



DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET L'AQUACULTURE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Boualem Zohra et Hocine Ahlem

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN HYDROBIOLOGIE MARINE ET CONTINENTALE

Spécialité: Bioressource marine

THÈME

**Valorisation biotechnologique des coproduits de crevette rouge
Aristeus antennatus (Risso, 1816): Etude du pouvoir
antioxydant et antimicrobien du chitosane**

Soutenue publiquement le 17/09/2018

DEVANT LA COMMISSION DU JURY

Président : Mr. BOUZAZA.Z. MAA. Université Abdelhamid Ibn Bdis Mostaganem

Examineur: Mr. BELBACHIR MAA. Université Abdelhamid Ibn Bdis Mostaganem

Encadreur : Melle. OULHIZA.A MAA. Université Abdelhamid Ibn Bdis Mostaganem

A decorative border with intricate black and white floral and scrollwork patterns surrounds the text.

Remerciements

Il nous est agréable d'exprimer notre profonde gratitude, notre grand respect, et nos sincères remerciements à, Melle. OULHIZ.A maitre de conférence à l'université de MOSTAGANEM. Qu'elle puisse trouver ici l'expression de notre considération et le témoignage de notre profonde reconnaissance pour le temps, la patience qu'elle a mis à notre disposition tout le long de notre formation.

On remercie Mr. BELBACHIR et Mr. BOUZAZA.Z de l'université de MOSTAGANEM qui ont accepté de prendre part on ce jury à fin s'examiné notre travail.

Enfin un grand merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce mémoire surtout les techniciens du laboratoire de chimie et particulièrement Balkhalfa Mohamed, Souane Abd el kader et tout l'équipe et le personnel de l'université de Mostaganem.



❧ Dédicace ❧

Je dédie mon travail à :



❧ *Mes très chers parents, je vous dois tout, car vous avez sacrifié toute votre vie juste pour notre réussite, que Dieu vous bénisse, vous apporte santé et vous garde pour nous.*



❧ *Mes sœurs, mes frères en particulier « Mokhtar »*

❧ *A mes chers amis hanene - amine*



❧ *A Tous mes camarades de classe spécialité Bioressource marine*

❧ *A tous les étudiants de la faculté de Science et technologie*



❧ *A tous les enseignants de hydrobiologie marine et continentale*

❧ *Et a tous ceux qui sont présent dans mon cœur*



Ahlem



❧ *Dédicace* ❧

Je dédie ce modeste travail à :

Celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère rabi yrhmha.

A mon père qui a contribué de très près à mon éducation et à ma formation, à qui je dois tout. Que Dieu vous bénisse, vous apporte santé et vous garde pour nous.

Ma sœur «Soriya» à qui je souhaite autant de réussites.

A tous mes collègues «hanen –amin- mokhtar »et enseignants de la promotion du « master »

A tout mes amis surtout « yasmin- fatima-imen-rayhana» et enseignants de la promotion du « master »

Je ne saurai oublier les vrais (es) amis (es)

A mon binome « Hocine ahlem »

Enfin, A tous ceux et celles qui m'ont aimé et aider à élaborer cetravail par leur soutien moral, qu'ils (elles) soient assurés de mon Fidèle souvenir...

Zohra

Résumé

Le chitosane est préparé à partir de chitine, il est principalement composé de résidus de glucosamine et de N-acétylglucosamine avec une liaison 1,4- β . Il peut être obtenu par désacétylation de la chitine produite à partir carapaces de crustacés, d'insectes et d'autres sources. Le chitosane est un polymère naturel non toxique, biodégradable et biocompatible et peut être utilisé dans de nombreuses applications, comme la biomédecine, pharmaceutique, la cosmétique, etc.

Dans notre étude, nous intéressons au premier lieu à l'extraction de la chitine à partir de la tête et la carapace de la crevette rouge *Aristeus antennatus*, ainsi qu'à sa conversion en chitosane, par des différentes méthodes d'extraction. Les propriétés biochimiques ont été aussi calculés par de nombreuses analyses menant à une estimation de taux de 13.12% protéines, 9.2% lipide, 14.80% cendre et 9% humidité.

Nous avons étudié aussi le comportement antibactérien par le biais de deux méthodes : de diffusion en puits et par disques, Les résultats obtenus révèlent un effet antimicrobien important démontré par un diamètre d'inhibition au niveau de plusieurs souches bactériennes. Un ensemble de tests a été aussi élaborés dans le contexte de la détermination du pouvoir antioxydant du chitosane et les résultats obtenus ont prouvé l'efficacité du chitosane contre les germes pathogène.

Mot clé : Crevette rouge *Aristeus antennatus*, Chitine, Chitosane, extraction, pouvoir antimicrobien, antioxydant.

Abstract

Chitosan is prepared from chitin, it is primarily composed of glucosamine residues and N-acetylglucosamine with a 1,4- β bond. It can be obtained by deacetylation of chitin produced from shells of crustaceans, insects and other sources. Chitosan is a non-toxic, biodegradable and biocompatible natural polymer and can be used in many applications, such as biomedicine, pharmaceutical, cosmetics, etc.

In this study, we are interested primarily in the extraction of chitin from the head and shell of the red shrimp *Aristeus antennatus*, and its conversion to chitosan by different extraction methods. The biochemical properties were also calculated by numerous analyzes leading to an estimated rate of 13.12% protein, 9.2% lipid, 14.80% ash and 9% moisture.

We also studied the antibacterial behavior through two methods: well and disk diffusion. The results obtained reveal a significant antimicrobial effect demonstrated by a diameter of inhibition at the level of several bacterial strains. A set of tests was also developed in the context of the determination of the antioxidant power of chitosan and the results obtained proved the effectiveness of chitosan against pathogenic germs.

Keyword: Red shrimp *Aristeus antennatus* , Chitin, Chitosan, extraction, antimicrobial, antioxidant

يتم تحضير الكيتوزان من الكيتين ، ويتكون في المقام الأول من بقايا الجلوكوزامين و N-acetylglucosamine مع رابطة 1.4 β . ويمكن الحصول عليها عن طريق deacetylation من الكيتين المنتجة من القشريات والحشرات وغيرها من المصادر. الكيتوزان هو بوليمر طبيعي غير سام وقابل للتحلل ومتوافق حيويًا ويمكن استخدامه في العديد من المجالات ، مثل الطب الحيوي والمستحضرات الصيدلانية و التجميل و غيرها.

في هذه الدراسة ، نحن مهتمون في المقام الأول في استخلاص الكيتين من رأس الجمبري الأحمر *Aristeus antennatus* ، وتحويلها إلى الكيتوزان عن طرق الاستخلاص المختلفة. كما تم حساب الخصائص البيوكيميائية و التي قدرت كما يلي: 13.12% بروتين ، و 9.2% دهون ، و 14.80% رماد ، و 9% رطوبة.

درسنا أيضًا السلوك المضاد للبكتيريا من خلال طريقتين: انتشار البئر والأقراص ، وتكشف النتائج التي تم الحصول عليها عن تأثير مضاد للميكروبات ملحوظ بقطر تثبيط على مستوى العديد من السلالات البكتيرية. كما قمنا بمجموعة من الاختبارات في سياق تحديد قوة مضادات الأكسدة في الكيتوزان ، كما أثبتت النتائج التي تم الحصول عليها فعالية الكيتوزان ضد الجراثيم المسببة للأمراض.

الكلمات المفتاحية : الجمبري *Aristeus antennatus* الأحمر، كيتين، كيتزان، استخلاص، مضاد البكتيريا،

مضاد الأكسدة.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralité sur la crevette rouge.....	3
1.1. Aperçu sur les crustacés	3
1.2. Présentation de l'espèce	3
1.2.1. Taxonomie et position systématique	4
1.3. Biologie de l'espèce	5
1.3.1. Reproduction	5
1.3.2. Respiration	6
1.3.3. Excrétion	6
1.3.4. Digestion	6
1.3.5. System nerveux	7
1.4. La métamorphose	7
1.5. Régime alimentaire	8
1.6. Habitat et réparation générale	8
2. La chitine et le chitosane.....	9
2.1. Présentation des coproduits.....	9
2.2. La chitine.....	10
2.2.1. Source de la chitine	11
2.2.2. Production de la chitine.....	12
2.2.3. Les propriétés de la chitine	12
2.2.4. Extractions de la chitine	13
2.2.4.1. Le traitement chimique	13
2.2.4.1.1. La déminéralisation	13
2.2.4.1.2. Déprotéination	14
2.2.4.1.3. Décoloration	14
2.2.4.2. Traitement biologique.....	14
2.3. Le chitosane	15
2.3.1. Production de chitosane à partir de la chitine (Processus de désacétylation)	16
2.3.2. Propriété physico- chimiques du chitosane.....	16

2.3.2.1.	Degré d'acétylation (DA)	16
2.3.2.2.	Viscosité.....	17
2.3.2.3.	Solubilité du chitosane.....	17
2.3.3.	Propriétés biologiques du chitosane.....	18
2.3.3.1.	Biodégradabilité.....	18
2.3.3.2.	Biocompatibilité.....	18
2.3.4.	Activité antimicrobienne du chitosane.....	18
2.3.5.	Activité antioxydant du chitosane.....	20
2.4.	Les applications du chitosane.....	20
2.4.1.	Domaine agricole.....	21
2.4.2.	Domaine cosmétique.....	21
2.4.3.	Les applications alimentaires.....	21
2.4.4.	Domaines biomédical et pharmaceutique.....	22
2.4.5.	Traitement des eaux.....	22

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

1.	Collecte des carapaces de crevette	23
2.	Prétraitement des coproduits de la crevette rouge.....	23
3.	Les analyses physico-chimiques.....	23
3.1.	Dosage de la teneur en eau.....	23
3.2.	Dosage de la teneur en protéines totales.....	24
3.3.	Analyse des lipides par la méthode de Soxhlet.....	25
3.4.	Dosage de la teneur en cendres.....	26
4.	Extraction de la chitine.....	26
4.1.	Extraction de la chitine par déprotéinisation chimique.....	26
4.1.1.	Déminéralisation.....	27
4.1.2.	Déprotéinisation.....	27
4.1.3.	Décoloration.....	28
4.2.	Extraction de la chitine par déprotéinisation enzymatique.....	28
4.2.1.	L'hydrolyse pepsiques.....	29
4.2.2.	Traitement des hydrolysats :.....	30
4.3.	L'extraction du chitosane.....	30
5.	Degré d'acétylation(DA) de chitosane :.....	32
5.1.	Solubilisation du chitosane :.....	32

6.	Pouvoir antibactérien du chitosane :	34
6.1.	Les souches pathogènes utilisées	34
6.1.1	Le renouvellement et l'enrichissement des souches pathogènes	34
6.2.	Méthode de diffusion en puits AWDT	34
6.3.	Diffusion sur agar semi-solide par méthode des disques	37
6.4.	Activités antifongiques du chitosane	38
7.	Activité antioxydant du chitosane	39
7.1.	Capacité de piégeage du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) radicaux	39
7.2.	Activité antioxydante totale	39

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

1.	Analyse des coproduits de la crevette	40
1.1.	Caractérisation de la chitine et de chitosane extraits.....	41
1.2.	Caractéristique biochimique de la chitine et du chitosane	43
2.	Pouvoir antibactérien du chitosane	44
2.1.	Diffusion sur agar semi-solide par méthode des puits AWDT	44
2.2.	Diffusion sur agar- semi-solide par la méthode des disques.....	47
3.	Activité antioxydant du chitosane	51
3.1.	Activité antioxydant totale	51
3.2.	Activité antioxydant (DPPH) du chitosane	52
CONCLUSION GENERALE		41

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

Liste des tableaux

Tableau 1 : variabilité de la teneur de la chitine chez quelques organismes (Tayel et al., 2010)	12
Tableau 2: Composition biochimique des coproduits de la crevette rouge <i>A.antennatus</i>	40
Tableau 3: Rendement massique de la chitine et du chitosane exprimé en (%) d'après les deux méthodes d'extraction	42
Tableau 4 : variabilité de la teneur en chitine et en chitosane contenu dans les coproduits de la crevette rouge.	43
Tableau 5 : Le pouvoir antimicrobien du chitosane chimique et enzymatique contre des souches pathogènes et leur diamètre d'inhibition en millimètre.	45
Tableau 6 : Le pouvoir antibactérien du chitosane chimique et enzymatique contre des souches pathogènes testé sur des milieux LB et MH et leur diamètre d'inhibition (en mm).	48

Liste des figures

Figure 1 : (A) Aspect général d' <i>Aristeus antennatus</i> (Risso, 1816) et (B) son anatomie externe.	4
Figure 2: Cycle biologique des crevettes rouge (Rafalimanana, 2003).	6
Figure 3: anatomie interne d'une crevette.	7
Figure 4 : répartition géographique d' <i>Aristeus antennatus</i> (Risso, 1816)	9
Figure 5 : Structure chimique de la chitine (Le Roux, 2012).....	11
Figure 6 : la structure chimique du chitosane (Le Roux, 2012).....	15
Figure 7: un échantillon de crevette rouge <i>Aristeus antennatus</i>	23
Figure 8 : Déminéralisation de l'échantillon	27
Figure9: Déprotéinisation de l'échantillon déminéralisé.....	28
Figure 10 : montage de l'appareil pour hydrolyse enzymatique des coproduits de la crevette	29
Figure 11 : Méthode d'extraction de chitosane.	30
Figure 12: Les étapes d'hydrolyse chimique et enzymatique	31
Figure 13 : La solubilisation du chitosane dans l'acide acétique 1 % à température ambiante, sous agitation constante. Chitosane obtenu par déprotéinisation chimique de la chitine (01), chitosane obtenu par déprotéinisation enzymatique de la chitine (2).....	33
Figure 14 : mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en puits	36
Figure 15 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques	38
Figure 16 : Aspect général de chaque chitine et chitosane obtenu. (A) et (C) extraction chimique (chitine et chitosane, respectivement), (B) et (D) extraction enzymatique (chitine et chitosane, respectivement).	42
Figure 17 : Pouvoir antibactérien du chitosane (diamètre d'inhibition) contre les souches pathogènes par laméthode des puits.	46
Figure 18 : pouvoir antifongique du chitosane (diamètre d'inhibition) contre les souches pathogènes.....	47
Figure 19 : Pouvoir antibactérien du chitosane (diamètre d'inhibition) contre les souches pathogènes testé sur les milieux MH et LB.....	49
Figure 20 : un exemple de photos du pouvoir antibactérien du chitosane par la méthode des disques. 1 : <i>Pseudomonas sp</i> (G-), 2 : <i>staphylococcus aureus</i> (G+), 3 : <i>Escherichia coli</i> (G-), 4 : <i>Bacillus cereus</i> (G+).....	50

Liste des figures

- Figure 21 : la croissance de l'activité antioxydant totale du chitosane (chimique et enzymatique) comparé au contrôle (acide ascorbique) en fonction des concentrations. . 51
- Figure 22 : Capacité d'élimination des radicaux DPPH par la solution du chitosane. (chitosane chimique(C.Chim), chitosane enzymatique(C.Enz),acide ascorbique(A.Asc). 52

Liste des Abréviations

AWDT : Agar Well Diffusion Test.

BHI : Brain Heart Infusion.

C° : Degré(s) Celsius.

DA : Degré d'acétylation.

DD : Degré de désacétylation

DO : Densité Optique

F.A.O. : Food and Agriculture Organisation (Organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

H : Heure.

HCl : Chlorure d'hydrogène.

H₂SO₄ : Acide Sulfurique.

LB: milieu Luria-Bertani

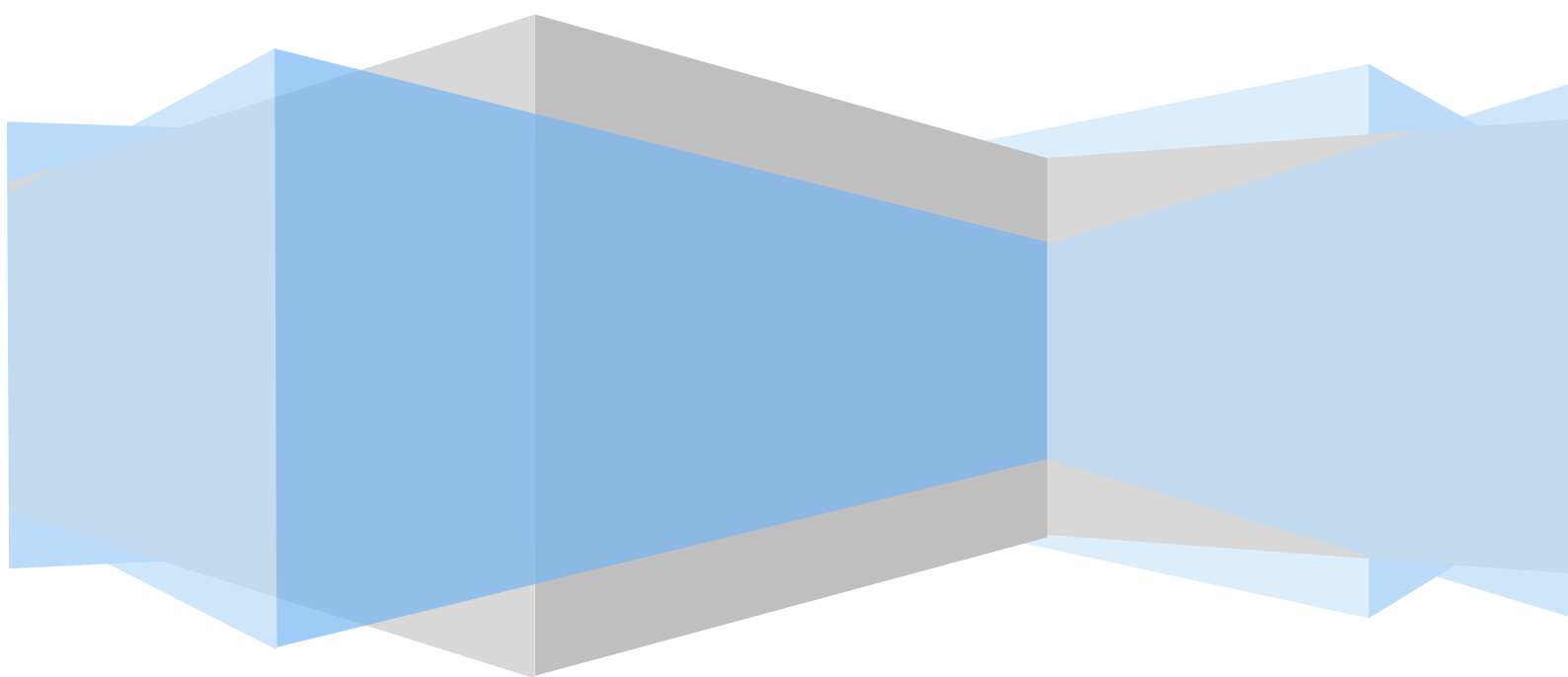
MH : Mueller Hinton

NH₃ : Ammoniac.

pH : Potentiel hydrogène

V : Volume.

Introduction générale



INTRODUCTION GENERALE

La crevette constitue le produit le plus valorisé sur le marché mondial (FAO, 2009). Destinée en sa totalité à l'alimentation humaine, la partie comestible représente près de 60% du poids de la crevette entière. La production de cette dernière augmente chaque année et les échanges internationaux sur ce produit de la mer sont les plus importants en valeur.

Les déchets des crevettes renferment plusieurs substances méritant d'être valorisées : On peut citer entre autres protéines, lipides, chitine et des éléments minéraux... (Heu *et al.*, 2003). La valorisation des coproduits permettrait, en plus du respect de l'environnement, elle consiste à les transformer de façon à ce qu'ils deviennent des matières premières ou des matières intermédiaires pour la production des autres produits.

Les principaux produits à haute valeur ajoutée pouvant être engendrés par les coproduits de crevette, on retrouve deux produits la chitine et le chitosane. La chitine est le principal produit dérivé de ces coproduits. Elle est en effet un constituant majoritaire des carapaces du crustacé (17 à 33%). La chitine commerciale et le chitosane sont extraits des coquilles de crustacés comme les crevettes, par traitement chimique et biologique. En raison de la nature origine de ressources renouvelables et exploitables, abondance, biocompatibilité, biodégradabilité et non-toxicité, ces polymères, sont en effet des substances uniques présentant un grand intérêt et un rôle important pour l'homme. Compte tenu de la nature des substances qu'ils renferment, ils peuvent être utilisés pour la nutrition humaine et animale, la nutraceutique et la pharmaceutique, la cosmétique... (Drevinskas *et al.*, 2017; Li, Wu, & Zhao.,2016; Tan, Li, Dong, Wei et Guo., 2016).

Les objectifs de notre travail et des nombreux tests expérimentaux, réalisés au laboratoire, rentrent dans le cadre de la valorisation des coproduits de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (Risso, 1816), en exposant les différentes méthodes d'extraction de la chitine et du chitosane et de déterminer les propriétés biochimique des coproduits de la crevette rouge, de la chitine ainsi que le chitosane. pour ensuite étudier l'activité antioxydante et antibactérienne du chitosane contre des germes pathogènes.

Introduction générale

Se présente rapport se divise en trois chapitre :

Chapitre I : Revue bibliographie

Le premier volet de ce premier chapitre est consacré à donner un aperçu générale sur l'espèce étudiée : la crevette *d'Aristeus antennatus* (RISSO, 1816). Le deuxième volet se veut à une présentation générale de la chitine et le chitosane.

Chapitre II : matériels et méthodes

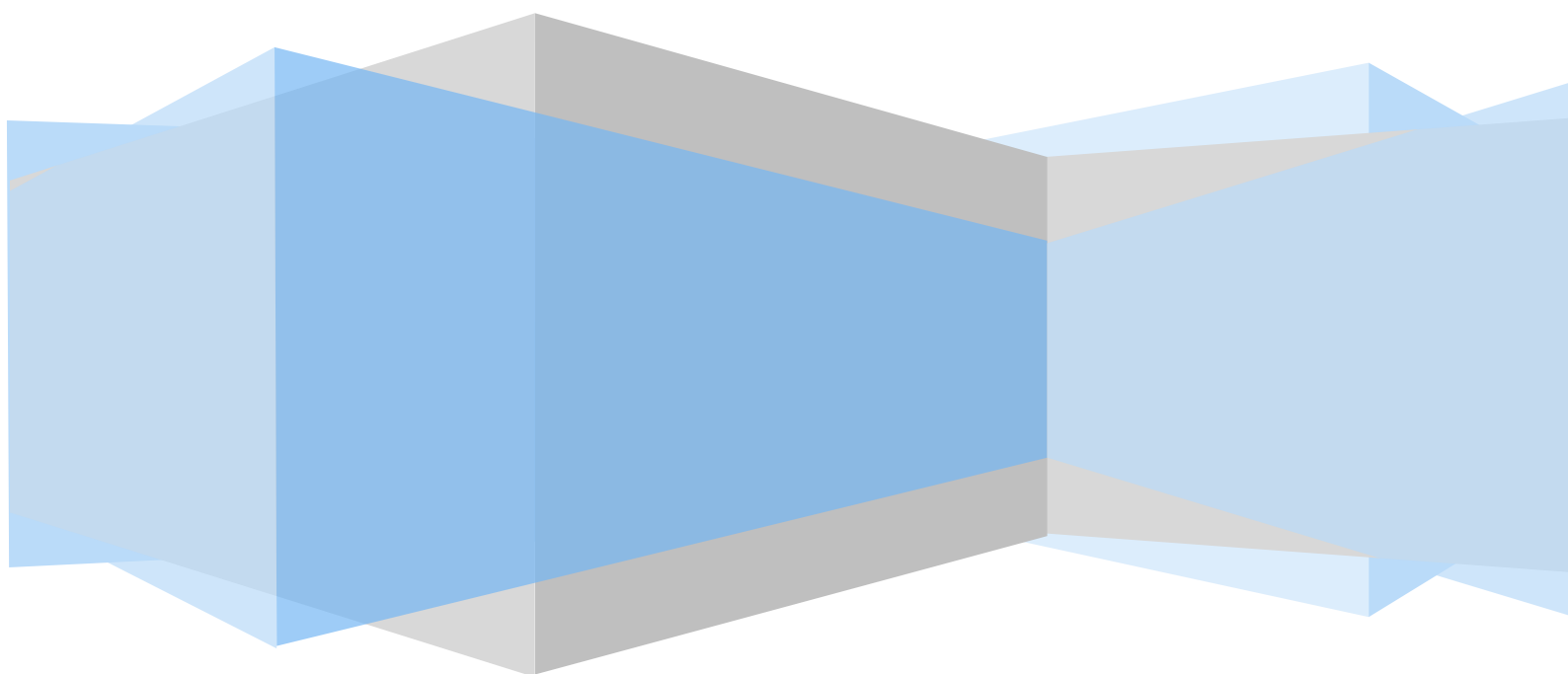
Le deuxième chapitre représente la méthodologie utilisée à extraire la chitine par deux méthode différentes, l'une est purement chimique, l'autre est plus douce en utilisant de l'enzyme.

Chapitre III : résultats, discussion et conclusion générale

Dans le troisième chapitre nous présentons les résultats obtenus des analyses biochimiques de la matière première et de ces dérivés (chitine et chitosane). Pour ensuite, étudier quelque propriété du chitosane obtenu en particulier le pouvoir antibactérien et antioxydant).

Chapitre I

Etude Bibliographique



1. Généralité sur la crevette rouge

1.1. Aperçu sur les crustacés

Les crustacés constituent l'une des classes de l'embranchement des arthropodes, celle-ci regroupant les animaux au corps segmenté. Les 45 000 espèces qui composent la classe présentent une grande diversité de formes et de modes de vies : on trouve des espèces marines, des espèces d'eau douce et des espèces terrestres. Elles sont libres et mobiles (comme le Tourteau) ou bien fixées sur un support inerte ou vivant (comme le Pouce-pied, la balane). Certains Crustacés sont parasites ou commensales d'autres animaux. (Kherraz , 2006).

Le corps des crustacés, bien qu'il ait subi différentes réductions et fusions, est essentiellement composé d'une tête avec cinq paires d'appendices et d'un tronc avec de nombreux segments. Chaque segment est relié aux autres par des membranes. Ces organismes se distinguent des autres classes par la présence de deux paires d'antennes par de nombreux appendices et par des branchies, pour extraire l'oxygène de l'eau indispensable à leur respiration. (Grimes *et al.*, 2004).

1.2. Présentation de l'espèce

La crevette rouge *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) vit sur des fonds de vase très peu sableuse aux profondeurs de 400 à 600 mètres (Nouar, 2003). Cette espèce par sa qualité et son abondance ainsi que par sa grande valeur économique se trouve très recherchée sur les côtes algériennes. La crevette rouge *A. antennatus* 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, son corps divisé en segments articulés, et une présence d'appendices articulés : les antennes, les antennules, les mandibules (mâchoire antérieure), les maxilles (mâchoires postérieures), les maxillipèdes (patte mâchoires), les préiopodes, les ptéropodes et l'uropode. (Kherraz, 2006).

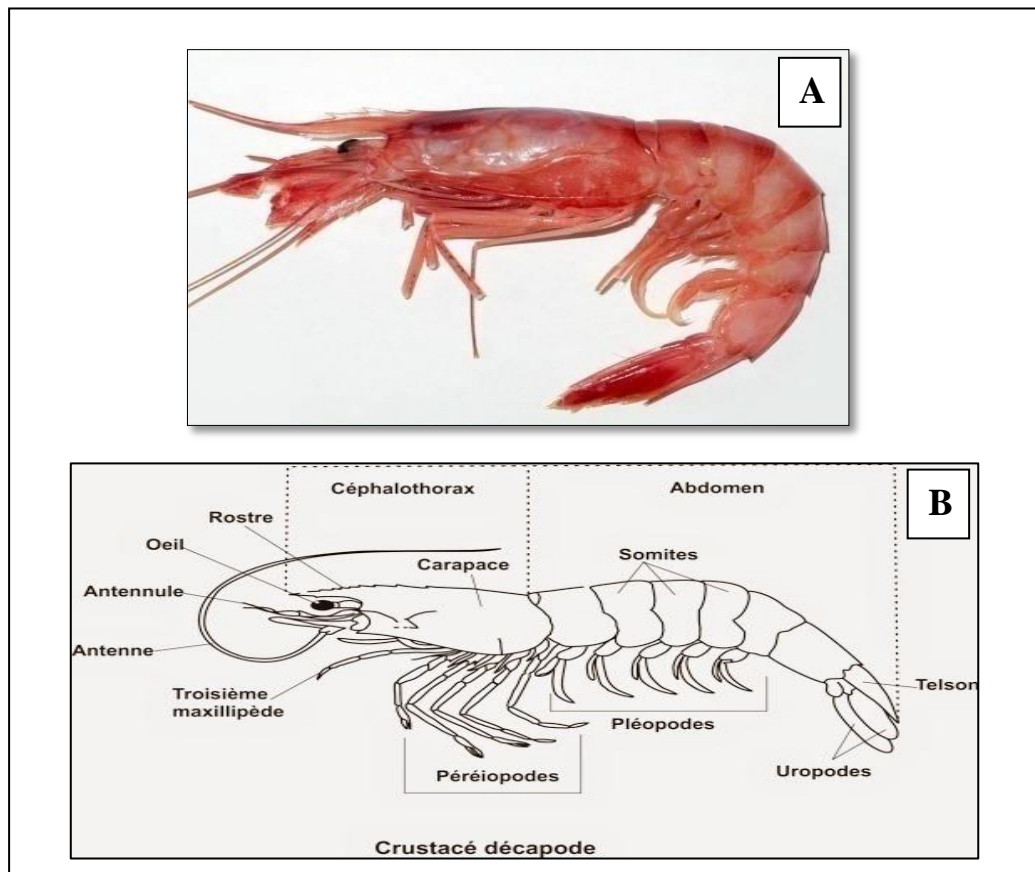


Figure 1 : (A) Aspect général d'*Aristeus antennatus* (Risso, 1816) et (B) son anatomie externe.

1.2.1. Taxonomie et position systématique

Aristeus Antennatus fut décrite pour la premier fois par (Risson, 1816), et nommée *Pneusantennatus* comprise dans la famille des penaude (Rafinesque, 1815), et tien actuellement la position taxinomique décrite ci-dessous proposée par (Bowman et Abeleen., 1982).

Embranchement : Arthropodes

Sous-embranchement : Crustacés

Classe : Malacostracés

Ordre : Décapodes (Latreille, 1806)

Famille: Aristaeidés (Wood-Mason, 1891)

Genre : *Aristeus* (Duvernoy, 1840)

Espèce : *Aristeus antennatus* (Risso, 1816)

1.3. Biologie de l'espèce

1.3.1. Reproduction

Les sexes sont séparés et les glandes génitales, situées au-dessus de l'intestin, forment de longs cordons recourbés latéralement en rosse et unis au niveau du cœur par une bandelette transversal d'où partent les canaux évacuateurs des produits génitaux : les spermmiductes chez les mâles et les oviductes chez les femelles. 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).

Le male va déposer, à l'aide de ses pattes, les spermatophores (sortes de petits sacs contenant les spermatozoïdes), dans l'orifice génital de la femelle (thelycium, le réceptacle séminal). Lors de la ponte, les œufs sont fécondés au contact du sperme. La figure 2, présente un schéma descriptif du cycle de vie d'une crevette. A l'éclosion des œufs, les larves (Nauplius) libérées dans le milieu mènent une vie pélagique. Elles peuvent être libres et planctonique dès ce stade (famille des pénéides). Au cours de leur vie larvaire, les larves subissent une succession de mues qui les amènent progressivement, après métamorphose, à leur forme définitive. La larve du stade Nauplius vit sur les réserves vitellines de l'œuf et sa taille est de l'ordre de 200 microns. Au stade zoé, La larve est capable de s'alimenter, les zoés se nourrissent de phytoplancton. La nage est régulière mais toujours près de la surface.

Les larves Mysis deviennent progressivement carnivores. Elles se tiennent la tête vers le bas et se déplacent par des mouvements brusques. Le stade poste-larvaire : à la suite d'une métamorphose, le dernier stade Mysis donne naissance à une jeune crevette. Se déplaçant tout d'abord en pleine eau, les post-larves vont, peu plonger vers les profondeurs marines et devenir benthiques (Kherraz, 2006).

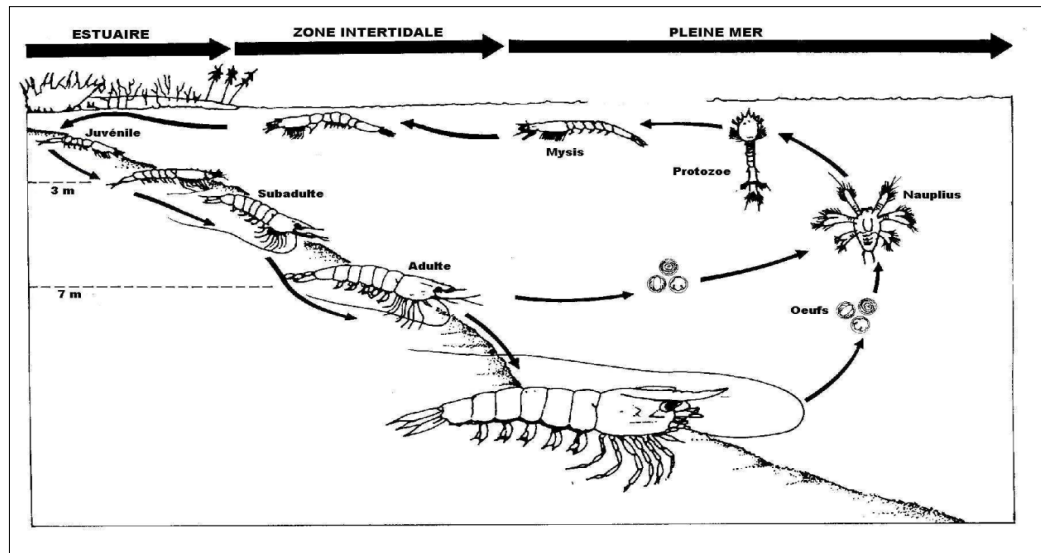


Figure 2: Cycle biologique des crevettes rouge (Rafalimanana, 2003).

1.3.2. Respiration

L'appareil respiratoire est constitué de lamelles ou de filaments branchiaux enfermés dans une cavité branchiale (en position ventru- latérale dans céphalothorax). La circulation de l'eau est assurée par les battements du scaphognathite de la maxille. Les branchies sont en relation avec l'appareil circulatoire pour réaliser les échanges gazeux (Schmid-Nielson, 1998).

1.3.3. Excrétion

Cet appareil est constitué par une partie de glande 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 (Sch-Nielson, 1998).

1.3.4. Digestion

La crevette rouge possède un estomac plus ou moins complexe : le moulin gastrique, qui est souvent subdivisé en deux parties appelées estomac pylorique. Il est prolongé par l'intestin moyen et accompagné d'un important hépatopancréas.

La digestion est extra cellulaire, mais les processus chimiques chimique ont surtout lieu dans l'intestin moyen, siège de l'absorption, et dans les diverticules hepatopancréatiques (Houseman, 2000).

1.3.5. System nerveux

Le system nerveux est de type annélide, c'est -à dire qu'il comporte un centre nerveux acromial au niveau de Céphalon, parfois appelé archicérébron, suivi de deux centres nerveux par métamère. La masse nerveuse acroniale est située dorsalement, en position supra œsophagie. En raison de sa position dans la cavité générale, la channe nerveuse est dite ventrale ou sous-intestinal.

Du point de vue histologique, le system nerveux présente des neurones, cellules nerveuses par excellence, formés de périacaryones (les centres nerveux) et de prolongements cellulaires qui sont : soit un axone (unique et peu ramifié), soit des dendrites (nombreuses et très ramifiées) (Houseman, 2000).

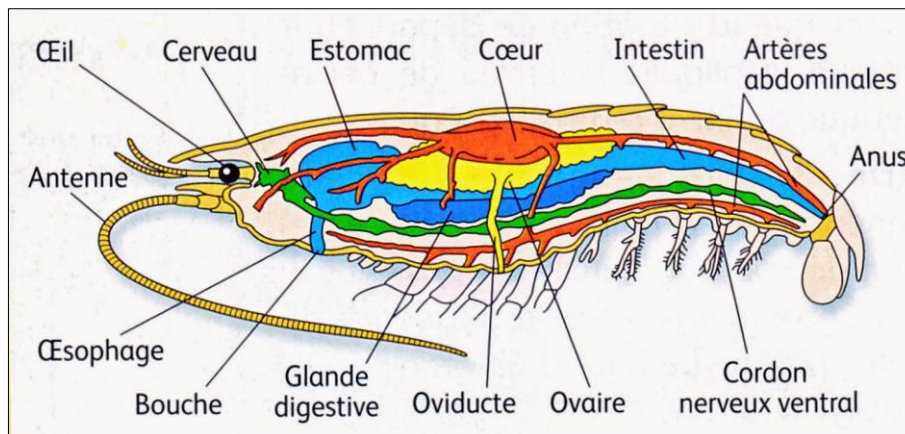


Figure 3: anatomie interne d'une crevette.

1.4. La métamorphose

Au cours de sa croissance, la crevette se retrouve à l'étroit dans cette carapace qui ne grandit pas avec elle. Elle l'abandonne, et cette carapace devient une exuvie ; c'est le phénomène de la mue. En absorbant le carbonate de calcium (CaCO_3) contenu dans l'eau, mais aussi dans une moindre mesure à partir du calcium des gastrolâtres contenus dans

l'estomac, les crustacés fabriquent leur nouvelle carapaces. La croissance est donc discontinue, par paliers, on note une brusque augmentation du poids et de la longueur, ce qui correspond à un ralentissement de croissance (Kherraz, 2006).

1.5. Régime alimentaire

Les larves se nourrissent d'organisme planctonique par la filtration de l'eau. De caractère généralement benthique, cette espèce est détritice, sa nourriture est principalement constituée de petits invertébrés (crustacés, polychètes), d'algues Mais aussi déchets animaux, pour la plupart elles sont capables de supporter des Jeunes prolongés.

Toutes les espèces de crevettes semblent subir un fort prédateur, exercé par un grand nombre d'animaux marins, essentiellement la rousset (*Scyliorhinus canicula*), les raies (*Dasyatis centroura* et *Dasyatis patinaca*), et le merlu. Cette crevette se trouve donc à l'échelon secondaire ou tertiaire de la pyramide trophique (Schmid-Nielson, 1998).

1.6. Habitat et répartition générale

La répartition géographique de cette espèce, comprend tout le bassin méditerranéen et les côtes atlantiques (Fig 4). Elle fréquente les fonds de vase, de sables exploités essentiellement par les chalutiers (Grimes *et al.*, 2004).

L'espèce *Aristeus antennatus* est une espèce démersale, qui vit sur des fonds de vase très peu sableux à *Isidella elongata* et *Funiculina quadrangularis* au-dessus de fonds vaseux de 80 à 1440 m ; plus commune entre 200 et 250m. Elle effectue d'importants déplacements (migration nyctémérale) passant de 80-650 m la nuit à 260-820 m le jour.

En Algérie, *A. antennatus* évolue au niveau du bord supérieur du plateau continental et du talus à partir de 100 mètre de profondeur. Elle est fréquente et abondante entre 400 et 600 mètre de jour et 200 à 300 mètre de nuit (GRIMES *et al.*, 2004).



Figure 4 : répartition géographique d'*Aristeus antennatus* (Risso, 1816)

2. La chitine et le chitosane

2.1. Présentation des coproduits

Les coproduits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. Ils sont issus de la transformation des crevettes pour la consommation humaine et sont constitués des têtes, des carapaces et des queues. Les coproduits 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.

Pour les coproduits de crevette, les autolysats sont également aptes pour l'utilisation en alimentation humaine et animale (Bueno-Solano *et al.*, 2009). Ainsi, les sauces produites par autolyse présentent une qualité élevée avec 35% d'acides aminés de plus que les sauces de poissons commerciales (Kim *et al.*, 2003). L'autolysat de têtes de crevette, de fait de sa teneur élevée en protéines et en acides aminés libres, peut être utilisé comme additif dans les aliments pour améliorer leur valeur nutritionnelle (Cao *et al.*, 2008 ; Cao *et al.*, 2009). Des études ont montré également des fonctions antioxydants d'autolysats de coproduits de crevette (Peralta *et al.*, 2008) et leur capacité à améliorer la tendreté de la viande (Kim *et al.*,

2005). En alimentation animale, la pâte de crevette fermentée est utilisée comme complément protéique pour l'alimentation animale (Johnson, 2002).

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, ...etc. A partir d'un même type de coproduit, il est possible d'obtenir différents produits dérivés : farine, huile, hydrolysats...etc (Dumay, 2006).

Les principaux produits à haute valeur ajoutée pouvant être engendrés par les coproduits de crevette, on retrouve deux produits la chitine et le chitosane.

2.2. La chitine

La chitine est un matériau résistant et souple (ou dur lorsqu'elle est associée à du carbonate de calcium). Elle est synthétisée par des glandes spéciales (glandes à chitines) de nombreuses espèces animales ou fongiques. Elle joue un rôle structural essentiel chez plusieurs taxons d'eucaryotes, notamment les champignons macroscopiques et levures², chez les mycorhizes³ et les lichens⁴ et chez les arthropodes.

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

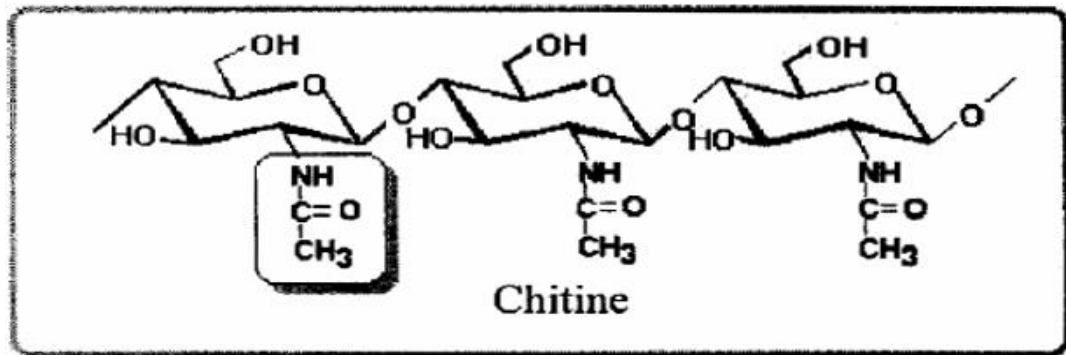


Figure 5 : Structure chimique de la chitine (Le Roux, 2012)

2.2.1. Source de la chitine

La chitine est le deuxième composant très abondant dans la nature après la cellulose, elle n'existe que sous la forme de complexe avec des protéines et des minéraux. Ce biopolymère est présente principalement dans l'exosquelette des arthropodes (crustacés), l'endosquelette des céphalopodes (calamars) et les cuticules des insectes. La chitine se trouve, aussi, dans la paroi de la plupart des champignons et de 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.

Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses, elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevettes. Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas récupérés et étaient simplement rejetés à la mer après décorticage.

La production de chitine permet de valoriser les déchets de l'industrie agroalimentaire en évitant qu'ils soient rejetés à la mer. Ce qui engendre des problèmes de pollution car les carcasses de crustacés contiennent environ 30-40% de protéine, 30-50% de carbonate de calcium, et 20-30% de chitine par rapport au poids sec. Selon (Durand, 2010), la chitine provient principalement de la carapace de la crevette, dont la composition en masse moyenne est la suivante :

- 75 d'eau
- 12 de protéine
- 09 de sels minéraux

- 04 de chitine
- Traces de lipides et de pigments organiques

Tableau 1 : variabilité de la teneur de la chitine chez quelques organismes (Tayel *et al.*, 2010)

Source	Chitine (%)	Source	Chitine (%)
Arthropodes	2 à 72	Crabes Chinoecetes	26,6
Mollusques	6 à 40	Crevettes Pandallus borealis	17,0
Ponophores	33	Crevettes Cangron cangron	33
Cnidaires (capsules oeufs)	3 à 30	Crevettes Penaeus monodon	3 à 30
Annélides	0,2 à 38	Ecrevisses	0,2 à 38

2.2.2. Production de la chitine

La grande disponibilité des carapaces de crevettes et leur teneur élevée en chitine en font la source principale de ce produit. L'extraction de la chitine de la carapace nécessite au moins deux étapes distinctes lorsque l'on procède par méthode chimique : la déminéralisation en milieu acide et la déprotéination en milieu basique. (Percot *et al.*, 2002).

Une deuxième méthode enzymatique qui a deux étapes, déminéralisation, pour éliminer les minéraux et déprotéinisation aussi pour l'élimination des protéines.

2.2.3. Les propriétés de la chitine

Parmi les dérivés de la chitine, on retrouve principalement le chitosane, la forme d'acétylation de la chitine, qui a attiré l'attention de plusieurs chercheurs et industriels depuis une trentaine d'année à cause de ses propriétés physicochimiques et biologique (Muzzarelli, 1977 ; Mathur and narang., 1990 ; li *et al.*, 1992 ; Percot *et al.*, 2003 ; Kurita *et al.*, 2005).La

chitine est fortement hydrophobe et insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organique (mario *et al.*, 2007). C'est un polysaccharide azoté, basique cationique, de couleur blanchâtre et non toxique (Majeti *et al.*, 2000 ; Morimoto *et al.*, 2002 ; Mrunal, 2004). Elle est caractérisée par le degré de N-acétylation ; le degré de substitution, le poids moléculaire et la solubilité (Majeti *et al.*, 2000 ; Kitture, 2002).

2.2.4. Extractions de la chitine

2.2.4.1. Le traitement chimique

La production typique du chitine à partir des carapaces des crustacés est composée est composée généralement de quatre étapes de base : la déminéralisation, la déprotéinisation, la décoloration et la désacétylation (No et Mayers., 1995).

2.2.4.1.1. La déminéralisation

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



La plupart des autres minéraux présents réagissent de façon similaire et donnent des sels solubles en présence d'acide. Les sels formés peuvent être séparés de la chitine par simple filtration suivie de lavage. Une grande quantité de mousse est produite durant la déminéralisation résultant du dégagement du gaz carbonique. La vitesse d'expansion de la mousse produite dépend de la vitesse de la réaction de déminéralisation et peut conduire au débordement du milieu réactionnel. L'ajout d'un agent anti-moussant permet une libération plus constante du gaz limitant le risque de débordement de la solution (No et Hur., 1998).

2.2.4.1.2. Déprotéination

La déprotéination de la chitine consiste à solubiliser les protéines présentes dans la matrice de chitine dans une solution aqueuse. Elle peut être effectuée de façon douce ou sévère. Les méthodes douces utilisent des enzymes qui dégradent les protéines en peptides solubles dans l'eau. Ces méthodes sont peu coûteuses, mais ne permettent pas l'élimination complète des protéines. L'emploi de soude à température élevée est généralement utilisé pour solubiliser une plus grande partie des protéines. Plusieurs études font état de divers protocoles afin d'optimiser le processus (Percot *et al.*, 2002 ; Synowiecki *et al.* Khateeb, 2003). Mais aucun procédé n'est parvenu à éliminer entièrement les protéines dans une période inférieure à six heures. Dans les meilleurs cas, il reste toujours quelques résidus protéiques attachés à la chitine. Il semble que les liens entre les protéines et la chitine diffèrent d'une espèce à l'autre et que le traitement doit varier. Dans ces tests d'optimisation, seuls le temps, la température, la concentration de base et le ratio soluté : solvant de chitine sont étudiés. L'ajout de co-solutés facilitant la solubilisation des protéines, tels certains sels chaotropiques, n'est mentionné dans aucun ouvrage.

2.2.4.1.3. Décoloration

Pour les applications industrielles, la chitine obtenue à partir des ressources crustacées doit être décolorée après le traitement acide et alcalin (No *et al.*, 1989). Le pigment dans les carapaces de crustacés forme un complexe avec la chitine. Il peut être par des réactifs tels que l'éthanol ; l'éther (Young *et al.* 2007), solution d'hypochlorite de sodium NaO Cl (Suyatama, 2006), peroxyde d'hydrogène H₂O₂. (Brine et Austin., 1981 ; Moorjani *et al.*, 1975).

2.2.4.2. Traitement biologique

À l'inverse, un processus 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, présente dans les coproduits de

crustacé. Il s'agit notamment des peptides et des pigments. Par ces voies, les taux de protéine 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).

Visuellement, l'aspect général du produit constitue également un critère d'appréciation. Le produit obtenu par hydrolyse enzymatique est plus rosé que celui obtenu par voie chimique.

2.3. Le chitosane

Chitosane est un copolymère linéaire β (1-4) de N-acétyl D-glucosamine et de D-glucosamine (klouj, 2012 ; Felt *et al.*, 1999 ; No *et al.*, 2003) (Fig 6), 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). Donc la nature chimique du chitosane fournit beaucoup de possibilités alternatives pour des modifications covalentes et ioniques qui permettent l'élargissement des propriétés mécaniques et biologiques.

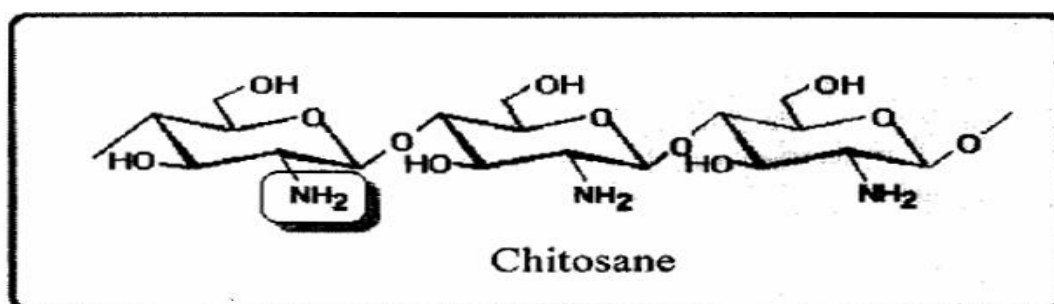


Figure 6 : la structure chimique du chitosane (le Roux, 2012)

Le chitosane est une macromolécule pressante sur la carapace des crustacés et des crabes ainsi que sur certains champignons. Le chitosane est utilisé pour régénérer les tissus, particulièrement les tissus osseux.

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

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine (No et Meyers, 1995). La désacétylation est la réaction de transformation de la chitine en chitosane qui consiste à enlever suffisamment de groupes acétyle ($\text{CH}_3\text{-CO}$) de la chitine pour permettre au chitosane d'être soluble dans la plupart des acides organiques dilués. Cette opération libère les groupes amines (NH) et confère au chitosane un caractère cationique particulièrement intéressant en milieu acide. La différence dans les méthodes de préparation du chitosane est susceptible d'influencer le degré de désacétylation, la distribution des groupements acétyle et la conformité de la structure du chitosane (Tsai *et al.* 2002). Ceci peut engendrer des changements au niveau de la solubilité, de l'activité antimicrobienne et d'autres propriétés du chitosane (Devlieghere *et al.* 2004). Le terme chitosane est utilisé lorsque 60 à 70% des monomères de chitine sont dés acétyle (Li *et al.* 2005) ou lorsque le produit de cette désacétylation est soluble en milieu acide dilué (Muzzarelli, 1983).

La désacétylation se fait (Ifremer, 2011) :

- ❖ Par voie chimique à haute température par une base concentrée (soude par exemple).
- ❖ Par voie enzymatique avec la chitine-désacétylase.

2.3.2. Propriété physico- chimiques du chitosane

2.3.2.1. 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).

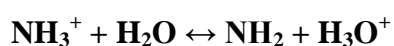
2.3.2.2. Viscosité

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 viscosimètre (Amiali, 1999).

2.3.2.3. Solubilité du chitosane

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 organique (Kurita, 2006), mais soluble dans l'acide acétique à 1 %. 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).

Le chitosane est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses fonctions amines suivant l'équilibre :



Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, donc cela favorise la solubilité du chitosane. Dans ce travail le pH du mélange chitosane acide acétique est de 1%. Le chitosane est un matériau non-poreux, très stable en phase solide (sèche) et il a une conservation quasi infinie. En solution, il est relativement fragile et dégradable. Il Possède un degré élevé de réactivité chimique dû à son groupe amine primaire libre qui lui Confère une forte densité de charges positives (transformation de NH_2 en NH_3^+ en milieu acide) (Rinaudo, 2006).

2.3.3. Propriétés biologiques du chitosane

2.3.3.1. Biodégradabilité

La biodégradation sont assurée par des enzymes hydrolysant le chitosane en oligomères. Cependant, 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 β (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 du DA est également constatée, *in vivo* (implantation sous cutanée) (Tomihata et Ikada., 1997).

2.3.3.2. 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).

2.3.4. 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 bactéries 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.

2.3.5. 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).

2.4. Les applications 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 :

2.4.1. 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 permettent 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).

2.4.2. 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).

2.4.3. 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).

2.4.4. Domaines biomédical et pharmaceutique

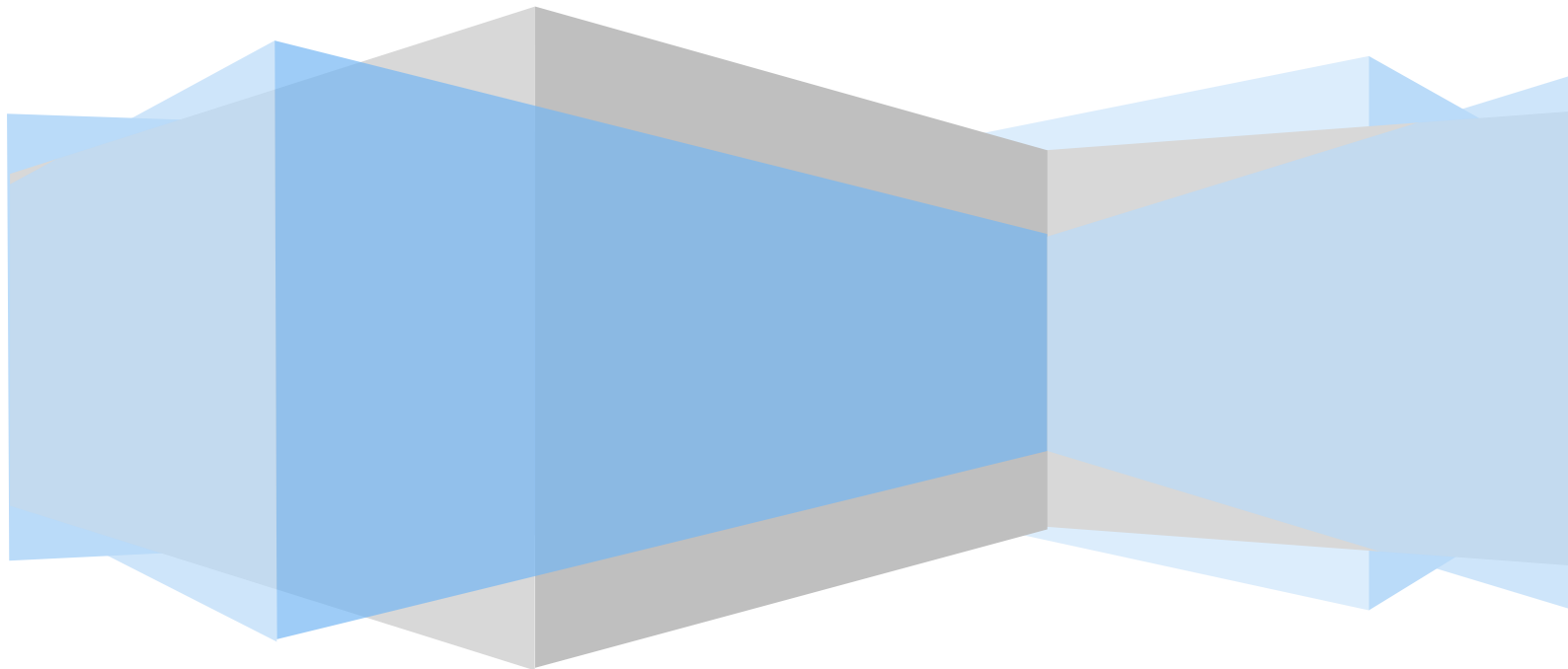
Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane (biocompatibilité, bioactivité...) en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques : agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant... Il est également utilisé comme système de libération contrôlée 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).

2.4.5. 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).

Chapitre II

Matériel et méthode



1. Collecte des carapaces de crevette

Dans notre étude, nous avons utilisé comme espèce la crevette rouge *Aristeus antennatus* (Fig.7), 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). Ces crevettes sont généralement pêchées dans la zone de l'ouest Algérien.



Figure 7: un échantillon de crevette rouge *Aristeus antennatus*

2. Prétraitement des coproduits de la crevette rouge

Avant leur utilisation, les coproduits (têtes et carapaces) de la crevette sont séchés à 35 °C, ensuite broyées de façon à obtenir des particules dont la taille est de l'ordre du millimètre (0,5 ; 0,8 mm) à l'aide d'un broyeur à café modèle WH-8100.

3. Les analyses physico-chimiques

3.1. Dosage de la teneur en eau

La teneur en eau est déterminée par étuvage des échantillons à 105 °C pendant 24 heures (AOAC, 2005).

Une capsule vide est pesée. Puis environ 5g d'échantillons sont ajoutés dans la capsule et l'ensemble est pesé à nouveau. Les capsules sont étuvées à 105°C pendant 24 heures. Ensuite, elles sont refroidies dans un dessiccateur avant d'être repesées à nouveau.

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

$$H\% = [(M1 - M2 / M1 - M0)] * 100$$

M0 : est la masse en g de la capsule vide ; *M1* : est la masse en g de la capsule et les échantillons avant étuvage ; *M2* : est la masse en g de la capsule et les échantillons après étuvage.

3.2. Dosage de la teneur en protéines totales

La méthode utilisée pour le dosage des protéines totales est celle de Kjeldhal (Crooke et Simpson., 1971). Il consiste à un dosage de l'azote contenu dans l'échantillon. Un facteur de conversion de 6,25 est utilisé pour obtenir la teneur en protéines.

Le dosage des protéines se déroule en 3 étapes :

- ❖ **Minéralisation** : Dans un matras de minéralisation, 1g de l'échantillon est placé. (20 ml) d'acide sulfurique et 1g du catalyseur 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.
- ❖ **Distillation** : Les minéralisas refroidis sont additionnés de 20 ml d'eau distillée. Le distillat qui contient l'azote sous forme d'ammoniac est récupéré dans 20 ml de solution d'acide borique 5% en présence d'indicateur coloré.
- ❖ **Titration** : La titration de l'azote est réalisée par l'acide sulfurique (0,1N) jusqu'à l'obtention de couleur rose pale.

La teneur en azote est obtenue par la formule ci-après :

$$N\% = 14 * V * N * 100 / M$$

N : la teneur en azote (%) ; *V* : volume de H_2SO_4 ; *N* : normalité de H_2SO_4 ; *M* : poids des échantillons (mg).

P% des échantillons est obtenue en utilisant le facteur de conversion 6,25. Elle s'écrit :

$$\text{Protéines}\% = K \times N\% \quad P\% = 6,25 \times N\%$$

P% : Teneur en protéines totales ; *K* : Facteur de conversion de l'azote en protéine.

3.3. Analyse des lipides par la méthode de Soxhlet

La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

Mode opératoire :

- Tarer les ballons de soxhlet (le poids des ballons vides M_0).
- Peser avec de 3 à 4 g de l'échantillon dans la cartouche et placer la dans le tube d'extraction.
- Mettre du solvant (200 ml de d'hexane ou d'éther de pétrole) dans les quatre ballons.
- Fixer le ballon au niveau du tube d'extraction.
- Ouvrir l'eau pour le réfrigérant ; le débit sera à surveiller pendant l'extraction.
- Régler le régulateur à triac sur thermostat 40°C pendant 30m et après ont augmenté la température à 60°C.

Après l'extraction, le solvant est évaporé (par rot vapeur), ensuite les ballons sont séchés à l'étuve (103 °C), puis refroidis (Larpen, 1997).

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 :

$$L\% = (M_2 - M_1 / M_0) * 100$$

L% : la teneur en matières grasses ; *M₂* : le poids du ballon avec les lipides en g ; *M₁* : la masse du ballon vide en g ; *M₀* : la masse de la prise d'essai en g.

3.4. Dosage de la teneur en cendres

La teneur en cendres est déterminée par incinération de la matière organique à 600°C pendant 3 heures (AOAC, 2005).

Des capsules d'incinération vides sont pesées. Environ 5g d'échantillon sont ajoutés et la masse de l'ensemble est notée. Les échantillons sont alors soumis à une température de 600°C dans un four à moufle pendant 3 heures. Après refroidissement dans un dessiccateur, les capsules contenant les cendres sont pesées à nouveau. La teneur en cendres des échantillons est calculée suivant la formule suivante :

$$C\% = [(M1 - M2) / (M1 - M0)] * 100$$

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).

4. Extraction de la chitine

De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des coproduits de crustacés. De manière générale, elles consistent à éliminer les minéraux (déméralisation), les protéines (déprotéinisation) et les pigments (décoloration). L'extraction se fait par deux voies : chimique et enzymatique.

4.1. Extraction de la chitine par déprotéinisation chimique

Dans le cas de l'hydrolyse chimique, le réactif est un acide ou une base. L'hydrolyse chimique est peu coûteuse, assez simple mais non spécifique (coupure des liaisons peptidique quelque soit la séquence des acides aminés .elle est donc peu reproductible (taille, composition et fonctionnalités variables des peptides obtenus).

De plus, les conditions d'hydrolyse (température élevées et condition de pH extrêmes) altèrent les propriétés des peptides et détruisent certains acides aminés comme le tryptophane qui

est un acide aminé essentiel (Houssoir *et al.*, 2012). L'hydrolyse acide est plus utilisée que l'hydrolyse basique.

4.1.1. Déminéralisation

La déminéralisation 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 HCl (1N) et le rapport du solide au solvant est de 1:10 (p/v), c'est-à-dire 100g de carapaces en poudres pour 1000 ml de l'eau distillé a 25°C, pendant 1 heures. Le produit ainsi obtenu est lavé par l'eau distillé plusieurs fois à la neutralité du pH, ensuite séché à l'étuve à 35 °C pendant une nuit.



Figure 8 : Déminéralisation de l'échantillon

4.1.2. 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 fait par traitement à NaOH 2,5 N au ratio 1 :10(p/v), c'est -à-dir 1g de produit déminéralisé sec pour 10 ml NaOH 2,5N ,70°C (Tolaimate *et al.* 2003 ; Al Sagheer *et al.*, 2009), pendant 6 heures ; le mélange est ensuite filtré et lavé plusieurs fois jusqu'à neutralité .La chitine ainsi obtenu est séchée à l'étuve 35°C pendant 24 heures.



Figure9: Déprotéinisation de l'échantillon déminéralisé.

4.1.3. Décoloration

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 °C, pendant 3 heures. Le mélange est ensuite filtré et lavé plusieurs fois avec l'eau distillée pour éliminer les composants restants afin d'obtenir un milieu neutre.

La chitine est ensuite séchée à l'étuve à une température de 35°C, pendant 24 heures et le produit final est de couleur légèrement brune.

4.2. Extraction de la chitine par déprotéinisation enzymatique

Les coproduits sont mis en présence d'une certaine quantité d'enzyme dans un milieu aqueux au pH et température optimisant son activité. L'enzyme va découper les protéines contenues dans les coproduits.

Chaque enzyme a une action sélective et coupe une liaison peptidique après une séquence précise d'acides aminés. Une grande variété d'enzymes différentes est disponible (papaïne, trypsine, pancréatine...)

En fonction du résultat souhaité (poids moléculaire, type de peptides...), une ou plusieurs enzymes peuvent être utilisées. Il est ainsi possible de contrôler l'hydrolyse. Il s'agit d'autolysat

lorsque l'enzyme utilisée est initialement présente dans les coproduits (enzyme endogène) comme pour la production de sauces de poissons, et d'hétéro lysat lorsqu'elle n'est pas présente dans les coproduits (enzymes exogène).

Il s'agit d'une hydrolyse ou 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 (Houssoir *et al.*, 2012).

L'enzyme utilisée au cours de cette étude c'est la Pepsine fournie par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). Il s'agit d'une endopeptidase extraite de la muqueuse gastrique porcine. Elle porte le numéro enzymatique (EC. 3.4.23.1).

4.2.1. L'hydrolyse pepsiques

Les coproduits de la crevette broyées sont diluées avec de l'eau distillée. Elles sont ensuite chauffées à 40°C dans un bain marie avec agitation continue, puis le pH est ajusté à 2 avec de l'acide chlorhydrique (HCl 2N). 0,5% de Pepsine est ensuite ajouté. L'hydrolyse dure 3 heures, pendant lesquelles le milieu réactionnel est constamment agité et le pH est ajusté à 2 avec de l'HCl 2N. Le degré d'hydrolyse est estimé en fonction de la quantité d'acide ajouté qui est proportionnel au nombre de liaisons peptidiques coupées. L'inactiver de l'hydrolyse se réalise en ajoutant NaOH (5N) jusqu'à la neutralité du milieu réactionnel.



Figure 10 : montage de l'appareil pour hydrolyse enzymatique des coproduits de la crevette

4.2.2. Traitement des hydrolysats :

La préparation est refroidie à température ambiante puis centrifugée dans une centrifugeuse Hettich Rotina 380R à 4000 tour pendant 20 à 40 minutes et à 4°C.

Les deux fractions obtenues : surnageant et culot sont lyophilisés pendant 2 à 3 jours avec lyophilisateur de modèle Freeze Dryer Bk-Fd10s biobase biodustry (shandong). Les lyophilisats font ensuite l'objet d'analyses biochimiques.

4.3. L'extraction du chitosane

- ❖ Première méthode d'extraction du chitosane : la chitine est ajoutée à une solution de NaOH concentrée à 40%, selon un ratio (P/V) de 1 :10. Mettre l'échantillon à l'agitateur pendant 3 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 35°C pendant une nuit.
- ❖ Deuxième méthode d'extraction du chitosane : mettre la chitine en présence d'une solution de NaOH 12 N dans un bain d'huile à 140°C pendant 4 à 6 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 35°C pendant une nuit.



Figure 11 : Méthode d'extraction de chitosane.

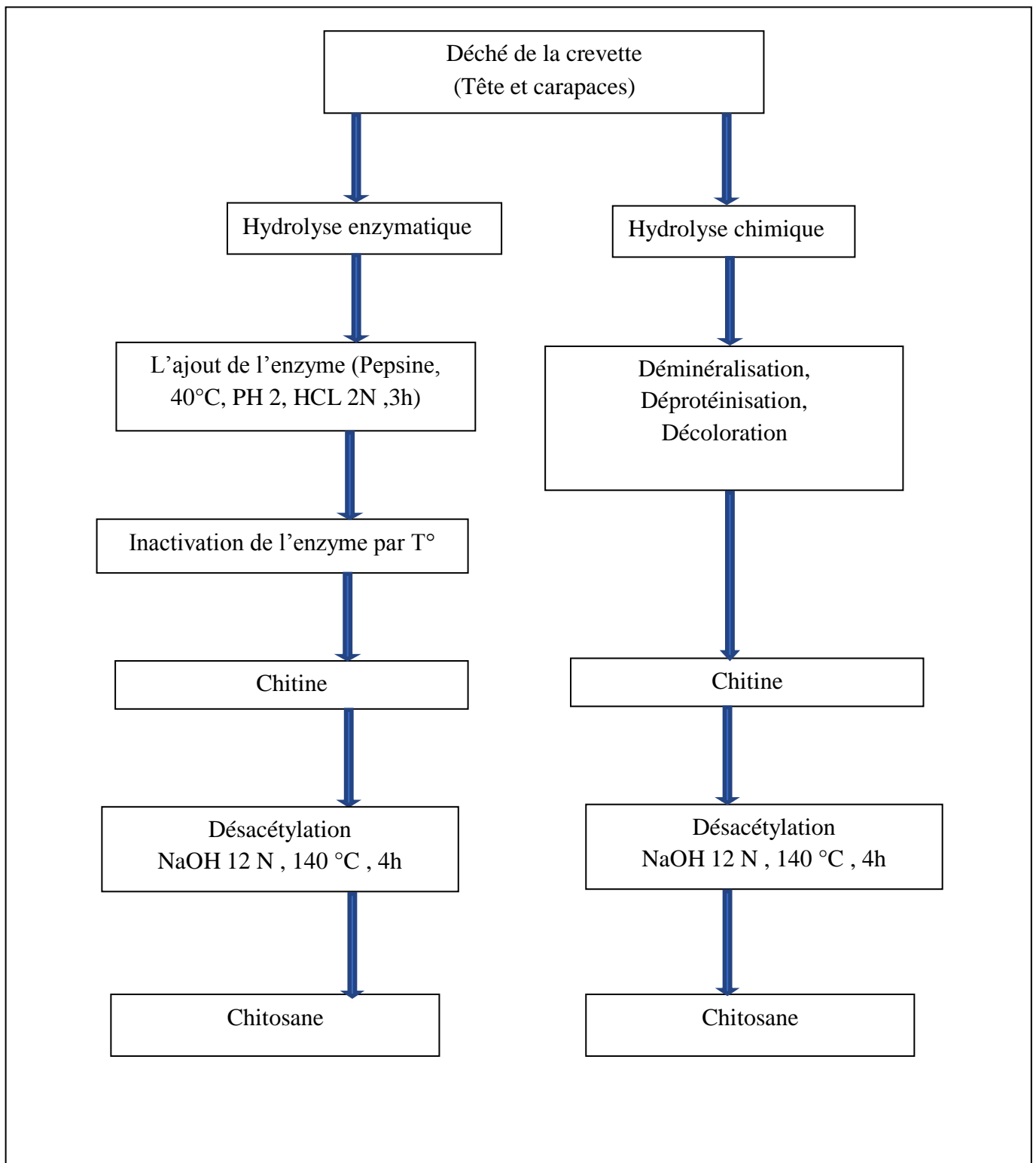


Figure 12: Les étapes d'hydrolyse chimique et enzymatique

5. Degré d'acétylation(DA) de chitosane :

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 chaîne 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 25 ml de solution de HCl (0,06)
- ❖ Poser le mélange sous agitation à température ambiante durant une heure, ensuite ajuster avec l'eau distillé à 50ml avec la solution NaOH (0,1) 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.

5.1. Solubilisation du chitosane :

La solution du chitosane est préparée en dissolvant 01g du chitosane en poudre dans 100 ml d'acide acétique (1%), sous agitation constante pendant une nuit à température ambiante jusqu'à sa solubilisation. Nous avons utilisée les deux différents chitosanes.



Figure 13 : La solubilisation du chitosane dans l'acide acétique 1 % à température ambiante, sous agitation constante. Chitosane obtenu par déprotéinisation chimique de la chitine (01), chitosane obtenu par déprotéinisation enzymatique de la chitine (2).

Le calcule :

$$Q = (V_{NaOH} * 0,1) / (1000 * M_{cs})$$

Q = nombre de moles de la fraction aminée du chitosane pour un échantillon de 1 g, 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 N_{NaOH} 0,1M entre pH 3,75 et pH 8, Le facteur 1000 vient du fait que V_{NaOH} est en ml.

$$DA = (1,16 * Q) / (1 + 42 * Q)$$

$$DD = (161,16 * V_{NaOH}) / M_{cs}$$

Et concernant la chitine et par le même principe

$$DD = (203,1925 * V_{NaOH}) / M_{cs}$$

$$DA = 100 - DD$$

DA=degré d'acétylation, DD=degré de désacétylation

6. Pouvoir antibactérien du chitosane :

Cette étude à été réalisée par 2 méthodes :

1. Méthode de diffusion en puits AWDT (Agar Well Diffusion Test)
2. Diffusion par Méthode des disques.

6.1. Les souches pathogènes utilisées

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *streptococcus sp*, *Bacellus Cereus* (laboratoire de microbiologie université de Mostaganem).

Les germes pathogènes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Stréptococcus sp*, *B.Cereus* ont été réactivés en bouillon LB, et incubés à 37°C pendant 24 H pour s'assurer de leurs pureté.

6.1.1 Le renouvellement et l'enrichissement des souches pathogènes

Le renouvellement et l'enrichissement est effectuée par ensemencement des souches pathogènes dans un bouillon LB à 37°C pendant 8 à 10 heures d'incubation avant chaque test d'antagonisme pour obtenir une culture jeune .

6.2. Méthode de diffusion en puits AWDT

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie, repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle). L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky *et al.*, 1976).

Dans Cette méthode en va commencer a l'écoulement des boite des pétris par le milieu LB semi solide apré la solidification en va étalé par les souches bactérienne, en a reposé 5 min.aprés

On réalise 4 puits par boîte de Pétri de 6 mm de diamètre, creusés à l'aide d'un embout jaune stérile (chaque test est réalisé en triplicat). Un volume de solution chitosane chimique et enzymatique (80 µl) est mis dans 4 puits périphérique. Un puits de 80µl de bouillon BHI stérile sert comme un témoin négatif au milieu de la boite. Après diffusion pendant1, 5 à 4 heures à +4°C on incube à 37°C pendant 18 à 24h.

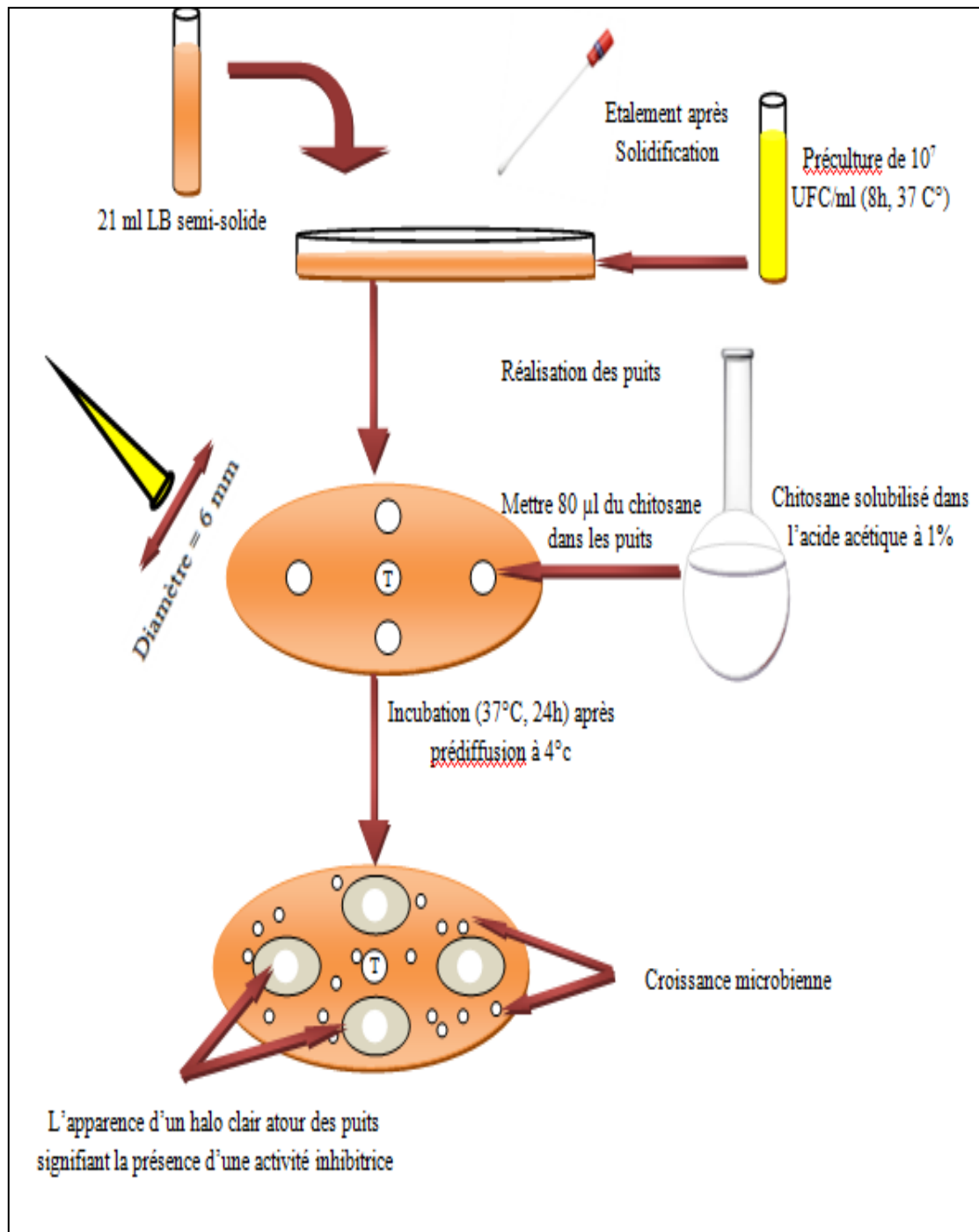


Figure 14 : mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en puits

6.3. Diffusion sur agar semi-solide par méthode des disques

Pour ce test on utilise principalement quatre souches, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, *streptococcus sp*, *B.Cereus*. (Préculture jeune de 18 heures d'incubation à 37°C) est étalée sur une MHet LB semi solide, le chitosane chimique et enzymatique est ensuiteensemencées sur ce tapis sous forme de disques de 80µl à l'aide d'une micropipette (6 disques pour chaque boîte), ensuite incubation à 37°C en aérobiose pendant 18 à 24 heures. Ensuite, les boîtes sont examinées pour les zones d'inhibition. Le pouvoir antagoniste est exprimé par la moyenne de trois diamètres perpendiculaires (Ababsa, 2012). Pour toutes les testes d'antagonisme, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits seront mesurés, le résultat est positif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur de 2 mm (Tabak *et al.*, 2007).

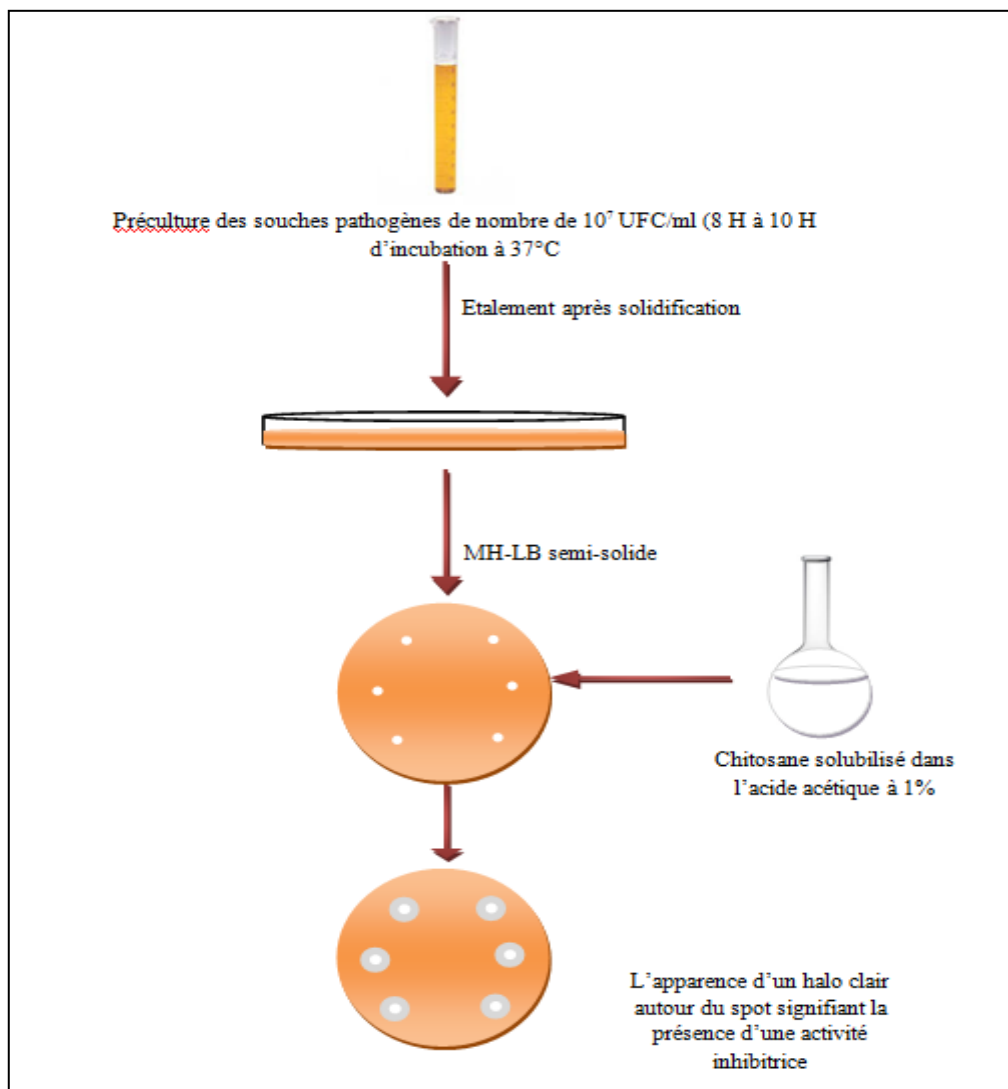


Figure 15 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques

6.4. Activités antifongiques du chitosane

Une étude d'efficacité antifongique a été réalisée par (Vanden Berghe & Vlietinck ., 1991). En bref, les suspensions de culture de deux champignons (*Aspergillus Sp*, *Condida Sp*) à tester par la méthode de diffusion en puits .ont été étalés par une gélose semi solide a LB. Ensuite, environ de solution du chitosane chimique et enzymatique ,ont été chargés dans des puits (6 mm de diamètre) faite dans la couche de gélose avec des pipettes Pasteur stériles. Par la suite, avant d'être incubés pendant 72 h à 30°C , les boîtes de Pétri ont été conservés pendant 2 h à 4°C . L'activité antifongique a été estimée par mesurer les diamètres de la zone d'inhibition de la croissance (en millimètres) autour des puits.

7. Activité antioxydant du chitosane

7.1. Capacité de piégeage du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) radicaux

La capacité du chitosane à éliminer le radical DPPH a été déterminée selon la méthode de (Bersuder, Hole et Smith., 1998). En fait, sous sa forme radicale, le DPPH a une bande d'absorption à 517 nm qui disparaît lors de la réduction par un composé antiradicalaire. Une absorbance inférieure du mélange réactionnel indique une DPPH supérieure activité de piégeage des radicaux libres.

L'activité de piégeage des radicaux DPPH a été évaluée et calculée via l'équation suivante:

$$\text{Activité \% : } A = (\text{DO}_{\text{Blanc}} - \text{DO}_{\text{échantillon}} / \text{DO}_{\text{Blanc}}) * 100$$

Blanc : 1.5 DPPH + 1.5 Ethanol, Echantillon : chitosane

DO : La mesure de la densité optique (DO) avec des spectrophotomètres automatiques (JENWAY-7305, Royaume-Uni) à 517 nm permet de suivre en temps réel la croissance de la concentration de chitosane.

7.2. Activité antioxydante totale

L'évaluation de l'activité antioxydante totale est basée sur réduction de Mo (VI) en Mo (V) par l'échantillon, donc formation d'un complexe phosphate vert / Mo (V) à pH acide (Prieto, Pineda, & Aguilar, 1999). Ainsi, une aliquote de 0.1 ml de solution de chitosane à différentes concentrations (0.2 - 5 mg / ml à 1% d'acide acétique) ont été homogénéisées avec 1 ml de solution de réactif (acide sulfurique 0,6 M, Phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4mM), dans un tube eppendorf. Après incubation à 90 °C pendant 90 min, on laisse refroidir à température ambiante. Par la suite, l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre une solution de contrôle, consistant en 1 ml de solution de réactif et 0,1 ml d'eau distillée.

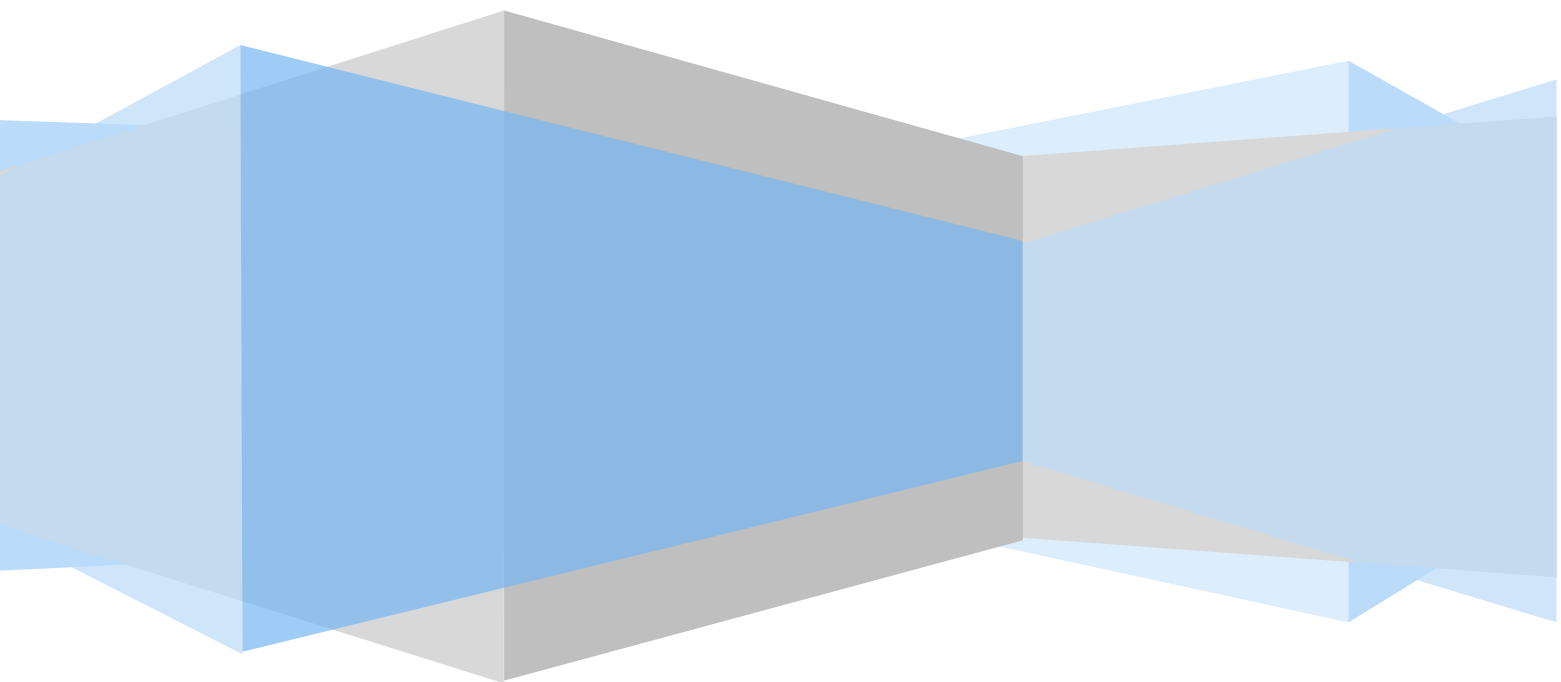
L'activité antioxydante totale du chitosane a été évaluée en tant que α -tocophérol équivalents via l'équation linéaire suivante :

$$A = 0,011 C + 0,0049 \quad R^2 = 0,987$$

Activité anti: A est l'absorbance à 695 nm et C la concentration en atocopherol équivalents (mmol/ ml).

Chapitre III

Résultats et Discussion



1. Analyse des coproduits de la crevette

Les analyses biochimique (humidité, protéines, lipides et cendres) des coproduits de la crevette rouge *A.antennatus* sont regroupés dans le tableau suivant et comparés à d'autres travaux réalisés.

Tableau 2: Composition biochimique des coproduits de la crevette rouge *A.antennatus*.

Echantillons	Présent travail <i>A.antennatus</i> (Risso, 1816)	(Harrats, 2016) <i>A.antennatus</i> (Risso, 1816)	(Z.Randriamahatody, 2011) <i>Penaeus monodon</i> (fabricius ,1798)
Teneur en eau %	9	35	73
Teneur en cendres %	14,89	41	6,56
Teneur en lipides%	9,2	7,2	1,9
Teneur en protéines %	13,12	11,7	16

❖ Analyse de la teneur en eau :

Pour obtenir la teneur en eau contenus dans les coproduits de la crevette *A.antennatus*, on a procédé au séchage, la teneur en eau obtenue d'une valeur de 9 % est inférieure à la valeur obtenue par (Harrats, 2016) pour la même espèce *A.antennatus* (Risso, 1816) dont la carapace contient 35% d'eau. Cependant, la teneur en eau obtenue par Randriamahatody (2011) (73%), pour l'espèce *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) est supérieure à la valeur de notre échantillon. Cette différence est du à la manière à sécher les coproduits, dont celle-ci à juste sécher son échantillon à l'air ambiant en gardant une bonne quantité d'eau dans les têtes de la crevette.

❖ Analyse de la teneur en cendre :

Le tableau 2 présente les résultats obtenus pour le taux en cendre contenues dans notre échantillon et de celui des autres auteurs. Nous constatons que la teneur en produits inorganiques de notre échantillon (14,89%) demeure plus basse par rapport à celui obtenu par Harrats (2016) (41%) mais qui reste plus élevé par rapport au taux obtenu par Randriamahatody (2011) pour la tête de la crevette *Penaeus monodon* (6,56%). Cela est dû à la nature des coproduits eux-mêmes, car Harrats a utilisé que les carapaces, Randriamahatody a travaillé avec seulement les têtes, tandis que nos échantillons c'est le mélange de têtes et carapaces des crevettes.

❖ Analyse de la teneur en lipides

Les résultats illustrés en tableau 2, montrent que le taux des lipides contenu dans les coproduits (têtes et carapaces) de la crevette *A.antennatus* est un peu supérieur à celui obtenu dans les carapaces pour la même espèce (Harrats, 2016). Cette valeur est supérieure de quatre fois la valeur des lipides mentionnés par Randriamahatody (2011) pour les têtes de crevette *penaeus monodon*.

❖ Analyse de la teneur en protéines

Le résultat obtenu pour le taux de protéines par la méthode de Kjeldahl a été évaluée à 13,12%. Ce dernier est supérieur à la valeur obtenue par Harrats (2016) pour la même espèce (*A. antennatus*). Par contre il est inférieur à la valeur obtenue par Randriamahatody (2011), pour l'espèce *Penaeus monodon* (16 %). Car c'est tout naturellement que les carapaces contiennent moins de protéines qu'un coproduit composé d'un mélange de têtes et carapaces.

1.1. Caractérisation de la chitine et de chitosane extraits

La chitine extraite par méthode chimique se présente sous forme de poudre inodore, sans saveur et de couleur entre le brun et le beige. Tandis que la chitine obtenue par extraction enzymatique garde un peu sa couleur originale rosâtre. Alors que, le chitosane c'est un polysaccharide azoté, basique, cationique, de couleur blanchâtre et non toxique (Majeti et Kumar, 2000 ; Morimoto *et al.*, 2002 ; Mrunal, 2004) (Fig.16).



Figure 16 : Aspect général de chaque chitine et chitosane obtenu. (A) et (C) extraction chimique (chitine et chitosane, respectivement), (B) et (D) extraction enzymatique (chitine et chitosane, respectivement).

Tableau 3: Rendement massique de la chitine et du chitosane exprimé en (%) d'après les deux méthodes d'extraction

	Déminéralisation	Déprotéinisation (chitine)	Deacetylation (chitosane)
Extraction chimique	50%	16.1%	03%
Extraction enzymatique	-	60%	23%

D'après le tableau 3, Le rendement massique d'extraction chimique de la chitine atteint le 50% lors de la phase de déminéralisation. Dans la phase de déprotéinisation de la chitine chimique, on aperçoit un rendement faible 16%, ce qui explique qu'une grande quantité de protéine a été éliminée.

Alors que l'extraction enzymatique avait un rendement de 60% ce qui veut dire qu'il n'y avait qu'une petite quantité de protéine qui a été éliminée.

En suite, la proportion de degré d'acétylation d'extraction chimique du chitosane est estimée par une valeur plus faible 3% que l'extraction enzymatique (23%).

1.2. Caractéristique biochimique de la chitine et du chitosane

Le tableau suivant présente les variabilités de la teneur en chitine et chitosane contenu dans les coproduits de la crevette rouge.

Tableau 4 : variabilité de la teneur en chitine et en chitosane contenu dans les coproduits de la crevette rouge.

		Teneur en cendres %	Teneur en lipides%	Teneur en protéines %
Chitine	Enzymatique	2.99	2.37	3.45
	Chimique	6.78	1.23	6.88
Chitosane	Enzymatique	4.22	0.94	0.99
	Chimique	0.47	0.71	2.11

❖ La teneur en protéine

Selon le tableau 3, nous remarquons que le taux de protéine est élevé dans l'extraction chimique de la chitine (6,88%) et le chitosane (2,11%) par rapport à l'extraction enzymatique de la chitine (3,45%) et le chitosane (0,99%). Cela indique que l'extraction enzymatique, résulte des produits (chitine et chitosane) plus pure à ceux obtenus par l'extraction chimique.

❖ La teneur en cendre

Les résultats obtenus en cendres, montrent que les teneurs les plus élevées se présentent pour la chitine obtenue par extraction chimique et pour le chitosane obtenu par extraction enzymatique de la chitine (6,78 et 4,22% respectivement). Ces résultats sont influencés par les étapes d'extractions, la concentration de l'acide (HCl), la température T°C et la durée de chaque réaction chimique.

❖ La teneur en lipide

Les teneurs les plus faibles en lipides sont celles de la chitine extraite par voie chimique (1,23 %) par rapport à la méthode enzymatique (2,37%). Tandis que le chitosane est pauvre en matière grasse pour les deux cas d'extraction.

2. Pouvoir antibactérien du chitosane

Nous avons étudié le pouvoir antimicrobien du chitosane par la méthode de diffusion en puits et des disques. Pour cela un milieu nutritif (LB) est utilisé pour les deux tests. L'activité antibactérienne du chitosane est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits et des disques, contenant le chitosane à tester vis-à-vis de 4 germe pathogène *Escherichia coli* (Gramme-), *staphylococcus aureus* (Gramme+), *pseudomonas sp*(Gramme-) et *Bacillus cereus* (Gramme+).

2.1. Diffusion sur agar semi-solide par méthode des puits AWDT

Les résultats sur les propriétés antibactériennes dans ce test, présenté dans le Tableau 5 ont montré que les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles que celles à Gram négatif vis-à-vis de l'action du chitosane, sauf que, le chitosane chimique possède une activité inhibitrice sur la souche *Staphylococcus aureus* (G+) marquée par un diamètre d'inhibition important de l'ordre de 18 mm.. Un diamètre d'inhibition de 16 mm pour le chitosane enzymatique a été marqué sur la *Pseudomonas sp* mais le chitosane chimique n'avait aucune activité.

Tableau 5 : Le pouvoir antimicrobien du chitosane chimique et enzymatique contre des souches pathogènes et leur diamètre d'inhibition en millimètre.

Les souches pathogènes	Chimique	Enzymatique
activité bactérienne		
<i>Escherichia coli</i>	/	12
<i>Pseudomonas Sp</i>	/	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	/
<i>Bacillus cereus</i>	/	8
Activité fongique		
<i>Candida Sp</i>	14	16
<i>Aspergillus. Sp</i>	12	26

Pour *E coli* et *B.cereus*, des diamètres d'inhibition de 12 et 8 mm respectivement ont été marqué pour le chitosane enzymatique, tandis que le chitosane chimique n'a montré aucune activité sur ces deux souches. L'absence de la croissance microbienne se traduit par un anneau translucide autour de puits, identique à de la gélose stérile. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 6 et illustrés par la figure 17. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés par Hamdi *et al* (2017., sur le chitosane du crabe bleu, ce dernier était efficace contre la souche *staphylococcus aureus* , démontré par un diamètre de zone d'inhibition apparu dans la gamme de 15mm.

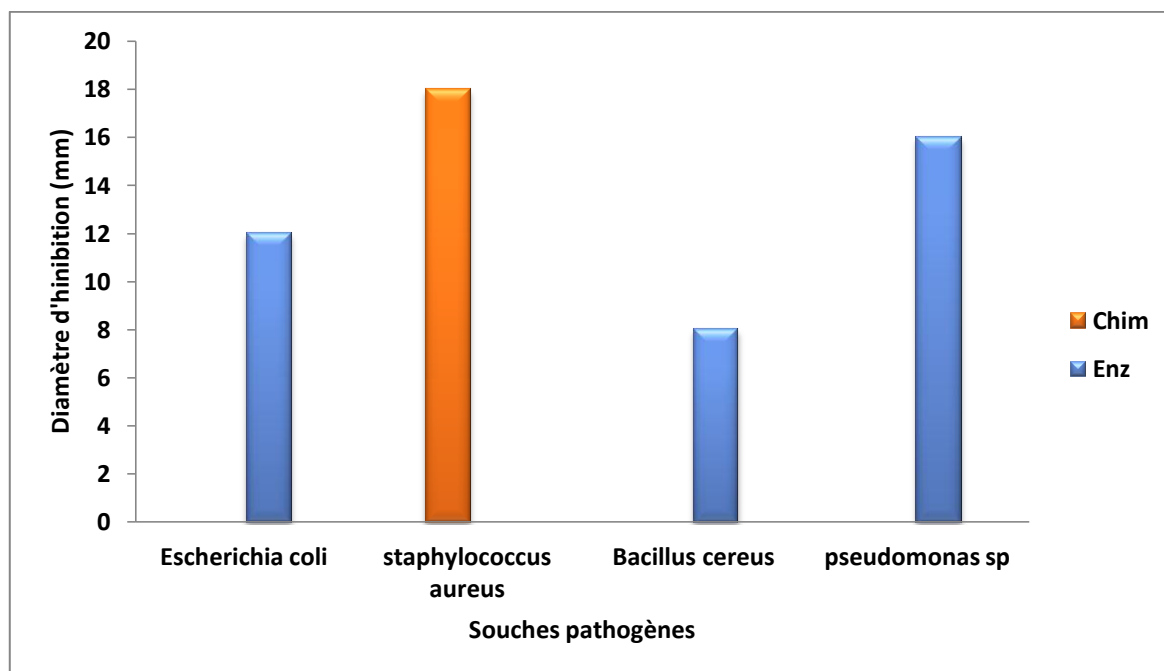


Figure 17 : Pouvoir antibactérien du chitosane (diamètre d'inhibition) contre les souches pathogènes par laméthode des puits.

L'activité antifongique du chitosane chimique et enzymatique contre deux souches pathogènes (*Candida Sp*, *Aspergillus. Sp*) ont été évalués, via la méthode de diffusion en gélose semi solide en puits. D'après le tableau 5 et la figure 18 le chitosane était hautement actif contre les deux souches testés : Les diamètres de la zone d'inhibition des espèces *Candida sp* et *Aspergillus. Sp* étaient de 16 et 26 mm pour l'extraction enzymatique respectivement; ce résultat est plus élevé que celui du chitosane obtenu par extraction chimique de la chitine qui était de 14mm et 12mm pour les deux espèces *Candida sp* et *Aspergillus Sp* respectivement..

Donc on note, que le chitosane enzymatique a un pouvoir antibactérien plus fort que le chitosane chimique contre les souches pathogènes.

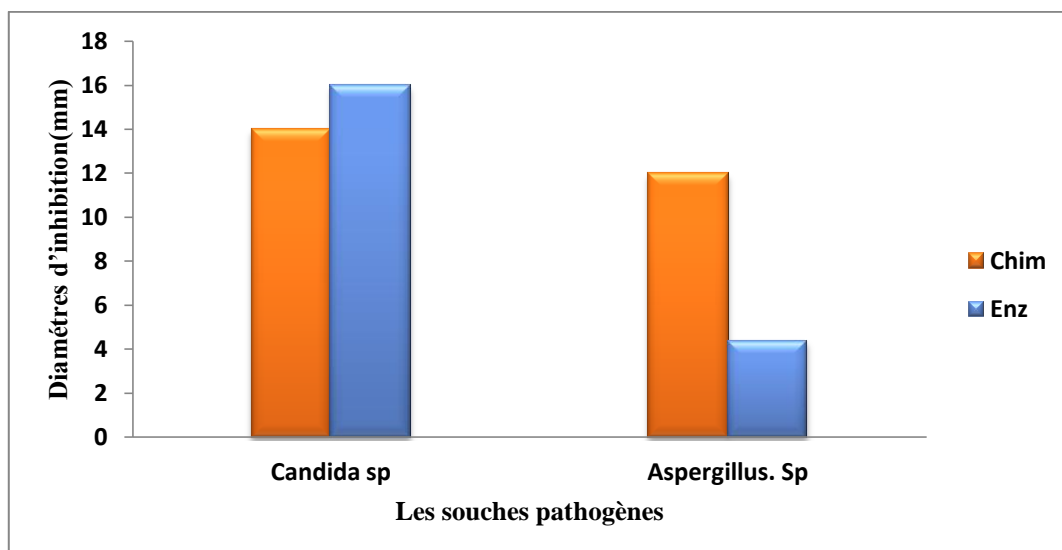


Figure 18 : pouvoir antifongique du chitosane (diamètre d'inhibition) contre les souches pathogènes.

2.2. Diffusion sur agar- semi-solide par la méthode des disques

La lecture du potentiel antibactérien du chitosane par ce test des disques est résumée dans le tableau 6 et le graphe (Fig 19). L'activité du chitosane chimique et enzymatique a été élargie à l'*E.coli* (gramme negative) et *B.cereus* (gramme positive) sur le milieu LB. Par contre aucune activité inhibitrice n'est apparue dans les deux souches pathogènes *staphylococcus aureus* (gramme positive) et *pseudomonas sp* (gramme negative) pour le chitosane obtenu par déprotéinisation enzymatique de la chitine. Les résultats concernant les propriétés antibactérienne sur MH ont montré une activité inhibitrice des deux chitosanes contre les souches pathogènes *E.coli*, *Staphylococcus aureus* et *B.cereus*. Alors que le chitosane obtenu par déprotéinisation chimique de la chitine contre la souche *Pseudomonas sp* n'a présenté aucune activité inhibitrice. (Voir figure 19).

Dans l'ensemble des résultats obtenue, il ressort que :

- Le milieu MH est plus efficace pour l'activité antibactérienne du chitosane enzymatique par rapport au milieu LB.
- *Escherichia coli* et *pseudomonas sp* (figure 20) sont les souches les plus sensibles vis-à-vis du chitosane (activité antibactérienne fort sur les de milieu LB ,MH).
- *Staphylococcus aureus* et *B.Cereus* révèle une sensibilité moyenne (activité anti microbienne modeste du chitosane (figure 20).

Tableau 6 : Le pouvoir antibactérien du chitosane chimique et enzymatique contre des souches pathogènes testé sur des milieux LB et MH et leur diamètre d'inhibition (en mm).

Les souches pathogènes	LB		MH	
	Chimique	Enzymatique	Chimique	Enzymatique
<i>Escherichia coli</i>	20	14	14	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	-	16	10
<i>Bacillus cereus</i>	10	14	8	10
<i>Pseudomonas sp</i>	19	-	-	8

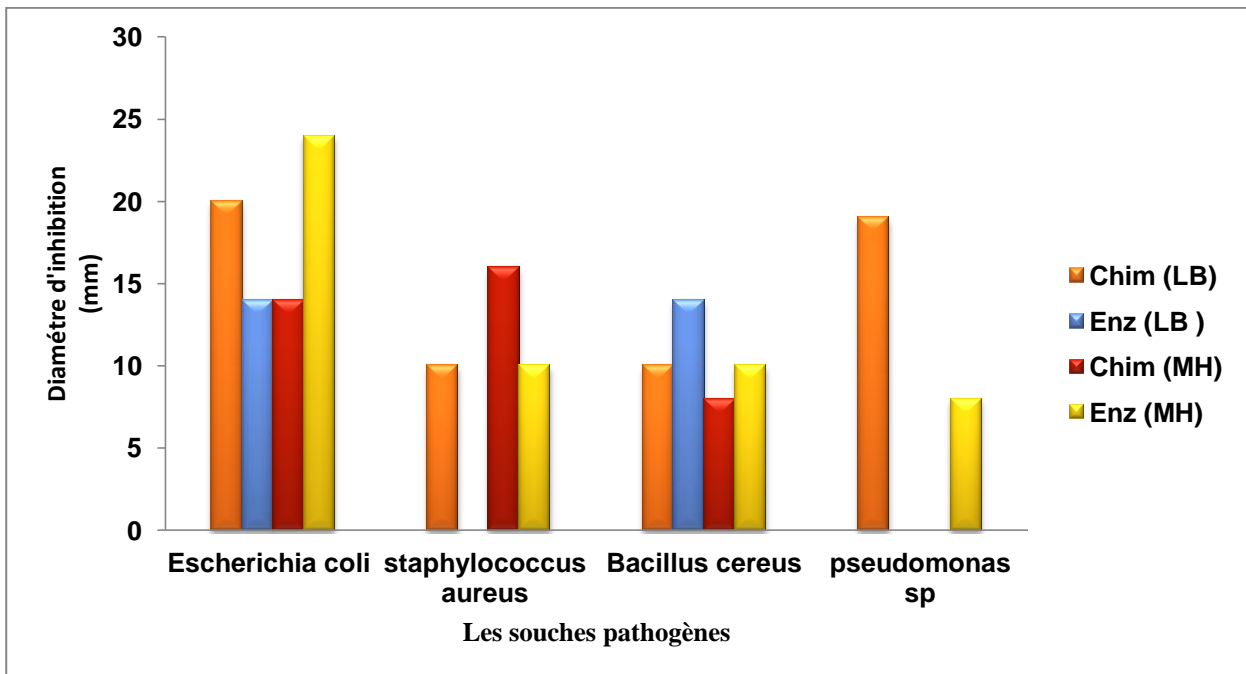


Figure 19 : Pouvoir antibactérien du chitosane (diamètre d'inhibition) contre les souches pathogènes testé sur les milieux MH et LB.

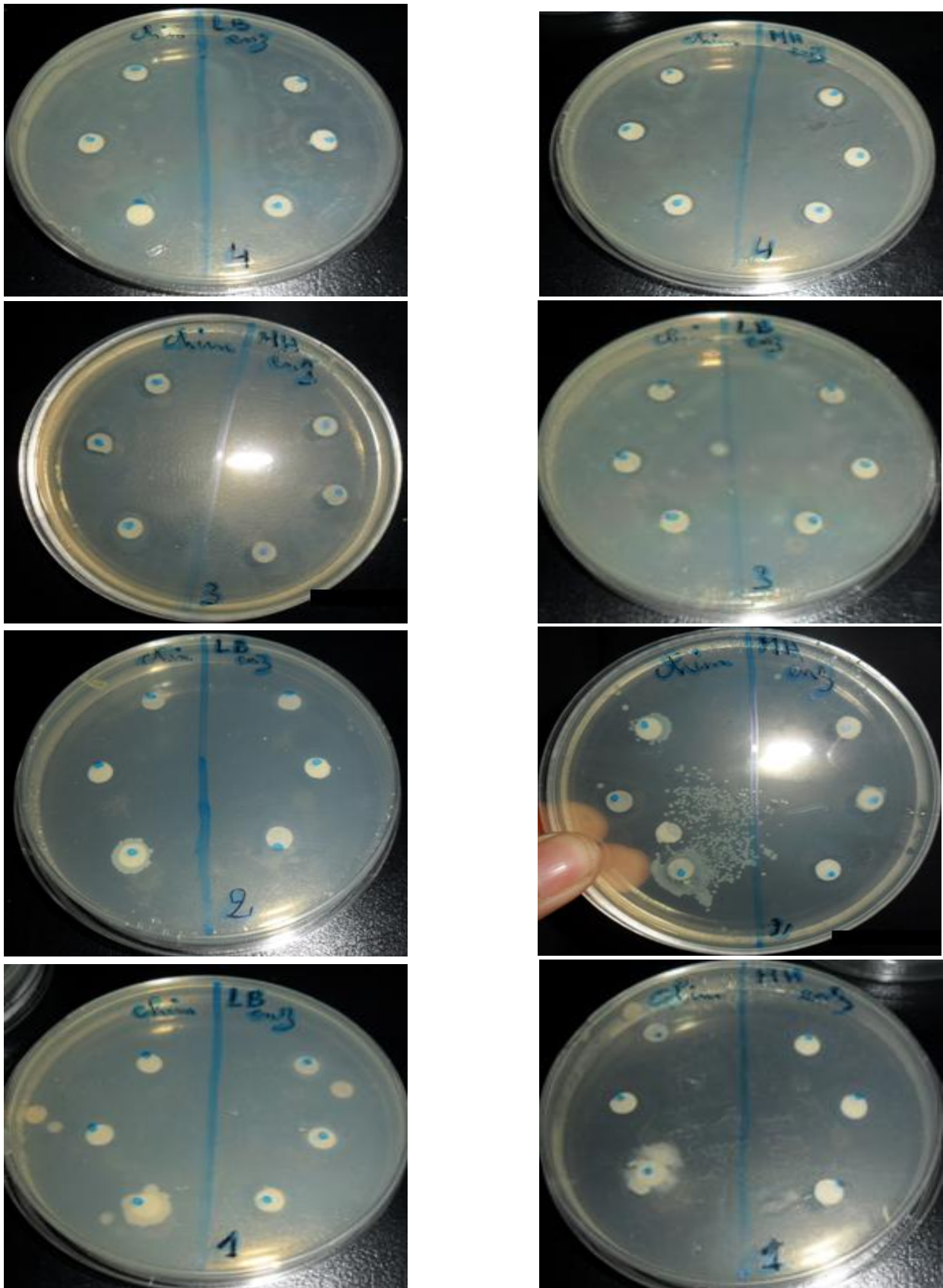


Figure 20 : un exemple de photos du pouvoir antibactérien du chitosane par la méthode des disques.
1 : *Pseudomonas sp* (G-), 2 : *staphylococcus aureus* (G+), 3 : *Escherichia coli* (G-), 4 : *Bacillus cereus* (G+)

3. Activité antioxydant du chitosane

3.1. Activité antioxydant totale

La figure 21 présente la croissance de l'activité antioxydant totale de chitosane chimique et le chitosane enzymatique ainsi que l'acide ascorbique en fonction des concentrations.

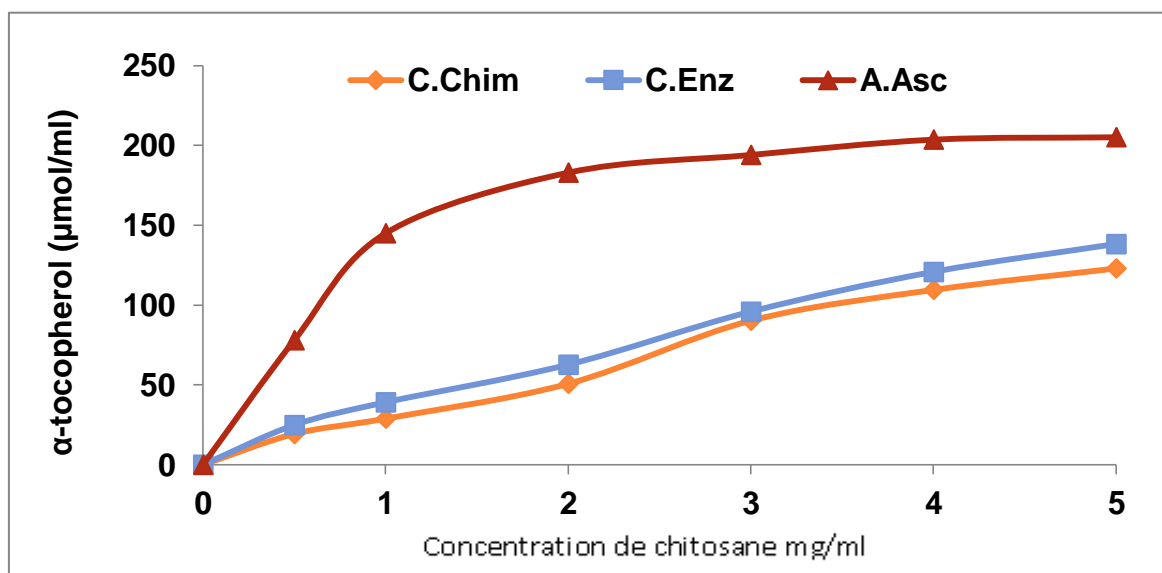


Figure 21 : la croissance de l'activité antioxydant totale du chitosane (chimique et enzymatique) comparé au contrôle (acide ascorbique) en fonction des concentrations.

L'acide ascorbique montre une croissance de l'activité antioxydante à concentration maximum de 200 $\mu\text{mol} / \text{ml}$ équivalents α -tocophérol). Cette valeur est moins élevée à celle obtenu par Hamdi *et al* (2017) (272 mmol / ml équivalents d' α -tocophérol) atteint à une concentration de 5 mg / ml .

La concentration du chitosane chimique et enzymatique sont presque identique est plus au moins faible que l'acide ascorbique à une valeur maximale de 140 $\mu\text{mol} / \text{ml}$ équivalents α -tocophérol, cette valeur est plus faible a celle obtenue par Hamdi *et al* (2017) (230 mmol / ml équivalents α -tocophérol).

3.2. Activité antioxydant (DPPH) du chitosane

Dans l'étude actuelle, la capacité de piégeage des radicaux DPPH de la crevette rouge a été étudiée, à différentes concentrations (0,2 à 10 mg / ml). Comme la montre la figure 22, le chitosane obtenu de la crevette rouge a montré une activité antioxydante notable contre le DPPH, dans une manière indépendante des différentes concentrations.

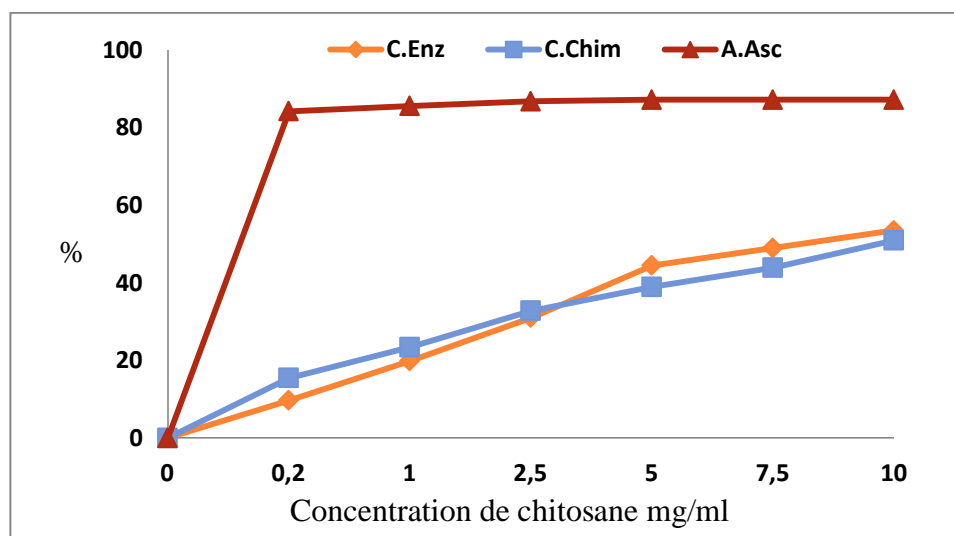


Figure 22 : Capacité d'élimination des radicaux DPPH par la solution du chitosane. (chitosane chimique(C.Chim), chitosane enzymatique(C.Enz),acide ascorbique(A.Asc).

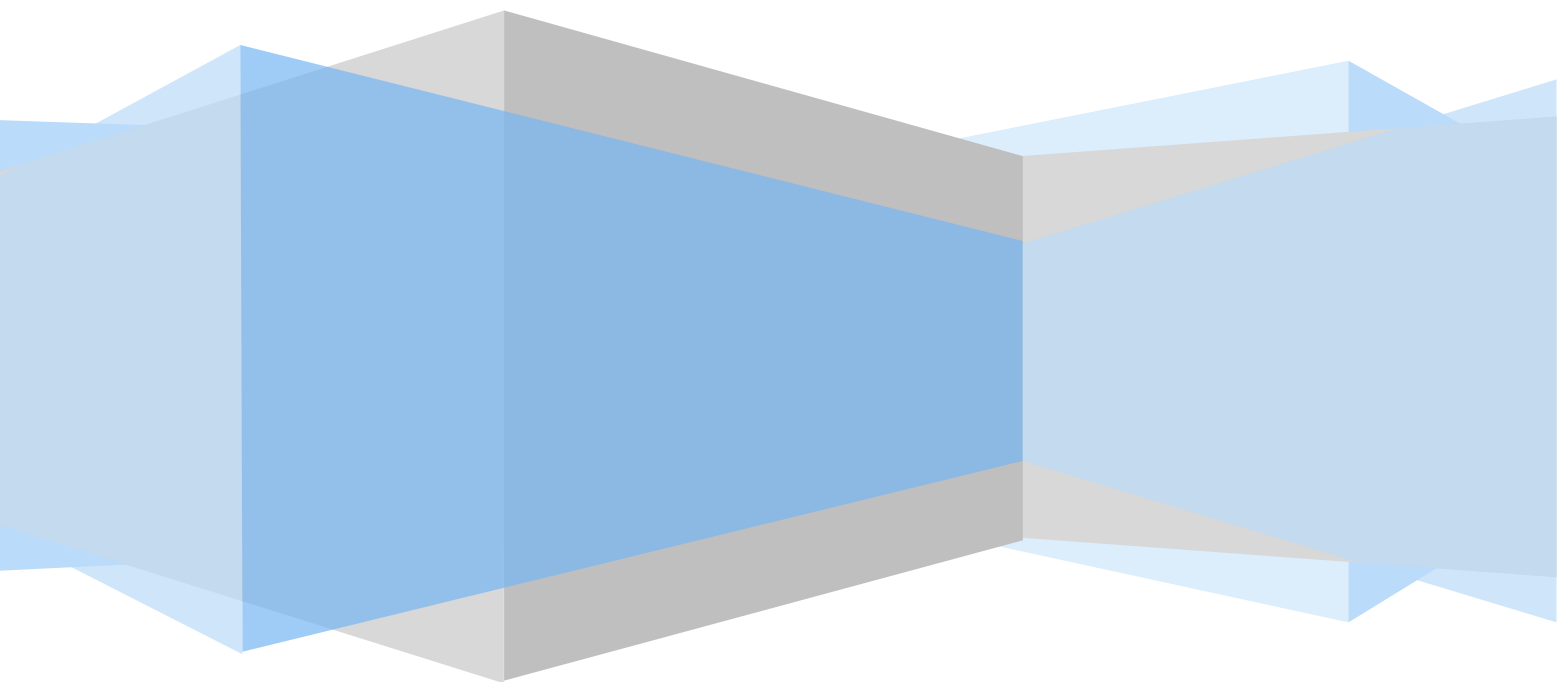
D'après la figure 22, Nous remarquons que Acide Ascorbique avait une activité antioxydant la plus élevée dès la concentration de 0,2 mg/ml et il a demeuré constant jusqu'à 10 mg/ml. Le chitosane chimique a montré une activité un peu élevée par rapport au chitosane enzymatique de début jusqu'à la concentration de 2,5 mg/ml, puis on a constaté une petite augmentation de l'activité du chitosane enzymatique par rapport au chitosane chimique.

Les résultats obtenus expliquent que les concentrations du chitosane enzymatique et chimique ont une valeur de 50% plus faible que l'acide ascorbique (85%) atteinte à une concentration de 10 mg / ml.

La valeur de la concentration inhibitrice semi-maximale (IC_{50}) de chitosane enzymatique est de 5,18 mg /ml et le chitosane chimique enregistre une valeur de l' IC_{50} de 5,74 mg/ml chez la crevette rouge.

Ces valeurs sont élevées par rapport à la valeur du chitosane de la crabe bleu obtenu par (M. Hamdi *et al.*, 2017) (1,76 mg/ml) et inférieur aux valeurs de l'IC₅₀ des chitosanes extrait de crabe de boue *Scylla olivacea* (Sarbon *et al.*, 2015) (11,37 mg/ml).

Conclusion générale



CONCLUSION GENERALE

Dans un univers de très forte compétitivité, où la ressource naturelle est limitée, valoriser au maximum son intrant est la clef de la pérennité pour toute l'industrie de la transformation des produits marins. Tirer la meilleure partie de sa matière première passe inéluctablement par apporter une valeur ajoutée à ses coproduits en amenant ses écarts de transformation vers de nouveaux marchés.

Au cours de ce projet de fin d'étude, notre intérêt portait sur la valorisation des coproduits de crevette rouge *Aristeus Antennatus*. Nos objectifs fondamentaux visés ont été achevés : le premiers était la détermination des différentes étapes d'extraction de la chitine et du chitosane à partir des coproduits de la crevette rouge *Aristeus Antennatus* par deux méthodes voir chimique et enzymatique. Le rendement massique de la chitine atteint 16% lors de l'extraction chimique et 60% en enzymatique. Le rendement massique obtenus après l'extraction du chitosane, est de 3% en méthode chimique et 23% en enzymatique.

Notre étude a été portée, aussi sur l'étude des caractéristiques biochimiques (humidité, protéines, lipides et cendres) des coproduits de la crevette. Selon les résultats évalués, le taux le plus important était celui de cendre (14.89%) et la protéine (13.12%).

Le deuxième objectif était l'étude de l'activité antibactérienne du chitosane par la méthode de diffusion en puits et par disques. Pour la méthode des puits, les résultats ont montré que les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles que celles à Gram négatif vis-à-vis de l'action du chitosane. Le chitosane chimique a marqué un diamètre d'inhibition important sur la souche *Staphylococcus aureus*. Le chitosane enzymatique a montré une activité antibactérienne sur les souches de *Pseudomonas. sp*, *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*.

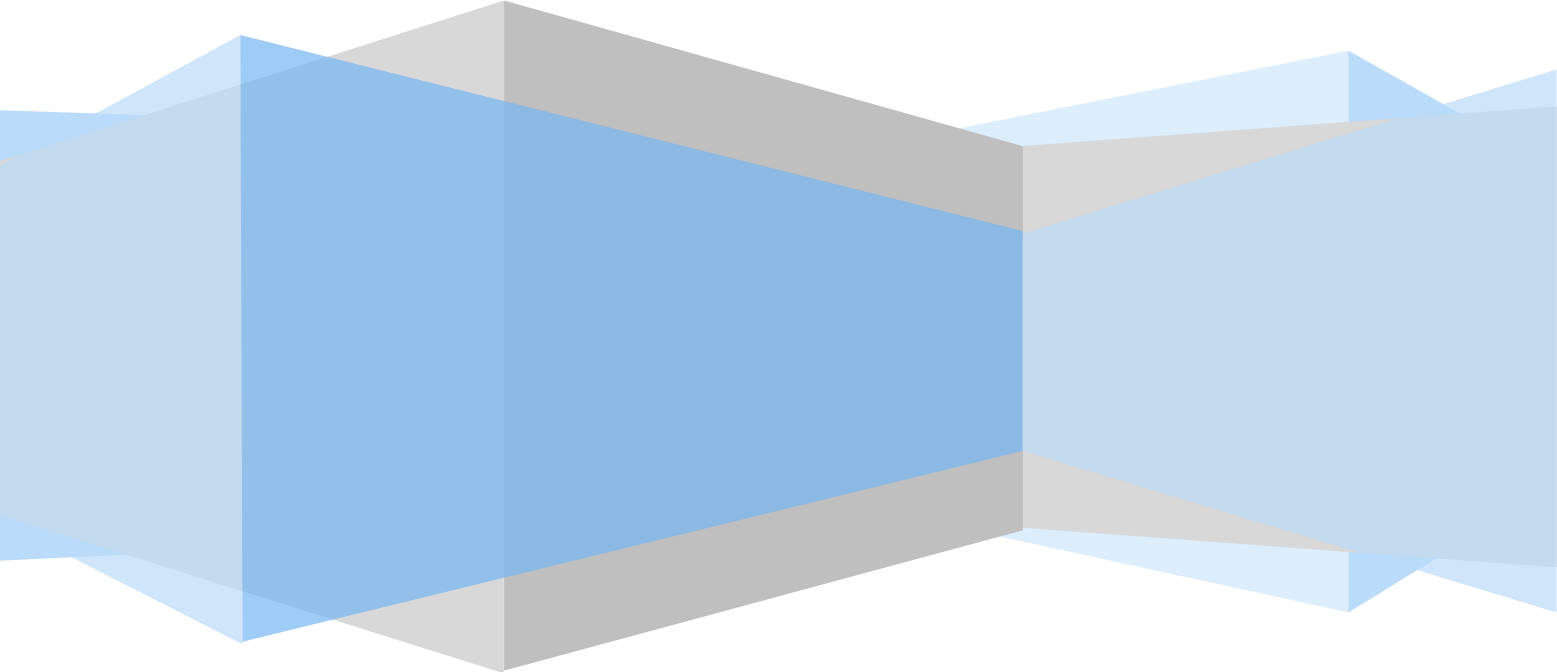
L'activité antifongique du chitosane chimique et enzymatique a été évaluée contre (*Candida Sp*, *Aspergillus. Sp*). Le chitosane enzymatique était hautement actif contre les deux espèces, mais le diamètre de la zone d'inhibition le plus important était celui du champignon *Aspergillus. Sp*.

Concernant la méthode des disques, Les deux chitosane chimique et enzymatique ont agi sur la plupart des bactéries à Gramme positif et à Gramme négatif (*E. coli* et *B. cereus* en milieu LB et (*E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* en milieu MH.

Pour déterminer l'activité antioxydant de chitosane, nous avons établi un ensemble des tests en fonction des concentrations croissantes en comparant avec acide ascorbique. Les résultats obtenus a permet de conclure que le chitosane chimique et enzymatique ont des activités antioxydants presque identique mais reste faible devant l'activité de l'acide ascorbique.

L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt du chitosane, celui-ci présente un pouvoir antimicrobien, antifongique et antioxydant assez attirant. A cet effet nous préconisons d'extraire ; de caractériser et d'exploiter les propriétés du chitosane de la tête de crevette, en tant que polymère doté de propriétés antimicrobiennes et antifongiques ainsi que antioxydants.

Annexe



Les milieux de culture utilisée

Muller Hinton :

Les compositions est comme suite :

Extrait de viande	1.5g
Tryptone	8.75g
Amidon.....	0.75g
Agar.....	8g

LB :

Les compositions est comme suite :

Extrait de levure	5g
Tryptone	10g
Nacl	5g
Agar.....	19g

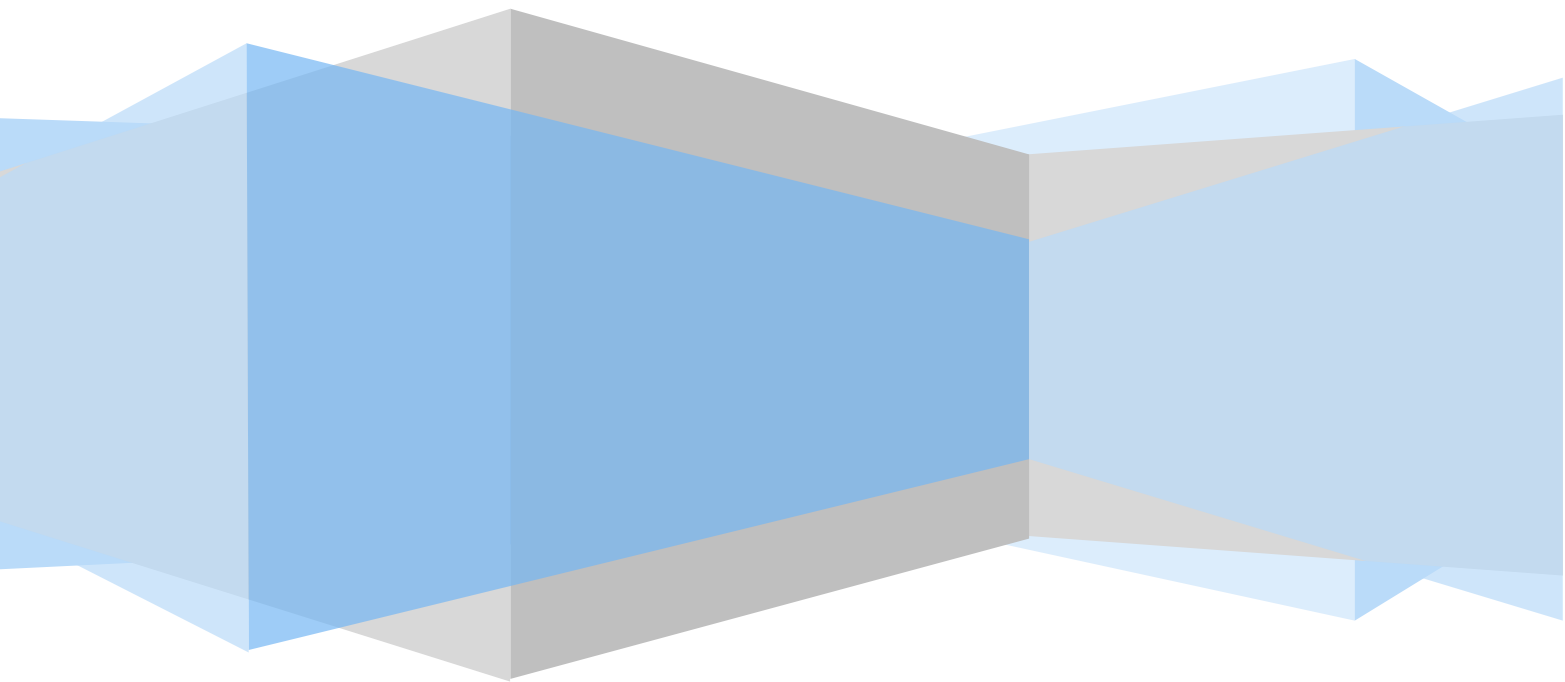
Milieu Malt :

Les compositions comme suite :

Extrait de Malt	18g
Agar.....	.6g

Bouillon Cœur-cervelle (BHIB) : (Réf : Cat.14000, Laboratoire Conda S.A, Spain) pour la vérification des souches avant chaque essai avec l'incubation dans l'étuve pendant 24 heures 37°C, et utilisé aussi comme un diluant pour étudier la cinétique de croissance des bactéries.

Bibliographie



-A-

Ababsa, A. (2012) : Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait. Mémoire de Magister Université Ferhat Abbas- SETIF.

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.

-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.

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.

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.

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.

Bueno- solano,C.,Lopez-Cervantes,J.,Campas-Baypoli,O.N.,Lauterio- Garcia,R.,Adan-Bante,N.P.& Sanchez-Machado,D.I.(2009):chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by –products. *Food chemistry*, 112, 671-675.

Bersuder, P., Hole, M., & Smith, G. (1998) : Antioxydants from a heated histidine -glucose model system. I : Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 181-187.

-C-

CAMPILLO,A .,1994 : Bio-écologie of *Aristeus antennatus* in the frech Mediterranean.N.T.R.- L.T.P.P., Special publication,3 :88 p.

Cao,W.,Zhang C., Hong,P.&Ji,H.(2008) : Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimphe ad and aminoacids during autolysis. *Foud chemistry* , 109,176-183.

BIBLIOGRAPHIE

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, 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.

-D-

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

Dumay ,J.,Donnay-Moreno,C.,Barnathan,G.,Jaouen,P.& Bergé, J.P.(2006):improvement of lipid and phospholipide recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscerausing industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41,2327-2332.

-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.

-F-

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.

FAO, 2009. The state of world fisheries and aquaculture 2008. in: F.F.a.A. Department (Ed.), Rome.

-G-

GRIMES, M et al. 2004 : BIODIVERSITE MARINE ET LITTORALE ALGERIENNE-Ed. SONATRACH-Ed.DIWAN, Alger-362p.

-H-

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

HOUSEMAN, J.G., 2000 :Crustacés et diversifié des Arthropodes. université d'ottawa. 7 p.

Housomi R., Fukumaga K., Arai H., Kanda S., Nishiyama T et yoshida M. (2012) : Fish protein Hydrolysates Affect cholesterol Metabolism in Rats Fed Non.cholesterol and High-cholesterol Diets. *Journal of Medical Food*. 15(3) :299-306

-I-

Ifremer, (2011) : 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.

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.

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.

-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.

KHERRAZ, A. 2006 : Premières Données sur la crevette Rouge, *aristeus antennatus* (Risso, 1816) de la région Oranaise. *Biologie-Ecologie*. P : 58-69.

Kim, I.Y., Lee, T.S. & Park, W.H. (2003): Synthesis of chitoooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and antimicrobial activity against streptococcus mutants. *International Journal of Biological Macromolecules* (32) :23-27.

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.

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

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

-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.

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.

Majeti, N. V. & Kumar, R. (2000): A review of chitin and chitosan applications., *React. & Func. Pol* 46 (1): 1-27.

Molmeret¹, M., Jones¹, S., Santic, M., Habyarimana, F., Esteban, M. T. G. & Abu Kwaik, Y. (2010): Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by *Legionella pneumophila* after bacterial escape into the host cell cytosol., *Environ. Microbiol.* March 12(3): 704–715.

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

Muzzarelli, R.A.A. & Peter, M.G. (1997): The chitin Handbook. In : Grottoammare., Ed. Atec, Haly , pp 528.

-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.

NOUAR, I.,2001 : Boi. écologie de *A.antennatus* (Risso,1816) et de *parapenaeuslongirostris* (Lucas,1846) des cotes Algeriennes.RAPP. Comm.Int Mer., 36 :304

p.No,H,K,&Mayers (1998):Préparation an charaterization of chitine and chitosane journal of Aquatic Food Product Technologie U,S,P-1995 : p25-52

-O-

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.

Pérez-Mateos, M. (2007) : Les applications alimentaires du chitosane et dérivés. Instituto del Frío (CSIC), José Antonio Novais, 10, E28040 Madrid, Spain.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999) : Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum Complex : Specific application to the determination of vitamin E.Analytical Biochemistry, 269, 337-341.

-Q-

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.

-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.

Rao, M. S., Chander, R. & Sharma, A. (2008): Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation., *LWT-Food Sci. Technol* (41) : 1995-2001.

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

Rinaudo, M. (2006) : Chitin and chitosan : Properties and application., *Prog. polym. Sci* 31 (7) : 603-632.

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.

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.

-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.NILSON.K.,1998 :Physiologie animale Adaptation et milieu de vi. Ed. DUNOD , PARIS :363 p.

Sekiguchi, S., Miura, Y., Kaneko, H., Nishimura, S.L., Nishi, N., Iwase, M. &

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.

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V.&Jeon, Y. J. (1999) : Foud application of chitin and chitosan., *Trends in foud 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.

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.

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

Synowiecki, J., Al-Khateeb, N. (2003): Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (2) : 145-171..

-T-

Tabak, S., Medouakh, L., Adda, M., Chekroun, A., Krantar, K. & Bensoltane, A. (2007): Interaction between *Helicobacter pylori* responsible for diseases gastro-duodenal and Bifidobacteria., *Egypt. J. App. Sci* (22): 72-83.

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.

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.

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

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.

Vanden Berghe, D. A., & Vlietinck, A. J. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods Plant Biochemistry*, 6, 47e69.

-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 hetero polysaccharides., *Carbohydr. Res* (323) : 156-162.

Youcefi, F. & Riazi, A. (2012): Extraction, Physicochemical Characterization and *in Vitro* Antioxidative Potential of Chitosan in Shrimp Shell Waste from Beni Saf Sea, Algeria.,

BIBLIOGRAPHIE

International Journal of Science and Research (IJSR.), ISSN (Online): 2319-7064. Impact Factor (2012): 3.358.

-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.

Zheng, L.Y. & Zhu, J.F. (2003): Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights., *Carbohydr Polymer* (54) : 527-530.

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.