

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés

MEMOIRE DE MAGISTER

Pour l'obtention du titre de

Magister en Génie de l'Environnement

Option : **Biotechnologie Environnementale**

Thème:

***PREPARATION D'OLIGOSACCHARIDES A
PARTIR D'UNE BIOMASSE MARINE :
LA CHITINE***

Présenté par :

M^{lle} SALAH RYM

Ingénieur d'Etat en Génie Biologique (U.S.T.H.B.)

Soutenu le 02 octobre 2005 devant le jury suivant :

Président :	N. MAMERI	Professeur	E.N.P.
Promotrice :	D.MAMERI	M.C.	E.N.P.
Co-promoteur :	M.S.BENHABILES	C.C.	U.M.M.T.O.
Examineurs :	D. ABDESSEMED	M.C.	U.S.T.H.B.
	H. LOUNICI	M.C.	U.M.M.T.O.
	A.S. MERAD	M.A.T.	I.N.E.S.S.M.

ENP 10, avenue Hassen Badi, El-Harrach, Alger.

الملخص:

- الهدف من هذه الدراسة هو تقييم القشرة الخارجية للجمبري الأبيض *Parapenaeus longirotris* لذلك قمنا بـ:
1. تحضير السكريات متعددة الوحدة السكرية "كيتين" و "كيتوزان" و نواتج تفككها المحضرة بين وحدتين سكريتين و عشرة . إيجاد الشروط المثلى لـ:
 2. أ. مرحلة نزع الأملاح المعدنية، بحيث وجدنا :
 - درجة الحرارة المثلى: حرارة الغرفة.
 - تركيز حمض الـ HCl : 1,5 مول/ل.
 - المدة الزمنية : ساعة
 - الكسو: وزن القشرة الخارجية/ حجم الحمض : 1 غ/15 مل.
 - ب. مرحلة نزع البروتينيات، بحيث وجدنا :
 - درجة الحرارة المثلى: 45°م.
 - تركيز حمض الـ NaOH : 2 مول/ل.
 - المدة الزمنية : ساعتين.
 - الكسو: وزن القشرة الخارجية/ حجم القاعدة : 1 غ/20 مل.
 3. لجأنا لإستعمال تقنية "FTIR" لتأكد من ماهية السكريات السليق ذكرها.
 4. وأخيرا درسنا تأثير المضاد الحيوي البكتيري على أربع أصناف "Gram +" : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Staphylococcus aureus* ATCC 43300، *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* و سبع أصناف "Gram -" : *Escherichia coli* ATCC 25922، *Escherichia coli* ATCC 27853، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Salmonella typhimurium*، *Vibrio cholerae*، *Shigella dysenteriae*، *Bacteroides fragilis*، *Enterobacter agglomerans* و *Prevotella melaninogenica* و على ضوء النتائج المتحصل عليها يمكننا التصنيف كما يلي:
تأثير الكيتين على أصناف: "Gram +" و *Staphylococcus aureus* ATCC 25922، *Escherichia coli* ATCC 25922، *Vibrio cholerae*، *Shigella dysenteriae*، *Bacteroides fragilis*، *Enterobacter agglomerans* و *Prevotella melaninogenica* (bactériostatique) ولا تأثير له على بقية الأصناف. أما تأثير الكيتوزان على أصناف: "Gram +" و *Escherichia coli* ATCC 25922، *Vibrio cholerae*، *Bacteroides fragilis*، *Shigella dysenteriae*، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Enterobacter agglomerans* و *Prevotella melaninogenica* كان مضاد لنموها (bactériostatique) ولا تأثير له على *Salmonella typhimurium*.
في حين نواتج تفكك الكيتين و الكيتوزان لها تأثير قاتل لجميع البكتيريا المستعملة (bactéricide).

الكلمات المفاتيح: كيتين، كيتوزان، نواتج تفكك الكيتين و الكيتوزان، تقييم، للجمبري، المضاد الحيوي البكتيري.

Résumé :

Cette étude consiste en la valorisation des carapaces de la crevette blanche *Parapenaeus longirotris* par la préparation de chitine, de chitosanes et de leurs oligomères par voie chimique. L'optimum de l'étape de déminéralisation est atteint à la température ambiante, 15ml d'HCl 1,5 N pour 1g de carapaces pendant 1 heure. Par contre, l'optimum de la déprotéinisation est atteint à la température de 45°C, 20ml de NaOH 2 N pour 1g de carapaces pendant 2 heures. La caractérisation des différentes substances sus-citées était réalisée par spectroscopie FTIR. Nous avons, par la suite, testé l'effet antibactérien de nos produits sur quatre souches à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* et sept souches à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter agglomerans*, *Prevotella melaninogenica* et *Bacteroides fragilis*.

Les oligomères ont démontré un effet bactéricide sur toutes les souches testées. Par contre, la chitine avait une activité bactériostatique sur les souches à Gram positif, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter agglomerans* et *Bacteroides fragilis*. Le chitosane, quant à lui, avait un effet bactériostatique sur toutes les souches testées à l'exception de *Salmonella typhimurium*.

Mots clés : chitine, chitosane, oligomères de la chitine et du chitosane, valorisation, crevette, effet antibactérien.

Abstract :

The aim of this study is to valorize the white shrimp shell *Parapenaeus longirotris*. This valorization consists in the chemical preparation of chitin, chitosans and their oligomers. The optimum of demineralisation is achieved at the atmospheric temperature, 15ml of HCl 1,5 N for 1g of shells during 1 hour. However, the optimum of deproteinisation is attained at 45°C, 20ml of NaOH 2 N for 1g of shells during 2 hours. The characterization of the various substances is done with FTIR spectroscopy. Then, we tested the antibacterial effect of the substances on four Gram positive bacteria : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and seven Gram negative bacteria : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter agglomerans*, *Prevotella melaninogenica* and *Bacteroides fragilis*.

The oligomers exhibited a bactericidal effect on all bacteria tested. However, chitin exhibited a bacteriostatic effect on Gram positive bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter agglomerans* and *Bacteroides fragilis*. Chitosan exhibited a bacteriostatic effect on all bacteria tested except *Salmonella typhimurium*.

Key words : chitin, chitosan, oligomers of chitin and chitosan, valorization, shrimp, antibacterial effect.

Dédicaces

Je dédie ce modeste ouvrage, fruit de longues années d'études inoubliables,

A mon très cher père, pour son sacrifice et ses conseils qui m'ont guidé dans la vie.

A ma très chère mère, pour sa tendresse et son sacrifice.

Qu'ils trouvent ici une humble expression de mon inaltérable amour.

*A ma très chère sœur Nawel, en espérant que Dieu ne lui réserve que de
bonnes surprises dans la vie,*

A ma tendre grand- mère, pour sa sollicitude et son affection,

A toute ma famille,

A tous ceux qui me sont chers,

Il est à vous.

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur MAMERI N., pour la confiance qu'il m'a accordé en m'accueillant au sein de son laboratoire de l'E.N.P., pour les conseils qu'il m'a prodigué tout au long de la réalisation de ce travail de Magister, tout en me laissant suffisamment de latitude dans la conduite de mon travail et d'avoir accepté d'être le Président du Jury .

Je tiens aussi à remercier vivement ma promotrice, Madame MAMERI D., Maître de Conférences à l'E.N.P., pour sa générosité, sa pertinence et la qualité de ses conseils et avis sur les travaux que j'ai pu mener.

Un grand merci pour à mon co-promoteur, Monsieur BENHABILES M.S., Chargé de Cours à l'U.M.M.T.O., pour sa gentillesse et ses suggestions.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame MERAD.A.S., Chef du Service Anaérobies de l'I.P.A, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire et d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie Monsieur LOUNICI H., Maître de Conférences à l'U.M.M.T.O., qui a su me guider tout au long de mon stage par ses suggestions et ses encouragements et d'avoir accepté de faire partie du Jury.

Je tiens à remercier Monsieur ABDESSEMED D., Maître de Conférences à l'U.S.T.H.B., d'accepter d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent à Mme ABDI-HAIDER N., Chargée de Cours à l'E.N.P., pour sa gentillesse et son aide.

Merci à Monsieur BENABDELKADER M., chef du service milieu de culture de l'I.P.A, pour avoir généreusement donné les souches bactériennes.

Je remercie également Monsieur NOUAR A., Maître de Conférences à l'U.S.T.H.B. pour ses conseils ainsi que pour l'aide prodiguée pour l'identification de notre espèce.

Un grand merci à l'ensemble des enseignants et étudiants du laboratoire que j'ai pu côtoyer durant ces années passées au laboratoire pour leur bonne humeur et leurs compétences.

A toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de ce mémoire,

Merci

Liste des tableaux

1. Production mondiale globale de crabe, langouste et crevette (tonnes métriques).....	2
2. Caractéristiques des bactéries testées.....	36
3. Protocoles utilisés pour la préparation du chitosane.....	38
4. Protocoles utilisés pour la préparation des oligomères de la chitine et du chitosane.....	38
5. Les conditions optimisées de la déminéralisation pour 1 g de carapaces.	56
6. Les conditions optimisées de la déprotéinisation pour 1 g de carapaces..	60
7. Résultats de l'analyse des carapaces et des différents produits.....	61
8. Les résultats des concentrations minimales inhibitrices pour les différentes souches.....	69

Liste des figures

1- Production mondiale en crevettes.....	3
2- Les différentes fonctions des oses.....	7
3- La classification des glucides.....	8
4- La transformation des oses en furfurals.....	9
5- L'interconversion des oses.....	10
6- L'épimérisation des oses.....	10
7- La réduction des oses.....	11
8- Structures du D- glucose, du D- glucosamine et du N-acétyl D- glucosamine.....	13
9- Structure de la cellulose.....	13
10- Structure de la chitine.....	14
11- Les différentes formes polymorphiques de la chitine.....	15
12- La biosynthèse de la chitine.....	16
13- Action des différentes enzymes sur la chitine.....	18
14- Structure du chitosane.....	21
15- Hydrolyse enzymatique de la chitine et du chitosane.....	25
16- Méthodes utilisées pour la préparation de la chitine et ses dérivés.....	40
17- Viscosimètre de type Ubbelohde.....	43
18- Optimisation de la concentration en acide chlorhydrique.....	54
19- Optimisation de la durée de la déminéralisation.....	55
20- Optimisation du volume d'acide chlorhydrique.....	56
21- Optimisation de la concentration en hydroxyde de sodium.....	57
22- Optimisation de la durée de la réaction de déprotéinisation.....	58
23- Optimisation de la température de la réaction de déprotéinisation.....	59
24- Optimisation du volume en hydroxyde de sodium.....	60
25- Résultat de la spectroscopie F.T.I.R. pour la chitine.....	62
26- Résultat de la spectroscopie F.T.I.R. pour le chitosane I.....	62
27- Résultat de la spectroscopie F.T.I.R. pour le chitosane II.....	63

28- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Stapylococcus aureus</i> ATCC 25923 (souche sensible à la pénicilline).....	70
29- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Stapylococcus aureus</i> ATCC 43300 (souche résistante à la pénicilline).....	70
30- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Bacillus subtilis</i> I.P.A.	72
31- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Bacillus cereus</i> I.P.A.	73
32- Effet des différents produits sur la croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	76
33- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Vibrio ogawa</i> I.P.A....	78
34- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Shigella dysenteriae</i> I.P.A.....	80
35- Effet des différents produits sur la croissance d' <i>Enterobacter agglomerans</i> I.P.A.....	81
36- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Bacteroides fragilis</i> I.P.A.....	83
37- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	84
38- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Prevotella</i> <i>melaninogenica</i> I.P.A.....	87
39- Effet des différents produits sur la croissance de <i>Salmonella typhimurium</i> I.P.A.....	89
40- Courbe d'étalonnage de la coloration de Biuret effectuée avec de la peptone de caséine.....	115
41- Concentration des bactéries selon Mc Farland.....	115
42- Variation de la viscosité de la chitine en fonction de la concentration...	116
43- Variation de la viscosité du chitosane I en fonction de la concentration.	116
44- Variation de la viscosité du chitosane II en fonction de la concentration	117
45- <i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846).....	117

Liste des abréviations

A.T.C.C. : American Type Culture Collection.

C.M.I.: concentration minimale inhibitrice.

D.A. : degré d'acétylation.

D.D. : degré de désacétylation.

I.P.A. : Institut Pasteur d'Alger.

T.G.Y.: Trypticase-Glucose-Yeast extract.

Sommaire

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	II
Liste des abréviations.....	III
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	VI
Introduction.....	1
Chapitre I :Synthèse des connaissances actuelles.....	5
1. Les glucides.....	6
1.1. Historique.....	6
1.2. Définitions.....	6
1.2.1. Les oses.....	6
1.2.2. Les osides	7
1.3. Propriétés physico-chimiques	8
1.3.1. Propriétés physiques.....	8
1.3.2. Propriétés chimiques.....	8
2. La chitine.....	12
2.1. Historique.....	12
2.2. Structure chimique.....	13
2.3. Solubilité de la chitine.....	15
2.4. Biosynthèse de la chitine.....	16
2.5. Biodégradation de la chitine.....	17
2.6. Préparation de la chitine.....	18
2.6.1. La méthode chimique.....	19
2.6.2. La méthode biologique.....	19

3. Dérivés de la chitine.....	20
3.1. Le chitosane.....	20
3.1.1. Historique.....	22
3.1.2. Obtention du chitosane.....	22
3.1.3. Solubilité du chitosane.....	23
3.1.4. Poids moléculaire.....	23
3.1.5. La viscosité du chitosane.....	24
3.2. Les oligomères de la chitine et du chitosane.....	24
4. Propriétés de la chitine et de ses dérivés.....	25
5. Applications de la chitine et de ses dérivés.....	27
5.1. Applications biomédicales.....	27
5.2. Applications environnementales et contrôle de la pollution.....	29
5.3. Applications à l'industrie alimentaire.....	30
5.4. Applications à l'agriculture.....	31
5.5. Autres applications.....	31
Chapitre II : Matériel et méthode.....	33
1. Matériel biologique.....	34
2. Méthodes.....	37
2.1. Extraction et préparation des différentes substances.....	37
2.2. Détermination des propriétés physico-chimiques.....	40
2.2.1. Mesure du taux de cendre.....	40
2.2.2. Mesure de la teneur en protéines lors de l'optimisation de la déprotéinisation.....	41
2.2.3. Mesure du degré de désacétylation.....	42
2.2.4. Mesure du poids moléculaire.....	42
2.2.5. Mesure de la densité apparente.....	45
2.2.6. Mesure de la densité réelle.....	45
2.2.7. Mesure du taux de chitine dans la carapace.....	46
2.2.8. Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl.....	47
2.3. Application : Etude de l'effet antibactérien des différentes substances préparées.....	50
2.3.1. Préparation des différents milieux.....	50

2.3.1.1. Pour les bactéries aérobies.....	50
2.3.1.2. Pour les bactéries anaérobies.....	50
2.3.2. Etude de l'effet inhibiteur.....	52
Chapitre III : Résultats et discussion.....	53
1. Préparation des différents produits.....	54
1.1. Optimisation de la déminéralisation.....	54
1.1.1. Optimisation de la concentration en acide chlorhydrique.....	54
1.1.2. Optimisation de la durée de la déminéralisation.....	55
1.1.3. Optimisation du volume d'acide chlorhydrique	55
1.2. Optimisation de la déprotéinisation.....	57
1.2.1. Optimisation de la concentration en hydroxyde de sodium.....	57
1.2.2. Optimisation de la durée de la réaction de déprotéinisation.....	57
1.2.3. Optimisation de la température de la réaction de déprotéinisation.....	58
1.2.4. Optimisation du volume en hydroxyde de sodium	59
1.3. Caractérisation de la carapace des crevettes, de la chitine et des chitosanes.....	61
2. Discussion.....	63
3. L'étude de l'effet antibactérien.....	68
3.1. Les bactéries à Gram positif.....	69
3.2. Les bactéries à Gram négatif.....	75
4. Discussion.....	90
Conclusion.....	98
Références bibliographiques.....	101
Annexe	113

1. Les glucides :

Largement répandus dans la nature, les glucides représentent une masse probablement plus importante que celle de tous les autres composés organiques réunis. Ils entrent pour une part importante dans la constitution chimique des êtres vivants.

1.1. Historique :

Des écrits arabes du XII^{ème} siècle mentionnent le « sucre » du raisin (glucose) (**cité par Kessous, 2002**). En 1747, le pharmacien allemand Marggraf isole du saccharose pur à partir de la betterave à sucre. Puis il extrait « ein art zucker » (une sorte de sucre) du raisin. En 1838, le chimiste français Dumas le baptise « glucose ».

Vers les années 1900, les travaux remarquables du chimiste allemand Emile Fischer établissent la structure du glucose et de plusieurs autres oses.

À l'origine ces composés ont été appelés « hydrates de carbone » car on les croyait composés uniquement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène mais de nouvelles découvertes ont modifié et élargi la définition initiale. Le terme « glucide » est le seul à employer actuellement pour nommer ces substances. En effet, dès 1923, la Commission Internationale de Nomenclature de Chimie Biologique réunie à Cambridge a décidé de son usage, sur la proposition de Gabriel Bertrand. L'ancienne appellation d'hydrates de carbone est définitivement supprimée (**Kessous, 2002**).

1.2. Définitions :

Les glucides sont des polyalcools comportant des fonctions aldéhydes ou cétones. Les glucides sont divisés en deux groupes: les oses et les osides.

1.2.1. Les oses :

Les oses ou sucres simples ont pour formule brute $C_n(H_2O)_n$ avec :

- ❖ n-1 fonctions alcool
- ❖ 1 fonction aldéhyde ou cétone

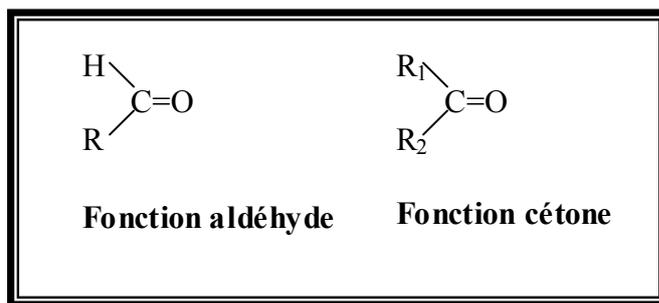


Figure n°2 : Les différentes fonctions des oses

(Percheron, *et al.*, 1981)

Deux critères permettent la classification des oses :

- ❖ Le nombre d'atomes de carbone présents dans la structure de l'ose. Les hexoses, par exemple, contiennent 6 carbones. Les plus connus sont le glucose contenu dans le miel et les fruits, et le fructose qui comme son nom l'indique est retrouvé dans les fruits.
- ❖ La nature de la fonction carbonyle (Figure n°2). Si c'est une fonction aldéhyde, l'ose sera considéré comme un aldose, et s'il s'agit d'une fonction cétone, l'ose en question appartiendra à la famille des cétooses.

1.2.2. Les osides :

Les osides ou glucides complexes sont composés de plusieurs hexoses. Les plus simples ne sont composés que de deux, on parle de disaccharides. Les plus complexes sont appelés polysaccharides.

Les osides sont divisés en holosides et hétérosides (Figure n°3) :

- ❖ Les holosides résultent de l'association exclusive de n molécules d'oses.
- ❖ Les hétérosides, quant à eux, résultent de l'association d'une ou plusieurs molécules d'oses avec une substance non glucidique ou aglycone. L'aglycone peut être une protéine, un lipide ou un autre groupement chimique **(Percheron, *et al.*, 1981)**.

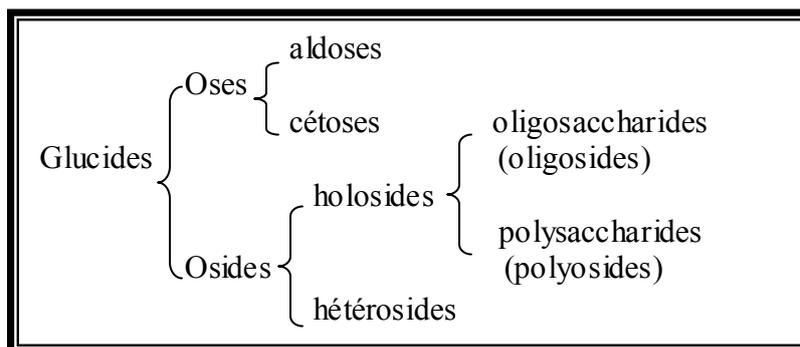


Figure n°3: La classification des glucides

(Perche ron, 1981)

1.3. Propriétés physico-chimiques:

1.3.1. Propriétés physiques:

- ❖ Solubilité : Les oses sont très solubles dans l'eau et peu solubles dans l'éthanol.
- ❖ Propriétés spectrales : les oses possèdent un spectre caractéristique dans l'infrarouge.

1.3.2. Propriétés chimiques:

- ❖ Stabilité :
 - En milieu acide : Les oses sont stables en milieu acide dilué. En milieu acide concentré et à chaud, les oses sont déshydratés en furfural (Figure n°4).

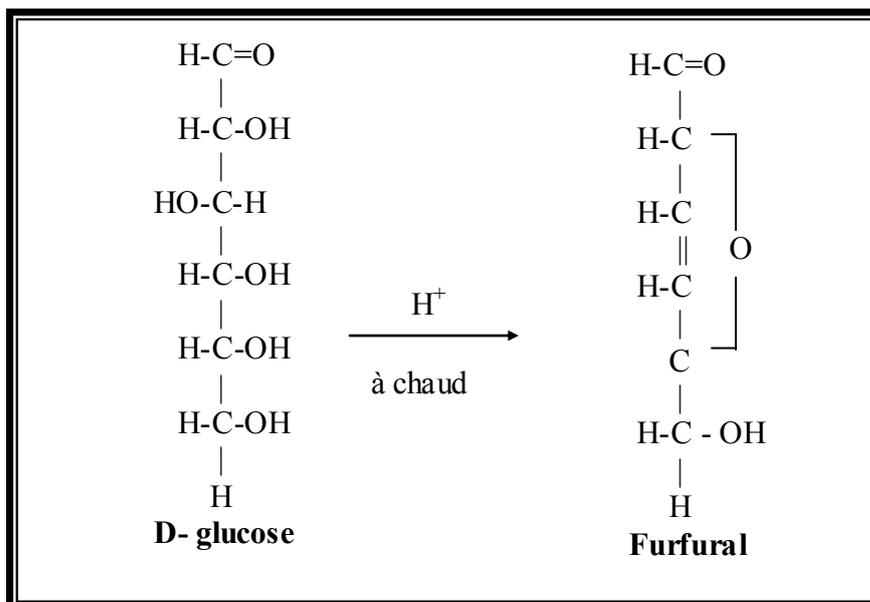


Figure n°4: La transformation des oses en furfurals

(Louisot, 1983)

Les furfurals, en se condensant avec les phénols, les amines cycliques ou les hétérocycles azotés, ont la propriété de former des produits dont la coloration est caractéristique de l'ose initial. Si ces produits sont suffisamment stables, leurs colorations peuvent servir au dosage de l'ose.

- En milieu alcalin : Les solutions alcalines diluées à température ambiante, produisent des isomérisations au niveau du carbone anomérique et du carbone voisin sans modifier le reste de la chaîne carbonée. Nous pourrions ainsi obtenir soit une interconversion d'un aldose en un cétose correspondant (ou l'inverse) (Figure n°5) soit une épimérisation (Figure n°6).

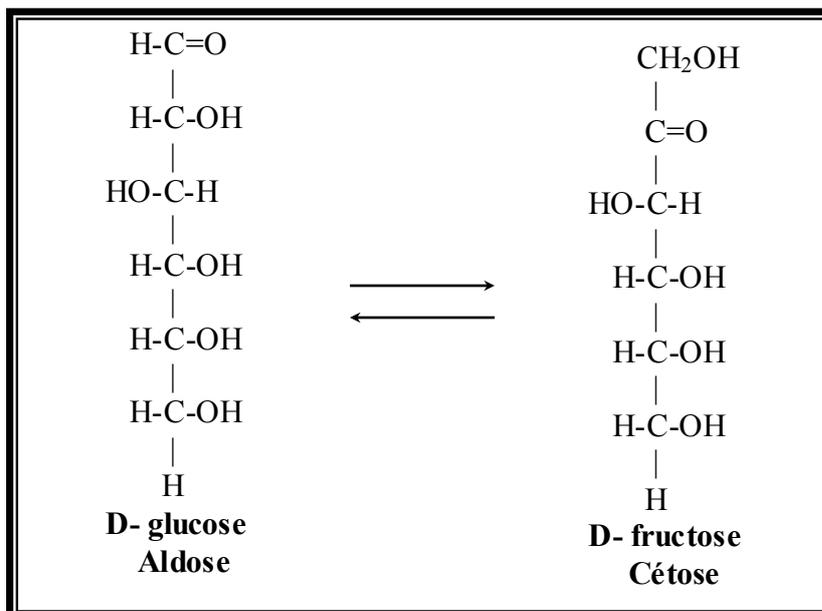


Figure n°5: L'interconversion des oses (Kessous, 2002)

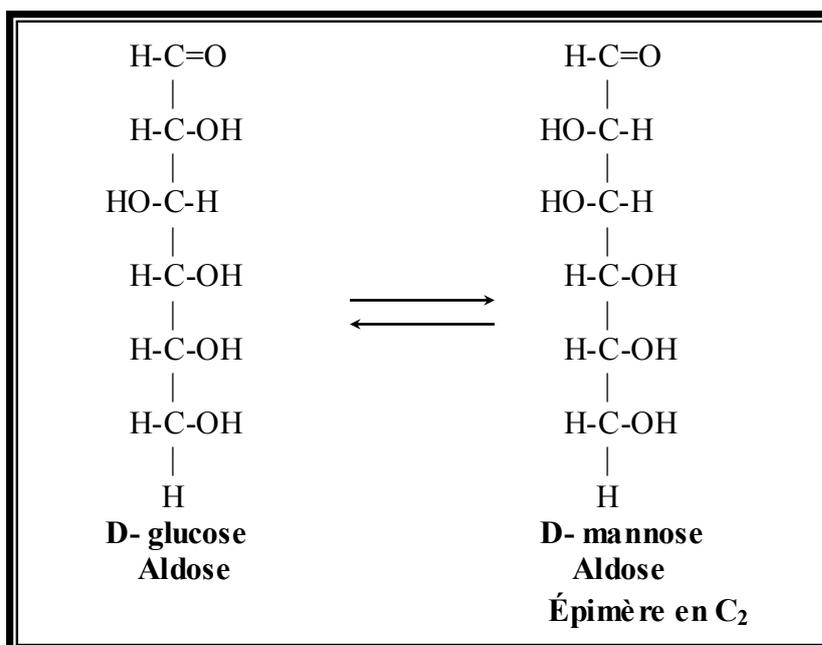


Figure n°6: L'épimérisation des oses (Kessous, 2002)

Cette épimérisation est une réaction biologique importante catalysée par une enzyme.

A concentration élevée et à chaud, les solutions alcalines entraînent des réarrangements moléculaires, des polymérisations et des dégradations.

❖ Propriétés chimiques dues à la présence de la fonction carbonyle :

➤ Réduction des oses :

La fonction carbonyle est réduite en fonction alcool par hydrogénation catalytique (sur noir de platine ou nickel Raney) ou par action du borohydrure de Na (NaBH_4) (Figure n°7) (Louisot, 1983).

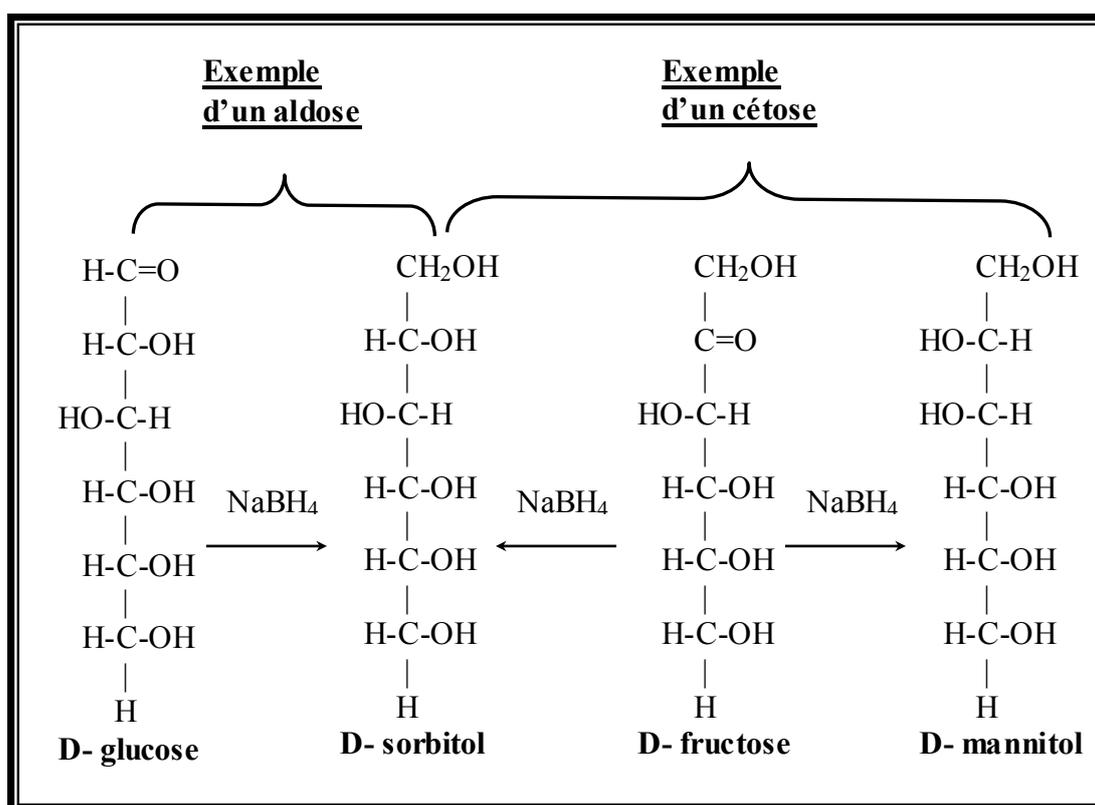


Figure n° 7: La réduction des oses

(Louisot, 1983)

Ces réductions ne sont pas réversibles par voie chimique, mais elles le sont par voie enzymatique.

➤ Oxydation des oses : Il y a trois possibilités d'oxydation :

- L'oxydation ménagée des aldoses par voie chimique (le brome ou l'iode en milieu alcalin, ou l'acide nitrique très dilué) ou enzymatique transforme la fonction aldéhydrique des aldoses en groupement carboxylique, conduisant à la formation d'un acide aldonique.
- L'oxydation plus poussée des aldoses par l'acide nitrique, transforme la fonction alcool primaire en même temps que la

fonction carbonyle en fonction carboxylique. Nous obtenons des diacides nommés acides glycariques ou acides aldariques.

- Lorsque la fonction carbonyle est préalablement protégée par combinaison à l'U.D.P. (Uridine DiPhosphate), seule la fonction alcool I du carbone 6 est oxydée en fonction carbonyle. Nous obtenons des acides uroniques. Ce 3^{ème} type présente un grand intérêt biologique. Les acides uroniques vont se combiner par voie enzymatique aux divers produits toxiques (médicaments, produits de dégradation cellulaire ou hormonale) à éliminer de l'organisme. C'est un important processus d'épuration fonctionnant chez l'homme appelé glucuro-no-conjugaison (**Chapeville et Clauser, 1974 ; Kessous, 2002**).

2. La chitine :

La chitine est un produit naturel issu de la biomasse, particulièrement abondant dans les carapaces d'arthropodes. Elle a une structure cristalline et constitue un réseau de fibres organisées. Elle confère la rigidité et la résistance aux organismes qui en contiennent (**Majeti et Kumar, 2000**).

La chitine est un bio-polymère de haut poids moléculaire ($1,033 \times 10^6$ à $2,53 \times 10^6$ Da), non toxique et biodégradable. C'est après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature (crustacés, mollusques, insectes et champignons). Elle a, en plus, des propriétés chimiques et biologiques exceptionnelles utilisables dans de nombreuses applications industrielles et médicales (**Majeti et Kumar, 2000 ; Jeon et Kim, 2000 (a)**).

2.1. Historique :

La chitine fut décrite en premier lieu en 1811 par le Professeur Braconnot, H. (Professeur d'histoire naturelle et directeur des jardins botaniques à l'Académie des Sciences à Nancy, France). En traitant des champignons avec une base forte diluée, il isola un produit qu'il nomma « fungine ». Odier, A. à découvert en 1823 la même substance qu'il renomma « chitine » du grec « kheitôn » signifiant tunique ou enveloppe. La composition chimique de la chitine (glucosamine et acide acétique) fut mise en évidence par Lebberhose, G. en 1878 et confirmée par Gilson, E. en 1894 (**Kerkut et Gilbert, 1985**).

2.2. Structure chimique :

La chitine est un copolymère constitué d'unités de répétition de deux sucres aminés : le D-glucosamine et le N-acétyl D-glucosamine, liés par des liaisons β -(1 \rightarrow 4) (Tan et Lee, 2002) (Figure n°8).

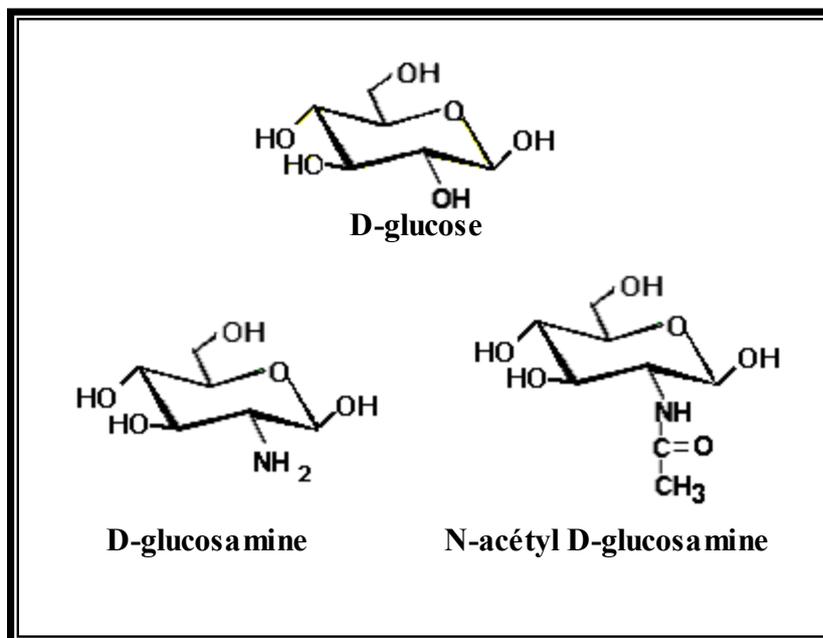


Figure n° 8: Structures du D-glucose, du D-glucosamine et du N-acétyl D-glucosamine

La chitine est considérée comme le dérivé acétamide de la cellulose (Figures n°9 et 10).

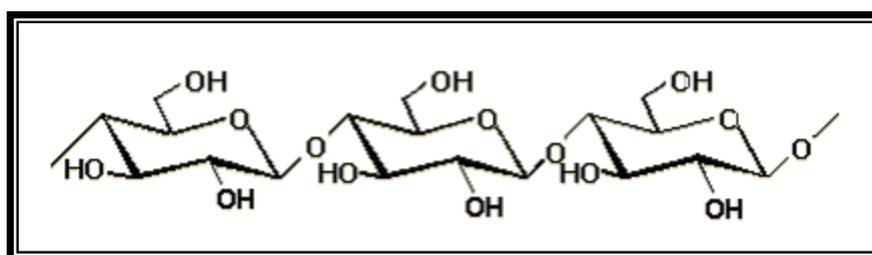


Figure n° 9: Structure de la cellulose

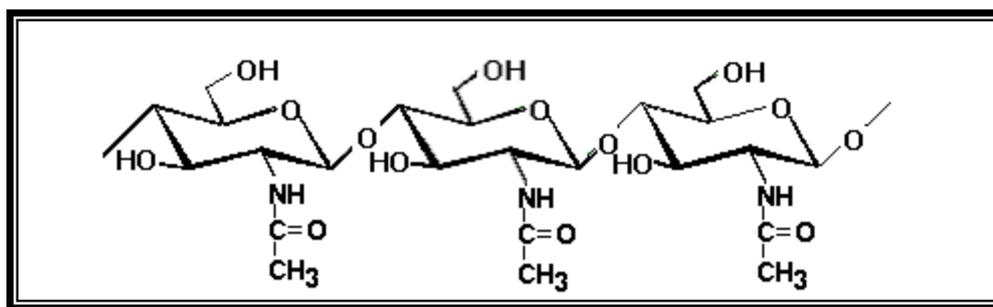


Figure n° 10: Structure de la chitine

Les longues chaînes de chitine pouvant atteindre 500 monomères, prennent trois formes polymorphiques (Figure n°11):

- La chitine α : c'est la forme la plus abondante, la plus stable et la plus rigide des trois, elle fut proposée par Carlstrom, D. (1957), elle est formée de chaînes qui sont associées de manière antiparallèle (Taboada, *et al.*, 2003 ; Falini, *et al.*, 2003).

Elle est surtout retrouvée dans la paroi des crustacés, mollusques, insectes et des champignons (Taboada, *et al.*, 2003). Elle est souvent retrouvée à l'état lié à des protéines ou des composés inorganiques (Tan et Lee, 2002 ; Hamodrakas, *et al.*, 2002).

- La chitine β : elle est supposée être moins stable que la chitine α et est formée de chaînes parallèles (Taboada, *et al.*, 2003 ; Falini, *et al.*, 2003). Flexible et résistante (Tan et Lee, 2002), elle est retrouvée dans les crochets de calamars, dans les parois des diatomées et les tubes des pogonophores (Taboada, *et al.*, 2003).
- La chitine γ : comparée aux chitines α et β , la chitine γ est plus rare. Elle est formée de chaînes parallèles et antiparallèles. Elle est flexible et résistante (Tan et Lee, 2002).

La chitine γ est essentiellement retrouvée dans les cocons des insectes (Taboada, *et al.*, 2003) et la paroi intestinale des calamars (Tan et Lee, 2002).

Remarque : les formes β et γ peuvent se changer en forme α après différents traitements (Taboada, *et al.*, 2003).

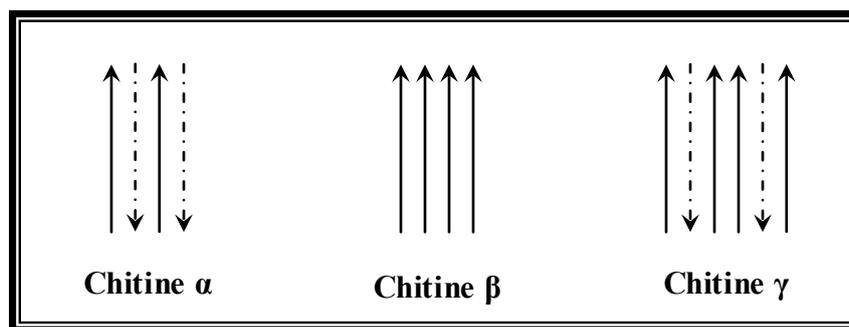


Figure n°11 : Les différentes formes polymorphiques de la chitine

La chitine a une configuration relativement rigide due à ses liaisons glycosidiques singulières. Et par conséquent, la chitine forme facilement des films torsionnables et le matériau qui en résulte a de très bonnes propriétés mécaniques (Tan et Lee, 2002).

2.3. Solubilité de la chitine :

A cause des fortes liaisons hydrogène intermoléculaires, la chitine a une affinité très limitée pour les solvants. La chitine α est insoluble dans la plupart des solvants. Elle est soluble dans le N,N-diméthylacétamide (DMAc) contenant 5-10% LiCl et quelques solvants fluorés tels que l'hexafluoroacétone et l'hexafluoro-2-propanol, et l'importance de cette solubilité varie selon la source de la chitine. Des mélanges de DMAc et N-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP) contenant 5-8% de LiCl sont fréquemment employés pour préparer des films. Le méthanol saturé avec du chlorure de calcium dihydraté, qui est un solvant pour les nylons, a été récemment utilisé pour solubiliser la chitine bien que le chlorure de calcium anhydre semble être inapproprié (Kurita, 2001 ; Majeti et Kumar, 2000 ; Muzzarelli, *et al.*, 2004 ; Austin, 1977).

La chitine β , contrairement à la chitine α , est caractérisée par une grande affinité pour l'eau et les solvants organiques grâce à ses faibles liaisons hydrogène intermoléculaires. La chitine β est soluble dans l'acide formique (Kurita, 2001 ; Majeti et Kumar, 2000).

2.4. Biosynthèse de la chitine :

La biosynthèse de la chitine est assurément une acquisition ancienne des êtres vivants : elle existe chez les champignons inférieurs et supérieurs, les chlorophycées, les protozoaires...etc. (Figure n°12).

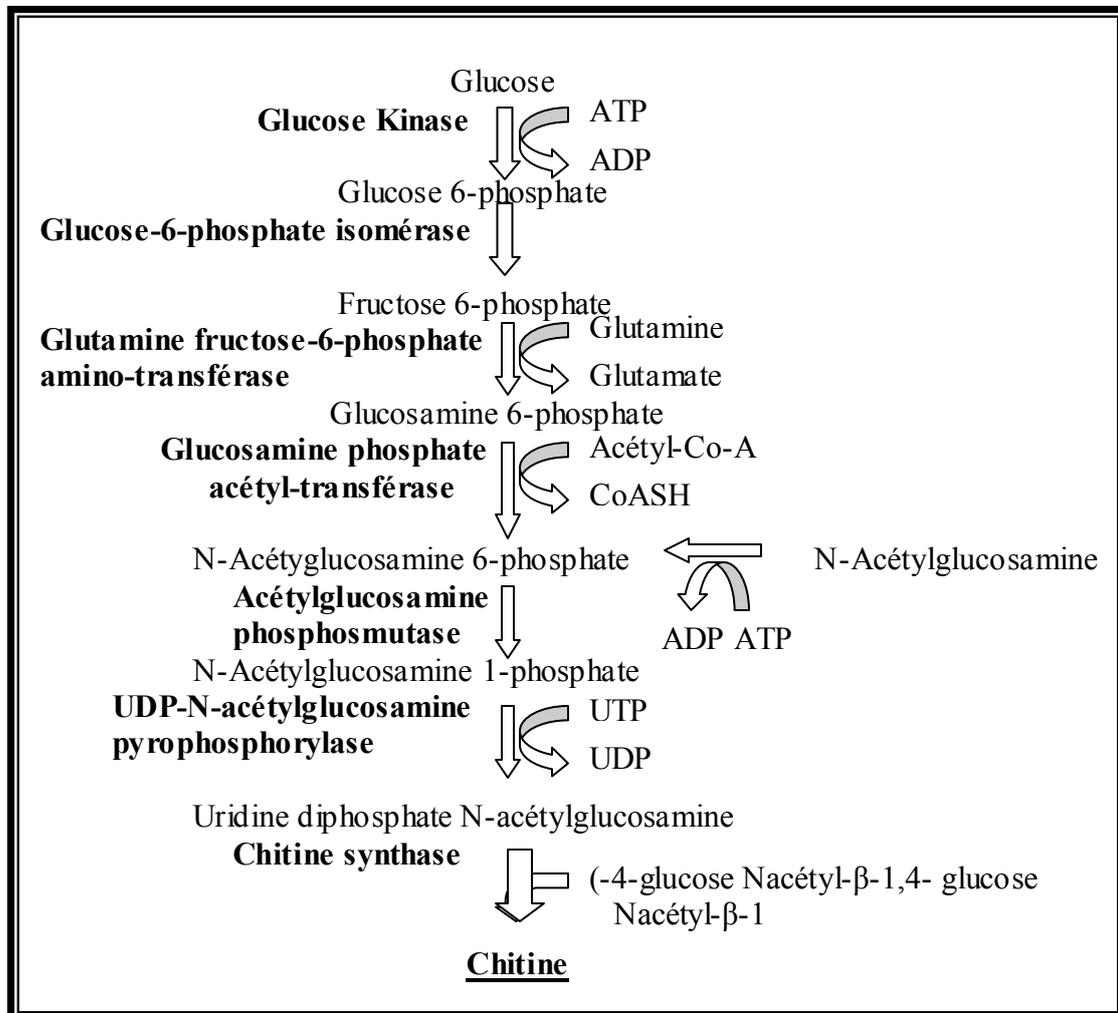


Figure n°12 : La biosynthèse de la chitine

(Mansencal, 1999 ; Merzendorfer et Zimoch, 2003 ; Imai, *et al.*, 2003)

Plusieurs recherches ont démontré que le glycogène peut être un précurseur de la biosynthèse de la chitine chez les crustacés (Kerkut et Gilbert, 1985).

2.5. Biodégradation de la chitine :

Plusieurs enzymes peuvent catalyser la réaction de dégradation de la chitine (Figure n°13):

- Les chitinases : Il s'agit d'un groupe d'enzymes ubiquitaires, que l'on peut retrouver chez les eucaryotes, procaryotes, et les virus. Ces enzymes hydrolytiques sont capables de fragmenter la chitine en N-acétyl chitooligosaccharides (chaînes de 3 à 10 monomères), diacétyl chitobioses et N-acétyl glucosamines. Il existe 2 sortes de chitinases :
 - Les endochitinases hydrolysent les ponts glycosidiques à l'intérieur du polymère.
 - Les exochitinases ôtent le dernier résidu N-acétyl glucosamine à la terminaison non réductrice de la chitine.
- Les chitobiosidases : libèrent des diacétyl chitobioses de l'extrémité non réductrice du polysaccharide.
- Lysozyme : en plus de son action bactéricide, le lysozyme (mucopeptide N-acétyl muramoyl hydrolase) peut fragmenter aussi les chaînes chitineuses.

Le monomère *N*-acétylglucosamine ainsi obtenu peut être métabolisé pour générer de l'énergie, du CO₂, de l'H₂O, et du NH₃ (**Kerkut et Gilbert, 1985 ; Cohen-Kupiec et Chet, 1998 ; Gutowska, 2002 ; Warren, 1996**).

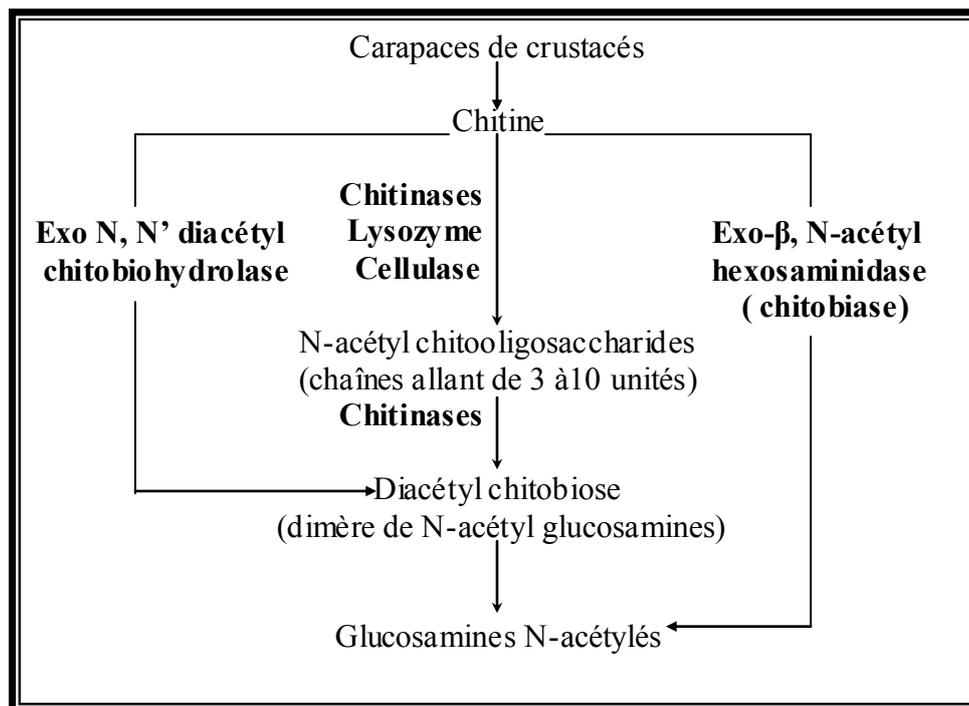


Figure n°13 : Action des différentes enzymes sur la chitine

(Haki et Rakshit, 2003 ; Saguez, 2002; Brison, 1971)

La chitine peut aussi être dépolymérisée chimiquement en combinant l'effet de la chaleur à celle d'un acide fort concentré. Les monomères sont obtenus en augmentant le temps de l'hydrolyse (Loiseleur, 1963).

2.6. Préparation de la chitine :

Dans la nature, la chitine est généralement associée à des protéines, des lipides, des pigments et des dépôts de calcium (Ca CO_3). Pour cela, la chitine doit être purifiée avant toute utilisation commerciale. Cette purification consiste en deux étapes majeures :

- ❖ La **déminéralisation** : qui consiste en l'élimination des minéraux en utilisant un acide dilué et
- ❖ La **déprotéinisation** : qui est la séparation des protéines moyennant une base diluée ou des enzymes protéolytiques.

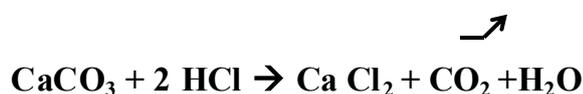
D'autres étapes facultatives, dépendant de la spécification d'utilisation du produit fini, peuvent être rajoutées aux étapes précédentes, telle que la **décoloration**

pour éliminer les pigments en utilisant de l'acétone ou du peroxyde d'hydrogène (**Tan et Lee, 2002**).

Il existe deux méthodes pour produire de la chitine:

2.6.1. Méthode chimique :

❖ La **déminéralisation** est effectuée par extraction des minéraux contenus dans les carapaces avec de l'HCl dilué et à température ambiante. Dans cette réaction, le carbonate de calcium CaCO_3 réagit avec l'HCl pour former du chlorure de calcium soluble CaCl_2 et du dioxyde de carbone gazeux CO_2 :



Le processus de déminéralisation ne dépasse pas 2 à 3 heures lorsqu'il est effectué avec une bonne agitation. Cependant, des temps de réaction de 30 minutes jusqu'à 2 jours dus aux méthodes de préparation, ont été cités. Les études ont démontré que le degré de déminéralisation dépend étroitement de la concentration de l'acide utilisé. En général, la quantité d'acide utilisée, pour assurer une réaction complète, doit être stœchiométriquement égale ou supérieure à la quantité de minéraux présents dans la carapace (**Tan et Lee, 2002**).

❖ Lors de la **déprotéinisation**, les protéines sont extraites des carapaces par traitement avec de l'hydroxyde de sodium dilué à des températures élevées (65°C à 100°C). Le temps de réaction usuel est de 30 minutes à 6 heures, selon la méthode de préparation utilisée. Un traitement alcalin prolongé sous des conditions sévères entraîne une dépolymérisation et une désacétylation (**Tan et Lee, 2002**).

2.6.2. Méthode biologique :

L'intérêt croissant à trouver des méthodes alternatives pour l'extraction de la chitine pouvant maximiser l'utilisation des carapaces tout en préservant l'environnement a conduit à l'utilisation d'enzymes protéolytiques et de bactéries

protéolytiques pour éliminer une grande partie des protéines liées à la chitine. Certains auteurs ont proposé une méthode toute simple d'acidification par des bactéries lactiques. Ce processus fait apparaître deux fractions: la première liquide contenant des protéines, des minéraux et de l'asthaxanthine (pigment des crevettes) et une fraction solide formée de chitine (**Tan et Lee, 2002 ; Yang, et al., 2000**).

Lors de la fermentation des déchets de carapaces en présence de bactéries lactiques dans un milieu de culture adéquat, il y a production d'acide lactique ainsi que différentes protéases (**Rao, et al., 2000**). L'acide lactique, produit par catabolisme de la source de carbone, va créer une atmosphère de faible pH qui va inhiber la croissance des autres microorganismes du déchet. Le carbonate de calcium, lié à la chitine, est éliminé en réagissant avec l'acide lactique, formant du lactate de calcium qui précipite et qui pourra donc être éliminé par un simple lavage (**Tan et Lee, 2002**). La déprotéinisation et la liquéfaction simultanées des carapaces sont dues à des bactéries présentes dans le système intestinal des crustacés, à des enzymes protéolytiques produites par les bactéries lactiques additionnées ou aux protéases présentes dans le déchet (**Rao, et al., 2000**).

3. Dérivés de la chitine :

3.1. Le chitosane :

Le chitosane est un polymère cationique dérivé de la chitine (Figure n°14). Le chitosane et la chitine sont tous les deux des copolymères de même structure chimique globale et ne se distinguent que par la proportion relative des unités glucosamines et N-acétyl glucosamines les constituant, c'est à dire leurs degrés de désacétylation (D.D.) ou leurs degrés d'acétylation (D.A.). Le D.D. étant le pourcentage de groupements amines dans le polysaccharide.

$$\mathbf{D.A. = 100\% - D.D.}$$

Ainsi, le **chitosane** possède **D.D. >56%** et donc un **D.A. ≤ 44**, alors que la **chitine** a un **D.D. ≤ 44** et un **D.A. >56%**. Ces données dépendent de la source du produit et sa méthode d'extraction (**Fernandez-Kim, 2004**).

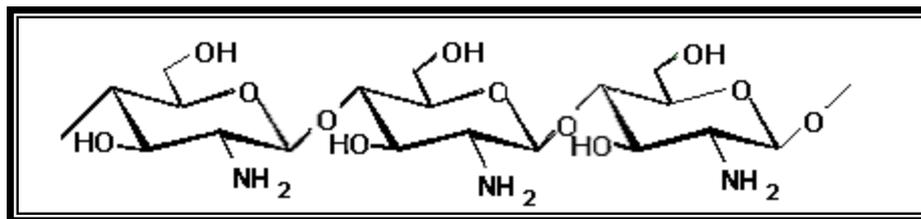


Figure n°14 : Structure du chitosane

Il existe plusieurs méthodes pour la détermination du degré de désacétylation du chitosane, dont :

- ◆ Le test à la ninhydrine
- ◆ La titration potentiométrique linéaire
- ◆ La spectroscopie infrarouge
- ◆ La chromatographie en phase gazeuse
- ◆ La gel perméation
- ◆ La spectroscopie $^1\text{H-NMR}$
- ◆ L'hydrolyse acide
- ◆ La chromatographie en phase liquide à haute performance (H.P.L.C.)
- ◆ La spectroscopie à résonance magnétique
- ◆ La titrimétrie au bromure d'hydrogène
- ◆ La spectroscopie dérivée de l'UV

(Fernandez-Kim, 2004; Majeti et Kumar, 2000 ; Niola, *et al.*, 1993 ; Muzzarelli, 1998 ; Prochazkova, *et al.*, 1999 ; Varum, *et al.*, 1995 ; Lavertu, *et al.*, 2003).

La méthode la plus fréquemment utilisée, pour l'estimation du D.D. du chitosane, est la spectroscopie I.R., proposée pour la première fois par Moore et Roberts en 1980. Ses avantages majeurs sont : sa rapidité, et sa non-exigence vis-à-vis de la pureté de l'échantillon à analyser. Le D.D. est calculé grâce à l'équation suivante :

$$\text{DD} = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33]$$
 selon Domszy and Roberts, 1985
(Fernandez-Kim, 2004; Khan, *et al.*, 2002).

Le chitosane a deux avantages majeurs par rapport à la chitine : sa solubilité et l'existence de groupements amines (sites actifs pour de nombreuses réactions chimiques) (**Fernandez-Kim, 2004**).

Le chitosane est retrouvé dans la plupart des zygomycètes. Il est extrait directement à partir de *Mucor rouxii* (**Da Silva Amorim, et al., 2001**).

3.1.1. Historique :

Le chitosane est isolé et identifié pour la première fois sous le nom de « chitine modifiée » en 1859 par Rouget qui, après avoir soumis la chitine à un traitement basique sous reflux avec une solution concentrée d'hydroxyde de potassium, trouve que le produit ainsi obtenu possède des caractéristiques physico-chimiques bien différentes du polymère naturel dont il est issu. Trente-cinq ans plus tard Hoppe-Seyler décrit une procédure permettant d'obtenir, par chauffage à 180°C de chitine d'origine animale (carapace de crabes, scorpions et araignées), un produit soluble dans l'acide acétique dilué, qu'il n'identifie pas comme étant la « chitine modifiée » découverte par Rouget et crée alors le terme de chitosane. Ce n'est qu'au siècle suivant (1934) qu'une procédure de fabrication de chitosane à partir de son parent naturel, la chitine est décrite par Rigby dans un brevet (**Felt, 1999 ; Hennen, 1996**).

3.1.2. Obtention du chitosane :

Rare dans la nature, le chitosane est toutefois présent en tant que composant de la paroi cellulaire de champignons (contrairement aux levures qui sont riches en chitine (**Al-Bassam, et al., 1986**)) tels que *Phycomyces blakesleeanus* et *Mucor rouxii* ainsi que chez certains arthropodes (**Felt, 1999**) et insectes comme dans la paroi abdominale des reines termites (**Seng, 1988**). La majorité des chitosanes commercialisés proviennent de la désacétylation alcaline de la chitine, abondamment présente dans la nature.

La désacétylation peut se faire par voie chimique en utilisant une base forte concentrée à haute température ou par action de la désacétylase. Les conditions peuvent être homogènes ou hétérogènes. Une autre méthode moins usitée consiste en l'acétylation partielle de chitosanes pour obtenir d'autres chitosanes (**Felt, 1999**).

3.1.3. Solubilité du chitosane :

La solubilité du chitosane est l'un de ses avantages majeurs par rapport à la chitine (soluble que dans des solvants très toxiques). Bien qu'il soit insoluble dans l'eau et les solvants organiques, ce polyamine est soluble dans les acides aqueux dilués. Il est soluble dans l'acide chlorhydrique et les acides organiques aqueux tels que l'acide formique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide lactique. L'efficacité de la solubilité dépend de l'acide employé et de sa concentration. La solubilité diminue avec l'augmentation de la concentration de l'acide, et les solutions aqueuses de quelques acides, tels que l'acide phosphorique, l'acide sulfurique, l'acide citrique et l'acide sébacique, semblent être de piètres solvants pour le chitosane (**Kurita, 2001**).

Il existe plusieurs facteurs agissant sur la solubilité du chitosane, tels que : la température et le temps de réaction de la désacétylation, la concentration en base, les traitements antérieurs appliqués à l'isolation de la chitine, le rapport chitine/base et la taille des particules.

A pH 7,0 la stabilité de la solubilité du chitosane est médiocre. A pH élevé, le chitosane tend à précipiter ou à former un gel. Des complexes polyioniques entre le chitosane et les hydrocolloïdes anioniques résultent de la formation du gel (**Felt, 1999**).

Le chitosane solubilisé peut être régénéré ou solidifié grâce à un coagulant. Le choix du coagulant dépend du solvant utilisé pour la solubilisation du chitosane (**Majeti et Kumar, 2000**).

3.1.4. Poids moléculaire :

Le chitosane est un bio-polymère de haut poids moléculaire (10 – 250 kDa) (**Majeti et Kumar, 2000**).

A l'instar de sa composition, le poids moléculaire du chitosane varie avec la source du matériel brut ainsi que sa méthode de préparation. En général, les hautes températures, l'oxygène dissout, et les conditions drastiques peuvent provoquer la dégradation du chitosane induisant la diminution du poids moléculaire (**Felt, 1999**).

Le poids moléculaire du chitosane peut être déterminé par chromatographie ou viscosimétrie (**Felt, 1999 ; Majeti et Kumar, 2000**).

3.1.5. La viscosité du chitosane:

La viscosité est un facteur important dans la détermination du poids moléculaire du chitosane et la détermination de ses applications commerciales dans des environnements biologiques complexes telle que l'alimentation. Les chitosanes de haut poids moléculaire rendent les solutions très visqueuses, ce qui est un inconvénient pour la maintenance industrielle.

Différents facteurs agissant lors de la désacétylation tels que le degré de désacétylation, le poids moléculaire, la concentration de la solution, les forces ioniques, le pH, et la température affectent la production du chitosane et ses propriétés **(Felt, 1999)**.

L'effet de la taille des particules a été étudié par plusieurs auteurs. Certains auteurs ont démontré que les petites particules (1mm) donnent lieu à un chitosane dont la viscosité et le poids moléculaire sont nettement supérieurs à ceux d'un chitosane issu de particules de taille 2 ou 6,4 mm. Ils ont aussi prouvé que les grandes particules exigent un temps de réaction de désacétylation plus long. En revanche, il a été démontré qu'une chitine de dimension 20-80 mesh (0,177-0,841 mm) n'affecte nullement la viscosité des solutions de chitosane **(Felt, 1999)**.

Il est possible de calculer le poids moléculaire à partir de la viscosité du chitosane, dans une solution à 0,2M d'acide acétique et 0,3M d'acétate de sodium, en employant l'équation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = KM^\alpha = 1,81 \times 10^{-3} M^{0,93}$$

Avec :

$[\eta]$: viscosité intrinsèque.

M : La masse molaire.

K et α : constantes.

(Mirzadeh, *et al.*, 2002).

Le poids moléculaire de la chitine ($1,033 \times 10^6$ à $2,53 \times 10^6$) est réduit (1×10^4 à $2,5 \times 10^5$) après désacétylation **(Majeti et Kumar, 2000)**.

3.2. Les oligomères de la chitine et du chitosane:

L'hydrolyse de la chitine et du chitosane, par voie chimique (acide et haute température) ou enzymatique, génère des oligosaccharides (chaînes de chitine ou chitosane contenant 2 à 10 unités) (Figure n°15).

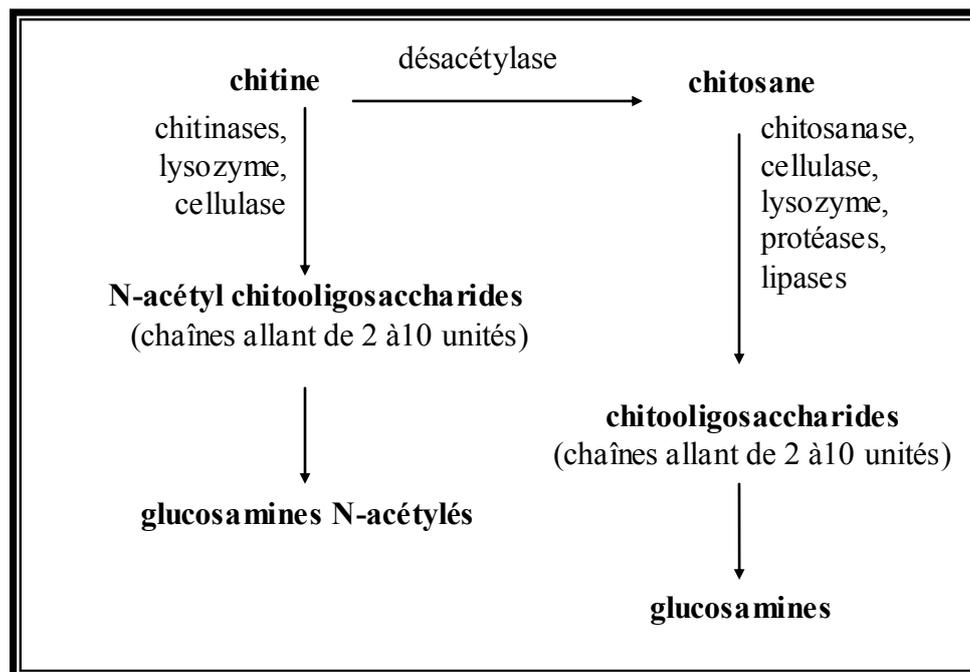


Figure n°15: Hydrolyse enzymatique de la chitine et du chitosane

(Yaku, *et al.*, 1990 ; Jeon et Kim, 2000 (b); Cohen-Kupiec et Chet, 1998; Kerkut et Gilbert, 1985 ; Muzzarelli, *et al.*, 2002).

L'avantage des oligosaccharides sur la chitine et le chitosane réside dans le fait qu'ils soient hydrosolubles (Seng, 1988). Les oligomères de la chitine et du chitosane ont suscité beaucoup d'intérêts ces dernières années (Chang, *et al.*, 2000 ; Jeon et Kim, 2000 (a) ; Jeon et Kim, 2000 (b) ; Jeon, *et al.*, 2001 ; No, *et al.*, 2002 ; Nakakuki, 2002).

L'hydrolyse acide de la chitine sous des conditions drastiques produit des D-glucosamines relativement pures (Majeti et Kumar, 2000).

Le passage de la forme acétylée à la forme désacétylée des oligomères se fait par voie chimique ou enzymatique (Tokuyasu, *et al.*, 2000).

4. Propriétés de la chitine et de ses dérivés :

La chitine et le chitosane ont la particularité d'être des polysaccharides très basiques contrairement à la plupart des polysaccharides naturels, tels que la cellulose, le dextran, la pectine, l'acide alginique, l'agar, l'agarose et les carragenanes, qui sont

neutres ou acides. Cette singularité a été utilisée dans plusieurs applications (**Majeti et Kumar, 2000**).

La chitine, le chitosane et leurs oligomères sont :

➤ Biocompatibles :

La chitine et le chitosane sont des biopolymères naturels ne possédant aucun caractère antigénique et de ce fait sont parfaitement compatibles avec les tissus vivants. Leur caractère antithrombogène et hémostatique confirme leur possibilité d'emploi dans tous les domaines de la biologie (**Chung, et al., 2004**).

➤ Cicatrisants :

Le chitosane forme des films perméables à l'air. Il favorise la régénération cellulaire tout en protégeant les tissus des agressions microbiennes. On a reconnu, de plus, au chitosane une activité biostimulante sur la reconstitution de tissus. Cette propriété a permis la fabrication d'une peau artificielle utilisée pour les greffes des grands brûlés et des applications en chirurgie comme les fils de suture en chitine (**Felse et Panda, 1999**).

➤ Anti-cholestémiant :

Le chitosane est capable de piéger les lipides à leur pH d'insolubilisation dans le tube digestif. Administré à des rats, le chitosane diminue de façon significative le taux de cholestérol dans le sang (**Jeon, et al., 2000**).

➤ Agents de chélation :

Grâce à leurs grands pourcentages en azote (6,89%), la chitine et ses dérivés sont des agents remarquables de chélation (**Majeti et Kumar, 2000**). Le chitosane est utilisé aussi bien comme support de chromatographie que pour le piégeage des métaux lourds et l'épuration des eaux usées (**Jeon, et al., 2000**).

➤ **Biodégradables :**

La chitine et le chitosane sont biodégradables. Des enzymes, la chitinase et la chitosanase, scindent ces biopolymères en oligomères, qui seront pris en charge par le métabolisme (**Chung, et al., 2004**).

5. Applications de la chitine et de ses dérivés:

La chitine et ses dérivés ont démontré un potentiel d'applications inestimable :

5.1. Applications biomédicales:

➤ **Traitement du cancer :**

La chitine et le chitosane conjugués au 5-fluoro-uracyl ont pu démontrer une grande activité antitumorale. La chitine et le chitosane conjugués sont beaucoup plus efficaces et diminuent les effets secondaires du 5-fluoro-uracyl seul (**Felse et Panda, 1999**). Le chitosane « soluble dans l'eau » est connu comme étant un agent anticancéreux (**Tan et Lee, 2002**).

L'hexa-N-acétyl chitohexaose ((GlcNAc)₆) et l'hexachitohexaose ((GlcN)₆) possèdent des propriétés antitumorales et immuno-activatrices (**Chang, et al., 2000 ; Chung, et al., 2004 ; Jeon, et al., 2000 ; Shahidi, et al., 1999**).

➤ **La rétention du calcium et la diminution du cholestérol:**

Les oligomères du chitosane (de 3 à 7 monomères) augmentent la rétention du calcium dans l'organisme contrairement au chitosane qui diminue l'absorption du calcium et autres minéraux (**Jeon, et al., 2000**). Le chitosane a démontré qu'il est capable de diminuer le taux de cholestérol sanguin (**Andrade, et al., 2003**).

➤ **La distribution de médicaments dans l'organisme et élimination des effets secondaires des médicaments:**

La carboxyméthylation de la chitine sur le groupement hydroxyl du C-6 des résidus N-acétyl glucosamine augmente considérablement la biodégradabilité et la

solubilité de la chitine dans l'eau. Ceci va permettre à la chitine d'être utilisée comme transporteur de médicaments dans l'organisme. Les systèmes d'acheminement de médicaments utilisant la chitine sont utilisés pour contrôler la libération des médicaments au moment et à l'endroit spécifique. La carboxyméthyl chitine est utilisée, entre autre, comme transporteur de la méthaphétamine dans les injections sous-cutanées (**Felse et Panda, 1999 ; Rolland et Mumper, 2001 ; Illum et Chatfield, 2002 ; Qaqich et Amiji, 1999 ; Payet, *et al.*, 2002 ; Chenite, *et al.*, 2001 ; Säkkinen, 2003 ; Gogev, *et al.*, 2003**). Lors de la prise de certains médicaments, il y a perturbation des propriétés des mucines. Ces molécules, protectrices des voies respiratoires, reproductives et gastro-intestinales, maintiennent leurs propriétés en interagissant avec le chitosane (**Deacon, *et al.*, 1999**).

➤ **Activation immunologique et activation de la coagulation:**

La chitine, le chitosane et leurs oligomères ont des propriétés immunologiques. Ils n'ont aucun comportement antigénique. Ils se comportent comme un activateur typique de cellules B polyclonales (**Seng, 1988 ; Konno, *et al.*, 2002 ; Benesch et Tengvall, 2002 ; Ruel-Gariepy, *et al.*, 2002**).

➤ **Traitement des brûlures, des ulcères et cicatrisation des plaies :**

La chitine et ses dérivés ont un effet accélérateur de la cicatrisation des plaies car ils possèdent des propriétés d'activateurs cellulaires et d'attachement aux cellules (**Tan et Lee, 2002**). Le chitosane possède aussi la capacité de traiter les brûlures. Il forme des films résistants, biocompatibles qui absorbent l'eau. Ces films peuvent être formés directement sur la brûlure par application d'une solution aqueuse d'acétate de chitosane, qui procure un effet rafraîchissant apaisant lors de son application. La chitine et le chitosane possède aussi un effet analgésique. Ces films ont pour avantage, aussi, d'être très perméables à l'oxygène, ce qui évite l'étouffement des tissus blessés. Ces films sont naturellement dégradés par les enzymes du corps d'où l'élimination de la contrainte de décoller le film appliqué à une brûlure (**Austin, *et al.*, 1981 ; Drohan, *et al.*, 2000 ; Oester, *et al.*, 2002 ; Collombel, *et al.*, 1992 ; Okamoto, *et al.*, 2002**).

Le chitosane est aussi connu pour son efficacité contre les ulcères (**Xie, et al., 2001**).

5.2. Applications environnementales et contrôle de la pollution :

➤ Elimination des métaux lourds, teintures, nitrates et déchets radioactifs et la récupération des métaux précieux:

Des bio-adsorbants naturels et abondants tels que la chitine et le chitosane sont appliqués avec un grand succès pour l'élimination des traces de métaux lourds, teintures, nitrates et déchets radioactifs. L'efficacité de l'utilisation du chitosane pour éliminer le plomb et le cadmium dans l'eau potable a été démontrée dans des études précédentes. Le chitosane issu des carapaces de crabe a aussi été efficace pour le traitement des effluents des industries métalliques et pour le chromium hexavalent où l'adsorption est de 90% (**Tan et Lee, 2002 ; Annadurai, et al., 1999 ; Hardinge-Lyme, 2001 ; Planas, 2002 ; Divakaran et Pillai, 2002 ; Jaafari, et al., 2001**).

La chitine et le chitosane sont utilisés pour l'élimination des teintures acides des effluents de la peinture domestique. Le processus d'élimination de la teinture opère en adsorbant les teintures à travers un mécanisme d'échange d'ions. Les particules de chitine sont très efficaces pour l'élimination des teintures phénoliques. Des études ont démontré que les particules de chitine adsorbent 2,45 fois plus de teintures que les sols minéraux habituellement utilisés (**Tan et Lee, 2002 ; Annadurai, et al., 1999**).

Le chitosane peut être utilisé pour l'adsorption de l'uranium des effluents nucléaires. Les sites carboxyliques agissent directement dans l'échange d'ions avec les ions uranyl alors que les sites amines du chitosane adsorbent les ions uranyl (**Felse et Panda, 1999**).

Le chitosane est aussi utilisé pour récupérer des métaux précieux (**Planas, 2002**).

➤ **Traitement de l'eau de rejet:**

Le chitosane est bien connu comme flocculant pour les particules en suspension, ce qui le rend idéal pour le traitement de l'eau de rejet. Il n'est pas surprenant de voir que l'une des principales utilisations du chitosane est « agent de floculation » pour la clarification des effluents industriels, incluant les boues des brasseries, les eaux usées et beaucoup d'autres. Environ 85% du chitosane produit au Japon est utilisé pour le traitement des eaux de rejets d'industries agroalimentaires (Tan et Lee, 2002).

5.3. Applications à l'industrie alimentaire :

Dans les industries alimentaires, les polysaccharides sont communément utilisés pour modifier ou contrôler les propriétés fonctionnelles des aliments. Ils sont incorporés dans les aliments en tant qu'agents gélifiants, agents de texture, agents de conservation ou comme agents déshydratants (Tan et Lee, 2002 ; Roller et Covill, 1999). Les chitooligosaccharides et le chitosane sont utilisés comme agents de floculation et de clarification des aliments (Andrade, *et al.*, 2003 ; Fernandez et Fox, 1997). Le chitosane possède un autre rôle dans l'aliment qui est d'inhiber la croissance des microorganismes (Daly et Manuszac-Guerrini, 2001). Les recherches tentent aujourd'hui d'introduire la chitine et/ou ses dérivés dans les applications à la préservation de la viande (Jeon, *et al.*, 2000).

Le N-acétyl glucosamine peut être utilisé comme « Single Cell Protein ». Il est une source de carbone pour la levure *Pichia kudriadezii*. La biomasse qui en résulte constitue une source de protéines pour l'alimentation animale (Seng, 1988 ; Cosio, *et al.*, 1982).

La chitine est, elle aussi, utilisée dans l'alimentation des crevettes pour augmenter leurs croissances (Shiau et Yu, 1998).

5.4. Applications à l'agriculture :

La chitine et le chitosane ont trois applications potentielles dans l'agriculture : comme agent antimicrobien, comme nématoicide ou comme engrais (**Hallmann, et al., 1998**). Le chitosane peut augmenter le pourcentage des récoltes de 50% (**Tan et Lee, 2002 ; Andrade, et al., 2003**). Il sert de conservateur, en formant un film protecteurs, pour les fruits (**Farber, et al., 2003**). Les chitooligosaccharides et les N-acétyl chitooligosaccharides inhibent la croissance des champignons et des bactéries phytopathogènes (**Chang, et al., 2000**).

Les chitooligosaccharides et les N-acétyl chitooligosaccharides ont aussi le potentiel d'activer le mécanisme de défense chez les plantes : Ils activent la production de pisatine, de chitinases et de phytoaléxine. Ils interviennent dans la réponse mitotique et les activités chimiotactiques des cellules animales. Ils influencent l'organogenèse des plantes à des concentrations nanomolaires (**Chang, et al., 2000 ; Takeshi, et al., 2000 ; Bakkers, et al., 1997**).

5.5. Autres applications :

Dans l'industrie cosmétique, la chitine et le chitosane peuvent être utilisés comme agents hydratants dans différents produits tels que les vernis à ongles, les lotions pour le corps ou les crèmes pour les mains (**Felse et Panda, 1999 ; Roller et Covill, 1999**).

La chitine est employée comme un additif dans l'industrie papetière (**Felse et Panda, 1999**).

Récemment, la chitine et le chitosane ont servi à la fabrication de membranes semi-perméables et de résines pour colonnes chromatographiques (**Tan et Lee, 2002 ; Sheperd, et al., 1997**).

La chitine et ses dérivés peuvent être employés pour séparer les protéines par adsorption grâce à la capacité de la chitine à adsorber des protéines par des liaisons non covalentes, des forces de Van Der Waals ou des liaisons hydrogène. Les protéines peuvent être ensuite relarguées par des produits chimiques (**Tan et Lee, 2002**).

La chitine et le chitosane peuvent être utilisés pour immobiliser des cellules ou des enzymes (**Tsukada, *et al.*, 2000 ; Juang, *et al.*, 2002**).

La chitine peut être utilisée pour encapsuler des acides aminés et servir ainsi de suppléments nutritifs pour les crevettes (**Bain, 1998**).

1. Matériel biologique:

Pour notre étude, nous avons opté pour la valorisation de la carapace de la crevette. Les carapaces étaient récupérées dans des restaurants de la capitale et identifiées au niveau du laboratoire halieutique de l'U.S.T.H.B. comme étant la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846). Cette espèce est présente en abondance à différentes profondeurs de 150 à 900 m, le long du littoral algérien (Nouar et Maurin, 2001).

Parapenaeus longirostris (Lucas, 1846) possède plusieurs avantages par rapport à notre étude, dont :

Tout d'abord, ce crustacé est très répandu sur les côtes algériennes et de ce fait très consommé. En 2003, 1003 tonnes de crevettes *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) ont été pêchées dans notre pays.

Puis, sa pigmentation permet d'obtenir aisément des produits incolores.

Parapenaeus longirostris (Lucas, 1846) est classé comme suit :

Règne : métazoaires

Sous-règne : eumétazoaires

Embranchement : arthropoda

Sous-embranchement : mandibulata

Classe : crustacea

Sous-classe : malacostraca

Super-ordre : eucarida

Ordre : decapoda

Sous-ordre : natantia

Famille : penaidae

Genre : Parapenaeus

Espèce : longirostris

(Jessop, 1973; Tyrra, 1999).

Pour l'application, nous avons étudié l'effet inhibiteur de nos produits sur les 4 souches A.T.C.C. (American Type Culture Collection) retrouvées en Algérie ainsi que d'autres souches fournies par l'I.P.A. (Institut Pasteur d'Alger). Il s'agit de :

☛ ***Escherichia coli* ATCC 25922 :**

Bacille à Gram négatif non sporulé aéro-anaérobie facultatif

☛ ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible à la pénicilline) et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (résistante à la pénicilline) :**

Cocci à Gram positif non sporulé aéro-anaérobie facultatif.

☛ ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 :**

Bacille à Gram négatif non sporulé aérobie stricte.

☛ ***Salmonella typhimurium* identifiée à l'I.P.A.:**

Bacille à Gram négatif non sporulé aéro-anaérobie facultatif

☛ ***Bacillus subtilis* identifiée à l'I.P.A.:**

Bacille à Gram positif sporulé aéro-anaérobie facultatif.

☛ ***Vibrio cholerae* sérotype ogawa identifiée à l'I.P.A.:**

Bacille à Gram négatif non sporulé aéro-anaérobie facultatif

☛ ***Shigella dysenteriae* identifiée à l'I.P.A.:**

Bacille à Gram négatif non sporulé aéro-anaérobie facultatif

☛ ***Enterobacter agglomerans* ou *Pantoea* identifiée à l'I.P.A.:**

Bacille à Gram négatif non sporulé aéro-anaérobie facultatif

☛ ***Bacillus cereus* identifiée à l'I.P.A.:**

Bacille à Gram positif sporulé aéro-anaérobie facultatif.

☛ ***Prevotella melaninogenica* identifiée à l'I.P.A.:**

Bacille à Gram négatif non sporulé anaérobie stricte.

☛ ***Bacteroides fragilis* identifiée à l'I.P.A.:**

Bacille à Gram négatif non sporulé anaérobie stricte.

Tableau n° 2 : Caractéristiques des bactéries testées

<i>Les bactéries</i>	<i>Forme et coloration</i>	<i>Habitat</i>	<i>Pouvoir pathogène</i>
<i>Escherichia coli</i>	Bacille Gram -	Hôte normal de l'intestin, eau contaminée	Infections urinaires, péritonéales, biliaires, appendiculaires ou génitales, méningites, syndromes diarrhéiques.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille Gram -	Eau, sol et la flore intestinale	Infections nosocomiales (patients fragilisés)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci Gram +	Ubiquitaires (air, sols, eaux et muqueuses)	Infections pleuro-pulmonaires, génito- urinaires, ostéo-articulaires, cardiaques et cérébro-méningées
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacille Gram -	Eaux usées et flore intestinale des animaux vertébrés	Salmonellose
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacille Gram +	Ubiquitaire grâce à ses spores	Intoxications alimentaires
<i>Bacillus cereus</i>	Bacille Gram +	Ubiquitaire grâce à ses spores	Intoxications alimentaires, septicémies, méningites, infections respiratoires et myo-nécroses
<i>Vibrio cholerae</i>	Bacille Gram -	Eau contaminée	Choléra
<i>Shigella dysenteriae</i>	Bacille Gram -	Eau et sol	Colites infectieuses, gastro-entérites sévères avec diarrhée mucopurulente et sanglante, fièvre et déshydratation
<i>Enterobacter agglomerans</i> = <i>Pantoea</i>	Bacille Gram -	Eau et sol	Infections urinaires, bactériémies, méningites et suppurations diverses
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Bacille Gram -	hôte normal de la bouche	Infections pleuro-pulmonaires, ORL et gingivales et pelvi-péritonéales
<i>Bacteroides fragilis</i>	Bacille Gram -	hôte normale de l'intestin	Infections pleuro-pulmonaire, péritonéale, gynécologiques, pariétales ou septicémiques.

2. Méthodes :

Notre étude a été effectuée en deux grandes étapes :

2.1. Extraction et préparation des différentes substances :

La préparation de la chitine, du chitosane et leurs oligomères a été réalisée comme suit :

1. Les carapaces de crevettes sont d'abord, débarrassées de leurs pattes et antennes, lavées puis bouillies dans de l'eau pendant une heure. Elles sont ensuite séchées à 163°C à l'étuve, les tissus secs sont éliminés plus aisément (**Mukherjee, 2001**).
2. L'étape « quenching » est employée par certains auteurs. Nous avons donc effectué des essais avec « quenching » et d'autres sans pour comparer et estimer la valeur de ce prétraitement. Lors de cette étape, la carapace est chauffée, dans l'étuve, à 80°C pendant 48h, puis, refroidie immédiatement dans l'acétone glacé (**Mukherjee, 2001**).
3. La carapace est enfin broyée, à l'aide d'un moulin à café, en fine poudre.
4. Pour la déminéralisation et la déprotéinisation, nous avons optimisé les paramètres suivants :
 - ❖ les concentrations : en HCl pour la déminéralisation et en NaOH pour la déprotéinisation,
 - ❖ le rapport : poids de carapace/volume de solution (p/v) et
 - ❖ le temps de réaction (t).
 - ❖ la température de la réaction (T°) a été optimisée pour la réaction de déprotéinisation.

Nous fixons trois paramètres et varions le quatrième.

La déminéralisation peut être observée grâce l'effervescence produite.

La réaction de déminéralisation est appréciée, par détermination du taux de cendres (plus le taux de cendre est faible et plus efficace aura été la réaction de déminéralisation) (No, *et al.*, 1989).

L'appréciation de la déprotéinisation, se fait par dosage des protéines dans le surnageant (plus le taux de protéines dans le surnageant est élevé et plus efficace aura été la réaction de déprotéinisation).

5. La dépigmentation est réalisée en imbibant la poudre de carapace déprotéinée et déminéralisée avec de l'acétone et en la laissant sécher à l'air libre pendant 2 heures. Puis, nous plongeons cette poudre dans une solution d'eau de Javel (blanchiment) à 0,315% (1 :10 p/v) sous agitation pendant une heure (No, *et al.*, 1989). Nous obtenons ainsi de la chitine.
6. Pour le chitosane, nous avons utilisé deux protocoles, présentés dans le tableau n°3 :

Tableau n°3 : Protocoles utilisés pour la préparation du chitosane
(Kolodziejska, *et al.*, 2000; Mirzadeh, *et al.*, 2002)

	[NaOH] (%)	T° (°C)	p/v (g/ml)	t (h)
Protocole I	50	140	1/10	1
Protocole II	50	95	1/50	3

7. L'hydrolyse de la chitine et du chitosane se fait selon les conditions présentées sur le tableau n°4:

Tableau n°4 : Protocoles utilisés pour la préparation des oligomères de la chitine et du chitosane (Chang, *et al.*, 2000)

Protocole	[HCl] (N)	T° (°C)	p/v (g/ml)	t (h)
Oligomères de la chitine	7	70	2/100	3
Oligomères du chitosane	6,27	56		

Nous terminons la réaction en refroidissant immédiatement la solution dans un bain glacé. La solution est ensuite séchée sous vide à -46°C . Les particules solides ainsi obtenues sont redissoutes dans 100ml d'eau distillée et séchées à nouveau dans les mêmes conditions. Cette dernière opération est répétée une troisième fois pour enlever le maximum d'HCl résiduel. La solution finale est neutralisée avec du NaOH 1N et filtrée ($0,22\mu\text{m}$) pour enlever les impuretés. Le filtrat est concentré par évaporation sous vide jusqu'à une concentration finale de 20%. Du méthanol (9 volumes) est additionné à la solution pour précipiter les oligosaccharides avec un degré de polymérisation $\text{DP} \geq 8$. Le méthanol est ensuite évaporé (Chang, *et al.*, 2000).

Remarques :

- A la fin de chaque réaction (déminéralisation, déprotéinisation, dépigmentation, désacétylation et hydrolyse), il y a une étape de lavage à l'eau de robinet jusqu'à pH neutre, puis un autre lavage à l'eau distillée et séchage à l'étuve à 90°C .
- Toutes les réactions se font sous agitation.

L'ensemble des étapes est présenté sur la figure n°16.

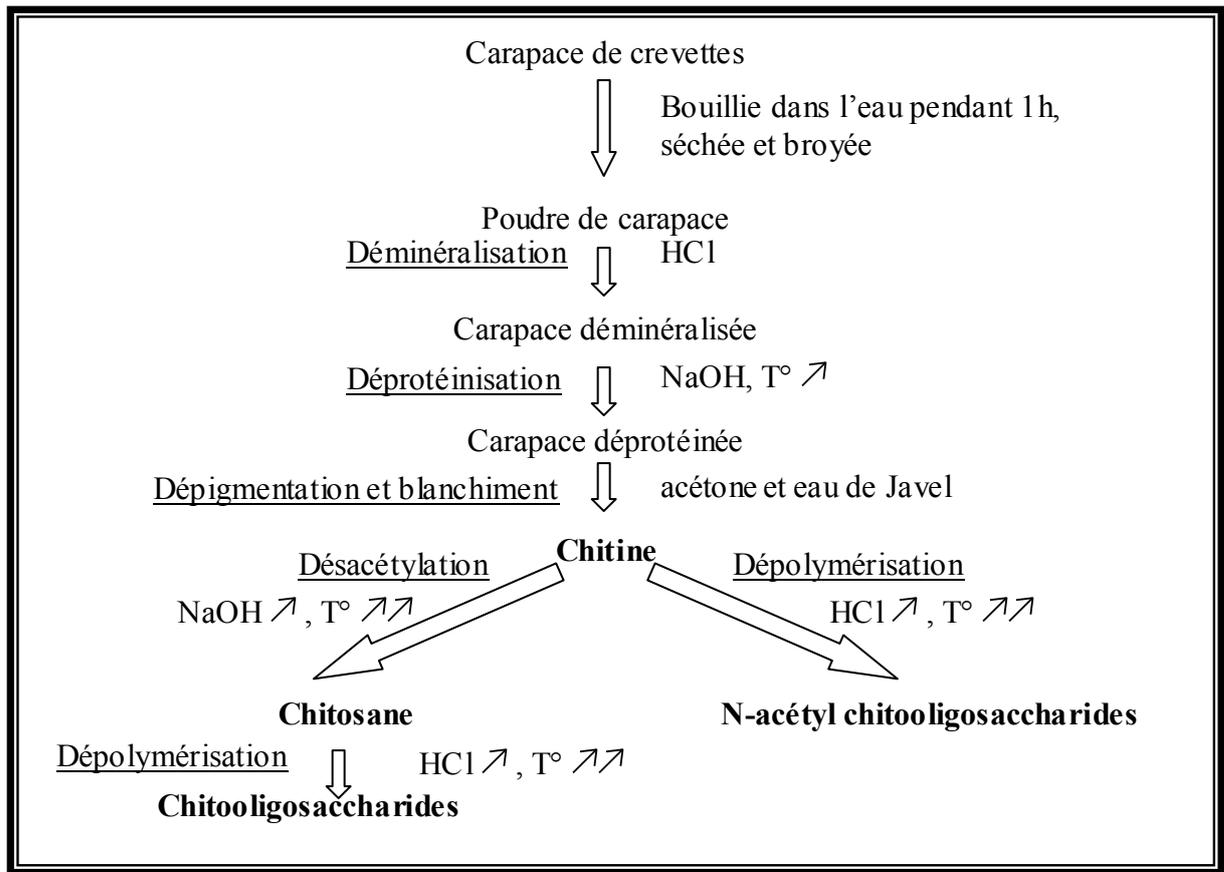


Figure n° 16: Méthodes utilisées pour la préparation de la chitine et ses dérivés

2.2. Détermination des propriétés physico-chimiques :

2.2.1. Mesure du taux de cendre :

L'efficacité de la déminéralisation a été observée en mesurant le taux de cendre. Elle est réalisée comme suit :

Nous pesons dans un creuset et 2g de carapace, de chitine ou de chitosane, préalablement chauffés pendant 15 min dans un four à mouffles et refroidis.

Nous introduisons le creuset avec la substance à analyser dans un four à moufle chauffé à 600°C pendant 6 heures et contrôlons la constance du poids (No, *et al.*, 1989).

$$\text{Le pourcentage en minéraux (\%)} = \frac{\text{poids de cendre final}}{\text{poids initial de l'échantillon}} \times 100$$

2.2.2. Mesure de la teneur en protéines lors de l'optimisation de la déprotéinisation:

A la fin de la réaction de déprotéinisation, le surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue et transvasé dans une fiole jaugée de 50 ml, le pH est ramené à la neutralité par une solution d'acide chlorhydrique 1N dont le volume rajouté est soigneusement noté. Nous effectuons par la suite le dosage colorimétrique de Biuret.

➤ **Principe :**

Le principe de cette méthode est le suivant :

En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements -CO-NH- ou -CO-NH₂ voisins forment avec les ions cuivriques (Cu⁺⁺) un complexe bleu-violet. Cette coloration se développe en particulier avec le biuret (NH₂-CO-NH-CO-NH₂) d'où son nom.

L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques. Il en résulte que pour une protéine pure, l'intensité est proportionnelle à la concentration de celle-ci. Toutefois cette concentration ne doit pas excéder 10mg/l.

➤ **Mode opératoire :**

La gamme d'étalonnage se fait comme suit : A partir d'une solution de peptone étalon mère à 5g/l, nous préparons la gamme suivante :

Dans cinq tubes à essai, nous introduisons des volumes de la solution étalon contenant : 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 mg de protéines.

Nous complétons chaque tube à 2 ml avec de l'eau physiologique, puis nous ajoutons 8 ml de réactif de Biuret préparé comme suit :

Sulfate de cuivre (CuSO₄)..... 1,5g
 Ethyldiméthyltétracétique (EDTA)..... 6g
 KI..... 1g
 NaCl..... 0,9g
 Dans 300ml d'eau distillée.

Nous ajoutons en une fois 300 ml de NaOH à 2,5M, puis complétons à

Nous plaçons les tubes 30 min à l'obscurité pour développer la coloration.

Nous mesurons l'absorbance à 545 nm contre un blanc, dans lequel la solution protéique est remplacée par de l'eau physiologique.

Pour le dosage des protéines, nous procédons comme pour la gamme sur 0,5ml de la solution à doser (surnageant), éventuellement diluée pour se situer dans la gamme.

2.2.3. Mesure du degré de désacétylation :

La mesure du degré de désacétylation était réalisée grâce au F.T.I.R. 8400 (Fourier Transform InfraRed spectroscopy) SHIMADZUW3.

Les différents degrés d'acétylation des polysaccharides ont été calculés selon la formule suivante :

$$\mathbf{D.A. = (A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33}$$

Avec A_{1655} et A_{3450} sont les absorbances à 1655 cm^{-1} de la bande amide-I donnant la mesure des groupements N-acétyle et à 3450 cm^{-1} de la bande hydroxyle indiquant le standard interne pour la correction. Le facteur 1,33 est la valeur de A_{1655} / A_{3450} lorsque tous les groupements du polymère sont N-acétylés.

Le degré de désacétylation est déduit de l'équation suivante :

$$\mathbf{D.D.=100-D.A. (Fernandez-Kim, 2004; Khan, et al., 2002).}$$

2.2.4. Mesure du poids moléculaire :

Pour déterminer, le poids moléculaire de la chitine et des deux chitosanes, nous avons utilisé la méthode viscosimétrique. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un viscosimètre de type **Ubbelohde** (Technico, ASTM D. 445) de constante $k= 0,01\text{cS/s}$.

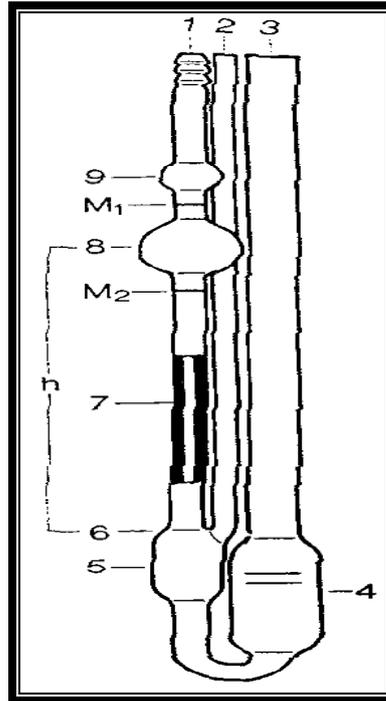


Figure n°17 : Viscosimètre de type Ubbelohde

➤ **Description :**

Le viscosimètre est constitué de trois parties tubulaires principales 1, 2 et 3 (Figure n°17). Le tube capillaire 7 avec la sphère de mesure 8, la sphère des avant-coulants 9 et le vase à niveau 5. Au-dessus et au-dessous de la sphère de mesure 8, les marques annulaires M_1 et M_2 sont imprimées sur le tube 1. Ces marques définissent le débit de l'échantillon. Le tube capillaire 7 se termine dans la partie supérieure, réalisée comme une calotte sphérique 6, du vase à niveau 5. Par la surface intérieure de cette calotte sphérique 6, l'échantillon s'écoule du tube capillaire 7 sous forme d'un film mince.

➤ **Mode de remplissage :**

Pour remplir le viscosimètre, nous inclinons celui-ci d'environ 30° sur la verticale, le réservoir 4 se trouvant en dessous du capillaire 7; nous introduisons ensuite suffisamment de liquide dans le tube 3 pour amener le niveau jusqu'au trait inférieur lorsque le viscosimètre est redressé. Le volume du liquide étudié sera toujours le même. Pour faire monter le liquide dans le viscosimètre, nous plaçons un doigt sur le tube 2 et aspirons par le tube 1 jusqu'à ce que le liquide atteigne le centre du réservoir 9, puis retirons le doigt du tube.

Nous mesurons le temps d'écoulement du liquide entre les repères M_1 et M_2 , à l'aide d'un chronomètre.

Le viscosimètre sera lavé à l'eau, puis séché à l'acétone entre chaque mesure.

➤ **Calcul de la viscosité et du poids moléculaire :**

Nous pouvons obtenir la viscosité réduite, η_r , et la viscosité inhérente, η_i , à partir des relations suivantes :

$$\eta_r = \eta_{sp} / [C] \quad \text{avec : } \eta_{sp} = (\eta / \eta_s) - 1$$

$$\eta_i = 1/[C] \times \ln (\eta / \eta_s)$$

η : représente la viscosité absolue de la solution de polymère (chitine ou chitosane) à la concentration $[C]$.

η_s : la viscosité absolue du solvant.

Pour un même viscosimètre, la viscosité cinématique (viscosité absolue) s'exprime par la relation :

$$\eta = k.t$$

k : constante de l'appareil ($k=0,01\text{cS/s}$).

t : temps d'écoulement en secondes.

Le poids moléculaire moyen des polymères préparés dans le cadre de ce travail, a été déterminé à partir de l'équation de **Mark-Houwink** :

$$[\eta]=k M^\alpha$$

avec :

$[\eta]$: la viscosité intrinsèque.

k et α : des constantes.

Pour la chitine: $k=0,24 \text{ cm}^3/\text{g}$ et $\alpha=0,69$.

Pour le chitosane : $k=0,078 \text{ cm}^3/\text{g}$ et $\alpha=0,76$.

Pour la mesure de la viscosité, le chitosane est dissout dans un mélange d'acide acétique à 0,2 M et d'acétate de sodium à 0,3 M, alors que la chitine est dissoute dans un mélange de LiCl et de diméthylacétamide à 5% (**Mirzadeh, et al., 2002**).

➤ **Mode opératoire :**

Nous préparons cinq solutions de concentrations croissantes de chaque polymère dans son solvant approprié (0,0223 ; 0,042 ; 0,065 ; 0,081 ; 0,1 (g/100ml)) et évidemment une solution à 0g de polymère (η_s). Nous chronométrons le passage de chaque solution. Les mesures ont été réalisées en introduisant le viscosimètre dans un bain thermostaté réglé à 25°C.

Nous calculons les η ($\eta = k \cdot t$) et η_s et déduisons les η_{sp} ($\eta_{sp} = (\eta / \eta_s) - 1$) afin de pouvoir retrouver η_r ($\eta_r = \eta_{sp} / [C]$) et η_i ($\eta_i = 1/[C] \cdot \ln (\eta / \eta_s)$) pour tracer les droites $\eta_r = f([C])$ et $\eta_i = f([C])$.

Nous déterminons les ordonnées à l'origine des deux droites tracées. La moyenne des deux valeurs est la viscosité intrinsèque.

Il suffit par la suite d'appliquer l'équation Mark-Houwink ($[\eta] = k M^a$) pour retrouver le poids moléculaire (M) de chaque polymère (Zhang et Neau, 2001).

2.2.5. Mesure de la densité apparente:

La densité apparente est mesurée en remplissant un pycnomètre avec l'échantillon sec et en le pesant :

$$\text{Densité apparente} = \frac{\text{Poids sec de l'échantillon (g)}}{\text{Volume apparent de l'échantillon (ml)}}$$

2.2.6. Mesure de la densité réelle:

La densité réelle était mesurée en plaçant 15g d'échantillon dans un pycnomètre de 50ml et utilisant l'équation suivante :

$$d_r = \frac{B-A}{(B+D) - (A+C)}$$

Avec :

A : Poids du pycnomètre vide (g)

B : Poids du pycnomètre contenant 15g d'échantillon bien séché (g)

C : Poids du pycnomètre contenant 15g d'échantillon rempli d'eau (g)

D : Poids du pycnomètre rempli avec 50ml d'eau (g)

2.2.7. Mesure du taux de chitine dans la carapace :

La teneur des carapaces de crevettes en chitine est déduite par le dosage des résidus hexosamines libérés par l'hydrolyse acide complète de la chitine. Cette hydrolyse est effectuée avec de l'acide chlorhydrique 6N pendant 6 heures à température ambiante. Le dosage des hexosamines est effectué par la méthode d'Elson et Morgan (**Blix, 1948**). La quantité d'hexosamines libérées correspond à la quantité de chitine.

➤ **Principe de la méthode :**

Le principe de la méthode d'Elson et Morgan peut être résumé comme suit :

En milieu alcalin et à chaud, les N-acétyl hexosamines conduisent à des chromogènes (dérivés du furane) qui, en milieu acide, se condensent en p-diméthyl aminobenzaldéhyde (réactif d'Ehrlich) conduisant à une coloration rouge violacée. Les osamines non acylées ne donnent pas directement la coloration. Le chauffage en milieu alcalin nécessite l'addition d'acétylacétone et conduit à la formation de dérivés pyrroliques (réaction d'Elson et Morgan) (**Percheron, et al., 1981**).

Cette méthode utilise deux réactifs :

- Le tetraborate de potassium (réactif A) : solution 0,8 M dans le borate. Le pH est ajusté à 9,1 avec du KOH.
- Réactif à la p-diméthyl aminobenzaldéhyde (réactif B) : il suffit de dissoudre 10 mg de ce réactif dans 100 ml d'acide acétique glacial très pur, qui contient 12,5% en volume de HCl 10N . Le réactif se conserve bien pendant un mois à +2°C. Au moment de l'usage, nous le diluons avec 9 volumes d'acide acétique glacial très pur.

➤ **Préparation de la gamme étalon :**

Nous choisissons une gamme comprise entre 0 et 8 mg d'acétyl glucosamines dans un volume d'un litre d'eau distillée. Nous répartissons 0,5 ml de chaque solution préparée, de concentration connue, dans une série de tubes à essai. Nous ajoutons 0,1 ml de tetraborate de potassium et nous chauffons dans un bain-marie bouillant pendant exactement trois minutes. Nous refroidissons dans un bain d'eau froide, puis nous ajoutons 3 ml de réactif B. Nous mélangeons et portons immédiatement dans un bain à

36°C. Nous refroidissons dans un bain d'eau froide (20°C) et lisons l'absorbance à 530µm au spectrophotomètre après 20 minutes aussi vite que possible, l'intensité de la couleur baissant d'environ 0,5% toutes les cinq minutes après avoir atteint son maximum en 20 minutes (**Loiseleur, 1963**).

La teneur des carapaces en chitine est calculée comme suit :

$$\text{La teneur en chitine (\%)} = \frac{\text{g d'acétyl glucosamines}}{\text{g d'échantillon}} \times 100$$

La fraction d'azote contenue dans la chitine est déterminée de la manière suivante :

$$\text{Teneur en azote de la chitine} = P \times 6,9 \% \quad (\text{g/100g de carapaces})$$

P : étant le poids de la chitine, exprimé en gramme contenu dans 100g de carapaces.

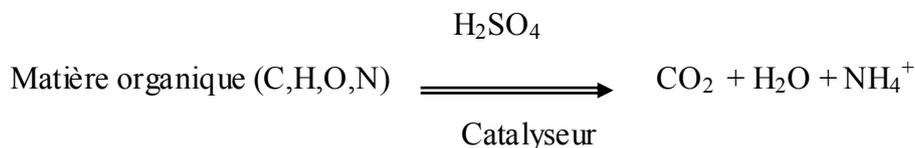
6,9 % : étant le pourcentage en azote au niveau de la chitine.

2.2.8. Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl :

La plus grande partie de l'azote des substances biologiques est contenue dans les protéines. La proportion d'azote est remarquablement constante pour un type de protéine donné (de l'ordre de 16% en masse).

Le mode opératoire :

- ✓ **Minéralisation** : a lieu à chaud en milieu sulfurique concentré en présence de catalyseur.



- ✓ **Déplacement de l'ammonium** :



- ✓ **Séparation de l'ammoniac** : se fait par :

- distillation simple.
- entraînement à la vapeur.

✓ **Dosage de l'ammoniac** : peut être :

- Direct : l'ammoniac est dosé directement par un acide étalonné au fur et à mesure qu'il distille.
- En retour : l'ammoniac est recueilli dans un excès connu d'acide, nous dosons le reste par une base étalonnée.

a. Minéralisation : dans ce travail, la minéralisation a été réalisée de la manière suivante:

a.1. L'essai : nous introduisons dans un tube matras :

- 2g de carapaces broyées ;
- 10 ml d'acide sulfurique concentré à 98% ;
- une pointe de spatule de catalyseur de minéralisation ;

a.2. Le blanc : 10 ml d'acide sulfurique additionnés de catalyseur.

La minéralisation est accomplie à 100°C pendant 30 minutes ensuite à 300°C pendant 2 heures.

Après minéralisation, le minéralisât est transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 200 ml puis complétée à 200 ml avec de l'eau distillée.

b. Distillation de l'ammoniac du minéralisât : nous introduisons, successivement, dans un ballon de distillation :

- 20 ml de minéralisât dilué ;
- 100 ml d'eau distillée ;
- quelques gouttes de phénophtaléine ;
- 10 ml de lessive de soude ;

Nous adaptons le ballon immédiatement au réfrigérant et chauffons.

Nous recueillons le distillat dans 20 ml d'acide sulfurique de concentration connue voisine de 0,01 M.

Nous distillons durant 30 minutes.

c. Dosage de l'ammoniac distillé : nous dosons l'excès d'acide sulfurique contenu dans le distillat à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire égale à 0,015 M.

Calculs : Au point d'équivalence le nombre de moles d'ions H^+ captés par les bases ($NaOH$, NH_3) est égal au nombre de moles d'ions H^+ cédés par l'acide (H_2SO_4), on écrit :

$$C(NH_3) \text{ (en moles/l)} = \frac{[2 \times C(H_2SO_4) \times V(H_2SO_4)] - [C(NaOH) \times V(NaOH)]}{V(NH_3) \text{ (minéralisat)}}$$

Dans 200ml (donc dans 2g de carapaces), nous avons :

$$N = [C(NH_3) \times M(N) \times 0,1] \text{ g / g de carapaces}$$

Et dans 100g de carapaces, nous avons :

$$N = [C(NH_3) \times M(N) \times 10] \text{ g / 100 g de carapaces}$$

Avec :

C (NH_3): concentration molaire d'ammoniac (mole/l).

C (H_2SO_4): concentration molaire de l'acide sulfurique (mole/l).

V (H_2SO_4) : volume de l'acide sulfurique (l).

C ($NaOH$) : concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium (mole/l).

V ($NaOH$) : volume de la solution d'hydroxyde de sodium, nécessaire à la neutralisation de l'excès d'acide sulfurique (l).

N : teneur en gramme d'azote par gramme de carapaces.

M (N) : masse molaire de l'azote, égale à 14 g/mole.

L'azote protéique est déterminé comme suit :

$$N(\text{protéines}) = N - N(\text{chitine})$$

La teneur des protéines en grammes dans 100g de carapaces est déterminée comme suit :

$$\text{Teneur en protéines en g dans 100g de carapaces} = (N(\text{protéines}) / 0,16)$$

Le facteur 0,16 représente la fraction moyenne d'azote dans les protéines.

2.3. Application : Etude de l'effet antibactérien des différentes substances préparées :

2.3.1. Préparation des différents milieux:

Pour cette étude, nous avons utilisé la méthode de Tsai et ses collaborateurs (Tsai, *et al.*, 2002).

2.3.1.1. Pour les bactéries aérobies:

Pour les bactéries aérobies, nous avons utilisé de l'eau peptonnée comme milieu de fermentation. Nous avons utilisé un fermenteur de 150ml.

Une préculture de la souche à étudier est préparée la veille dans un tube à essai, en ensemençant 10 colonies dans 10ml d'eau peptonnée.

Le lendemain, nous ensemençons le fermenteur avec les 10ml de préculture. Le fermenteur contient :

- ✓ 150ml d'eau peptonnée
- ✓ 150ml d'eau peptonnée additionnée à 0,1% (p/v) de chitine
- ✓ 150ml d'eau peptonnée additionnée à 0,1% (p/v) de chitosane
- ✓ 150ml d'eau peptonnée additionnée à 0,1% (p/v) d'oligochitines
- ✓ 150ml d'eau peptonnée additionnée à 0,1% (p/v) d'oligochitosanes

La croissance est mesurée par la lecture de la densité optique à 640 nm toutes les 30 minutes (Jeon et Kim, 2000).

2.3.1.2. Pour les bactéries anaérobies:

Pour les bactéries anaérobies, nous avons utilisé le bouillon T.G.Y. (Trypticase-Glucose-Yeast extract) comme milieu de fermentation. Le milieu T.G.Y. doit être régénéré 20 minutes au bain-marie bouillant afin d'éliminer toute trace d'oxygène.

La préculture de la souche à étudier est préparée la veille dans un tube à essai, en ensemençant 10 colonies dans 10ml de bouillon T.G.Y. en anaérobiose.

Le lendemain, nous ensemençons le fermenteur avec les 10ml de préculture. Le fermenteur contient :

- ✓ 150ml de bouillon T.G.Y.
- ✓ 150ml de bouillon T.G.Y. additionné à 0,1% (p/v) de chitine
- ✓ 150ml de bouillon T.G.Y. additionné à 0,1% (p/v) de chitosane
- ✓ 150ml de bouillon T.G.Y. additionné à 0,1% (p/v) d'oligochitines
- ✓ 150ml de bouillon T.G.Y. additionné à 0,1% (p/v) d'oligochitosanes

La fermentation se déroule à l'intérieur d'une jarre qui assure une atmosphère anaérobie grâce au mélange gazeux (90% N₂, 5% CO₂ et 5% H₂) introduit après création du vide, pour extraire tout l'oxygène environnant. Un catalyseur au palladium est présent dans la jarre pour transformer l'hydrogène atmosphérique en hydrogène radicalaire très réactif. Ce dernier va se lier avec l'oxygène présent dans l'enceinte pour former des molécules d'eau.

La croissance est mesurée par la lecture de la densité optique à 640 nm à intervalle d'une heure afin d'éviter de fréquentes expositions à l'oxygène atmosphérique.

Remarques :

- Le chitosane et les oligochitosanes employés pour l'étude de l'effet antimicrobien étaient ceux issus du premier protocole (tableau n°3).
- La chitine, le chitosane, les oligochitines ainsi que les oligochitosanes sont autoclavés avant leurs emplois dans les milieux de culture.
- L'ouverture de la jarre doit se faire loin de toute flamme, l'hydrogène libéré étant susceptible de s'enflammer.
- Après usage, le catalyseur est humide et ne peut être réemployé immédiatement; il doit être régénéré au four Pasteur à 160 °C pendant 2 heures.

2.3.2. Etude de l'effet inhibiteur :

Pour étudier l'effet inhibiteur de la chitine, du chitosane, des N-acétyl chitooligosaccharides et des chitooligosaccharides, nous avons mesuré la densité optique à 640nm et calculé la concentration minimale inhibitrice (C.M.I.) comme suit :

Nous préparons différentes concentrations (0,1% ; 0,08% ; 0,05% ; 0,03% ; 0,01% ; 0,006% et 0,003% (poids/volume)) des produits à tester dans le milieu Muller-Hinton pour les bactéries aérobies et dans le milieu Muller-Hinton additionné de sang pour les bactéries anaérobies strictes. Il suffit ensuite d'inoculer les boîtes de Pétri avec les souches bactériennes à tester.

La C.M.I. est définie comme étant la concentration minimale, du produit utilisé, qui inhibe complètement la croissance bactérienne (**No, *et al.*, 2002**).

1. Préparation des différents produits :

1.1. Optimisation de la déminéralisation :

1.1.1. Optimisation de la concentration en acide chlorhydrique:

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en acide chlorhydrique est de 15 ml, la température est ambiante (20°C) et la durée de la réaction est de 24 heures. Les essais sont effectués en triplicat. Les résultats sont représentés dans la figure n°18:

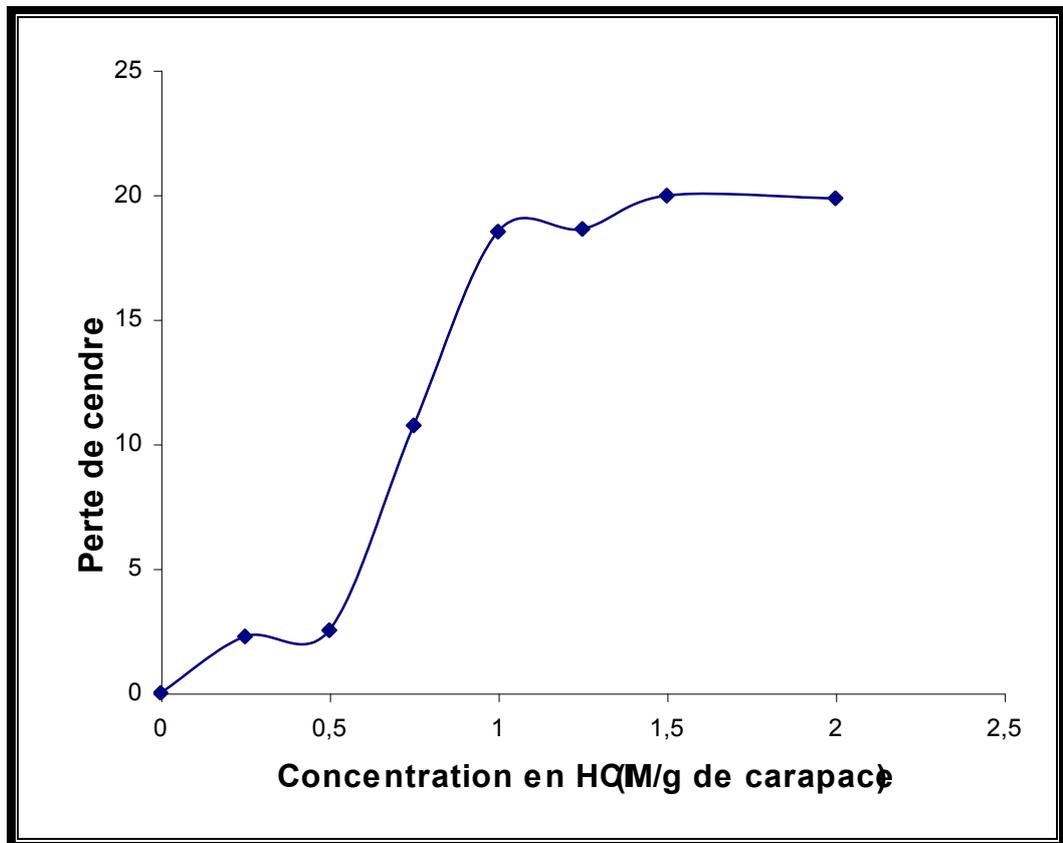


Figure n° 18 : Optimisation de la concentration en acide chlorhydrique

Nous remarquons que lorsque les concentrations en HCl varient de 0 à 0,5M, le poids de cendre reste pratiquement constant. Tandis qu'à partir d'une concentration en HCl de 0,75 M, la diminution du taux de cendre s'accélère pour atteindre un optimum à 1,5M.

1.1.2. Optimisation de la durée de la déminéralisation :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en acide chlorhydrique est de 15 ml, la température est ambiante (20°C) et la concentration en HCl est de 1,5M. Les essais sont effectués en triplicat. Les résultats sont représentés dans la figure n°19:

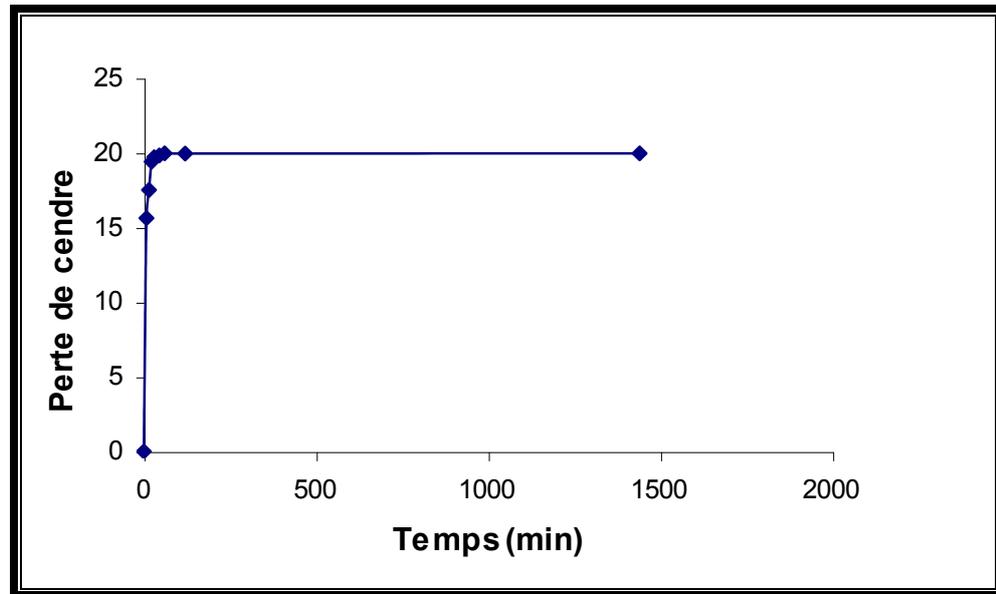


Figure n° 19 : Optimisation de la durée de la déminéralisation

Nous remarquons que la réaction de déminéralisation par l'HCl est une réaction très rapide. Elle est achevée au bout de 1 heure.

1.1.3. Optimisation du volume d'acide chlorhydrique :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, la température est ambiante (20°C) et la concentration en HCl est de 1,5M et le temps de réaction est de 1 heure. Les essais sont effectués en triplicat. Les résultats sont représentés dans la figure n°20 :

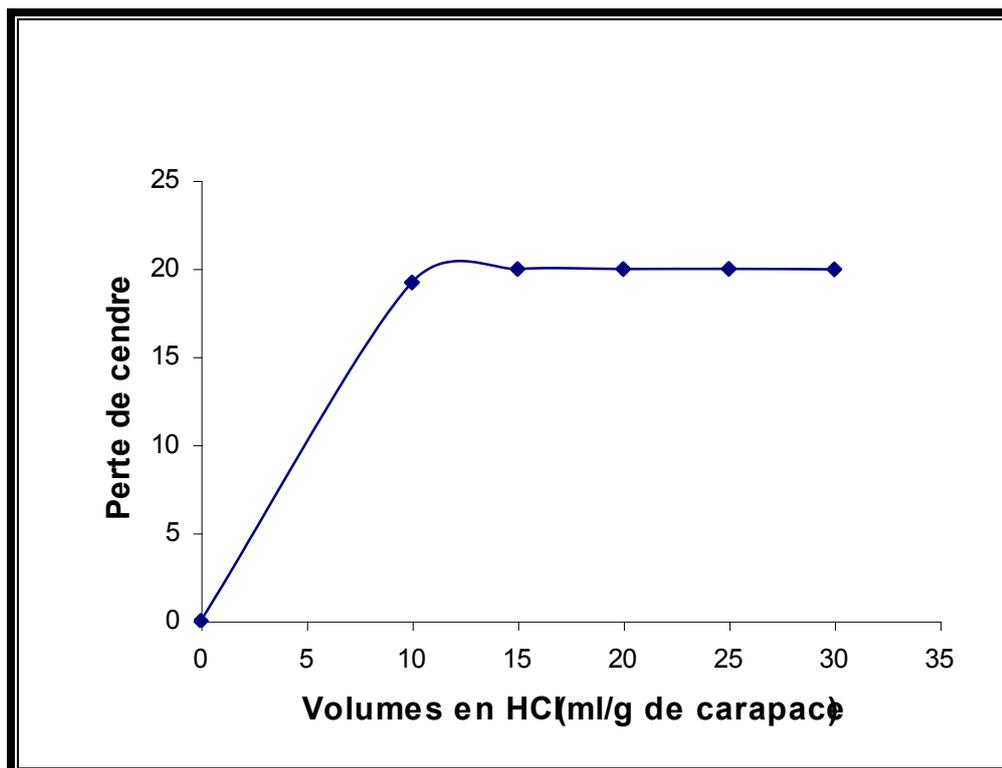


Figure n° 20 : Optimisation du volume d'acide chlorhydrique

Nous remarquons que la plus grande partie des minéraux contenus dans la carapace de crevettes est éliminée par 10ml d'HCl à 1,5M. L'optimum de la déminéralisation se situe à 15ml d'HCl 1,5N est achevée au bout de 1 heure.

Les conditions optimisées de la déminéralisation sont présentées dans le tableau n°5 :

Tableau n° 5 : Les conditions optimisées de la déminéralisation pour 1g de carapaces

Température (°C)	Temps (h)	Volume de HCl (ml)	Concentration en HCl (M)
Ambiante	1	15	1,5

1.2. Optimisation de la déprotéinisation :

1.2.1. Optimisation de la concentration en hydroxyde de sodium :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en soude caustique est de 15 ml, la température est ambiante (20°C) et la durée de la réaction est de 24 heures. Les essais sont effectués en triplicat. Les résultats sont représentés dans la figure n°21 :

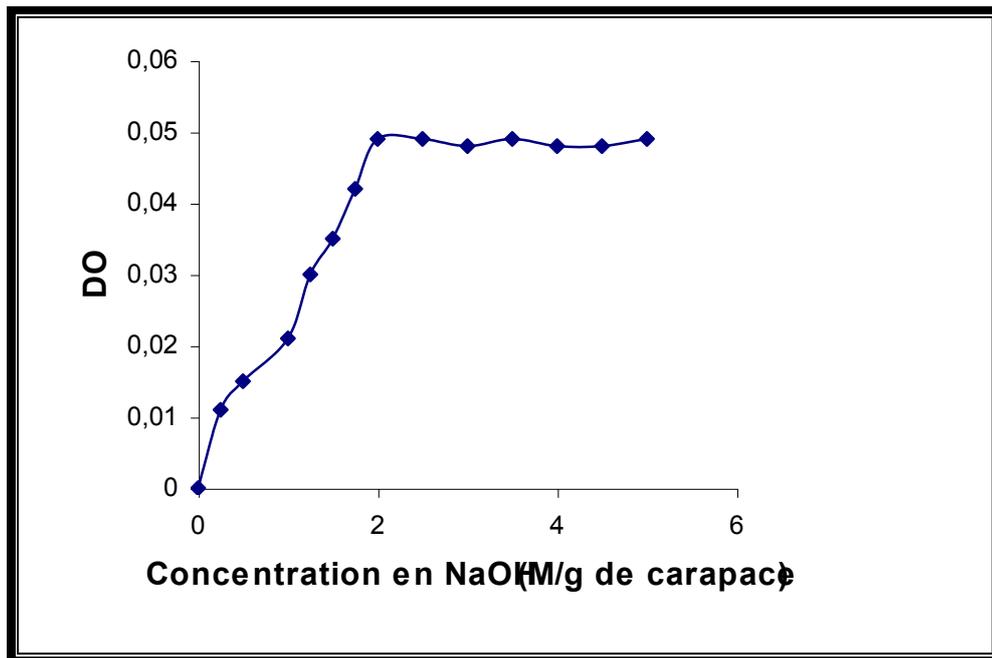


Figure n° 21 : Optimisation de la concentration en hydroxyde de sodium

Nous remarquons que la réaction de déprotéinisation s'effectue à de faibles concentrations en NaOH et est à son maximum à 2 M.

1.2.2. Optimisation de la durée de la réaction de déprotéinisation :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en soude caustique est de 15 ml, la concentration en NaOH est de 2 M et la température est ambiante (20°C). Les essais sont effectués en triplicat. Les résultats sont représentés dans la figure n°22 :

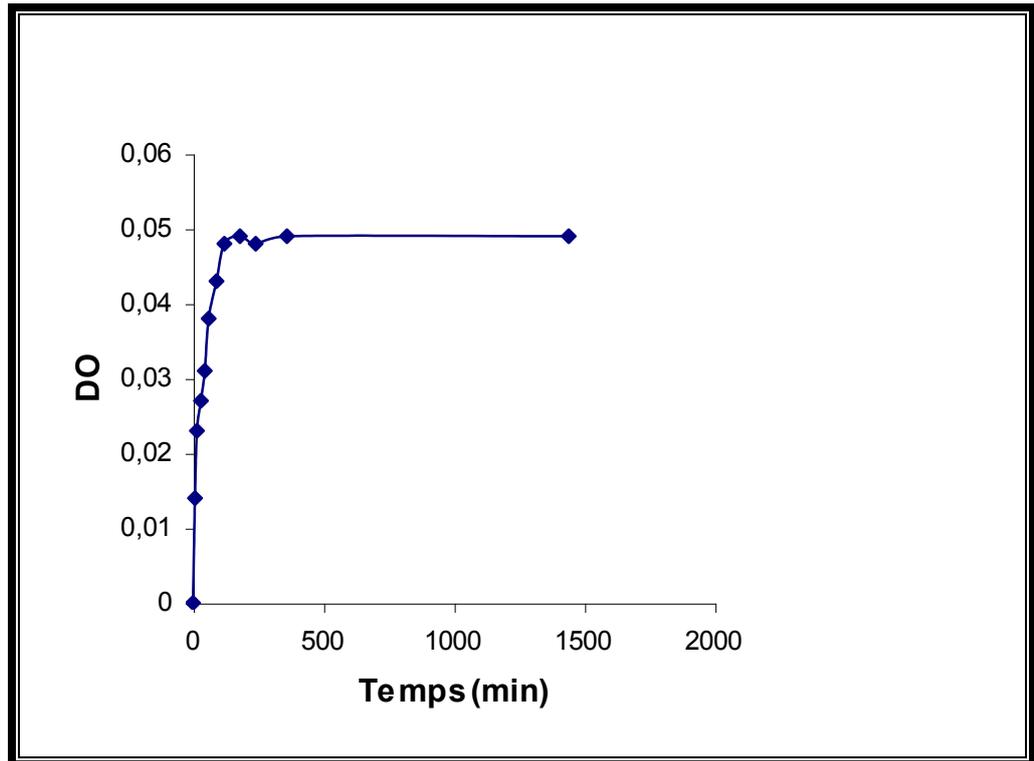


Figure n° 22 : Optimisation de la durée de la réaction de déprotéinisation

Nous remarquons que la déprotéinisation est proportionnelle à la durée de la réaction jusqu'à 2 heures. Au-delà, nous atteignons un palier.

1.2.3. Optimisation de la température de la réaction de déprotéinisation :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1 g, le volume en soude caustique est de 15 ml, la concentration en NaOH est de 2 M et la durée de la réaction est de 2 heures. Les essais sont effectués en triplicat. Les résultats sont représentés dans la figure n°23 :

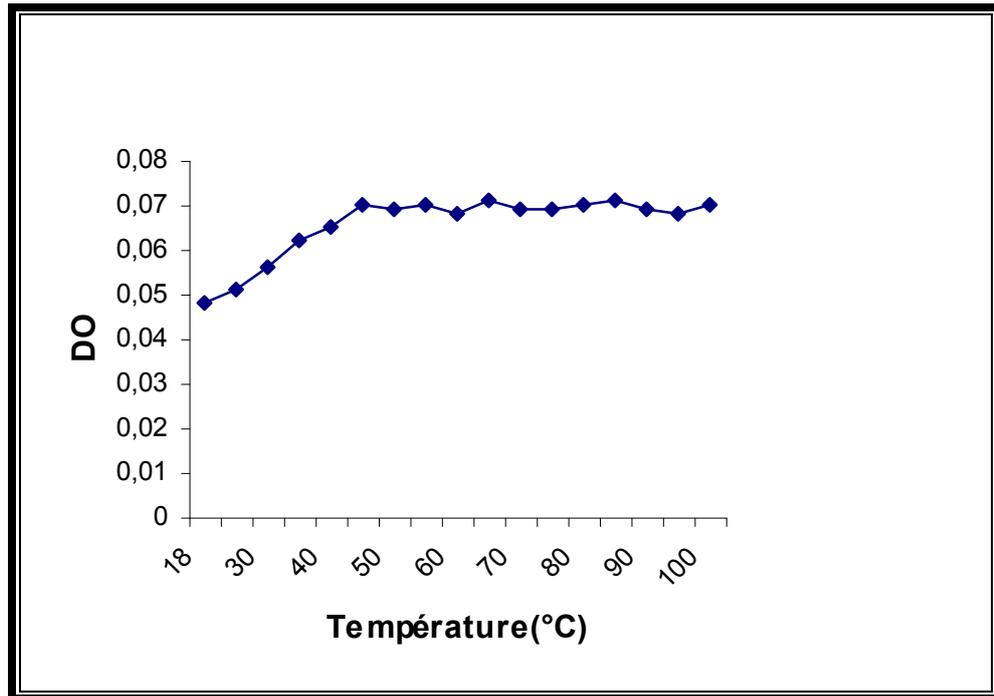


Figure n° 23 : Optimisation de la température de la réaction de déprotéinisation

Nous remarquons que la déprotéinisation peut se faire à température ambiante, mais est optimale à 45°C.

1.2.4. Optimisation du volume en hydroxyde de sodium :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, la concentration en NaOH est de 2 M, la température de la réaction est de 45°C et la durée de la réaction est de 2 heures. Les essais sont effectués en triplicat. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure n°24 :

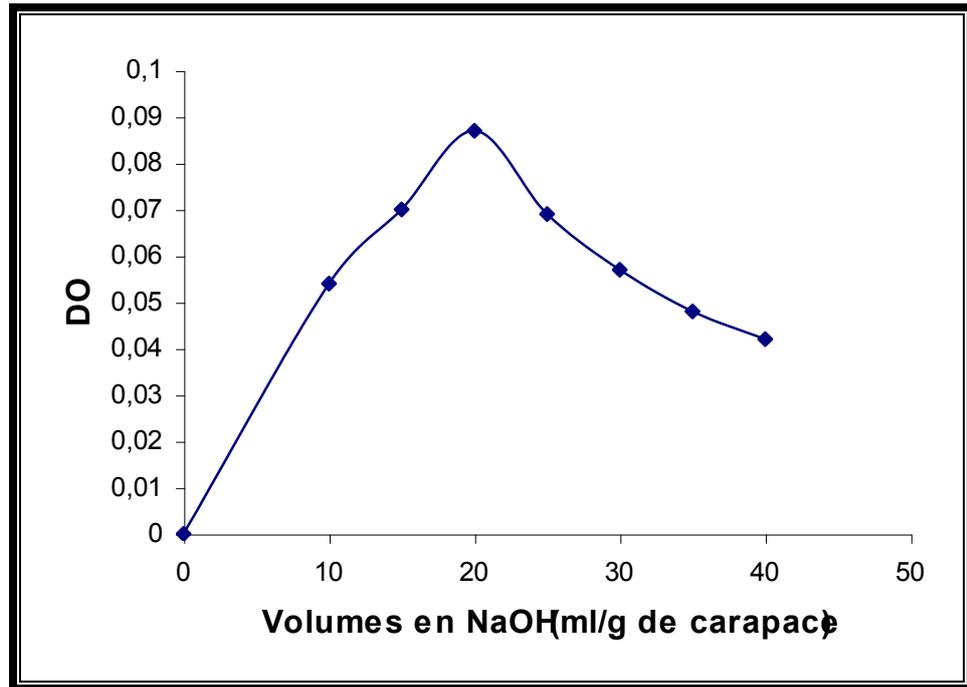


Figure n° 24 : Optimisation du volume en hydroxyde de sodium

Nous constatons que le volume optimum pour déprotéiner les carapaces de crevettes est de 20ml. Notons que si l'on diminue ou augmente ce volume, le rendement de la réaction baisse. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à des volumes de NaOH inférieurs à 20ml, il n'y a pas assez d' OH^- pour hydrolyser au maximum les liaisons peptidiques. Par contre, à des volumes de NaOH supérieurs à 20ml, il y a augmentation du volume en NaOH alors que la quantité de protéines libérées reste constante. Ainsi, plus l'on augmente le volume en NaOH, plus il y aura diminution de la concentration en protéine (la quantité de protéines restera constante et à son maximum).

Les conditions optimisées de la déprotéinisation sont résumées dans le tableau n°6:

Tableau n° 6 : Les conditions optimisées de la déprotéinisation pour 1g de carapaces

Température (°C)	Temps (h)	Volume de NaOH (ml)	Concentration en NaOH (M)
45	2	20	2

1.3. Caractérisation de la carapace des crevettes, de la chitine et des chitosanes :

Les différents résultats, obtenus lors de l'analyse des carapaces et des différents produits, sont illustrés dans le tableau n°7 :

Tableau n° 7 : Résultats de l'analyse des carapaces et des différents produits

	Carapace brute	Chitine	Chitosane I	Chitosane II
Taux de cendre (%)	20,18	0,22	0,18	0,2
Densité apparente (g/ml)	0,46	0,21	0,19	0,16
Densité réelle	1,34	0,97	0,99	0,98
Protéines (libres et liées) (%)	40,6	3,14	1,08	1,12
Corps gras, pigments et autres (%)	15,55	0	0	0
Chitine (%)	23,67	/	/	/
Viscosité intrinsèque (100ml/g)	/	15,687	0,9884	0,99
Poids moléculaire (Daltons)	/	388000	12000	12000
D.D. (%)	/	35	78	77,5

Remarque : L'étape « quenching », négligée par la plupart des auteurs, a augmenté l'efficacité de la déminéralisation (le taux de cendre de la chitine est passé de 0,46% à 0,22%) en rendant la structure cristalline de la chitine amorphe.

Les degrés de désacétylation des chitosanes et de la chitine étaient calculés par spectrophotométrie à Infra-Rouge. Les résultats sont présentés sur les figures n°25, 26 et 27.

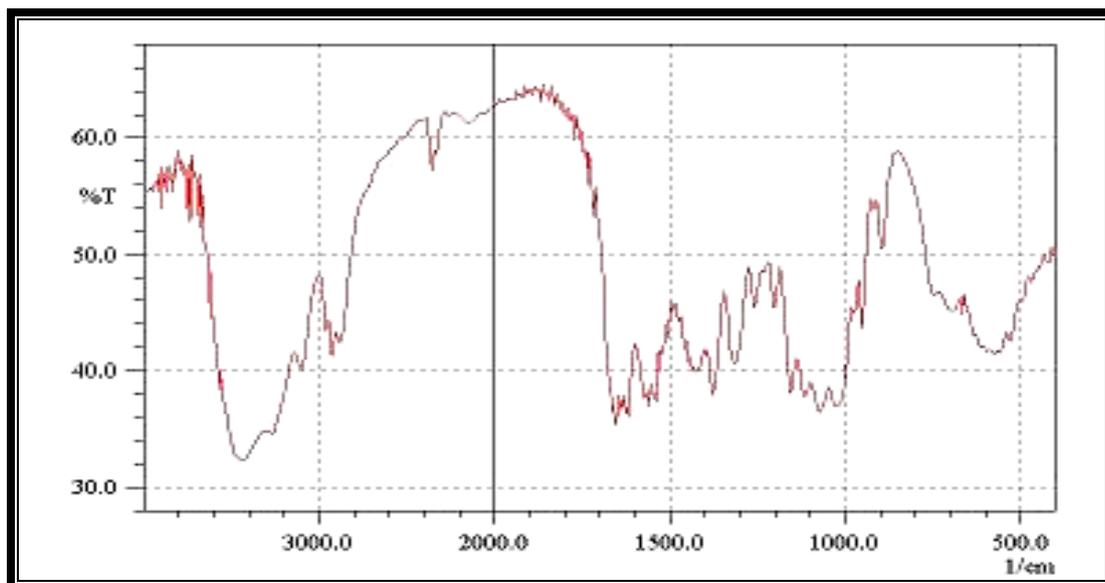


Figure n° 25 : Résultat de la spectroscopie F.T.I.R. pour la chitine

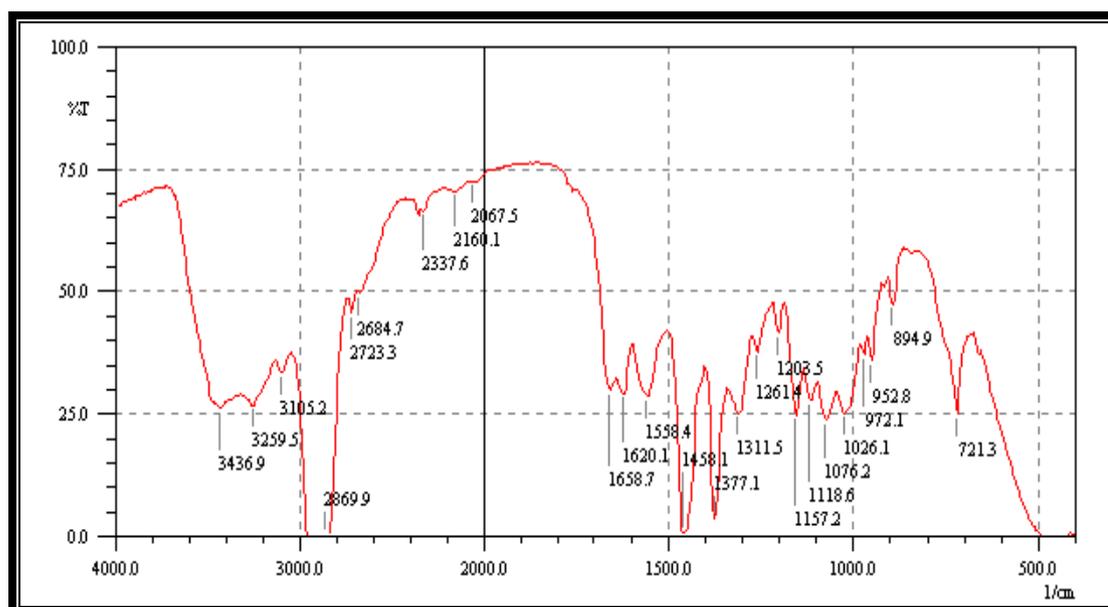


Figure n° 26 : Résultat de la spectroscopie F.T.I.R. pour le chitosane issu du premier protocole

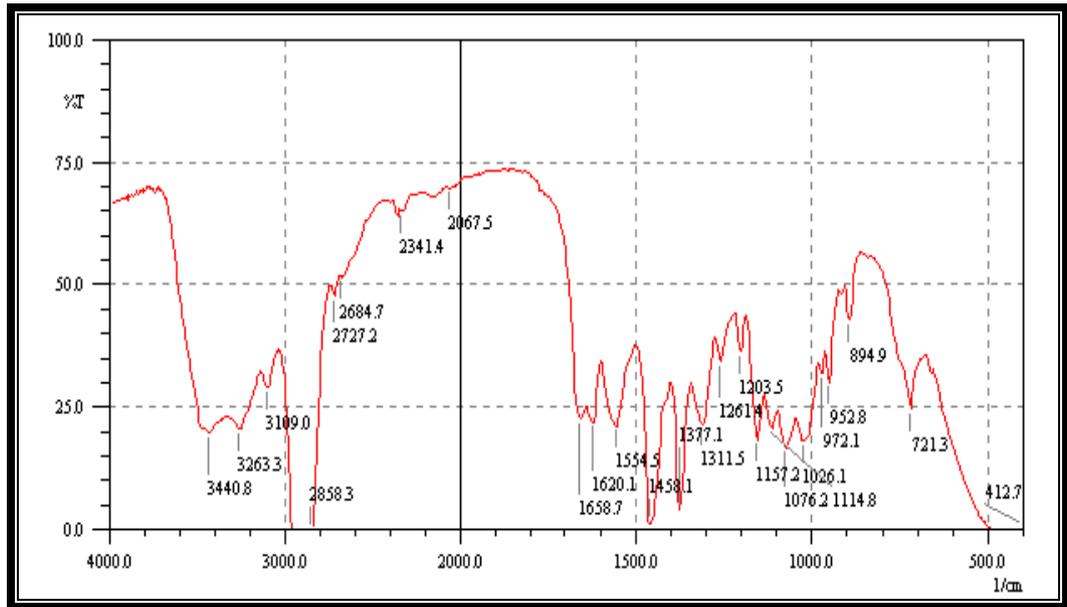


Figure n° 27 : Résultat de la spectroscopie F.T.I.R. pour le chitosane issu du deuxième protocole

La spectroscopie F.T.I.R. (Fourrier Transformed Infra Red) révèle la présence de pics caractéristiques de la chitine et du chitosane (figures n°32, 33 et 34), il s'agit de :

- Pic à 3440 : bande O-H.
- Pic à 2858 : bande C-H.
- Pic à 1658 : bande N-H.
- Pic à 1076 : bande du pont O.
- Pic à 721 : bande C-O.

Le pic à 1658, caractéristique de la présence des groupements amines au niveau de la chitine et du chitosane, est bien visible, preuve que la chitine possède un grand nombre de groupement NH_2 . Les D.D. sont de l'ordre de 78% pour le chitosane I, 77,5% pour le chitosane II et 35% pour la chitine.

2. Discussion :

Les résultats sont originaux vu qu'aucune étude similaire n'a été faite sur la crevette *Parapenaeus longirostris*.

L'analyse des carapaces de *Parapenaeus longirostris* a démontré la présence de 23,7% de chitine, 40,6% de protéines, 20,2% de minéraux et les 15,5% restant

représentent les corps gras, les pigments et autres. Nos résultats sont en accord avec ceux de No et ses collaborateurs (No, *et al.*, 1989). Il faut avoir à l'esprit, toutefois, que ces données ne sont pas constantes car chez les crustacés, des variations quantitatives et qualitatives de la chitine en fonction de l'espèce, du stade physiologique de l'organisme ou des variations saisonnières peuvent être observés (Seng, 1988 ; Fernandez-Kim, 2004).

La densité apparente de la chitine est de 0,21 g/ml. Elle est supérieure aux densités de chitines issues de crevettes (0,06 g/ml) et de crabes (0,17 g/ml) (Fernandez-Kim, 2004). Cette différence indique que la chitine issue des carapaces de crevettes *Parapenaeus longirostris* est moins poreuse que celles issues des carapaces d'autres espèces de crevettes. Elle est donc plus proche des chitines issues de carapaces de crabes.

Le poids moléculaire de la chitine est de 388 kDa. Il correspond parfaitement à la masse du polymère dans la littérature mais il reste tout de même approximatif car la chitine native peut subir une dépolymérisation durant les étapes de son extraction (Kurita, 2001). Ceci est valable aussi pour le chitosane. Nous remarquons que l'étape de désacétylation fait chuter le poids moléculaire car il y a une dépolymérisation, en parallèle, de la molécule due aux hautes températures utilisées (Sabnis et Block, 2000).

D'après nos résultats, la transformation de la chitine en chitosane, qui correspond à l'augmentation du degré de désacétylation, induit une diminution de la densité apparente. Ceci est en accord avec les résultats présentés dans la littérature (Fernandez-Kim, 2004).

L'étape « quenching », négligée par la plupart des auteurs, permet, par un choc thermique, d'améliorer le rendement de la déminéralisation et facilite le broyage des carapaces. Ceci est dû au relâchement de la structure cristalline de la chitine (Mukherjee, 2001). Certains auteurs utilisent les microondes pour obtenir un relâchement de la structure (Roy, *et al.*, 2003).

L'optimum de la déminéralisation des carapaces de *Parapenaeus longirostris* est atteint en utilisant 15ml d'HCl à 1,5N à la température ambiante sous agitation pendant une heure. Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par No et ses collaborateurs (1989). Ces derniers ont extrait la chitine à partir de la langouste (l'espèce n'a pas été mentionnée) et ont mis en évidence que l'optimum de la déminéralisation est situé à la température ambiante pendant 30 minutes avec de l'HCl à 1N et un rapport de 1/15 g/ml (No, *et al.*, 1989). Mukherjee (2001) a travaillé, lui aussi, sur l'extraction de la chitine à partir de la langouste (l'espèce n'a pas été mentionnée) et a mis en évidence que l'optimum de la déminéralisation est situé à la température de 25°C pendant 2 heures avec de l'HCl à 1N et un rapport de 1/15 g/ml (Mukherjee, 2001). Par contre, Chang et Tsai (1997), ont employé la crevette rose *Solenocera melanthero* et sont parvenus à des conditions optimales de déminéralisation de la carapace à la température ambiante avec une concentration en HCl de 1,7N et un rapport de 9ml/g (Chang et Tsai, 1997). Mirzadeh et ses collaborateurs (2002) ont travaillé sur l'extraction de la chitine à partir de la crevette du Golf persique et ont mis en évidence que l'optimum de la déminéralisation est situé à la température ambiante pendant 3 à 5 heures avec de l'HCl à 10% (Mirzadeh, *et al.*, 2002). Ceci indique que la structure, la conformation et les propriétés de la chitine diffèrent d'une espèce à l'autre. La structure minérale des carapaces de crevettes blanches *Parapenaeus longirostris* semble être plus proche de celle des langoustes que celle de la crevette rose *Solenocera melanthero* ou celle de la crevette du Golf persique.

Nous avons opté pour la déprotéinisation chimique car l'extraction des protéines par les enzymes est incomplète (contrairement au procédé chimique). De plus, l'utilisation des enzymes protéolytiques peut se révéler coûteuse et ce, en fonction de l'enzyme utilisée (Tan et Lee, 2002).

L'optimum de la déprotéinisation des carapaces de *Parapenaeus longirostris* est atteint en utilisant 20ml de NaOH 2M à 45°C sous agitation pendant deux heures et un rapport de 1/20 g/ml. Nos résultats diffèrent de ceux indiqués dans la littérature. Citons entre autres : Chang et Tsai (1997), ont déterminé que les conditions optimales de déprotéinisation sont : une température de 75°C, une concentration en NaOH de 2,5N et un rapport de 5ml/g (Chang et Tsai, 1997). Certains auteurs ont mis en évidence que

l'optimum de la déprotéinisation est situé à la température de 65°C pendant 2 heures avec du NaOH à 3,5% et un rapport de 1/10 g/ml (**Mukherjee, 2001 ; No, et al., 1989**). Mirzadeh et ses collaborateurs (2002), quant à eux, sont parvenus à la conclusion que l'optimum de la déprotéinisation est situé à la température de 60-65°C avec du NaOH à 2N (**Mirzadeh, et al., 2002**). Tout cela confirme bien, que notre chitine n'est pas semblable à celle extraite de la langouste.

Les protéines, ainsi extraites, peuvent être récupérées et valorisées (**Synowiecki, et Ali Abdul Quawi Al-Khateb, 2000**).

Plusieurs auteurs ont proposé des optimums de désacétylation, citons entre autres :

Sergio et ses collaborateurs ont fixé l'optimum de la désacétylation (sans mentionner la source de la chitine) à 115°C pendant 6 heures et avec du NaOH à 40% et un rapport de 1/48 g/ml (**Sergio, et al., 2001**).

Campana et Signini, qui ont utilisé de la chitine commerciale (source non citée), ont désacétylé la chitine à 115°C pendant 6 heures avec du NaOH à 40% (**Campana et Signini, 2001**).

Mukherjee a travaillé sur l'extraction de la chitine à partir de la langouste et a mis en évidence que l'optimum de la désacétylation est situé à la température de 80°C pendant 96 heures avec du NaOH à 50% et un rapport de 1/25 g/ml (**Mukherjee, 2001**).

Kolodziejska et ses collaborateurs, qui ont travaillé sur la chitine du krill *Euphasia superba* ont utilisé du NaOH à 50% avec un rapport de 1/10 g/ml à la température de 140°C pendant 1 heure (**Kolodziejska, et al., 2000**).

Mirzadeh et ses collaborateurs ont utilisé du NaOH à 50% avec un rapport de 1/50 g/ml à la température de 95°C pendant 3 heures (**Mirzadeh, et al., 2002**).

Notre choix s'est porté sur les 2 dernières méthodes car elles sont plus rapides, tout en utilisant les mêmes concentration en NaOH. Nos résultats ont démontré des caractéristiques très voisines des deux chitosanes obtenus (voir tableau n°7).

Les caractéristiques physico-chimiques du chitosane varient selon l'espèce et la méthode de préparation. En général, les hautes températures, l'oxygène dissout et les fortes agitations peuvent causer la dégradation du chitosane. Par exemple, à des

températures supérieures à 280°C, le polymère est rapidement dégradé (**Fernandez-Kim, 2004**).

Durant le processus de préparation du chitosane, plusieurs facteurs tels le degré de désacétylation, le poids moléculaire, la concentration de la solution, les forces ioniques, le pH et la température affectent la production du chitosane et ses propriétés. Par exemple, la viscosité du chitosane diminue avec l'augmentation du temps de la déminéralisation (**Fernandez-Kim, 2004**).

Le degré de désacétylation peut être augmenté en répétant plusieurs fois la réaction (**Kim, et al., 2000**).

Mirzadeh et ses collaborateurs (2002) ont travaillé sur l'extraction de la chitine à partir de la crevette et ont dépigmenté leur chitine avec de l'acétone pendant 2 heures (**Mirzadeh, et al., 2002**). Nous avons préféré utiliser la méthode de No et ses collaborateurs (**No, et al., 1989**) qui associent une étape de blanchiment pour garantir une chitine la plus blanche possible. Cependant, la chitine garde toujours une couleur blanc cassé et s'éclaircit après désacétylation. Certainement que les pigments sont liés du moins partiellement aux groupements acétylés de la chitine.

Ces pigments peuvent être valorisés. Ils peuvent notamment être incorporés dans l'alimentation des salmonidés, afin que ceux-ci acquièrent une plus forte pigmentation. Les poissons sont incapables de synthétiser eux-mêmes ces molécules (**Tan, et al., 2002 ; Chen et Meyers, 1982 ; Armanta, et al., 2002**).

La dépolymérisation a été effectuée par de l'acide chlorhydrique comme préconisé par Chang et ses collaborateurs (**Chang, et al., 2000**). D'autres auteurs utilisent d'autres acides mais ils obtiennent des hydrolysats d'assez haut poids moléculaires. C'est le cas de Jia et Shen (2002) qui ont hydrolysé le chitosane avec de l'acide phosphorique et ont obtenu des chitosanes de poids moléculaires assez élevés ($7,1 \cdot 10^4$ à $21,4 \cdot 10^4$ Daltons) (**Jia et Shen, D., 2002**). D'autres utilisent de l'acide fluorhydrique pour la dépolymérisation (**Muraki, et al., 1993**). Cette hydrolyse peut être effectuée, aussi, avec des bases mais le degré d'hydrolyse est faible (**Anonymous, 2003**). D'autres auteurs utilisent la γ -irradiation pour dépolymériser le chitosane (**Liu, et al., 2000**).

Lors de la dépolymérisation du chitosane, il peut se produire, en parallèle, une désacétylation (**Varum, et al., 2001**).

L'extraction de la chitine et du chitosane peut être réalisée directement à partir de microorganismes (**Chen, et al., 2001 (a) ; Chen, et al., 2001 (b) ; Chen, et al., 2001 (c) ; Park, et al., 1993 ; Al-Bassam, et al., 1986 ; Da Silva Amorim, et al., 2001**).

3. Etude de l'effet antibactérien :

Afin de mettre en évidence un effet antimicrobien exercé par nos différents produits, nous avons utilisé de l'eau peptonée comme milieu de culture pour les bactéries aérobies et le bouillon T.G.Y. pour les bactéries anaérobies strictes, et avons fait cinq essais pour chaque souche (en absence de produit et en présence de 0,1% de chacun d'eux) et avons mesuré la D.O. à 640nm.

Remarque : nous n'avons testé que le chitosane I et ses oligosaccharides car les deux chitosanes possédaient des D.D. ainsi que des poids moléculaires pratiquement identiques.

Le calcul de la concentration minimale inhibitrice (C.M.I.) pour l'ensemble des souches est reporté sur le tableau n°8.

Tableau n° 8 : Les résultats des concentrations minimales inhibitrices pour les différentes souches

Les souches testées	C.M.I. (%)			
	Chitine	Chitosane I	Oligochitine	Oligo-chitosane I
<i>Escherichia coli</i>	0,01	0,01	0,003	0,003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 0,1	0,05	0,003	0,003
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	0,03	0,03	0,003	0,003
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0,03	0,03	0,003	0,003
<i>Salmonella typhimurium</i>	> 0,1	> 0,1	0,003	0,003
<i>Bacillus subtilis</i>	0,03	0,01	0,003	0,003
<i>Bacillus cereus</i>	0,03	0,01	0,003	0,003
<i>Vibrio cholerae</i>	0,01	0,01	0,003	0,003
<i>Shigella dysenteriae</i>	0,01	0,01	0,003	0,003
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,01	0,01	0,003	0,003
<i>Prevotella melaninogenica</i>	> 0,1	0,01	0,003	0,003
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,006	0,006	0,003	0,003

3.1. Les bactéries à Gram positif :

Pour notre étude, nous avons utilisé 4 bactéries à Gram positif qui sont les suivantes :

***Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300:**

Ce sont deux souches de référence (**American Type Culture Collection**). Les staphylocoques sont des Cocci à Gram positif non sporulés aéro-anaérobies facultatifs. La première souche (***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**) est sensible à la pénicilline alors que la seconde (***Staphylococcus aureus* ATCC 43300**) ne l'est pas.

***Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* :**

Ce sont deux souches identifiées au niveau du service milieu de culture de l'**Institut Pasteur d'Alger**. Les bacillus sont des bacilles sporulés aéro-anaérobies facultatif à Gram positif.

Les essais dupliqués ont donné les résultats suivants :

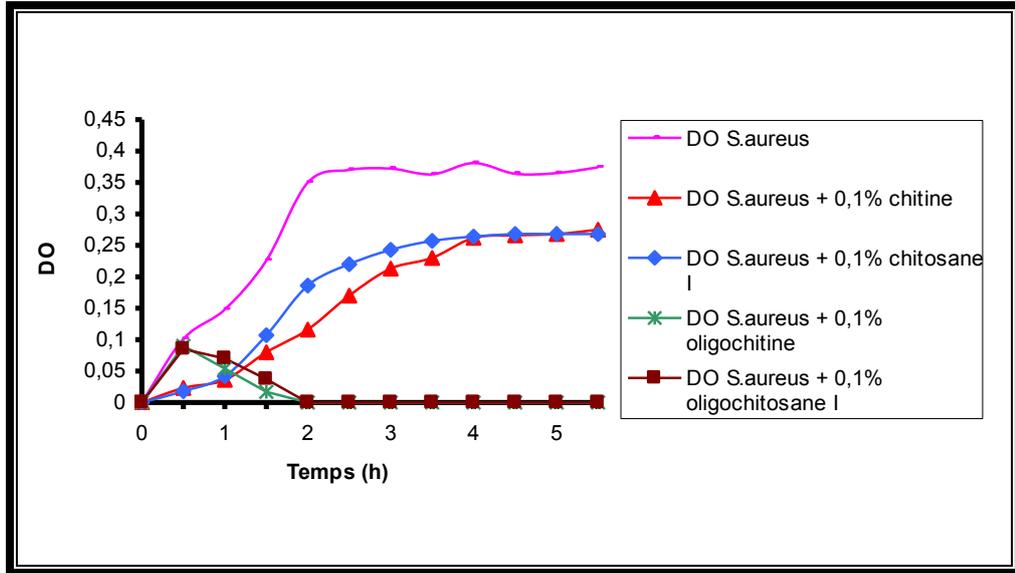


Figure n° 28 : Effet des différents produits sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (souche sensible à la pénicilline)

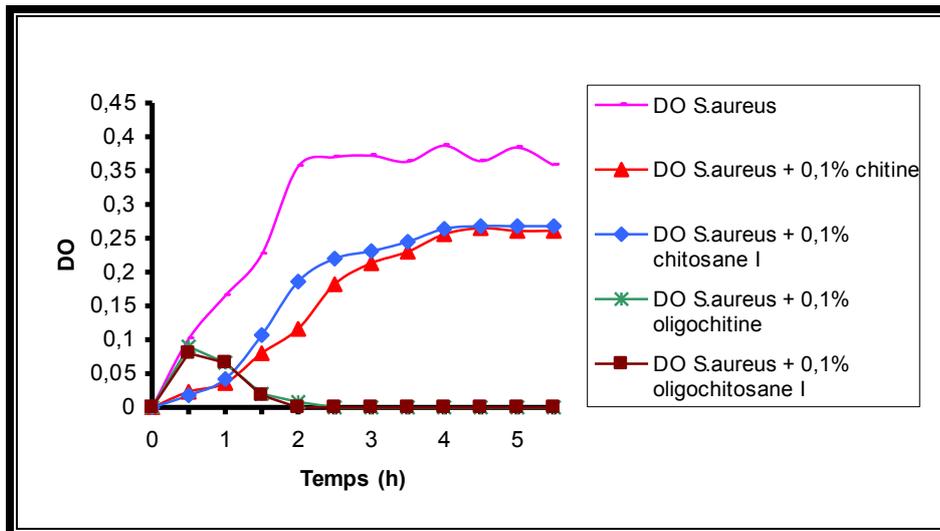


Figure n° 29 : Effet des différents produits sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (souche résistante à la pénicilline)

En ce qui concerne les deux souches de *Staphylococcus aureus* (Figures n°28 et 29), nous remarquons que nous obtenons les mêmes profils et déduisons qu'elles ont les mêmes sensibilités vis-à-vis des quatre substances testées.

Les quatre substances ont un effet inhibiteur sur la croissance des deux *Staphylococcus aureus*.

En ce qui concerne la chitine et le chitosane, il y a pour les deux souches testées, une phase exponentielle plus lente par rapport au témoin (en absence de chitine ou chitosane) et la phase stationnaire est atteinte au bout de 4 heures alors que pour le témoin, cette phase stationnaire est atteinte au bout de 2 heures.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,4 et correspond à une concentration bactérienne de $1,2 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec la chitine et le chitosane, la densité optique maximale est la même et égale à 0,25. Cela correspond à une concentration bactérienne de $0,75 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Staphylococcus aureus* d'un tiers (37,5%).

La chitine et le chitosane semblent avoir un effet bactériostatique sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

D'ailleurs, Gerasimenko et ses collaborateurs (2004) ont eux aussi testé l'activité antibactérienne d'un chitosane de même poids moléculaire que le notre (12kDa) et un autre de 27kDa et ont conclu que le chitosane de 12kDa possède un plus grand effet inhibiteur sur la croissance *Staphylococcus aureus* que le chitosane de poids moléculaire égal à 27 kDa (**Gerasimenko, et al., 2004**).

La concentration minimale inhibitrice de *Staphylococcus aureus* pour le chitosane est de 0,03% (Tableau n°8). Cette concentration est multipliée par 2 (0,06%) dans les études menées par Jeon et ses collaborateurs (**Jeon, et al., 2001**). Ceci confirme l'idée que le chitosane produit dans notre laboratoire possède un grand potentiel inhibiteur.

En ce qui concerne les oligosaccharides de la chitine et du chitosane, nous remarquons que nous obtenons les mêmes profils (Figures n°28 et 29) et déduisons que les deux souches de *Staphylococcus aureus* ont les mêmes sensibilités vis-à-vis des N-acétyl chitoooligosaccharides et des chitoooligosaccharides.

Pour ces deux substances et pour les deux souches testées, il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 30 minutes et tout de suite après une phase de déclin qui dure 1 heure et 30 minutes pour atteindre ensuite une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,4 et correspond à une concentration bactérienne de $1,2 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères de la chitine et du chitosane, la densité optique maximale est la même et égale à 0,09, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,27 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Staphylococcus aureus* de 3/4 (77,5%).

Les N-acétyl chitoooligosaccharides et les chitoooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Les C.M.I. du chitosane et de la chitine sont de 0,03% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

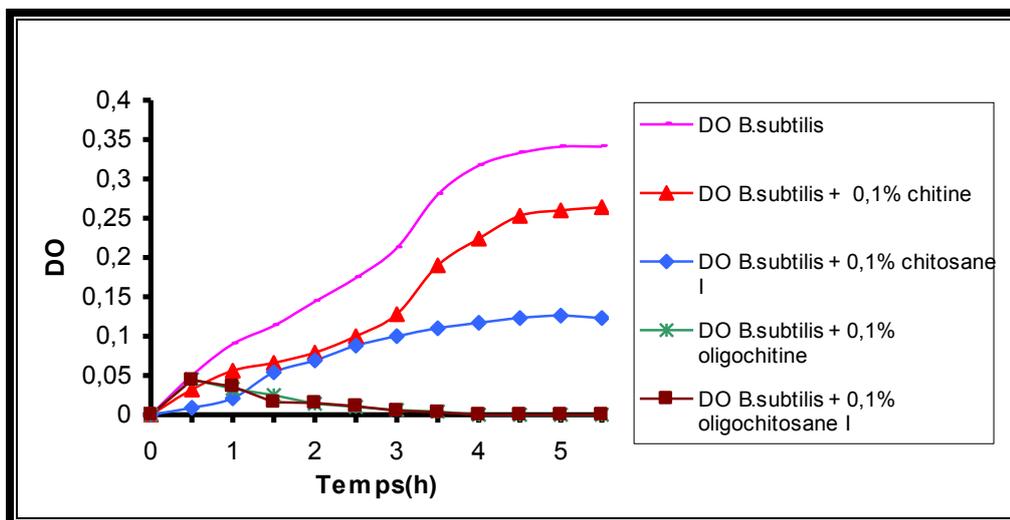


Figure n° 30 : Effet des différents produits sur la croissance de *Bacillus subtilis* I.P.A.

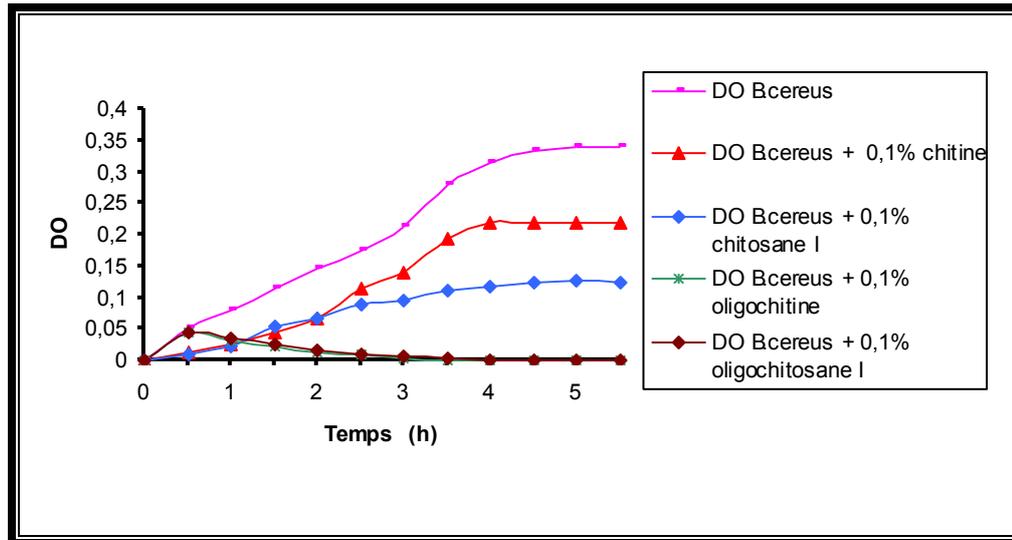


Figure n° 31 : Effet des différents produits sur la croissance de *Bacillus cereus* I.P.A.

En ce qui concerne les deux souches de *Bacillus* (Figures n°30 et 31), nous remarquons que nous obtenons les mêmes profils en incorporant 0,1% d'oligomères de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture et déduisons que *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* ont les mêmes sensibilités vis-à-vis des deux substances testées.

Pour ces deux substances et pour les deux souches testées, il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 30 minutes et tout de suite après une phase de déclin qui dure 2,5 heures à 3 heures pour aboutir à une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,341 et correspond à une concentration bactérienne de $1,023 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères de la chitine et du chitosane, la densité optique maximale est la même et égale à 0,045, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,135 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Bacillus* de 6/7 (86,8%).

Les N-acétyl chitooligosaccharides et les chitooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*.

En ce qui concerne *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*, la chitine et le chitosane ne semblent pas avoir le même effet. Certes tous deux semblent avoir un effet bactériostatique mais ce dernier est plus marqué avec le chitosane.

Pour *Bacillus subtilis* (Figure n°30), la phase stationnaire est atteinte au bout de 5 heures que ce soit pour le témoin ou pour les essais avec la chitine ou le chitosane, mais la pente diminue avec la chitine et encore plus avec le chitosane.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,341 et correspond à une concentration bactérienne de $1,023 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour l'essai avec la chitine, la densité optique maximale est de 0,264, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,792 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitine au milieu de culture a diminué d'un quart (22,58%) la concentration finale de *Bacillus subtilis*. L'essai avec le chitosane donne une densité optique maximale de 0,123, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,369 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitine dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Bacillus subtilis* de deux tiers (63,93%).

Pour *Bacillus cereus* (Figure n°31), la phase stationnaire est atteinte au bout de 4,5 heures que ce soit pour le témoin ou pour les essais avec la chitine ou le chitosane, mais la pente diminue avec la chitine et encore plus avec le chitosane.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,341, ce qui équivaut à une concentration bactérienne de $1,023 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, alors que pour l'essai avec la chitine, la densité optique maximale est de 0,22, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,66 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. En rajoutant 0,1% (p/v) de chitine dans le milieu de culture, la concentration finale de *Bacillus cereus* a diminué d'un tiers (35,48%). L'essai avec le chitosane donne une densité optique maximale de 0,123, correspondant à une concentration bactérienne de $0,369 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitine dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Bacillus cereus* de deux tiers (63,93%).

Le chitosane employé dans cette expérience a une faible viscosité (0,9884) et un faible poids moléculaire (12kDa). No et ses collaborateurs (2002) ont affirmé que l'activité antibactérienne du chitosane envers *Bacillus sp.* augmente avec la diminution de la viscosité (No, *et al.*, 2002). L'activité antibactérienne du chitosane diminue avec l'augmentation du poids moléculaire (Liu, *et al.*, 2000).

La C.M.I. du chitosane envers *Bacillus subtilis* est de 0,01% (Tableau n°8). Cette concentration est multipliée par 6 (0,06%) dans les études menées par Jeon et ses collaborateurs (**Jeon, et al., 2001**). Ceci confirme l'idée que le chitosane produit dans notre laboratoire est doué d'un grand potentiel inhibiteur.

Pour *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, la C.M.I. de la chitine est de 0,03%, celle du chitosane est de 0,01% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

3.2. Les bactéries à Gram négatif :

Pour notre étude, nous avons utilisé 8 bactéries à Gram négatif qui sont les suivantes :

***Escherichia coli* ATCC 25922:**

C'est une souche de référence (**American Type Culture Collection**). Il s'agit d'un bacille non sporulé aéro-anaérobie facultatif.

***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853:**

C'est une souche de référence (**American Type Culture Collection**). Il s'agit d'un bacille non sporulé aérobie strict.

***Salmonella typhimurium*:**

C'est une souche identifiée au niveau du service milieux de culture de l'**Institut Pasteur d'Alger**. Les salmonelles sont des bacilles non sporulés aéro-anaérobies facultatives.

***Vibrio cholerae* (sérotypage ogawa):**

C'est une souche identifiée au niveau du service milieux de culture de l'**Institut Pasteur d'Alger**. Il s'agit d'un bacille non sporulé aéro-anaérobie facultatif.

***Shigella dysenteriae*:**

C'est une souche identifiée au niveau du service milieux de culture de l'**Institut Pasteur d'Alger**. Les shigelles sont des bacilles non sporulés aéro-anaérobies facultatives.

✶ *Enterobacter agglomerans*:

C'est une souche identifiée au niveau du service milieux de culture de l'**Institut Pasteur d'Alger**. Il s'agit d'un bacille non sporulé aéro-anaérobie facultatif.

✶ *Prevotella melaninogenica*:

C'est une souche identifiée au niveau du service des anaérobies de l'**Institut Pasteur d'Alger**. Il s'agit d'un bacille non sporulé anaérobie stricte.

✶ *Bacteroides fragilis*:

C'est une souche identifiée au niveau du service des anaérobies de l'**Institut Pasteur d'Alger**. Il s'agit d'un bacille non sporulé anaérobie stricte.

Les essais dupliqués ont donné les résultats suivants :

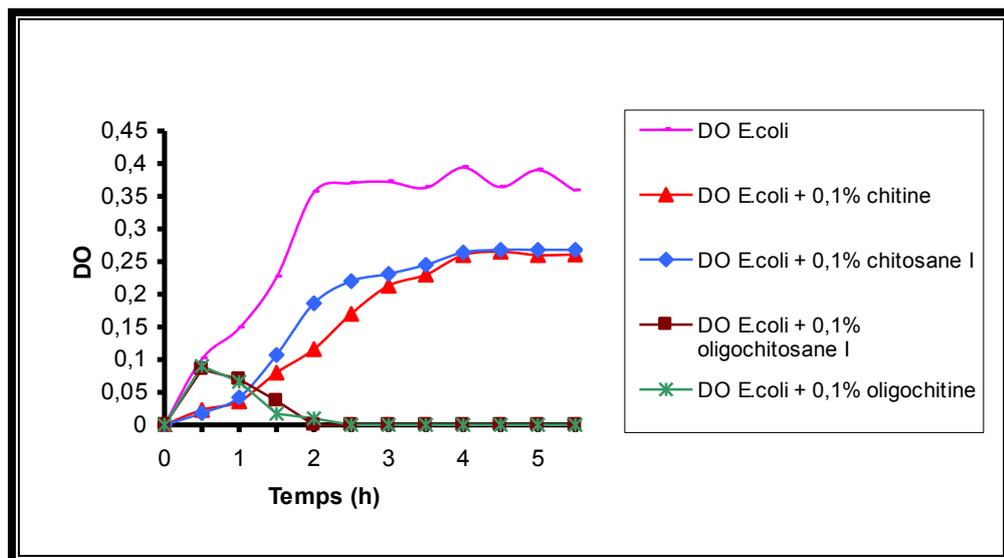


Figure n° 32 : Effet des différents produits sur la croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922

En ce qui concerne *Escherichia coli*, nous remarquons que nous obtenons les mêmes profils pour la chitine et le chitosane (Figure n°32). Il y a d'abord une phase exponentielle plus lente par rapport au témoin (en absence de chitine ou de chitosane) et la phase stationnaire est atteinte au bout de 4 heures alors que pour le témoin, cette dernière phase est atteinte au bout de 2 heures.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,39 et correspond à une concentration bactérienne de $1,17 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec la chitine et le chitosane, la densité optique maximale est environ la même et est de 0,268, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,804 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. En incorporant 0,1% (p/v) de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture, il y a diminution la concentration finale d'*Escherichia coli* d'un tiers (31,28%).

La chitine et le chitosane semblent avoir un effet bactériostatique sur la croissance d'*Escherichia coli*.

Gerasimenko et ses collaborateurs (2004) ont étudié l'effet antibactérien d'un chitosane de même poids moléculaire que le notre (12 kDa) et ont conclu que le chitosane de 12 kDa possède un plus grand effet inhibiteur sur la croissance d'*Escherichia coli* que le chitosane de poids moléculaire égal à 27 kDa (**Gerasimenko, et al., 2004**). Le chitosane employé dans cette expérience a une faible viscosité (0,9884) et un faible poids moléculaire (12 kDa). No et ses collaborateurs (2002) ont affirmé que l'activité antibactérienne du chitosane envers *Escherichia coli* augmente avec la diminution de la viscosité (**No, et al., 2002**). Liu et ses collaborateurs (2000) ont démontré, quant à eux, que l'activité antibactérienne du chitosane diminue avec l'augmentation du poids moléculaire (**Liu, et al., 2000**).

En ce qui concerne les oligosaccharides de la chitine et du chitosane, nous remarquons que nous obtenons les mêmes profils (Figure n°32). Pour ces deux substances, il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 30 minutes et tout de suite après une phase de déclin qui dure 1,5 heures pour atteindre une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,39 et correspond à une concentration bactérienne de $1,17 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères de la chitine et du chitosane, la densité optique maximale est pratiquement la même et égale à 0,09, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,27 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale d'*Escherichia coli* de 3/4 (76,9%).

Les N-acétyl chitoooligosaccharides et les chitoooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance d'*Escherichia coli*.

Jeon et ses collaborateurs (2001) ont utilisé des chitoooligosaccharides et sont parvenus à la même conclusion que nous et qui est que ces substances possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis d'*Escherichia coli* (Jeon, *et al.*, 2001). Jeon et Kim (2002) ont démontré que l'effet inhibiteur des chitoooligosaccharides sur la croissance d'*Escherichia coli* augmente avec leurs concentrations (Jeon et Kim, 2000 (b)).

Les C.M.I. du chitosane et de la chitine sont de 0,01% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

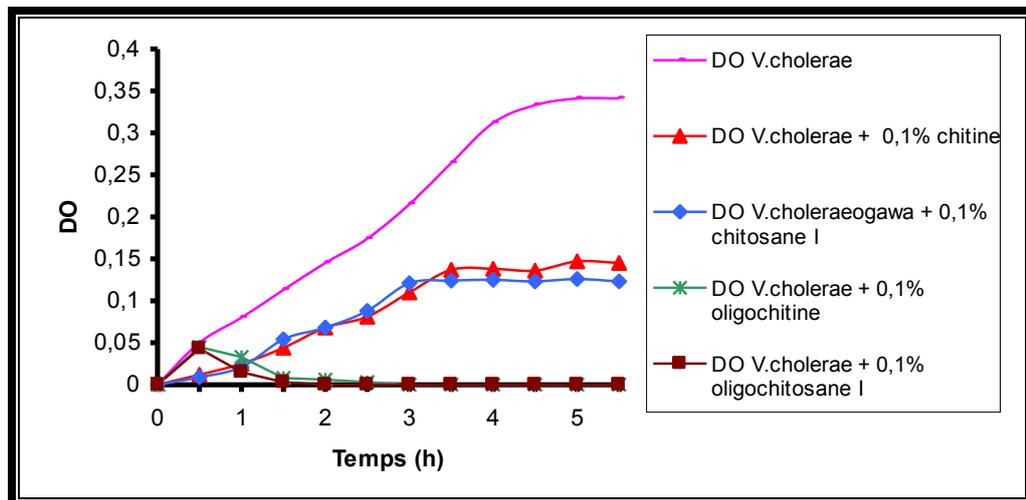


Figure n° 33 : Effet des différents produits sur la croissance de *Vibrio cholerae* I.P.A.

En ce qui concerne *Vibrio cholerae*, nous remarquons que nous obtenons pratiquement les mêmes profils pour la chitine et le chitosane (Figure n°33). La phase stationnaire semble être atteinte au bout de 3 heures pour l'essai avec le chitosane, 3,5 heures pour l'essai avec la chitine, alors que pour le témoin, cette phase stationnaire est atteinte au bout de 4,5 heures.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est 0,34 et correspond à une concentration bactérienne de $1,02 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec la chitine et le chitosane, la densité optique maximale est 0,147 et 0,126,

respectivement, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,441 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture et $0,378 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, respectivement. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitine au milieu de culture a diminué de moitié (56,7%) la concentration finale de *Vibrio cholerae*, et l'adjonction de 0,1% (p/v) de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Vibrio cholerae* de deux tiers (63%).

La chitine et le chitosane semblent avoir un effet bactériostatique sur la croissance de *Vibrio cholerae*.

En ce qui concerne les oligosaccharides de la chitine et du chitosane, nous remarquons que nous obtenons pratiquement les mêmes profils (Figure n°33). Pour ces deux substances, il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 30 minutes et tout de suite après une phase de déclin qui dure 1 heure pour l'essai avec les oligochitines et 1,5 heures pour l'essai avec les oligochitosanes, pour aboutir à une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,34 et correspond à une concentration bactérienne de $1,02 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères de la chitine et du chitosane, la densité optique maximale est pratiquement la même et égale à 0,045, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,135 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine ou de chitosane dans milieu de culture a diminué de 6/7 (87%) la concentration finale de *Vibrio cholerae*.

Les N-acétyl chitooligosaccharides et les chitooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance de *Vibrio cholerae*.

Les C.M.I. du chitosane et de la chitine sont de 0,01% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

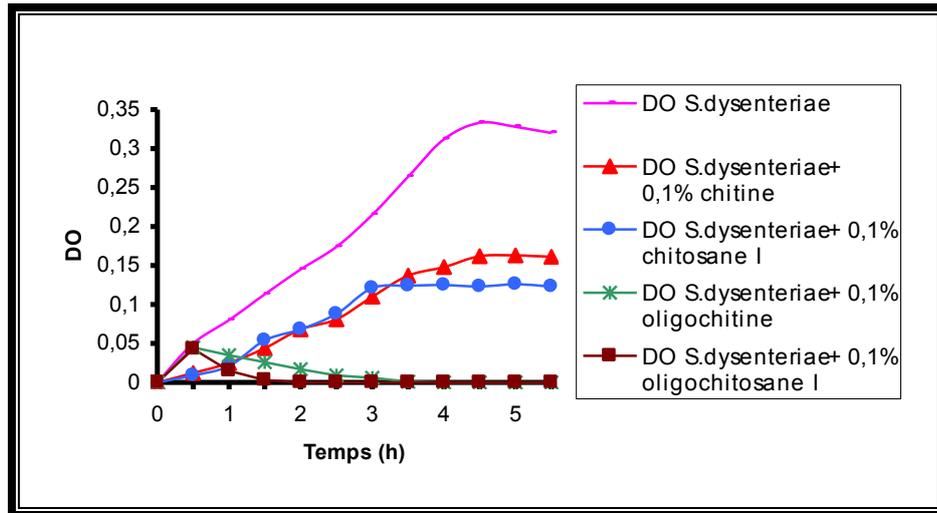


Figure n° 34 : Effet des différents produits sur la croissance de *Shigella dysenteriae* I.P.A.

En ce qui concerne *Shigella dysenteriae* (Figure n°34), la chitine et le chitosane ne semblent pas avoir le même effet. Certes, tous deux semblent avoir un effet bactériostatique mais ce dernier est un peu plus marqué avec le chitosane.

Pour *Shigella dysenteriae*, la phase stationnaire est atteinte au bout de 4 heures que ce soit pour le témoin ou pour l'essai avec la chitine, mais la pente diminue avec la chitine.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,333 et correspond à une concentration bactérienne de $0,999 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour l'essai avec la chitine, la densité optique maximale est de 0,163, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,489 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitine au milieu de culture a diminué la concentration finale de *Shigella dysenteriae* de moitié (51,05%). L'essai avec le chitosane donne une densité optique maximale est de 0,126, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,378 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. En rajoutant 0,1% (p/v) de chitine dans le milieu de culture, il y a diminution de la concentration finale de *Shigella dysenteriae* de deux tiers (62 %).

En ce qui concerne les oligosaccharides de la chitine et du chitosane, nous remarquons que nous n'obtenons pas les mêmes profils (Figure n°34). Pour ces deux substances, il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 30 minutes et tout de

suite après une phase de déclin qui dure 1 heure pour l'essai avec les oligochitines et 2,5 heures pour l'essai avec les oligochitosanes, pour atteindre une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,333 et correspond à une concentration bactérienne de $0,999 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères de la chitine et du chitosane, la densité optique maximale est pratiquement la même et égale à 0,045, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,135 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que l'adjonction de 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Shigella dysenteriae* de 6/7 (86,5%).

Les N-acétyl chitoooligosaccharides et les chitoooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance de *Shigella dysenteriae*.

Les C.M.I. du chitosane et de la chitine sont de 0,01% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

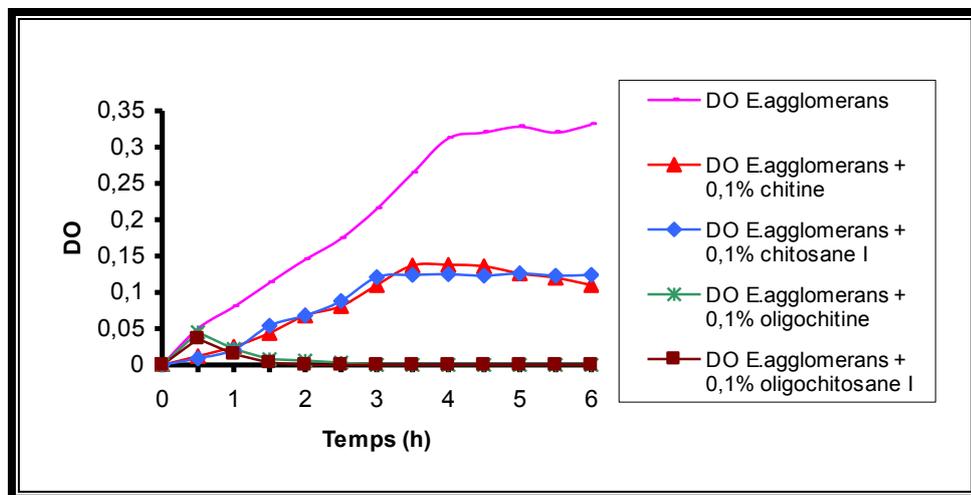


Figure n° 35 : Effet des différents produits sur la croissance d'*Enterobacter agglomerans* (*Pantoea*) I.P.A.

En ce qui concerne *Enterobacter agglomerans*, nous remarquons que nous obtenons pratiquement les mêmes profils pour la chitine et le chitosane (Figure n°35). La phase stationnaire semble être atteinte au bout de 3 heures alors que pour le témoin, cette phase stationnaire est atteinte au bout de 4 heures.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,331 et correspond à une concentration bactérienne de $0,993 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec la chitine et le chitosane, la densité optique maximale est d'environ 0,138, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,414 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale d'*Enterobacter agglomerans* de plus de moitié (58 %).

La chitine et le chitosane semblent avoir un effet bactériostatique sur la croissance d'*Enterobacter agglomerans*.

En ce qui concerne les oligosaccharides de la chitine et du chitosane, nous remarquons que nous obtenons pratiquement les mêmes profils (Figure n°35). Pour ces deux substances, il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 30 minutes et tout de suite après une phase de déclin qui dure 1,5 heures, pour aboutir à une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,331 et correspond à une concentration bactérienne de $0,993 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour l'essai avec les oligomères de la chitine, la densité optique maximale est égale à 0,045, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,135 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine au milieu de culture a diminué de 6/7 (86,4%) la concentration finale d'*Enterobacter agglomerans*. Pour l'essai avec les oligomères du chitosane, la densité optique maximale est égale à 0,036, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,108 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères du chitosane dans le milieu de culture a diminué de 8/9 (89%) la concentration finale d'*Enterobacter agglomerans*.

Les N-acétyl chitooligosaccharides et les chitooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance d'*Enterobacter agglomerans*.

Les C.M.I. du chitosane et de la chitine sont de 0,01% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

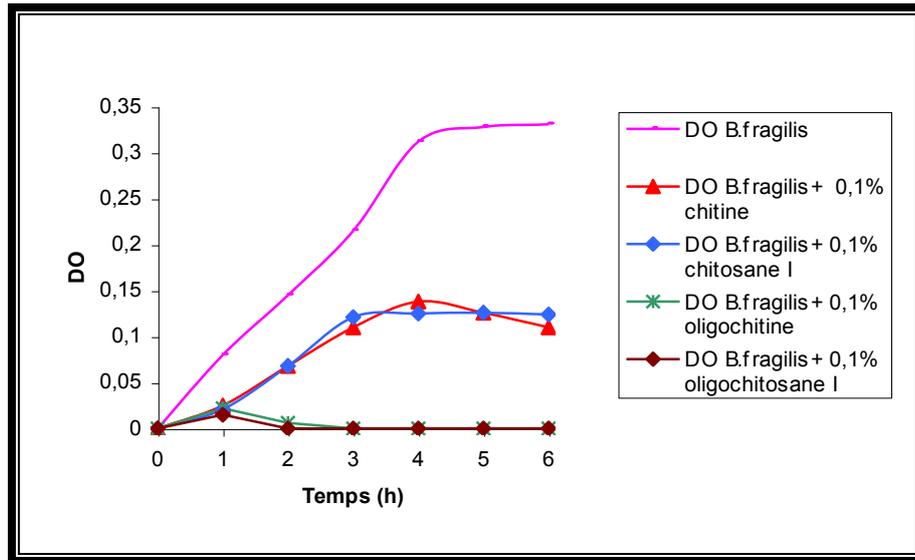


Figure n° 36 : Effet des différents produits sur la croissance de *Bacteroides fragilis* I.P.A.

Pour *Bacteroides fragilis*, nous remarquons que nous obtenons pratiquement les mêmes profils pour la chitine et le chitosane (Figure n°36). La phase stationnaire semble être atteinte au bout de 3 heures alors que pour le témoin, cette phase stationnaire est atteinte au bout de 4 heures.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,33 et correspond à une concentration bactérienne de $0,99 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec la chitine et le chitosane, la densité optique maximale est d'environ 0,068, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,204 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitine ou de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Bacteroides fragilis* de 4/5 (79 %).

La chitine et le chitosane semblent avoir un effet bactériostatique sur la croissance de *Bacteroides fragilis*.

En ce qui concerne les oligosaccharides de la chitine et du chitosane, nous remarquons que nous obtenons pratiquement les mêmes profils (Figure n°36). Pour ces deux substances, il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 1 heure et tout de suite après une phase de déclin qui dure 1 heure pour l'essai avec les oligochitosanes et 1,5 heures pour l'essai avec les oligochitines, pour atteindre une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,33 et correspond à une concentration bactérienne de $0,99 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour l'essai avec les oligomères de la chitine, la densité optique maximale est égale à 0,022, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,066 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine au milieu de culture a diminué de 14/15 (93%) la concentration finale de *Bacteroides fragilis*. Pour l'essai avec les oligomères du chitosane, la densité optique maximale est égale à 0,015, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,045 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères du chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Bacteroides fragilis* de 21/22 (95%).

Les N-acétyl chitoooligosaccharides et les chitoooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance de *Bacteroides fragilis*.

Les C.M.I. du chitosane et de la chitine sont de 0,006% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

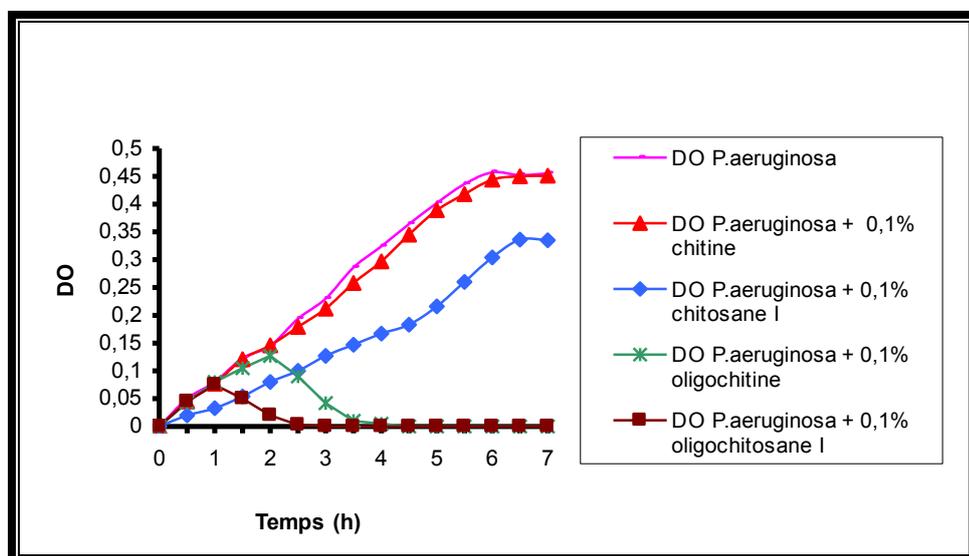


Figure n° 37 : Effet des différents produits sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

En ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa*, nous remarquons que les profils de la croissance de cette souche en présence ou en absence de 0,1% de chitine sont

identiques (Figure n°37). La chitine à 0,1% ne semble avoir aucune action inhibitrice sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*.

Par contre, nous remarquons que le chitosane à 0,1% possède un effet bactériostatique sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour le témoin, la phase stationnaire est atteinte au bout de 6 heures alors que pour l'essai avec le chitosane, la phase stationnaire est atteinte au bout de 6,5 heures et la pente diminue.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,457 et correspond à une concentration bactérienne de $1,371 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour l'essai avec le chitosane, la densité optique maximale est de 0,336, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $1,008 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitosane au milieu de culture a diminué la concentration finale de *Pseudomonas aeruginosa* d'un quart (26,5 %).

Jeon et ses collaborateurs (2001) ont abouti aux mêmes conclusions que nous. Ils ont affirmé qu'avec les bactéries à Gram négatif, le chitosane exhibe un meilleur effet antibactérien avec *Escherichia coli* que *Pseudomonas aeruginosa* et leurs croissances sont complètement inhibées dans un milieu contenant 0,06% de chitosane (**Jeon, et al., 2001**).

L'hypothèse pouvant expliquer le fait que la chitine n'ait eu aucun effet sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* est l'existence d'un mucus excrété par la bactérie, la protégeant en l'enveloppant (**Gerasimenko, et al., 2004**). Nous pourrions penser que ce mucus a pu altérer le pouvoir inhibiteur du chitosane sans l'éliminer complètement. Par contre, l'effet antibactérien de la chitine fut complètement supprimé.

Pour ce qui est des oligochitines (Figure n°37), nous remarquons qu'il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 2 heures et tout de suite après une phase de déclin qui dure 1,5 heures pour atteindre une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,457 et correspond à une concentration bactérienne de $1,371 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères de la chitine, la densité optique maximale est égale à

0,127, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,381 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Pseudomonas aeruginosa* de 3/4 (72 %).

En ce qui concerne les oligochitosanes, nous remarquons qu'il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 1 heure et tout de suite après une phase de déclin qui dure 1,5 heures pour atteindre une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,457 et correspond à une concentration bactérienne de $1,371 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères du chitosane, la densité optique maximale est égale à 0,075, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,225 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitosane dans le milieu de culture a diminué de 5/6 (84 %) la concentration finale de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les N-acétyl chitooligosaccharides et les chitooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*.

La C.M.I. du chitosane est de 0,05% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

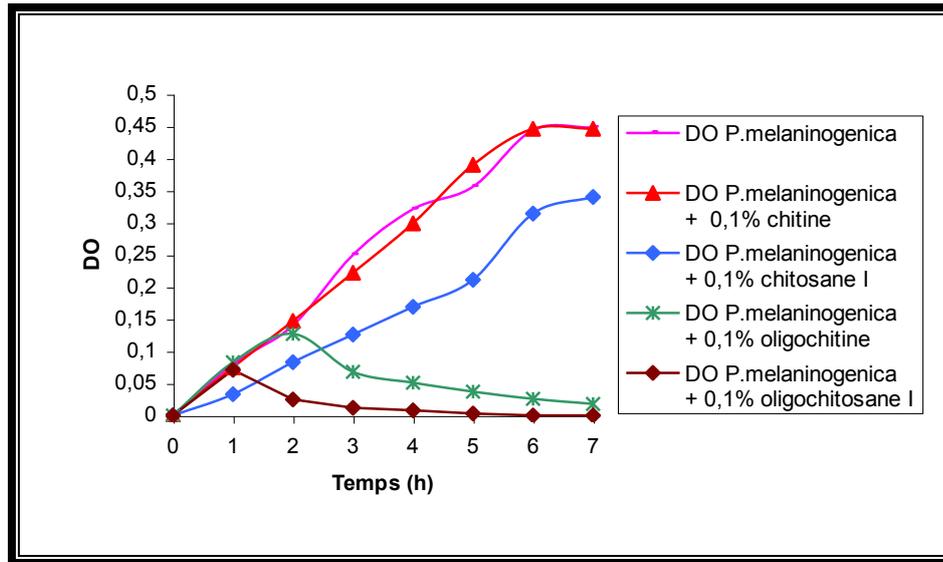


Figure n° 38 : Effet des différents produits sur la croissance de *Prevotella melaninogenica* I.P.A.

En ce qui concerne *Prevotella melaninogenica*, nous remarquons que les profils de la croissance de cette souche en présence ou en absence de 0,1% de chitine sont identiques (Figure n°38). La chitine à 0,1% ne semble avoir aucune action inhibitrice sur la croissance de *Prevotella melaninogenica*.

Par contre, nous remarquons que le chitosane à 0,1% possède un effet bactériostatique sur la croissance de *Prevotella melaninogenica*.

Pour le témoin ainsi que pour l'essai avec 0,1% de chitosane, la phase stationnaire est atteinte au bout de 6 heures mais la pente diminue en présence de 0,1% de chitosane.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,448 et correspond à une concentration bactérienne de $1,344 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour l'essai avec le chitosane, la densité optique maximale est de 0,34, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $1,02 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. Le fait de rajouter 0,1% (p/v) de chitosane dans le milieu de culture a diminué d'un quart (24 %) la concentration finale de *Prevotella melaninogenica*.

Pour ce qui est des oligochitines, nous remarquons qu'il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 2 heures et tout de suite après une phase de déclin qui dure plus de 5 heures .

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,448 et correspond à une concentration bactérienne de $1,344 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères de la chitine, la densité optique maximale est égale à 0,127, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,381 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Prevotella melaninogenica* de 3/4 (72 %).

En ce qui concerne les oligochitosanes, nous remarquons qu'il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 1 heure et tout de suite après une phase de déclin qui dure 4 heures pour atteindre une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,448 et correspond à une concentration bactérienne de $1,344 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères du chitosane, la densité optique maximale est égale à 0,071, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,213 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitosane au milieu de culture a diminué la concentration finale de *Prevotella melaninogenica* de 5/6 (84%).

Les N-acétyl chitooligosaccharides et les chitooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance de *Prevotella melaninogenica*.

La C.M.I. du chitosane et de la chitine sont de 0,01% alors que celles des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

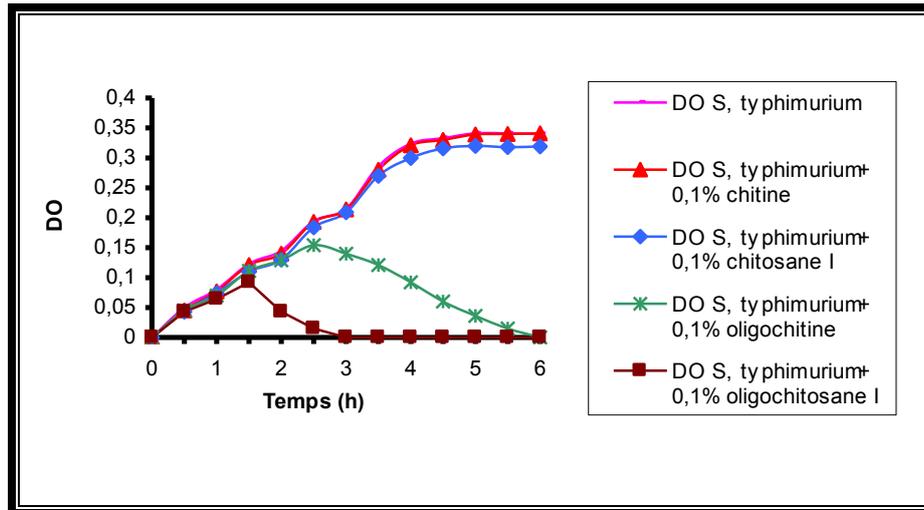


Figure n° 39 : Effet des différents produits sur la croissance de *Salmonella typhimurium* I.P.A.

Pour *Salmonella typhimurium*, nous remarquons que les profils de la croissance de cette souche en présence ou en absence de 0,1% de chitine ou de chitosane sont pratiquement identiques (Figure n°39). La chitine et le chitosane à 0,1% ne semblent avoir aucune action inhibitrice sur la croissance de *Salmonella typhimurium*. D'autres auteurs ont utilisé du chitosane de poids moléculaire plus élevé et ont obtenu des résultats similaires à ceux de cette étude. En effet, No et ses collaborateurs (2002) ont révélé que le chitosane (PM = 1106 et 224 kDa) ne possède aucune activité antibactérienne vis-à-vis de *Salmonella typhimurium* à la concentration de 0,1% (ni à 0,5%) (No, *et al.*, 2002).

En ce qui concerne les oligochitines (Figure n°39), nous remarquons qu'il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 2,5 heures et tout de suite après une phase de déclin qui dure 3,5 heures pour aboutir à une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,341 et correspond à une concentration bactérienne de $1,023 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères de la chitine, la densité optique maximale est égale à 0,154, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,462 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitine dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Salmonella typhimurium* de moitié (55 %).

En ce qui concerne les oligochitosanes, nous remarquons qu'il y a une phase exponentielle de croissance qui dure 1,5 heures et tout de suite après une phase de déclin qui dure 1,5 heures pour atteindre une densité optique nulle.

Pour le témoin la densité optique maximale obtenue est de 0,341 et correspond à une concentration bactérienne de $1,023 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture, tandis que pour les essais avec les oligomères du chitosane, la densité optique maximale est égale à 0,092, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $0,276 \times 10^8$ cellules/ml de milieu de culture. On en déduit que le fait de rajouter 0,1% (p/v) d'oligomères de chitosane dans le milieu de culture a diminué la concentration finale de *Salmonella typhimurium* de 3/4 (73%).

Les N-acétyl chitooligosaccharides et les chitooligosaccharides semblent avoir un effet bactéricide sur la croissance de *Salmonella typhimurium*.

Les C.M.I. des oligomères sont de 0,003% (Tableau n°8).

4. Discussion :

Toutes les souches bactériennes à Gram positif testées ont démontré leurs sensibilités vis-à-vis des quatre produits testés (Figures n°28 à 31 et tableau n°8). Ceci n'est pas valable pour toutes les souches à Gram négatif (figures n°32 à 39 et tableau n°8). Cette sensibilité est variable d'un genre à l'autre et n'est pas seulement due à la nature de la paroi bactérienne (Gram positif ou Gram négatif). En général, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'effet biocide du chitosane que les bactéries à Gram négatif (Sagoo, *et al.*, 2002). Ceci est peut être dû au fait que les bactéries à Gram négatif ont une structure de paroi plus compliquée (Xie, *et al.*, 2002).

Les bactéries à Gram positif possèdent une paroi formée d'une couche de peptidoglycanes en réseau avec une abondance de pores, ce qui permet la pénétration des molécules sans difficulté. Les bactéries à Gram négatif, quant à elles, possèdent une paroi formée d'une couche épaisse de peptidoglycanes et d'une enveloppe externe constituée de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et de phospholipides. Cette structure en double couche (paroi des bactéries à Gram négatif) fait de l'enveloppe externe une barrière potentielle vis-vis des molécules de haut poids moléculaire (Xie, *et al.*, 2002).

Allan et Hadwidger (1979) ont démontré des différences de sensibilités au chitosane au sein du même genre de champignons (**Allan et Hadwidger, 1979**).

Plusieurs mécanismes expliquant le mode d'action du chitosane sur les bactéries ont été proposés. Roller et Covill (1999) ont suggéré que le chitosane pouvait inhiber la croissance des bactéries en agissant comme un agent chélateur sur les métaux, les oligo-éléments ou les nutriments essentiels à la croissance de l'organisme (**Roller et Covill, 1999**). Jung et ses collaborateurs suggèrent que l'origine de l'activité antimicrobienne du chitosane est sa nature polycationique et peut donc se lier avec les sites anioniques des protéines (**Jung, et al., 1999**). Gerasimenko et ses collaborateurs (2004) ont, quant à eux, émis l'hypothèse que le chitosane est fortement fixé à l'enveloppe externe par des forces électrostatiques et que le mécanisme d'action du chitosane sur les microorganismes est probablement dû à la perturbation de l'intégrité de l'enveloppe externe. Le chitosane augmenterait la perméabilité de la membrane cellulaire jusqu'à la destruction complète de cette dernière (**Gerasimenko, et al., 2004**). Chung et ses collaborateurs (2004) ont prouvé l'existence d'une bonne corrélation (le coefficient de corrélation 0,988) entre la quantité de chitosane adsorbé et l'efficacité de son inhibition. Ils ont affirmé que le chitosane réagit avec la surface cellulaire, altère la perméabilité cellulaire et, en plus, empêche l'entrée du matériel ou cause la fuite du matériel. Ils ont pu démontrer aussi que la densité de charge négative sur la surface cellulaire détermine la capacité de la bactérie à être inhibée par le chitosane (**Chung, et al., 2004**). L'effet inhibiteur du chitosane vis-à-vis des bactéries à Gram négatif est dû à ses propriétés chimiques et structurales. Le chitosane, vu qu'il s'agit d'une macromolécule, est incapable de traverser l'enveloppe externe des bactéries à Gram négatif, ainsi l'accès direct du chitosane à l'intérieur de la cellule est improbable. Grâce à ses charges positives, le chitosane crée une structure polycationique qui peut interagir avec les composants poly-anioniques de la surface des bactéries à Gram négatif, tels que les protéines et les lipopolysaccharides. La liaison avec des molécules polycationiques perturbe l'intégrité de l'enveloppe externe induisant la perte de la fonction protectrice sans qu'il y ait d'activité bactéricide directe. Helander et ses collaborateurs (2001), qui ont travaillé sur l'effet du chitosane sur les bactéries à Gram négatif, ont prouvé qu'il n'y a pas de perte de lipopolysaccharides (L.P.S.) ou autres lipides membranaires des cellules en contact avec le chitosane. Par contre, le chitosane rend les cellules plus

sensibles à l'effet inhibiteur des colorants utilisés dans les milieux sélectifs. Le chitosane peut être un agent antimicrobien indirecte. Au microscope électronique, il y a apparition de grandes altérations de la surface des cellules mises en contact avec le chitosane. La structure de l'enveloppe externe semble être recouverte de vésicules. Le chitosane se lie à l'enveloppe externe des bactéries et diminue ainsi la fonction de barrière protectrice de la paroi. Le chitosane perturbe la perméabilité de la paroi cellulaire causant la perte des constituants cellulaires tels que les enzymes et le glucose. L'accumulation de ce matériel donne l'impression, au microscope électronique, que la paroi a épaissi. La perméabilité causée par le chitosane est réversible (**Helander, et al., 2001**). Les travaux de Chung et ses collaborateurs (2004) ont démontré que la distribution des charges négatives sur les surfaces cellulaires des bactéries à Gram négatif est relativement différente. Plus les surfaces cellulaires sont chargées négativement, plus il y a d'interaction avec le chitosane, ce phénomène a été confirmé par microscopie électronique à transmission (M.E.T.). L'activité antibactérienne du chitosane et les caractéristiques de la surface de la paroi cellulaire sont étroitement liées. Une plus grande quantité de chitosane adsorbé résulterait en de plus grands changements dans la structure de la paroi cellulaire et la perméabilité de la membrane cellulaire. Ces deux effets induisent la mort de la bactérie. Les expériences d'adsorption indiquent clairement la relation entre l'activité antibactérienne (efficacité d'inhibition) du chitosane et les caractéristiques de la surface de la paroi cellulaire de la bactérie. En outre, les diagrammes du M.E.T. pour l'adsorption du chitosane confirment bien le phénomène (**Chung, et al., 2004**). Liu et ses collaborateurs (2004) ont expressément dit que le mécanisme exact de l'activité antimicrobienne du chitosane et de ses dérivés reste méconnu. Néanmoins, plusieurs mécanismes ont été proposés. En général, on considère que les charges positives portées par le C-2 du glucosamine interagissent avec les charges négatives des parois cellulaires microbiennes et induisent la perte des constituants cellulaires. Les $-NH_3^+$ des chitosanes en solution interagissent vigoureusement avec les groupements phosphoriques des phospholipides des parois cellulaires, endommageant ainsi les parois (**Liu, et al., 2004**). Le mécanisme des activités antimicrobiennes du chitosane a été résumé, par Jung et ses collaborateurs (1999), comme suit :

1. Les groupements cationiques du chitosane se lient à l'acide sialique des phospholipides. Ceci va entraîner une restriction des mouvements des substances micro-biologiques.
2. Les oligomères du chitosane pénètrent dans la cellule et empêchent la croissance des microorganismes en prohibant la transcription de l'A.D.N. en A.R.N. (**Jung, et al., 1999**).

Le chitosane inhibe la croissance de beaucoup de champignons pathogènes pour l'homme et les plantes. Par contre, les champignons contenant le chitosane dans leurs parois cellulaires sont insensibles à l'action antifongique du chitosane (**Allan et Hadwiger, 1979**).

Chung et ses collaborateurs (2004) ont stipulé que puisque le chitosane porte plus facilement des charges positives de groupements (NH_3^+) dans des solutions plus acides, il en résulte une plus grande quantité adsorbée d'où une plus grande activité antimicrobienne (**Chung, et al., 2004**).

Le degré de désacétylation de notre chitosane est de 78%. Cette propriété influe grandement sur l'activité antimicrobienne puisqu'elle est supposée être due aux forces électrostatiques entre les groupements NH_3^+ du chitosane et les résidus négatifs des surfaces cellulaires. Il faut noter que le nombre de groupements NH_3^+ présents au niveau du chitosane augmente avec l'augmentation du degré de désacétylation (D.D.).

No et ses collaborateurs ont affirmé que l'activité antibactérienne du chitosane est affectée par le pH de la solution, avec un maximum d'activité aux pH les plus faibles (**No, et al., 2002**). Plus le pH augmente et plus le degré de protonation des groupements NH_2 diminue (**Xie, et al., 2002**). Gerasimenko et ses collaborateurs ont démontré que la diminution du pH à 5,3 ne facilite pas le contact entre le chitosane et les cellules bactériennes (**Gerasimenko, et al., 2004**). Liu et ses collaborateurs ont prouvé qu'à pH=4, l'activité antimicrobienne du chitosane est plus faible qu'à pH=6 et ont interprété ce résultat par le fait qu'à pH = 4, la quantité de groupement NH_3^+ ne varie pas contrairement à la quantité de H^+ dans le milieu qui augmente. Ces deux groupements se lient aux charges négatives des parois cellulaires mais il n'y a que les polymères qui

vont causer l'agglutination. Il va donc y avoir compétition et diminution du pouvoir antibactérien du chitosane (**Liu, et al., 2000**).

Nous remarquons que bien que la chitine exhibe un effet antibactérien, il reste toujours moins prononcé que celui du chitosane (Figures n°28 à 36 et tableau 8). De même pour les oligomères : l'effet inhibiteur des chitooligosaccharides est toujours supérieur ou égal à celui des N-acétyl chitooligosaccharides, vis-à-vis des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif. Jeon et ses collaborateurs (2001) sont arrivés aux mêmes conclusions en étudiant l'inhibition par le chitosane et la chitine (**Jeon, et al., 2001**). La différence d'activité antimicrobienne entre la chitine et le chitosane pourrait s'expliquer par le fait que le chitosane est doté d'un lot d'amines poly-cationiques qui interagissent avec les résidus chargés négativement des macromolécules à la surface cellulaire des bactéries et inhibent par conséquent la croissance des bactéries. La chitine possède ses mêmes charges mais en plus faible quantité (D.D.= 35%) ce qui explique la baisse de l'activité antibactérienne (Tableau n°7). L'hypothèse de Gerasimenko et ses collaborateurs (2004) conforte notre idée. Ils ont prouvé que l'effet antibactérien du chitosane augmente avec l'augmentation de son degré de désacétylation. Dans ce cas, il y a augmentation du nombre de charges positives, ainsi le chitosane se lie plus fortement à la paroi cellulaire des bactéries (**Gerasimenko, et al., 2004**).

Par contre, Tsai et ses collaborateurs (2002), ont testé l'effet antibactérien de chitines préparées par voies chimiques et enzymatiques. Les résultats étaient négatifs (**Tsai, et al., 2002**).

Les différentes méthodes utilisées pour la préparation de la chitine et du chitosane induisent des différences au niveau des degrés de désacétylation, de la distribution des groupements acétyles, de la longueur de la chaîne et de la conformation de la molécule. Ceci affecte les caractéristiques de la chitine et de ces dérivés et influence l'effet antibactérien de ces substances. Tsai et ses collaborateurs (2002) ont justement négligé l'étape de « quenching ». Cette dernière entraîne une transition conformationnelle faisant perdre à la chitine sa cristallinité, la rendant ainsi plus

détendue. Cette forme relâchée permet un accès beaucoup plus aisé aux groupements actifs et, par conséquent, augmente l'activité antimicrobienne.

La chitine extraite des carapaces de *Parapenaeus longirostris* possède une viscosité intrinsèque relativement élevée (15,687) ce qui démontre une structure détendue de notre chitine. La viscosité intrinsèque indique indirectement la taille et la conformation des chaînes polymériques. Plus la valeur de la viscosité intrinsèque est élevée et plus la conformation du polymère est détendue (**Liu, et al., 2004**).

Ainsi, il y a plusieurs paramètres expliquant la présence de l'effet inhibiteur au niveau de la chitine produite dans notre laboratoire qui sont :

- Le fait que notre chitine possède un degré de désacétylation de 35% rendant le tiers de la molécule chargée positivement.
- De plus le quenching (étape négligée par la plupart des auteurs), en rendant la chitine amorphe, a libéré les NH₃ présents au niveau de la chitine.
- La chitine extraite des carapaces de *Parapenaeus longirostris* possède une viscosité intrinsèque relativement élevée (15,7) ce qui démontre une structure détendue de notre chitine.
- Et enfin, la chitine utilisée dans notre essai diffère de celle utilisée par Tsai et ses collaborateurs (2002). Ces derniers ont travaillé avec une chitine extraite de la crevette rose *Solenocera melantho* (**Tsai, et al., 2002**).

Allan et Hadwidger (1979), qui ont travaillé sur les champignons, sont parvenus à la conclusion que le chitosane possède une plus grande activité antifongique que la chitine (**Allan et Hadwidger, 1979**). Certains auteurs ont rapporté que le chitosane possède une activité antifongique supérieure à celle de la chitine grâce aux groupements aminés, chargés positivement, du chitosane. Ces charges positives vont inhiber la croissance des champignons et des bactéries en formant des complexes poly-électrolytiques avec les charges négatives des groupements carboxyliques présentes au niveau des parois cellulaires (**Jeon, et al., 2000**). L'activité antifongique du chitosane est inversement proportionnelle à la taille des particules (**Allan et Hadwidger, 1979**).

L'activité antimicrobienne du chitosane dépend de son poids moléculaire et de son degré de désacétylation (**Gerasimenko, et al., 2004**).

Les concentrations minimales inhibitrices (tableau n°8), les activités antibactériennes de la chitine et de ses dérivés sont directement proportionnelles à la quantité de la substance en solution. Roller et Covill (1999) sont parvenus à la même conclusion en étudiant l'effet inhibiteur du chitosane (**Roller et Covill, 1999**).

L'activité antimicrobienne du chitosane est directement proportionnelle à la quantité de chitosane en solution (**Roller et Covill, 1999**). D'autre part, au-delà d'une certaine concentration (2 à 3%), il n'y a plus d'augmentation de l'activité antimicrobienne du chitosane (**Sagoo, et al., 2002**) (Figures n° 28 à 38).

Il existe une enzyme fongique capable de désacétyler la chitine, constituant de la paroi fongique, en chitosane. Cette enzyme agit sur les champignons vivants ou morts (**Allan et Hadwidger, 1979**). Tsai et ses collaborateurs (2002) ont prouvé qu'un chitosane désacétylé enzymatiquement ne possède aucun effet antimicrobien. Ceci est expliqué par le fait que la désacétylation chimique permet une décristallisation partielle du chitosane (**Tsai, et al., 2002**).

Notre idée de mélanger les différents oligomères a donné des résultats très satisfaisants. Cette idée fut confortée par le fait que certains auteurs ont démontré que les oligomères de chitosane de 1 kDa ont une plus grande activité sur les bactéries à Gram négatif alors que les oligomères de chitosane de 2 à 4 kDa ont une plus grande activité sur les bactéries à Gram positif (**No, et al., 2002**).

En général, les chitoooligosaccharides possèdent une activité antibactérienne plus accentuée envers les bactéries pathogènes associées à des maladies humaines par rapport aux bactéries non-pathogènes, à l'exception des bactéries lactiques (**Jeon, et al., 2001**).

Les chitoooligosaccharides de hauts poids moléculaires suppriment complètement la croissance microbienne à de très faibles concentrations. Cet effet inhibiteur diffère légèrement d'une bactérie à autre (**Jeon, et al., 2001**) (Figures n°28 à 39).

Le grand pouvoir inhibiteur des oligomères (Figures n°28 à 39) peut être expliqué par le fait que l'hydrolyse acide produit des substances qui peuvent être toxiques à cause des conversions chimiques susceptibles d'avoir lieu (**Jeon et Kim, 2000 (b)**).

Les concentrations minimales inhibitrices du chitosane sont toujours inférieures ou égales à 0,06% (tableau n°8) que ce soit pour les bactéries à Gram positif ou négatif. Les différences dans les résultats sont probablement dues aux méthodes expérimentales, aux caractéristiques du chitosane ou au pH du milieu utilisé. La concentration minimale inhibitrice du chitosane peut varier aussi avec le poids moléculaire de ce dernier ainsi qu'avec l'espèce de bactérie utilisée (**No, et al, 2002**).

Il est difficile à l'heure actuelle d'évaluer l'importance dans le monde du marché de la chitine et de ses dérivés. En effet, si les débouchés sont nombreux, les applications potentielles ne se trouvent qu'au stade de la recherche de la pré-industrialisation.

Le développement de cette nouvelle technologie est lié à la capacité de couvrir une proportion significative des coûts de production par la récupération et vente des autres composants des carapaces. C'est le cas des protéines qui possèdent d'excellentes qualités nutritives ainsi que d'un pigment, l'asthaxanthine, qui présente un intérêt croissant.

Notre étude a révélé que la composition de la carapace de *Parapenaeus longirotris* (Lucas, 1846) est composée de 23,7% de chitine, 40,6% de protéines, 20,2% de minéraux et les 15,5% restant représentent les corps gras, les pigments et autres.

L'optimisation de la déminéralisation de la carapace de *Parapenaeus longirotris* est atteinte en utilisant 15ml d'HCl à 1,5M par gramme de carapaces à la température ambiante sous agitation pendant une heure. Tandis que l'optimum de la déprotéinisation est atteint en utilisant 20ml de NaOH à 2M par gramme de carapaces à 45°C sous agitation pendant deux heures.

Notre étude a démontré, aussi, que la chitine et le chitosane semblent avoir un effet bactériostatique tandis que les oligochitines et les oligochitosanes semblent posséder un pouvoir bactéricide.

Nous avons utilisé un mélange des différents oligomères pour élargir notre spectre d'activité.

Notre travail a démontré l'efficacité de la chitine, du chitosane et leurs oligosaccharides sur des bactéries résistantes aux antibiotiques classiques. C'est le cas de *Prevotella melaninogenica* et *Bacteroides fragilis*.

La chitine est insoluble dans la plupart des solvants et l'eau. Le chitosane quant à lui est insoluble dans l'eau et très visqueux dans les solutions acides diluées. Ces problèmes de solubilité limitent leurs utilisations. Cependant, les oligomères de chitine et chitosane sont solubles dans l'eau et leurs solutions sont de faibles viscosités. Les

chitooligosaccharides et les N-acétyl chitooligosaccharides, contrairement à la chitine et le chitosane, peuvent être absorbés par l'intestin humain. Ils peuvent donc être utilisés comme agents de préservation des aliments en inhibant la croissance des microorganismes à l'intérieur même des aliments et une fois absorbés dans l'intestin, ils auront pour rôle de stimuler l'immunité. D'où l'intérêt de développer cet axe.

Il est nécessaire aussi d'élargir la gamme de microorganismes testés et de poursuivre des recherches sur le mécanisme exacte de fonctionnement de la chitine, du chitosane et leurs oligomères sur les cellules microbiennes. Il faudrait étudier, par la suite, l'éventuel mécanisme de résistance des souches à l'effet inhibiteur de ces substances. Ce travail sera complété, au sein de notre laboratoire, par l'étude de l'effet antimicrobien d'autres molécules dérivées de la chitine.

- Al-Bassam, R.; Al-Jumaily, W.; Rawi, A.A.; Suffi, F.A. (1986). Evaluation of methods of extraction and partial characterization of cell wall carbohydrates of brewer's yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae*. *Mircen Journal*, 2: 383-388.
- Allan, C.R. and Hadwidger, L.A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental mycology*, 3: 285-287.
- Annadurai, G.; Chellapandian, M.; Krishnan, M.R.V. (1999). Adsorption of reactive dye on chitin. *Environmental Monitoring and Assessment*, 59: 111-119.
- Anonymous. (2003). Overview of chitin/chitosan. *Agrofood industry hi-tech*, September/October: 30-31.
- Armanta, R.E.; Guerrero-Legarreta, I.; Huerta, S. (2002). Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentados. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 1: 49-55.
- Austin, P.R. (1977). Solvents for and purification of chitin. *United States Patent*, 4,062,921.
- Austin, P.R.; Brine, C.J.; Castle, J.E.; Zikakis, J.P. (1981). Chitin: New facets of research. *Science*, 212: 749-753.
- Bain, R. (1998). Microencapsulation of prawn feed using chitin. Undergraduate Thesis. Department of chemical engineering, University of Queensland.
- Benesch, J.; Tengvall, P. (2002). Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*, 23: 2561-2568.
- Blix, G. (1948). The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. *Acta Chemica Scandinavica 2* : 467-473.
- Brison, J. (1971). Techniques d'enzymologie bactérienne. Ed. Masson et Cie.
- Campana, S.P.; Signini, R. (2001). Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Polimeros: Ciência Tecnologia*, 11 (4) : 169-173.
- Chang, K.L.; Tsai, G. (1997). Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1900-1904.
- Chang, K.L.B.; Lee, J.; Fu, W.-R. (2000). HPLC Analysis of N-acetyl-chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *Journal of Food and Drug Analysis*, 8(2) : 75-83.
- Chapeville, F. et Clauser, H. (1974). Les glucides, structure et métabolisme. Biochimie. p299-461. Ed. Herman.

- Chen, H.-M.; Meyers, S.P. (1982). Extraction of asthaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *Journal of Food Science*, 47:892-896.
- Chen, M.-H.; Chan, H.-Y.; Wu, C.L.; Chen Y.-L.; Yuan, G.-F. (2002) (a). Production of chitosan and chitin. *United States Patent*, 6,399,338.
- Chen, M.-H.; Chan, H.-Y.; Wu, C.L.; Chuang, S.-H.; Hwang, I.-E.; Chen Y.-L.; Yuan, G.-F. (2002) (b). Production of chitosan and chitin. *United States Patent*, 6,485,946.
- Chen, M.-H.; Chan, H.-Y.; Wu, C.L.; Chuang, S.-H.; Hwang, I.-E.; Chen Y.-L.; Yuan, G.-F. (2001) (c). Production of chitosan and chitin. *United States Patent*, 6,255,085.
- Chenite, A.; Buschmann, M.; Wang, D.; Chaput, C.; Kandani, N. (2001). Rheological characterization of thermogelling chitosan/ glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46: 39-47.
- Chung, Y.-C.; Su, Y.-P. ; Chen, C.-C.; Jia, G.; Wang, H.-L. ; Wu, J.C.G. ; Lin, J.-G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25 (7): 932-936.
- Cohen-Kupiec, R.; Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 270-277.
- Collombel, C.; Damour, O.; Gagnieu, C.; Poinsignon, F. ; Echinard, C. ; Marichy, J. (1992). Biomaterials with a base of mixtures of collagen, chitosan and glycosaminoglycans, process for preparing them and their application in human medicine. *United States Patent*, 5,166,187.
- Cosio, I.G.; Fischer, R.A.; Carroad, P.A. (1982). Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pre-treatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *Journal of Food Science*, 47:901-905.
- Da Silva Amorim, R.V.; De Souza, W.; Fukushima, K.; De Campos-Takaki, G.M. (2001). Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 20-23.
- Daly, W.H.; Manuszac-Guerrini, M.A. (2001). Biocidal chitosan derivatives. *United States Patents*, 6,306,835.
- Deacon, M.P.; Davis, S.S.; White, R.J.; Nordman, H.; Carlstedt, I.; Errington, N.; Rowe, A.J.; Harding, S.E. (1999). Are chitosan-mucin interactions specific

- to different regions of the stomach? Velocity ultracentrifugation offers a clue. *Carbohydrate Polymers*, 38: 235-238.
- Divakaran, R.; Pillai, V.N.S. (2002). Flocculation of river silt using chitosan. *Water Research*, 36: 2414-2418.
 - Drohan, W.N.; MacPhee, M.J.; Miekka, S.I.; Singh, M.S.; Elson, C.; Taylor, J.R. (2000). Chitin hydrogels, methods of their production and use. *United States Patent*, 6,124,273.
 - Falini, G.; Weiner, S.; Addadi, L. (2003). Chitin-silk fibroin interactions: relevance to calcium carbonate formation in invertebrates. *Calcified Tissue International*.
 - FAOSTAT, FAO Statistical Databases, Food and Agricultural Organisation of the United Nations. (2001. <http://apps.fao.org>)
 - Farber, J.N.; Harris, L.J.; Parish, M.E.; Beuchat, L.R.; Suslow, T.V.; Gorney, J.R.; Garret, E.H.; Busta, F.F. (2003). Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 : 142-160.
 - Felse, P.A.; Panda, T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*, 20: 505-512.
 - Felt, O., 1999. Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. *Thèse de doctorat*. Université de Genève.
 - Fernandez, M.; Fox, P.F. (1997). Fractionation of cheese nitrogen using chitosan. *Food Chemistry*, 58 (4): 319-322.
 - Fernandez-Kim, S.-O. (2004). Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. *A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Department of Food Science*. Seoul National University.
 - Gerasimenko, D.V.; Avdienko, I.D.; Bannikova, G.E.; Zueva, O.Y.; Varlamov, V.P. (2004). Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(3): 253-257.

- Gogev, S.; Versali, M.-F.; Thiry, E. (2003). Les chitosanes - nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. *Annales Médicales Vétérinaires*, 147 : 343-350.
- Grisham, G. (2000). Biochimie. *Les glucides*. 2^e Ed. p232-233.
- Gutowska, M. (2002). Chitinase activity of fishies with varying depth distributions. *The Evergreen State College*.
- Haki, G.D.; Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89: 17-34.
- Hallmann, J.; Rodriguez-Kabana, R.; Kloepper, J.W. (1998). Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 551.
- Hamdrakas, S.J.; Willis, J.H.; Iconomidou, V.A. (2002). A structural model of the chitin binding domain cuticle proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1577-1583.
- Hardinge-Lyme, N. (2001). Chitosan-containing liquid compositions and methods for their preparation and use. *United States Patents*, 6,323,189.
- Helander, I.M.; Nurmiho-Lassila, E.-L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Rolller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 235-244.
- Hennen, W.J. (1996). Chitosan. *Woodland Publishing Inc*: 1-31.
- Illum, L.; Chatfield, S.N. (2002). Vaccine compositions including chitosan for intranasal administration and use thereof. *United States Patents*, 6,391,318.
- Imai, T.; Watanabe, T.; Yui, T.; Sugiyama, J. (2003). The directionality of chitin biosynthesis : a revisit. *Biochemical Journal*, 374: 755-760.
- Jaafari, K.; Elmaleh, S.; Coma, J.; Benkhoudja, K. (2001). Equilibrium and kinetics of nitrate removal by protonated cross-linked chitosan. *Water SA*, 27 (1): 9-13.
- Jeon, Y.-J.; Kim, S.-K. (2000) (a). Continuous production of chitoooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochemistry*, 35: 623-632.

- Jeon, Y.-J. ; Kim, S.-K. (2000) (b). Production of chitoooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 41: 133-141.
- Jeon, Y.-J. ; Shahidi, F. ; Kim S.-K. (2000). Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Rev. Int.*, 16(2): 159-176.
- Jeon, Y.-J.; Park, P.-J.; Kim, S.-K. (2001). Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44:71–76.
- Jessop, N.M. (1973). Biosphère. *Ecologie mécanisme de l'adaptation*. Tome1. Ed. Recherche et Marketing. Troisième trimestre : 71-125.
- Jia, Z. ; Shen, D. (2002). Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydrate Polymers*, 49: 393-396.
- Jorillier, M.; Polonovski, M. (1962). *Traité de biochimie générale*. Tome II, premier fascicule. Ed. Masson : 327.
- Josupeit, H. (2004). An Overview on the World Shrimp Market. GLOBEFISH. *World Shrimp Markets*, 26-27 October, Madrid, Spain.
- Juang, R.-S.; Wu, F.-C.; Tseng, R.-L. (2002). Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilisation. *Advanced in Environmental Research*, 6: 171-177.
- Jung, B.-O.; Kim, C.-H.; Choi, K.-S.; Lee, Y.M.; Kim, J.-J. (1999). Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *Journal of Applied Polymer Science*, 72: 1713-1719.
- Kerkut, J.A.; Gilbert, L.I (1985). *Comprehensive insect physiology. Biochemistry and pharmacology*, volume 3. Ed Pergamon Press.
- Kessous. C. (2002). Chapitre II: Glucides. *Biochimie structurale*. 2^e Ed. Office des Publications Universitaires: 56-120.
- Khan T.A. ; Peh, K.K. ; Chang, H.S. (2002). Reporting degree of deacetylation of chitosan : the influence of analytical methods. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 5(3) : 205-212.

- Kim, S.O. ; Cho, S.M. ; Lee, Y.M. ; Kim, S.J. (2000). Thermo- and pH-responsive behaviour of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide. *Journal of Applied Polymer Science*, 78: 1381-1391.
- Kolodziejska, H.; Wojtasz-Pajak, A.; Ogonowska, G.; Sikorski, Z.E. (2000). Deacetylation of chitin in a two-stage chemical and enzymatic process. *Bulletin of the Sea Fisheries Institute*, 2(150): 15-24.
- Konno, A.L.; Gauthier, J.H.; Matahira, Y. (2002). Chitin oligosaccharides and/or chitosan oligosaccharides for preventing or treating common cold or treating pain. *United States Patent*, 6,492,350.
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer science*, 26: 1921-1971.
- Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A.N. ; Berrada, M. ; Rodrigues, A. ; Wang, D. ; Buschmann, M.D. ; Gupta, A. (2003). A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32: 1149-11458.
- Liu, H.; Du, Y.; Wang, X. ; Hu, Y. ; Kennedy, J.F. (2004). Interaction between chitosan and alkyl β-D-glucopyranoside and its effect on their antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 56: 243-250.
- Liu, X.F. ; Guan, Y.L. ; Yang, D.Z. ; Li, Z. ; Yao, K.D. (2000). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science*, 79: 1324-1335.
- Loiseleur, J. (1963). Techniques de laboratoire. Tome 1, fascicule 21: 1355-1356. Ed. Masson.
- Louisot, P. (1983). Biochimie métabolique, volume 4. Ed. Simep sa : 807.
- Majeti, N.V.; Kumar, R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46: 1–27.
- Mansencal, R. (1999). Chitin. *Polymer Data Handbook*, 67-69. Ed. Oxford University Press.
- Merzendorfer, H.; Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 4393-4412.
- Mirzadeh, H. ; Yaghobi, N. ; Amanpour, S. ; Ahmadi, H. ; Mohagheghi, M.A. ; Hormozi, F. (2002). Preparation of chitosan derived from shrimp's shell of

- Persian Gulf as a blood hemostasis agent. *Iranian Polymer Journal*, 11 (1) : 63-68.
- Mukherjee, D.P., (2001). Method for producing chitin or chitosan. *United States Patents*, 6,310,188.
 - Muraki, E.; Yaku, F.; Kojima, H. (1993). Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. *Carbohydrate Research*, 2396: 227-237.
 - Muzzarelli, C.; Francescangeli, O.; Tosi, G.; Muzzarelli, R.A.A. (2004). Susceptibility of dibutyryl chitin and regenerated chitin fibres to deacylation and depolymerization by lipases. *Carbohydrate Polymers*, 56: 137-146.
 - Muzzarelli, R.A.A. (1998). Colorimetric determination of chitosan. *Analytical Biochemistry*, 260: 255-257.
 - Muzzarelli, R.A.A.; Terbojevich, M.; Muzzarelli, C.; Francescangeli, O. (2002). Chitosans depolymerised with the aid of papain and stabilized as glycosylamines. *Carbohydrate Polymers*, 50: 69-78.
 - Nakakuki, T. (2002). Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure Appl. Chem.*, 74(7): 1245-1251.
 - Niola, F.; Basora, N.; Chornet, E. ; Vidal, P.F. (1993). A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. *Carbohydrate Research*, 238: 1-9.
 - No, H.K. ; Meyers, S.P. and Lee, H.S. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 37 (3): 575-579.
 - No, H.K.; Park, N.Y.; Lee, S.H.; Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 65– 72.
 - Nouar, A.; Maurin, C. (2001). Nature of and typical populations on the characteristic facies of substratum of *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) along the algerian coast. *Crustaceana*, 74 (2): 129-135.
 - Oester, D.A.; Wachter, R.; Gates, J. (2002). Chitosan formulation with azelaic acid and other actives for treatment of acne. *United States Patent*, 6,451,773.

- Okamoto, Y.; Kawakami, K.; Miyatake, K.; Morimoto, M.; Shigemasa, Y.; Minami, S. (2002). Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 49: 249-252.
- Park, O.; Miyoshi, H.; Watanabe, J.; Chiba, T. ; Endo, I. (1993). Method for preparing chitosan. *United States Patents*, 5,232,842.
- Payet, L.; Ponton, A.; Agnely, F. ; Colinart, P. ; Grosiord, J.L. (2002). Caractérisation rhéologique de la gélification d'alginate et de chitosane : effet de la température. *Rhéologie*, 2 : 46-51.
- Percheron, F. ; Perlès, R. et Foglietti, M.-J. (1981). Glucides, structure et propriétés. Abrégé de biochimie générale. Tome2. Ed Masson : 32-131.
- Planas, R.M. (2002). Development of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals. *Thesis*. Universitat Polytechnica de Catalunya.
- Prochazkova, S.; Varum, K.M.; Ostgaard, K. (1999). Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. *Carbohydrate Polymers*, 38: 115-122.
- Qaqich, R.B.; Amiji, M.M. (1999). Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interaction. *Carbohydrate Polymers*, 38 : 99-107.
- Rao, M.S.; Munoz, J. and Stevens, W.F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology Biotechnology*, 54: 808-813
- Rolland, A.; Mumper, R.J. (2001). Chitosan related composition and methods for delivery of nucleic acids and oligonucleotides into a cell. *United States Patent*, 6,184,037.
- Roller, S.; Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47: 67-77.
- Roy, I.; Mondal, K.; Munishar, N.G. (2003). Accelerating enzymatic hydrolysis of chitin by microwave pre-treatment. *Biotechnology Progress*, 19: 1648-1653.
- Ruel-Gariepy, E ; Leclair, G ; Hildgen, P. ; Gupta, A. ; Leroux, J.-C. (2002). Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. *Journal of Controlled Release*, 82 : 373–383.
- Sabnis, S.; Block, L.H. (2000). Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems: I. Molecular modifications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27: 181-186.

- Sagoo, S.; Board, R.; Roller, S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiology*, 19: 175-182.
- Saguez, J. (2002). Les chitinases et leur implication dans la pénétration de la membrane péritrophique des moustiques par les oocinètes de *Plasmodium*. *Mémoire de Maîtrise en Biologie*. Université de Picardie Jules Verne.
- Säkkinen, M. (2003). Biopharmaceutical Evaluation of Microcrystalline Chitosan as Release-Rate-Controlling Hydrophilic Polymer in Granules for Gastro-Retentive Drug Delivery. *Thèse de doctorat*. Université de Helsinki, Finlande.
- Sashiwa, H.; Shigemasa, Y. (1999). Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins. *Carbohydrate Polymers*, 39: 127-138.
- Seng, J.-M. (1988). Chitine, chitosane et dérivés : de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, Septembre : 40-44.
- Sergio, P.; Campana, F.; Signini, R. (2001). Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Plimeros: Ciência Tecnologia*, 11(4) : 169-173.
- Shahidi, F. ; Arachchi, J.K.V.; Jeon, Y.-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trens in Food Science & Technology*, 10: 379-51.
- Sheperd, R.; Reader, S.; Falshaw, A. (1997). Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, 14: 535-542.
- Shiau, S.-Y.; Yu, Y.-P. (1998). Chitin but not chitosan supplementation enhances growth of grass shrimp, *Penaeus monodon*. *American Society for Nutritional Sciences*.
- Shigememasa, Y.; Usui, H.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Okamoto, Y.; Minami, S.; Sashiwa, H. (1999). Chemical modification of chitin and chitosan 1: preparation of partially deacetyled chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydres in lithium chloride / N,N-dimethylacetamide. *Carbohydrate Polymers*, 39: 237-243.
- Synowiecki, J.; Ali Abdul Quawi Al-Khateb, N. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68: 147-152.

- Taboada, E.; Cabrera, G.; Cárdenas, G. (2003). Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *Journal of the Chilean Chemical Society*, vol.48, n°.1.
- Takeshi, Y.; Yuki, I.; Naoto, S. (2000). Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 12(64): 113-120.
- Tan, E.W.Y.; Lee, V.R. (2002). Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin. *Final year research & development project* Department of chemical engineering Loughborough University.
- Tokuyasu, K.; Ono, H.; Mitsutomi, M.; Hayashi, K.; Mori, Y. (2000). Synthesis of a chitosan tetramer derivative, β -D-GlcNAc-(1→4)- β -D-GlcNAc-(1→4)- β -D-GlcNAc-(1→4)-D-Glc N through a partial N-acetylation reaction by chitin deacetylase. *Carbohydrate Research*, 325: 211-215.
- 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. *Fisheries Science*, 68: 170-177.
- Tsukada, M.; Shirata, A.; Hayasaka, S.J. (2000). Chitin beads, process for preparing these beads, carrier comprising said beads, and process for preparing microsporidian spore. *United States Patent*, 6,156,330.
- Tsukada, S.; Inoue, Y. (1981). Conformational properties of chito-oligosaccharides : titration, optical rotation, and carbon-13 N.M.R. studies of chito-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 88: 19-38.
- Tyrra, S., 1999. Crustacea. Projet de fin d'études. Univesité Humboldt, Berlin.
- Varum, K.M.; Egelanddal, B.; Ellekjaer, M.R. (1995). Characterization of partially N-acetyled chitosans by near infra-red spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 28: 187-193.
- Varum, K.M.; Ottoy, M.H.; Smidsrod, O. (2001). Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 46: 89-98.
- Warren, R.A.J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50: 183-212.
- Xie, W.; Xu, P.; Wang, W. ; Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11: 1699-1701.

- Xie, W.; Xu, P.; Wang, W. ; Liu, Q. (2002). Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohydrate Polymers*, 50: 35-40.
- Yaku, F.; Tanaka, R.; Muraki, E.; Fujishima, S. ; Miya, M. (1990). Process for preparing chitosan oligosaccharides. *United States Patents*, 4,970, 150.
- Yang, J.-K. ; Shih, I.-L. ; Tzeng, Y.-M.; Wang, S.-L. (2000). Production and purification of proteases from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 406-413.
- Zhang, H. ; Neau, S.H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22 : 1653-1658.

1. Milieux utilisés:

✿ Eau peptonnée:

Peptone trypsique.....4,5 g
NaCl.....1,5 g
Eau distillée.....300ml

Verser délicatement la peptone et le sel dans l'eau à 80°C

Agiter jusqu'à dissolution complète

Compléter avec l'eau distillée la solution à 300ml

Ajuster le pH à 7,6

Filtrer sur papier dur

✿ Bouillon T.G.Y. :

Trypticase.....30 g/l
Extrait de levure.....20 g/l
Glucose.....5 g/l
Chlorhydrate de cystéine...1 g/l

pH final =7,0 -7,4

Répartition dans des tubes à essai à raison de 10ml par litre

✿ La gélose Muller-Hinton:

Infusion de bœuf (déshydratée).....300 g
Hydrolysate acide caséine.....17,5 g
Amidon de Maïs.....1,5 g
Agar.....10 g
Eau distillée.....1 l

Le pH est ajusté à 7,4

2. Les courbes d'étalonnage :

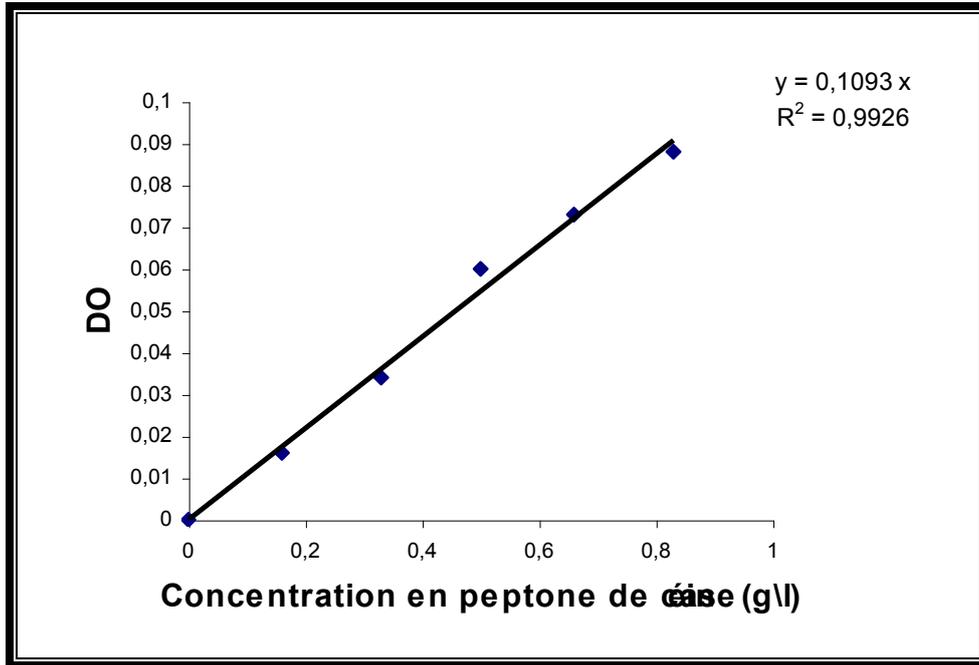


Figure n° 40: Courbe d'étalonnage de la coloration de Biuret effectuée avec de la peptone de caséine

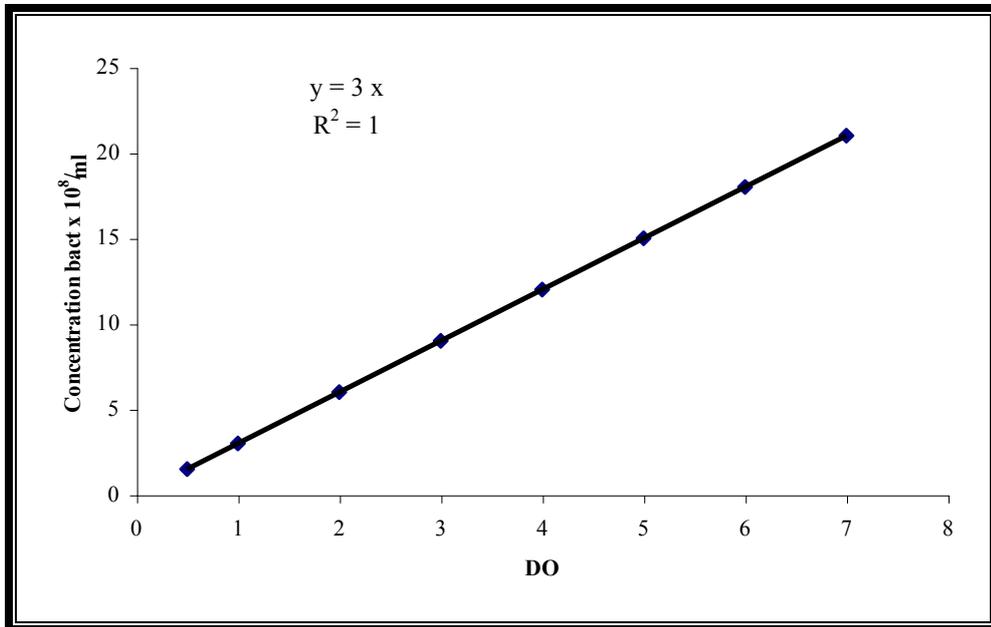


Figure n° 41 : Concentration des bactéries selon Mc Farland

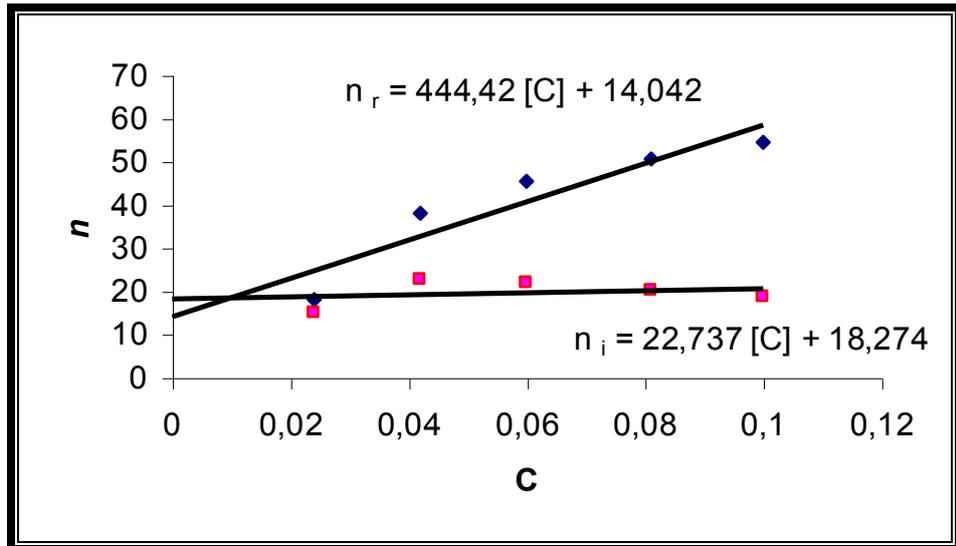


Figure n°42 : Variation de la viscosité de la chitine en fonction de la concentration

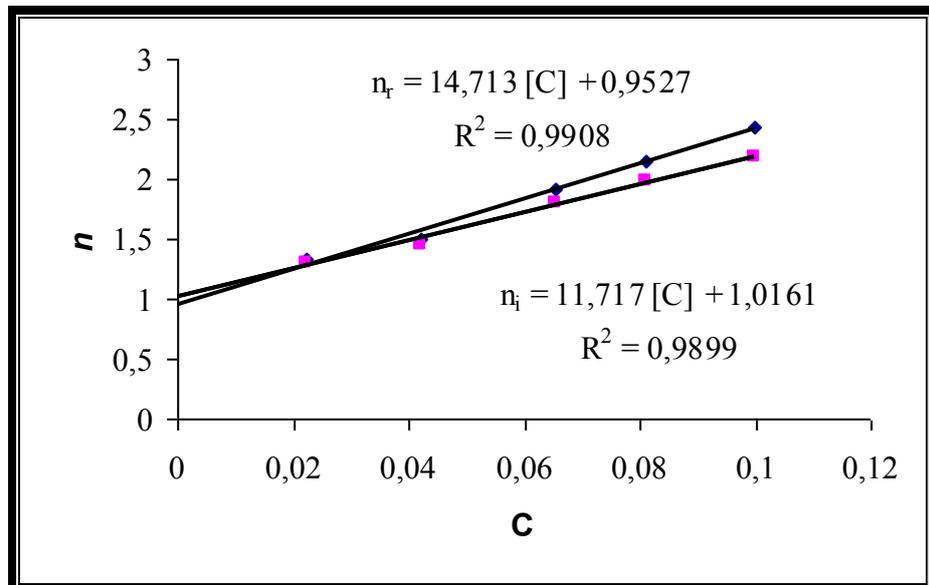


Figure n°43 : Variation de la viscosité du chitosane I en fonction de la concentration

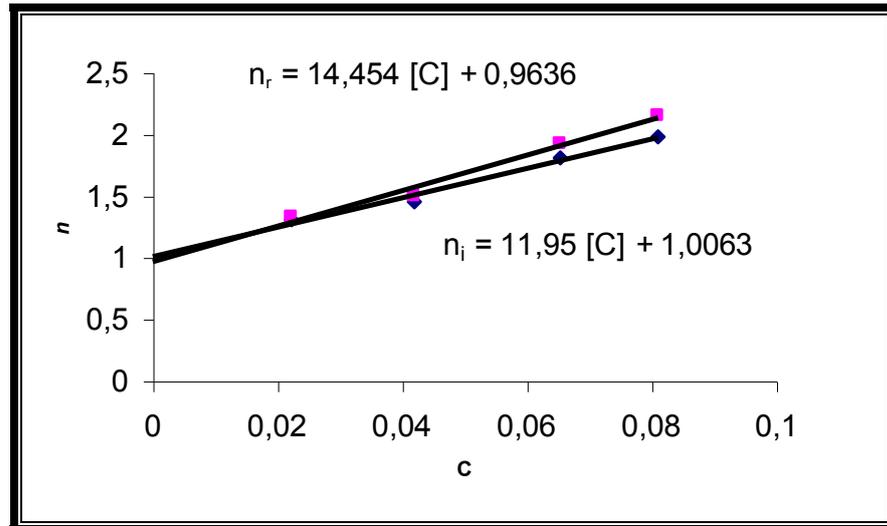


Figure n°44 : Variation de la viscosité du chitosane II en fonction de la concentration



Figure n°45 : *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)