

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME D'INGENIEUR  
ET DE MASTER EN SCIENCES DE LA MER

OPTION : Biotechnologie Marine

Thème :

*Valorisation biotechnologique des coproduits de crevettes: Etude  
du pouvoir antimicrobien et anti-inflammatoire du chitosane*

Présenté par : KEFIL Sarah.

Soutenu le 07/10/2020 devant la commission du jury suivant :

Mr. REFES W.	Maître de conférences A	(ENSSMAL)	Président
Mme. KHELIFA N.	Maître de conférences B	(ENSSMAL)	Examinatrice
Mr. AYAD N.	Docteur en pharmacie	(IPA)	Examineur
Mme. ALAMIR H.	Maître de recherche	(IPA)	Promotrice
Mme. AMROUCHE L.	Maître assistante A	(ENSSMAL)	Co-promotrice
Mme. BENABOU A.	Chargée d'études (doctorante)	(IPA)	Invitée

Promotion : 2019/2020.

## **REMERCIEMENTS**

*Je tiens à remercier chaleureusement : Mme AMROUCHE L ; Mme BENABOU A et Mme ALAMIR H. Pour leur temps accordés, conseils et orientations. Il m'est agréable de leur exprimer mes plus profonds respects et ma haute considération.*

*Je présente mes sincères remerciements à :*

*Mr REFFES W (MCA) à l'ENSSMAL pour l'honneur qui m'a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire ; ainsi pour son aide au laboratoire pour d'identification des espèces de l'ENSSMAL.*

*Mme KHELIFA N (MCB) et Mr AYAD N (Docteur en pharmacie) de l'attention qu'ils portent à ce travail en acceptant de le juger.*

*Mme GRANGAUD M-F membre du CCU pour son temps consacré, son encouragement et ses conseils précieux.*

*Mr CHADER H, Professeur à LNCP pour m'avoir facilité l'accès à son laboratoire afin de réaliser le test anti-inflammatoire.*

*Mme GUERROUMI H, Mr DJERRAI N, Mr MATOUK Y, Mme CHIOUKH S Ingénieurs de laboratoire biochimique et microbiologique de l'ENSSMAL, pour leurs disponibilités et leurs aides. Et toute l'équipe et le personnel de l'ENSSMAL.*

*Mr BENFARES, chef de département de transformation des produits de la pêche et d'aquaculture au CNRDPA et à toute son équipe.*

*Mme BENZITOUNI A, Ingénieur à l'IPA qui nous a aidé à la réalisation de l'analyse des protéines.*

*L'équipe RMN en particulier Mme AYA du laboratoire RMN au CRAPC.*

*L'équipe de la FRX du CRND en particulier Mr CHAHDANE R.*

*Les poissonniers de la pêcherie d'Alger, le gérant de Pescadilla à Birtouta et le restaurant spécialiste en poisson à Dely Ibrahim. Merci à vous tous.*

## *DEDICACES*

*A ma lumière du jour et mes étoiles de la nuit. A ma source de bonheur et de joie. A ce qui m'ont mis au monde et ne m'ont privé de rien .A mes très chers parents, RACHID et DRIFA qui m'ont tant aimé, tant encouragé et tant soutenu à chaque seconde. Votre présence à mes côtés a été toujours ma source de force. Aucune dédicace, ni aucun mot ne sauraient exprimer mon respect, mon amour éternel, et ma considération pour les sacrifices que vous avez accordé pour mon instruction et mon bien-être. Que dieu vous garde pour moi et vous apporte tout le bonheur et la santé et la bénédiction. Que le fruit de ce travail soit l'exaucement de vos vœux et vos prières formidables. J'espère que je serai toujours à la hauteur de vos attentes. Merci à vous.*

*A ma source d'amour, de bonheur et de confiance la plus belle chose que j'ai eu au monde. Tu étais et tu seras toujours mon ange gardien et mon amie fidèle. Les mots ne suffisent guère pour exprimer mon amour et mon affection que je porte pour toi. A toi ma chère sœur YASMINE, tous mes vœux de bonheur de santé et de succès dans ta vie.*

*A mon petit frère SAADEDDINE, je t'aime plus que tout au monde.*

*A la mémoire de mon cher grand-père SAID que dieu t'accueil dans son vaste paradis. A mes chers grands-parents paternels AMER et FATIMA ; et ma grand-mère maternelle AICHOUCHE, votre amour, votre encouragement et vos conseils sont les plus beaux souvenirs de ma vie que dieu vous garde et vous bénisse.*

*A toute ma famille « KEFIL », en particulier :*

*Mes oncles et tante paternels : NOUREDDINE, ABDENNOUR, IDIR, KACI, DJAMEL, FARIDA et leurs petites familles.*

&

*Mes oncles et tantes maternels : AHMED, HAMID, MALEK, TASSAADIT, MASOUDA et leurs petites familles.*

*A mon cousin Riad et mes cousines Hanene, Ikram, mouna et ania je vous souhaite que du bonheur, de la santé et de la réussite du fond du cœur.*

*A mes copines de cœurs: Nawel, sara<sup>2</sup>, najwa, houda, ines<sup>2</sup>, souhila, soraya, hadjer les plus belles rencontres que j'ai pu faire. Je vous aime.*

*A mes camarades de l'ENSSMAL : ANNNOUAR, BADREDDINE, MUSTAPHA. Merci pour votre aide et encouragement.*

**Table des matières****Liste des tableaux****Liste des figures****Liste des abréviations****Introduction** ..... 2**Chapitre I: Généralités.**

I.1. Généralités sur les crustacés, focus sur les crevettes utilisées .....	5
I.1.1. Description générale et biologie .....	5
I.1.2. Taxonomie et position systématique .....	6
I.1.3. Distribution géographique .....	6
I.1.4. Production mondiale des crustacés "crevettes" .....	7
I.1.4.1 Abondance des crustacés en Méditerranée "en Algérie" . .....	8
I.1.5 Valorisation des coproduits de crustacés et enjeux économiques.....	8
I.1.5.1 Production de la chitine et du chitosane. ....	8
I.2. Chitosane.....	9
I.2.1. Aperçu historique.....	9
I.2.2. Principales sources du chitosane.....	9
I.2.3. Structure de la chitine et du chitosane .....	10
I.2.4. Production du chitosane .....	12
I.2.5. Propriétés de la chitine et du chitosane .....	12
I.2.5.1. Propriétés physico-chimiques .....	12
I.2.5.2. Propriétés biologiques.....	14
I.2.6. Activités du chitosane et domaines d'applications .....	14
I.3. Micro-organismes pathogènes et activité antimicrobienne.....	17
I.3.1. Micro-organismes pathogènes .....	17
I.3.1.1. Description générale du genre <i>Legionella</i> .....	17
I.3.1.2. Description générale de l'espèce <i>Escherichia coli</i> .....	18
I.3.1.3. Description générale de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
I.3.1.4. Description générale de l'espèce <i>Candida albicans</i> .....	19
I.3.2. Activité antimicrobienne et mode d'action.....	19
I.4. Activité anti-inflammatoire.....	20

**Chapitre II: Matériel et méthodes.**

II.1. Matériel.....	23
II.1.1. Matériel biologique.....	23
II.1.2. Matériel non biologique.....	23
II.2. Echantillonnage et prétraitement .....	24
II.2.1. Collecte de la matière première .....	24
II.2.2. Prétraitement et traitement des carapaces de crustacés .....	24
II.2.2.1. Granulométrie de la poudre des coproduits de crevettes préparés.....	25
II.3. Caractérisation biochimique des coproduits de crustacés .....	25
II.3.1. Teneur en eau.....	25
II.3.2. Teneur en protéines totales .....	26
II.3.3. Teneur en matières minérales .....	27
II.3.3.1. Détermination de la teneur totale des carapaces de crevette en matières minérales .....	27
II.3.3.2. Détermination de la composition et la concentration des matières minérales contenues dans les carapaces de crevettes.....	27
II.3.4. Teneur en lipides totaux .....	28
II.3.5. Teneur en sucres totaux .....	29
II.4. Extraction de la chitine .....	30
II.4.1. Extraction de la chitine par voie chimique .....	30
II.4.1.1. Déminéralisation.....	30
II.4.1.2. Déprotéinisation.....	30
II.4.1.3. Décoloration .....	31
II.4.2. Extraction de la chitine par hydrolyse enzymatique.....	31
II.4.2.1. Déprotéinisation.....	31
II.5. Extraction du chitosane par désacétylation .....	31
II.5.1. Rendement en masse de la chitine et du chitosane .....	32
II.6. Caractérisation du chitosane .....	32
II.6.1. Solubilisation du chitosane .....	32
II.6.2. Caractérisation biochimique du chitosane .....	32
II.6.3. Détermination du degré de désacétylation du chitosane .....	32
II.6.4. Mesure du degré de désacétylation par résonance magnétique nucléaire RMN .....	33
II.7. Détermination des propriétés pharmacologiques du chitosane .....	36

II.7.1. Détermination de l'activité antimicrobienne du chitosane .....	36
II.7.1.1. Revivification des souches .....	36
II.7.1.2. Essai de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disques .....	36
II.7.2. Activité anti-inflammatoire .....	39
<b>Chapitre III: Résultats et discussion.</b>	
III.1. Identification des espèces .....	42
III.2. Granulométrie de la poudre des coproduits de crevettes préparés .....	43
III.3. Composition biochimique des coproduits de crevettes .....	44
III.3.1. Teneur en eau .....	45
III.3.2. Teneur en protéines totales.....	45
III.3.3. Teneur en matières minérales.....	46
III.3.3.1. Composition et concentration des minéraux contenus dans les coproduits des crevettes étudiées.....	46
III.3.4. Teneur en lipides totaux .....	47
III.3.5. Teneur en sucres totaux .....	47
III.4. Chitine et chitosane extraits par méthodes chimique et enzymatique.....	48
III.4.1. Aspect de la chitine et du chitosane obtenus par voies chimique et enzymatique ...	48
III.4.2. Rendements massiques de la chitine et du chitosane .....	48
III.5. Caractérisation du chitosane.....	50
III.5.1. Solubilisation du chitosane.....	50
III.5.2. Caractérisation biochimique du chitosane.....	50
III.5.3. Degré de déacétylation du chitosane : mise en évidence par RMN et dosage potentiométrique.....	51
III.6. Activité antimicrobienne du chitosane .....	53
III.7. Activité anti-inflammatoire du chitosane .....	55
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>59</b>

### **Références bibliographiques.**

### **Annexes.**

**Chapitre I : Généralités.**

Tableau I.1 : Sources potentielles de la chitine ..... 10  
 Tableau I.2 : Utilisation du chitosane en fonction de sa pureté.....15

**Chapitre II: Matériel et méthodes.**

Tableau II.1 : Matériel et réactifs utilisés.....24

**Chapitre III: Résultats et discussion.**

Tableau III.1 : Caractères d'identification des deux espèces de crevettes utilisées.....43  
 Tableau III.2: Données comparatives de composition biochimique des coproduits des crevettes.....45  
 Tableau III.3 : Composition et concentration en quelques éléments minéraux des carapaces de crevettes (exprimées en g/kg du poids sec).....43  
 Tableau III.4 : Rendements massiques de la chitine et du chitosane exprimés en (%) des deux extraits (chimique et enzymatique).....49  
 Tableau III.5 : Rendement massique (%) en chitine et chitosane obtenu à partir des coproduits de crevettes rapportés dans la littérature.....49  
 Tableau III.6 : Caractérisation biochimique des deux extraits de chitosane.....51  
 Tableau III.7 : Degré de Désacétylation des deux produits extraits par dosage potentiométrique et par RMN.....52  
 Tableau III.8 :Pouvoir antimicrobien du chitosane vis-à-vis des souches pathogènes testées.....53  
 Tableau III.9 : Résultat du test statistique (T).....55

### Chapitre I : Généralités

Figure I.1 : Morphologie externe d'une crevette.....	6
Figure I.2: Distribution géographique des deux espèces. a : <i>A.antennatus</i> (Risso, 1816). b : <i>P.longirostris</i> (Lucas, 1846). ....	7
Figure I.3: Structure chimique de la chitine et du chitosane .....	11

### Chapitre II : Matériel et méthodes.

Figure II.1 : Diagramme d'extraction de la chitine et du chitosane à partir des carapaces de crevettes.....	35
Figure II.2 : Schéma récapitulatif de l'activité antimicrobienne.....	38
Figure II.3 : Etapes du test anti-inflammatoire. ....	40

### Chapitre III : Résultats et discussion.

Figure III.1 : Détermination de la granulométrie et de la fraction dominante dans le broyat de carapace de crevettes.....	44
Figure III.2 : Composition biochimique globale des coproduits de crevettes exprimés en (%) par rapport au poids sec.....	44
Figure III.3 : Composition et concentration en quelques éléments minéraux des carapaces de crevettes (exprimées en g/kg du poids sec).....	47
Figure III.4 : Aspect general de chitine et chitosane.....	48
Figure III.5: Solubilisation du chitosane dans de l'acide acétique .....	50
Figure III.6 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du chitosane extrait. ....	52
Figure III.7 : Résultat du test antimicrobien du chitosane. a: <i>E.coli</i> ; b: <i>L.pneumophila</i> ; c: <i>S.aureus</i> .....	55
Figure III.8 : Potentiel d'inhibition de l'œdème (PIO) pour chaque traitement appliqué sur les souris en (%) .....	57

*A.antennatus* : *Aristeus antennatus*.

AOAC : Association of Official Agricultural Chemists.

ATCC: American Type Culture Collection.

BALB/c : Albino, laboratory-bred.

BCYE :Buffered Charcoal Yeast Extract.

BHIB : Brain Heart Infusion Broth.

*C.albicans* : *Candida albicans*.

CNRD : Centre de Recherche Nucléaire de Draria.

CNRDPA: Centre Nationale de Recherche et Développement de la Pêche et de l'Aquaculture.

CRAPC : Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques.

Cs : Chitosane.

Ct : Chitine.

DA : Degré d'acétylation.

DD : Degré de désacétylation.

*E.coli* : *Escherichia coli*.

ENSSMAL : Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral.

FTIR : Infrarouge à transformation de Fourier.

GlcN : D-glucosamine.

GlcNAc : N-acétyl-d-glucosamine.

HCl : Chlorure d'Hydrogène (acide chlorhydrique).

IPA : Institut Pasteur d'Algérie.

kDa : Kilo Dalton.

kg/hab : Kilogramme par habitant.

LNCPP : Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques.

NaOH : Hydroxyde de Sodium.

*P. longirostris* : *Parapenaeus longirostris*.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

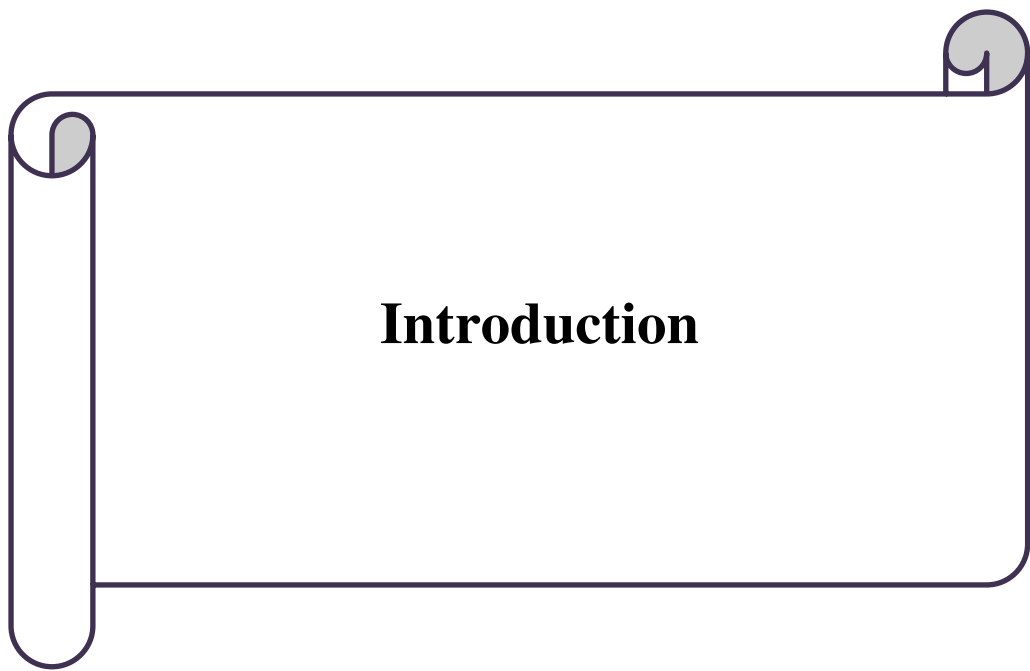
pH : Potentiel d'Hydrogène.

PM : Poids moléculaire.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

*S.aureus* : *Staphylococcus aureus*.

T : Tonnes.



# **Introduction**

## Introduction

Dans le monde, plus de 336 000 tonnes de crevettes sont capturées en 2018 (FAO, 2020). Ces crustacés sont destinés en premier lieu à l'alimentation humaine. Grâce à leur chair appréciée riche en protéines, en oméga 3 et en diverses vitamines, ces petits organismes marins occupent une place importante sur le plan économique et présentent le sommet de la marchandise internationale échangée des crustacés. Cependant, la gestion des déchets de crevettes, jusqu'à 70% de son poids, est problématique car elle engendre des coûts qui se répercutent sur le rendement des entreprises de transformation (SAINI *et al.* 2018).

En effet, selon HAMED *et al.* (2016) et ÖZOGUL *et al.* (2018), ces sous-produits sont jetés en mer, incinérés, mis en décharge ou simplement laissés à l'abandon. Pourtant, ils contiennent des composés hautement valorisables, notamment les protéines, les minéraux, les lipides et la chitine, qui peuvent être incorporés dans l'alimentation humaine et animale. Les retombées sont donc environnementales, sanitaires et économiques.

C'est pourquoi, la valorisation biotechnologique des coproduits de crevettes devient une préoccupation majeure à l'échelle mondiale et les crustacés marins sont considérés comme source principale de la chitine. Avec une disponibilité de plus de 10 000 tonnes par an, ce biopolymère devient le deuxième polysaccharide le plus abondant sur terre après la cellulose (HAMED *et al.* 2016 ; MOUSSIAN, 2019). Cependant, la chitine ne peut être exploitée en étant insoluble. Par conséquent, un processus de transformation de la chitine en chitosane doit être réalisé, par un processus chimique ou/et biologique.

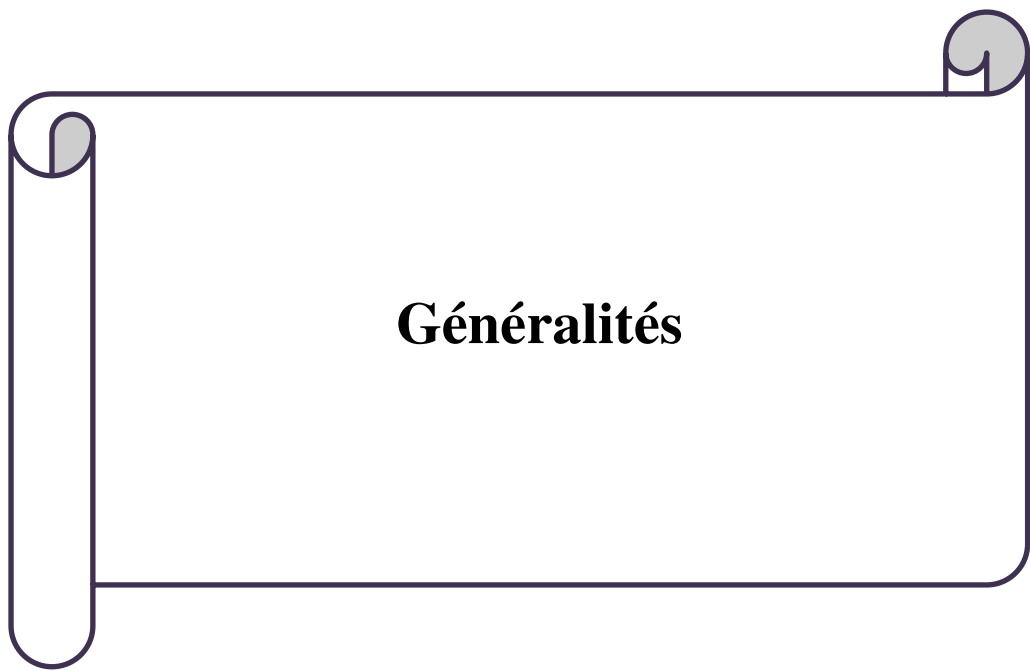
Le produit "chitosane" est un biomatériau biocompatible, biodégradable, non toxique, non allergène, économique et sans danger pour l'environnement (NATARAJAN *et al.* 2017 ; KHAN *et al.* 2019). Ce biopolymère est doté d'excellentes activités biologiques, notamment antiallergique, anti-oxydante, anti-hypertensive, anticoagulante, antidiabétique, anti-obésité, anticancéreuse, anti-inflammatoire et antimicrobienne (TEIXEIRA *et al.* 2017).

L'objectif principal de cette étude est la valorisation biotechnologique des carapaces de crevettes récupérées auprès des pêcheries et des restaurateurs et l'étude des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques de la chitine et du chitosane produits.

Nous évaluerons en particulier son activité antimicrobienne *in vitro* vis-à-vis de divers germes pathogènes (*Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*) et son activité anti-inflammatoire *in vivo*.

Ce travail s'organisera en trois chapitres principaux présentés comme suit:

- Le premier chapitre est un aperçu général sur les deux espèces de crevettes étudiées : *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) et *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846). Une attention particulière sera apportée aux propriétés physico-chimiques et biologiques de la chitine et du chitosane ainsi que sur leurs domaines d'utilisation. Enfin, une description générale des germes pathogènes utilisés sera abordée.
- Le deuxième chapitre décrit les protocoles expérimentaux adoptés pour la caractérisation biochimique des carapaces de crevettes, l'extraction de la chitine et du chitosane par deux méthodes, l'une purement chimique et l'autre par l'intermédiaire d'une enzyme. La caractérisation biochimique du chitosane extrait ainsi que les tests du pouvoir antimicrobien et anti-inflammatoire seront détaillés.
- Le troisième chapitre est consacré à l'interprétation des différents résultats obtenus et à une étude comparative avec les travaux antérieurs.



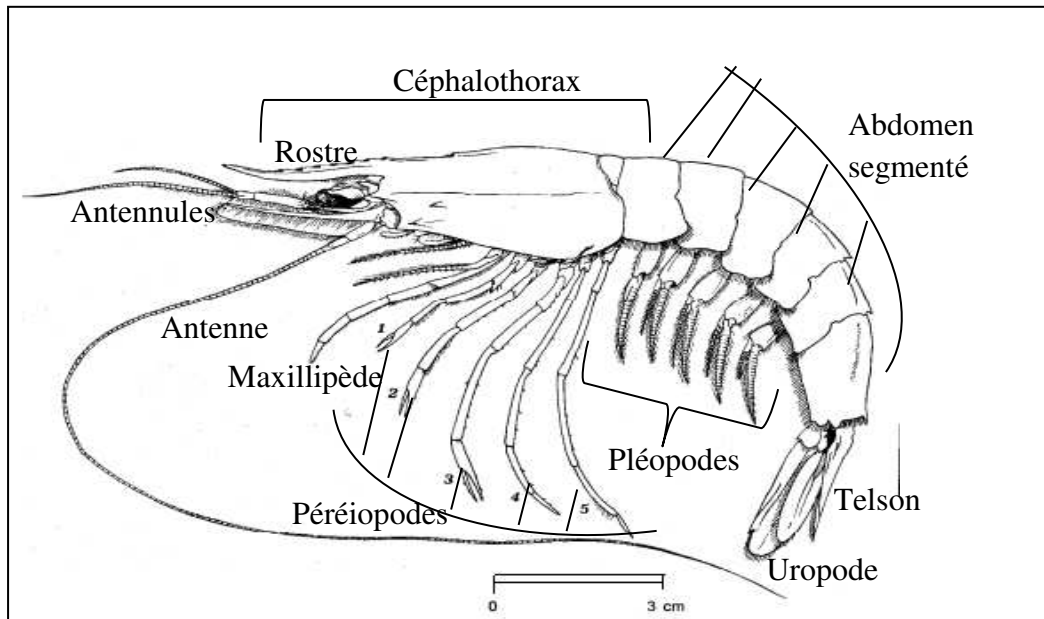
# **Généralités**

## **I.1. Généralités sur les crustacés, focus sur les crevettes utilisées**

### **I.1.1. Description générale et biologie**

Les Crustacés constituent l'une des classes de l'embranchement des Arthropodes (crustacés, insectes, arachnides) (ADDA-HANIFI, 2007). Ils comprennent actuellement 68 171 espèces décrites. La plupart sont des animaux aquatiques, terrestres, parasites ou sessiles (MAI, 2014). Ils ont un corps constitué d'une tête soudée au thorax (céphalothorax) qui comprend des yeux, des antennules, un rostre et des pièces buccales destinées à broyer la nourriture, le thorax porte cinq paires de péréiopodes. De plus, un abdomen segmenté, recouvert d'une cuticule sécrétée par l'épiderme, muni de cinq paires de pléopodes et se termine par un telson (ADDA-HANIFI, 2007). La cuticule fournit un soutien, une protection contre les prédateurs et diverses options locomotrices. Pour grandir, l'animal élimine son ancienne carapace et la remplace par une nouvelle dans un processus de mue. L'anatomie interne des crustacés est la plus complexe de tous les invertébrés. Ils sont dotés d'un système neuronal très développé avec un cerveau céphalique et des organes sensoriels complexes. Par conséquent, ils ont un comportement sophistiqué. Ceci comprend une communication visuelle, tactile et chimique (THROP et ROGERS, 2011). Leur respiration est assurée par l'absorption de l'oxygène présent dans l'eau grâce aux branchies renfermées dans la cavité thoracique (ADDA-HANIFI, 2007). Parmi les Crustacés, on trouve les crevettes qui sont considérées comme les plus précieuses dans cette classe (figure I.1). Ces organismes sont des carnivores prédateurs qui capturent de petits invertébrés, mais aussi détritivores qui se nourrissent de débris organiques et de cadavres d'animaux (KHERRAZ, 2006). Les excréments sont principalement de l'ammoniac ou de l'acide urique. Les crevettes sont des animaux à sexe différent (MAI, 2014). Leur reproduction est basée sur le dépôt des spermatophores par le mâle, dans l'orifice génital de la femelle (KHERRAZ, 2006). Les œufs fécondés sont portés par la femelle pendant un mois d'incubation. Après l'éclosion, les larves subissent une succession de mues jusqu'à obtention d'une forme mature (BENKABOUCHE, 2015).

Deux espèces méditerranéennes ont fait l'objet de cette étude. La crevette rouge : *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) et la crevette rose : *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846).



**Figure I.1 : Morphologie externe d'une crevette. (HOLOTUIS, 1987) modifiée.**

### I.1.2. Taxonomie et position systématique

D'après la classification obtenue par différentes études, on peut classer les deux espèces dans le même règne, embranchement, classe, sous classe et ordre. Selon KHERRAZ (2006), et BENKABOUCHE (2015), une taxonomie sommaire est donnée comme suit :

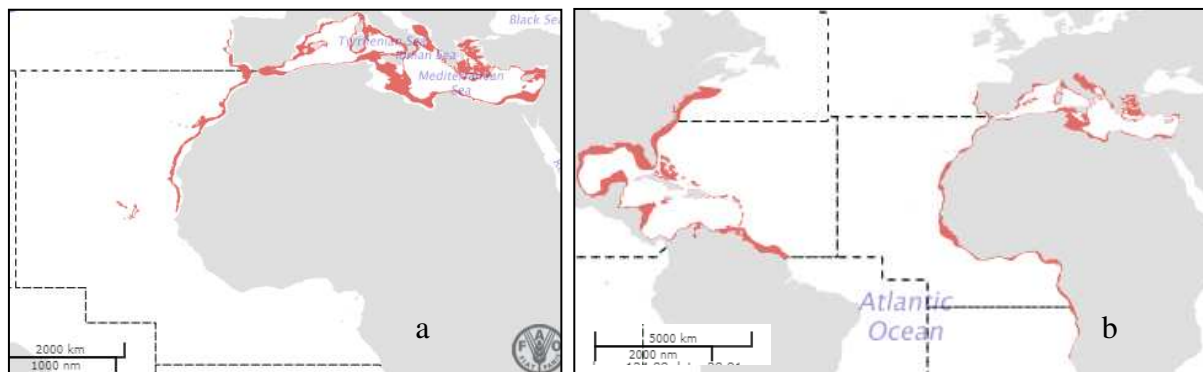
- Règne : Animal.
- Embranchement : Arthropodes.
- Classe : Crustacés (Pennant, 1777).
- Sous Classe : Malacostracés.
- Ordre : Décapodes (Latreille, 1802).
- Famille : Aristeidées (Wood-mason, 1891) / Penaeidées (Rafinesque, 1815).
- Genre : *Aristeus* (Duvernoy, 1841) / *Parapenaeus* (Smith, 1885).
- Espèce : *Antennatus* (Risso, 1816) / *Longirostris* (Lucas, 1846).

### I.1.3. Distribution géographique

Les deux espèces décrites sont démersales, vivent sur des fonds vaseux peu sableux et sont capturées essentiellement par les chalutiers.

*A. antennatus* est une espèce distribuée dans : la Méditerranée, la zone centrale de l'Atlantique Est, l'océan Indien, le Mozambique, l'Afrique du Sud et le Brésil (FAO, 2020). Elle est fréquente et abondante à une profondeur allant de 80 à 3 300 m (OULHIZ, 2018). Tandis que *P. longirostris* est fréquente et abondante dans les profondeurs allant de 100 à 300 mètres ; elle se rencontre dans tout le bassin méditerranéen, l'Atlantique oriental; de l'Angola

au Portugal et dans l'Atlantique occidentale, des Guyanes au Massachusetts (USA), (FAO, 2020).



**Figure I.2: Distribution géographique des deux espèces. a : *A. antennatus* (Risso, 1816). b : *P. longirostris* (Lucas, 1846), (FAO, 2020).**

#### **I.1.4. Production mondiale des crustacés "crevettes"**

La consommation mondiale des crustacés est passée de 0,4 kg/hab en 1961 à 1,6 kg/hab en 2005. La crevette est la première valeur échangée parmi les produits marins. Selon les données de la (FAO, 2020). Sa production mondiale est estimée à plus de 336 000 tonnes en 2018. La majeure partie de la production s'effectue en Asie et en Amérique latine et les principaux marchés sont les États-Unis d'Amérique, l'Union européenne et le Japon (FAO, 2020). De son côté, l'Équateur renforce sa croissance par des gains de productivité. La pression à l'achat de la Chine pousse la pénéculture équatorienne dans ce sens. Tendence identique au Vietnam devenu, parallèlement à la pénéculture, une véritable « usine » de transformation de crevettes importées puis réexportées sur le marché chinois. En comptant sa propre production et les importations, le Vietnam atteindrait 470 000T (FAO, 2016). Les exportations de crevettes atteignent 14 milliards de dollars par an, soit 16% des produits marins. La part de l'aquaculture représente 70% de la production mondiale de crevettes et plus généralement 76% pour l'ensemble des crustacés (FAO, 2016). Cependant, la répartition entre l'aquaculture et la pêche de crevettes est très inégale selon les régions du globe.

Les crevettes sont généralement traitées aux métabisulfites à la sortie de l'eau, pour éviter leur dégradation et le noircissement des carapaces par oxydation (CHANTREAU et VALLET, 1991). Elles sont vendues soit fraîches, soit congelées, cuites ou marinées. De plus, elles sont proposées entières ou décortiquées.

En 2010, la plus forte augmentation était la part des crevettes cuites et décortiquées. Généralement, cette forme de produit est destinée à une post-transformation, telle que la fabrication de brochettes de la mer ou de plats préparés.

L'augmentation de la production des crustacés entraîne une augmentation du volume de leurs coproduits. Des plateformes de décorticage de crevettes existent notamment au Maroc et en Asie. Leur principale voie de valorisation est la production de chitine, l'un des composés majoritaires des cuticules de crustacés (OULHIZ, 2018).

#### **I.1.4.1. Abondance des crustacés en Méditerranée "en Algérie"**

Les crevettes roses *P.longirostris* (Lucas, 1846) et rouges *A.antennatus* (Risso, 1816) sont parmi les crustacés les plus précieuses et les plus importantes sur le plan économique dans la Méditerranée. Toutes les deux sont abondantes et avec une distribution considérablement plus large que de nombreux autres crustacés décapodes (MOUFFOK *et al.* 2008, KAPIRIS et THESSALOU-LEGAKI, 2011 ; MARRA *et al.* 2015). Selon ALGERIE PRESSE SERVICES, la pêche des crustacés a atteint en 2018, 2.192 T pour venir se placer en troisième position après la pêche des poissons pélagiques avec 92,392 T et des poissons démersaux avec 6.177 T. La production annuelle élevée et la transformation continue des crustacés engendrent de très grandes quantités de déchets ce qui permet aux industries technologiques de les exploiter comme une source biologique renouvelable de valeur économique non négligeable.

#### **I.1.5. Valorisation des coproduits de crustacés et enjeux économiques**

##### **I.1.5.1. Production de la chitine et du chitosane**

Les coproduits sont définis comme les parties non utilisées lors de la consommation et transformation d'un produit comestible. Ils représentent plus de 60% du poids frais (RANDRIAMAHATODY, 2011). En général, les composés précieux qu'on peut acquérir à partir des coproduits de crevettes, présentent : 15% à 40% de chitine, 20% à 40% de protéines et 20% à 50% de minéraux. Les pigments, les lipides et autres sels métalliques sont des composants mineurs. Étant donné que ces coproduits sont à haute valeur ajoutée, la bioconversion de cette ressource facilement accessible et renouvelable a attiré beaucoup d'intérêt pour assurer une pêche durable et améliorer la rentabilité des activités de la filière (BRÜCK *et al.* 2011).

La production de la chitine se situe en majorité en Asie-Pacifique. Les coproduits de crustacés y sont disponibles et la législation liée au retraitement des effluents est peu contraignante. En 2004, on répertoriait 63 producteurs de chitine ayant une place importante sur le marché, dont la moitié en Asie. Le Japon est le premier producteur (LE ROUX, 2012).

Pour la plupart des applications, la chitine n'est pas utilisée directement. Elle est convertie, principalement en chitosane et chitooligosaccharides.

La demande en chitine et ses dérivés en 2020 est estimée à 106.900T. Le marché mondial des dérivés de la chitine devrait atteindre 63 milliards de dollars d'ici 2024, selon le rapport de GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC et SFLY GREENTECH (2020).

## **I.2. Chitosane**

### **I.2.1. Aperçu historique**

C'est en 1811 que le naturaliste français Braconnot a pu identifier un polysaccharide à partir des champignons et lui a donné le nom de "fungine". Une décennie plus tard, en 1823, Odier a trouvé la même biomolécule dans l'exosquelette des insectes et l'a nommé chitine (Ct) qui signifie tunique (enveloppe). Ensuite, en 1859, Charles Rouget a traité la chitine par ébullition dans une solution alcaline concentrée et il a été obtenu un biopolymère soluble dans les acides organiques nommé "chitosane" (Cs). Ce dernier, est identifié, par le scientifique Ledderhose en 1876, comme étant un sucre doux qui peut être consommé par la levure comme source d'énergie. Par la suite, Seiler a confirmé en 1894 que le (Cs) est la forme désacétylée de la (Ct) et lui a donc donné son nom actuel nommé (Cs). Ce n'est qu'un siècle après la première découverte (1934), qu'un procédé de fabrication du chitosane est décrit par Rigby dans un brevet. Néanmoins, le véritable intérêt aux produits chitineux (chitine et chitosane) se manifeste, dans les années 1970, de la part des gouvernements américains et japonais, suite à leurs programmes de recherche sur « la valorisation des déchets » surtout avec des ressources renouvelables et abondantes. Ces deux biopolymères d'origine animale, sont biodégradables et biorésorbables (HAMED *et al.* 2016 ; HASSAINIA, 2018 ; MOUSSIAN, 2019 ; QIN et ZHAO, 2019).

### **I.2.2. Principales sources du chitosane**

Il n'y a pas vraiment de sources primaires de chitosane exploitable, et la source majeure provient de la désacétylation de la chitine. Cette dernière est présente dans la plupart

des espèces vivantes, chez les arthropodes et les céphalopodes. On le trouve aussi chez les champignons mais ils sont tous les deux (Ct et Cs) absents chez les mammifères.

Le meilleur rendement d'extraction de la chitine est actuellement observé chez les crustacés qui en constituent la principale source au niveau industriel (Tableau I.1).

**Tableau I.1 : Sources potentielles de la chitine (RINAUDO, 2006).**

Source de la chitine	Teneur en chitine (%)
Calmar ( <i>Loligo vulgaris</i> )	40
Seiche ( <i>Sepia officinalis</i> )	20
Crevette ( <i>Palaemon fubricius</i> )	22
Ecrevisse ( <i>Astacus fluviatilis</i> )	36
Langouste ( <i>Palimurus vulgaris</i> )	32
Homard sauterelle ( <i>Scyllarus arctus</i> )	25
Homard ( <i>Homaras vulgaris</i> )	17
Crabe araignée ( <i>Maia squinado</i> )	16
Crabe rouge ( <i>Potumus puspuber</i> )	10
Crabe marbré ( <i>Grapsus marmoratus</i> )	10
Bernacle ( <i>Lapas anatifera</i> )	7

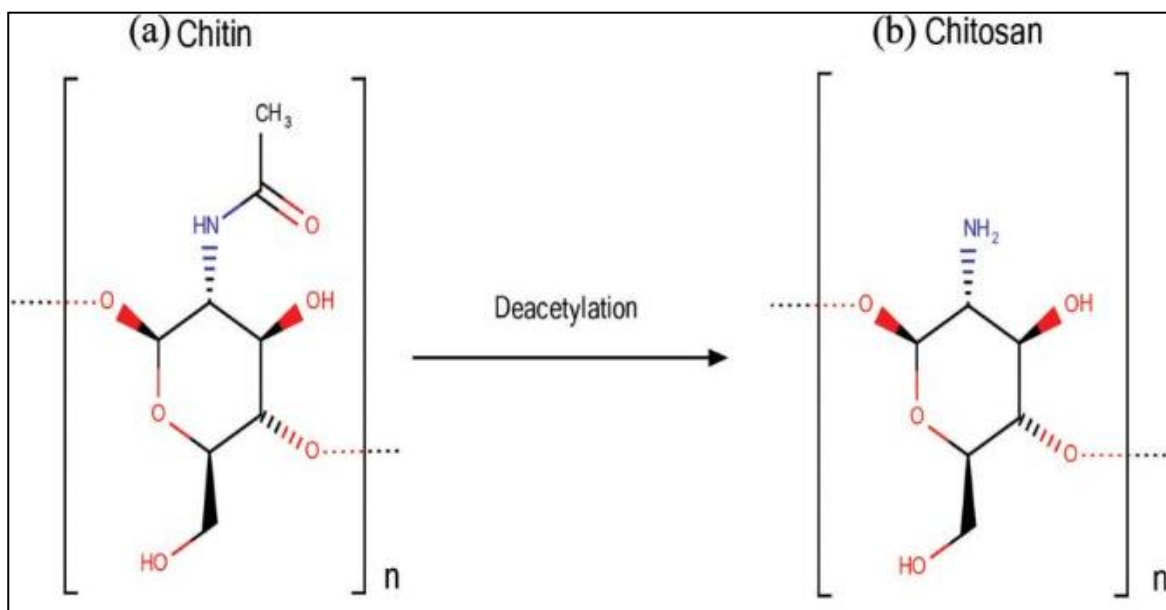
### I.2.3. Structure de la chitine et du chitosane

La chitine (Ct) est un copolymère polysaccharidique, le plus abondant dans la nature après la cellulose (MOUSSIAN, 2019). Elle est composée d'unités de N-acétyl-d-glucosamine (GlcNAc) et de D-glucosamine (GlcN), reliées par des liaisons covalentes  $\beta$ , (1 $\rightarrow$ 4). En raison de cette liaison spécifique, la (Ct) présente une structure extrêmement robuste qui entre dans la composition de la cuticule des Arthropodes ainsi que dans l'endosquelette des Céphalopodes. Elle est également présente dans les parois cellulaires de la plupart des champignons, de certaines levures et algues (HASSAINIA, 2018). La (Ct) est insoluble dans la plupart des solvants (AL-SAGHEER *et al.* 2009).

Selon, AL-SAGHEER *et al.* (2009), il existe trois polymorphes différents de la (Ct) dans la nature :

- La (Ct)  $\alpha$ , est la structure la plus courante, formée de cellules en feuilles alternées de chaînes antiparallèles étroitement compactées et correspondant à un orthorhombique. Elle est généralement isolée de l'exosquelette des crevettes et des crabes.
- La (Ct)  $\beta$ , adopte une cellule unitaire monoclinique où les chaînes polysaccharidiques sont disposées en parallèle. Elle est principalement trouvée dans des enclos de calmar.
- La (Ct)  $\gamma$ , peu identifiée, est considérée comme une combinaison d'une structure  $\alpha$  et  $\beta$ . Elle existe majoritairement dans les champignons et les levures.

La dés-acétylation de la chitine en milieu basique permet donc la formation du chitosane. Ce biopolymère a des caractéristiques structurales uniques. C'est un copolymère linéaire cationique constitué de deux monomères (80% de poly (GlcN) et 20% de poly (GlcNAc), liés entre eux par la liaison  $\beta$ -1-4) (figure I.3). La présence de groupes aminés ( $\text{NH}_2$ ) dans le (Cs) est la raison pour laquelle il présente un potentiel beaucoup plus grand que celui de la (Ct) pour diverses utilisations dans différents domaines (GADKARI *et al.* 2019).



**Figure I.3: Structure chimique de la chitine et du chitosane  
(ESCUDERO-OÑATE et MARTINEZ-FRANCÉS, 2018)**

Ce biomatériau est biocompatible, biodégradable, non toxique, non allergène, économique et sans danger pour l'environnement (KHAN *et al.* 2019).

Le degré d'acétylation (DA) et le poids moléculaire (PM) sont les principaux paramètres ayant un impact direct sur le comportement de solubilité et propriétés de sorption

du (Cs) (DARAGAN et DINU, 2020), la troisième principale caractéristique est la cristallinité du polymère qui contrôle son hydratation et son gonflement en solution. Ces trois paramètres sont distinctifs pour la (Ct) et le (Cs) (GUIBAL et VINCENT, 2009).

En effet, la structure de la chitine et du chitosane diffère au niveau de la position C<sub>2</sub> où on trouve l'acétamide pour la chitine et l'amine pour le chitosane, ce qui confère à ce dernier sa nature cationique en milieu acide. En outre, la différence entre ces deux polysaccharides est essentiellement associée à la possibilité de solubiliser le (Cs) en milieu acide dilué alors que la chitine reste insoluble (AL-SAGHEER *et al.* 2009).

#### **I.2.4. Production du chitosane**

La production du (Cs) ou la désacétylation (désAc) est la réaction de transformation de la (Ct) en (Cs) qui consiste à enlever suffisamment de groupes acétyles (CH<sub>3</sub>-CO). Cette opération libère les (NH<sub>2</sub>) pour que le (Cs) soit soluble (OULHIZ, 2018). La (désAc) est soit enzymatique ou chimique, pour des raisons économiques, la voie chimique est privilégiée (TEIXEIRA *et al.* 2017).

Chez les Arthropodes producteurs de la (Ct), la (désAc) est réalisée par la (Ct)-désacétylase. Celle-ci est une métalloprotéine appartenant à une famille d'estérases glucidiques qui catalyse différents substrats glucidiques dont la (Ct) (LIU *et al.* 2019). Alors que sur le plan industriel, le (Cs) peut être produit en utilisant des solutions alcalines hautement concentrées (40% à 50%) à haute température (100°C ou plus) (BRÜCK *et al.* 2011). Ce traitement conduit généralement à une (désAc) partielle. En effet, pour obtenir une (désAc) totale il conviendrait de procéder à une série de traitements successifs (GUIBAL et VINCENT, 2009).

#### **I.2.5. Propriétés de la chitine et du chitosane**

##### **I.2.5.1. Propriétés physico-chimiques**

Parmi les propriétés physico-chimiques originales de ce biomatériau, on trouve le (DA) ou degré de (désAc) (DD). Ces deux paramètres déterminent la structure de la (Ct) et identifient le biopolymère comme (Ct) ou (Cs). Ajoutant à cela, le (PM) comme troisième propriété importante. Il permet de déterminer la viscosité et le taux de dégradation.

Les protéines résiduelles, la teneur en humidité, en cendres, en lipides et la couleur sont d'autres propriétés présentes en fractions mineures dans la (Ct) et le (Cs) et diffèrent selon le processus de fabrication.

### **I.2.5.1.1. Degré d'acétylation et degré de désacétylation**

Le (DA) et le (DD), sont deux propriétés clés qui doivent être déterminées car elles influencent les propriétés physiques et chimiques de la (Ct) et du (Cs) telles que la solubilité, la réactivité chimique et la biodégradabilité et donc leurs applications.

On définit le DA comme le pourcentage d'unités Glucosamines de la chaîne de biopolymère ayant le groupement N-acétyle qui lui sont attachés (VILLAR *et al.* 2019) et le degré de (désAc) comme le nombre d'unités d'acétyle retirées de la (Ct) (VINUSHA *et al.* 2019). Il faut faire la différence entre ces deux paramètres, ils sont complémentaires mais l'un comme étant l'inverse de l'autre. On parle de la (Ct) lorsque le  $DA > 50\%$  et du (Cs), lorsque le  $DA < 50\%$  (HASSAINIA, 2018). Pour déterminer le DD, plusieurs méthodes ont été décrites. On cite : l'infrarouge à transformation de Fourier (FTIR) pour une caractérisation rapide et simple, méthode de résonance magnétique nucléaire (RMN) qui est la plus précise et le titrage potentiométrique (AL-SAGHEER *et al.* 2009).

### **I.2.5.1.2. Poids moléculaire**

Le (PM) est la moyenne de tout le poids des chaînes d'un polymère. Pour la (Ct) et le (Cs), le PM est déterminé par la viscosimétrie (KHOR, 2001). La masse moléculaire du (Cs) est souvent élevée comme tous les polysaccharides elle varie entre 300 et 1000 kDa (GUTIERREZ-MARTINEZ *et al.* 2018). Ce PM dépend intimement de la source de la (Ct) et du procédé de production (CRINI *et al.* 2009).

### **I.2.5.1.3. Solubilité**

La solubilité d'un polymère est liée aux interactions intra et inter moléculaires entre les chaînes. La (Ct) a un caractère hydrophobe. Par conséquent, elle est insoluble dans les solvants classiques (LE ROUX, 2012). Cette insolubilité est due aux liaisons fortes d'hydrogène intermoléculaires qui fait de la (Ct) un matériau rigide (HAMED *et al.* 2016). Néanmoins, les acides concentrés la dégradent par chauffage à 250°C, ce qui altère sa structure et engendre une dangerosité pour l'opérateur.

Ceci constitue l'inconvénient majeur qui limite l'utilisation de la (Ct) et rend difficile sa caractérisation. Tandis que le (Cs) est soluble dans la plupart des solvants acides tel que l'acide acétique dilué à pH 3-4 (CRINI *et al.* 2009).

#### **I.2.5.1.4. Viscosité**

La viscosité du chitosane dépend du (DA) de ce polymère. Plus le chitosane est soluble, plus sa viscosité est importante, ceci est dû au fait de sa désacétylation et la libération des groupements amines. Notons que la viscosité augmente avec la concentration du polymère mais, qu'elle chute lorsque la température augmente. Plus le pH est bas plus la viscosité est importante, alors que la viscosité intrinsèque est cohérente avec l'augmentation du poids moléculaire (HAMED *et al.* 2016).

#### **I.2.5.2. Propriétés biologiques**

La protonation de la fonction amine du (Cs) lui confère des propriétés cationiques et le qualifie comme polymère naturel, biocompatible, biodégradable et non toxique (NATARAJAN *et al.* 2017).

##### **I.2.5.2.1. Biocompatibilité et Cytocompatibilité**

Une substance est dite biocompatible si elle est tolérée et acceptée par les cellules du corps et ses tissus (HALIM *et al.* 2011). La biocompatibilité et la cytocompatibilité sont attribuées à la (GlcN), le composant le plus abondant du (Cs) ainsi que des tissus cartilagineux dans le corps humain, produit à partir du glucose (VEGA-CAZAREZ *et al.* 2018). Grâce à cette complémentarité structurelle, les interactions produites entre ce biomatériau et le tissu hôte sont tolérées.

##### **I.2.5.2.2. Biodégradabilité**

Le (Cs) est polycationique, il interagit facilement avec diverses molécules chargées négativement telles que les protéines, les polysaccharides anioniques, les acides gras et les acides biliaires. La compréhension de la biodégradation du (Cs) est cruciale car elle implique des problèmes de performance et de sécurité. Sa dégradation dépend de son poids moléculaire, de sa structure chimique et des milieux environnants. Il est dégradé par le lysozyme, une enzyme présente dans l'intestin humain et elle est produite également par les macrophages pendant la cicatrisation des plaies et dans certains cas par les bactéries du colon (HALIM *et al.* 2011). Cette enzyme hydrolyse le (Cs) en oligomères dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps (OULHIZ, 2018).

#### **I.2.6. Activités du chitosane et domaines d'applications**

En raison de ses caractéristiques nobles, le (Cs) et ses dérivés ont diverses activités biologiques, notamment anti-oxydante, anti-hypertensive, anticoagulante, antidiabétique, anti-

obésité, antiallergique, anti-inflammatoire, antimicrobienne, anticancéreuse ; en plus, il est neuroprotecteur (TEIXEIRA *et al.* 2017). Les applications sont très variées et dépendent des propriétés physico-chimiques et du degré de pureté. Les principales activités et applications sont résumées ci-après:

**Tableau I.2 : Utilisation du chitosane en fonction de sa pureté (ANDRIEUX, 2004; IFREMER, 2010).**

Chitosane technique	Chitosane pur	Chitosane ultra-pur
<b>Traitement des eaux :</b> - Flocculant coagulant - Chélateur des métaux et des colorants	<b>Alimentation :</b> - Agent de conservation - Epaississant - Emulsifiant - Stabilisant	<b>Biotechnologie et biomédicale :</b> - Antibactérien et anti fongique - Immunostimulant - Hémostatique - Anti-coagulant Antithrombogène : - Agent d'accélération de la cicatrisation Traitement des brûlures des lésions épidermiques : Pansements, bandages, peau artificielle, lentilles cornéennes, implants, fil de suture -Transport de gènes biocapteur- nanocomposites -Matrice pour la régénération des os et substituts du cartilage. -Immobilisation et encapsulation des enzymes et des cellules.
<b>Pâtes et papiers :</b> -Traitement de surfaces -Papier carbone	<b>Anti-oxydant :</b> - Anti-cholestérolémiant - Fibre diététique ou complément alimentaire : - Flocculant pour la clarification des boissons film alimentaire pour la protection - Agent d'encapsulation et d'enrobage	
<b>Agriculture :</b> - Enrobage des grains - Fertilisant - Bio-fongicide - Protection contre le gel - Stimulation de germination et fructification	<b>Cosmétique :</b> - Hydratant - Traitement capillaire - Anti-odeur - Gel dentaire	
<b>Bioplastique</b> en substitution de dérivés pétroliers		

- Le (Cs) est doté d'une forte capacité de réduction et élimination des radicaux hydroxyles et anions superoxydes. Grâce aux charges positives, ce biomatériau fournit des positons aux radicaux libres, ce qui les rend dans un état stable, bloquant la réaction radicalaire en chaîne et réduisant efficacement les dommages oxydatifs (QIN et ZHAO, 2019).

- Ce polysaccharide complexe stimule l'immunité et joue un rôle important dans la régénération des tissus du cartilage endommagés et vieillissants. En effet, une fois implanté dans les lésions ostéochondrales, l'implant sang/chitosane induit une inflammation aiguë où des macrophages sont sollicités pour la libération de deux puissants facteurs anti-inflammatoires, le récepteur antagoniste de l'interleukine-1 (IL-1ra) et l'interleukine-10 (IL-10) dans l'environnement ostéochondral. Une faible dose de chitosane avec un degré de polymérisation précis peut guider une réponse anti-inflammatoire et protéger ainsi le cartilage (FONG, 2016 ; ADNAN *et al.* 2020).
- Il renforce aussi les défenses immunitaires des plantes (CRINI *et al.* 2009). Il stimule la différenciation des cellules racinaires et apporte de l'azote lorsqu'il se décompose contribuant à l'enrichissement du sol et de la plante. Par conséquent, de meilleurs rendements de germination et de récolte sont obtenus (LE ROUX *et al.* 2012 ; STEINFELD *et al.* 2019).
- L'encapsulation et les hydrogels fabriqués à base du (Cs) lui permettent d'être porteur de médicaments, de gènes, de protéines et d'autres matériaux biologiques (KHOR et WAN, 2014). Il est doté d'une caractéristique mucoadhésive qui prolonge le temps de séjour du médicament sur les sites de distribution spécifiques. D'autre part, ces nanoporteurs de médicaments, présentent une activité antitumorale (TEIXEIRA *et al.* 2017 ; KHOR et WAN, 2014).
- Dans le domaine alimentaire, cette molécule active est actuellement utilisée comme un complément alimentaire pour prévenir l'absorption des graisses (TEIXEIRA *et al.* 2017). Des matrices d'enrobage à base du (Cs) ont été également utilisées comme emballage, notamment pour prolonger la durée de conservation, réduire la détérioration, protéger efficacement l'aliment de l'humidité, de la contamination gazeuse et inhiber la prolifération des microorganismes (KHAN *et al.* 2019 ; İNCILI *et al.* 2020).
- L'une des meilleures options pour réduire le plastique jeté en mer est la fabrication de bioplastique à base de (Cs) rapidement dégradé (LAARAIBI *et al.* 2018). Cette biomolécule grâce à ses propriétés floculantes et adsorbantes à différentes matières (minérales, organiques et microorganismes), est qualifiée comme un matériau de choix pour le traitement des eaux usées. Par floculation, le (Cs) réduit la teneur en matière en suspension jusqu'à 98%. De plus, il se comporte comme un catalyseur hétérogène efficace, il piège les composés dangereux par formation des agglomérats. Puis ces derniers sont éliminés par filtration. Ce processus aurait même l'avantage de permettre

la récupération des colorants sous une forme concentrée (CRINI *et al.* 2009 ; DARAGAN et DINU 2020).

### **I.3. Micro-organismes pathogènes et activité antimicrobienne**

#### **I.3.1. Micro-organismes pathogènes**

##### **I.3.1.1. Description générale du genre *Legionella***

En 1976, un groupe d'anciens combattants de la seconde Guerre Mondiale, membres de la Légion Américaine se sont réunis dans un hôtel (Bellevue Stratford) de Philadelphie. Près de 4000 délégués ont contracté une pneumonie grave, 146 ont été hospitalisés et 29 ont succombé à la maladie. Un nouveau microorganisme, nommé *Legionella pneumophila* a été isolé du tissu pulmonaire d'un patient décédé lors de l'épidémie (GOMEZ-VALERO *et al.* 2009 ; FARHAT, 2009 ; RICHARDS *et al.* 2013).

Les Legionellales est un ordre composé uniquement de bactéries intracellulaires au sein de la classe des Gammaprotéobactéries (GRAELLS *et al.* 2018 ; GOMEZ-VALERO *et al.* 2009). La *Legionella* est un coccobacille à Gram négatif, aérobic stricte, ubiquitaire pouvant se multiplier à l'intérieur de protozoaires (CATTAN *et al.* 2019). C'est un agent pathogène opportuniste (LEARBUCH *et al.* 2019) qui affecte principalement les sujets immunodéprimés ou souffrant d'autres maladies (MORENO *et al.* 2019). Sa taille mesure de 0.3 à 0.9 µm de large sur 2 µm de long. Elle se caractérise par un ou plusieurs flagelles (JARRAUD et FRENEY, 2006).

Cette bactérie est virulente, intracellulaire de type auxotrophe pour plusieurs acides aminés tels que la L -cystéine, et oligo-éléments comme le fer, mésophile ou thermotolérante car elle peut résister à des températures allant de (0 à 45°C), se développant de préférence en milieu à pH neutre (KUSIĆ *et al.* 2016 ; GRAELLS *et al.* 2018).

La *Legionella* est une bactérie hydrique largement répandue dans tous les milieux naturels et artificiels. Cet agent pathogène présente des interactions avec les amibes ou les biofilms qui sont considérés tous les deux comme un refuge, fournisseur de nutriments et milieu de protection contre les antagonistes. La bactérie se transmet de l'environnement à l'homme par inhalation de particules d'aérosols contaminées en se concentrant dans les lobes pulmonaires (VERDON, 2009 ; RICHARDS *et al.* 2013).

Chez l'homme, *Legionella* peut causer dans un premier cas une fièvre de Pontiac, ressemblant à la grippe; elle est spontanément résolutive et rarement signalée. Dans un deuxième cas, une pneumonie grave ou legionellose. Celle-ci présente divers symptômes,

allant du malaise à la toux en passant par les frissons, dyspnée, maux de tête et douleurs thoraciques à la diarrhée. Elle peut aussi causer des manifestations extra-pulmonaires comme une variété de troubles du système nerveux central, léthargie, confusion, hallucinations, réflexes hyperactifs ou rétention urinaire (GOMEZ-VALERO *et al.* 2009 ; SHAHEEN *et al.* 2019).

Plusieurs méthodes de diagnostic ont été proposées, elles diffèrent l'une de l'autre par leur spécificité, sensibilité et rapidité. Parmi ces méthodes on peut citer:

L'antigénurie est actuellement la méthode la plus utilisée pour le diagnostic des légionelloses. Elle permet de détecter les antigènes présents dans les urines par deux méthodes rapides d'immuno-chromatographie sur membrane (15 minutes) ou par méthode ELISA (4 heures) (JARRAUD et FRENEY, 2006).

La mise en culture d'un ou plusieurs prélèvements d'origine pulmonaire sur milieu BCYE puis identification par un test d'agglutination ou par amplification et séquençage de gènes. La culture donne une estimation tardive (3 à 10 jours) et sous-évaluée de la *Legionella* (JARRAUD et LAWRENCE, 2015).

Le sérodiagnostic à son tour vise à détecter les anticorps présents dans le sang et la biologie moléculaire vise à détecter les gènes présents dans le prélèvement par PCR (JARRAUD et LAWRENCE, 2015).

En raison de la forme intracellulaire de la *Legionella*, seuls les antibiotiques qui peuvent pénétrer à l'intérieur du parenchyme pulmonaire sont efficaces (LONG *et al.* 2012). Dans une forme légère, un traitement par macrolide (érythromycine, azithromycine...) est préféré. Ce dernier, grâce à son macrocycle de lactone traverse la membrane interne pulmonaire et empêche le ribosome de synthétiser les protéines bactériennes (JANAS et PRZYBYLSKI, 2019). Tandis que dans une forme grave, un traitement par fluoroquinolone (lévofloxacine, ofloxacine...) est préféré (DE-LASTOURS et FANTIN, 2014).

### **I.3.1.2. Description générale de l'espèce *Escherichia coli***

*Escherichia coli* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles de 0,5 à 3 µm de long, à coloration de Gram négative, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs et à oxydase négative. L'espèce *E. coli* est considérée comme un hôte de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud.

Elle a été identifiée la première fois dans l'étiologie de l'entérite infantile lorsque Théodore Escherich isola ces micro-organismes lors de cas de diarrhée de nourrissons en 1885. À partir des années 1950, de nombreuses souches d'*E. coli* ont été répertoriées, chez

l'homme comme chez l'animal, comme étant des souches pathogènes responsables d'affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques sévères voire mortelles (DIALLO, 2013 ; MISZCZYCHA, 2013).

#### **I.3.1.3. Description générale de l'espèce *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* est une espèce bactérienne à Gram positif, de forme sphérique (coque) regroupée généralement en amas, découverte en 1870 lors de l'étude microscopique d'échantillons de pus. Elle est immobile, non sporulée, fermente des sucres (glucose, saccharose, lactose et mannitol), présente une activité catalase, coagulase, phosphatase mais pas d'oxydase et elle est capable de sécréter de nombreuses toxines. Cette bactérie se caractérise par la pigmentation dorée de ses colonies mesurant de 0,5 à 1,5µm de diamètre. *S. aureus* a un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Le *S. aureus* se développe entre 10 et 42°C avec une température optimale de 37°C. La majorité des infections à ce germe pathogène sont des infections de la peau ou des tissus mous. Néanmoins, des cas mortels ont aussi été rapportés, comme des pneumonies nécrosantes ou des septicémies (ACCARIAS, 2014).

#### **I.3.1.4. Description générale de l'espèce *Candida albicans***

Le *Candida albicans* est une levure (champignons microscopiques), eucaryote à paroi contenant 1 à 3 % de chitine, se multipliant par bourgeonnement. Ce microorganisme est non capsulé, non pigmenté, aérobie, formant des colonies blanches crémeuses. Sa taille mesure entre 3 à 15 µm. Cette levure vit dans des endroits particulièrement chauds et humides du corps humain, elle se nourrit du glycogène, un sucre complexe des cellules épithéliales formant la peau et les muqueuses (YOUCEF-ALI, 2014).

### **I.3.2. Activité antimicrobienne et mode d'action**

Le (Cs) possède une activité antimicrobienne contre un certain nombre de bactéries à Gram négatif et bactéries à Gram positif ainsi que contre plusieurs champignons (LIMAM *et al.* 2011). En neutralisant la charge négative des membranes cellulaires, les microorganismes subissent une inhibition et une destruction (DARAGAN et DINU, 2020).

Le mécanisme exact de l'action antimicrobienne du (Cs) est encore imparfaitement connu, mais différents mécanismes ont été proposés :

- En raison de la nature polycationique du groupe amino(Cs) et des charges électro-négatives dans la surface externe de la membrane bactérienne, une fuite de

divers constituants intracellulaires des microorganismes due à l'altération de la bicouche phospholipidique dans la membrane cellulaire. Celle-ci affecte même la respiration bactérienne (LAI et LIN, 2011).

- Famine microbienne, lorsque le (Cs) agit comme agent chélatant des métaux et des nutriments essentiels affectant le développement microbien.
- Inhibition de la synthèse de l'ARNm et des protéines, liée à la liaison du (Cs) à l'ADN microbien (BOUKHLIFI *et al.* 2018).
- Formation d'un film sur la surface de la culture qui interfère avec la croissance fongique et active plusieurs processus de défense, tels que l'accumulation de chitinase et la synthèse de protéinase (TEIXEIRA *et al.* 2017). En conséquence, ces deux enzymes dégradent la (Ct) et les protéines synthétisées et inhibent la croissance fongique.

#### **I.4. Activité anti-inflammatoire**

L'inflammation est un mécanisme de défense contre les agressions externes (chimiques, biologiques, microbiennes...) ou les lésions cellulaires qui induisent la libération des médiateurs du système immunitaire au site de l'inflammation. Elle est souvent suivie par une dilatation des vaisseaux sanguins permettant la migration de cellules et de certaines molécules du sang vers les tissus où l'agression a été localisée. Ses symptômes classiques sont la rougeur, l'enflure, la chaleur et la douleur. Elle se présente sous deux formes, aiguë (à court terme) ou chronique (à long terme). La plupart des infections ne provoquent que des inflammations aiguës (FERRADJI, 2011 ; DIALLO, 2019).

Pour traiter l'inflammation, différents anti-inflammatoires sont utilisés. En effet, on les définit comme étant des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogène. On parle alors de trois catégories d'anti-inflammatoires : stéroïdiens, non stéroïdiens et naturels.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens représentent la classe thérapeutique la plus utilisée dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antalgique, antipyrétique (contre la fièvre) et anti-agrégant plaquettaire. Le diclofénac est classé au sein de cette classe. Celui-ci bloque la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (prostaglandines, prostacylines et les thromboxanes), et donc diminuent la sensation de douleur et aussi l'inflammation (DIALLO, 2019).

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou les glucocorticoïdes sont des dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que les maladies auto-immunes (TRABSA, 2015). Les glucocorticoïdes sont des hormones lipophiles et peuvent donc traverser la membrane plasmique, puis ils pénètrent dans le noyau cellulaire et se fixent à la molécule d'ADN pour exercer leurs effets anti-inflammatoires. En effet, ils diminuent la migration des macrophages vers le site de l'inflammation, ils suppriment la libération des prostaglandines, des leucotriènes, et les cytokines inflammatoires et ils augmentent la production de la lipocortine (protéine anti-inflammatoire) (HELLAL, 2007).

À cause des effets indésirables des anti-inflammatoires synthétisés (stéroïdiens et non stéroïdiens), les chercheurs étudient de nouvelles molécules biologiques alternatives, efficaces et sans effets secondaires.

Selon MEBIROUK (2017), les organismes marins présentent une source potentielle de molécules biologiques à effet anti-inflammatoire. Il a été établi que le chitosane et ses dérivés ont été utilisés pour leurs activités anti-inflammatoires envers l'inflammation aiguë et chronique. Ils inhibent la synthèse des cytokines inflammatoires (ADNAN *et al.* 2020) et stimulent la libération de chimiokines et de cytokines anti-inflammatoires (FONG, 2016). Bien que ces composés actifs ne soient pas encore des médicaments, ils ont montré une activité anti-inflammatoire par divers mécanismes moléculaires, et représentent des candidats potentiels pour le développement de médicaments anti-inflammatoires (MEBIROUK, 2017).



## **Matériel et méthodes**

L'objectif de ce travail est la valorisation biotechnologique des coproduits de crevettes. Nous avons dans un premier temps procédé à l'identification des espèces de crevettes récoltées aux niveaux des pêcheries de l'algérois et à l'évaluation de leur composition biochimique globale ; puis nous avons réalisé l'extraction de la chitine et du chitosane par deux méthodes l'une chimique et l'autre biologique (enzymatique). Nous avons également déterminé les propriétés physico-chimiques du produit fini (chitosane) ainsi que quelques-unes de ses propriétés pharmacologiques (activité anti-inflammatoire et antimicrobienne).

Ce travail n'est pas l'œuvre d'une seule personne ou une seule institution, c'est le fruit de la collaboration de plusieurs établissements et centres de recherche à savoir l'ENSSMAL, l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), le Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques (LNCPP), le Centre Nationale de Recherche et Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA), le Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) et le Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CNRD).

## **II.1. Matériel**

### **II.1.1. Matériel biologique**

Le matériel biologique utilisé dans le cadre de cette étude est le suivant :

- Carapaces et têtes de crevettes (05 kg).
- Pepsine (Sigma-Aldrich).
- Sérum d'albumine bovine (BSA).
- Micro-organismes pathogènes: *Legionella pneumophila* (souche environnementale) ; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (souche humaine).
- Souris BALB/c de 18- 20g.

### **II.1.2. Matériel non biologique**

Les principaux appareils et réactifs chimiques sont consignés dans le tableau II.1 :

**Tableau II.1 : Matériel et réactifs utilisés.**

Appareillage et petit matériel	Réactifs et produits chimiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agitateur magnétique.</li> <li>- Appareil BRUKER RMN.</li> <li>- Balance de précision.</li> <li>- Bêchers.</li> <li>- Ciseaux.</li> <li>- Congélateur (-20°C).</li> <li>- Creuset.</li> <li>- Dessiccateur.</li> <li>- Eprouvettes graduées.</li> <li>- Etuve.</li> <li>- Four à moufle (Wise therm).</li> <li>- Lecteur Automatique de Microplaque ELx808™.</li> <li>- Mixeur (Kenwood 50/60 Hz ; 750W).</li> <li>- Mortier et pilon.</li> <li>- pH mètre.</li> <li>- Pipettes et micropipettes (2-200µl) (10-100µl (100-1000µl).</li> <li>- Séchoir à ventilation (La Parmigiana).</li> <li>- Spectromètre de fluorescence X : Thermo Fisher Scientific Niton XL3t gold+.</li> <li>- Tamiseuse.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acide Acétique.</li> <li>- Acide sulfurique 95%.</li> <li>- Cristaux de phénol 80%.</li> <li>- Oxyde de deutérium D<sub>2</sub>O.</li> <li>- Eau distillée.</li> <li>- Ethanol absolu.</li> <li>- Ether di-éthylique.</li> <li>- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.</li> <li>- HCl.</li> <li>- NaOH.</li> <li>- Orthophosphate à 85%.</li> <li>- Réactif de Bradford.</li> <li>- Saccharose.</li>   <li>- Xylène 96%.</li> </ul>

## II.2. Echantillonnage et prétraitement

### II.2.1. Collecte de la matière première

Pour la présente étude, les carapaces fraîches des deux espèces de crevettes (*Aristeus antennatus* et *Parapenaeus longirostris*), ont été collectées gratuitement à partir de trois lieux : le restaurant nommé *Spécialité poisson* de Dely Ibrahim, la poissonnerie *Pescadilla* de Birtouta et les poissonneries de la pêcherie d'Alger, pendant une période allant du début du mois de novembre jusqu'à la fin du mois de décembre 2019. Ces espèces ont été pêchées par chalutier dans les côtes Algéroises.

### II.2.2. Prétraitement et traitement des carapaces de crustacés

Après chaque collecte, la matière première est rincée avec de l'eau de robinet afin d'éliminer les impuretés attachées à la carapace (sable, sang...).

Les espèces sont identifiées au laboratoire de l'ENSSMAL à Sidi-Fredj grâce aux critères distinctifs comme c'est décrit dans la fiche FAO (HOLTUIS, 1987). Puis elles sont

congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour les préserver jusqu'au moment de l'utilisation. Avant que les manipulations soient entamées, les échantillons sont décongelés, égouttés, séchés, broyés et tamisés.

Le séchage est une étape cruciale afin d'éviter l'autolyse naturelle (HASSAINIA, 2018). Le séchage s'est déroulé au CNRDPA, dans un séchoir à ventilation réglé à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 10 à 12 heures. Ce séchoir permet de sécher la carapace grâce aux phénomènes de convection et de conduction, éliminant ainsi l'humidité tout en préservant sa valeur. À la fin, l'échantillon est broyé dans un mixeur (Kenwood 750W) afin d'obtenir une poudre fine.

### **II.2.2.1. Granulométrie de la poudre des coproduits de crevettes préparés**

La granulométrie est une étude gravimétrique qui permet de classer la poudre en une poudre fine, moyenne ou grosse. Afin de déterminer sa granulométrie, la poudre de l'échantillon est tamisée dans une série de tamis de diamètres allant de 200 à  $1000\mu\text{m}$ , une poudre fine et homogène est récupérée pour faciliter les différents traitements. Celle-ci est conditionnée dans un bocal propre et hermétique et stockée dans un endroit sec (le dispositif de l'étude granulométrique est figuré en annexe).

## **II.3. Caractérisation biochimique des coproduits de crustacés**

La caractérisation biochimique d'un coproduit est une étape indispensable avant de passer à l'extraction des biomolécules. Elle permet de mettre en évidence la richesse et la diversification d'une carapace en composés à haute valeur ajoutée.

### **II.3.1. Teneur en eau**

- Principe de la méthode

La teneur en eau est déterminée par incubation de l'échantillon dans une étuve à  $105^{\circ}\text{C}$  pendant 24h (AOAC, 1980). Dans ce processus, l'eau s'évapore tout en préservant la matière organique. L'échantillon est pesé à nouveau pour déterminer la quantité d'eau évaporée.

- Mode opératoire

- Peser un creuset vide et tarer à 0.
- Peser 2g d'échantillon frais.
- Placer l'échantillon dans une étuve à  $105^{\circ}\text{C}$  pendant 24h.
- Placer l'échantillon dans un dessiccateur afin de le refroidir sans ré-humidification.
- Repeser le creuset avec l'échantillon à nouveau pour déterminer la quantité d'eau éliminée.

- Lecture

La teneur en eau est obtenue par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100$$

Avec : H% est la teneur en humidité en pourcentage;  $M_0$  est la masse du creuset vide en g ;  $M_1$  est la masse en g du creuset et des échantillons avant séchage ;  $M_2$  est la masse en g du creuset et des échantillons après séchage.

### II.3.2.Teneur en protéines totales

- Principe

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés composants des protéines.

La forme cationique (libre) du colorant est rouge et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 465-470 nm<sup>1</sup>. La forme anionique (liée à une protéine) du colorant est bleue, absorbant à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon (BRADFORD, 1976).

- Mode opératoire

La méthode adoptée est celle de Bradford modifiée. C'est une microméthode qui permet une grande économie des réactifs et des extraits biologiques grâce à l'utilisation des microplaques et du lecteur. Les analyses sont répétées trois fois.

- Préparer une solution de BSA d'une concentration de 1g/l qui sert comme témoin (protéine standard).
- Préparer une solution de l'échantillon à analyser.
- Déposer un volume final de 10µl de la gamme étalon et de l'échantillon dans les puits de la microplaque.
- Ajouter le réactif de Bradford dans chaque puits de la microplaque puis incuber à température ambiante de 5 à 45 minutes.

- Lecture

Lire la concentration en protéines sur le Lecteur Automatique de Microplaque ELx808™ à une absorbance entre 595 et 620 nm. Une courbe étalon ( $A = f[\text{BSA}]$ ) est obtenue. Celle-ci permet de déterminer la teneur en protéines dans l'échantillon.

### II.3.3. Teneur en matières minérales

#### II.3.3.1. Détermination de la teneur totale des carapaces de crevette en matières minérales

- Principe de la méthode

La teneur en matières minérales est déterminée par la méthode référentielle (AOAC, 1999). Elle est basée sur l'incinération de l'échantillon dans un four à moufle à 600°C pendant au moins 4h, jusqu'à calcination complète. La matière perdue est la matière organique qui rentre en combustion à partir de 375°C, tandis que la matière minérale se précipite sous forme de cendres blanches (EL SOHAIMY *et al.*2015).

- Mode opératoire

- Peser le creuset vide dans une balance à précision  $10^{-6}$ .
- Peser 2g d'échantillon sec dans un creuset.
- Placer le creuset dans un four à moufle à température 600°C, pendant 4h.
- Placer le creuset dans un dessiccateur pour refroidir sans ré-humidification.
- Repeser le creuset avec l'échantillon à nouveau.

- Lecture

La teneur en cendres est obtenue par la formule suivante :

$$C\% = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \times 100$$

Avec : C% est la teneur en cendres ;  $M_0$  est la masse du creuset vide en g ;  $M_1$  est la masse du creuset et des échantillons avant incinération en g ;  $M_2$  est la masse en g du creuset avec les cendres.

#### II.3.3.2. Détermination de la composition et la concentration des matières minérales contenues dans les carapaces de crevettes

- Principe

La révélation des minéraux présents dans notre échantillon ainsi que leurs concentrations massiques est mise en évidence par la spectrométrie de fluorescence X. Celle-ci est une technique d'analyse élémentaire globale permettant d'identifier et de

déterminer la plupart des éléments chimiques qui composent un échantillon parmi eux les minéraux même à une faible concentration.

Une fois l'échantillon à analyser placé sous un faisceau de rayons X, il passe de son état fondamental à un état excité et instable. Alors, les atomes tendent à revenir à l'état fondamental en libérant de l'énergie, sous forme de photons X (THIRION-MERLE, 2016).

- Mode opératoire
  - Mettre l'échantillon à analyser dans l'appareil et le soumettre à des rayons X.
- Lecture

Chaque atome, ayant une configuration électronique propre, va émettre des photons d'énergie et de longueur d'onde déterminée. L'analyse par rayonnement X permet à la fois de connaître la nature des éléments chimiques présents dans l'échantillon ainsi que leurs concentrations massiques. Les concentrations sont exprimées en (g/kg).

### **II.3.4. Teneur en lipides totaux**

- Principe de la méthode
 

La teneur en lipides est mesurée par la méthode référentielle (Soxhlet 1879). L'échantillon en poudre est pesé dans une cartouche en cellulose. Puis il est mis au contact de l'éther di-éthylique qui présente une polarité pour les acides gras. Par chauffage à 60°C pendant 4h, le solvant s'évapore : il passe par la cartouche en cellulose contenant l'échantillon et dissout les lipides. En contact avec le réfrigérateur, la goutte du solvant contenant la matière grasse se condense et retombe dans le ballon. Comme seul le solvant peut s'évaporer, le cycle se renouvelle et la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète (le dispositif d'extraction est figuré en annexe). Une fois celle-ci terminée, l'éther est évaporé grâce à un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée à nouveau (DE BOER, 1988 ; LUQUE DE CASTRO et GARCÍA-AYUSO, 1998).
- Mode opératoire
  - Peser 2g d'échantillon dans une cartouche en cellulose.
  - Peser les ballons vides.
  - Prévoir un blanc qui ne contient que le solvant (éter di-éthylique).
  - Déposer les cartouches dans le matras.
  - Verser 160 ml d'éther di-éthylique dans le ballon.

- Régler la température à 60°C pendant 4 heures.
- Placer les ballons au rota-vapeur afin d'éliminer totalement le solvant.
- Placer les ballons dans une étuve à 37°C pour stabiliser les lipides, puis refroidir dans un dessiccateur pendant 20 minutes.
- Peser les ballons à nouveau pour déterminer la matière grasse.
- Lecture

La teneur en lipides est exprimée par la formule suivante :

$$L\% = \frac{P1 - P0}{P0} \times 100$$

Avec : L% est la teneur en lipides ; P0 est le poids du ballon avant extraction ; P1 est le poids du ballon après extraction.

### II.3.5.Teneur en sucres totaux

- Principe de la méthode

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode modifiée de DUBOIS *et al.* (1956) dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la manifestation de composés glucidiques. Ces derniers se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

- Mode opératoire
- Préparer une série de tubes avec des volumes finaux égaux mais à différentes concentration de saccharose puis ajouter le phénol à 80% et l'acide sulfurique.
- Incuber pendant 30minutes à 30°C dans l'étuve.
- Lecture

L'absorbance des différentes concentrations de saccharose dans les tubes est mesurée par spectrophotométrie UV-visible à 490nm.

Les valeurs d'absorbance obtenues permettent de tracer une courbe étalon (A= f [sucres totaux]). Cette proportionnalité permet de déterminer la teneur en sucres libres dans l'échantillon.

## II.4. Extraction de la chitine

### II.4.1. Extraction de la chitine par voie chimique

L'extraction de la chitine par voie chimique est établie par plusieurs auteurs et dans différentes conditions. Un traitement acide est recommandé pour éliminer les minéraux (démminéralisation), un traitement alcalin pour éliminer les protéines (déprotéinisation) et un traitement oxydant pour éliminer les pigments (blanchiment). Le protocole de l'extraction de la chitine dans le présent travail se base sur une multitude d'études menées par plusieurs auteurs (figure II.1).

#### II.4.1.1. Démminéralisation

- Principe

La démminéralisation consiste à éliminer la fraction minérale, le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) principalement. Elle est basée sur le chauffage de l'échantillon dans un acide (HCl), pendant un temps déterminé.

- Mode opératoire (KURITA, 2006)

- Préparer une solution de HCl (1N), et ajouter à l'échantillon avec un ratio de 1:10 (p/v, g/ml) dans un ballon.
- Chauffer le ballon pendant 1 heure à 70°C.
- Laver le produit obtenu avec de l'eau distillée à plusieurs reprises jusqu'à neutralité du pH.
- Sécher dans une étuve à 105°C pendant 48 h.

#### II.4.1.2. Déprotéinisation

- Principe

La chitine est intimement liée aux protéines d'où le nom chitinoprotéines. Un traitement alcalin peut décomposer l'albumine et les acides aminés, libère la chitine et favorise son extraction.

- Mode opératoire (NO et MEYERS, 1995)

- Mélanger l'échantillon démminéralisé avec du NaOH (2,5 N) au ratio 1:10 (p/v, g/ml).
- Chauffer le mélange pendant 06 heures à 70 °C dans un chauffe ballon.
- Laver le produit obtenu avec de l'eau distillée à plusieurs reprises jusqu'à neutralité du pH.
- Sécher dans une étuve à 50°C pendant 24 heures.

### II.4.1.3. Décoloration

- Principe

Le blanchiment de la chitine est une étape facultative pour enlever les pigments. Elle est réalisée seulement pour la chitine extraite par voie chimique, souvent par un traitement oxydant et le produit final est de couleur gris-beige.

- Mode opératoire (ONSØYEN et SKAUGRUD, 1990)

- Mélanger la poudre obtenue avec du  $H_2O_2$  (2,5N) avec un ratio de 1/10 (p/v; g/ml) à 30°C, pendant 3 heures.
- Filtrer et laver le mélange plusieurs fois avec de l'eau distillée pour éliminer les composants restants afin d'obtenir un milieu neutre.
- Sécher le produit dans une étuve à 70°C, pendant 24h.

### II.4.2. Extraction de la chitine par hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique a été réalisée avec la pepsine, enzyme gastrique qui catalyse les liaisons peptidiques. Ce qui conduit à la solubilisation des protéines et à la libération de la chitine. Cette voie d'extraction est plus douce que la voie chimique et aboutit à un produit final de bonne qualité nutritionnelle. Néanmoins, elle présente un taux élevé de protéines résiduelles ce qui influe sur les activités biologiques du chitosane; des traitements chimiques supplémentaires sont recommandés pour la purifier (NGUYEN, 2009). Dans cette étape, la déminéralisation suit les mêmes instructions que celles du processus chimique.

#### II.4.2.1. Déprotéinisation

- Homogénéiser les coproduits déminéralisés avec de l'eau distillée avec un ratio de 1/5 (p/v, g/ml) à 40°C avec un pH maintenu à 2 (avec du HCl (2N) pendant 20 min.
- Ajouter l'enzyme Pepsine à raison de (0,3%) et laisser agiter pendant 3h (stabilisation du pH à 2).
- Inactiver l'hydrolyse par neutralisation du milieu en ajoutant du NaOH (5N).

### II.5.Extraction du chitosane par désacétylation

- Principe

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine ce qui consiste à enlever suffisamment de groupes acétyles ( $CH_3-CO$ ). Cette opération libère les groupes ( $NH_2$ ) pour que le (Cs) soit soluble. Différentes méthodes sont décrites dans la littérature.

Dans la présente étude, un chauffage de la chitine dans une solution alcaline concentrée est réalisé (figure II.1)

- Mode opératoire (YEN *et al.* 2009)
  - Chauffer la chitine à 105 °C, dans une solution de NaOH (10 N) selon un ratio de 1/20 (p/v, g/ml), pendant 4 heures.
  - Filtrer et laver le chitosane produit afin d'éliminer la soude résiduelle et ce jusqu'à neutralité du pH puis étuver à 50 °C pendant 12 heures.

### **II.5.1. Rendement en masse de la chitine et du chitosane**

La masse de la chitine est calculée par différence de poids entre l'échantillon initial et l'échantillon débarrassé des minéraux, des protéines et des pigments. Tandis que le rendement en chitosane est le poids obtenu après désacétylation sur le poids de l'échantillon initial.

## **II.6. Caractérisation du chitosane**

Pour caractériser le chitosane obtenu : les taux de minéraux et de protéines ont été déterminés comme déjà cité ci-dessus ; nous avons aussi procédé à sa solubilisation dans un acide dilué, à la détermination de son degré de désacétylation par dosage potentiométrique ainsi qu'à son identification par méthode RMN.

### **II.6.1. Solubilisation du chitosane**

Le chitosane en poudre (01g) est dissout dans 100 ml d'acide acétique (1%) et mis sous agitation constante pendant une nuit à température ambiante jusqu'à sa solubilisation.

### **II.6.2. Caractérisation biochimique du chitosane**

La caractérisation biochimique du chitosane implique la détermination du taux de minéraux et du taux de protéines résiduels par les méthodes décrites ci-dessus.

### **II.6.3. Détermination du degré de désacétylation du chitosane**

- Principe

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré d'acétylation (DA). Le degré d'acétylation représente le taux du groupe acétylé par rapport au groupe non acétylé. Il peut être déterminé par un titrage à partir d'une base. La frontière entre chitosane et chitine correspond à un DA de 50%, en deçà le composé est nommé chitosane et au-delà, chitine (ARANAZ *et al.* 2009).

- Mode opératoire
  - Mélanger 0.1g du chitosane avec 25 ml de HCl (0,06N) et bien agiter à température ambiante durant une heure.
  - Ajuster avec l'eau distillée à 50 ml.
  - Titrer ce mélange par NaOH (0,1N) jusqu'à un pH= 3,75 ( $V_1$ ) et continuer à titrer jusqu'à un pH de 8 ( $V_2$ ).

- Lecture

Le degré d'acétylation et de désacétylation du chitosane est calculé par la formule suivante :  $DA = 203 \times \frac{V_2 - V_1}{m + 42(V_2 - V_1)}$  et  $DD(\%) = 1 - DA(\%)$ .

Avec : DA : degré d'acétylation ; DD : degré de désacétylation ;  $V_2$  et  $V_1$  : volumes équivalents de NaOH ; m : masse de chitosane (g) ; 203 (g/mol) : masse moléculaire du monomère acétylé ; 42 (g/mol) : différence entre la masse moléculaire du monomère acétylé et la masse moléculaire du monomère désacétylé.

#### II.6.4. Mesure du degré de désacétylation par résonance magnétique nucléaire RMN

- Principe

La RMN  $^1\text{H}$  peut être utilisée pour identifier le chitosane via un déplacement chimique particulier des protons. Elle ne nécessite pas de courbe d'étalonnage ni de standards et n'est pas affectée par la teneur en eau (BUSCHMANN *et al.* 2013). Cette technique, permet de déterminer la structure d'une molécule organique mettant en jeu les atomes d'hydrogène. En exposant l'échantillon à un champ magnétique, les atomes d'hydrogène s'excitent et puis retournent à l'état initial tout en apparaissant sous forme de pics sur un graphique (spectre) (AUDAT, 2013). L'analyse du spectre obtenu par RMN permet de déterminer avec précision le DD du chitosane (LE DEVEDEC, 2008).

- Mode opératoire

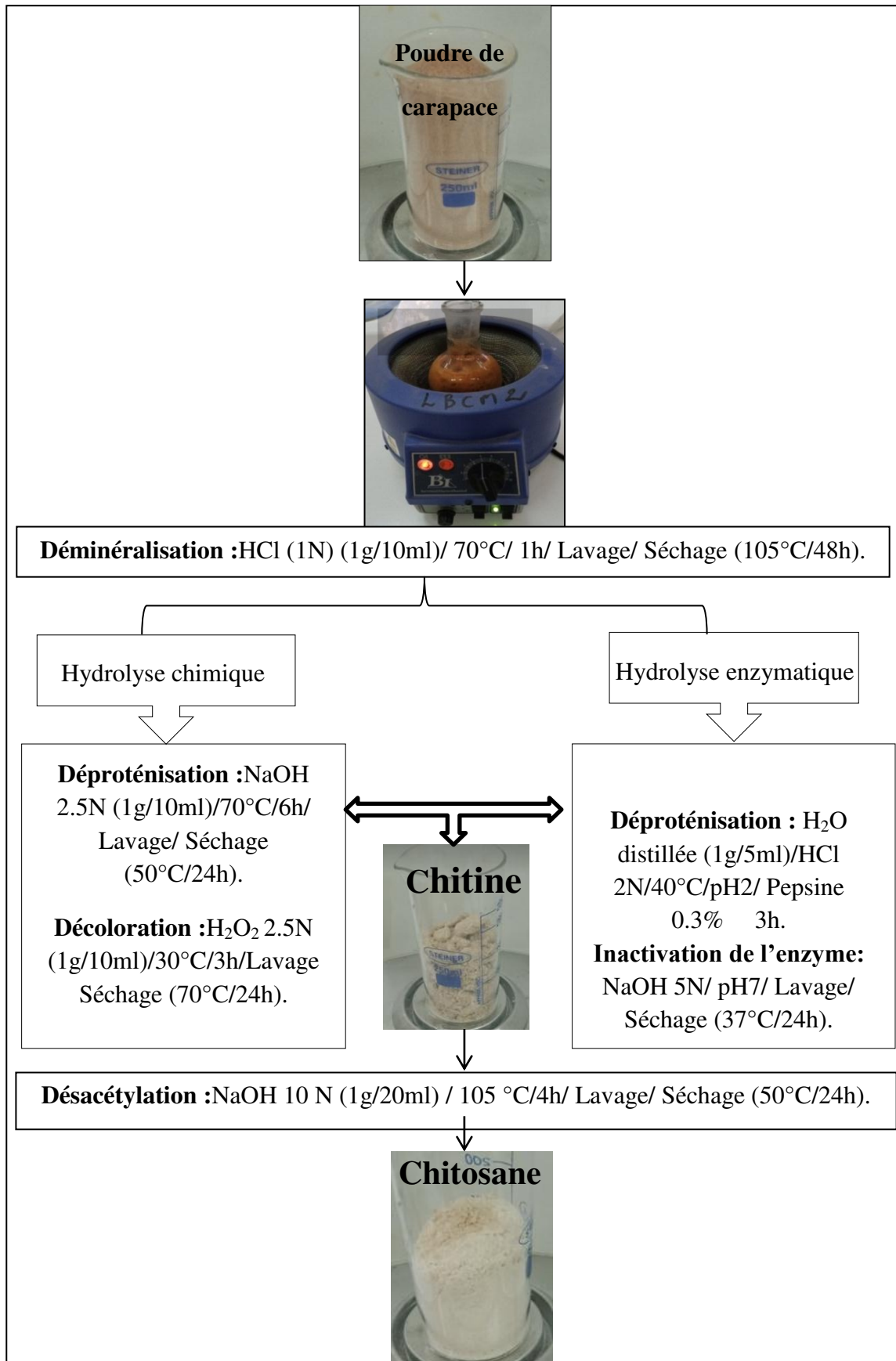
- Préparer une solution de 5 mg du chitosane dans 600  $\mu\text{l}$  d'oxyde de deutérium ( $\text{D}_2\text{O}$ ) et chauffer jusqu'à obtention d'une solution homogène.
- Soumettre l'échantillon à un champ magnétique dans un appareil BRUKER de 400MHz à 70°C.

- Lecture

Le DD est évalué à partir de l'intégration des intensités des pics correspondant au groupement méthyle de la N-acétylglucosamine et de celle des protons H2 à H6 du cycle glucosidique selon l'équation :

$$DD\% = 1 - \frac{\frac{1}{3} \times I_{HAc}}{\frac{1}{6} \times I(H2 - H6)} \times 100$$

Où :  $I_{HAc}$  est l'intensité intégrale de du pic correspondant aux protons du groupement acétyle ( $CH_3$ ) ;  $I(H2-H6)$  est la somme des intensités intégrées des protons H2, H3, H4, H5et H6 (VO, 2013).



**Figure II.1 : Diagramme d'extraction de la chitine et du chitosane à partir des carapaces des crevettes** (KEFIL S, 2020).

## II.7. Détermination des propriétés pharmacologiques du chitosane

### II.7.1. Détermination de l'activité antimicrobienne du chitosane

Cette étape a été réalisée à l'IPA

#### II.7.1.1. Revivification des souches

Le renouvellement et l'enrichissement sont effectués par ensemencement des souches pathogènes dans un bouillon approprié et l'incubation se fait dans des conditions optimales de croissance jusqu'à l'obtention d'une culture jeune en phase exponentielle. Toutes les souches ont été cultivées au moins trois fois avant l'expérience :

- La revivification des souches de *L.pneumophila* conservées dans des cryotubes à -20C° se fait par l'ensemencement de ces dernières sur gélose BCYE et incubation à 37C° pendant 3 à 10 jours.
- Les autres bactéries conservées dans des tubes de conservation ont été réactivées en bouillon BHIB et incubées à 37°C pendant 24h puis ensemencées par la méthode d'épuisement de charge (méthode des quadrants) sur gélose Muller Hinton, et incubées ensuite à 37°C pendant 24h pour s'assurer de leurs puretés.

#### II.7.1.2. Essai de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion sur disques

- Principe de la méthode

La méthode de diffusion, très utilisée en microbiologie (antibiogramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle). L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (ABABSA, 2012). Quatre souches pathogènes ont été testées : une souche environnementale *Legionella pneumophila* (Gram-), une souche ATCC 25922 *Escherichia coli* (Gram-) et une souche ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* (Gram+). Ainsi qu'une souche fongique d'origine humaine *Candida albicans*.

- Mode opératoire

- Préparer des suspensions bactériennes de densité 0.3Mc Farland dans de l'eau physiologique.
- Etaler à l'aide d'un écouvillon les suspensions, sur BCYE pour la souche de légionelles et sur MH pour les autres souches. .

- Imbiber des disques stériles par 80  $\mu$ l de la solution chitosane et les déposer sur la gélose.
- Incuber à 37 °C, les lectures seront faites après 48h pour les légionelles et 24h pour les autres germes.

- Lecture

L'activité antimicrobienne a été évaluée en déterminant les diamètres (en mm) de la zone d'inhibition de croissance nette autour des disques.

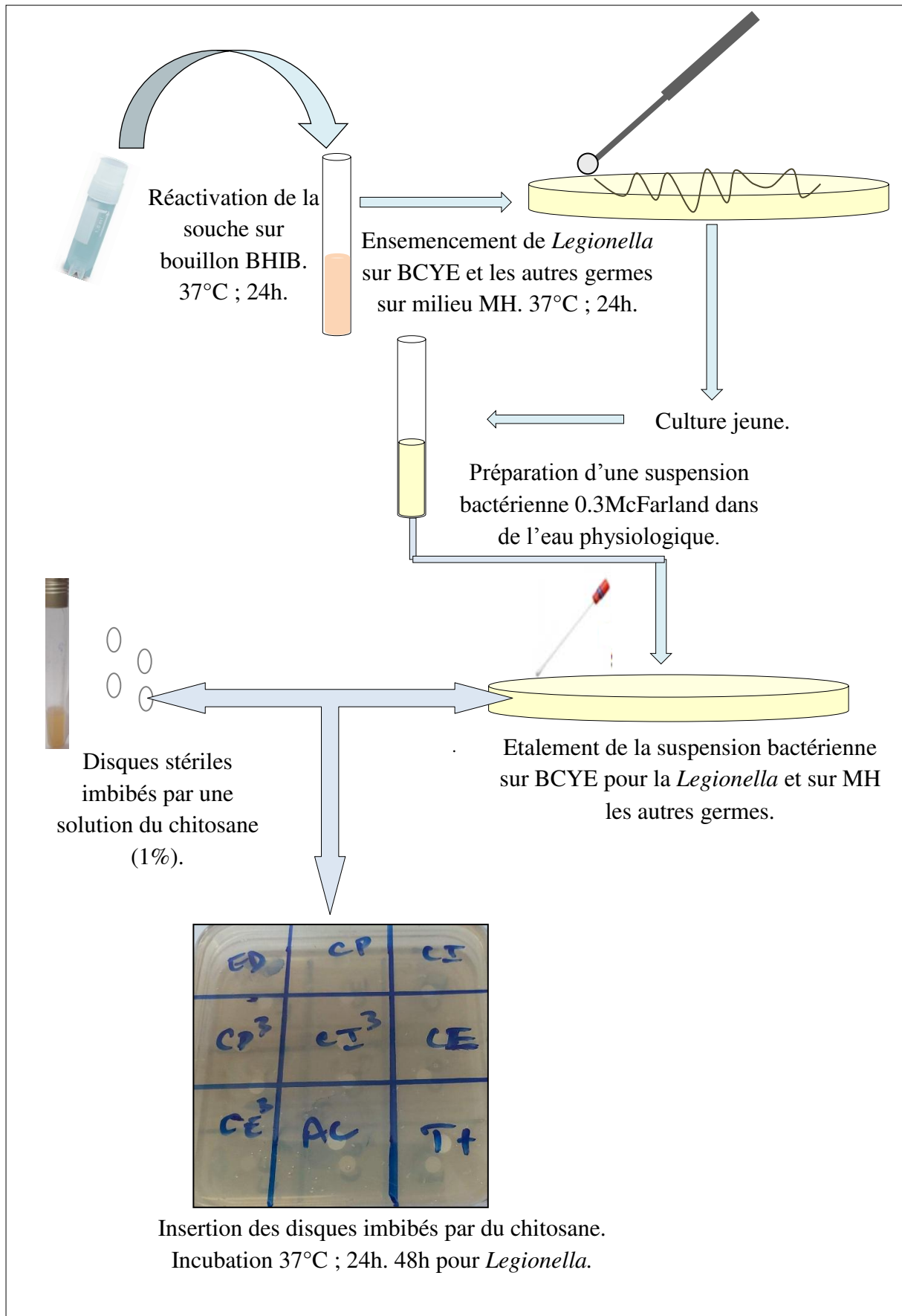


Figure II.2 : Schéma récapitulatif de l'activité antimicrobienne (KEFIL S, 2020).

### I.7.2. Activité anti-inflammatoire

Cette étape a été réalisée au LNCPP

- Principe

L'œdème de l'oreille est induit par le xylène à 96% agent irritant. En pratique chaque souris (n=10) reçoit localement par injection une solution de chitosane à 1% sur la face interne de l'une de ses deux oreilles. Quatre heures après, une inflammation cutanée est alors induite sur la même oreille, par injection de 30µl de xylène. Un groupe témoin négatif (n=10) ne reçoit que le xylène, un autre groupe témoin positif (n=10) reçoit un traitement par diclofénac 1% et du xylène. Un autre lot (n=10) est traité par un placebo (dans ce cas l'huile de tournesol qui a servi à la suspension du chitosane). L'anti inflammation est estimée par la différence de poids entre l'oreille traitée et celle non traitée (L'élimination d'œdème se manifeste par une différence de poids légèrement élevée, voire nulle entre les deux oreilles (traitée et non traitée)).

- Mode opératoire (Figure II.3)

- Prendre un lot de 10 souris d'une même race (BALB/c), du même sexe (mâles ou femelles) et d'un poids de 20± 2g.
- Appliquer 100µl du chitosane 1% au niveau de l'oreille (gauche ou droite) de chaque souris et laisser les pendant 1h.
- Appliquer 30µl de xylène (qui va provoquer l'inflammation) au niveau de la même oreille sur laquelle l'échantillon a été appliqué, et laisser les pendant 4h.
- Sacrifier les souris dans un bain d'éther de pétrole 95%, puis couper délicatement deux disques de chaque oreille (traitée et non traitée) pour peser et noter la différence de poids.

- Lecture

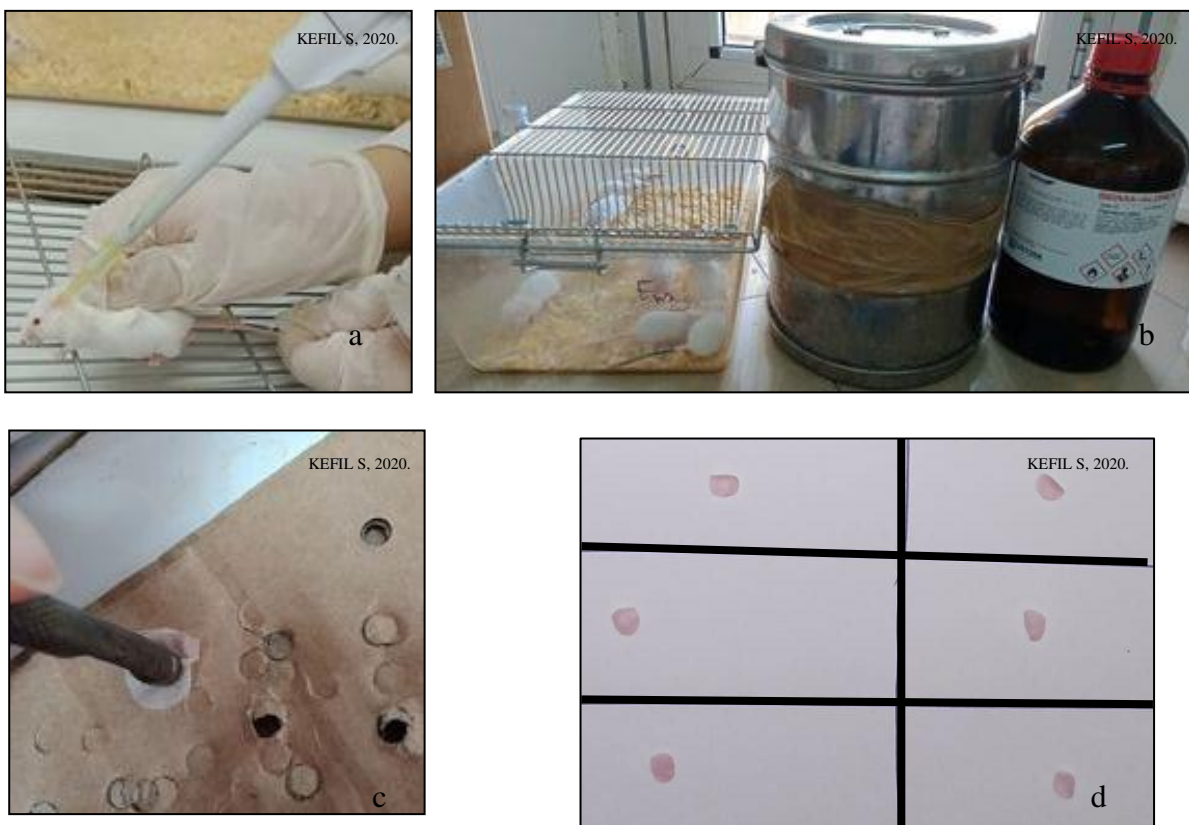
L'estimation de l'élimination d'œdème est déterminée par le calcul du potentiel d'inhibition de l'œdème et par test statistique T (Test de Student) qui permet de comparer deux pourcentages (dans ce test, le groupe témoin négatif est toujours comparé à un autre lot traité par un produit donné).

- ❖ Le calcul du potentiel d'inhibition de l'œdème (PIO) est calculé par la formule suivante :

$$PIO\% = \frac{\text{Moy Diff témoin} - \text{Moy Diff essai}}{\text{Moy Diff témoin}} * 100$$

Avec : MoyDiff témoin : la moyenne des différences de poids entre oreille traitée et non traitée du lot témoin ; MoyDiff essai : la moyenne des différences de poids entre oreille traitée et non traitée du lot essai.

- ❖ Le test T ou test de Student est un test statistique permettant de comparer les moyennes de deux groupes d'échantillons. Il s'agit donc de savoir si les moyennes des deux groupes sont significativement différentes au point de vue statistique. L'emploi de ce test reste subordonné en général à deux conditions d'application importantes qui sont la normalité et le caractère aléatoire et simple des échantillons. La première condition n'est toutefois pas essentielle lorsque les échantillons ont des effectifs suffisants (en pratique, la valeur de 30 est souvent retenue) pour assurer la quasi-normalité des distributions d'échantillonnage des moyennes (ZARROUK, 2012). Dans le présent test, un lot traité par un produit donné est constitué de 10 souris pour des raisons économiques.



**Figure II.3 : Etapes du test anti-inflammatoire. a : Injection cutanée de la souris (xylène après une heure de l'injection du chitosane). b : Sacrifice des souris dans un bain d'éther de pétrole (95%). c : Récupération des disques d'oreilles. d : Pesée des disques (oreille traitée à gauche, oreille non traitée à droite).**



## **Résultats et discussion**



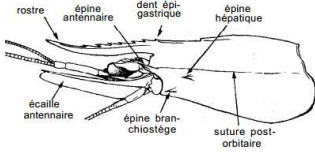
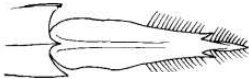
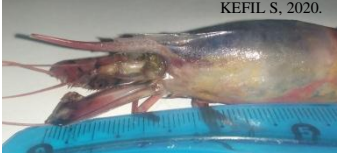



Les coproduits issus de la transformation des crustacés sont une mine de composés à haute valeur nutritive et fonctionnelle. En général, les exosquelettes contiennent une quantité considérable de protéines, de minéraux, de chitine ainsi que d'autres composés tels que les lipides et les pigments. Cette richesse en éléments précieux, rend la valorisation biotechnologique et l'utilisation de ces sous-produits dans plusieurs domaines une préoccupation majeure (BRÜCK *et al.* 2011).

Dans la présente étude et compte tenu des conditions défavorables causées par la pandémie du Covid-19, nous avons réussi à réaliser une bonne part des tâches que nous avons programmées, à savoir la détermination et la mise en évidence des différents composants biochimiques des coproduits de crevettes, l'extraction de la chitine et du chitosane et la caractérisation physico-chimique de ce dernier ainsi que l'évaluation de son activité antimicrobienne et anti-inflammatoire.

### **III.1. Identification des espèces**

D'après les résultats illustrés dans le tableau III.1, et en référant à la fiche FAO (HOLOTUIS, 1987) ; on remarque que les deux espèces présentent un corps lisse et mou avec la présence de petites pinces aux trois premières paires de pattes. Tandis, qu'on remarque une coloration rouge pâle avec un rostre légèrement dentée chez *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) ; et une couleur rose orangée avec un rostre recourbé en haut avec 8 dents, ainsi qu'un telson se terminant par 3 grandes dents, aiguës et fixes chez *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846). Ce qui concorde avec la littérature, notamment sur la fiche présentée par (HOLOTUIS, 1987).

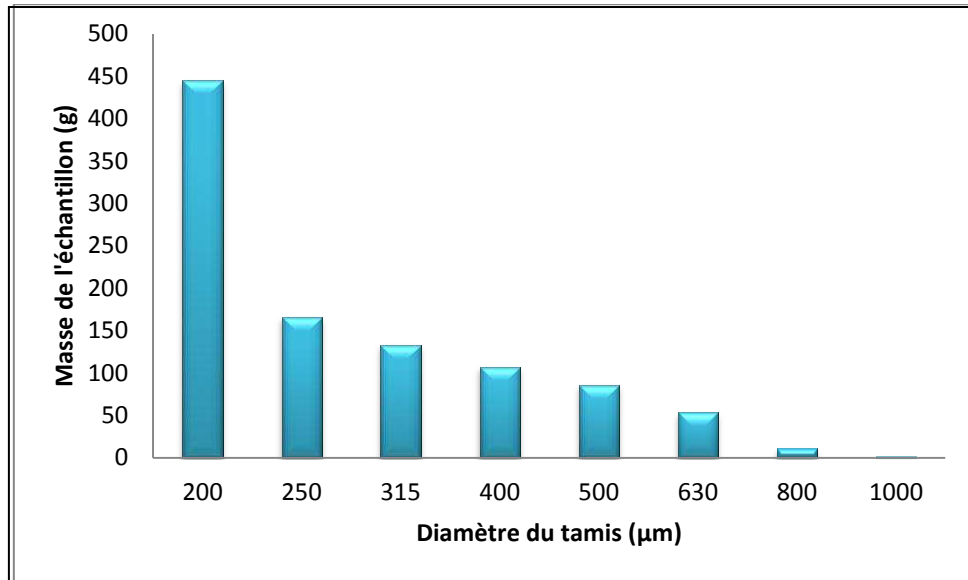
**Tableau III.1 : Caractères d'identification des deux espèces de crevettes utilisées.**

Espèce utilisée	Identification par FAO (HOLOTUIS, 1987)	Caractères distinctifs
  <p><i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846)</p>	 <p>Tête</p>  <p>Telson</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Corps glabre dépourvu de soies.</li> <li>- Rostre a 8 dents.</li> <li>- Taille comprise entre 10 à 16cm.</li> <li>- Présence de suture post orbitaire, épines hépatique, antennaire et branchiostège.</li> <li>- Telson se terminant par 3 grandes dents, aiguës et fixes.</li> <li>- Coloration rose orangée.</li> </ul>
  <p><i>Aristeus antennatus</i> (Risso, 1816)</p>	 <p>Tête</p>  <p>Telson</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rostre armé de 3 dents présentant un dimorphisme sexuel (court chez le mâle, très long chez la femelle).</li> <li>- Taille comprise entre 10 à 22 cm.</li> <li>- Carapace sans épine hépatique.</li> <li>- Telson long, très étroit, comprimé latéralement, terminé en pointe.</li> <li>- Coloration rouge pâle avec une tonalité bleuâtre sur la carapace.</li> </ul>

### III.2. Granulométrie de la poudre des coproduits de crevettes préparés

Le broyage et le tamisage de la poudre de l'échantillon biologique (coproduits de crevettes) ont donné des particules d'un diamètre variant majoritairement entre 200 et 1000  $\mu\text{m}$ . La distribution de la granulométrie est présentée sur l'histogramme ci-après (figure III.1). Les différents essais ont été réalisés sur 400g de poudre avec un diamètre de 200  $\mu\text{m}$ . Cela peut faciliter la dissolution des minéraux lors de la déminéralisation et favoriser l'extraction de la chitine qui est aussi intimement liée aux complexes protéiques. En effet, plus la poudre est fine, meilleure sera la caractérisation de la composition biochimique des coproduits de crevettes et l'extraction de la chitine.

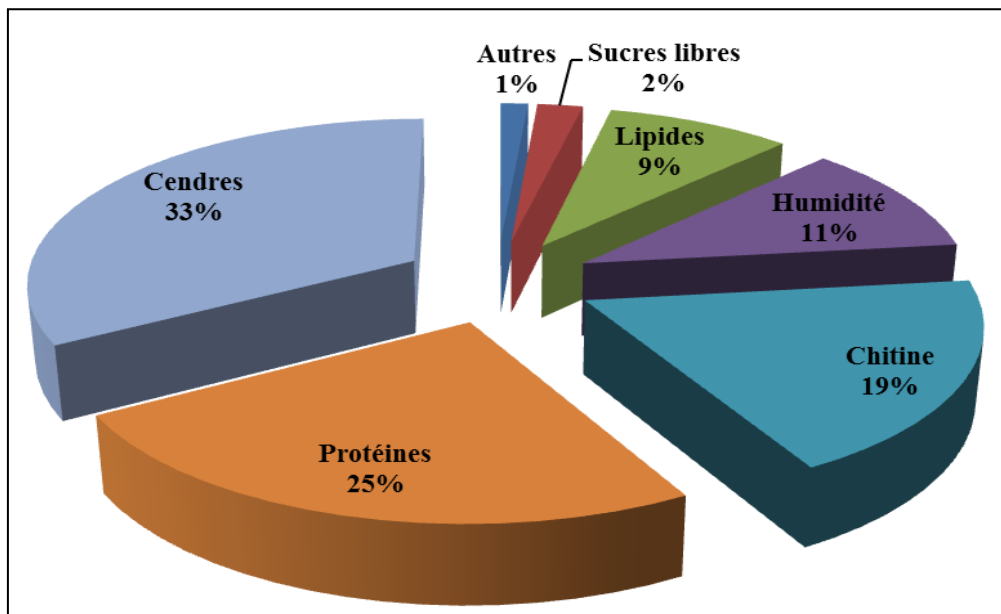
DUVAL (2008), au cours de la valorisation des carapaces de la crevette nordique, a réalisé l'extraction de la chitine à partir d'une poudre présentant une granulométrie qui variait entre 200 et 250 $\mu\text{m}$ .



**Figure III.1 : Détermination de la granulométrie et de la fraction dominante dans le broyat de carapace de crevettes.**

### III.3. Composition biochimique des coproduits de crevettes

Les résultats de la caractérisation biochimique des carapaces et des têtes de crevettes sont présentés sur la figure III.2 et comparés à d'autres travaux dans le tableau III.2.



**Figure III.2 : Composition biochimique globale des coproduits de crevettes exprimés en (%) par rapport au poids sec.**

**Tableau III.2: Données comparatives de composition biochimique des coproduits des crevettes.**

Composition (%)	Présente étude	(OULHIZ, 2018)	(BOUALEM et HOCINE, 2018)
Humidité	10.5	10.9± 0.09	9
Cendres	32.6	28.09± 0.52	14.89
Protéines	24.26	30.63± 2.01	13.12
Chitine	18.46/ 24.54	20.45	16.1
Lipides	8.7	3.22± 2.04	9.2
Sucres libres	2.14	/	/

**III.3.1.Teneur en eau**

Au regard du tableau III.2 et de la figure III.2 ci-dessus, le taux d'humidité enregistré dans les carapaces de crevette se rapproche de celui obtenu par OULHIZ (2018) avec 10.9% et par BOUALEM et HOCINE (2018) avec 9%, notons que ces deux études n'ont porté que sur une seule espèce (*A. antennatus*), cependant le séchage pour les trois études a été mené à une température allant de 35 à 37°C.

**III.3.2.Teneur en protéines totales**

Le taux de protéines, estimé par la méthode de Bradford (micro-méthode), est de 24,6 %, ce qui indique que les coproduits de crevette utilisés dans cette étude constituent une bonne source en protéines. On remarque aussi que ces taux sont largement supérieurs à ceux obtenus par BOUALEM et HOCINE (2018), qui sont de l'ordre de 13.12%.

Cette différence peut s'expliquer comme nous l'avons mentionné plus haut, par le fait que dans leur étude BOUALEM et HOCINE n'ont utilisé que les carapaces sans les têtes de (*A. antennatus*). Il est admis que les têtes de crevettes sont riches en protéines.

Selon RANDRIAMAHATODY (2011), ces petits organismes marins sont une source précieuse de protéines et peuvent être des fournisseurs d'acides aminés essentiels qui sont incorporés dans l'alimentation humaine et animale.

Néanmoins, ces teneurs varient selon l'espèce, l'âge, la zone de pêche et les méthodes de transformation (ÖZOGUL *et al.* 2018).

En général les coproduits de crevettes présentent un taux moyen en protéines allant de 20% à 40% du poids sec. Par ailleurs, les taux ( $30.63 \pm 2.01$ ), rapportés par OULHIZ (2018), sont plus élevés que ceux obtenus dans le cadre de cette étude. Cela pourrait s'expliquer par les différences d'âge et de taille des individus collectés, du régime alimentaire, de la période et de la zone de pêche.

### **III.3.3. Teneur en matières minérales**

La teneur en matières minérales est estimée après incinération de la poudre de carapaces à 600°C pendant 4h. Au regard des résultats présentés sur le tableau III.2 et la figure III.2 ci-dessus, on constate que la matière minérale de l'échantillon analysé est de 32.6% par poids sec. Ce pourcentage reste plus élevé que celui trouvé par BOUALEM et HOCINE (2018) qui est de 14.89%. Cette richesse en matière minérale est peut-être due au phénomène de la mue. Lorsque l'organisme se met à changer son ancienne cuticule, la nouvelle carapace sécrétée est molle et souple. Cette dernière absorbe les sels minéraux dissouts dans l'eau pour se renforcer et devenir rigide à la phase adulte. L'eau, le calcium, le phosphate et les carbonates sont absorbés à travers la couche externe de l'épicuticule. Par conséquent l'exosquelette est biominéralisé et devient plus robuste (MAI, 2014). Ces minéraux peuvent être utilisés comme constituants de haute valeur nutritionnelle humaine et animale (HAMED *et al.* 2016).

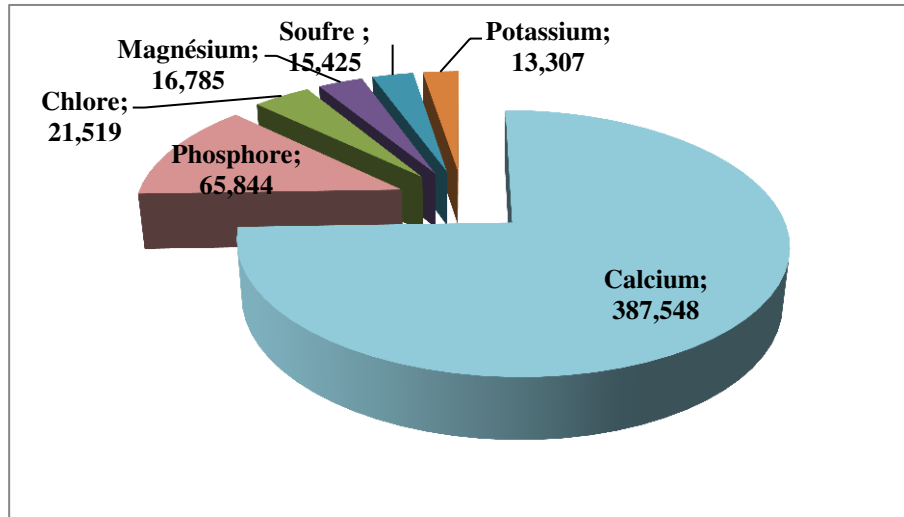
Les résultats présentés dans la littérature indiquent que les coproduits de crevettes peuvent présenter une teneur en cendres allant de 20 à 50% (BRÜCK *et al.* 2011 ; OULHIZ, 2018).

#### **III.3.3.1. Composition et concentration des minéraux contenus dans les coproduits des crevettes étudiées**

Comme l'indique la figure III.3 ci-dessous, les minéraux contenus dans la carapace des deux espèces étudiées, sont constitués en première position de calcium, élément minéral majeur de l'exosquelette avec une masse de 387.548 g/kg. Le phosphore vient en deuxième position avec une masse de 65.844 g/kg. Ces deux éléments principaux permettent la calcification de la cuticule (OULHIZ, 2018). Parmi les autres minéraux présents mais en moindre abondance, on trouve : le chlore, le magnésium, le soufre et le potassium avec les masses respectives (21.519 ; 16.785 ; 15.425 ; 10.307 g/kg).

Cette composition fait de la cuticule de crevette une mine d'éléments minéraux et une source intéressante de calcium et de phosphore. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par RANDRIAMAHATODY (2011).

Néanmoins, son échantillon présentait un taux considérable en sodium (Na) avec absence du chlore et du soufre. Cela est justifié par la différence de l'environnement et de l'espèce étudiée (*Penaeus mondon* de Madagascar).



**Figure III.3 : Composition et concentration en quelques éléments minéraux des carapaces de crevettes (exprimées en g/kg du poids sec).**

#### III.3.4. Teneur en lipides totaux

La teneur en lipides enregistrée au cours de cette étude (9.2%) est similaire à celle rapportée par BOUALEM et HOCINE (2018) (8.7%). Par contre, elle est supérieure à celle révélée par OULHIZ (2018), (3.2 %± 2.04).

Selon la littérature, les lipides sont présents en fraction mineure dans la carapace de crevette (allant de 0.1 jusqu'à 25%). Cela peut varier en fonction des différences saisonnières, de l'abondance des proies qu'elles consomment, de la profondeur, du sexe et de la taille du spécimen (ROSA et NUNES, 2003 ; KAPIRIS et THESSALOU-LEGAKI, 2011). Une faible teneur en lipides indique que la femelle consomme toutes ces réserves en matière grasse pour assurer la maturation des ovaires afin de se reproduire. Ce phénomène se passe en été (période principale de ponte).

#### III.3.5. Teneur en sucres totaux

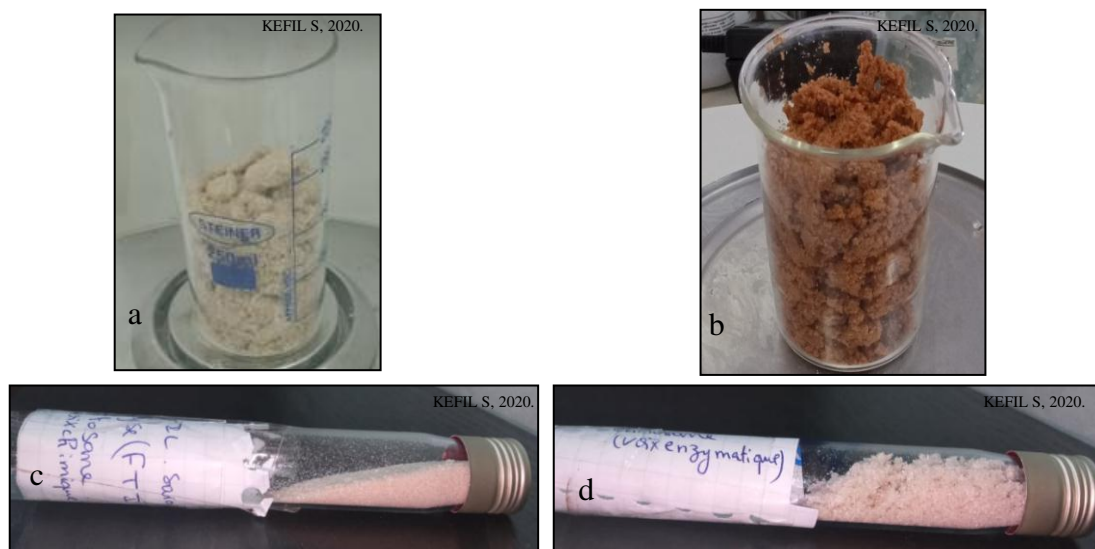
La concentration en sucres totaux est déterminée par la méthode référentielle de (DUBOIS, 1956) modifiée. On constate que l'échantillon analysé est pauvre en sucres libres

(2.14%) ; malgré sa teneur moyenne en chitine qui est un polysaccharide. Dans la littérature, notamment les études menées par RANDRIAMAHATODY (2011) et OULHIZ (2018), la teneur en sucres totaux est négligeable car ils sont combinés et intimement liés aux protéines, sous formes de chitine, pour former des complexes chitino-protéiques. La méthode colorimétrique de Dubois ne révèle que les sucres libres dans l'échantillon analysé.

### III.4. Chitine et chitosane extraits par méthodes chimique et enzymatique

#### III.4.1. Aspect de la chitine et du chitosane obtenus par voies chimique et enzymatique

On remarque que les deux produits de chitine se présentent sous forme de poudre inodore et sans saveur. Néanmoins, comme le montre la figure III.4 ci-dessous, la chitine extraite par voie enzymatique a préservé sa couleur brunâtre par contre celle extraite par voie chimique est blanchâtre, cela est dû au blanchiment (étape négligée dans le procédé enzymatique) et aux conditions drastiques exercées sur la poudre lors de l'extraction chimique. De même, on note une différence de couleur entre le chitosane enzymatique (légèrement rosâtre) et le chitosane chimique (blanchâtre).



**Figure III.4 : Aspect général de : a et c (chitine et chitosane respectivement obtenus par extraction chimique), b et d (chitine et chitosane respectivement obtenus par extraction enzymatique).**

#### III.4.2. Rendements massiques de la chitine et du chitosane

Le calcul du rendement permet de déterminer l'efficacité d'une synthèse chimique. Le rendement massique est le rapport entre la masse du produit obtenu (synthétisé) sur la masse

du produit théorique (matière première mise en jeu exprimée en matière sèche). C'est la masse de produit correspondant à un rendement de 100%. Les rendements obtenus de la synthèse de la chitine et du chitosane sont consignés dans le tableau ci-dessous (tableau III.4).

**Tableau III.4 : Rendements massiques de la chitine et du chitosane exprimés en (%) des deux extraits (chimique et enzymatique).**

Extraction	Chitine	Chitosane
Chimique	18.46%	6.84%
Enzymatique	24.54%	8.01%

En observant le tableau III.4, on remarque que le rendement massique en chitine obtenue par voie chimique (18.46%) est plus bas que celui obtenu par voie enzymatique (24.54%). Cette différence est due à la méthode d'extraction. En effet, lors de l'extraction par voie chimique, des agents chimiques concentrés sont utilisés afin de déprotéiniser et déminéraliser, tandis que l'extraction par voie enzymatique par la pepsine permet de préserver une quantité considérable de protéines et des pigments résiduels. Idem en ce qui concerne le faible taux en chitosane chimique (6.84%) par rapport à celui obtenu par voie biologique (8.01%).

Les résultats obtenus dans la présente étude se rapprochent de ceux obtenus par plusieurs auteurs tels que : (OULHIZ, 2018 ; HAMDI *et al.* 2017 ; CHENIT et NAIT YAHIA, 2015) mais ils diffèrent de ceux obtenus par BOUALEM et HOCINE (2018). (Tableau III.5).

**Tableau III.5 : Rendement massique (%) en chitine et chitosane obtenu à partir des coproduits de crevettes rapportés dans la littérature.**

Mode d'extraction	Rendements (%) en chitine et chitosane rapportés dans la littérature							
	BOUALEM et HOCINE (2018)		OULHIZ (2018)		HAMDI <i>et al.</i> (2017)		CHENIT et NAIT YAHIA (2015)	
	Ct (%)	Cs (%)	Ct (%)	Cs (%)	Ct (%)	Cs (%)	Ct (%)	Cs (%)
Chimique	16.1	3	18.89-20.45	6.65-9.02%	-	-	19.32	8.91
Enzymatique	60	23	23,04-25.18	10.53-13.23	22.23	-	-	-

Selon ÖZOGUL *et al.* (2018), les différents rendements massiques obtenus se justifient par la variation des espèces et des saisons ; ainsi que par la variation des modes d'extraction.

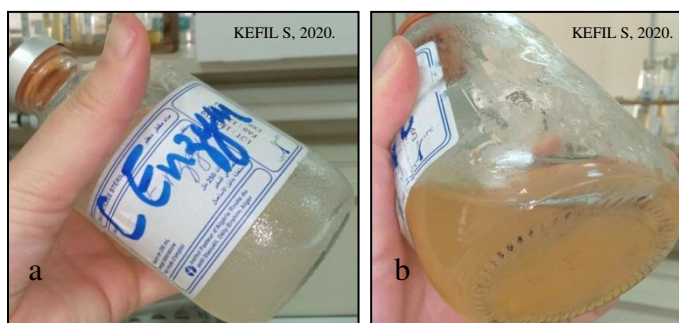
En effet BOUALEM et HOCINE (2018) dans leur étude, n'ont pas procédé à la déminéralisation pendant l'extraction enzymatique, ce qui explique les taux élevés obtenus par ces derniers.

### III.5.Caractérisation du chitosane

Pour caractériser le chitosane obtenu, sa teneur en minéraux et en protéines résiduels, sa solubilisation dans un acide dilué, son degré de désacétylation par titration volumétrique et par méthode RMN ont été déterminés.

#### III.5.1. Solubilisation du chitosane

Les deux extraits de chitosane (chimique et enzymatique) sont parfaitement solubles dans de l'acide acétique à 1% avec une texture plus ou moins visqueuse et une teinte légèrement colorée en beige (figure III.5).



**Figure III.5: Solubilisation du chitosane dans de l'acide acétique à 1%. a : chitosane enzymatique ; b: chitosane chimique.**

#### III.5.2. Caractérisation biochimique du chitosane

La détermination de la teneur du chitosane en protéines et cendres résiduelles permet d'évaluer l'efficacité du traitement appliqué aux coproduits de crevettes. Les résultats de la déminéralisation et déprotéinisation sont consignés dans le tableau ci-après (tableau III.6).

**Tableau III.6 : Caractérisation biochimique des deux extraits de chitosane.**

Caractéristique	Cendres (%)	Protéines (%)
Chitosane chimique	6.36	1.33
Chitosane enzymatique	ND	4.44

ND : non déterminé suite au confinement en prévention de la pandémie COVID-19.

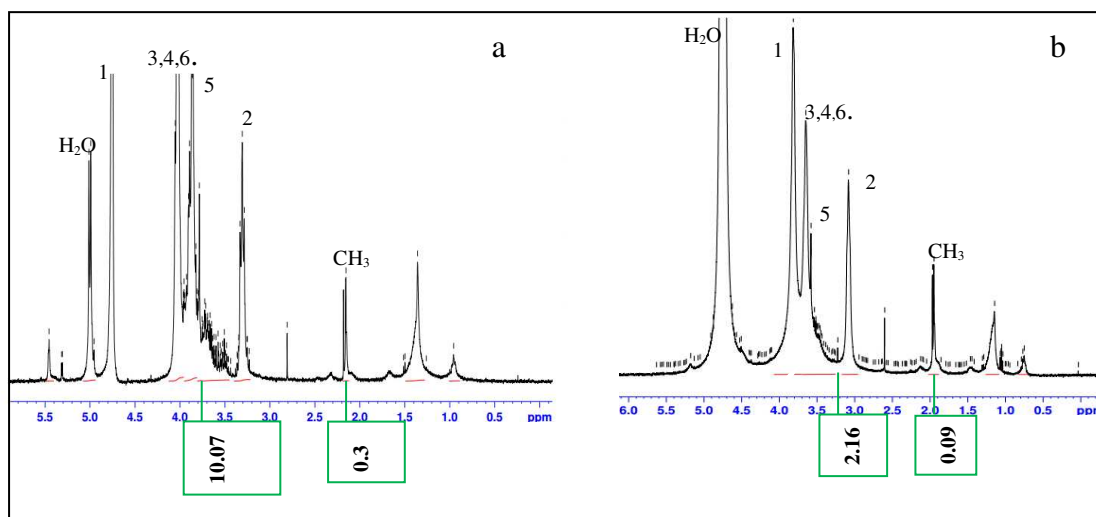
Les valeurs des cendres résiduelles du chitosane chimique (6.36%) sont élevées malgré les conditions drastiques appliquées. Il est à signaler que l'échantillon (coproduits) contenait à la base de fortes concentrations en matières minérales. Faute de temps (confinement à cause de la pandémie), le taux en cendres résiduelles du chitosane enzymatique n'a pas été déterminé. Quant aux taux en protéines résiduelles, elles sont assez faibles, cela est dû probablement à leur sensibilité à la chaleur et aux acides et bases fortes. Néanmoins, l'extrait enzymatique préserve un taux plus élevé en protéines (4.44%) par rapport au produit chimique (1.33%). Le traitement enzymatique permet une hydrolyse sans dénaturation totale des protéines.

Par ailleurs, les concentrations rapportées par OULHIZ (2018) sont plus basses ( $1.53 \pm 0.44\%$ ) pour les minéraux et ( $0.04 \pm 0.02\%$  à  $0.88 \pm 0.09\%$ ) pour les protéines résiduelles du chitosane enzymatique et chimique dans l'ordre. Ces résultats sont conditionnés par les modes d'extractions, la concentration de l'acide (HCl), la température et la durée du traitement appliqué. De même, ils sont influencés par la composition chimique globale de carapaces de crevettes qui dépend de l'espèce, de la saison de pêche, du sexe, de l'âge ou taille/poids.

Toutefois, à la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que l'extraction chimique est plus efficace car elle a permis une hydrolyse plus importante pour obtenir un chitosane extrêmement déminéralisé et déprotéinisé.

### **III.5.3. Degré de désacétylation du chitosane : mise en évidence par RMN et dosage potentiométrique**

L'analyse du chitosane chimique et enzymatique par la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a permis l'obtention des spectres présentés ci-après.



**Figure III.6 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du chitosane extrait. a : extrait chimique ; b : extrait enzymatique.**

Les deux spectres des extraits de chitosane (chimique et enzymatique) illustrés ci-dessus ont été comparés aux spectres obtenus par ROUX (2013) et VO (2013). Ils sont similaires mais avec de légers décalages dans les déplacements chimiques des atomes en partie par million (ppm). Cela est vraisemblablement dû à la différence dans la concentration de l'échantillon dissout dans l'eau lourde. Cette similarité confirme que la molécule extraite est du chitosane.

En général, le spectre RMN  $^1\text{H}$  du chitosane montre des pics allant de 0.5 à 5 ppm (chaînes aliphatiques). Ce graphique révèle la présence des unités glucosamine et acétyl glucosamine qui diffèrent par les déplacements chimiques des protons liés aux carbones 1, 2 et 5. Les autres protons ont des déplacements chimiques identiques. À partir des spectres présentés ci-dessus, le degré de désacétylation (DD) peut être déterminé en comparant l'intégralité du pic de résonance à 2 ppm environ, correspondant aux protons du  $\text{CH}_3$  du groupe acétyle, par rapport aux protons H2-H6 du cycle glucosidique, situés entre 3 et 4,4 ppm (VO, 2013). Le degré de désacétylation (DD) du chitosane extrait par voie chimique est de 94.01% et celui du chitosane extrait par voie enzymatique est de 91.66% (tableau III.7).

**Tableau III.7 : Degré de Désacétylation des deux produits (Ct, Cs) déterminé par dosage potentiométrique et par RMN.**

Degré de Désacétylation (%)	Titrage potentiométrique	RMN
Chitosane chimique	70.62	94.01
Chitosane enzymatique	ND	91.66

ND : non déterminé suite au confinement en prévention de la pandémie COVID-19.

Au regard du tableau III.7, on constate un écart important entre le DD du chitosane chimique obtenu par dosage potentiométrique et celui obtenu par analyse RMN. Ceci peut être justifié par les conditions de manipulation et les concentrations des solutions utilisées pendant le dosage, car la RMN est considérée comme une méthode efficace de détermination du DD. Un DD élevé indique que le chitosane est un produit de bonne qualité (OULHIZ, 2018).

### III.6. Activité antimicrobienne du chitosane

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des deux produits chitosane extraits par voie chimique et par voie enzymatique, des tests de sensibilité sont réalisés par la méthode de diffusion des disques sur gélose. Ces disques sont imbibés par une solution de chitosane puis déposés sur une gélose préalablementensemencée par une suspension microbienne donnée. Trois espèces bactériennes ont été testées : une souche environnementale, *Legionella pneumophila* (Gram-), une souche ATCC 25922 *Escherichia coli* (Gram-) et une souche ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* (Gram+). Ainsi qu'une souche fongique d'origine humaine *Candida albicans*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III.8.

**Tableau III.8 : Pouvoir antimicrobien du chitosane vis-à-vis des souches pathogènes testées.**

Souches pathogènes	Chitosane chimique $\Phi$	Chitosane enzymatique $\Phi$
<i>Legionella pneumophila</i>	$\Phi < 6\text{mm}$	$\Phi < 6\text{mm}$
<i>Escherichia coli</i>	$\Phi < 6\text{mm}$	$\Phi < 6\text{mm}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\Phi < 6\text{mm}$	$\Phi < 6\text{mm}$
<i>Candida albicans</i>	$\Phi < 6\text{mm}$	$\Phi < 6\text{mm}$

$\Phi < 6\text{mm}$  : pouvoir bactéricide nul

L'activité antimicrobienne du chitosane est estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques. Les disques utilisés ont un diamètre de 6mm, donc un anneau clair et translucide autour des disques ( $\Phi > 6\text{mm}$ ), indique la présence d'une activité microbicide. Au regard des résultats mentionnés sur le tableau III.8 et illustré dans la figure III.7; on remarque que les chitosanes chimique et enzymatique n'ont pas d'activité

antagoniste vis-à-vis des souches testées. De même pour le chitosane commercial qui a été testé vis-à-vis des mêmes souches, aucune activité n'a été détectée. D'autres tests devraient être effectués pour rechercher l'activité bactériostatique vis-à-vis des mêmes souches et d'autres germes de différentes origines.

Selon la littérature (CHRIKI *et al.* 2017), le chitosane aurait plus une action bactériostatique que bactéricide et il est souvent utilisé dans l'épuration des eaux usées comme adsorbant et non comme désinfectant.

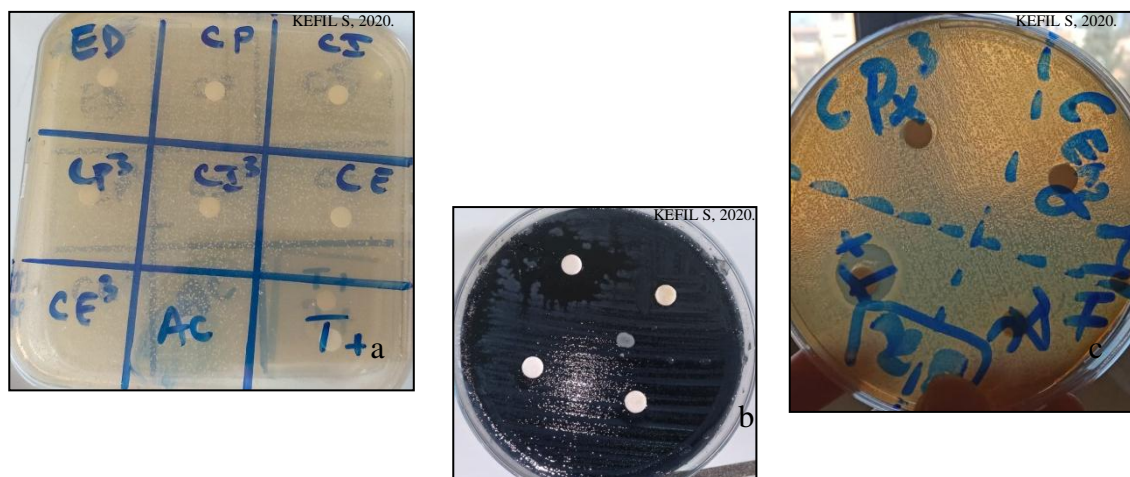
Il agirait comme un adsorbant des nutriments nécessaires à la croissance microbienne ou chélateur d'anions pouvant éliminer des métaux indispensables à la survie microbienne.

Ou alors, grâce à sa charge polycationique il se fixerait directement sur la paroi microbienne chargée négativement et il adsorberait directement le germe ce qui inhiberait sa multiplication et donc diminuerait sa charge et sa disponibilité dans le milieu.

Quant à BOUALEM et HOCINE (2018), ils ont noté une activité anti *Candida.sp*, pour les deux produits « chimique et enzymatique », avec une activité anti-*E.coli* pour le chitosane produit par voie enzymatique et une activité anti *S.aureus* pour celui produit par voie chimique.

Par ailleurs, FUJIMOTO *et al.* (2006) ont constaté que le chitosane avait un effet anti-légionelle efficace mais en présence d'autres acides organiques et en dilution dans l'eau de mer. Ils ont une activité bactéricide prouvée séparément. C'est plutôt donc une action synergique des acides, de l'eau de mer et du chitosane.

Malheureusement, à cause de la pandémie nous nous sommes limités à la recherche du pouvoir antagoniste du chitosane par la méthode de diffusion sur gélose, il aurait été intéressant de continuer cette étude comme cela était prévu, et de tester la capacité du chitosane à adsorber les microorganismes pathogènes et de suivre la cinétique microbienne en présence de ce produit à différentes concentrations.



**Figure III.7 : Résultat du test antimicrobien du chitosane. a: *E.coli*; b: *L.pneumophila*; c: *S.aureus*.**

### III.7. Activité anti-inflammatoire du chitosane

Afin d'évaluer l'effet du chitosane extrait à partir de la carapace de crevette par voie chimique et par voie enzymatique sur l'inflammation aiguë, le modèle de l'œdème de l'oreille induit par un agent irritant (xylène 96%), a été utilisé chez un lot de 10 souris de race (BLB/c), de sexe (mâle) et de poids ( $20 \pm 2$ g).

Quatre heures après l'induction de l'inflammation (traitement avec du xylène), les souris du groupe témoin négatif ont développé un œdème au niveau de leur oreille gauche avec un poids moyen de 1.11mg. Les valeurs des poids des oreilles du groupe témoin négatif sont toujours comparées aux autres valeurs des lots traités par le test T, les résultats sont consignés sur le tableau III.9.

**Tableau III.9 : Résultat du test statistique (T).**

T-/ Diclofénac	T-/Placebo	T-/ Cs chimique	T-/Cs enzymatique
0,040602641 < 0,05	0,942770972 > 0,05	0,006523871 > 0,01	0,044861708 < 0,05

T- : témoin négatif.

Chez les souris du groupe traité localement avec le diclofénac à 1%, on remarque une réduction significative ( $p < 0,05$ ) de l'œdème de l'oreille par rapport à celle des souris du groupe témoin négatif, et qui passe de 1.11mg à 0.43 mg ; ce qui correspond à une inhibition de l'inflammation de  $61.26 \pm 0.52$  %.

Le traitement des souris avec 100  $\mu$ l du chitosane à 1% obtenu par voie chimique induit une diminution très significative ( $p < 0,01$ ) de l'inflammation par rapport aux souris du

groupe témoin négatif. La moyenne des poids de l'oreille est de 0.23 mg, ce qui signifie une inhibition de  $79.27 \pm 0.37\%$  de l'œdème. Cette inhibition est élevée par rapport à celle obtenue avec l'anti-inflammatoire commercial diclofénac à 1%.

De son côté, le traitement des souris par chitosane 1% obtenu par voie enzymatique induit une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de l'inflammation par rapport aux souris témoins. La moyenne des poids de l'oreille est de 0.45 mg, ce qui signifie une inhibition de de l'œdème (figure III.8).

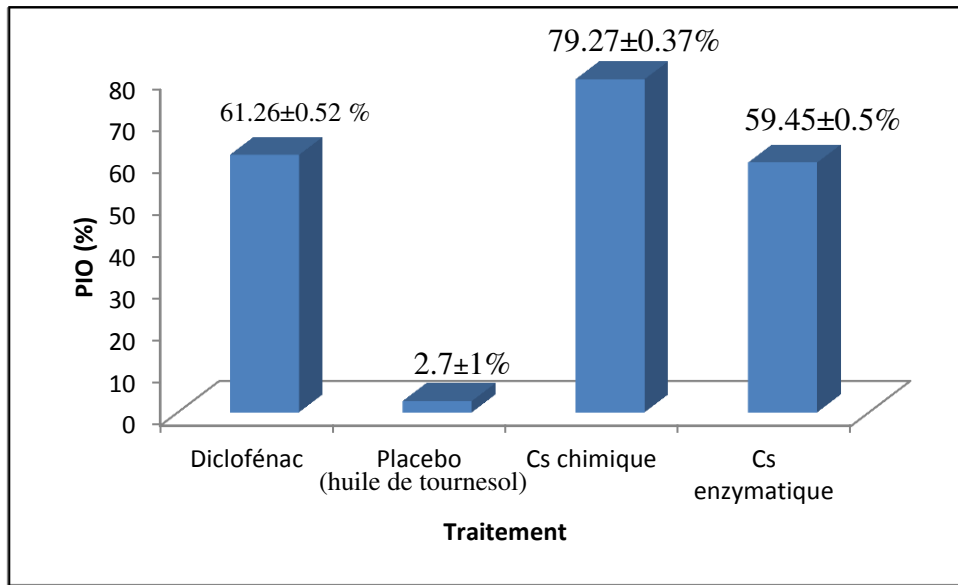
L'inhibition de l'œdème induite par utilisation du chitosane enzymatique se rapproche de celle induite par le diclofénac commercial mais celle du chitosane chimique est nettement meilleure et très prometteuse, d'autant plus qu'il s'agit d'extraits bruts ; avec les purifications, l'activité spécifique devrait augmenter.

Le potentiel d'inhibition de l'huile de tournesol (utilisée pour diluer le chitosane), ou autrement dit : placebo est vérifié. Le lot de souris traité par l'huile de tournesol seule a présenté un poids moyen de 1.08 mg ce qui signifie une inhibition très faible de l'œdème de l'ordre de  $(2.7 \pm 1\%)$  (figure III.8).

Ceci confirme que l'inhibition de l'œdème résulte de l'activité anti-inflammatoire du chitosane et que l'huile de tournesol ne présente aucun effet sur l'inflammation aiguë induite.

Dans une étude menée par QIAO *et al.* (2011), où les souris ont été injectées avec des doses létales de lipopolysaccharide (LPS) bactérien induisant une inflammation de 90% à 100%, la mort des souris (témoin négatif) est intervenue trois jours après l'injection. Alors que pour celles traitées avec du chitosane, le taux de survie a augmenté jusqu'à 52% pendant la même période.

Les résultats obtenus indiquent que le chitosane ainsi préparé est doté d'une excellente activité anti-inflammatoire et peut devenir un concurrent potentiel pour les autres anti-inflammatoires de synthèses. En effet dans une étude récente d'ADNAN *et al.* (2020), le dérivé du chitosane "le chitosane O-carboxyméthylé (O-CMC)" présentait un pouvoir d'inhibition de l'inflammation de l'ordre de  $45,5 \pm 0,02\%$ . L'inflammation a été induite par la carraghénine sur les pates des rats albinos.



**Figure III.8 : Potentiel d'inhibition de l'œdème (PIO) pour chaque traitement appliqué sur les souris en (%).**



**Conclusion générale et  
perspectives**

## Conclusion générale et perspectives

Cette étude s'inscrit dans le cadre général de la valorisation biotechnologique des coproduits de crevettes qui sont identifiés comme une importante source de minéraux, protéines, chitine et lipides.

En effet, la composition biochimique des sous-produits des deux espèces de crevettes étudiées (*Aristeus antennatus* et *Parapenaeus longirostris*) corrobore avec la littérature, notamment les résultats présentés par OULHIZ (2018). Celle-ci révèle que les minéraux et les protéines sont les plus abondants avec des proportions importantes : 32.6% et 24.26 % respectivement.

Les rendements de l'extraction enzymatique de la chitine et du chitosane (24.54% et 8.01% respectivement) sont plus élevés que ceux obtenus par voie chimique (18.46% et 6.84% dans l'ordre).

La caractérisation biochimique du chitosane extrait ainsi que sa mise en évidence par titrage potentiométrique et analyse RMN ont confirmé que ce biopolymère est de bonne qualité : une excellente déprotéinisation et déminéralisation a été effectuée avec un haut degré de désacétylation de l'ordre de 94.01% pour le chitosane chimique et de 91.66% pour le chitosane enzymatique.

Concernant l'activité antimicrobienne des chitosanes préparés (chimique et enzymatique), il n'a été observé aucun effet remarquable sur les souches testées. Ceci nous mène à conclure que le chitosane a une faible activité bactéricide ce qui concorde avec la littérature où il est plutôt décrit comme un produit microbiostatique et plutôt utilisé comme adsorbant et chelateur dans le traitement des eaux.

En revanche, le chitosane obtenu s'est révélé être un agent anti-inflammatoire puissant et un concurrent des autres anti-inflammatoires commercialisés notamment le diclofénac à 1% qui a présenté un potentiel d'inhibition de l'ordre de  $61.26 \pm 0.52\%$ ; alors que le chitosane obtenu par voie chimique a pu inhiber l'inflammation jusqu'à  $79.27 \pm 0.37\%$  et le chitosane enzymatique jusqu'à  $59.45 \pm 0.5\%$ .

De l'ensemble des résultats obtenus, il apparaît que la valorisation biotechnologique des coproduits de crevettes est prometteuse. Il serait donc intéressant à l'avenir de :

- Poursuivre la caractérisation physico- chimique du chitosane produit telle que la détermination de sa viscosité et de son poids moléculaire.

- Poursuivre la caractérisation de ses propriétés pharmacologiques à savoir l'activité analgésique, anti-oxydante, cicatrisante, antidiabétique et anti-hypertensive.
- Étudier son pouvoir de décoloration, d'adsorption et de chélation des colorants et contaminants (métaux lourds) des eaux résiduaires issues des industries du textile, de pétrochimie et autres.
- Explorer les activités biologiques des autres constituants des coproduits de crevettes : pigments (asthaxantine), protéines et minéraux.



**Références bibliographiques**

**Références bibliographiques**

- HOLTUIS L-B** (1987). Crevettes. In : FISHER W., SCHNIDER M et BAUCHOT M-L. Fiches FAO d'identification des espèces pour des besoins de la pêche, mediterrane et mer noire. 1. 190p.
- JARRAUD S., FRENEY J** (2006). Legionella. Paris : TEC & DOC Lavoisier. Chapitre n°02, Taxonomie, 11p. Chapitre n°05, Diagnostic des légionelloses et traitement, 87p.
- JARRAUD S., LAWRENCE C** (2015). Legionella spp. In BOURLET T., COURCOL R., HERRMANN J-L [*et al.*] Référentiel en microbiologie médicale 5<sup>ème</sup> ed. Paris : Remic : Société française de microbiologie, 515p.
- ABABSA A** (2012). Recherche de bactériocines produites par les bactéries lactiques du lait [en ligne]. Memoire de magister. Université Ferhat Abbas- Setif, Algérie, 111 p [Consulté le 03/04/2020]. Disponible sur le web : <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/bitstream/123456789/2127/1/m%C3%A9moire%20Ababsa%20Ahlem%20%28finale%29.pdf>.
- ACCARIAS S** (2014). Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par Staphylococcus aureus. [en ligne]. Thèse de doctorat. Immunologie et Maladies infectieuses. France : univ-ersité de Toulouse, 15p. [Consulté le 05/06/2020]. Disponible sur le web : <http://thesesups.ups-tlse.fr/2649/1/2014TOU30273.pdf>.
- ADDA-HANIFI M** (2007). Aspects de la biologie et de la pêche d'un crustacé décapode aristeus antennatus (Risso, 1816), exploité au niveau du littoral occidental algérien [en ligne]. Mémoire de magister. Science de l'environnement. Algérie : Université d'Oran, 4p. [Consulté le 05/05/2020]. Disponible sur le web : <https://theses.univ-oran1.dz/document/TH2598.pdf>.
- ADNAN S., RANJHA N-M., HANIF M [et al.]** (2020). O-Carboxymethylated chitosan; a promising tool with in-vivo anti-inflammatory and analgesic properties in albino rats. [en ligne] Biological Macromolecules, 156 : 531-536p. [Consulté le 10/07/2020]. Disponible sur le web : 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.038.
- ALGERIE PRESSE SERVICES** (2018). [en ligne]. [Consulté le 18/07/2020]. Disponible sur le web : <http://www.aps.dz/economie/100128-peche-poursuite-de-la-tendance-haussiere-de-la-production-en-2018>.
- AL-SAGHEER F-A., AL-SUGHAYER MA., MUSLIM S [et al.]** (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. [en ligne]. Carbohydrate polymers, 77 : 410-419p. [Consulté le 12/02/2020]. Disponible sur le web : <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301848798>.
- ANDRIEUX G.** (2004). La filière française des coproduits de la pêche et de l'aquaculture : état des lieux et analyse. [en ligne]. Etude de l'OFIMER. 63 p. [Consulté le 07/05/2020]. Disponible sur le web : <http://bibliomer.ifremer.fr/consult.php?ID=2004-2795>.
- AOAC** (1980). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. Washington : DC [en ligne]. [Consulté le 06/08/2020]. Disponible sur le

- web: [https://www.domainex.co.uk/services/analytical-sciences?gclid=Cj0KCQjwoJX8BRCZARIsAEWBFMK8eTC0qAxUc3VCl\\_bllbCaQ7L4Gef8AcH3bSxGu4Q7ajrIuXefWTwaAuPyEALw\\_wcB](https://www.domainex.co.uk/services/analytical-sciences?gclid=Cj0KCQjwoJX8BRCZARIsAEWBFMK8eTC0qAxUc3VCl_bllbCaQ7L4Gef8AcH3bSxGu4Q7ajrIuXefWTwaAuPyEALw_wcB).
- AOAC** (1999). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Washington : DC. [en ligne]. [Consulté le 06/08/2020]. Disponible sur le web: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>.
- ARANAZ I., MENGIBAR M., HARRIS R [et al.]** (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. [en ligne] Current Chemical Biology, 3(2):203-230p. [Consulté le 09/06/2020]. Disponible sur le web: <https://www.eurekaselect.com/93238/article/functional-characterization-chitin-and-chitosan>.
- AUDAT B** (2013). Comment déterminer la structure des molécules organiques. [en ligne]. Fondation Maison de la Chimie. [Consulté le 15/04/2020]. Disponible sur le web : [https://www.mediachimie.org/sites/default/files/RMN-molecules\\_organiques.pdf](https://www.mediachimie.org/sites/default/files/RMN-molecules_organiques.pdf).
- BENKABOUCHE B-I** (2015). Biologie et dynamique de la population de la crevette rose *parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) pêchée au niveau de la côte oranaise. [en ligne]. Thèse de doctorat. Sciences de l'environnement. Algérie : Universités d'Oran, 4p. [Consulté le 05/07/2020]. Disponible sur le web : <https://theses.univ-oran1.dz/document/13201592t.pdf>.
- BOUALEM Z., HOCINE A** (2018). Valorisation biotechnologique des coproduits de crevette rouge *aristeus antennatus* (Risso, 1816): Etude du pouvoir antioxydant et antimicrobien du chitosane. [en ligne]. Mémoire de master. Hydrobiologie marine et continentale. Algérie : Université Abdehamid Ibn Badis-Mostaganem, 40p. [Consulté le 18/07/2020]. Disponible sur le web : <http://193.194.86.113/handle/123456789/1760/browse?value=antioxydant.&type=subject>.
- BOUKHLIFI F., MAMOUNI F-Z., RAZOUK R** (2018). Chitin/chitosan's bio-fertilizer: usage in vegetative growth of wheat and potato crops. In : DONGRE R-S. Chitin-chitosan : myriad functionalities in science and technology. [en ligne]. London : Intech Open, 331p. [Consulté le : 08/07/2020]. Disponible sur le web : <https://books.google.dz/books?id=EXeQDwAAQBAJ&pg=PA350&dq=chitosane+livre&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwi4qc-6xeDIAhWKecAKHW6tDCEQ6AEINjAC#v=onepage&q=chitosane%20livre&f=false>.
- BRADFORD M-M** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. [en ligne]. Analytical Biochemistry, 72 (1-2): 248-254p. [Consulté le: 20/03/2020]. Disponible sur le web: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>
- BRÜCK W-M., SLATER J-W., CARNEY B-F** (2011). Chitin and chitosan from marine organisms. In : KIM S-K. Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives : biological activities and applications. [en ligne]. USA : Taylor &

- francis group,11p. [Consulté le 06/05/2020]. Disponible sur le web: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780429165931>.
- BUSCHMANN M-D., MERZOUKI A., LAVERTU M., [et al.]** (2013). Chitosans for delivery of nucleicacids. [en ligne]. *Advanced Drug Delivery Reviews* : 65, 1234–1270p. vierB.V. [Consulté le 15/04/2020]. Disponible sur le web: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.005>.
- CATTAN S., THIZY G., MICHON A., [et al.]** (2019). Actualités sur les infections à legionella. [en ligne]. *La revue de médecine interne* 40(12) : 791-798p. [Consulté le : 07/08/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.08.007>.
- CHANTREAU P., VALLET J-L** (1991). Traitement des langoustines et des crevettes contre le noircissement. [en ligne]. IFREMER. [Consulté le 15/07/2020]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/1991/rapport-1586.pdf>.
- CHENNIT M., NAIT YAHIA L** (2015). Élaboration d'un composite à base de chitosane, Le poly-acide lactique et cloisite 30B par voie fondue. [en ligne]. Mémoire de master. Génie des procédés: polymère et composite. Université de Bejaia, Algérie, 111p. [Consulté le : 20/08/2020]. Disponible sur le web : <http://univ-bejaia.dz/jspui/handle/123456789/7887>.
- CHRIKI S., RIVOLLIER M., MICHAUD P** (2017). Le chitosane Un nouvel antimicrobien pour la filière viande. [en ligne]. *Viandes prod. Carnés*, 27 (6) : 183-186p. [Consulté le : 27/08/2020]. Disponible sur le web : <file:///C:/Users/server/Downloads/183-chriki.pdf>.
- CRINI G., BADOT P-M., GUIBAL E [et al.]**(2009). Chitine et chitosane du biopolymère à l'application. [en ligne]. France : Besançon. Chap n°01, chitine et chitosane : préparation, propriétés et principales applications, 19p. [Consulté le : 14/08/2020]. Disponible sur le web : <https://books.google.dz/books?id=LHK3ZGbdHJMC&printsec=frontcover&hl=fr#v=onepage&q&f=true>.
- DARAGAN E-S., DINU M-V** (2020). Advances in porouschitosan-based composite hydrogels: synthesis and applications. [en ligne]. *Reactive and functional polymers*, 146 : (104372), 1-38p. [Consulté le : 05/08/2020]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514819308132>.
- DE BOER J** (1988). Chlorobiphenyls in boundandnon-boundlipids of fishes; comparison of different extraction methods. [en ligne]. *Chemosphere*, 17 (9) : 1803-1810p. [Consulté le : 09/08/2020]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0045653588901087>.
- DE-LASTOURS V., FANTIN B** (2014). Résistance aux fluoroquinolones en 2013 : quel impact pour l'interniste ? [en ligne]. *Médecine et maladies infectieuses*, 35 (9) : 601-608p. [Consulté le : 09/08/2020]. Disponible sur le web : [10.1016/j.revmed.2014.05.005](http://dx.doi.org/10.1016/j.revmed.2014.05.005).
- DIALLO A-A** (2013). *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire. [en ligne]. Thèse de doctorat. Microbiologie. France :

Université de Toulouse, 13p. [Consulté le : 20/08/2020]. Disponible sur le web : <http://thesesups.ups-tlse.fr/2112/1/2013TOU30162.pdf>.

**DIALLO I** (2019). Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de lentinulaedodes (shiitake) sous différentes conditions de culture. [en ligne].Thèse de doctorat. Sciences des Aliments et Nutrition. France : Université de Montpellier, 42p. . [Consulté le : 20/08/2020]. Disponible sur le web : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02481192/document>.

**DUBOIS M., GILLES K., HAMILTON J-K [et al.]** (1956). A colorimetric method for the determination of sugars. [en ligne]. Nature, 4265 : 167p. [Consulté le : 02/08/2020]. Disponible sur le web : <https://www.nature.com/articles/168167a0.pdf?origin=ppub>.

**DUVAL M** (2008). Isolation et valorisation des constituants de la carapace de la crevette nordique. [en ligne]. Mémoire pour obtention de diplôme de maître en sciences. sciences de l'agriculture et de l'alimentation. Canada : Université Laval, 41p. [Consulté le : 03/08/2020]. Disponible sur le web : <https://pdfs.semanticscholar.org/81cf/83f33d118397cbc6578bcb2bee9c053c8e18.pdf>.

**EL SOHAIMY S-A., MASRY S-H-D., SHEHATA M-G** (2015). Physicochemical characteristics of honey from different origins. [en ligne]. Annals of agricultural science, 60 (2) : 279-287p. [Consulté le : 05/08/2020]. Disponible sur le web : <http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2015.10.015>.

**ESCUADERO-OÑATE C., MARTINEZ-FRANCÉS E** (2018). Areview of chitosan-based for the removal of organic pollution from water and bioaugmentation. In : DONGRE R-S. Chitin and chitosan myriad functionalities in science and technology. [en ligne].London : Intech open, 74p. [Consulté le : 09/08/2020]. Disponible sur le web : <https://books.google.dz/books?id=EXeQDwAAQBAJ&pg=PA350&dq=chitosan+livre&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwi4qc-6xeDIAhWKecAKHW6tDCEQ6AEINjAC#v=onepage&q=chitosane%20livre&f=false>.

**FAO** (2016). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2016. [en ligne]. Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous. Rome. 224 pages. [Consulté le : 09/08/2020]. Disponible sur le web : <http://www.fao.org/3/a-i5555f.pdf>.

**FAO** (2020). La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2020. [en ligne]. La durabilité en action. Rome. [Consulté le : 03/08/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.4060/ca9229fr>.

**FAO** (2020). Species fact sheets aristeus antennatus (Risso, 1816). [en ligne]. [Consulté le : 07/07/2020]. Disponible sur le web : <http://www.fao.org/fishery/species/3422/en>.

**FAO** (2020). Species fact sheets parapenaeus longirostris (Lucas, 1846). [Consulté le : 07/07/2020]. Disponible sur le web : <http://www.fao.org/fishery/species/2598/en>.

**FARHAT M** (2009). Etude de la survie des légionelles et de la dynamique des populations microbiennes des réseaux d'eau chaude : rôle des procédés de décontamination. [en ligne]. Thèse de doctorat. Chimie et microbiologie de l'eau. Poitiers : Université de Poitiers.4p. [Consulté le : 20/07/2020]. Disponible sur le web :

<http://nuxeo.edel.univ-poitiers.fr/nuxeo/site/esupversions/05cd9603-0ce6-4b01-a4b2-72073da45045>.

**FERRADJI A** (2011). Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies de *Pistacia lentiscus*. [en ligne]. Mémoire de magister. Biochimie. Algérie : Université Ferhat Abbas –SETIF, 1p. [Consulté le : 03/07/2020]. Disponible sur le web : <https://www.univ-setif.dz/MMAGISTER/images/facultes/SNV/2012/FERRADJI%20Ayoub.pdf>.

**FONG D** (2016). Identification des propriétés structurales du chitosane induisant la libération de cytokines pro régénératrices chez les macrophages humains. [en ligne]. Thèse de doctorat. Génie biomédical. Canada : Université de Montréal, vii p. [Consulté le : 15/07/2020]. Disponible sur le web : [https://publications.polymtl.ca/2426/1/2016\\_DavidFong.pdf](https://publications.polymtl.ca/2426/1/2016_DavidFong.pdf).

**FUJIMOTO T., TSUCHIYA Y., TERAOKA M., [et al.]** (2006). Antibacterial effects of chitosan solution against legionella pneumophila, escherichia coli, and staphylococcus aureus. [en ligne]. Int j food microbiol, 112(2) : 96-101p. [Consulté le : 10/07/2020]. Disponible sur le web : [10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.003](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.003).

**GADKARI R-R., SUWALKA S., YOGI MR., [et al.]** (2019). Green synthesis of chitosan-cinnamaldehyde cross-linked nanoparticles: characterization and antibacterial activity. [en ligne]. Carbohydrate polymers. 1-22p. [Consulté le : 04/07/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115298>.

**GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS INC** (2020). [en ligne]. [Consulté le : 03/07/2020]. Disponible sur le web : <https://www.strategyr.com/market-report-chitin-and-chitosan-derivatives-forecasts-global-industry-analysts-inc.asp>.

**GOMEZ-VALERO L., RUSNIOK C., BUCHRIESER C** (2009). Legionella pneumophila: population genetics, phylogeny and genomics. [en ligne]. Infection, genetics and evolution, 9 : 727–739p. [Consulté le : 05/07/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.004>.

**GRAELLS T., ISHAK H., LARSSON M [et al.]**(2018). The all-intracellular order legionella is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant. [en ligne]. Fems microbiol ecol, 94 (12) : 1-23p. [Consulté le : 23/07/2020]. Disponible sur le web : [10.1093/femsec/fiy185](https://doi.org/10.1093/femsec/fiy185).

**GUIBAL E., VINCENT T** (2009). Adsorption d'ions métalliques et des produits dérivés. In : CRINI G., BADOT P-M. Traitement et épuration des eaux industrielles polluées : Procédés membranaires, biadsorption et oxydation chimique. France : Serlabo technologies, 142-145p. [Consulté le : 25/07/2020]. Disponible sur le web : <https://books.google.dz/books?id=LHK3ZGbdHJMC&printsec=frontcover&hl=fr#v=onepage&q&f=true>.

**GUTIERREZ-MARTINEZ P., AIDE M., LUZ I [et al.]** (2018). Antifungal activity of chitosan against postharvest fungi of tropical and subtropical fruits. In : DONGRE R-S. chitin-chitosan : myriad functionalities in science and technology.[en ligne]. London : Intech open, 311p. [Consulté le : 17/02/2020]. Disponible sur le web : <https://books.google.dz/books?id=EXeQDwAAQBAJ&pg=PA350&dq=chitosane+livre&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwi4qc->

6xeDIAhWKecAKHW6tDCEQ6AEINjAC#v=onpage&q=chitosane%20livre&f=false.

**HALIM A-S., KEONG L-C., ZAINOL I [et al.]** (2011). Biocompatibility and biodegradation of chitosan and derivatives. In : SARMENTO B et NEVES J-D. Chitosan baseds ystems for biopharmaceuticals : delivery, targeting, and polymer herapeutics. [en ligne]. Chichester, west sussex : john wiley & sons, 15p. [Consulté le : 20/08/2020]. Disponible sur le web : 10.1002/9781119962977.CH4.

**HAMDI M., HAMMAMI A., HAJJI S., [et al.]** (2017). Chitin extraction from blue crab (*portunus segnis*) and shrimp (*penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *p. segnis viscera*. *Int j.* [en ligne]. *Boil macromol*, 10: 455-463p. [Consulté le 07/06/2020]. Disponible sur le web: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.103.

**HAMED I., ÖZOGUL F., REGENSTEIN J-M** (2016). Industrial applications of crustacean by products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides). [en ligne]. *Trends in food science & technology*, 48 : 40-50p. [Consulté le 20/04/2020]. Disponible sur le web: 10.1016/j.tifs.2015.11.007.

**HASSAINIA A** (2018). Obtention du biopolymere «chitine» à partir du champignon «*agaricus bisporus*»: extraction et caracterisation. [en ligne]. Thèse de doctorat. Génie des procédés. Algérie : Université de Guelma, 9-11-25p. [Consulté le 20/08/2020]. Disponible sur le web : <http://dspace.univ-guelma.dz:8080/xmlui/handle/123456789/505>.

**HELLAL M** (2007). Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine : synthèses et activités anti-cytokine. [en ligne]. Thèse de doctorat . Pharmacochimie. Université Louis Pasteur (Strasbourg I), Strasbourg , 33p. [Consulté le 09/06/2020]. Disponible sur le web : <https://docplayer.fr/11674556-These-phtalazinones-et-2-3-benzodiazepinones-derivees-de-l-azelastine-syntheses-et-activites-anti-cytokine.html>.

<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104372>.

**IFREMER**, 2010. Chitine et chitosane.fichev1 réalisée pour [www.bibliomer.com](http://www.bibliomer.com). [en ligne]. 3p. [Consulté le 04/04/2020]. Disponible sur le web : [http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/Chitine\\_et\\_chitosan\\_vf.pdf](http://bibliomer.ifremer.fr/documents/fiches/Chitine_et_chitosan_vf.pdf).

**İNCILI G-K., KARATEPE P., İRFANİLHAK O** (2020). Effect of chitosan and *pediococcus acidil acticion e. coli O157:H7*, *salmonella typhi muriumand listeria monocytogenes* inmeatballs. [en ligne]. *Lwt - food science and technology*. 117 : (108706), 1-6p. [Consulté le 24/04/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108706>.

**JANAS A., PRZYBYLSKI P** (2019). 14- and 15-membered lactone macrolides and their analogues and hybrids: structure, molecular mechanism of action and biological activity. [en ligne]. *European journal of medicinal chemistry*, 182 (111662) : 1-73p. [Consulté le 24/04/2020]. Disponible sur le web : 10.1016/j.ejmech.2019.111662

**KAPIRIS K., THESSALOU-LEGAKI M** (2011). Feedin gecology of the deep-water blue–red shrimp *aristeus antennatus* (decapoda: aristeidae) in the greek ionian

sea (e. mediterranean). [en ligne]. Sea research, 65 : 151–160p. [Consulté le 09/07/2020]. Disponible sur le web: [10.1016/j.seares.2010.09.005](https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.09.005).

**KHAN F., PHAM D-T-N., OLOKETUYI S-F., [et al.]** (2019). Chitosan and their derivatives: antibiofilm drugs against pathogenic bacteria, colloids and surfaces b. [en ligne]. Biointerfaces. 1-54p. [Consulté le 05/06/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110627>.

**KHERRAZ A** (2006). Première données sur la crevette rouge, aristeus antennatus (Risso, 1816) de la région oranaise. Biologie écologie. [en ligne]. Mémoire de magister. Sciences de l'environnement. Algérie : Université d'Oran, 37p. [Consulté le 03/08/2020]. Disponible sur le web : <https://theses.univoran1.dz/document/TH2323.pdf>.

**KHOR E** (2001). Chitin : fulfilling a biomaterials promise. [en ligne]. 1<sup>ère</sup> ed. Singapore : Elsevier science. Chap n° 06, the structural properties of chitin as itisknowntoday, 79p. [Consulté le 20/05/2020]. Disponible sur le web: <https://www.elsevier.com/books/chitin-fulfilling-a-biomaterials-promise/khor/978-0-08-044018-7>.

**KHOR E., WAN A-C-A** (2014). Chitin fulfilling a biomaterials promise. [en ligne]. 2<sup>ème</sup> ed. USA : Elsevier. Chap n° 01, Overview of chitin and chitosan research, 1p. [Consulté le: 15/05/2020]. Disponible sur le web: <https://www.elsevier.com/books/chitin/khor/978-0-08-099939-5>.

**KURITA K** (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. [en ligne]. Biotechnol. 8: 203-226p. [Consulté le: 05/06/2020]. Disponible sur le web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16532368/>.

**KUSIĆ D., RDDOTOSCH P., POPP J** (2016). Fast label free detection of legionella spp. in biofilms by applying immunomagnetic beads and raman spectroscopy. [en ligne]. Systematic and applied microbiology, syapm 25746 : 1-25p. [Consulté le 23/06/2020]. Disponible sur le web: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2016.01.002>.

**LAARAIBI A., MOUGHAOUI F., DAMIRI F [et al.]** (2018). Chitosan-claybased (cs-nabnt) biodegradable nanocomposite films for potential utility in food and environment. In : DONGRE R-S. Chitin-chitosan : myriad functionalities in science and technology. [en ligne]. London : Intech open, 45p. [Consulté le 07/08/2020]. Disponible sur le web : <https://books.google.dz/books?id=EXeQDwAAQBAJ&pg=PA350&dq=chitosane+livre&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwi4qc-6xeDIAhWKecAKHW6tDCEQ6AEINjAC#v=onepage&q=chitosane%20livre&f=false>.

**LAI W-F., LIN C-M** (2011). Chemical derivatization of chitosan for plasmid dna delivery: present and future. In : KIM S-K. Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives : biological activities and applications. [en ligne]. USA : taylor & francis group, 69p. [Consulté le : 05/05/2020]. Disponible sur le web : <https://www.taylorfrancis.com/books/9780429165931>.

- LE DEVEDEC** (2008). Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés. [en ligne]. Mémoire de maîtrise. Chimie. Canada : Université du Québec, 12p. [Consulté le : 15/08/2020]. Disponible sur le web : <https://archipel.uqam.ca/959/1/M10234.pdf>.
- LE ROUX K** (2012). Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *penaeus vannamei* : Caractérisations des produits et optimisation du procédé. [en ligne]. Thèse de doctorat. Génie des procédés. France : Université de Nantes. 17-32-41-p. [Consulté le 05/08/2020]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00087/19828/17470.pdf>.
- LE ROUX K., BERGE J-P., BARON R [et al.]** (2012). Extraction of chitins in a single step by enzymatic hydrolysis in an acid medium. 1-42p. [Consulté le 22/08/2020]. Disponible sur le web: [https://www.researchgate.net/publication/258433402\\_extraction\\_of\\_chitins\\_in\\_a\\_single\\_step\\_by\\_enzymatic\\_hydrolysis\\_in\\_an\\_acid\\_medium](https://www.researchgate.net/publication/258433402_extraction_of_chitins_in_a_single_step_by_enzymatic_hydrolysis_in_an_acid_medium).
- LEARBUCH K-L-G., LUT M-C., LIU G., [et al.]** (2019). Legionella growth potential of drinking water produced by a reverse osmosis pilot plant. [en ligne]. Water research, 157 : 57-63p. [Consulté le 06/05/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.037>.
- LIMAM Z., SELMI S., SADOK S [et al.]** (2011). Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: biological and physicochemical properties. [en ligne]. African journal of biotechnology, 10 (4) : 640-647p. [Consulté le : 03/03/2020]. Disponible sur le web : [https://www.researchgate.net/publication/268370948\\_Extraction\\_and\\_characterization\\_of\\_chitin\\_and\\_chitosan\\_from\\_crustacean\\_by-products\\_Biological\\_and\\_physicochemical\\_properties](https://www.researchgate.net/publication/268370948_Extraction_and_characterization_of_chitin_and_chitosan_from_crustacean_by-products_Biological_and_physicochemical_properties).
- LIU X., ZHANG J., ZHU K-Y** (2019). Chitin in arthropods: biosynthesis, modification, and metabolism. In : COHEN I-R [et al.] Targeting chitin-containing organisms. [en ligne]. Singapore : Springer : qing yang & tamofukamizo, 169p. [Consulté le: 15/07/2020]. Disponible sur le web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31102247/>.
- LONG S-S., PICKERING L-K., PROBER C-G** (2012). Legionella species. In : Principles and practice of pediatric infectious diseases. [en ligne]. 4<sup>ème</sup> ed. Edinburgh : Elsevier saunders, 923p. [Consulté le 28/04/2020]. Disponible sur le web: [https://books.google.dz/books?hl=fr&lr=&id=nQ7o8JAH7kC&oi=fnd&pg=PP1&dq=LegionellaSpecies+Lorry+G.+Rubin&ots=bmi5OPJ33n&sig=pfXvuoSBtHy0wQauuEJalz79VjE&redir\\_esc=y#v=onepage&q=legionella&f=false](https://books.google.dz/books?hl=fr&lr=&id=nQ7o8JAH7kC&oi=fnd&pg=PP1&dq=LegionellaSpecies+Lorry+G.+Rubin&ots=bmi5OPJ33n&sig=pfXvuoSBtHy0wQauuEJalz79VjE&redir_esc=y#v=onepage&q=legionella&f=false).
- LUQUE DE CASTRO M-D., GARCÔ ÂA-AYUSO L-E** (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. [en ligne]. Analytica chimica acta 369, 1-10p. [Consulté le : 05/03/2020]. Disponible sur le web : <https://pharmacy.hebmu.edu.cn/trywhx/resources/43/2019520154130.pdf>.
- MAI D-S** (2014). Shellfish (molluscs and crustacea). [en ligne]. Encyclopedia of food microbiology, 3. 376p. [Consulté le : 25/02/2020]. Disponible sur le web : <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00305-0>.

- MARRA A., MONA S., SA R-M., [et al.]** (2015). Population genetic history of *aristeus antennatus* (crustacea: decapoda) in the western and central mediterraneansea. [en ligne]. Plos one, 10(3): e0117272 : 1-16p. [Consulté le 25/04/2020]. Disponible sur le web : [10.1371/journal.pone.0117272](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117272)
- MEBIROUK R** (2017). Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*helixaspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : activités anti-inflammatoire, anti tumorale et anti-angiogénique. [en ligne]. Thèse de doctorat. Biotechnologie, biologie et Environnement. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie, 19p. [Consulté le 18/04/2020]. Disponible sur le web : <https://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/MEB7013.pdf>.
- MISZCZYCHA S-D** (2013). Croissance et survie des *escherichia coli* producteurs de Shiga Toxines (stec) en fonction des technologies fromagères mettant en oeuvre du lait cru. [en ligne]. Thèse de doctorat. Physiologie et génétique moléculaires. France : Université d'Auvergne, 26p. [Consulté le 05/08/2020]. Disponible sur le web : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00874866/file/Miszczycha-2013CLF22349.pdf>.
- MORENO Y., MORENO-MESONERO L., GARCIA-HERNANDEZ J** (2019). Dvc-fish to identify potentially pathogenic legionella inside free-living amoebae from water sources. [en ligne]. Environmental research, 176 (108521) : 1-7p. [Consulté le 23/05/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.06.002>.
- MOUFFOK S., MASSUTÍ E., BOUTIBA Z., [et al.]** (2008). Ecology and fishery of the deep-water shrimp, *aristeus antennatus* (risso, 1816) off algeria (south-western mediterranean). [Consulté le 25/06/2020]. Disponible sur le web : [10.1163/156854008X374513](https://doi.org/10.1163/156854008X374513).
- MOUSSIAN B** (2019). Chitin: structure, chemistry and biology. In : COHEN I-R [et al.] Targeting chitin-containing organisms. [en ligne]. Singapore : Springer : qing yang & tamofukamizo, 5p. [Consulté le 25/04/2020]. Disponible sur le web : <https://www.springer.com/gp/book/9789811373176>.
- NATARAJAN T-S., KALYANASUNDARAM N., RAVI S** (2017). Extraction and characterization of chitin and chitosan from *achatinodes*. [en ligne]. Nat prodchemres. 5 (5): 281p. [Consulté le 25/04/2020]. Disponible sur le web : [10.4172/2329-6836.1000281](https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000281).
- NGUYEN T-M-H** (2009). Valorisation de matières premières marines de faible valeur ajoutée: application aux coproduits de thons. [en ligne]. Thèse de doctorat. Génie des procédés : biotechnologie. Nantes : Université de Nantes. [Consulté le 25/03/2020]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/2009/these-6918.pdf>.
- NO H-K., MEYERS S-P** (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan. [en ligne]. J. aquatic food prod. tech: 4, 27-52p. [Consulté le: 03/05/2020]. Disponible sur le web: [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J030v04n02\\_03](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J030v04n02_03).

- ONSØYEN E., SKAUGRUD O-J** (1990). Metal recovery using chitosan. [en ligne]. *Journal of chemical technology & biotechnology*. 49(4):395-404p. [Consulté le : 15/07/2020]. Disponible sur le web: 10.1002/jctb.280490.
- OULHIZ A** (2018). Évaluation, valorisation et utilisation des coproduits de la crevette rouge *aristeus antennatus* (Risso, 1816) et du thon *thunnusthynnus* (Linné, 1758) pour l'alimentation du tilapia rouge (*oreochromis* sp.). [en ligne]. Thèse de doctorat. Ecologie et environnement marin. Algérie. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. 14-22-23-p. [Consulté le 20/02/2020]. Disponible sur le web : <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/13260>.
- ÖZOGUL F., HAMED I., ÖZOGUL Y [et al.]** (2018). Crustacean by-products. [en ligne]. 1-6p. [Consulté le 28/05/2020]. Disponible sur le web: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21690-9.
- QIAO Y., BAI X-F., DU Y-G** (2011). Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. [en ligne]. *International immunopharmacology*, 11 : 121-127p. [Consulté le 25/06/2020]. Disponible sur le web : 10.1016/j.intimp.2010.10.016.
- QIN Z., ZHAO L** (2019). The history of chito/chitin oligosaccharides and its monomer. In : ZHAO L. Oligosaccharides of chitin and chitosan bio-manufacture and applications. [en ligne]. Singapore : SPRINGER, 3p. [Consulté le : 05/06/2020]. Disponible sur le web : <https://www.springer.com/gp/book/9789811394010>.
- RANDRIAMAHATODY Z** (2011). Valorisation biotechnologique des coproduits de crevette : utilisation de la proteolyse enzymatique pour des applications avicoles a Madagascar. [en ligne]. Thèse de doctorat. Sciences de la Vie. Madagascar : Universite d'Antananarivo, 76 p. [Consulté le 03/08/2020]. Disponible sur le web : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00043/15456/>.
- RICHARDS A-M., VON-DWINGELO J-E., PRICE C-T [et al.]** (2013). Cellular microbiology and molecular ecology of legionella–amoeba interaction. [en ligne]. *Virulence*, 4 (4) : 307-314p. [Consulté le 25/07/2020]. Disponible sur le web: <http://dx.doi.org/10.4161/viru.24290>.
- RINAUDO M.** 2006. Chitin and chitosane: properties and applications. [en ligne]. *Progress in polymer sciences*. 31, 603-632p. [Consulté le 23/07/2020]. Disponible sur le web: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- ROSA R., NUNES M-L** (2003). Nutritional quality of red shrimp, *aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *parapenaeus longirostris* (Lucas), and norway lobster, *nephrops norvegicus* (Linnaeus). [en ligne]. *Science of food and agriculture*, 84:89–94p. [Consulté le 04/07/2020]. Disponible sur le web : 10.1002/jsfa.1619.
- ROUX R** (2013). Élaboration d'assemblages colloïdaux à partir de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane. [en ligne]. Thèse de doctorat. Matériaux. France : Université Claude Bernard, 13p. [Consulté le : 09/06/2020]. Disponible sur le web : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01174097>.
- SAINI R-K., MOON S-H., KEUM Y-S** (2018). An updated review on use of tomato pomace and crustacean processing waste to recover commercially vital carotenoids.

- [en ligne]. Food research international, 108 : 516-529p. [Consulté le 23/04/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.003>.
- SFLY GREENTECH** (2020). [en ligne]. [Consulté le 07/08/2020]. Disponible sur le web: <http://sflyproteins.com/a-worldwide-market-with-a-strong-demand/>.
- SHAHEEN M., SCOTT C., ASHBOLT N-J** (2019). Long-term persistence of infectious legionella with free-living amoebae in drinking water biofilms. [en ligne]. International journal of hygiene and environmental health, 222 (4) : 678-686p. [Consulté le : 05/05/2020]. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.04.007>.
- STEINFELD L., VAFAEI A., RÖSNER J [et al.]** (2019). Chitin prevalence and function in bacteria, fungi and protists. In : COHEN I-R [et al.]. [en ligne]. Targeting chitin containing organisms. Singapore : Springer : qing yang & tamofukamizo, 19p. [Consulté le: 05/03/2020]. Disponible sur le web: <https://www.springer.com/gp/book/9789811373176>.
- TEIXEIRA M-D-C., SANTINI A., SOUTO E-B** (2017). Delivery of antimicrobials by chitosan-composed therapeutic nanostructures. [en ligne]. Nanostructures for antimicrobial therapy, 203-222p. [Consulté le : 08/06/2020]. Disponible sur le web : <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00008-1>.
- THIRION-MERLE V** (2016). Spectrométrie de fluorescence X. Circulation et provenance des matériaux dans les sociétés anciennes, éditions des archives contemporaines (2014). [en ligne]. Collection sciences archéologiques, 9782813001634. [Consulté le : 25/06/2020]. Disponible sur le web : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01393984>.
- THROP J-H., D-C ROGERS** (2011). Field guide to freshwater invertebrates of north america : n/a. [en ligne]. Saint Louis : Elsevier science. Chap n°13, Introduction to freshwater invertebrates in the phylum arthropoda, 109p. [Consulté le : 05/05/2020]. Disponible sur le web: [10.1016/B978-0-12-381426-5.00013-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381426-5.00013-2)
- TRABSA H** (2015). Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des plantes médicinales : sedum sediforme et lycium arabicum. [en ligne]. Thèse de doctorat. Biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie, 9p. [Consulté le : 08/05/2020]. Disponible sur le web : <http://www.univ-setif.dz/Tdoctorat/2015/SNV/TRABSA%20Hayat.pdf>.
- VEGA-CAZAREZ C-A., SANCHEZ-MACHADO D-I., LOPEZ-CERVANTES J** (2018). Overview of electrospun chitosan nanofiber composites for wound dressings. In : DONGRE R-S. Chitin-chitosan : myriad functionalities in science and technology. [en ligne]. London : IntechOpen, 157p. [Consulté le : 05/06/2020]. Disponible sur le web: <https://books.google.dz/books?id=EXeQDwAAQBAJ&pg=PA350&dq=chitosane+livre&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwi4qc-6xeDIAhWKecAKHW6tDCEQ6AEINjAC#v=onepage&q=chitosane%20livre&f=false>
- VERDON J** (2009). Caractérisation et mode d'action de la warnéricinerk, un peptide anti legionella. [en ligne]. Thèse de Doctorat. Aspects moléculaires et cellulaires de la

biologie. Poitiers : Université de Poitiers : 61-68p. [Consulté le : 09/03/2020]. Disponible sur le web : <http://nuxeo.edel.univ-poitiers.fr/nuxeo/site/esupversion-s/58b1cd92-c0ec-4de8-82e2-1d78e3a45d1d>.

**VILLAR-CHAVERO M., DOMÍNGUEZ J-C., ALONSO V-M., [et al.]** (2019). Chitosan-reinforced cellulosic bionogels: viscoelastic and antibacterial properties. [en ligne]. Carbohydrate polymers, 1-25p. [Consulté le : 05/08/2020]. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115569>.

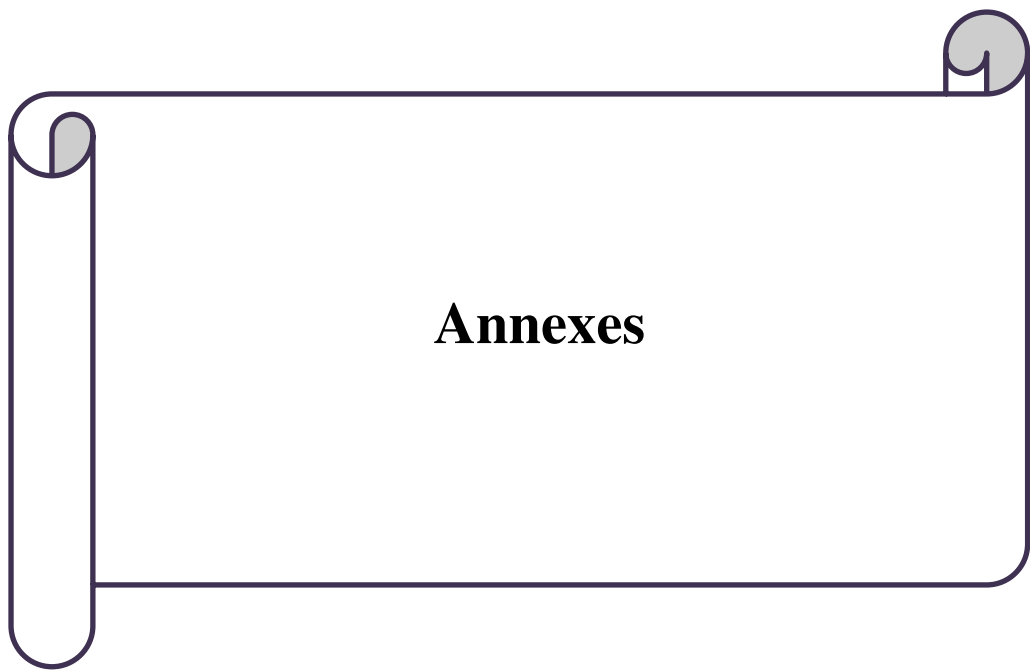
**VINUSHA A., VIJAYA C** (2019). Extraction and characterization of chitosan from aquatic biowaste. [en ligne]. International journal for research in applied science & engineering technology, 7 (4) : 2217-2220p. [Consulté le: 15/06/2020]. Disponible sur le web: <https://www.ijraset.com/fileserve.php?FID=21957>.

**VO N-D-K** (2013). Synthèse de nanoparticules d'or par irradiation de solution aqueuse d'ions Au(III) en présence de chitosane.[en ligne]. Thèse de doctorat. Chimie. France : Université de Reims Champagne-ardenne, 58p. [Consulté le : 22/06/2020]. Disponible sur le web : [file:///C:/Users/server/Downloads/34717\\_VO\\_2013\\_archivage%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/server/Downloads/34717_VO_2013_archivage%20(1).pdf).

**YEN M-T., YANG J-H ., MAU J-L** (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. [en ligne]. Carbohydr polym, 75 (1): 15-21p. [Consulté le : 28/04/2020]. Disponible sur le web : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861708002701>.

**YOUCEF-ALI M**(2014). Etude de l'activité anti-candida albicans des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides. [en ligne].Thèse de doctorat. Biotechnologies, biologie et environnement. Université Constantine 1, Algérie, 6-7p. [Consulté le : 25/07/2020]. Disponible sur le web : <https://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/YOU6552.pdf>.

**ZARROUK F** (2012). Les statistiques inferentielles (test T). [en ligne]. Issep ksarsaid. [Consulté le 20/09/2020]. Disponible sur le web : [http://www.issep-ks.rnu.tn/fileadmin/templates/Fcad/Test\\_\\_de\\_Student.pdf](http://www.issep-ks.rnu.tn/fileadmin/templates/Fcad/Test__de_Student.pdf).



**Annexes**

**Annexe 01 : Milieux de culture utilisés et leurs compositions****BCYE**

Buffered Charcoal Yeast Extract est un milieu sélectif permettant l'isolement et l'enrichissement des Légionelles.

Composition type (g/l)	
Extrait de levure	10
Chlorhydrate de L-cystéine	0.4
Alpha-cétoglutarate	1
Pyrophosphate de fer III	0.25
Tampon ACES/ hydroxyde	10
Charbon activé	2
Agar	13

**Mueller Hinton**

Milieu non sélectif pour l'étude de la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques et les sulfamides.

Composition type (g/l)	
Extrait de viande	3
Hydrolysate acide de caséine	17.5
Amidon	1.5
Agar	16

**Annexe 02 : Préparation de la solution phénol 80%**

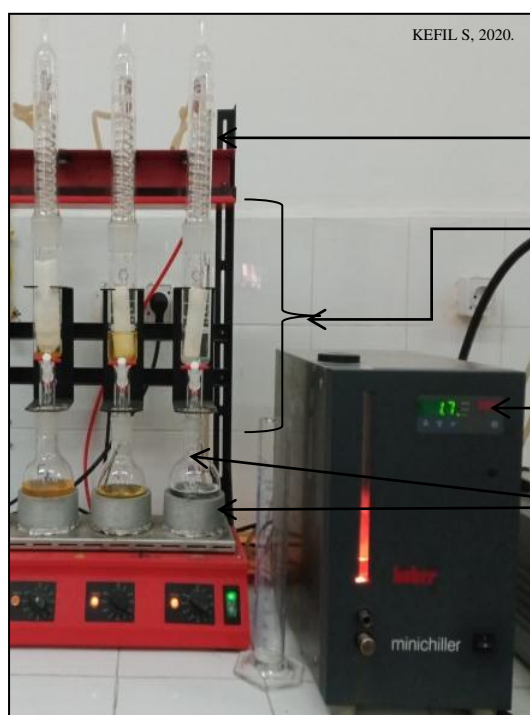
- Peser 80g de cristaux de phénol 80% dans 100ml d'eau distillée, chauffer et agiter jusqu'à dissolution complète.

### Annexe 03 : Dispositif du tamisage



**Figure 1 : Série de tamis (200-1000 $\mu$ m).**

### Annexe 04 : Description en photo de l'extraction des lipides.



- ← Réfrigérateur
- ← Extracteur Soxhlet (Echantillon dans la capsule en cellulose+ solvant).
- ← Thermorégulateur.
- ← Ballon et chauffe ballon.

**Figure2 : Dispositif d'extraction de lipides (Soxhlet).**

## Annexe 05 : Courbes d'étalonnage.

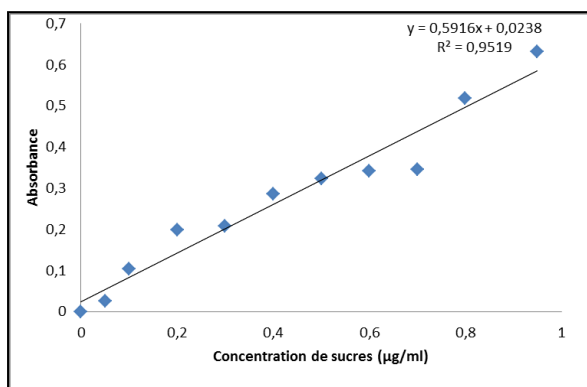


Figure 3: Courbe d'étalonnage des sucres.

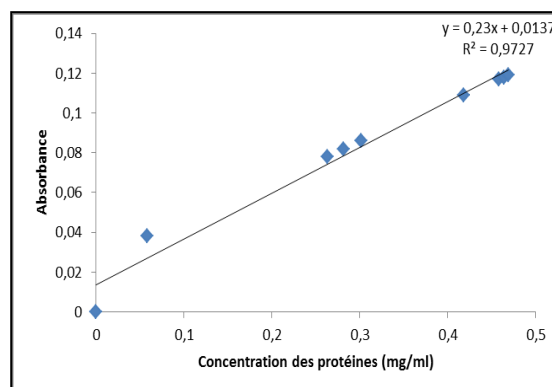


Figure 4: Courbe d'étalonnage des protéines.

## Annexe 06 : Composition biochimique de la carapace en photos.



Figure 5 : Cendres obtenues après calcination des coproduits de crevettes à 600°C pendant 4H.



Figure 6: Lipides et pigments extraits par méthode de Soxhlet.



Figure 7 : Résultat de la gamme étalon des protéines.

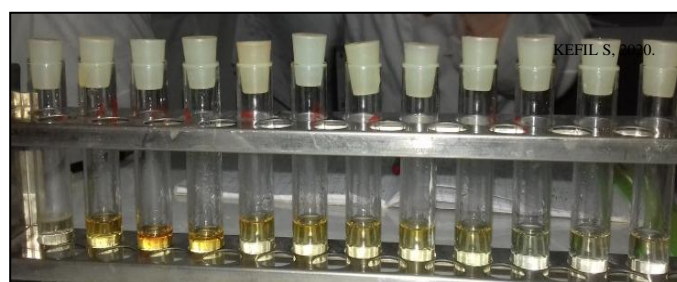


Figure 8 : Résultat de la gamme étalon des sucres.

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو إضافة قيمة إلى أصداف الجمبري المتحصل عليها من المصايد والمطاعم ؛ إنتاج الكيتوزان ودراسة خصائصه الفيزيائية والكيميائية والدوائية. كشف التركيب البيوكيميائي العام للمنتجات الثانوية للجمبري التي تحتوي على ثروة من المركبات ذات القيمة الغذائية والوظيفية العالية. تحتوي الهياكل الخارجية للجمبري التي تم تحليلها على كمية كبيرة من المعادن (32.6%) ، والبروتينات (24.26%) والكيتين (من 18.46% إلى 24.54%) ومركبات أخرى بمستويات أقل مثل الدهون والأصباغ. الكالسيوم عنصر معدني رئيسي بكتلة 387.548 غ / كغ. يأتي الفوسفور في المرتبة الثانية بكتلة 65.844 غ / كغ. الكلور والمغنيسيوم والكبريت والبوتاسيوم موجودون ولكن بكميات أقل. يتم استخلاص الكيتوزان بطريقتين ، إحداهما كيميائية والأخرى أنزيمية بالبييسين. يعتبر الاستخلاص الكيميائي أكثر كفاءة لأنه سمح بالحصول على كمية أكبر من الكيتوزان منزوع المعادن و البروتين بصفة جيدة. تراوحت عائدات الإنتاج الضخم وكذلك درجة نزع الأسيتيل 6.84% و 94.01% للكيتوزان الكيميائي ، و 8.01% و 91.66% للكيتوزان الأنزيمي. تمت دراسة قوة الكيتوزان المضادة للميكروبات والالتهابات. أظهرت النتائج أنه بغض النظر عن طريقة إنتاج الكيتوزان ، فإنه ليس له نشاط مضاد فيما يتعلق بالسلالات الممرضة التي تم اختبارها ، وهي *Legionella pneumophila* ، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Candida albicans*. ومع ذلك ، فإن هذه المادة الحيوية لها نشاط ممتاز مضاد للالتهابات ، متفوقاً على ديكلوفاك التجاري 1% ، مع إمكانية عالية لتثبيط الودمة بنسبة  $79.2 \pm 0.37\%$  للكيتوزان الكيميائي و  $59.45 \pm 0.5\%$  للكيتوزان الأنزيمي.

**الكلمات المفتاحية:** الكيتوزان، تثمين التكنولوجيا الحيوية ، منتجات الجمبري الثانوية ، الخصائص الفيزيائية والكيميائية والدوائية ، نشاط مضاد للميكروبات ، نشاط مضاد للالتهابات.

## Résumé

L'objectif de ce travail est de valoriser les carapaces de crevettes récupérées auprès des pêcheries et des restaurateurs ; produire du chitosane et étudier ses propriétés physico-chimiques et pharmacologiques. La détermination de la composition biochimique globale des coproduits de crevettes a révélé une mine de composés à haute valeur nutritive et fonctionnelle. Les exosquelettes des crevettes analysés contiennent une quantité considérable de minéraux (32.6 %), de protéines (24.26%) et de chitine (de 18.46% à 24.54%) et d'autres composés à des taux plus faibles tels que les lipides et les pigments. Le calcium est l'élément minéral majeur avec une masse de 387.548 g/kg. Le phosphore vient en deuxième position avec une masse de 65.844 g/kg. Le chlore, le magnésium, le soufre et le potassium sont présents mais à moindre abondance. Le chitosane est extrait par deux méthodes : l'une chimique et l'autre enzymatique à la pepsine. L'extraction chimique est plus efficace car elle a permis une hydrolyse plus importante pour obtenir un chitosane extrêmement déminéralisé et déprotéinisé. Les rendements massiques de production ainsi que le degré de désacétylation sont dans l'ordre de 6.84% et 94.01 % pour le chitosane chimique, de 8.01% et 91.66% pour le chitosane obtenu par voie enzymatique. Le pouvoir antimicrobien et anti-inflammatoire

du chitosane a été étudié. Les résultats obtenus montrent que quel que soit le mode de production du chitosane, celui-ci n'a pas d'activité antagoniste vis-à-vis des souches pathogènes testées à savoir *Legionella pneumophila*, *Escherchia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. Néanmoins, ce biomatériau possède une excellente activité anti-inflammatoire, supérieure à celle du diclofénac commercial à 1%, avec un potentiel élevé d'inhibition de l'œdème qui est de l'ordre de  $79.27\pm 0.37\%$  pour le chitosane chimique et  $59.45\pm 0.5\%$  pour le chitosane enzymatique.

**Mots clés :** Chitosane, Valorisation biotechnologique, Coproduits de crevettes, Caractérisation physico-chimique et pharmacologique, Activité antimicrobienne, Activité anti-inflammatoire.

## **Abstract**

The objective of this work is to enhance the shrimp shells recovered from fisheries and restaurateurs; produce chitosan and study its physico-chemical and pharmacological properties. Determination of the overall biochemical composition of shrimp co-products revealed a wealth of compounds with a high nutritional and functional value. The analyzed shrimp exoskeletons contain a considerable amount of minerals (32.6%), proteins (24.26%) and chitin (from 18.46% to 24.54%) and other compounds such as lipids and pigments at lower levels. Calcium is the major mineral with a mass of 387.548 g / kg and Phosphorus comes second with a mass of 65.844 g / kg. Chlorine, magnesium, sulfur and potassium are present but in less abundance. Chitosan is extracted by two methods, chemical extraction and the enzymatic extraction with pepsin. The chemical extraction is more efficient because it allows more hydrolysis to obtain an extremely demineralized and deproteinized chitosan. The mass production yield as well as the degree of deacetylation are respectively of the order of 6.84% and 94.01% for the chemical chitosan and 8.01% and 91.66% for the organically obtained chitosan. The antimicrobial and anti-inflammatory power of chitosan has been studied. The results obtained show that whatever the mode of production of chitosan, it has no antagonist activity with respect to the tested pathogenic strains, namely *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. However, this biomaterial has an excellent anti-inflammatory activity, higher than the commercial 1% diclofenac, with a high potential for inhibiting edema equal to  $79.27\pm 0.37\%$  for the chemical chitosan and  $59.45\pm 0.5\%$  for the enzymatic chitosan.

**Keywords:** Chitosan, Biotechnological valuation, shrimp waste, Physicochemical and pharmacological characterization, Antimicrobial activity, Anti-inflammatory activity.