

Milieux de culture MRSM6

- hydrolysate alcaline (NaOH) 2,5g
- Glucose..... 2 g
- Acétate de sodium tri hydraté5 g
- Citrate d'ammonium0,2 g
- Tween 80..... 0,108 ml
- hydrogénophosphate de potassium0,2 g
- sulfate de magnésium heptahydraté..... 0,02 g
- sulfate de manganèse tétra hydraté0,005 g
- Agar agar bactériologique..... 1,5 g
- pH =..... 6,8

Milieu de culture TGEA1

- déchet de la crevette..... 0,6 g
- extrait de viande..... 0,3g
- Glucose1g
- Agar agar bactériologique1g
- pH =..... 7

Milieu de culture TGEA2

- chitine..... 0,6g
- Extrait de viande0,3g
- Glucose..... 1g
- Agar agar bactériologique..... 1g
- pH =..... 7

Milieu de culture TGEA3

- chitosane..... 0,6g
- Extrait de viande..... 0,3g
- Glucose1g
- Agar agar bactériologique 1 g
- pH =..... 7

Annexe

Milieu de culture TGEA4

- hydrolysate Acide (H Cl)..... 0,9g
- Glucose 1g
- Agar agar bactériologique 1g
- pH =..... 7

Milieu de culture TGEA5

- hydrolysate Acide (Acide acétique)..... 0,9g
- Glucose 1g
- Agar agar bactériologique1g
- pH =..... 7

Milieu de culture TGEA6

- hydrolysate alcaline (NaOH)..... 0,9g
- Glucose 1g
- Agar agar bactériologique..... 1g
- pH =7

Milieu de culture OGA pour 1000ml

- Extrait de levure..... 5g
- Glucose20g
- Agar15g
- PH= 7

Milieu de culture PCA Pour 1000ml

- Tryptone..... 5g
- Extrait de levure2,5 g
- Glucose..... 1g
- Agar12g
- pH = 7