



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**UNIVERSITÉ de TLEMCEM**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers**  
**Département d'AGRONOMIE**

**MÉMOIRE**

**En vue de l'obtention du Diplôme de MASTER**

**Option : Gestion de la Qualité Dans les Industries Agro-Alimentaires**

***CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE L'EFFET ANTIMICROBIEN,  
ADSORBANT DE COLORANTS ET CHÉLATEUR DES MÉTAUX  
LOURDS SUR BILLES DE CHITOSANE ÉLABORÉES À PARTIR  
DE DÉCHETS DE CRUSTACÉS***

Présenté par : **Mme BORSALI Née : BAGHLI Latifa ;**

**Mr. BENGHERBI Seif El-Islam.**

**Soutenu le : Jeudi 06 juillet 2017, devant le jury composé de :**

<b>Président</b>	Mr. EL AFFIFI Mohamed	MCB	Université de Tlemcen
<b>Examineur</b>	Mr. NAHAR Benameur	MCB	Université de Tlemcen
<b>Encadreur</b>	Mme. YUCEFI Fatma	MCB	Université de Tlemcen

**Année Universitaire : 2016-2017**

# REMERCIEMENTS

*Louange à DIEU le tout Puissant d'avoir insufflé en nous l'amour de la science et d'avoir guidé nos pas jusqu'à la réalisation de ce modeste travail. Prière et Salut sur notre Prophète « Mohammed » et sur sa famille et ses compagnons.*

*Nous tenons d'abord à exprimer toute notre gratitude, nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance à notre promotrice **Mme YOUCEFI F.**, Maître de conférences B au département d'Agronomie à l'Université Abou Baker Belkaid de Tlemcen, de nous avoir proposé ce sujet si passionnant, d'avoir accepté d'encadrer notre travail qu'elle a suivi régulièrement et de près, pour ses précieux conseils qu'elle n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail, son optimisme malgré toutes les contraintes, ainsi que sa rigueur scientifique qui nous a illuminé pour l'élaboration de ce mémoire. Sans oublier sa patience et ses qualités humaines et amicales.*

*Nous souhaitons également exprimer notre sincère gratitude à **Mr EL-AFFIFI M.** Maître de conférences B au département d'Agronomie, Université Abou Baker Belkaid de Tlemcen, qui a toujours si généreusement aidé et conseillé tous ses étudiants et collaborateurs. Nous tenons à le remercier de nous avoir fait l'honneur de prêter attention à notre travail et d'en présider le jury de soutenance.*

*Nous tenons à remercier également **Mr NAHAR B.** Maître de conférences B au département d'Agronomie, Université Abou Baker Belkaid de Tlemcen, pour ses conseils, sa collaboration et qui nous a fait l'honneur d'accepter de siéger à notre jury et d'examiner notre travail.*

*Nous exprimons nos remerciements à **Mme KARA-SLIMANE S.** Maître de conférences au département de chimie inorganique pour sa contribution, ainsi qu'au LRM laboratoire de Recherches des Macromolécules, spécialement **Mr Sid-Ahmed** et **Mme Zakia**; Sans oublier, **Mr Bensaha S.** du laboratoire de Chimie Inorganique et Environnement (CIE) de l'Université de Tlemcen laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO) de l'Université de Tlemcen, pour son aide et conseils. Nous profitons ici pour remercier **Melle Atiqa KERBBACHE**, assistante aux labos de Microbiologie au niveau du département, pour ses conseils et sa présence.*

*Nos vifs remerciements vont également à tous nos enseignants depuis la tendre enfance jusqu'à l'université, ceux qui ont contribué à notre formation scientifiquement, ce qui nous a permis d'acquérir cette part de connaissance dans l'univers du savoir. On ne pourrait qu'exprimer un infini remerciement plein de gratitude, à nos respectives petites et grandes familles, qui n'ont jamais arrêtés de nous encourager et de nous aider à aller de l'avant. Sans oublier tous nos amis. **Grand Merci à Tous.***

## ***Dédicaces***

➤ *Je dédie ce modeste travail à :*

*Mon respectueux mari,*

*Mes très chers enfants : El-Arabi, Nadjiba, Malika, Fayçal & Leila ;*

*Mes beaux-fils & Ma belle-fille ainsi qu'à mes petits anges :*

*Ghizlaine, Meriem & Adam.*

*Mes très chères : mère & belle-mère.*

*Tous mes frères, sœurs, beaux-frères & belles-sœurs ; nièces & neveux*

*Toute ma famille & mes amis.*

*Tous mes amis du Master, et ceux du laboratoire, ....*

***Grand Merci à Tous***

*respectueusement, Latifa*

➤ *Je dédie ce modeste travail à mes parents qui m'ont soutenu avec leurs encouragements et qui m'ont mené à cet aboutissement, en hommage affectueux.*

*A mes chers frères : Ismail, Mohamed, Sanaa et le petit Ghali.*

*A ma chère jolie sœur Amina et sa petite famille*

*A toute ma famille.*

*A tous mes amis : Yasmine, Amine, Rachid, Zakaria, Sofien, Lotfi, Noor, Nadira, Souhila, Atika , Zekri et Nassim.*

*A toutes les personnes que j'aime.*

*Latifa El-Islem*

*«DIEU créa en l'homme l'habilité de penser...  
L'habilité qu'a l'homme de penser, lui permet  
d'obtenir les informations désirées en combinant  
les connaissances universelles entre-elles,  
l'esprit universel obtient alors,  
comme résultat une image conforme  
aux détails extérieurs. »...*

*« God created in man the ability to think...  
Man's ability to think may try to obtain  
the desired information by combining  
the universals with each other,  
with the result that the mind obtains  
a universal picture that conforms  
to details outside. » ...*

*Ibn Khaldûn  
The Muqqaddimah.  
The Science of Logic.*

## Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antibactérien des billes de chitosane vis-à-vis de deux souches (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) et (*Escherichia coli* CIP 76.24), du pouvoir chélateur de certains métaux lourds et d'un colorant, ainsi que quelques paramètres physico-chimiques: le taux de protéines, de cendres et d'humidité.

Ce travail est réparti en plusieurs étapes :

- ✓ L'extraction du chitosane à partir des carapaces de crevettes avec élaboration des billes de chitosane ;
- ✓ L'étude de l'effet antimicrobien de ces billes sur une bactérie Gram-positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) et une Gram-négative (*Escherichia coli* CIP 76.24) ;
- ✓ La chélation des microbilles sur trois métaux lourds (Zn, Cu et Cd) et sur un colorant (rouge d'alizarine) ;
- ✓ La mesure de certains paramètres physico-chimiques : le taux de protéines, de cendres et d'humidité.

Nous avons démontré :

- L'effet antimicrobien par une réduction de la charge bactérienne supérieure à 50% pour les différentes concentrations de billes et pouvant atteindre presque les 80% pour *E. coli* et dépassant les 60% pour *B. subtilis* ;
- Le rôle chélateur des billes de chitosane vis-à-vis de certains métaux lourds avec une chélation totale au bout d'environ deux heures ; et pour le colorant l'alizarine, un maximum d'efficacité pour une dilution au 1/10 ème, dépassant ainsi les 90% de réduction.

Les caractéristiques physico-chimiques des billes de chitosane extraites sont : taux de protéines : 2,45% ; taux de cendres : 3,2% ; taux d'humidité : 6%.

**Mots clés :** Billes de chitosane, antagonisme, chélation, métaux lourds, colorant.

## Abstract

In this work, we investigated the antibacterial activity of chitosan beads against two strains (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) and (*Escherichia coli* CIP 76.24), the chelating power of certain heavy metals and of a dye, as well as some physico-chemical parameters: the level of proteins, ash and moisture.

This work is divided into several steps:

- ✓ Extraction of chitosan from shrimp shells with the production of chitosan beads;
- ✓ Study of the antimicrobial effect of these beads on a Gram-positive bacterium (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) and a Gram-negative bacterium (*Escherichia coli* CIP 76.24);
- ✓ Chelation of microbeads on three heavy metals (Zn, Cu and Cd) and on a dye (alizarin red);
- ✓ The measurement of certain physicochemical parameters: the rate of protein, ash and moisture.

We have demonstrated:

- The antimicrobial effect by reducing the bacterial load by more than 50% for the various concentrations of beads and up to almost 80% for *E. coli* and exceeding 60% for *B. subtilis*;
- The chelating role of chitosan beads against certain heavy metals with total chelation after about two hours; And for the alizarin dye, a maximum efficiency for a 1/10 dilution, thus exceeding the 90% reduction.

The physico-chemical characteristics of the extracted chitosan beads are: protein content: 2.45%; Ash rate: 3.2%; Moisture content: 6%.

**Key words:** Chitosan beads, antagonism, chelation, heavy metals, dye.

## ملخص

في هذا العمل، وجهنا اهتمامنا لدراسة قوة مضادة للبكتيريا من حبيبات الكيتوزان وجها لوجه السلالتين (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) و (*Escherichia coli* CIP 76.24)، قوة عملية إزالة معدن ثقيل لبعض المعادن الثقيلة و للملون، بالإضافة إلى بعض الاعدادات الفيزيائية و الكيميائية: معدل البروتينات، الرماد و الرطوبة

وينقسم هذا العمل إلى عدة خطوات:

- ✓ استخراج الكيتوزان من ذرائع الجمبري مع انتاج حبيبات الكيتوزان.
- ✓ دراسة تأثير مضادات الميكروبات من هذه الحبيبات على البكتيريا ايجابية الجرام (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) وسلبية الغرام (*Escherichia coli* CIP 76.24)؛
- ✓ عملية إزالة معدن ثقيل للحبيبات الدقيقة على ثلاثة معادن ثقيلة (Cd و Zn, Cu) وعلى ملون (أحمر الأليزارين)
- ✓ قياس بعض المعلمات الفيزيائية والكيميائية: معدل البروتين و الرماد و الرطوبة.

لقد أثبتنا:

- تأثير مضادات الميكروبات عن طريق تقليل الحمل البكتيري من 50٪ لتركيزات مختلفة من الحبيبات المتمكنة للوصول إلى ما يقارب 80٪ ل *E. coli* و ما يزيد عن 60٪ ل *B. Subtilis*
- دور عملية إزالة معدن ثقيل لحبيبات الكيتوزان وجها لوجه بعض المعادن الثقيلة مع عملية كاملة في حدود ساعتين (2)، و لملون الأليزارين فعالية قصوى لتخفيف إلى 1/10، وكذا تجاوز 90٪ من التخفيض

الخصائص الفيزيائية والكيميائية لحبيبات الكيتوزان المستخرجة هي: معدل البروتين: 2.45٪. معدل الرماد: 3.2٪، معدل الرطوبة: 6٪.

**الكلمات المفتاحية:** حبيبات الكيتوزان، التضاد البكتيري، عملية إزالة معدن ثقيل، المعادن الثقيلة، الملون.

## Sommaire

Sommaire .....	i
Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	ix
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
Introduction générale.....	2
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	5
I. La dépollution des eaux usées.....	6
I.1 Introduction.....	6
I.2 Généralités sur la pollution .....	6
I.2.1. Définition .....	6
I.2.2. La pollution d'origine humaine.....	6
I.2.3. La pollution d'origine environnementale .....	7
I.3 La pollution de l'eau .....	7
I.3.1. Origines des pollutions des eaux .....	7
I.3.1.1. Eaux domestiques.....	8
I.3.1.2. Eaux pluviales .....	8
I.3.1.3. Eaux industrielles.....	8
I.3.1.4. Eaux agricoles .....	9
I.4 Evaluation de la pollution de l'eau .....	9
I.4.1. Principaux types de pollution .....	9
I.4.1.1. Pollution organique .....	9
I.4.1.2. Pollution minérale .....	10
I.4.1.3. Pollution microbienne .....	10
I.4.1.4. Pollution par les métaux lourds.....	10
I.4.1.5. Pollution par les colorantes.....	11
I.5 La dépollution des eaux usées.....	11
I.5.1. Les différents types de dépollution .....	11
I.5.1.1. Prétraitement .....	11
I.5.1.2. Les méthodes physico-chimiques.....	12
I.5.1.3. Les méthodes biologiques .....	14

I.5.1.4.	Les méthodes chimiques .....	14
I.5.1.5.	Conclusion .....	15
I.6	Les différents dépolluants .....	16
I.6.1.	Les dépolluants artificiels (le charbon actif).....	16
I.6.2.	Les dépolluants d'origine naturelle .....	16
I.6.2.1.	Les bactéries .....	17
I.6.2.2.	Les algues.....	17
I.6.2.3.	La bentonite.....	17
I.6.2.4.	Les champignons et produits chitineux.....	17
I.7	Situation de la réutilisation des eaux usées en Algérie .....	18
I.7.1.	Aspect législatif.....	19
II.	Le chitosane.....	20
II.1	Historique : .....	20
II.2	Définition et caractéristiques : .....	20
II.3	Méthode d'obtention du chitosane : .....	21
II.4	Propriétés du chitosane :.....	24
II.4.1.	Propriétés physico-chimiques : .....	24
II.4.1.1.	Effet de la masse molaire et du degré de désacétylation du chitosane: .....	24
II.4.1.2.	La viscosité :.....	25
II.4.1.3.	La structure cristalline du chitosane : .....	26
II.4.2.	Propriétés biologiques du chitosane :.....	26
II.4.2.1.	Biodégradabilité : .....	26
II.4.3.	Toxicité systémique : .....	27
II.4.4.	Hémocompatibilité : .....	27
II.4.5.	Cytocompatibilité: .....	27
II.5	Activités antimicrobienne du chitosane :.....	28
II.6	Activités fongistatiques : .....	29
II.7	Applications du chitosane : .....	29
II.7.1.	Les applications dans le domaine du traitement des eaux .....	31
II.7.1.1.	Le Chitosane : un matériau adsorbant .....	31
II.7.2.	Autres applications.....	32
III.	Les métaux lourds.....	34
III.1	Introduction.....	34

III.2	Définition .....	34
III.3	Origines des métaux lourds : .....	35
III.3.1.	Les sources naturelles .....	35
III.3.2.	Les sources humaines.....	36
III.4	La toxicité des métaux lourds.....	37
III.4.1.	Contamination des sols : .....	38
III.4.1.1.	Devenirs des métaux lourds dans les sols .....	39
III.4.1.2.	Le processus de transfert .....	40
III.4.2.	Contamination de l'air .....	41
III.4.3.	Contamination de l'eau .....	41
III.4.4.	Toxicité et effet sur la santé .....	42
III.4.4.1.	Exposition .....	42
III.4.4.2.	Symptômes neurologiques.....	43
III.4.4.3.	Symptômes de la tête.....	43
III.4.4.4.	Symptômes digestifs .....	43
III.4.4.5.	Symptômes cardiaques .....	43
III.5	Normes et réglementation .....	43
IV.	Les colorants.....	46
IV.1	Historique .....	46
IV.2	Classification des colorants .....	47
IV.2.1.	Classification selon la constitution chimique .....	47
IV.2.2.	Les colorants utilisés en alimentaire .....	49
IV.3	Les colorants et leurs impacts environnementaux.....	49
IV.4	Toxicité des colorants.....	50
IV.5	Législation sur l'environnement.....	51
CHAPITRE II : MATÉRIELS & MÉTHODES.....		53
V.1	L'objectif du mémoire .....	54
V.1.1.	Préparation de la chitine et de ses dérivés .....	54
V.1.2.	Préparation des billes de chitosane .....	56
V.2	Les souches pathogènes.....	57
V.3	Milieus de culture et conditions de croissance .....	57
V.4	Etude de l'évolution de la cinétique de croissance .....	57
V.5	Suivi de la Concentration minimale inhibitrice: (test de micro-dilution) .....	58

V.6	Dosage des métaux lourds .....	58
V.6.1.	Objectif : .....	58
V.6.2.	Analyse en spectrophotométrie à absorption atomique : .....	58
V.6.2.1.	Principe : .....	58
V.6.2.2.	Appareillage : .....	59
V.6.2.3.	Protocole de dosage.....	59
V.6.3.	Mode opératoire : .....	60
V.6.3.1.	Préparation de la solution métallique : .....	60
V.6.3.1.	Lecture en spectrophotométrie d'absorption atomique : .....	61
V.7	Effet des billes de chitosane sur un colorant « Rouge d'alizarine » .....	63
V.7.1.	Les colorants .....	63
V.7.2.	Le matériel .....	64
V.7.3.	Préparation des solutions de colorant .....	64
V.7.4.	Le calcul du taux d'inhibition d'un paramètre : .....	64
V.8	Dosage de la fraction protéique du chitosane .....	64
V.9	Détermination de la teneur en cendres .....	66
V.10	Détermination du taux d'humidité .....	67
V.10.1.	Définition .....	67
V.10.2.	Principe .....	67
V.10.3.	Mode opératoire : Dessiccation sans pré-séchage.....	67
CHAPITRE III : RÉSULTATS & DISCUSSIONS.....		69
VI.1	Préparation du chitosane et de ses microbilles : .....	70
VI.2	Les souches pathogènes et la cinétique bactérienne.....	71
VI.3	Suivi de la concentration minimale inhibitrice avec les microbilles de chitosane sur les souches.....	72
VI.4	La biosorption des métaux par les microbilles de chitosane .....	75
VI.4.1.	Pour le cas de Zinc (Zn).....	76
VI.4.2.	Pour le cas de Cadmium (Cd).....	77
VI.4.3.	Pour le cas de Cuivre (Cu) : .....	78
VI.5	Effets des billes de chitosane sur un colorant : le rouge d'alizarine .....	80
VI.6	Dosage des protéines .....	84
VI.7	Le taux de cendres.....	85
VI.8	Le taux d'humidité : .....	85
VI.8.1.	Détermination de la teneur en eau dans les billes de chitosane préparés.....	85

CONCLUSION GÉNÉRALE .....	87
Conclusion générale .....	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	89

## Liste des tableaux

TABLEAU 1- UTILISATION DU CHITOSANE EN FONCTION DE SA PURETE. (ANDRIEUX, 2004).....	30
TABLEAU 2 - PRINCIPAUX AVANTAGES ET INCONVENIENTS DU CHITOSANE COMME MATERIAU ADSORBANT POUR LE TRAITEMENT DES EAUX POLLUEES. ....	32
TABLEAU 3 - RAPPORT DU FLUX LIE A L'ACTIVITE HUMAINE ET LE FLUX NATUREL DES METAUX LOURDS (LUCKHAM, P. F ET ROSSI, S. 1999).....	36
TABLEAU 4 - SOURCES INDUSTRIELLES ET AGRICOLES DES METAUX LOURDES (GRIM, R.E.1968). ....	37
TABLEAU 5 - TENEURS NATURELLES DE QUELQUES ELEMENTS TRACES DANS LES SOLS ET APPORTS ANTHROPIQUES (EN MG/KG). (KOZAKI ET AL .2000) .....	40
TABLEAU 6 - CONCENTRATIONS EN METAUX ET METALLOÏDES DEFINISSANT LES LIMITES DE QUALITE D'UNE EAU POTABLE (LEGISLATION FRANÇAISE, OMS) (DABROWSKI, ET AL .2005) .....	44
TABLEAU 7 - SEUILS DE REJETS DES METAUX EN ALGERIE D'APRES LE JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 24, 16 AVRIL. 2006 .....	45
TABLEAU 8 - VALEURS LIMITES DES PARAMETRES DE REJETS D'EFFLUENTS TEXTILES (SIEDLECKA ET AL, 2007)...	52
TABLEAU 9 - NATURE ET ORIGINE DES DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES PATHOGENES UTILISEES .....	57
TABLEAU 10 - LES PARAMETRES DE MESURE DE CHAQUE ELEMENT METALLIQUE .....	62
TABLEAU 11 - DILUTIONS DE LA SOLUTION MERE DE BSA (100 MG / L) POUR LA COURBE D'ETALONNAGE.....	65
TABLEAU 12 - LA QUANTITE DE METAL (ZN) BIOSORBEE (ADSORBEE) EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT DES MICROBILLES AVEC LA SOLUTION METALLIQUE (ORIGINAL).....	75
TABLEAU 13 - LA QUANTITE DE METAL (Cd) BIOSORBEE (ADSORBEE) EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT DES MICROBILLES AVEC LA SOLUTION METALLIQUE (ORIGINAL).....	75
TABLEAU 14 - LA QUANTITE DE METAL (Cu) BIOSORBEE (ADSORBEE) EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT DES MICROBILLES AVEC LA SOLUTION METALLIQUE (ORIGINAL).....	76
TABLEAU 15 - VALEURS D'ETALONNAGE POUR LE ROUGE D'ALIZARINE.....	81

## Liste des figures

FIGURE 1 - STRUCTURE CHIMIQUE DU CHITOSANE (NUGRAHA, 2006). .....	21
FIGURE 2 - MODE DE PREPARATION DE LA CHITINE ET DU CHITOSANE. (CRINI ET AL, 2009).....	22
FIGURE 3 - CONVERSION DE LA CHITINE EN CHITOSANE PAR DESACETYLATION BENSABA, (2010). .....	24
FIGURE 4 - DIFFERENTES FORMES DE CHITOSANE PRODUITES. (ARAREM F., 2010).....	33
FIGURE 5 - CONSEQUENCES DE LA BIOACCUMULATION APRES DEVERSEMENT DE SUBSTANCES TOXIQUES (INSECTICIDES) DANS UN COURS D'EAU (LITTLE L.W., CHILLINGWORTH M.A.,1974).....	50
FIGURE 6 - (1) CARAPACES DE CREVETTES LAVES/SECHES (2) CARAPACES DES CREVETTES BROYEES, (ORIGINAL).55	
FIGURE 7 - (3) ETAPE DEMINERALISATION ; (4) E. DE1ROTEINATION ; (5) E. DESACETYLATION. (ORIGINAL)....	55
FIGURE 8 - (6) CHITINE DEPROTEINEE -(7) CHITOSANE EXTRAIT-(8) CHITOSANE EN POUDRE. (ORIGINAL).....	56
FIGURE 9 - CHITOSANE EXTRAIT QUI SERA SOLUBILISE PUIS BILLES/LENTILLES DE CHITOSANE PRODUITES (ORIGINAL).....	56
FIGURE 10 - PREPARATION DE DIFFERENTES SOLUTIONS METALLIQUES AVEC LES BILLES DE CHITOSANE. (ORIGINAL).....	61
FIGURE 11 - PHOTO D'UN SPECTROPHOTOMETRE D'ABSORPTION ATOMIQUE PERKIN-ELMER A ANALYSTE 300.....	61
FIGURE 12 - FORMULE DEVELOPEE DU ROUGE D'ALIZARINE (WIKIPEDIA.ORG/WIKI/ALIZARINE) .....	63
FIGURE 13 - BILLES DE CHITOSANE. (1) BILLES DE CHITOSANE DU COMMERCE ; (2) B. DE CHITOSANE EXTRAIT ET (3) B. DE CHITOSANE MISES A SECHER. (ORIGINAL).....	70
FIGURE 14 - (A)CHITOSANE EXTRAIT SOLUBILISE ; (B) MICROBILLES OBTENUES APRES SECHAGE ET MOUTURE (ORIGINAL).....	71
FIGURE 15 - CINETIQUE BACTERIENNE DE BACILLUS SUBTILIS DANS LE MILIEU BHIB SUR PLUS DE 12H.....	72
FIGURE 16 - CINETIQUE BACTERIENNE D'ESCHERICHIA COLI DANS LE MILIEU BHIB APRES PLUS DE 12H. ....	72
FIGURE 17 - POUVOIR ANTAGONISTE DU CHITOSANE EN PRESENCE DE BACILLUS SUBTILIS ET D'ESCHERICHIA COLI A DIFFERENTES CONCENTRATIONS (25 ;50 ;75 ET 100 MG). .....	73
FIGURE 18 - DENOMBREMENT DE LA CHARGE MICROBIENNE BACILLUS SUBTILIS PAR LA METHODE DES SPOTS SUR M.H. EN PRESENCE DU CHITOSANE. (ORIGINAL) .....	73
FIGURE 19 - CINETIQUE DE BIOSORPTION DU ZINC PAR LES BILLES DE CHITOSANE : $C_0 = 100 \text{ mg/L}$ ; $m/v = 1 \text{ g/L}$ . .....	77
FIGURE 20 - CINETIQUE DE BIOSORPTION DU CADMIUM PAR LES BILLES DE CHITOSANE : $C_0 = 100 \text{ mg/L}$ ; $m/v =$ $1 \text{ g/L}$ .....	78
FIGURE 21 - CINETIQUE DE BIOSORPTION DU ZINC PAR LES BILLES DE CHITOSANE : $C_0 = 100 \text{ mg/L}$ ; $m/v = 1 \text{ g/L}$ . .....	79
FIGURE 22 - CINETIQUE DE BIOSORPTION DES METAUX (Cd, Zn, Cu) PAR LES BILLES DE CHITOSANE .....	79
FIGURE 23 - DETERMINATION DU $\lambda \text{ MAX}$ POUR LE ROUGE ALIZARINE.....	80
FIGURE 24 - LES VALEURS D'ETALONNAGE DU ROUGE D'ALIZARINE A 500NM. ....	81
FIGURE 25 - L'ACTION CHELATANTE DU CHITOSANE DU COMMERCE ET EXTRAIT VIS-A-VIS DU ROUGE D'ALIZARINE A 250MG/L. (ORIGINAL).....	82

FIGURE 26 - CHELATION DU COLORANT (ROUGE D'ALIZARINE) PAR LE CHITOSANE EXTRAIT ET DU COMMERCE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS (25 ;50 ;75 ET 100 MG).....	82
FIGURE 27 - LA CHELATION DU ROUGE D'ALIZARINE AVEC LE CHITOSANE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS.....	83
FIGURE 28 - TAUX D'ABATTEMENT ET DE CHELATION DU COLORANT AVEC LE CHITOSANE EXTRAIT (ORIGINAL)...	84
FIGURE 29 - CHELATION PRESQUE TOTALE DE L'ALIZARINE PAR LE CHITOSANE POUR UNE DILUTION AU 1/10 (ORIGINAL).....	84

## Liste des abréviations

- °C : Degré Celsius
- μ : Micro.
- AA : L'acide acétique
- ATCC : American Type Culture Collection
- *B.s* : *Bacillus subtilis*
- CIP : Collection de souches de l'Institut Pasteur
- CO<sub>2</sub>: dioxyde de carbone
- DA : Degré d'acétylation
- DD : Degré de désacétylation
- DL50: Dose létale 50
- DO : densité optique
- *E.c* : *Escherichia coli*
- ED : Eau distillée
- EFSA: European Food Safety Authority
- EMEA: European Medicines Evaluation Agency,
- FAO: « Food and agriculture organization », Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
- FDA: Food and Drug Agency
- g : Gramme.
- Gram (-): Gram négative.
- Gram (+): Gram positive.
- GRAS: Generally Recognized As Safe
- h : Heure
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène
- Hcl : l'acide chlorhydrique
- HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
- IR : Infra rouge
- KDa: Kilodalton
- mn : minute
- MPa: Megapascal

- **Na<sub>2</sub> Tartrate** : Sodium tartrate
- **Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Bicarbonate de sodium
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **NaOH** : Hydroxyde de Sodium
- **nm** : nanomètre
- **P/V** : Poids par volume
- **pH** : Potentiel D'Hydrogène
- **Ppm** : Partie par million
- **RMN** : Résonance magnétique nucléaire
- **UFC**: unité formant colonie
- **UV** : Ultra-violet
- **v/v** : volume par volume

***INTRODUCTION***  
***GÉNÉRALE***

## Introduction générale

L'eau, matière première essentielle pour tous les êtres vivants sur notre planète. Tous les phénomènes vitaux de la biosphère sont liés à la disponibilité de l'eau. Le développement accéléré des sociétés humaines s'accompagne souvent d'une pollution cruelle, de l'atmosphère et des eaux qui posent un réel problème pour l'environnement. La pollution de l'hydrosphère, survient lorsque des matières sont déversées dans l'eau qui en dégrade la qualité, en effet, ces activités génèrent une grande diversité de produits chimiques qui se déversent dans le cycle de l'eau, mettant en péril le fragile équilibre naturel qui a permis à la vie de se développer sur la terre. **(Barka, 2008).**

Tous les pays du monde sont concernés par la protection de l'environnement et la sauvegarde des ressources en eau douce, soit parce qu'ils manquent d'eau ou qu'ils la polluent. **(Hammami, 2008).** Pour le grand public, un effluent coloré est obligatoirement pollué et dangereux. Notons aussi, que l'activité industrielle en matière d'extraction ou élaboration de métaux génère des effluents aqueux chargés en éléments métalliques toxiques à des concentrations variables, et rejetés quelquefois sans traitement dans le milieu récepteur. Ainsi, la pollution des eaux par les métaux lourds et les colorants suscite actuellement une grande inquiétude quant à la qualité de l'eau. Chaque année et d'après notre ministère de l'environnement plus de 100 million de m<sup>3</sup> d'eaux usées contenant des colorants ont été rejetées dans l'environnement en Algérie. **(Benguella, 2009).** Ce fait conduit à recourir à des critères plus adaptés pour la protection des populations exposées à des contaminations par ces colorants et ou ces espèces métalliques; le danger de ces derniers réside dans leur accumulation dont résultent des conséquences graves sur les écosystèmes et par la suite sur la santé de l'homme. **(Liu et Fang, 2002).** Donc, il est important de rechercher des moyens d'épuration sévères des eaux usées industrielles avant leur rejet dans le milieu naturel. **(Benguella, 2009).**

Plusieurs techniques ont été employées pour l'élimination des polluants à partir des effluents Industriels. L'adsorption est l'une des techniques les plus utilisées pour cette élimination. Le charbon actif est l'adsorbant le plus communément employé, mais il reste très onéreux et nécessite en plus une régénération, ce qui limite son utilisation. Ainsi, au cours des récentes

décennies, la recherche des matériaux adsorbants bon marché, ayant une efficacité comparable à celle des charbons actifs comme le gel de silice, les zéolithes, les algues, les matériaux argileux (bentonite, Kaolinite...) et les produits chitineux, a constitué un important thème de recherche. Ces adsorbants naturels ont été étudiés avec succès pour l'élimination des polluants des cours d'eau, tels que les métaux lourds, les colorants réactifs et même les microbes. (Ilhan, 2006).

Ces bioprocédés de traitement faisant appel à des matériaux naturels tels que la chitine et le chitosane, qui sont des biopolymères très attractifs économiquement dans le traitement des eaux usées, grâce à leurs propriétés intrinsèques, leur abondance et leur faible coût. En plus, ils sont biodégradables et résorbables deux propriétés primordiales à notre époque où la protection de l'environnement joue un rôle important (Benguella, 2009).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antibactérien vis-à-vis de deux souches pathogènes (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) et (*Escherichia coli* CIP 76.24), du pouvoir chélateur de certains métaux lourds et d'un colorant par des billes de chitosane, ainsi que la caractérisation de quelques paramètres physico-chimiques : le taux de protéines, de cendres et d'humidité.

Ce travail est structuré en trois chapitres :

✚ Le premier chapitre aborde la synthèse bibliographique, structurée en quatre parties : la dépollution, le chitosane, les métaux lourds et les colorants ; avec certaines méthodes de caractérisations telles que : la spectrophotométrie UV-visible et la spectrométrie d'absorption atomique.

✚ Le second chapitre : Matériels & Méthodes, dans lequel sont présentés :

- ✓ L'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevettes.
- ✓ La désacétylation de la chitine pour former le chitosane.
- ✓ L'élaboration des billes de chitosane.
- ✓ L'effet antimicrobien de ces billes sur une bactérie Gram-positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) et une Gram-négative (*Escherichia coli* CIP 76.24).
- ✓ L'effet chélateur des microbilles sur trois métaux lourds (Zn, Cu et Cd) et sur un colorant (rouge d'alizarine).

✓ Et la mesure de certains paramètres physico-chimiques : le taux de protéines, de cendres et d'humidité.

✚ Le troisième et dernier chapitre est consacré à l'exploitation des différents résultats expérimentaux et à leurs interprétations.

✚ Nous terminons ce travail par une conclusion générale et les perspectives envisagées.

***CHAPITRE I :***  
***SYNTHÈSE***  
***BIBLIOGRAPHIQUE***

## I. La dépollution des eaux usées.

### I.1 Introduction

L'eau est un composé chimique simple, liquide à température et pression ambiantes, sa formule chimique est « H<sub>2</sub>O », c'est-à-dire que chaque molécule d'eau se compose d'un atome d'oxygène et de deux atomes d'hydrogène (**Abdesselem, 1999**).

Les activités humaines ont des impacts de pollution sur les milieux naturels aquatiques : l'homme déverse des déchets dans les mers, les océans, les rivières et les lacs (les eaux superficielles). Mais cela touche aussi les réserves d'eau douces souterraines que l'on appelle les nappes phréatiques (les eaux souterraines). Ces pollutions sont d'origine diverses : elles peuvent être d'origine chimique, agricole, industrielle et domestique.

Mieux produire et moins polluer sont les défis auxquels sont confrontés les industriels de tout secteur. Toujours, le traitement des eaux usées s'est fait de manière biologique. Se basant sur l'autoépuration naturelle des eaux, l'homme a alors construit des systèmes de traitement biologique de plus en plus perfectionnés.

Cependant, les stations de traitement biologiques ne peuvent pas traiter les substances difficilement biodégradables ou toxiques (**Hammami, 2008**).

### I.2 Généralités sur la pollution

#### I.2.1. Définition

La pollution est une dégradation de l'environnement par l'introduction dans l'air, l'eau ou le sol de matières n'étant pas présentes naturellement dans le milieu. Elle entraîne une perturbation de l'écosystème dont les conséquences peuvent aller jusqu'à la migration ou l'extinction de certaines espèces incapables de s'adapter au changement qui se pose dans l'environnement.

#### I.2.2. La pollution d'origine humaine

Les pollutions d'origine humaine, dites aussi anthropiques, ont de nombreuses formes qui peuvent être locales, culturelles, ponctuelles, accidentelles, diffuses, chroniques, génétiques, volontaires, involontaires, etc.

Cette pollution est une diffusion directe ou indirecte dans l'environnement de polluants. Ce sont souvent des sous-produits involontaires d'une activité humaine, comme les émissions des

pots d'échappement. Les déchets de produits de consommation courants (emballages, batteries usagées) jetés sans précautions dans l'environnement biophysique et dans l'environnement humain, constituent également une source de pollution très fréquente.

Il peut aussi s'agir de phénomènes physiques (comme la chaleur, la lumière, la radioactivité, l'électromagnétisme, etc.), dont le caractère impur ou malsain est généralement relatif car dépendant de la dose, de la durée d'exposition etc.

### **I.2.3. La pollution d'origine environnementale**

La pollution d'origine environnementale peut être soit:

- a. la conséquence directe ou indirecte de catastrophe naturelles, tels que le volcanisme ;
- b. liée à des phénomènes naturels, tels que les éruptions solaires ;
- c. la conséquence d'un captage d'eau potable par un animal qui ferait ses besoins à proximité ou qui serait mort et en décomposition dans l'eau.

## **I.3 La pollution de l'eau**

La pollution de l'eau est actuellement en tête des problèmes de l'environnement, car l'eau est l'interface entre l'air et le sol, subit donc les dégradations de ces deux milieux (**Bouziati, 2000**). L'eau compte tenu de ses propriétés physico-chimiques est trop souvent utilisée par l'homme comme un vecteur d'évacuation de la majorité de ses déchets, ainsi pollué, elle devienne un vecteur de pollution (**Emilian, 2004**).

La pollution de l'eau est peut être observée à différents niveaux dont on cite:

- Les nappes ou les sources d'eaux par suite d'infiltration d'eaux usées ;
- Les eaux de surfaces: les fleuves; les rivières et les oueds qui sont rouilles par les déversements des eaux non traités ;
- Les canalisations et les réseaux d'alimentations en eau (**Bouziati, 2000**).

### **I.3.1. Origines des pollutions des eaux**

La pollution des eaux provient essentiellement des activités domestiques et industrielles ainsi que des précipitations, elle perturbe les conditions de vie de la flore et la faune aquatiques, elle compromet également l'utilisation de l'eau et l'équilibre du milieu aquatique,

on distingue quatre grandes catégories d'eaux usées : les eaux domestiques, les eaux pluviales, les eaux industrielles et les eaux agricoles (**Gommella et Gurree, 1983**).

#### **I.3.1.1. Eaux domestiques**

Dans les eaux domestiques on distingue les eaux ménagères et les eaux vannes.

##### **a- Eaux ménagères**

Elles sont essentiellement porteuses de pollution organique. Les eaux des cuisines contiennent des matières insolubles (terre, débris divers), des matières extraites des aliments (organiques ou minérales) ainsi que les graisses provenant de la cuisson, par exemple : les eaux des salles de bains, les eaux des machines à lessiver qui renferment des savons et des détergents et des eaux de lavages des locaux qui sont riches en particules solides (terre, sable,...etc.) et surtout en détergents et désinfectants (eaux de javel, produit de base de chlore ou d'ammoniaque,...) (**Baghdad et Chadouli, 2010**).

##### **b- Eaux des vannes**

Il s'agit des rejets de toilettes, chargés de diverses matières organiques azotées et Des germes fécaux (**Baghdad et Chadouli, 2010**).

#### **I.3.1.2. Eaux pluviales**

Elles peuvent constituer la cause de pollution importante des cours d'eau, notamment pendant les périodes orageuses. L'eau de pluie se charge d'impuretés au contact de l'air (fumée industrielles), puis en ruissellent, des résidus déposés sur les toits et les chaussées des villes (huiles des vidanges, carburants, résidus de pneus et métaux lourds,...) (**Ezziane, 2007**).

#### **I.3.1.3. Eaux industrielles**

Elles sont très différentes des eaux usées domestiques, leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre en plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micros polluants organiques des hydrocarbures.

Certaines d'entre elles doivent faire l'objet d'un pré traitement de la part des industries avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte, elles sont mêlées aux eaux domestiques que

l'or qu'elles ne présentent plus de danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des usines de dépollution (**Paul, 1998**).

#### **I.3.1.4. Eaux agricoles**

Sont particulièrement chargées en nitrates et phosphates qui provoquent l'eutrophisation des cours d'eau entraînant la prolifération des algues qui, lors de leur putréfaction, consomment l'oxygène dissous dans l'eau ce qui va perturber l'autoépuration (**Ezziane, 2007**).

### **I.4 Evaluation de la pollution de l'eau**

#### **I.4.1. Principaux types de pollution**

La composition des eaux usées est en fonction de nombreux paramètres tel que :

- La Propriété physico-chimique de l'eau potable distribuée,
- Le Mode de vie des usagers,
- L'Importance et le type des rejets industriels.

D'une manière générale selon (**Raymond, 1997**) la pollution des eaux se manifeste sous les formes principales suivantes :

##### **I.4.1.1. Pollution organique**

La pollution organique constitue la partie la plus importante, et comprend essentiellement des composés biodégradables. Ces composés sont de diverses origines (**Bechac et Boutin, 1984**).

#### **A. D'origine urbaine**

Les protides (les protéines) : qui représentent tous les organismes vivants qui sont de nature protéique telle que les animaux, les bactéries et même les virus. Ces protéines subissent une décomposition chimique au contact de l'eau (hydrolyse) en donnant des acides aminés. Les lipides (corps gras) : ce sont des éléments rejetés généralement par les eaux domestiques telles que les graisses animales, et les huiles végétales. Leurs décompositions en milieu aérobie se traduit par une libération du CO<sub>2</sub>, et en anaérobiose, il y a formation de CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>.

Les glucides : à l'état simple, il s'agit des sucres alimentaires, le glucose, à l'état complet donnant les polysaccharides (**Ezziane, 2007**).

## **B. D'origine industrielle**

Le développement considérable des activités industrielles c'est la cause d'un accroissement important des pollutions suite aux sous produites organique et inorganiques des activités humaines. Ces derniers existent depuis des siècles mais leur nocivité s'est exercée à cause de leurs excès qui dépasse les capacités de destruction et de recyclage des organismes décomposeurs présents dans tous les écosystèmes. (**Koller, 2004**).

### **I.4.1.2. Pollution minérale**

Il s'agit principalement d'effluents industriels contenant des substances minérales tel que : les sels, les nitrates, les chlorures, les phosphates, les ions métalliques, le chrome, le cuivre et le chlore.

### **I.4.1.3. Pollution microbienne**

Les bactéries, virus et autres agents pathogènes vivant dans les eaux souterraines composent ce que l'on appelle la pollution microbiologique. Elle vient généralement de décharges, d'épandages d'eaux usées, de l'élevage, de fosses septiques, de fuites de canalisations et d'égouts, d'infiltration d'eaux superficielles, de matières fermentées ou du rejet d'eaux superficielle. Ces microorganismes nocifs peuvent générer des maladies graves dans les cas de contact ou d'ingestion de l'eau qui est chargé de ces microorganismes (**Paul, 1998**).

### **I.4.1.4. Pollution par les métaux lourds**

Parmi les métaux lourds dangereux pour la santé, il faut citer le plomb, le mercure, le cadmium, l'arsenic, le cuivre, le zinc et le chrome. Ces métaux se trouvent à l'état naturel dans le sol, sous forme de traces qui posent peu de problèmes. Cependant, quand ils sont concentrés dans des aires particulières, ils posent un grave danger. L'arsenic et le cadmium, par exemple, peuvent causer le cancer. Le mercure peut provoquer des mutations et des dégâts génétiques, tandis que le cuivre, le plomb et le mercure peuvent causer des lésions aux os (**Ezziane, 2007**).

#### **I.4.1.5. Pollution par les colorantes**

Ils sont utilisés dans l'industrie des cosmétiques, la coloration des métaux (aluminium anodisé), la photographie (sensibilisateurs), la biologie (coloration des préparations microscopiques), les indicateurs colorés, et certains d'entre eux sont employés en thérapeutique (antiseptiques, etc.).

Ils contribuent aux problèmes de pollution liés à la génération d'une quantité considérable d'eau usée contenant des colorants résiduels (**Greene et al, 1996**), Le rejet de ces eaux résiduaires dans l'écosystème est une source dramatique de pollution, d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique et par conséquent présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter l'homme par transport à travers la chaîne alimentaire.

### **I.5 La dépollution des eaux usées**

Les ressources en eau douce de surface comme les cours d'eau fournissent une eau brute qui contient énormément de pollutions qui la rendent non potable ; l'élimination de ces polluants est indispensable. Dans ce but l'eau brute va subir un certain nombre de traitements nécessaires pour la rendre potable.

#### **I.5.1. Les différents types de dépollution**

Il est nécessaire de traiter les eaux usées car il contient des quantités importantes en colorant et en métaux lourds ainsi que de charge importante de microorganismes et différents polluants.

##### **I.5.1.1. Prétraitement**

Il sert à éliminer les éléments solides ou les particulaires les plus grossiers, susceptibles de gêner les traitements ultérieurs ou d'endommager les équipements : volumineux (dégrillage) qui comprend :

- a- Le Dégrillage :** qui consiste à retenir tous les gros déchets. Pour ce faire, un système de grille est mis en place, dont l'espacement dépend de la nature des déchets. Le dégrillage a pour objectif de protection de la station de traitement (**Aoubed, 2007**).

**b- Déshuilage** : C'est étape indispensable notamment pour éviter le bouchage des canalisations et protéger les équipements contre l'abrasion. Ce dessablage est par décantation. Les sables extraits sont envoyés en décharge (**Bechac et Boutin, 1984**).

#### **I.5.1.2. Les méthodes physico-chimiques**

##### **a. La coagulation-précipitation**

Cette technique permet l'élimination des colorants et des ions métalliques par coagulation-floculation-décantation, grâce à l'ajout de cations trivalents, tels  $Fe^{3+}$  ou  $Al^{3+}$  (**Cardot, 1999**).

Cette méthode consiste à la coagulation par l'ajout d'un réactif chimique, ce qui entraîne la déstabilisation des particules colloïdales, suivit de leur agglomération (floculation) en micro-floc, puis en flocons volumineux et décantables.

La neutralisation de la charge superficielle (potentiel zêta) est réalisée au moyen de coagulants minéraux à base de cation trivalent, tels que sulfate et chlorure d'alumine, chlorure et sulfate ferrique, ou organiques de synthèse à caractère cationique, tel que : l'épichlorhydrinediméthyl-amine.

Les flocculants peuvent être des macromolécules ioniques ou neutres, non ioniques, anioniques, cationiques ou encore des adjuvants naturels qui favorisent la floculation en complément des réactifs minéraux, tel que la silice activée, l'argile, les alginates ou l'amidon. Cependant, cette technique, à elle seule, ne suffit pas toujours pour réduire la concentration de ces polluants jusqu'aux seuils admissibles par les normes de qualité de l'eau, qu'il s'agisse des ions métalliques ou des colorants. De plus, parallèlement à une production de boues importante, le coût des adjuvants est relativement élevé.

Par conséquent, pour évaluer le coût d'exploitation d'une installation de traitement d'eaux par coagulation-floculation-précipitation, il conviendrait également de prendre en compte le coût du traitement des boues et si nécessaire celui d'un post-traitement à la précipitation (**Jouen et al 2000**).

### **b- Les techniques membranaires**

Les procédés membranaires sont des techniques de séparation par perméabilité à travers une membrane, sous l'action d'un gradient de pression. La séparation se fait en fonction des tailles moléculaires des composés, mais aussi de leur forme, leur structure, leur polarisabilité, leur solubilité, de la présence de Co-solubilité, de matériau et de la configuration de la membrane, des paramètres opératoires, etc.

Les techniques membranaires regroupent la microfiltration, l'ultrafiltration, la nano filtration, et l'osmose inverse. Les cations métalliques et les colorants ne sont retenus par la microfiltration, ils le sont partie par l'ultrafiltration. La nano filtration permet d'obtenir de meilleur rendement, mais environ 1 à 2% de résidus d'ions métalliques (**Laimé, 2003**) et de colorants selon (**Robinson et al 2001**) subsistent dans le perméat. L'osmose inverse est le procédé membranaire le plus efficace, en ce sens qu'elle permet d'enlever quasiment tous les composés de l'eau mais, en raison du cout relativement élevé des membranes, ce procédé est surtout réservé à la potabilisation.

### **c. L'échange d'ions**

L'échange d'ions est le procédé au moyen duquel les ions d'une certaine charge (positive ou négative) contenue dans une solution sont éliminés et remplacés par une quantité équivalente d'autres ions de même charge émis par un solide (l'échangeur d'ions). Ainsi, les métaux précieux ou nobles, tel que l'argent ou le cuivre et les substances nocives, comme le cyanure, peuvent être récupérés et remplacés par d'autres ions sans valeur ou moins nocif.

Généralement, les résines sont employées en naval des procédés de précipitation ou d'électrolyse. Par conséquent, les concentrations d'ions métalliques en entrée sont relativement faibles (< 500mg/l), les concentrations résiduelles atteintes sont de l'ordre de 0,05 à 0,1 mg/l. en pratique, l'échange d'ions permet par exemple l'adoucissement et la décarbonatation des effluents ou d'une eau naturelle, en éliminant les ions calcium et les carbonates. Ce procédé s'applique aussi bien aux effluents contenant des colorants (**Osnick, 2009**) et des ions métalliques (**Malik et al, 2007**).

### **d. L'adsorption**

L'adsorption est une technique de transfert de matière entre une phase liquide (ou gazeuse) chargée en composés organiques ou inorganiques et une phase solide, l'adsorbant.

Pendant des décennies, les charbons actifs commerciaux ont été les principaux, voir les seuls adsorbants utilisés dans les filières de traitement d'eaux. En effet, l'adsorption sur le charbon actif présente de nombreux avantages: elle permet l'élimination d'une large gamme de polluants, dont différents types de colorants, mais aussi d'autres polluants organiques et inorganiques, tels que les phénols, les ions métalliques et les pesticides, les substances humiques, les détergents, ainsi que les composés responsables du goût et de l'odeurs.

A l'inverse de la précipitation, l'adsorption est plutôt efficace dans le domaine des faibles concentrations. Ces principaux inconvénients dans la compétition pour l'adsorption entre molécules de taille différentes et le prix relativement élevé des matériaux (**Ferandon et al. 1998**).

Mais depuis quelques décennies les macromolécules biologiques telles que les produits chitineux (chitine et chitosane) entre autres, développé au chapitre II.

#### **I.5.1.3. Les méthodes biologiques**

Ces procédés exploitent certains mécanismes de résistance développés par les microorganismes (bactéries, algues, champignons et levures), qui sont capables de fixer et accumuler les métaux et les colorants (**Diard, 1996**). Ces micro-organismes appelés aussi biomasse, qui sont d'origine forestière, agricole, aquatique, déchets urbains et industriels, sont les plus sérieux pour le développement de bioprocédés d'épuration, dans de nombreux pays (**Goudeau, 1985**) Parmi ceci, le processus de la biosorption, correspond à l'utilisation de matériaux biologiques pour la fixation des polluants par adsorption.

Ces traitements sont biologiques et permettent d'éliminer les polluants dissous. Pour cela on utilise des populations de micro-organismes capables de les consommer. Dans les cas étudiés, le principe général est de favoriser la croissance de communautés de bactéries aérobies, c'est-à-dire qui prélève l'O<sub>2</sub> pour leur métabolisme.

#### **I.5.1.4. Les méthodes chimiques**

Les techniques d'oxydation chimique sont généralement appliquées quand les procédés biologiques sont inefficaces. Elles peuvent être ainsi utilisées en étape de prétraitement pour les procédés biologiques. L'oxydation chimique est souvent appliquée pour le traitement des

eaux usées contenant des polluants non biodégradables et /ou toxiques et de fortes concentrations que les autres procédés ne peuvent pas traiter ou transformer en produits biodégradables et/ou non toxiques. Ainsi, l'oxydation chimique se révèle un procédé efficace de traitement des eaux usées. On distingue:

- a- les procédés classiques d'oxydation chimique
- b- les procédés d'oxydation avancée.

Les procédés classiques d'oxydation chimique sont basés sur l'ajout d'un agent oxydant dans la solution à traiter. Les principaux agents oxydants sont:

**\*Cl<sub>2</sub>**: représente un oxydant moyennement fort et est utilisé pour le traitement des eaux usées ou plutôt pour la désinfection comme l'ozone. En revanche, ils présentent l'inconvénient de produire des sous-produits halogénés cancérigènes pour l'homme.

**\*O<sub>2</sub>**: il est considéré comme un oxydant modéré, le coût tolérable de ce procédé le rend fréquemment choisi.

**\*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: il est considéré parmi les oxydants les plus appropriés et les plus recommandés pour une grande variété de procédé, utilisé avec ou sans catalyseur. Toutefois, l'utilisation de cet oxydant seul n'est pas efficace pour la plupart des produits organiques.

**\*O<sub>3</sub>**: c'est un oxydant très fort qui a presque le même avantage que l'oxygène ou le Peroxyde d'hydrogène. Le problème majeur lié à l'utilisation de cet oxydant est son Instabilité, d'où la nécessité de production sur le site. Il a été observé que l'oxydation chimique avec l'un de ces oxydants n'est pas toujours efficace pour le traitement des polluants organiques persistants. Dans ce cas, nous avons fait appel aux procédés d'oxydation avancée (**Hammami, 2008**).

#### **I.5.1.5. Conclusion**

Les technologies conventionnelles d'élimination des polluantes dans les effluents industriels telles que : la précipitation, l'échange d'ion, l'électrolyse, l'adsorption..., ont atteint leurs

limites dans beaucoup de cas surtout pour les faibles concentrations inférieures à 100 mg/l (**Benaïssa et al 1994**).

Le prix d'exploitation élevé, la complexité et la faible efficacité des procédés membranaires limitent leur utilisation dans l'élimination des polluantes (**Budries, 1997**). Grâce à la biotechnologie et devant le besoin d'une nouvelle technique plus performante, économiquement compétitive, les procédés biologiques par l'utilisation des matériaux physico-chimiques (méthodes traditionnelles) pur de faible concentration (**Benaïssa et Benguella, 1999**).

Ils peuvent également être utilisés pour épurer des effluents fortement pollués d'où la performance et la crédibilité de ces matériaux.

## **I.6 Les différents dépolluants**

Il existe différents dépolluants soit d'origine naturelle soit des dépolluants artificiels :

### **I.6.1. Les dépolluants artificiels (le charbon actif)**

Les charbons actifs sont de loin les adsorbants les plus fabriqués et utilisés industriellement. Ils ont diverses applications notamment dans les domaines de la purification de l'eau, et de l'air. Le pouvoir d'adsorption des charbons actifs est attribué à la porosité, la surface spécifique, et les groupements fonctionnels de surface (**Peker et al, 1995**).

Les caractéristiques des charbons actifs varient en fonction des précurseurs (matériau de départ) et de la méthode d'activation ils peuvent être présentés sous trois formes différentes : grains, poudre, ou fibre (pouvant se présenter sous forme de tissu ou feutre).

### **I.6.2. Les dépolluants d'origine naturelle**

Ils sont caractérisés par la propriété de « biosorption », ce terme est utilisé pour décrire la propriété des matériaux d'origine naturelle, morts ou vivants, à retenir des ions métalliques lourds ainsi que des éléments radioactifs (**Kadirvelu et al, 2008**). La Biosorption fait partie des procédés biologiques qui mettent en jeu l'affinité des micro-organismes (bactéries, algues, champignons et levures) appelés aussi biomasses ou biosorbants pour les ions métalliques pour une épuration efficace des effluents industriels, à un coût économiquement acceptable (**Diard, 1996**).

### **I.6.2.1. Les bactéries**

Les biomasses bactériennes sont générées en quantités relativement importantes comme sous-produits de l'industrie agro-alimentaire. On distingue deux grands groupes en fonction de leur comportement lors d'un protocole de coloration, dite coloration de Gram : les bactéries Gram+ et Gram-. Le résultat (+ ou -) de la coloration dépend de la nature et de l'agencement de polymère (**Diard, 1996**).

Les bactéries ont un rapport surface/volume élevé, ce qui est une caractéristique, qui tend à augmenter leur capacité d'adsorption (**Mullen et al, 1989**).

### **I.6.2.2. Les algues**

Leur paroi est composée de fibres, emprisonnées dans une matrice amorphe. Les fibres sont constituées d'un polymère du glucose : la cellulose, la matrice est de composition variable suivant les espèces : acide alginique, galactose. Les principaux composants de cette structure sont riches en groupements carboxyle, hydroxyle, amine, phosphate et thiol (**Brady et al, 1994**).

### **I.6.2.3. La bentonite**

Les bentonites se caractérisent par une capacité élevée d'adsorption, d'échange ionique et de gonflement, ainsi que par des propriétés rhéologiques particulières (thixotropie). Les minéraux argileux qui font partie du groupe des phyllosilicates se composent de couches élémentaires organisées de manière caractéristique : tétraèdres (SiO) et octaèdres (Al/MgO OH) ; Le feuillet élémentaire de la montmorillonite est formé par une couche octaédrique comprise entre deux couches tétraédriques.

Les nombreux minéraux argileux et groupes de minéraux argileux se différencient d'abord par l'empilement et le décalage de leurs feuillets élémentaires, ainsi que par la substitution des atomes isomorphes dans le réseau cristallin (**Laribi et al, 2005**)

### **I.6.2.4. Les champignons et produits chitineux**

L'architecture de la paroi est complexe car elle est composée de plusieurs couches mettant en jeu différents constituants tels que la chitine (polymère de N-acétyl glucosamine),

chitosane forme désacétylée de chitine, d'autres glucides et de protéines permettant la rétention des cations métalliques (Brierley, 1991).

La richesse de ces composants en groupements fonctionnels (fonction carboxyle, amines) est l'un des atouts majeurs des champignons dans le domaine de la biosorption des métaux (Guibal et al, 1990). Parmi les champignons, on peut citer *Rhizopus arrhizus* qui contient 18% de protéines, 24% d'hexosamines (chitine et chitosane), 19% d'acide uronique, 13 % de sucre naturel et 9% de phosphate (Fourest, 1993).

## I.7 Situation de la réutilisation des eaux usées en Algérie

La réutilisation des eaux usées épurées est une action volontaire et planifiée qui vise la production de quantités complémentaires en eau pour différents usages.

Aujourd'hui la stratégie nationale du développement durable en Algérie se matérialise particulièrement à travers un plan stratégique qui réunit trois dimensions à savoir : Sociale, Economique et Environnementale (MRE, 2012).

Le réseau national d'assainissement totalise un linéaire de 27000 kilomètres. Le taux de recouvrement est, hors population éparsée, de 85%. Le volume global d'eaux usées rejetées annuellement est évalué à près de 600 millions de m<sup>3</sup>, dont 550 pour les seules agglomérations du nord. Ce chiffre passerait à près de 1150 millions de m<sup>3</sup> à l'horizon 2020.

La réutilisation des eaux usées épurées pour l'irrigation doit concerner en priorité les zones déficitaires en eau conventionnelle (MRE, 2012). Parmi les stations d'épuration exploitées par l'ONA (Office nationale d'assainissement) à travers les 43 wilayas (Départements), quelques-unes sont concernées par la réutilisation des eaux usées épurées en agriculture. A fin 2011, le volume réutilisé est estimé à 17 millions de m<sup>3</sup>/an, afin d'irriguer plus de 10 000 hectares de superficie agricoles (MRE, 2012).

Le potentiel de la réutilisation des eaux usées épurées à des fins agricoles évoluera d'une manière significative d'environ 17 millions de m<sup>3</sup> en 2011 à environ 200 millions de m<sup>3</sup> en 2014, et le nombre de stations concernées sera de 25 stations d'épurations à l'horizon 2014 (MRE, 2012). Les stations d'épurations gérées par l'ONA concernées par les projets de

réutilisation des eaux usées épurées en cours d'étude ou de réalisation, sont au nombre de 12, pour l'irrigation de plus de 8 000 hectares de terres agricoles (MRE, 2012).

Un plan d'action entre ONA et ONID (Office national d'irrigation et de drainage) est en cours d'étude, pour définir les possibilités réelles d'une éventuelle réutilisation des eaux usées épurées des stations d'épurations exploitées par l'ONA pour l'irrigation des grands périmètres d'irrigation (GPI) gérés par l'ONID au niveau des cinq (05) bassins hydrographiques à l'échelle nationale (MRE, 2012).

### **I.7.1. Aspect législatif**

Le décret exécutif n° 07-149 de 20 mai 2007 publié dans le Journal Officiel de la République Algérienne n° 35, 23 mai 2007, fixe les modalités d'utilisation des eaux usées épurées à des fins d'irrigation sous forme de concession ainsi que le cahier des charges-type y afférent (JO, 2007). Ce décret règle tous les processus d'utilisation des eaux usées épurées par les stations d'épurations, par une demande adressée par un concessionnaire au Wali (premier responsable de la Wilaya ou département) de la région, cette demande comporte une convention avec la station d'épuration qui fournit les eaux usées épurées.

Le contrôle technique, la gestion des périmètres irrigués et le contrôle sanitaire ainsi que la qualité de l'eau épurée et des produits agricoles est assurée par les directions territoriales de chaque wilaya sous tutelle de différents ministères: ressources en eau, agriculture, santé, environnement et commerce. (JO, 2007).

## II. Le chitosane

### II.1 Historique :

Au 19<sup>ème</sup> siècle, le Pr Braconnot, directeur du jardin botanique de Nancy (France) fût le premier à isoler une fraction de la membrane filamenteuse de certains champignons, qu'il a appelé « fungina » ; et qui était insoluble dans les solutions aqueuses. Cette découverte précède de trente ans l'isolement de la cellulose des plantes. En 1823, la même substance a été découverte dans certains insectes (coléoptère) et a été nommée « chitine » par Auguste Odier (chitine issue du mot grec « kitos » signifiant l'enveloppe). (No et Meyers, 1995)

En 1859, le Professeur C. Rouget, obtint une chitine modifiée par traitement avec de la potasse concentrée à température élevée : un produit soluble dans les solutions aqueuses acides ; baptisé chitosan ou chitosane, quatre décennies plus tard, par le chimiste allemand Félix Hoppe-Seyler en 1894. Ce n'est qu'au siècle suivant (1934) qu'un procédé de fabrication du chitosane à partir de son parent naturel, la chitine, est décrit par Rigby dans un brevet (Li et al, 1992). Mais le véritable intérêt aux produits chitineux (chitine et chitosane) se manifeste, deux siècles après la première découverte de la chitine, dans les années 1970, par les 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, facteurs essentiels à la protection de l'environnement. (Truong et al, 2007)

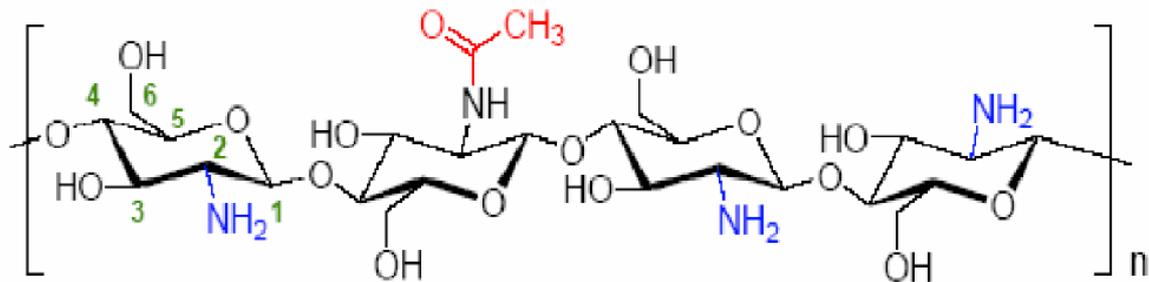
### II.2 Définition et caractéristiques :

Le chitosane est un polysaccharide de formule  $[C_6H_{11}NO_4]_n$ , de structure linéaire et un biopolymère cationique de glucosamine partiellement acétylé. (Baldwin et al, 1995). Le mot chitosane ne représente pas une seule et unique structure chimique, mais s'adresse à toute une famille de copolymères linéaires à arrangement aléatoire d'unités N-acétyle-D-glucosamine et de D-glucosamine avec des proportions variables, liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -(1-4) (figure II.1.) qui confèrent de bonnes caractéristiques filmogènes hydrophiles au chitosane. (Caroline et al, 2006).

Le chitosane est un produit naturel obtenu par désacétylation de la chitine, qui est le produit naturel le plus abondant après la cellulose (Andrieux, 2004) à partir de la carapace : des

crustacés (crabes, crevettes), des mollusques et insectes, par des processus chimiques ou microbiologiques et peut aussi être synthétisé par certaines moisissures (*Penicillium notatum* ; *Aspergillus niger*,...) (No et al, 2002 ; Qin et al, 2006)

La désacétylation est la frontière entre la chitine et le chitosane, qui a un degré de désacétylation (DD) de (60-70)% : en-deçà le composé est nommé chitine, au-delà, chitosane (Aranaz et al, 2009)



**Figure 1** - Structure chimique du chitosane (Nugraha, 2006).

La désacétylation est la réaction de transformation de la chitine en chitosane qui consiste à enlever suffisamment de groupes acétyles (CH<sub>3</sub>-CO) de la chitine pour permettre au chitosane d'être soluble dans la plupart des acides organiques dilués.

Cette opération libère les groupes amines (NH) et confère au chitosane un caractère "cationique" particulièrement intéressant en milieu acide surtout que la plupart des polysaccharides du même type sont le plus souvent neutres ou chargés négativement. Ceci peut engendrer des changements au niveau de la solubilité, de l'activité antimicrobienne et d'autres propriétés du chitosane" (Devlieghere, 2004).

### II.3 Méthode d'obtention du chitosane :

L'industrie de transformation des produits de la mer génère d'énormes quantités de chitine qui peuvent facilement être recyclées, la production de la chitine par biomasse est aussi abondante que celle de la cellulose et sa production annuelle est estimée à 10<sup>10</sup>-10<sup>12</sup> tonnes.

Pour produire la chitine à partir d'exosquelettes de crustacés, il suffit d'enlever les protéines associées au polymère, de même que le calcium que l'on retrouve en grandes concentrations.

Après cette purification, on peut désacétyler la chitine dans une solution d'hydroxyde de sodium à 40 % à 120 °C durant 1 à 3 h. Un tel traitement produit généralement, 70 % de chitosane (Jalal Zohuriaan-Mehr M., 2005).

La production de chitosane est décrite à la (Figure 2.)

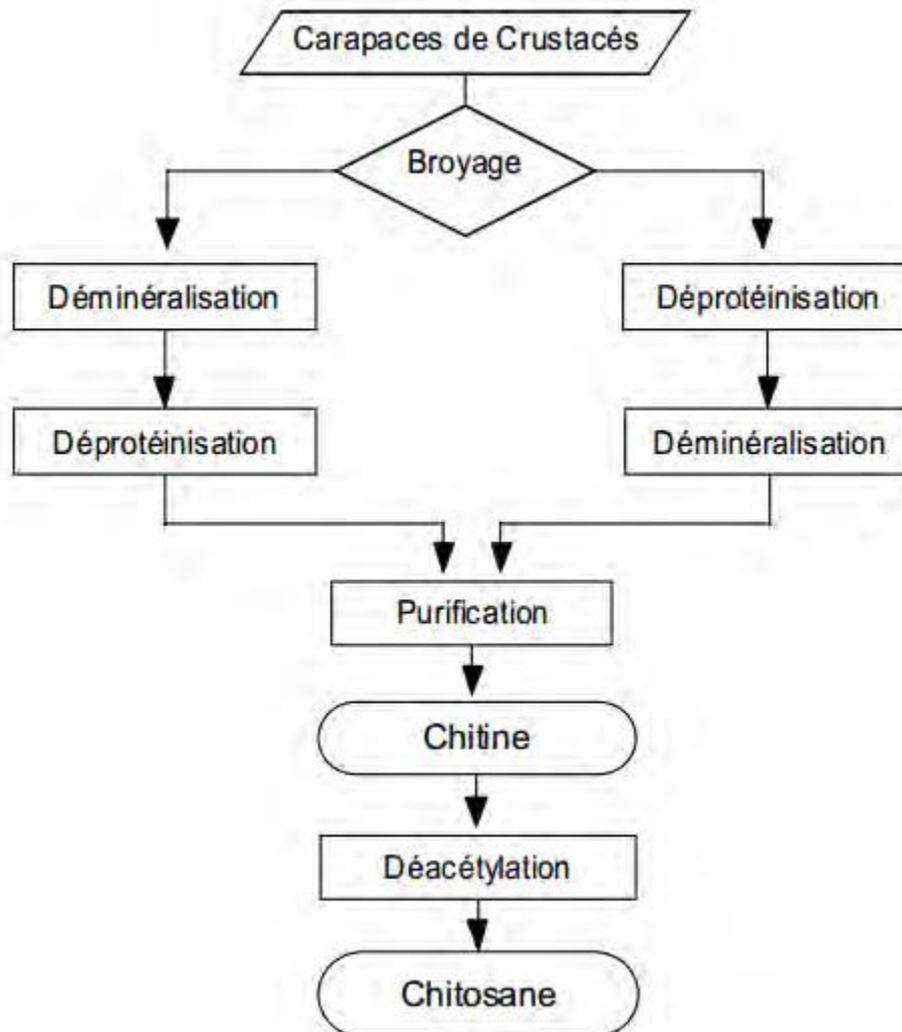


Figure 2 - Mode de préparation de la chitine et du chitosane. (Crini et al, 2009)

La figure (2) décrit la production du chitosane par voie chimique. Elle comprend essentiellement trois étapes successives : La déminéralisation, la déprotéination et la désacétylation (Truong et al, 2007).

Pour réaliser l'étape de désacétylation, trois procédés différents ont été développés :

- Le premier procédé, ou la méthode chimique, utilise uniquement du NaOH concentré et demande entre trois à quatre jours pour atteindre un degré de désacétylation de 70 à 75 % (**Hirano, 1989**).
- Le second procédé repose sur une réaction enzymatique faisant appel aux enzymes trypsine, chitosanase et/ou mycelia (**Frehaut, 2002; Nwe et Stevens, 2002**). Les hydrolyses enzymatiques sont effectuées en 28h, pour atteindre le même degré de désacétylation, (74 %) (**Pelletier, 1991**). Mais génère des inconvénients majeurs, à savoir les quantités importantes d'enzymes nécessaires à la réaction (691 mg-chitosanase/g-chitine) et ensuite, la difficulté de les isoler (**Plonski et al, 1990**).
- Le troisième procédé de désacétylation est réalisé par une technique thermomécanique en utilisant des autoclaves en cascade. En milieu basique NaOH, une température de 230 °C et une pression de 17,24 MPa (2 500 psi), cette technique, semble être la plus rapide des trois procédés puisqu'elle nécessite 24h pour atteindre un degré de désacétylation de 71 % (**Chatterjee et al, 2005**). L'inconvénient majeur de cette technique réside dans les besoins d'infrastructures tels que l'installation d'autoclaves en cascade avec une pressurisation sous atmosphère d'azote (**No et al, 2000 ; Pelletier, 1991**).
- La désacétylation est la réaction de transformation de la chitine en chitosane. Elle consiste à enlever suffisamment de groupes acétyle (CH<sub>3</sub>-CO) de la chitine pour permettre au chitosane d'être soluble dans la plupart des acides organiques dilués. Cette opération libère les groupes amines (NH) et confère au chitosane un caractère "cationique" (**Benabbou, 2009**). Figure 3.

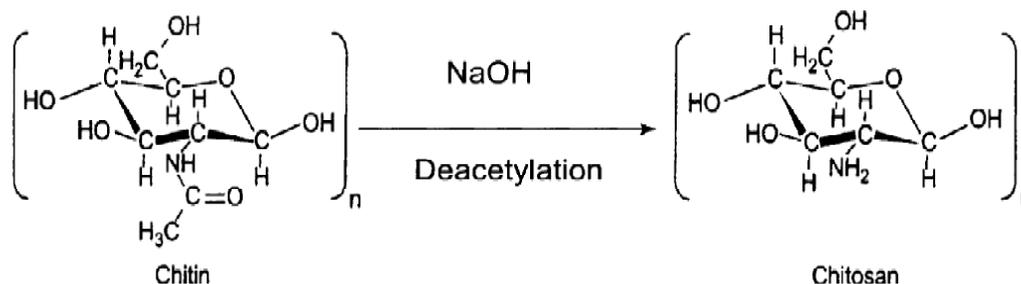


Figure 3 - Conversion de la chitine en chitosane par désacétylation **Bensaha, (2010)**.

## II.4 Propriétés du chitosane :

### II.4.1. Propriétés physico-chimiques :

La viscosité des solutions de chitosane est affectée par différents paramètres: le degré de désacétylation, le poids moléculaire, la concentration, les liaisons ioniques, la température et le pH. A un pH supérieur (>6,5), les groupements ne sont plus ionisés et le chitosane se précipite. Autour de pH 6, le nombre de fonctions amine libres devient suffisamment élevé pour induire une association des chaînes et la précipitation du polymère. (**Rabea et al, 2003**).

La différence dans les méthodes de préparation du chitosane est susceptible d'influencer le degré de "désacétylation, la distribution des groupements acétyles et la conformité de la structure du chitosane (**Tsai et al, 2006**).

#### II.4.1.1. Effet de la masse molaire et du degré de désacétylation du chitosane:

L'effet des masses molaires du chitosane (240 ; 291 ; 340 ; 410 kg/mol) sur les propriétés mécaniques et barrière des films obtenus, a été étudié par (**Chen et Hwa, 1996**), qui ont conclu que :

- Plus la masse molaire du chitosane augmente, plus la contrainte à la rupture augmente ;
- Plus la masse molaire du chitosane augmente, plus la perméabilité à la vapeur d'eau diminue.

Donc, le chitosane de haute masse molaire possède les meilleures propriétés mécaniques et barrière, comparé à celui de faible masse molaire. Cette étude a montré que la résistance à la traction des films de chitosane augmente avec l'augmentation de la masse molaire.

Quant au degré de désacétylation du chitosane, (**Wiles et al, 2000**) ont conclu qu'il n'y a pas d'effet significatif sur la perméabilité à la vapeur d'eau, après avoir étudié l'effet de trois degrés de désacétylation du chitosane (92 ; 84 ; 73 % DD) sur la perméabilité à la vapeur d'eau. Il paraît que le DD du chitosane affecte beaucoup plus les propriétés antimicrobiennes des films de chitosane que les propriétés mécaniques et barrière.

Les propriétés particulières du chitosane sont liées essentiellement à la présence de la fonction amine portée par le carbone 2. Elles sont de deux types :

- A pH acide, le chitosane porte de nombreuses charges positives. C'est un bon agent de floculation et un bon agent de coagulation dans la décontamination des effluents. Il peut interagir avec des molécules chargées négativement (par exemple acides gras, protéines ...) peut former ainsi des complexes poly-anion/poly-cation. Cette propriété permet de multiples applications dermo-cosmétologie entre autres : elle permet d'interagir de façon très intime avec les kératines de la peau et ainsi former un film à la surface de celle-ci (**Pejic et al, 2009**).
- A pH supérieur à 6,5, le chitosane perd ses charges positives, le doublet électronique de l'azote est libre. Ce qui permet au chitosane de se comporter comme un excellent complexant, en particulier des métaux lourds. Il est donc utilisé pour la purification des eaux, par exemple pour la récupération de métaux dans les effluents industriels, mais aussi comme agent antibactérien (**Crini et al, 2009**).

#### II.4.1.2. La viscosité :

La viscosité du chitosane dépend du degré d'acétylation 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 (**Wang et Xu, 1994**). Notons que la viscosité augmente avec la concentration du polymère mais, qu'elle chute lorsque la température augmente (**Pejic et al,**

2009). Plus le pH est bas plus la viscosité est importante, alors que la viscosité intrinsèque est cohérente avec l'augmentation du poids moléculaire (Berth et al, 1998).

#### II.4.1.3. La structure cristalline du chitosane :

Samuels, (1981), propose pour le chitosane deux types de cristallinité différentes ; le type I du chitosane correspondant à un faible degré de désacétylation (60%) c'est des sels de chitosane bien plus ordonné que le type II, à fort degré de désacétylation (90%) (forme amine libre). Notons que le chitosane se cristallise dans le système orthorhombique.

#### II.4.2. Propriétés biologiques du chitosane :

##### II.4.2.1. Biodégradabilité :

Chez l'homme et les mammifères, la biodégradation et la biorésorption sont assurées par des lysozymes qui dégradent les liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidiques des unités (N-acétyl glucosamine) en des résidus (N-acétyl-glucosamine) et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme (Valenti et al, 2003 ; Lestaevel et al, 2003). Même si, actuellement, les mécanismes d'actions ne sont pas totalement éclaircis.

Un chitosane de DA 50% est ainsi facilement dégradé in vivo dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps (Paradossi et al,1992). La dégradation dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharides (DA, masse molaire...) (Kamiyama et al, 1999).

L'influence de la structure cristalline, de l'agrégation des N-acétyl-glucosamines et de leur distribution a été mise en évidence (Shigemasa et al, 1995).

Une étude plus approfondie a montré d'abord une augmentation de la susceptibilité enzymatique pour les DA supérieurs à 50%, puis une diminution avec le DA, et finalement une absence de dégradation pour un chitosane de DA3 (Brevet par : Shoenfeldt et al, 2002). Cette influence du DA est également constatée, in vitro (dégradation par des lysozymes) et in vivo (implantation sous cutanée) (Dupasquier, 2011).

Un chitosane de DA 50% semble donc permettre une dégradation optimale.

#### **II.4.3. Toxicité systémique :**

Dans le cas d'administration orale, la dose létale DL50 dépasse les 16 g/kg/jour chez la souris, soit une dose supérieure à celle du saccharose (12 g/kg/jour). L'administration sous-cutanée de chitosane conduit à une valeur de DL50 supérieure à 10 g/kg/jour chez la souris. Globalement, pour des doses administrées adéquates, la non-toxicité du chitosane est admise que ça soit pour des applications diététiques et cosmétiques, chez l'homme et certains animaux. **(Rao et al, 1997).**

#### **II.4.4. Hémostabilité :**

Si le chitosane montre une activité hémostatique particulièrement sous forme d'un solide de haute masse, les oligomères de chitosane et le chitosane hydrolysé de faible masse molaire soluble dans l'eau ne présentent aucune activité thrombogène **(Malette et al, 1983)**. Notons que l'hémostabilité, correspond à la mesure du degré et de la durée des altérations de l'hémostase causée par un biomatériau.

Le chitosane a la capacité d'induire la formation d'un coagulat lorsqu'il est en contact avec des érythrocytes, même dans le cas du sang héparine **(Klokkevold et al, 1999)**. Cet effet hémostatique du chitosane est attribué à un mécanisme indépendant de la cascade de coagulation classique. Il entraîne l'agglutination des érythrocytes de toutes les espèces, certainement en raison de ses propriétés poly-cationiques qui interfèrent avec la surface chargée négativement des cellules **(Rao et Sharma, 1997)**.

L'activité du chitosane peut être modulée en modifiant chimiquement le polymère. Un effet anti-thrombogène est ainsi obtenu après N-acétylation avec de longues chaînes carbonées **(Lee et al, 1995)**.

#### **II.4.5. Cytocompatibilité:**

La cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes, des kératinocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes a été démontrée in vitro. Des travaux montrent que, quel que soit le DA (2-50%), la mise au contact prolongée de films de chitosane avec les deux premiers

types de cellules n'induit ni la destruction, ni la croissance anarchique de celles-ci, et qu'aucune substance cytotoxique n'est larguée dans le milieu (**Chatelet et al, 2001**).

Le même comportement est constaté dans le cas de cultures de chondrocytes et de kératinocytes sur un film de chitosane de DA 2,5% (**Denuzière, 1998**) ainsi que la culture de chondrocytes et d'ostéoblastes sur une surface similaire de DA 10% (**Lahiji et al, 2000**). Lors de cultures cellulaires sur un film de chitosane, la croissance des cellules dépend des caractéristiques et de la source du chitosane (**Cid et al, 2000 ; Ramos et al, 2000**).

## **II.5 Activités antimicrobienne du chitosane :**

Le mécanisme exact de l'action antimicrobienne du chitosane est encore inconnu mais certains mécanismes ont été proposés. L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement (**Chen et al, 1996**) ; Ce qui crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur entraînant la mort cellulaire (**Shahidi et al, 1999**).

Par ailleurs, **Helander et al. (2001)** ont prouvé que la clé de l'activité antimicrobienne du chitosane provient de la charge positive des groupements amine du carbone C<sub>2</sub> (structure poly-cationique à pH < 6,3). Le même résultat a été montré par **Tsai et Su (1999)** pour lesquels le mécanisme d'action antimicrobienne de chitosane est dû aux interactions entre les cations du chitosane et les anions à la surface des bactéries qui modifient la perméabilité de la membrane cellulaire.

De plus, le chitosane semblerait interférer et perturber la synthèse des ARN messagers en interaction avec l'ADN (**Shahidi et al, 1999 ; Liu et al, 2002**).

Les applications biomédicales : agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant... Il est également fortement étudié en tant que système à libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale (**Lahiji et al 2000 ; Howling et al, 2001 ; Minagawa et al, 2007 et Ribeiro et al, 2009**). Il présente en effet de bonnes propriétés muco-adhésives et une absence de toxicité qui le prédisposent pour des utilisations en thérapie génique et pour la vaccination.

## II.6 Activités fongistatiques :

L'effet antifongique du chitosane sur la croissance in vitro des champignons pathogènes dans les cerises a été examiné par **El Ghaouth et al, (1992)**. En outre, ces auteurs ont confirmé l'efficacité du grand nombre de groupes de charge positive. Une baisse d'activité a été observée avec N,O-carboxy-méthyl-chitosane comparée à celle du chitosane pur.

En ce qui concerne l'activité antifongique, le chitosane peut interagir avec la membrane des cellules pour altérer leur perméabilité. Par exemple, la fermentation avec la levure boulangère est inhibée par certains cations, qui agissent sur la surface des cellules de la levure en empêchant l'entrée du glucose. L'analyse par absorption UV a indiqué que le chitosane provoque considérablement une perte de matériels protéiques de *Pythium arcandrum* (**Rabea et al, 2003**).

Dans une étude in vivo, **El Ghaouth et al. (1992)** ont rapporté qu'un début de l'infection des fruits enrobés par le chitosane a lieu après 5 jours de conditionnement (T =13°C), alors qu'il se produit après 1 jour pour le témoin. D'autres études, ont rapporté que l'enrobage du chitosane peut réduire la putréfaction des pommes au-delà de 12 semaines.

## II.7 Applications du chitosane :

Le chitosane est utilisé dans de nombreuses industries primaires : l'agriculture, le papier, le textile, le retraitement des eaux, la pharmacie, les dispositifs médicaux... Il est le seul biopolymère cationique capable d'apporter de la viscosité aux produits de la cosmétologie (**Jeon et al, 2002**). Le tableau suivant résume son utilisation dans différents secteurs :

**Tableau 1-** Utilisation du chitosane en fonction de sa pureté. (Andrieux, 2004).

Chitosane technique	Chitosane pur	Chitosane ultra pur
Traitement des eaux : - Flocculant coagulant - Chélateur des métaux et des colorantes Pâtes et papiers : -traitement de surfaces -Papier carbone Agriculture : - Enrobage des grains - Fertilisant - Bio-fongicide - Protection contre le gel - Stimulation de germination et fructification bioplastique - En substitution des dérivées pétrolières	Alimentation : - Agent de conservation - Epaississant - Emulsifiant - stabilisant Anti oxydant - Anti-cholestérolémiant - Fibre diététique ou complément alimentaire : - flocculant pour la clarification des boissons film alimentaire pour la protection - Agent d'encapsulation et d'enrobage : - cosmétique - hydratant - traitement capillaire - gel dentaire	Biotechnologie et biomédicale : -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, fil de suture -transport de gènes biocapteur- nanocomposites

L'industrie alimentaire profite de ses propriétés antibactériennes et antifongiques pour réduire l'utilisation de conservateurs synthétiques. L'application du chitosane dans le domaine alimentaire est très prometteuse à cause de sa biocompatibilité et sa non-toxicité. En 1992, le département de santé japonais a autorisé l'utilisation de la chitine et de ses dérivés notamment du chitosane en tant qu'ingrédient alimentaire fonctionnel. Ainsi, il a été utilisé au Japon dans des produits alimentaires grâce à ses effets diététiques (Li et al, 2009). Plus récemment, en 2001, l'US FDA a approuvé le statut GRAS du chitosane.

Le chitosane peut donc piéger le cholestérol apporté par l'alimentation et éviter qu'il ne soit absorbé par la paroi intestinale. Par conséquent, il est de plus en plus introduit dans les produits amaigrissants (**Zhang et al, 2010**).

### **II.7.1. Les applications dans le domaine du traitement des eaux**

Des réductions de 70 à 98 % de la teneur en MES (matière en suspension, responsable de la turbidité) et de 55 à 80 % la demande chimique en oxygène (DCO) ont été observées pour le traitement des eaux usées en utilisant du chitosane comme flocculant. (**Jun et al, 1994**).

Du fait de leur forte densité de charge, les dérivés de chitine sont capables d'interagir avec les MES, les microorganismes et les ions métalliques (**Taboada et al, 2003 ; Cárdenas et al, 2001**).

#### **II.7.1.1. Le Chitosane : un matériau adsorbant**

Le chitosane présente d'autres avantages qui peuvent être mis à profit lors de son utilisation comme adsorbant dans des procédés de décontamination des eaux usées. **Le tableau 2** regroupe les principaux avantages et inconvénients de l'utilisation du chitosane dans le traitement des eaux (**No et Meyers., 2000**).

**Tableau 2** - Principaux avantages et inconvénients du chitosane comme matériau adsorbant pour le traitement des eaux polluées.

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>*Substance disponible dans de nombreux pays.</li> <li>*Substance écologique acceptée par le public.</li> <li>*Matériau polyfonctionnel et versatile</li> <li>*Remarquables capacités de fixation/rétention de polluants avec des cinétiques rapides.</li> <li>*Importante sélectivité à décontaminer des effluents très dilués ou concentrés.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Variabilités dans les caractéristiques du polymère.</li> <li>*Matériau non-poreux ayant une faible surface spécifique.</li> <li>*Nécessité à recourir à des modifications physiques et chimiques.</li> <li>*Capacités d'adsorption dépendant d'un nombre important de facteurs.</li> <li>*Influence du pH ; Limitations hydrodynamiques (problèmes de colmatage des colonnes de réacteurs).</li> </ul>

Actuellement, les techniques d'adsorption utilisant le chitosane et ses dérivés, comme un traitement conventionnel développé pour adsorber les colorants anioniques en solution aqueuse (Xue et al, 2014).

L'adsorption des ions métalliques par le chitosane a été intensivement étudiée parce que le chitosane exerce les propriétés bioadhésive pour former les nanoparticules stables avec différents métaux en solution (Tajuddin Sikder et al, 2014).

### II.7.2. Autres applications

L'immobilisation d'enzymes dans des matrices à base de chitosane s'étend aujourd'hui à tous les domaines (Tae-Hee et al, 2007). Les dérivés de chitine peuvent intégrer des électrodes, des capteurs, des phases stationnaires de colonne de chromatographie, des membranes d'osmose inverse et de dialyse.

Dans l'industrie du papier et de la photographie, on utilise le chitosane pour obtenir une meilleure surface et pour résister à l'humidité. Les feuilles enduites de chitosane renforcent

les propriétés morphologiques, mécaniques, optiques, de vieillissement et offrent une meilleure qualité d'impression (Tae-Hee et al, 2007).

Dans le domaine du textile, des principes actifs peuvent être encapsulés dans du chitosane et imprégnés dans les tissus pour fabriquer des vêtements dits « intelligents ». Les principes actifs se diffusent progressivement sur la peau à mesure que le vêtement est porté (No HK et Meyers., 2000). Le chitosane est également capable d'améliorer la force et la rigidité d'un tissu (Tae-Hee Kim et al, 2007). La figure 4 montre différentes formes de chitosane.

Enfin, la chitine, comme substrat nutritif, favorise la croissance de microorganismes chitino-lytiques. Cette propriété est exploitée pour améliorer des composts (De Jin et al, 2005), et comme méthode d'identification de ces microorganismes (Gomez Ramirez et al, 2004).



Figure 4 - Différentes formes de chitosane produites. (Ararem F., 2010)

## III. Les métaux lourds

### III.1 Introduction

Les éléments métalliques sont, sous différentes formes, toujours présents au sein de l'environnement.

A l'état de traces, ils sont nécessaires voir indispensables aux êtres vivants (**Mohan et al 2006**), en revanche il présente une toxicité plus ou moins forte lorsqu'ils sont en concentrations élevés (**Mohan et al, 2002**).

La présence de métaux lourds dans l'environnement résulte de causes naturelles et des activités humaines. Elle pose un problème particulier, car les métaux lourds ne sont pas biodégradables (**Naseem et al, 2001**). Ces métaux lourds ne présentent pas tous les mêmes risques en raison de leurs effets sur les organismes, leurs propriétés chimiques, physico-chimiques et biologiques. Leur toxicité est très variable et leur impact sur l'environnement très différent (**Reddad, 2002**).

Les métaux traces sont connus parmi les ions principaux pour le procédé vital. Etant donné qu'ils jouent un rôle clé dans les différents processus de la vie, ils sont libérés en grandes quantités par les voies naturelles. Ainsi ces métaux traces (métaux lourds), et lorsqu'ils sont en excès s'accumulent dans l'environnement aquatique et causent des effets toxiques pour les organismes vivants. Leur présence dans la mer est une grande préoccupation écologique pour les états qui se trouvent sur la côte notamment pour les pays en voie de développement (**Dasgupta et al, 2002**).

### III.2 Définition

Les métaux lourds peuvent être définis comme Tout métal ayant une densité supérieure à 5 (**Bouranene et al, 2008**), et un numéro atomique élevé, Tout métal pouvant être toxique pour les systèmes biologiques.

Certains chercheurs utilisent des définitions plus spécifiques :

Le géologue par exemple, considérera comme métal lourd tout métal réagissant avec la pyrimidine (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N).

Dans les sciences environnementales, les métaux lourds associés aux notions de pollution et de toxicité, sont généralement : l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le plomb (Pb), l'étain (Sn), le zinc (Zn).

En toxicologie, ils peuvent être définis comme des métaux à caractère cumulatif (souvent dans les tissus graisseux) ayant essentiellement des effets très néfastes sur les organismes vivants.

En nutrition et en agronomie, ils peuvent même être assimilés à des oligo-éléments indispensables à certains organismes, en particulier par leur action catalytique au niveau du Métabolisme.

Enfin, dans l'industrie en général, on considère comme métal lourd tout métal de densité supérieure à 5, de numéro atomique élevé et présentant un danger pour l'environnement. (Groy, 1978 et Browing, 1974).

### **III.3 Origines des métaux lourds :**

Les métaux lourds sont redistribués dans l'environnement par, les processus géologiques et les cycles biologiques. Actuellement les activités industrielles et technologiques diminuent le temps de résidence des métaux dans les roches, ils forment de nouveaux composés métalliques, introduisent les métaux dans l'atmosphère par la combustion de produits fossilifères. Ils résultent aussi de la contamination d'origine humaine (Académie des sciences, 1998).

#### **III.3.1. Les sources naturelles**

Parmi sources naturelles, citons l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts, la contribution des volcans peut se présenter sous forme d'émissions volumineuses dues à une activité explosive, ou d'émissions continues de faible volume, résultant notamment de l'activité géothermique et du dégazage du magma. (Pedro, 1994).

**Tableau 3** - Rapport du flux lié à l'activité humaine et le flux naturel des métaux lourds (Luckham et Rossi, 1999).

Élément	Flux lié à l'homme /flux naturel (%)
<b>Cadmium</b>	<b>1, 897</b>
<b>Mercure</b>	<b>27.5</b>
<b>Chrome</b>	<b>1.61</b>
<b>Arsenic</b>	<b>2.786</b>
<b>Plomb</b>	<b>34,583</b>

### III.3.2. Les sources humaines

Les métaux provenant d'apports anthropiques sont présents sous des formes chimiques assez réactives et entraînent de ce fait des risques très supérieurs aux métaux d'origine naturelle qui sont le plus souvent immobilisés sous des formes relativement inertes (McKenzie, 1997), Les sources anthropogènes sont les suivantes:

- Activités pétrochimiques ;
- Utilisation de combustibles fossiles (centrales électriques au charbon, chaudière Industrielles, fours à ciment) ;
- Transport (véhicules et moteurs routiers et non routiers, embarcations) ;
- Incinération de déchets ;
- Produits (interrupteurs électriques, amalgames dentaires, éclairages fluorescents) ;
- Déchets urbains (eaux usées, boues d'épuration, ordures ménagères), agricoles.

**Tableau 4** - Sources industrielles et agricoles des métaux lourdes (**Grim, 1968**).

Utilisation	Métaux
Batteries et autres appareils électriques	Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni
Pigments et peintures	Ti , Cd , Hg , Pb , Zn , Mn , Sn , Cr , Al , As , Cu , Fe
Alliages et soudures	Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu
Biocides (pesticides, herbicides)	As , Hg , Pb , Cu, Sn , Zn , Mn
Agents de catalyse	Ni, Hg, Pb, Cu, Sn
Verre	As , Sn , Mn
Engrais	Cd , Pb, As , , Cu, Mn
Matières plastiques	Cd, Pb
Produites dentaires et cosmétiques	Hg, Sn
Textiles	Al , Cr, Fe
Raffineries	Ni, V, Pb
Carburants	Ni, Hg, Cu, Fe, Ne, Pb, Cd

Le tableau présent quelques exemples de sources industrielles et agricoles d'où peuvent provenir les métaux présents dans l'environnement.

### III.4 La toxicité des métaux lourds

Les métaux lourds sont des éléments chimiques qui ont un poids spécifique (une mesure de la densité) au moins cinq fois celle de l'eau.

Les métaux lourds les plus souvent impliqués dans l'empoisonnement de l'homme sont : le plomb, le mercure, l'arsenic et le cadmium. Certains métaux lourds, tels que le zinc, le cuivre, le chrome, le fer et le manganèse, sont requis par le corps en petites quantités, mais ces mêmes éléments peuvent être toxiques en grande quantité (**Fallon, 2006**).

L'exposition aux métaux lourds est potentiellement dangereux, en particulier les composés métalliques qui n'ont aucun rôle physiologique dans le métabolisme cellulaire.

La pénétration des métaux par l'eau ou des aliments peut modifier le métabolisme d'autres éléments essentiels tels que Zn, Cu, Fe et Se (**Abdulla et Chmielnicka, 1990**).

Au cours des dernières années, les concentrations des métaux lourds ont augmenté de manière significative, pour atteindre les niveaux les plus élevés dans les régions fortement peuplées, telles que le nord-ouest de la mer Méditerranée.

La forme ionisée des métaux lourds est la forme toxique, il semble que les formes conjuguées et liées des métaux lourds filtrées ne sont pas toxiques par eux-mêmes mais c'est la forme divalente de ces métaux libérés à partir de ces complexes qui est responsable de la toxicité cellulaire (**Barbier et al, 2004**).

Généralement les métaux et leurs composés interfèrent avec les fonctions du système nerveux central, le système hématopoïétique, le foie et les reins. Récemment, la plus grande attention est donnée aux composés métalliques qui ont des effets toxiques à des faibles niveaux d'expositions produisant ouvertement des signes et des symptômes cliniques et pathologiques (**Kalia et Flora, 2005**).

#### **III.4.1. Contamination des sols :**

Tous les sols contiennent naturellement des éléments traces métalliques, on parle de contamination d'un sol lorsque sa teneur en élément trace est supérieure à la concentration naturelle, mais sans influence sur la qualité du sol.

La concentration naturelle de l'élément trace dans le sol résulte de son évolution à partir de la roche initiale. On parle de pollution des sols par un élément trace lorsque l'élément trace est présent à une dose constituant une menace pour l'activité biologique ou les fonctions du sol.

Les contaminations diffuses, qui affectent les niveaux superficiels des sols, résultent de phénomènes naturels tels que les retombées atmosphériques d'aérosols d'origine volcanique, ou d'actions anthropiques intentionnelles ou non : poussières et dépôts atmosphériques, fertilisants minéraux (cuivre contenu dans les phosphates), pesticides, lisiers et fumiers, boues de stations d'épuration, activités minières, déchets industriels (bâtiments) ou urbains, transports, etc. (**Katti et Shanmugasundaram, 2001**).

#### III.4.1.1. Devenirs des métaux lourds dans les sols

L'étude de la répartition d'un élément trace métallique entre les composants solides s'appelle la spéciation appréhendée avec une technique qui porte le nom « d'extraction séquentielle ». La variable qui détermine cette répartition c'est le degré de solubilité du métal.

Si le métal est soluble, il va passer dans les nappes ou dans la plante, s'il est insoluble, il va rester dans le sol.

La solubilité va dépendre de plusieurs facteurs, le plus important est l'acidité du sol. **(Bérend, 1991) :**

✓ Un sol acide facilite la mobilisation. Les métaux lourds ne s'accumulent pas. Ils sont transférés vers les nappes phréatiques et les fleuves ou absorbés par les plantes et présentent alors un risque pour la santé.

✓ Un sol calcaire contribue à l'immobilisation de certains métaux (certains éléments réagissent différemment, notamment l'arsenic, plus mobile dans un sol calcaire).

✓ Il n'y a donc pas de risque immédiat pour la santé. Mais le sol est contaminé durablement et la concentration en métaux lourds augmente avec les années.

Ces derniers sont susceptibles d'être relégués quand l'environnement est modifié. Au niveau des sols, les risques sont divers, (transfert vers les nappes phréatiques, biodisponibilité, écotoxicité), et dépendent principalement de la spéciation (degré d'oxydation, mode de complexations avec les macromolécules organiques et les constituants minéraux du sol).

**Tableau 5** - Teneurs naturelles de quelques éléments traces dans les sols et apports anthropiques (En mg/kg). (Kozaki et al, 2000)

Certains métaux lourds	Teneurs naturelles dans les sols en éléments traces		Apports anthropiques
	Concentration moyenne dans la croûte terrestre	Valeurs extrêmes relevées dans les roches	Nature des apports anthropiques
<b>Cadmium</b>	<b>0.2</b>	<b>46</b>	<b>2 – 4 – 5</b>
<b>Cobalt</b>	<b>23</b>	<b>100 – 200</b>	<b>3 – 2</b>
<b>Chrome</b>	<b>100 – 200</b>	<b>1500 – 3000</b>	<b>1 – 2</b>
<b>Cuivre</b>	<b>45 – 70</b>	<b>80 – 150</b>	<b>3 – 4 - 5</b>
<b>Nickel</b>	<b>80</b>	<b>2000</b>	<b>3</b>
<b>Plomb</b>	<b>13 – 16</b>	<b>30</b>	<b>1 – 2 – 3 – 4 – 5 -6</b>
<b>Zinc</b>	<b>70 – 132</b>	<b>120</b>	<b>3 – 4 – 5 – 6</b>

**\*Nature des apports anthropiques**

- 1 : retombées atmosphériques ;
- 2 : épandages boues de station d'épuration ;
- 3 : activités industrielles ;
- 4 : activités urbaines et trafic routier ;
- 5 : activités agricoles ;
- 6: activités minières.

**III.4.1.2. Le processus de transfert**

Les précipitations et l'irrigation sont les principales sources d'eau des sols. Une partie est évacuée par évaporation ou ruissellement de surface. Une partie pénètre dans le sol et se dirige alors soit vers les racines des plantes, soit, par gravité, vers les horizons profonds et les nappes phréatiques. Au cours de ces transports, l'eau se charge en éléments en traces dissous. (Koch, 2002).

### III.4.2. Contamination de l'air

Les métaux lourds se dispersent dans les hautes couches de l'atmosphère et retombent ailleurs, après un transport sur de très longues distances. On estime qu'une particule de mercure dans l'atmosphère reste un an avant de retomber.

Les métaux lourds dans l'air peuvent se trouver principalement sous deux formes :

- ✓ Soit sous forme gazeuse pour certains composés métalliques volatiles ou dont la Pression de vapeur saturante est élevée;
- ✓ Soit sous forme de composés métalliques solides, déposés sur les très fines particules ou poussières formées lors des phénomènes de combustion.

Les métaux lourds sont transportés par des particules atmosphériques provenant de combustions à haute température, de fusions métallurgiques, véhicules.

Les effets biologiques, physiques et chimiques de ces particules sont fonction de la taille des particules, de leur concentration et de leur composition, le paramètre le plus effectif sur l'environnement étant la taille de ces particules.

Dans l'air ambiant, on trouve de nombreux éléments, comme le plomb, le cadmium, le zinc, le cuivre, etc., dont la concentration est d'autant plus élevée que les particules sont fines (Besq, 2000).

### III.4.3. Contamination de l'eau

Les métaux présents dans l'eau peuvent exister sous forme de complexes, de particules ou en solutions. Les principaux processus qui gouvernent la distribution et la répartition des métaux lourds sont la dilution, la dispersion, la sédimentation et l'adsorption/désorption.

Selon (Sigg et al 1992) on trouve Certains processus chimiques peuvent néanmoins intervenir également. C'est ainsi que la spéciation selon les diverses formes solubles est régie par les constantes d'instabilité des différents complexes, et par les propriétés physico-chimiques de l'eau (pH, ions dissous, et température).

Les métaux lourds subissent de nombreuses transformations: réduction par processus biochimique, méthylation, déméthylation et oxydation d'espèces de métaux isolées, Des réactions redox peuvent aussi faciliter certaines transformations. Les processus biochimiques sont effectués par des micro-organismes et par des algues.

Les principales sources de contamination de l'eau sont les suivantes :

- Les eaux usées domestiques et industrielles
- La production agricole
- Les polluants atmosphériques
- Les anciennes décharges

#### **III.4.4. Toxicité et effet sur la santé**

##### **III.4.4.1. Exposition**

Les hommes sont exposés par inhalation des polluants aériens, la consommation d'eau contaminée, l'exposition à des sols contaminés de déchets industriels.

Les métaux peuvent être absorbés sous la forme inorganique ou sous la forme organique. Pour certains éléments, comme l'arsenic et le cuivre, la forme inorganique est la plus toxique. Pour d'autres, comme Hg, Sn et Pb, les formes organiques sont les plus toxiques. La quantité de métaux absorbée par un homme influe directement sur sa santé (**Evans, 1989**).

En fait, le risque sur la santé humaine est d'abord associé aux propriétés des métaux lourds à polluer les eaux, l'atmosphère, les aliments et les sols. Et dépendent également de l'état de leur forme chimique, de leur concentration, du contexte environnemental, de la possibilité de passage dans la chaîne du vivant.

Quelques métaux lourds sont indispensables à la croissance des organismes vivants comme Zn, Cu, Mn et Fe, On peut néanmoins s'attendre à ce qu'ils aient des effets toxiques quand les organismes sont exposés à des niveaux de concentration supérieurs à ceux qu'ils requièrent normalement. D'autres éléments, comme Pb, Hg et Cd, ne sont pas indispensables aux activités métaboliques et manifestent des propriétés toxiques (**Manole Greanca, 2007**).

On trouve comme un exemple selon (**Wang et al, 1997, et Dubinin, 1979**). La toxicité du cadmium résulte principalement de l'inhibition des enzymes thiols ainsi que de son affinité pour les hydroxyles et les carboxyles. Il est également l'agent étiologique de la maladie qui se manifeste par des troubles osseux et l'augmentation du taux de phosphatase alcaline.

Les effets des métaux lourds sur le système nerveux central et leurs symptômes sont : irritabilité , peur , nervosité , inquiétude , instabilité émotionnelle , perte de confiance timidité (symptôme principal chez les adolescents) , indécision , perte de la mémoire immédiate , toutes les sortes d'insomnies , dépression.

#### **III.4.4.2. Symptômes neurologiques**

Généralement sont cernées en fourmillement des mains et un sentiment de brûlure constante avec endormissement des membres inférieurs (Symptôme caractéristique des perturbations dues au mercure) léger tremblement des mains.

#### **III.4.4.3. Symptômes de la tête**

Se sont traduisent par des saignements des gencives, des dents qui bougent, une mauvaise haleine, un sentiment de brûlure sur les lèvres, la langue et le visage, en trouve aussi des abcès buccaux, des vertiges, un sifflement dans les oreilles et des troubles de l'audition, avec une difficultés oculaires (baisse de la vision des contrastes et des couleurs dues à des dépôts de métaux lourds dans le cervelet).

#### **III.4.4.4. Symptômes digestifs**

Généralement on trouve des allergies alimentaires, particulièrement aux œufs et au lait, des coliques.

#### **III.4.4.5. Symptômes cardiaques**

Le plus souvent des cas y'a des arythmies due aux dépôts de métaux lourds dans les nerfs commandant l'activité cardiaque. (**Bouranene et al, 2009 et Hazourli et al, 2007**).

### **III.5 Normes et réglementation**

Les nouvelles réglementations se sont penchées sur le problème des métaux lourds. Ceci s'explique par le fait que leurs effets sur l'homme et l'environnement ne cessent d'être mis en lumière, voire prouvés pour certains concernées.

L'arrêté du premier mars 1993, relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux rejets de toute nature des installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation, fixe un certain nombre de seuils à ne pas dépasser quant à l'émission de métaux lourds dans l'environnement. Cet arrêté s'applique à toutes les installations classées pour la protection de l'environnement, dont font partie la plupart des activités très polluantes précédemment citées (usines de traitement de surface, incinérateurs...).

Notons que cet arrêté a récemment été cassé par une décision de justice, notamment en raison de ses normes trop restrictives en matière de métaux lourds. Ceci nous conforte dans l'idée que la problématique des métaux lourds n'est pas suffisamment prise en compte.

De nouvelles réglementations exigent un seuil d'émission et l'emploi des meilleures technologies disponibles à un coût économique acceptable, et des caractéristiques particulières de l'environnement ( **Benedetto, 1997**).

**Tableau 6** - Concentrations en métaux et métalloïdes définissant les limites de qualité d'une eau potable (**Législation Française, OMS**) (**Dabrowski et al, 2005**)

Elément	Décret n°2001-1220	Recommandations OMS
As	10 µg/l	10µg/l
Cd	5 µg/l	3µg/l
Cr	50 µg/l	50µg/l (chrome total)
Cu	2 µg/l	2 mg/l
Hg	1 µg/l	1 µg/l (mercure total)
Ni	20µg/l	20µg/l
Pb	10 µg/l	10µg/l
Se	10 µg/l	10µg/l

Tandis que le **tableau7** présente les normes de rejet d'effluents, à titre indicatif, par rapport aux métaux lourds en Algérie.

**Tableau 7** - seuils de rejets des métaux en Algérie d'après le **Journal Officiel de la République Algérienne N° 24, 16 avril. 2006**

Métal	Al	Cd	Cr	Fe	Mg	Hg	Ni	Pb	Cu	Zn
Concentration (mg/l)	3	0.2	0.5	3	1	0.01	0.5	0.5	0.5	0.5

## IV. Les colorants

### IV.1 Historique

De l'antiquité au 18<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation par l'homme de substances colorées, pour modifier l'aspect extérieur de son environnement, remonte à la plus haute antiquité : pigments minéraux et animaux des grottes décorées Lascaux ou Altamira, (vers 12000 avant J-C), ou des pyramides Égyptiennes : teintures de vêtements attestées en différentes régions du globe : En chine vers 3000 ans avant J-C, en Inde (où on utilise la garance et l'indigo, teintures préparées à partir de plantes) vers 2000 ans avant J-C, en Palestine vers 2000 à 1500 ans avant J-C, et en Égypte, comme en témoignent les plus anciens textiles retrouvés : bandelettes qui entouraient les momies dans les tombes de pharaons datant de 2500 ans avant J-C.

(Fues, 2017).

Depuis longtemps, les colorants ont été appliqués dans pratiquement tous les domaines de la vie quotidienne ; l'histoire des couleurs et celle des textiles sont étroitement liées. L'essor de la production textile au fil des siècles a entraîné le développement des recherches et des expérimentations sur les colorants et les techniques de teinture. Au fil des siècles, des alchimistes du Moyen Âge aux industries chimiques modernes. La production des teintures représente donc depuis longtemps un enjeu non seulement scientifique mais aussi économique d'une importance capitale. Notons que jusqu'à la moitié du 19<sup>ème</sup> siècle, les colorants appliqués étaient d'origine naturelle. (Zhenwang et al, 2000).

On dénombre actuellement, environ 8000 colorants synthétiques chimiquement différents répertoriés dans le Colour Index (Guivarch, 2004) sous 40000 dénominations commerciales. Chaque colorant y est classé sous un nom de code indiquant sa classe, sa nuance ainsi qu'un numéro d'ordre. Un colorant doit posséder, outre sa couleur propre, la propriété de teindre, cette propriété résultant d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre est à l'origine des principales difficultés rencontrées lors des traitements. En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur lesquels ils sont appliqués : résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment les détergents) et aux attaques microbiennes.

L'affinité du colorant pour la fibre est particulièrement développée pour les colorants qui possèdent un caractère acide ou basique. Ces caractéristiques propres aux colorants organiques accroissent leur persistance dans l'environnement et les rendent peu disposés à la biodégradation (**Ganesh, 1992**).

Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à adsorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (de 380 à 750nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés :

**Chromophores** : la molécule colorante étant le chromogène ; plus la facilité du groupe chromophore à donner un électron est grande plus la couleur sera intense. D'autres groupes **auxochromes** : ces groupes d'atomes du chromogène peuvent intensifier ou changer la couleur due au chromophore (**Brown et Devito, 1993**).

## IV.2 Classification des colorants

Tous les composés aromatiques absorbent l'énergie électromagnétique mais seulement ceux qui ont la capacité d'absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (de 380 à 750 nm) sont colorés.

Lorsque le nombre de noyau aromatique augmente, la conjugaison des doubles liaisons s'accroît et le système conjugué s'élargit. L'énergie des liaisons diminue tandis que l'activité des électrons augmente et produit un déplacement vers les grandes longueurs d'onde.

Dans ces cas, la molécule absorbe dans les grandes longueurs d'onde et donne des couleurs plus foncées (**Zollinger, 1991**).

### IV.2.1. Classification selon la constitution chimique

La classification des colorants peut être faite selon leur constitution chimique ou selon le domaine d'application. Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupe :

### **A- Les colorants azoïques**

Les colorants "azoïques" sont caractérisés par le groupe fonctionnel azo (-N=N-) unissant deux groupements alkyles ou aryles identiques ou non (azoïque symétrique et dissymétrique). Ces structures qui reposent généralement sur le squelette de l'azobenzène sont des systèmes aromatiques ou pseudo aromatiques liés par un groupe chromophore azo. **(Brown et Devito, 1993).**

### **B- Les colorants anthraquinoniques**

D'un point de vue commercial, ces colorants sont les plus importants après les colorants azoïques. Leur formule générale dérivée de l'anthracène montre que le chromophore est un noyau quinonique sur lequel peuvent s'attacher des groupes hydroxyles ou amines **(Zollinger, 1991).**

### **C- Les colorants indigoïdes**

Ils tirent leur appellation de l'Indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues sélénié, soufré et oxygéné du Bleu Indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise. **(Brown et Devito, 1993).**

### **D- Les colorants xanthènes**

Ces colorants sont dotés d'une intense fluorescence. Le composé le plus connu est la fluorescéine. Peu utilisé en tant que teinture, leur faculté de marqueurs lors d'accident maritime ou de traceurs d'écoulement pour des rivières souterraines est malgré tout bien établie. (Colour Index, 1975).

### **E- Les phtalocyanines**

Ils ont une structure complexe basée sur l'atome central de cuivre. Les colorants de ce groupe sont obtenus par réaction du dicyanobenzène en présence d'un halogénure métallique (Cu, Ni, Co, Pt, etc.) **(Zollinger, 1991).**

### **F- Les colorants nitrés et nitrosés**

Ces colorants forment une classe très limitée en nombre et relativement ancienne. Ils sont actuellement encore utilisés, du fait de leur prix très modéré lié à la simplicité de leur

structure moléculaire caractérisée par la présence d'un groupe nitro (-NO<sub>2</sub>) en position ortho d'un groupement électro-donneur (hydroxyle ou groupes aminés). (Colour Index, 1975).

### **G- Les colorants triphénylméthanés**

Les triphénylméthanés sont des dérivés du méthane pour lesquels les atomes d'hydrogène sont remplacés par des groupes phényles substitués dont au moins un est porteur d'un atome d'oxygène ou d'azote en para vis-à-vis du carbone méthanique. Le triphénylméthane et ses homologues constituent les hydrocarbures fondamentaux d'où dérivent toute une série de matières colorantes. (Zollinger, 1991).

#### **IV.2.2. Les colorants utilisés en alimentaire**

Etant donné l'emploi massif de colorants dans l'alimentation (particulièrement les azoïques) et devant les risques de toxicité qu'ils peuvent engendrer chez l'être humain, les pouvoirs publics se sont attachés à légiférer leur utilisation et à les classifier.

Ainsi, depuis longtemps, un effort a été consenti dans le but d'établir une classification des différents colorants. La plus ancienne est la C.X-Rose (Colour Index de 1924) ; est apparue ensuite celle de Shültz en 1931 et enfin celle de la D.F.G en 1957.

Actuellement, les pays de la communauté européenne ont intégré les colorants dans la classification générale des additifs. Ils sont numérotés de 100 à 199 et sont précédés des deux lettres CE (par exemple CE.100 à 199).

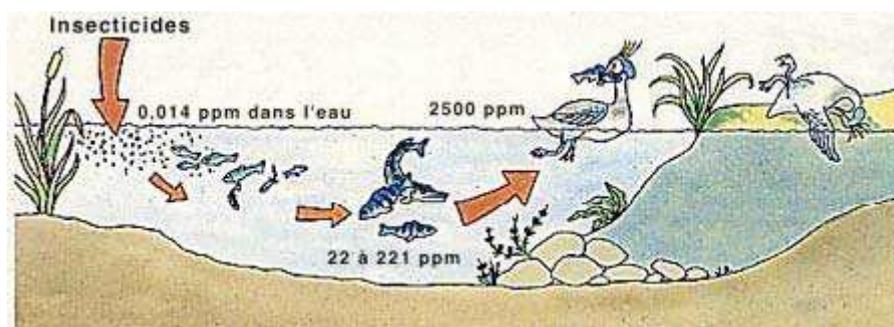
Cependant, cette classification ne tient compte que des colorants utilisés actuellement où depuis peu de temps. Leur utilisation touche des domaines tels que (Lederer, 1986) la confiserie, la liqueur, la pâtisserie, la siroperie, la limonadière et la fromagerie.

### **IV.3 Les colorants et leurs impacts environnementaux**

Les colorants sont considérés comme les plus importantes des contaminants, qui menacent l'environnement et la vie humaine dû à leur présence dans les textiles et d'autres eaux usées industrielles (Zollinger, 1991).

Beaucoup de colorants sont visibles dans l'eau même à de très faibles concentrations (<1 mg/l). Ainsi, ils contribuent aux problèmes de pollution liés à la génération d'une quantité considérable d'eau usée contenant des colorants résiduels (**Greene et Baughman, 1996**). Le rejet de ces eaux résiduaires dans l'écosystème est une source dramatique de pollution, d'eutrophisation et de perturbation non esthétique dans la vie aquatique et par conséquent présente un danger potentiel de bioaccumulation qui peut affecter l'homme par transport à travers la chaîne alimentaire.

Si un organisme ne dispose pas de mécanismes spécifiques, soit pour empêcher la résorption d'une substance, soit pour l'éliminer une fois qu'elle est absorbée, alors cette substance s'accumule. Les espèces qui se trouvent à l'extrémité supérieure de la chaîne alimentaire, y compris l'homme, se retrouvent exposées à des teneurs en substances toxiques pouvant aller jusqu'à cent mille fois plus élevées que les concentrations initiales dans l'eau (illustration du phénomène de bioaccumulation de pesticides figure 5).



**Figure 5** - Conséquences de la bioaccumulation après déversement de substances toxiques (insecticides) dans un cours d'eau (**Little et Chillingworth, 1974**).

#### IV.4 Toxicité des colorants

La toxicité des différents types de colorants (mortalité, effet mutagénique et cancérigène) a été étudiée par plusieurs travaux de recherche aussi bien sur des organismes aquatiques (poisson, algue, bactéries, etc.) que sur les mammifères. Un colorant est toxique lorsqu'il possède la capacité de modifier le code génétique des cellules humaines et de déclencher potentiellement des effets cancérigènes (**Goupy, 1988**).

En outre, des recherches ont été effectuées pour étudier l'effet des colorants sur l'activité des bactéries aérobies et anaérobies dans des systèmes de traitement des eaux résiduaires.

Des études faites sur divers colorants commerciaux ont démontré que les colorants basiques sont les plus toxiques pour les algues (**Clarke et Anliker, 1980 ; Specht et Platzek, 1995**). Ce résultat a été prouvé par le test de mortalité des poissons effectué sur 3000 colorants commerciaux où il s'est avéré que les colorants basiques, et plus particulièrement ceux de la famille de triphénylméthane sont les plus toxiques. Par ailleurs, les poissons semblent être relativement sensibles aux colorants acides (**Brown et DeVito, 1993**).

D'autre part, la mortalité examinée avec des rats a montré que seulement 1% sur 4461 colorants commerciaux présentent des valeurs de DL50 au-dessous du poids corporel de 250 mg/kg. Par conséquent, la chance de la mortalité humaine due à la toxicité aiguë de colorant est probablement très basse. Cependant, il faut sensibiliser l'être humain quant à l'utilisation de certains colorants. En effet, il a été prouvé que quelques colorants dispersés peuvent causer des réactions allergiques, dermatologiques, etc. (**Chung et al, 1981**).

Par ailleurs, l'effet d'exposition des ouvriers dans l'industrie de textile aux colorants a suscité l'attention. Par conséquent, il s'est avéré que l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques. Notons que la plupart des colorants azoïques ne sont pas initialement toxiques, excepté ceux à groupement amine libre (**Rosenkranz et Klopman, 1990**).

En raison des effets mentionnés ci-dessus, il est clair que les colorants, essentiellement les azoïques, ne devraient pas envahir notre environnement. Par conséquent, il est nécessaire de traiter les eaux résiduaires chargées de colorants jusqu'à leur minéralisation totale.

#### **IV.5 Législation sur l'environnement**

La législation sur les rejets d'eaux résiduaires devient de plus en plus stricte. L'Algérie est dotée de la réglementation **06-141** sur les rejets d'effluents textiles dans le milieu hydrique (**Bouafia, 2010**) (**JORA, N° 26 du 04/09/2006**). Certaines substances à risques ont été réglementées par le législateur européen, et parfois par les législateurs nationaux, afin d'imposer aux professionnels des obligations visant à protéger le consommateur. Ainsi, il

existe des réglementations sur les colorants azoïques (directive 200/61), etc. (Siedlecka et al, 2007).

**Tableau 8 - Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents textiles (JORA 26, 2006)**

PARAMÈTRES	UNITÉ	VALEURS LIMITES	TOLÉRANCE AUX VALEURS LIMITES (ANCIENNES INSTALLATIONS)
Température	°C	30	35
pH	-	6.5- 8.5	6-9
DBO <sub>5</sub>	mg/l	150	200
DCO	-	250	300
Matières décantables	-	0.4	0.5
Matières dissoutes non	-	30	40
Oxydabilité	-	100	120
Permanganate	-	20	25

***CHAPITRE II :***  
***MATÉRIELS &***  
***MÉTHODES***

## V.1 L'objectif du mémoire

Est de mettre en évidence le rôle des billes de chitosane, après leur élaboration, dans l'épuration des eaux usées, pour l'élimination de certains métaux lourds (Zn, Cu et Cd) et du colorant : le rouge alizarine ; ainsi que le pouvoir antimicrobien de ces billes contre deux souches pathogènes, une Gram-positive à savoir (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) et une Gram-négative (*Escherichia coli* CIP 76.24). Ce travail vise aussi la caractérisation de certains paramètres physicochimiques : le taux de protéines, de cendres et d'humidité.

### V.1.1. Préparation de la chitine et de ses dérivés

Les carapaces de crevettes ont été collectées dans des restaurants. Ces déchets avant leur utilisation, sont d'abord débarrassés de leurs antennes et autres pattes. Ils subissent ensuite un prétraitement selon Mukherjee (**Mukherjee, 2002**), qui consiste en un lavage énergique afin d'éliminer les résidus organiques (tissus) et bouillis pendant 1 heure. Après séchage, les carapaces subissent le quenching : ce traitement permet de casser la structure cristalline de la chitine contenue dans la carapace, facilitant ainsi son extraction. Il consiste à placer les carapaces préparées comme indiquées ci-dessus dans l'étuve à 80°C, pendant 48 heures. Elles sont ensuite broyées dans un blinder afin d'obtenir des particules d'un diamètre de 0.5mm.

Le chitosane a été obtenue après trois étapes suivantes :

La déminéralisation en milieu acide (1<sup>ère</sup> étape) suivie d'une déprotéination (2<sup>ème</sup> étape), et d'une désacétylation (3<sup>ème</sup> étape) simultanée par voie hydrothermo-chimique en milieu basique lors de la procédure d'extraction du chitosane, différentes concentrations de solution digestive d'acide HCl et de base NaOH (Hengye Zhongyuan Chemical Co., Beijing, China), variant respectivement de 2M, et de 2M de 8% et 50% ont été utilisées.

✓ Une déminéralisation dans le but d'obtenir de la chitine brute, nous avons mélangé le produit broyé issu du prétraitement à une solution d'acide chlorhydrique HCl 2N dans un rapport 1 : 15 (poids du solide : volume du solvant) c.à.d. 1 g de carapaces en poudre pour 15 ml de HCL (**Jumaa et al, 2002**) et l'ensemble est soumis à une agitation pendant 12 heures à la température ambiante afin d'éliminer les sels minéraux. La solution est ensuite filtrée et lavée

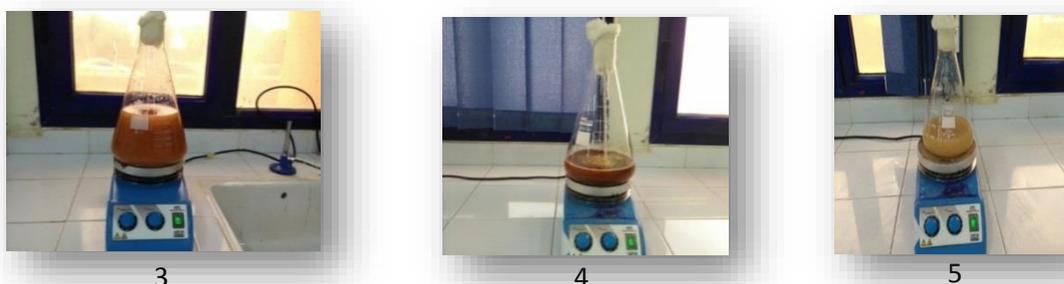
plusieurs fois avec de l'eau distillée jusqu'à la neutralisation et séché à l'air libre pendant toute une nuit, (**Figure 7.3**).

✓ Une déprotéination la chitine brute obtenue précédemment est trempée dans une solution d'hydroxyde de sodium NaOH 8% en masse dans un rapport 1 :10 (poids du solide : volume du solvant) (**Caroline et al, 2006**) à une température  $T=100\text{ }^{\circ}\text{C}$  sous haute, pendant 6 heures pour dissoudre les protéines. Le mélange est ensuite filtré et lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée pour éliminer les composants de NaOH restants puis séché à l'air libre, ainsi nous obtenons une chitine déprotéinée (**Fig. 7.4**)

✓ Une désacétylation : Dans ce cas la chitine obtenue est mise en contact avec une solution d'hydroxyde de sodium NaOH 50% en masse à une température  $T=100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pendant 3 heure (**No et Meyers, 1995**) dans un rapport 1 :20 pour enlever certains ou tous les groupements acétyle de la chitine. Le produit obtenu est ensuite filtré et lavé plusieurs fois avec l'eau distillé et séché à l'air libre et ainsi nous obtenons le chitosane (**Fig. 7.5**).



**Figure 6** - (1) carapaces de crevettes lavés/séchés (2) carapaces des crevettes broyées, (original).



**Figure 7** - (3) Etape de déminéralisation ; (4) E. de déprotéination ; (5) E. de désacétylation. (Original)



**Figure 8** - (6) Chitine déprotéinée -(7) Chitosane extrait-(8) Chitosane en poudre. (Original)

### V.1.2. Préparation des billes de chitosane

Pour préparer les billes de chitosane, nous avons appliqué **la synthèse par extrusion** : c'est une méthode qui consiste à faire tomber goutte à goutte une solution de polymère à l'aide d'une seringue dans un bain de réticulant dans lequel s'effectue la gélification. La réaction rapide entre le polymère et le réticulant à la surface permet de figer la forme sphérique de la goutte au sein de la solution. Le volume interne de la goutte gélifie par la suite au fur et à mesure de la diffusion du réticulant au travers de la surface de la bille en formation, (**Mohan et al, 2014**) ; dans notre cas, nous avons dissous 4 g de chitosane poudre dans 100 ml d'une solution d'acide acétique de 2% (v/v) et laisser reposer pendant toute la nuit. Le mélange est ensuite versé goutte à goutte dans 500 ml d'une solution de NaOH (0.5M) sous agitation moyenne et continue, les billes ainsi obtenues sont laissées reposer dans la solution toute la nuit. Ensuite les billes sont filtrées et lavées de l'eau distillée plusieurs fois jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage soit neutre, les billes sont séchées à l'air libre, broyées puis tamisées à une taille <125  $\mu\text{m}$ .



**Figure 9** - Chitosane extrait qui sera solubilisé puis Billes/lentilles de chitosane produites (Original)

## V.2 Les souches pathogènes

Les différentes souches utilisées dans cet expérimental sont reportés dans le **Tableau 9**.

**Tableau 9** - Nature et origine des différentes souches bactériennes pathogènes utilisées

Souches	Références	Milieu de culture
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Laboratoire de Sécurité Alimentaire par les Bactéries Lactiques et les Probiotiques (SEGABALP), Université de Madrid, Espagne	BHI (Réf. CM0225) Oxoid, Biomérieux, France
<i>Escherichia coli</i> CIP76.24	Collection du laboratoire INMV Alger, Algérie	BHI (Réf. CM0225) Oxoid, Biomérieux, France

## V.3 Milieux de culture et conditions de croissance

Tous les milieux de culture préparés sont autoclavés à 121°C pendant 15 min. La souche de référence : *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Escherichia coli* CIP 76.24, ont été réactivées deux fois et cultivée respectivement sur BHI bouillon (Brain-Heart-Infusion : réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France). L'incubation est faite en aérobiose pendant 24 h à 37°C. Pour l'étude de l'évolution du pathogène au cours de sa croissance, le milieu Mueller-Hinton Gélose (Réf. CM0419 Oxoid, Biomérieux, France) a été utilisé à 37°C pendant 24 h en aérobiose; les souches ont été cultivées au moins trois fois avant l'expérience.

## V.4 Etude de l'évolution de la cinétique de croissance

L'étude de l'évolution de la croissance de *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* est effectuée dans le milieu BHI à pH 7.4 à 37 °C en aérobiose. Des prélèvements stériles sont effectués périodiquement afin d'évaluer la croissance (DO) à 600 nm par un spectrophotométrie sur un spectrophotomètre de type Jenway 6700 Visible UV-Visible ; la détermination de l'évolution de la charge microbienne en micro culture s'effectue par isolement sur milieu Muller-Hinton gélose pour ces pathogènes ; cette méthode est utilisée dans le but de déterminer la charge microbienne du ATCC 6633 et du CIP 76.24 évaluée à 10<sup>9</sup> UFC/ml (phase exponentielle), puis mise en contact avec les différentes concentration des billes de chitosane.

## **V.5 Suivi de la Concentration minimale inhibitrice: (test de micro-dilution)**

Les CMI sont aussi déterminées vis-à-vis des bactéries cibles. L'inoculum de chaque bactérie testée est obtenu à partir d'une pré-culture de 6 h d'incubation, la charge microbienne était ajustée à  $5 \times 10^7$  UFC/ml à l'aide d'une turbidité standard 0,5 Mc-Farland. Des dilutions en série sont préparées dans une gamme de concentration de (25 ;50 ;75 et 100 (mg) de microbilles chitosane) (p/v) dans des tubes à essais stériles contenant 10ml de bouillon BHI. Les CMI des différents composés vis-à-vis des souches bactériennes sont déterminés par la DO spectrophotométrie à 600nm et par ensemencement sur gélose MH grâce à la méthode des spots (10µl/spot) ceci après avoir effectué des micro-dilutions.

## **V.6 Dosage des métaux lourds**

### **V.6.1. Objectif :**

Notre objectif c'est déterminer le pouvoir biosorbant de nos microbilles de chitosane par rapport au temps et de quantités absorbées par les microbilles vis-à-vis des trois métaux étudiés séparément.

On utilisant des solutions métalliques préparées et on ajoutant notre masse de biosorbant (les billes de chitosane) afin de mettre en évidence un dosage des métaux lourds par une spectrophotométrie à absorption atomique.

### **V.6.2. Analyse en spectrophotométrie à absorption atomique :**

#### **V.6.2.1. Principe :**

L'absorption atomique de flamme est une méthode qui permet de doser essentiellement les métaux en solution. C'est une méthode d'analyse élémentaire qui utilise la propriété des atomes d'être excités par l'apport à une énergie extérieure sous forme d'un rayonnement électromagnétique (photons) de fréquence bien définie.

Tout corps chimique peut absorber les radiations qu'il émet lui-même dans les conditions déterminées. Les atomes, à la température ordinaire, sont au niveau d'énergie fondamentale. Le passage à l'état excité se fait par un rapport d'énergie électromagnétique. Chaque atome ne

peut absorber qu'un photon de fréquence caractéristique de l'atome (lui permettant de passer à un niveau d'énergie quantifié supérieur). L'absorption atomique consiste en la mesure de l'absorption des radiations photoniques spécifiques par des atomes en phase vapeur.

(Morlot, 1996 ; Otero et al, 2009).

#### V.6.2.2. Appareillage :

L'appareil de mesure comporte cinq constituants essentiels selon (Fourest, 1993) :

- ✓ Un générateur de photon : soit une lampe à cathode creuse qui fournit le spectre des raies de l'élément à doser dont on isole la raie de résonance.
- ✓ Une cellule d'absorption : elle est composée d'un nébuliseur et d'un bruleur, et produisant un gaz d'atomes libres. La température de la flamme (environ 2300°C), produite par un mélange air-acétylène, conditionne l'atomisation de l'élément.
- ✓ Un monochromateur : son rôle est de sélectionner la longueur d'onde caractéristique de l'élément.
- ✓ Un détecteur photomultiplicateur : il transforme en courant tous les photons reçus, alors que seuls les photons issus de la cathode creuse sont intéressants. On module le faisceau lumineux émis par la lampe à la sortie de celle-ci par un cache tournant.
- ✓ Un circuit électronique : il traite et affiche les données obtenues soit en absorption ou converties en concentration grâce à un étalonnage automatique de l'appareil.

#### V.6.2.3. Protocole de dosage

Le protocole de dosage des métaux lourds par la méthode de la spectroscopie d'absorption atomique est effectué par plusieurs étapes :

- 1- Choisir la lampe appropriée à l'élément à doser.
- 2- Chauffer la lampe sélectionnée.
- 3- Sélectionner la longueur d'onde du monochromateur.
- 4- Régler le zéro du détecteur en absence de radiation.
- 5- Etalonner l'appareil.
- 6- Tracer la courbe d'étalonnage en portant l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration.
- 7- Passer les échantillons à doser et déduire leur concentration en fonction de la courbe d'étalonnage.

### V.6.3. Mode opératoire :

La biosorption des métaux par les billes de chitosane est réalisée et mesurée selon (Benaissa et Benguella, 1998).

#### V.6.3.1. Préparation de la solution métallique :

Elle est réalisée par l'ajout des trois métaux (Cu, Cd, Zn) dans différents fioles remplies de 100 ml de l'eau désalée pour atteindre à 100ppm de masse métallique :

##### a- solution de cuivre :

(CuN<sub>2</sub>O<sub>6</sub>3H<sub>2</sub>O) →M=241.6 mol/L, 241.6 →63.546g / x →0.1 g (100ppm)

x = 0.3802g/l.

##### b- solution de cadmium :

(Cd N<sub>2</sub> O<sub>6</sub> 4H<sub>2</sub>O) →M= 308 mol/L, 308 →112g /x→0.1g (100ppm)

x=0.275 g/l.

##### c- solution du zinc :

(N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Zn6H<sub>2</sub>O) →M=279 mol/L, 279→65g /x→0.1g(100ppm)

x = 0.457g/l.

Après préparation des solutions métalliques on ajoutant notre masse de billes de chitosane (100 mg ) pour 100 ml de l'eau distillé avec une agitation de 10 min avant de la mettre en lecture sur le spectrophotomètre a absorption atomique comme il est représenté dans la figure 10.



**Figure 10** - préparation de différentes solutions métalliques avec les billes de chitosane. (Original).

#### V.6.3.1. Lecture en spectrophotométrie d'absorption atomique :

Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre d'absorption atomique PERKIN-ELMER A analyste 300 (**Figure 11**) en utilisant une lampe à cathode creuse et un courant d'exploitation de 5-50mA.



**Figure 11** - photo d'un Spectrophotomètre d'absorption atomique PERKIN-ELMER A analyste 300.

Avant de commencer nos analyses, nous avons effectué une série des courbes d'étalonnage de chaque type d'élément métallique ainsi que les paramètres de mesure représentés dans le Tableau 10. Les solutions standards ont été préparées avant chaque mesure selon les conditions de l'analyse telles que le slit (Sensibilité) et le maximum de linéarité pour chaque ion métallique.

**Tableau 10** - les paramètres de mesure de chaque élément métallique

<b>Ion métallique</b>	<b>Sensibilité (nm)</b>	<b>Maximum de linéarité (ppm)</b>	<b>Longueur d'onde (nm)</b>
<b>Cu</b>	<b>0.2</b>	<b>327,4</b>	<b>5</b>
<b>Zn</b>	<b>0.2</b>	<b>213,9</b>	<b>1</b>
<b>Cd</b>	<b>0.2</b>	<b>326,1</b>	<b>2</b>

Chaque solution métallique a été mesurée pendant 2h et 30 min pour le suivie de la cinétique de la biosorption des métaux par les microbilles de chitosane bien sûr avec des facteurs d'influence tel que : le temps de contact, le PH du milieu, la température et la masse des billes de chitosane.

La quantité de métal fixé par les billes biosorbants est déterminée par différence entre les Concentrations ( $C_0$ ) initiale et instantanée ( $C_t$ ) de la solution et calculée comme suit :

$$q \text{ (mg/g)} = (C_0 \text{ (mg/l)} - C_t \text{ (mg/l)}) \cdot (v \text{ (l)/m) (g)}$$

$C_0$  et  $C_t$  sont respectivement les concentrations : initiale et instantanée en ion métallique (mg/l).

$V$  est le volume de solution (ml).  $m$  est la masse du biosorbant utilisé (mg).

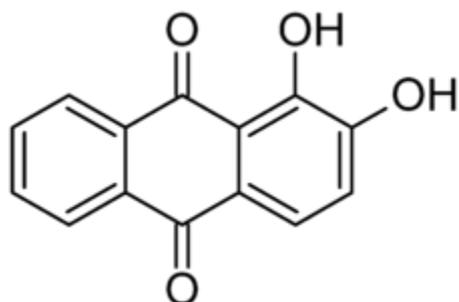
## V.7 Effet des billes de chitosane sur un colorant « Rouge d'alizarine »

### V.7.1. Les colorants

Nous nous sommes intéressés à éliminer un colorant à savoir : le rouge d'alizarine. L'Alizarine (ou Rouge mordant) est un pigment rouge d'origine végétale, extrait de la racine de la Garance des teinturiers (*Rubiatinctorum* L.), une plante vivace de la famille des Rubiacées, autrefois largement cultivée pour la teinture qu'elle fournissait. Le terme "alizarine" proviendrait du jus d'Al-usara, originaire d'Arabie.

Le rouge d'alizarine est une alizarine sulfoconjuguée (dioxyanthraquinose ou 1,2-dihydroxyanthraquinone) ... Le groupe quinonine est un chromophore acide très énergétique : c'est donc un colorant acide (pH du rouge d'Alizarine : de 4,6 à 6,3). C'est une anthraquinone qui se prépare facilement de manière synthétique.

Ce dernier est un colorant acide sous forme solide, un dérivé hydroxylé de l'anthraquinone. Elle est référencée au (Colour Index) comme Rouge Mordant 11. Elle est soluble dans l'hexane et le chloroforme et destinée à la teinture des textiles. Elle change de couleur selon le pH, et peut donc servir d'indicateur de pH. L'alizarine a une formule moléculaire de  $C_{14}H_8O_4$  de masse moléculaire  $240,2109 \pm$  g/mol.



**Figure 12** - Formule développée du rouge d'alizarine ([wikipedia.org/wiki/Alizarine](https://wikipedia.org/wiki/Alizarine))

La première approche consiste en la détermination des propriétés spectrophotométriques UV-visible de ce colorant c'est-à-dire la détermination de  $\lambda_{max}$  pour laquelle l'absorbance est maximale et la vérification de la loi de Beer-Lambert dans un domaine de concentration.

Le dosage de l'effet chélateur des microbilles se fera par la suite à différentes concentrations du colorant et des billes.

### V.7.2. Le matériel

Le matériel utilisé dans ce travail est :

- Un tamis permet d'obtenir des billes de diamètre inférieur à 125µm.
- Un pH mètre dont l'utilité est nécessaire du fait que le caractère acido-basique est un facteur déterminant dans la fixation des colorants sur le dépolluant.
- Un agitateur qui permet l'homogénéisation des solutions.

### V.7.3. Préparation des solutions de colorant

Nous avons préparés une solution mère dont la concentration est de 250 mg/l. A partir de cette solution nous avons préparé les solutions filles et pris aussi un échantillon de cette concentration ; nous avons ajusté le pH à la valeur 4 par le HCl 0.1 M qui correspond au pH pour lequel nous avons obtenu un taux de biosorption relativement élevé.

### V.7.4. Le calcul du taux d'inhibition d'un paramètre :

Le taux d'inhibition, exprimé en pourcentage, est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{DO}_i - \text{DO}_{\text{finale}})}{\text{DO}_i}$$

## V.8 Dosage de la fraction protéique du chitosane

### ➤ Principe

Le "test de Lowry : protéines par Folin Reaction" (Lowry et al, 1951) a été le plus largement utilisé procédé pour estimer la quantité de protéines dans des échantillons biologiques. D'abord, les protéines sont prétraitées avec des ions cuivre dans une solution alcaline, puis les acides aminés aromatiques dans l'échantillon traité à réduire le phosphomolybdate-phosphotungstic acide présent dans le réactif de Folin.

Le produit donne une couleur bleu à la fin de cette réaction, la concentration des protéines dans l'échantillon peut être estimée par lecture de l'absorbance (à 750 nm). Une courbe d'étalonnage d'une solution de protéine standard sélectionné (Sérum-albumine bovine-BSA-solution) est utilisée pour pouvoir mesurer la concentration protéique de surnageant de nos échantillons testés.

La solution Lowry est un mélange de produits chimiques ci-dessus qui doit être préparé au jour de la mesure. Bien que les solutions individuelles, pour la solution Lowry peut être préparé à l'avance et ensuite mélangée.

➤ **Solution de Lowry** (0,7 ml / échantillon)

Solution A + Solution B+ Solution C avec un rapport (vol : vol) de 100 :1 :1.

✓ **Solution A** (solution alcaline) (pour 500 ml d'eau distillée)

2,8598 g ➡ NaOH

14,3084 g ➡ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

✓ **Solution B** (pour 100 ml d'eau distillée)

1,4232 g ➡ CuSO<sub>4</sub>.5 (H<sub>2</sub>O)

✓ **Solution C** (pour 100 ml d'eau distillée)

2,85299 g ➡ Na<sub>2</sub>Tartrate.2 (H<sub>2</sub>O)

➤ **Folin** (0,1 ml / échantillon)

➤ **BSA** (Sérum-albumine bovine)

Bien que la BSA soit une protéine soluble dans l'eau, il faut du temps pour le dissoudre complètement pendant 1 heure avant de commencer les expériences.

- Peser 0.05 g de BSA et l'ajouter le volume à 500 ml d'eau distillée.
- Bien remuer pour dissoudre et ajuster le volume à 500 ml avec de l'eau distillée : concentration finale de la solution de BSA est de 100 mg /L
- Préparer des dilutions suivantes (voir tableau ...).

**Tableau 11** - Dilutions de la solution mère de BSA (100 mg / L) pour la courbe d'étalonnage.

Eau distillé (ml)	Solution BSA (ml)	Concentration (mg /l)
10	00	00
08	02	20
06	04	40
04	06	60
02	08	80
00	10	100

➤ **Procédure de méthode de Lowry**

- Préparer la solution mère de BSA et des dilutions de la courbe d'étalonnage (Tableau 4, préparé fraîchement).
- Préparer la solution en mélangeant le Lowry Sol. A, B, et C mélangé trois fois par vortex, l'échantillon/ dilution (ou standard) et transférer 0,5 ml dans un tube de 10 ml.
- Ajouter 0,7 ml de solution Lowry aux tubes.
- Incuber pendant 20 min à température ambiante dans l'obscurité
- Ajouter de 0.1 ml de folin dans chaque tube, vortex brièvement, incubé pendant 30mn à température ambiante dans l'obscurité.
- Après 30 minutes, les échantillons sont mélangés par vortex brièvement les échantillons sont transférés (2 à 3 ml) dans des semi-micros cuvettes jetables
- Mesurer la densité optique à 750 nm, étalonné le spectre avec de l'eau distillée pour la solution BSA et solution (Lowry + Folin) (vol : 7 :1) pour notre échantillon.
- Puis enregistrer les valeurs d'absorption pour les normes et les échantillons.
- Préparer la courbe d'étalonnage de l'absorbance.
- Lectures des normes et calculer la teneur en protéines des échantillons en mg BSA / L à partir de cette courbe.

## V.9 Détermination de la teneur en cendres

➤ **Principe :** La matière sèche obtenue après déshydratation d'un produit est composée de substances minérales et organiques. Il s'agit de molécules complexes constituées majoritairement des éléments C, H, O et N. Un chauffage puissant au four à 500°C (four à mouffles) pour éliminer et détruire toutes les matières organiques qui seront dégradées en matières minérales qui s'échappent du creuset sous forme gazeuse, c'est la minéralisation :



La minéralisation se fera dans un four à moufle à  $525^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$  pendant 3 heures. Il reste dans le creuset en porcelaine les sels minéraux sous forme de cendres blanches.

Pour l'expression des résultats, nous utiliserons la minéralisation par voie sèche.

**Taux de cendres (en %) =  $[(m / p) * 100]$**

**m** : la masse du résidu après incinération.

**p** : la masse de la matière sèche avant incinération.

## V.10 Détermination du taux d'humidité

### V.10.1. Définition

La « teneur en eau » d'un produit veut dire la quantité d'eau exprimée en pourcentage contenue dans un composé en parallèlement la « matière sèche » c'est le résultat de la déshydratation ou l'élimination de l'eau d'un composé, elle est exprimée en g/100g pour un produit solide.

### V.10.2. Principe

Dessiccation par évaporation à une température donnée d'une quantité de produit, jusqu'à masse constante. La méthode employée est une méthode de référence étalonnée : étuvage à température modérément élevée. Elle se fera à  $(103 \pm 2)^{\circ}\text{C}$  / 3 heures, dans une étuve isotherme.

### V.10.3. Mode opératoire : Dessiccation sans pré-séchage

- Peser la capsule vide  $\rightarrow (M_0)$
- Prendre comme fraction d'épreuve de 1 g de produite pour l'analyse
- Mettre la portion d'analyse au centre de capsule
- Peser l'ensemble  $\rightarrow (M_1)$
- Placer la capsule dans l'étuve réglée à la température de  $(103 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ , éviter d'ouvrir l'étuve pendant 3 heures.
- Laisser la capsule refroidir pendant 30 min

- On pèse la capsule après refroidissement ( $M_2$ )

Les résultats de la détermination de taux d'humidité ( $w$ ) doivent être exprimés selon la formule suivante :

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

$M_0$  : désigne la masse en gramme de la capsule vide.

$M_1$  : désigne la masse en gramme de la capsule avec l'échantillon avant séchage.

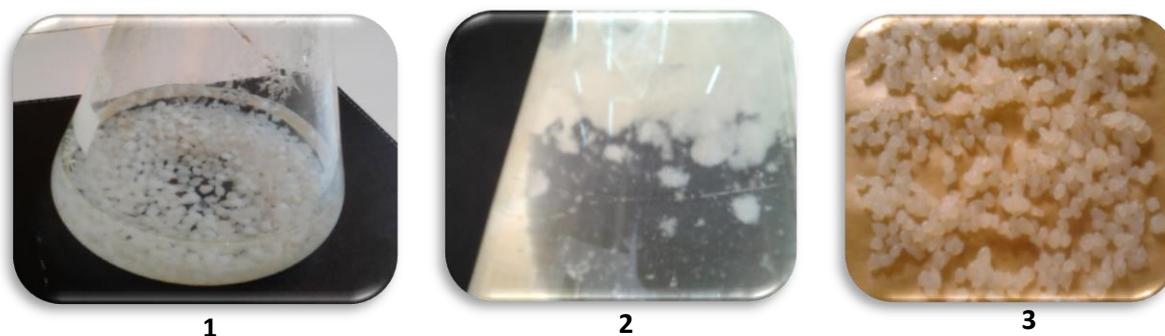
$M_2$  : désigne la masse en gramme de la capsule avec l'échantillon après séchage.

***CHAPITRE III :***  
***RÉSULTATS &***  
***DISCUSSIONS***

## VI.1 Préparation du chitosane et de ses microbilles :

Visuellement, l'aspect général du produit constitue un critère d'appréciation. Le produit chitine obtenu par voie chimique est nettement plus rosé que le produit chitosane. La différence de couleur est clairement visualisée sur la figure N 8 et laisse deviner la forte présence d'impuretés dans le produit chitine. Nous avons observé que la couleur de la chitine s'estompait progressivement avec le temps, probablement du fait de la dégradation des caroténo-protéines. Au contraire, le produit chitosane présente un aspect presque blanc, de texture plastique, convenable pour notre travail et éventuellement, sa commercialisation.

Puis nous nous sommes intéressés à l'élaboration des billes (perles) de chitosane selon le protocole cité précédemment ; Nous avons obtenu les billes et lentilles illustrées dans la figure 13.

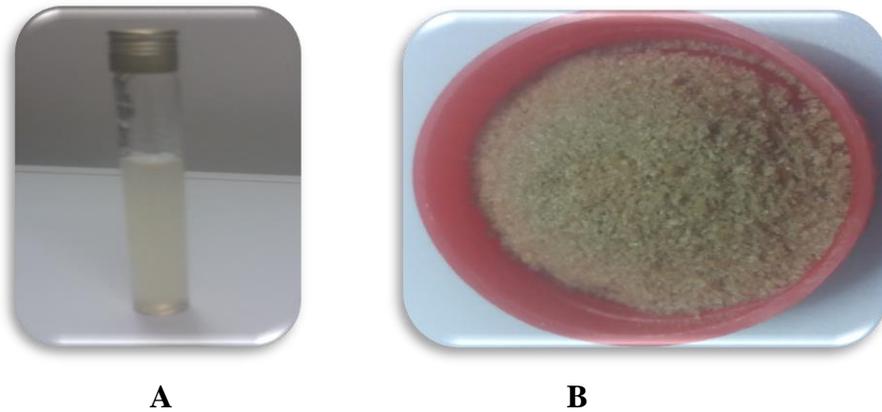


**Figure 13 - Billes de chitosane.** (1) Billes de chitosane du commerce ; (2) B. de chitosane extrait et (3) B. de chitosane mises à sécher. (Original).

Ceci correspond aux travaux de **(Djelad, 2011)** qui a constaté que si la viscosité n'est pas assez élevée on a des billes  $\pm$  aplaties (lentilles) ; et contrairement si la viscosité est très élevée on constate la formation de billes ovales avec queue.

Comme on l'a cité en littérature la viscosité du chitosane dépend elle-même des paramètres suivants : surtout le degré de désacétylation, le poids moléculaire, la concentration, les liaisons ioniques, la température et le pH. **(Wan et al, 2004)**.

Vu que le chitosane du commerce a donné des billes sphériques et que son DD est élevé, on peut conclure que le chitosane obtenu par extraction a un DD moins /DD du chitosane du commerce, notamment pour sa viscosité, sa solubilité et surtout son poids moléculaire **(Djelad, 2011)**.



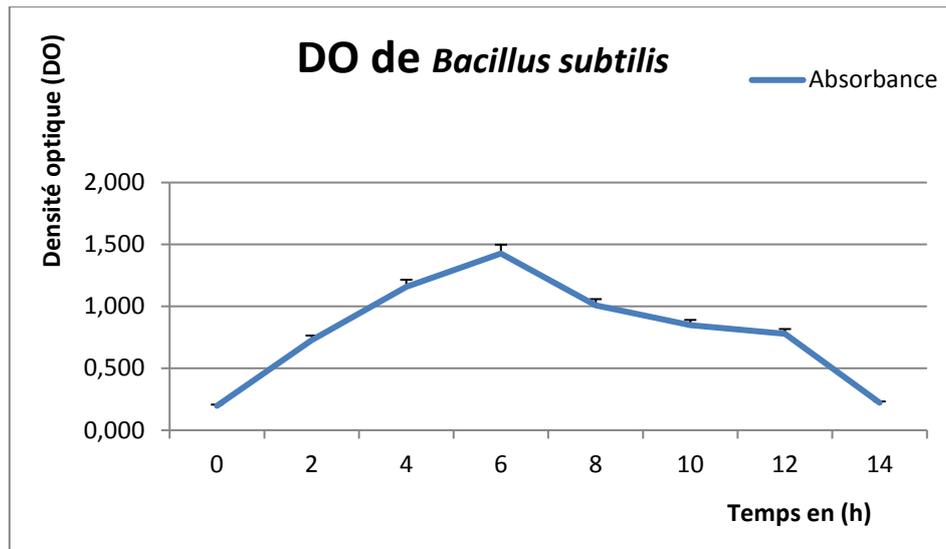
**Figure 14** - (A)Chitosane extrait solubilisé ; (B) microbilles obtenues après séchage et mouture (original).

Concernant les billes obtenues, la texture des sphères repose sur le type de séchage appliqué : conventionnel à température ambiante **hydrogels** pendant 48h ce qui les transforme en **xérogels** dure et de couleur brune ; car il a perdu son eau et la structure poreuse s'est refermée et cela explique sa dureté ; c'est ce qui a été appliqué. Ou un séchage en supercritique au CO<sub>2</sub> (Djelad, 2011).

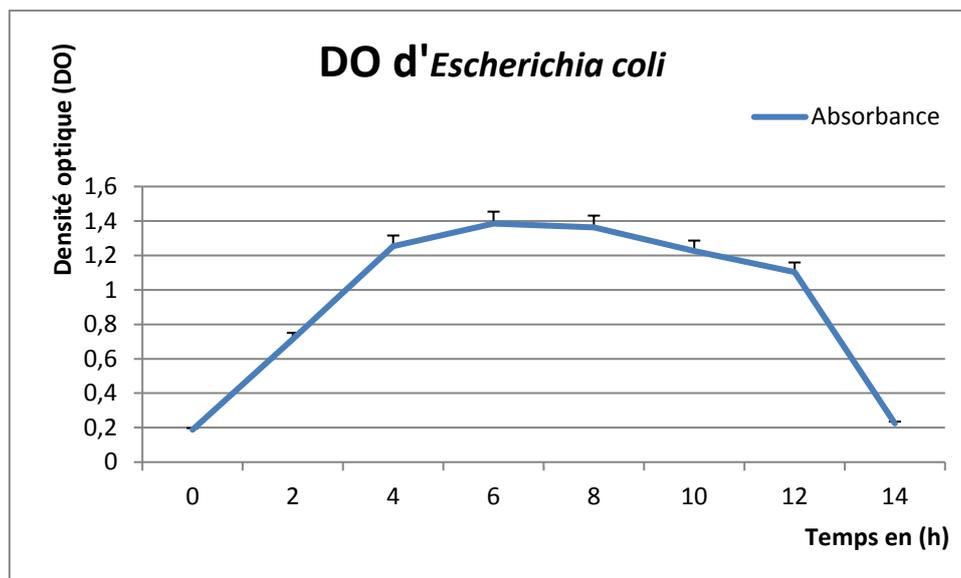
## VI.2 Les souches pathogènes et la cinétique bactérienne

A partir de l'analyse des cinétiques de croissance, il est intéressant de relever que les deux souches pathogènes de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Escherichia coli* CIP 76.24; présentent le même profil cinétique au début de la phase exponentielle, la cinétique de croissance est représentée respectivement dans la figure 15 et 16 avec des densités optiques variables selon l'espèce.

Il a été remarqué que pour les charges bactériennes de 10<sup>5</sup> UFC/ml, les pathogènes sont atteints en 4h d'incubation, la croissance est très rapide après 6h, à savoir 10<sup>9</sup> UFC/ml, les valeurs du taux de croissance diminuent après 6 heures.



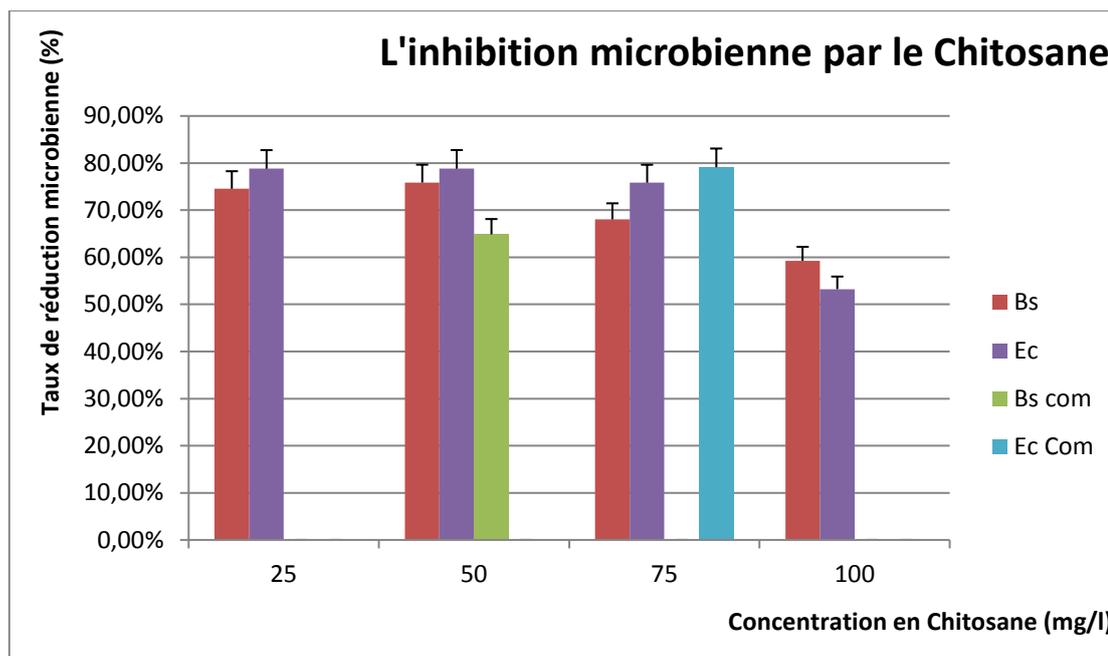
**Figure 15** - Cinétique bactérienne de *Bacillus subtilis* dans le milieu BHIB sur plus de 12h.



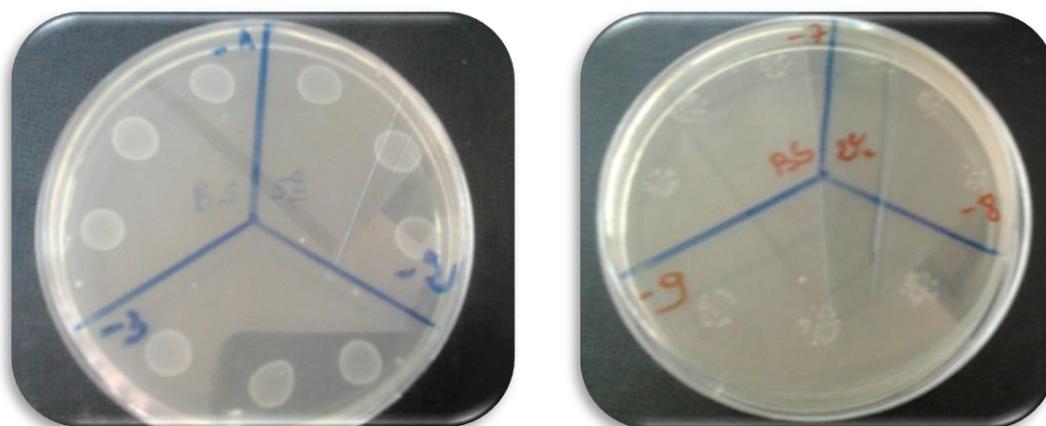
**Figure 16** - Cinétique bactérienne d'*Escherichia coli* dans le milieu BHIB après plus de 12h.

Nous concluons qu'il faut 6h à chacune des espèces pour être en pleine phase exponentielle, donc c'est le temps nécessaire pour l'incubation des souches.

### **VI.3 Suivi de la concentration minimale inhibitrice avec les microbilles de chitosane sur les souches**



**Figure 17** - Pouvoir antagoniste du chitosane en présence de *Bacillus subtilis* et d'*Escherichia coli* à différentes concentrations (25 ;50 ;75 et 100 mg).



**Figure 18** - Dénombrement de la charge microbienne *Bacillus subtilis* par la méthode des spots sur M.H. en présence du chitosane. (Original)

Nous remarquons que le chitosane a une activité antibactérienne importante vis-à-vis *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ceci s'explique car, le chitosane agit comme agent chélateur d'anions pouvant éliminer de l'environnement bactérien certains métaux à l'état de traces indispensable à la croissance et/ou à la production des toxines (Shahidi et al, 1999). Pour Les bactéries Gram-positives, l'acide lipotéichoïque pourrait fournir une liaison moléculaire pour le

chitosane à la surface de la cellule, lui permettant de perturber les fonctions membranaires **(Raafat et al, 2008)**.

Notons que l'action bactéricide est plus importante vis-à-vis d'*E. Coli* **(Chen et Liau et al, (1998))** ce qui concorde avec nos résultats et explique que l'activité antimicrobienne du chitosane dépend de plusieurs facteurs : sa nature, son degré de polymérisation, son origine, la composition du substrat et des conditions environnementales. Son action antimicrobienne comporte des effets antifongiques, antibactériens et algicides.

Il agit de différentes manières. Il a d'abord un effet inhibiteur sur certaines enzymes. Par ailleurs, son caractère chélatant le conduit à emprisonner des cations métalliques qui limitent la production de toxines et la croissance des micro-organismes. Enfin, les groupements ammonium du chitosane ont des effets bactériostatiques et bactéricides, en particulier s'ils sont quaternaires.

Nos résultats concordent avec ceux de **Chung et al, (2004)** qui montrent une corrélation hydrophile et une efficacité d'inhibition du chitosane vis-à-vis des bactéries Gram-positives (*L.monocytogene, B.megaterium, B.creus, S.aureus, ...*), ainsi que les travaux de **No et al, (2002)**, montrent que le chitosane a un effet bactéricide important.

Dans un autre travail **Qin et Li (2006)** déclarent aussi qu'en général, les moisissures et les levures sont les plus sensibles au chitosane suivies des bactéries. Seule, la fraction soluble en milieu acide (pH 5,5) présente une capacité antimicrobienne ; aux pH supérieurs, le biopolymère est insoluble, ce qui se traduit par une perte drastique de son efficacité.

Le mécanisme d'action du chitosane est attribuable à l'interaction ionique entre les groupes cationiques de ses macromolécules avec les groupes anioniques de cette membrane cellulaire microbienne, qui sont à l'origine de la rupture de la membrane **(Rabea et al, 2003)**. L'efficacité antibactérienne du chitosane augmente avec l'augmentation de sa masse molaire, de son degré de désacétylation et de sa concentration. Concernant l'influence du pH, l'activité antibactérienne du chitosane est plus efficace à pH faible, mais, cette activité diminue avec l'augmentation de la masse molaire et varie avec les bactéries cibles. **(Liu et al, 2000)**.

Nous retenons que la réduction bactérienne est de plus de 50% pour les deux germes, et pour les deux types de chitosane ; et que l'effet contre *E. Coli* est plus important, sauf pour la concentration de 100mg/l.

#### VI.4 La biosorption des métaux par les microbilles de chitosane

Les tableaux ci-dessous représentent les résultats de la quantité de métaux biosorbée (adsorbée) en fonction du temps de contact des microbilles avec la solution métallique (2h) et les concentrations des métaux. Selon le rapport suivant :

$$q \text{ (mg/g)} = (C_0 \text{ (mg/l)} - C_t \text{ (mg/l)}) \cdot v \text{ (l)} / m \text{ (g)}$$

##### A- Pour le cas de Zinc (Zn) :

**Tableau 12** - La quantité de métal (Zn) biosorbée (adsorbée) en fonction du temps de contact des microbilles avec la solution métallique (original)

Temps de contact	T0	T1	T2	T3
Concentration du métal (mg /l)	100mg/l	8.518 mg/l	8.321 mg/l	8.279 mg/l
Quantité biosorbé (mg)	0mg	91.482 mg	91.679 mg	91.721mg

##### B- pour le cas de Cadmium (Cd) :

**Tableau 13** - La quantité de métal (Cd) biosorbée (adsorbée) en fonction du temps de contact des microbilles avec la solution métallique (original)

Temps de contact	T0	T1	T2	T3
Concentration du métal (mg /l)	100	25.1	24.53	22.82
Quantité biosorbé (mg)	0.0	74.9	75.47	77.18

### C - Pour le cas de Cuivre (Cu) :

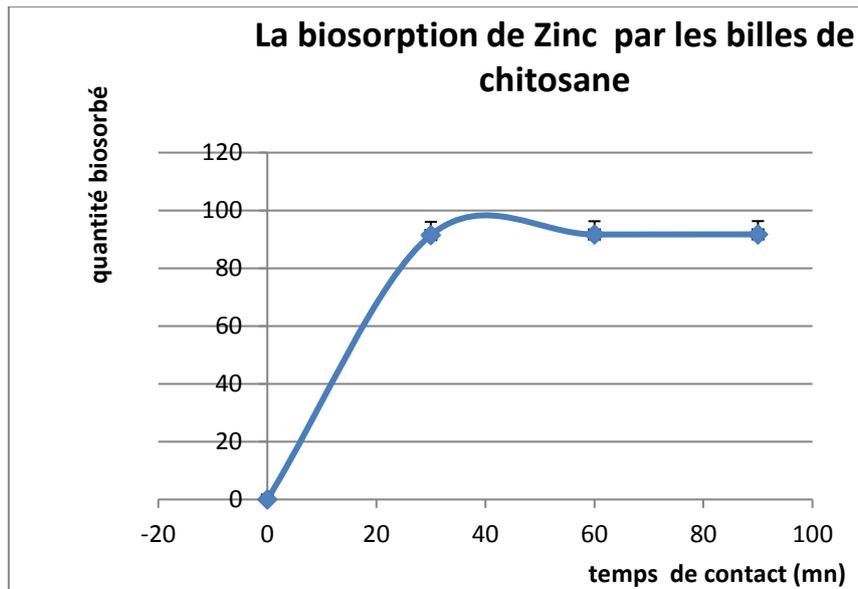
**Tableau 14** - La quantité de métal (Cu) biosorbée (adsorbée) en fonction du temps de contact des microbilles avec la solution métallique (original)

Temps de contact	T0	T1	T2	T3
Concentration du métal (mg /l)	100	53.77	44.20	44.12
Quantité biosorbé (mg)	0.0	46.23	55.80	55.88

Après avoir obtenu ces résultats nous avons calculé les quantités biosorbées par le contact des billes de chitosane qui sont montrés dans les figures ci-dessous :

#### VI.4.1. Pour le cas de Zinc (Zn)

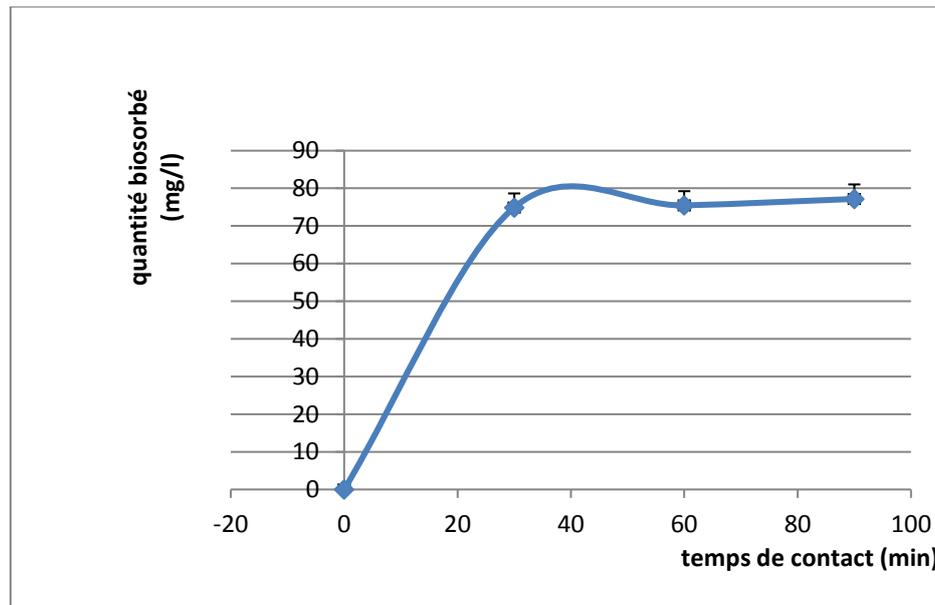
La figure 19, représente la quantité de zinc biosorbée en fonction du temps de contact des microbilles de chitosane avec la solution métallique, montre une allure caractérisée par une forte augmentation de biosorption du zinc par ces billes pendant les premières minutes de contact (solution-billes), suivie d'une augmentation lente jusqu'à atteindre un état d'équilibre. Le temps nécessaire pour atteindre ce dernier est d'environ 2h. Ces résultats sont en accord avec celles de **(Benaïssa et Benguella, 1998)**.



**Figure 19** - Cinétique de biosorption du zinc par les billes de chitosane :  $C_0 = 100 \text{ mg/l}$  ;  $m/v = 1 \text{ g/l}$ . (originale)

#### VI.4.2. Pour le cas de Cadmium (Cd)

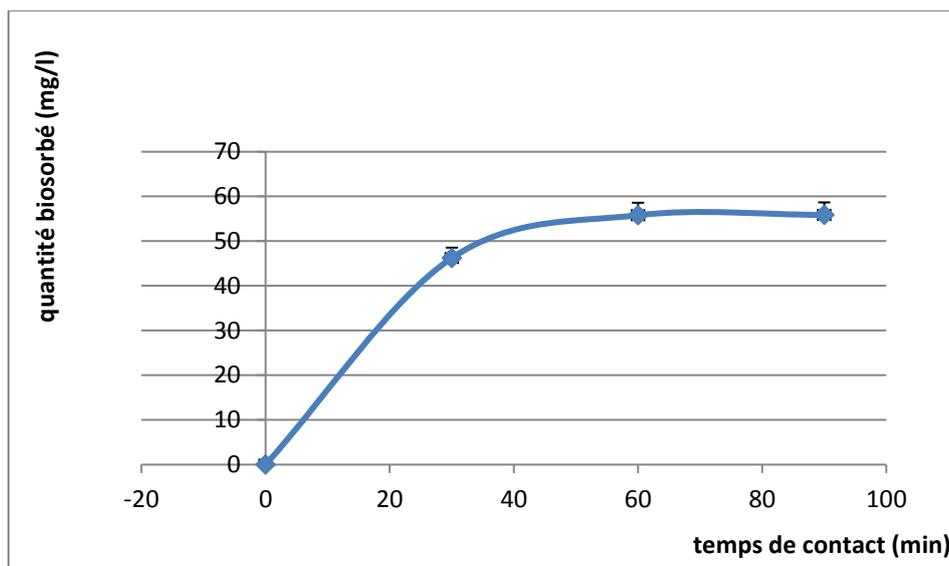
La quantité de Cadmium biosorbée est représentée dans la figure 20, en fonction du temps de contact des microbilles de chitosane avec la solution métallique ; montre une allure caractérisée par une forte biosorption du Cadmium par les billes pendant les premières minutes de contact (solution-billes), suivie d'une augmentation lente jusqu'à atteindre un état d'équilibre pendant 2h. (Benguella B., 1999).



**Figure 20** - Cinétique de biosorption du Cadmium par les billes de chitosane :  $C_0 = 100$  mg/l ;  $m/v = 1$  g/l.

#### VI.4.3. Pour le cas de Cuivre (Cu) :

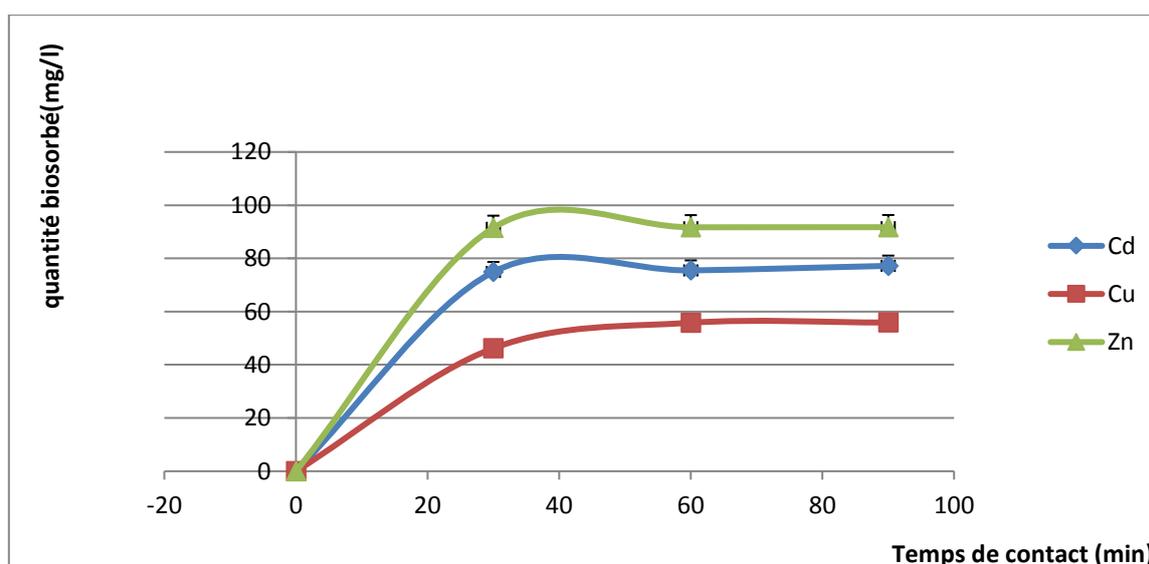
La figure 21, représente la quantité de Cuivre adsorbée en fonction du temps de contact des microbilles de chitosane avec la solution métallique, montre une allure caractérisée par une forte augmentation de biosorption du Cuivre par les billes pendant les premières minutes de contact (solution-billes (**Benguella, 1999**)), suivie d'une augmentation lente jusqu'à atteindre un état d'équilibre. Le temps nécessaire pour atteindre ce dernier est d'environ 1h 30min.



**Figure 21** - Cinétique de biosorption du zinc par les billes de chitosane :  $C_0 = 100$  mg/l ;  $m/v = 1$  g/l. (originale)

**Remarque :**

Nous avons remarqué que la quantité de biosorption des métaux est variable d'un métal à l'autre selon les paramètres d'influence sur la cinétique de biosorption (pH, température, concentration des milieux ...), (Benaissa et Benguella, 1998) et parmi les trois métaux étudiés le plus biosorbé c'est le Zn comme il est défini dans la figure 22, ci-dessous .



**Figure 22** - Cinétique de biosorption des métaux (Cd, Zn, Cu) par les billes de chitosane

## Conclusion :

Après l'exploitation des résultats on peut dire que notre produit (les billes de chitosane) a un pouvoir biosorbant vis-à-vis les trois métaux étudiés avec l'intervention des paramètres ambiants telle que les conditions de manipulation : la température, le pH de solution aussi la durée de l'agitation, ont une influence sur la cinétique de biosorption.

La quantité maximale atteinte des métaux biosorbés augmente avec l'augmentation dans les valeurs de certains paramètres tels que : la concentration initiale en métal et la masse des billes de chitosane préparées jusqu'à atteindre la valeur optimum.

Elle augmente aussi avec l'augmentation de pH initial de la solution jusqu'à 7, il y a une compétition entre les protons et l'ion métalliques réduit les performances de biosorption de notre produit. (Crini, 2007 et Benguella, 1998).

Cette propriété est utilisée pour piéger les composés dangereux, pour les éliminer ou les doser (Camci-Unal et Pohl 2010 ; Skorik et al, 2010).

Le chitosane est également employé pour recycler les effluents de l'industrie textile en retenant des pigments (Hsien et Rorrer, 1995).

## VI.5 Effets des billes de chitosane sur un colorant : le rouge d'alizarine

Pour déterminer  $\lambda_{\max}$  du colorant utilisé nous avons tracé l'absorbance en fonction de  $\lambda$ , les résultats obtenus sont représentés sur la figure 2 :

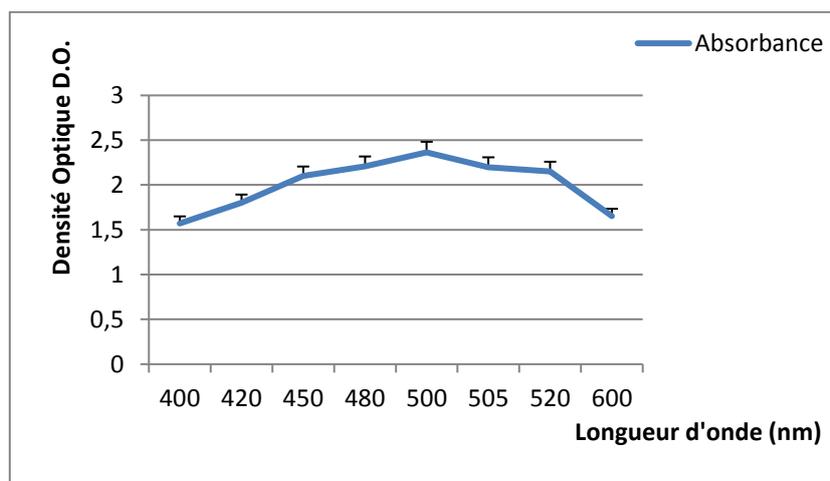
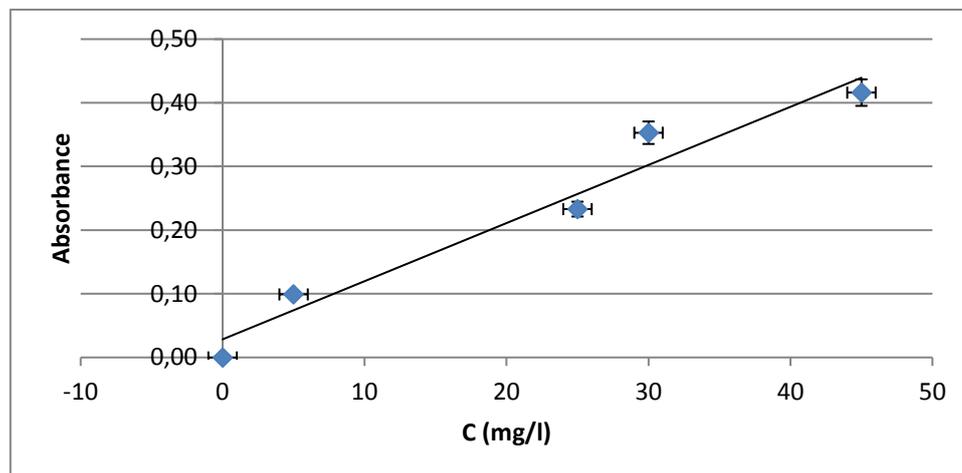


Figure 23 - Détermination du  $\lambda_{\max}$  pour le rouge alizarine.

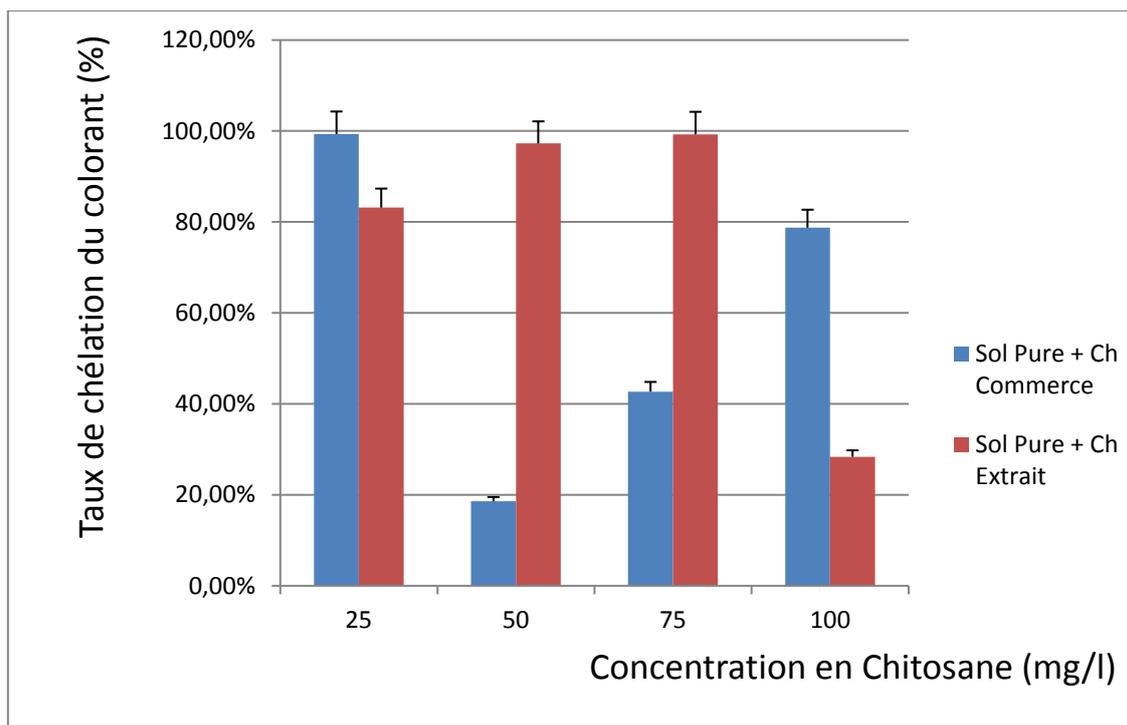
A partir de cette figure on peut déduire que la longueur d'onde maximale  $\lambda_{\max} = 500$  nm. Pour vérifier la loi de Beer-Lambert, nous avons tracé la courbe d'étalonnage pour le colorant utilisé afin de déterminer les domaines de concentrations pour lesquels la loi de Beer-Lambert est respectée (obtention d'une droite).

**Tableau 15** - Valeurs d'étalonnage pour le rouge d'alizarine.

C(mg/l)	0	5	25	30	45
Absorbance	0,000	0,099	0,233	0,353	0,416



**Figure 24** - Les valeurs d'étalonnage du rouge d'alizarine à 500nm.



**Figure 26** - Chélation du colorant (rouge d'alizarine) par le chitosane extrait et du commerce à différentes concentrations (25 ;50 ;75 et 100 mg).



**Figure 25** - L'action chélatante du chitosane du commerce et extrait vis-à-vis du rouge d'alizarine à 250mg/l. (original).

Le spectrophotomètre UV-visible nous donne l'absorbance de chaque échantillon, ce qui nous permet de déduire sa concentration à partir de la courbe d'étalonnage qui vérifie la loi de Beer-Lambert. La quantité du colorant adsorbée à l'équilibre par le biosorbant.

Le taux d'abattement du colorant est fort pour 25 et 100mg concernant le chitosane du commerce ; alors que pour le chitosane extrait, la réduction est importante pour les 50 et 75mg. Et la formule explique pour une solution pure que le chitosane récolte moins de

colorant. Ce qui correspond à la littérature qui rapporte que le chitosane peut être utilisé de plusieurs façons, la principale étant comme flocculant (Crini et al, 2009).

Les colloïdes en suspension, les métaux lourds, les colorants des eaux de teinturerie (Rhee et al, 1998) ou encore les molécules aromatiques et phénoliques (No HK et Meyers, 2000 ; Krajewska, 2004), s'agglomèrent avec le chitosane et les floccs sont retenus par filtration. Les floccs de chitosane réduisent de 50 % les MES (Rhee et al, 1998). Un autre mode d'action consiste à intégrer le chitosane directement dans la composition des membranes de filtration.

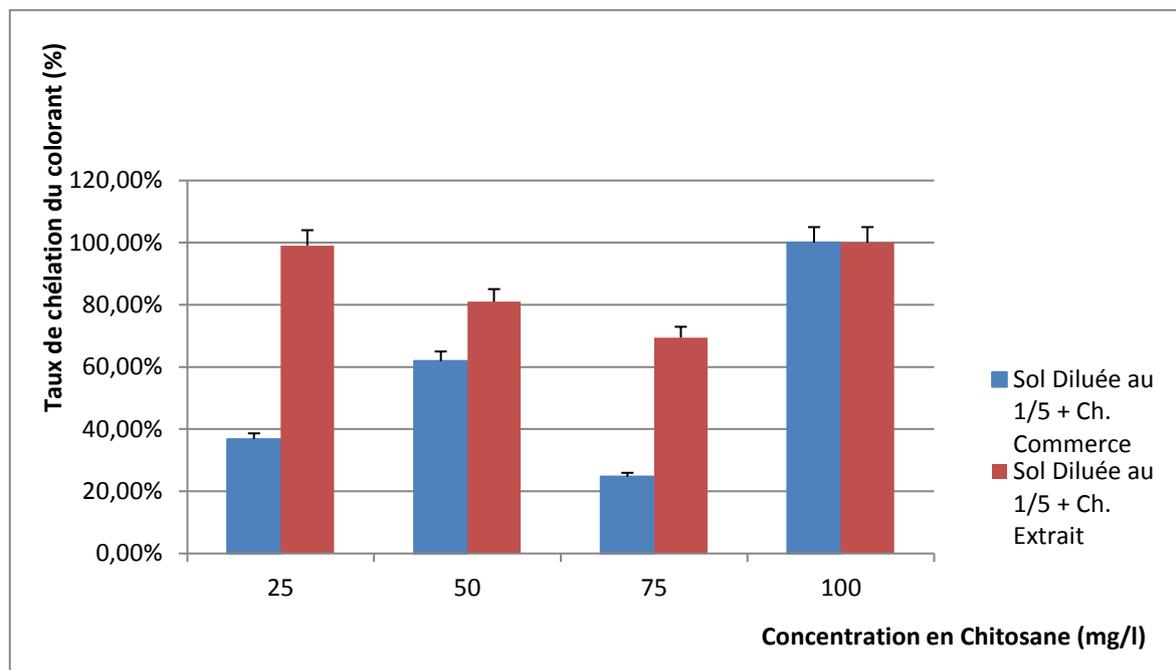


Figure 27 - La chélation du rouge d'alizarine avec le chitosane à différentes concentrations.

Tandis qu'au 1/5 de la solution de chitosane, la chélation est 100% pour les 100mg et presque la même valeur pour 25mg, et de meilleurs abattements pour le chitosane extrait / chitosane du commerce. Dans la nature la pollution se passe par des concentrations moindres pour ce type de polluant, ce qui nous emmène à la figure suivante. (Benguella, 2009).

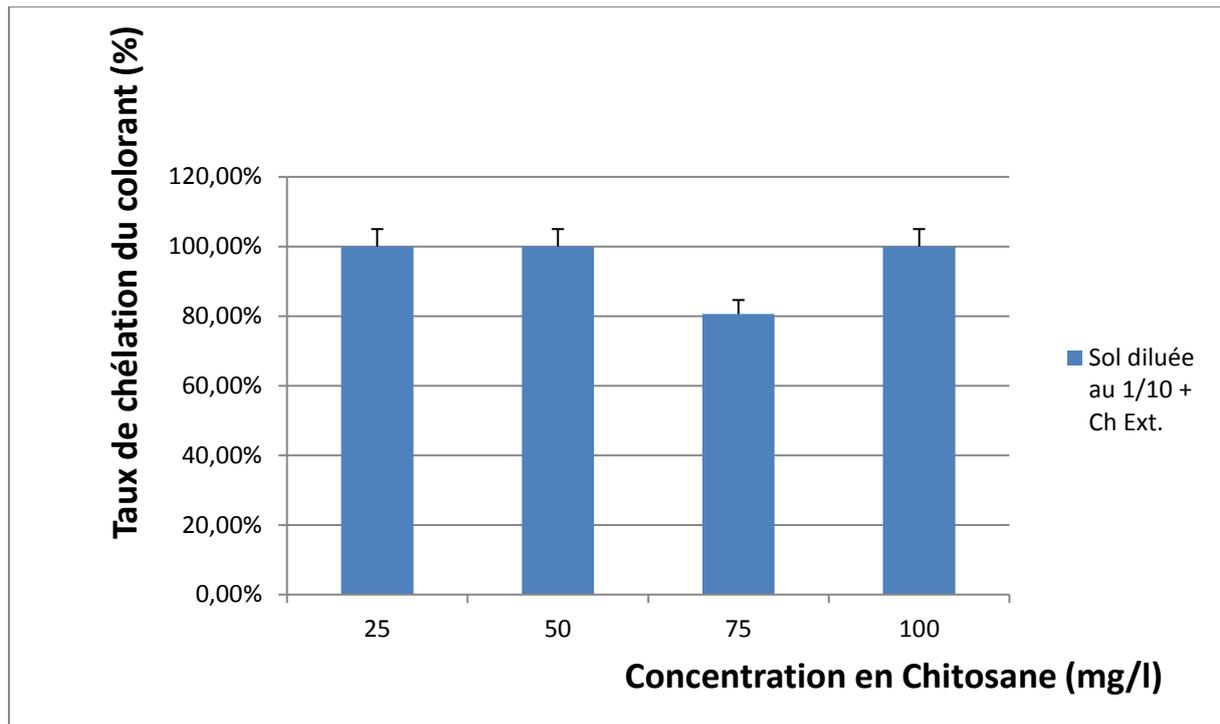


Figure 28 - taux d'abattement et de chélation du colorant avec le chitosane extrait (original).

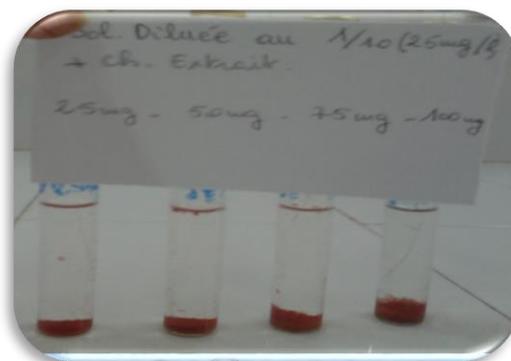


Figure 29 - Chélation presque totale de l'alizarine par le chitosane pour une dilution au 1/10 (original).

Notons finalement, que la chélation est pratiquement totale pour une concentration diluée au 1/10 ; Ce qui concorde avec les travaux de (Benguella, 2009).

## VI.6 Dosage des protéines

Les billes de chitosane préparés avaient une teneur en protéine de **2,45%** ; était déterminé par courbe d'étalonnage de BSA (Bovin Sérum Albumine). En comparant notre résultat avec ceux

de **Diaz-Rojas et al, (2006)** qui ont démontré que la chitine a un taux de protéines de 8,92 %, cela s'explique par une bonne déprotéination.

## **VI.7 Le taux de cendres**

Après le pesage d'échantillons avant et après incinération nous avons obtenu les résultats suivants :

**M** : (la masse de résidu après incinération) →26.294

**P** (la masse de l'échantillon avant incinération) →26.326

Le taux de cendre est déterminé par le rapport :  $(p - m) \times 100$

$(26.326-26.294) \times 100 = 3,2 \%$ .

Les billes de chitosane préparés avaient une teneur en cendres de 3,2 % ; cette valeur est un paramètre important qui affecte la solubilité, la viscosité et d'autres caractéristiques importantes. (**Mohan et al, 2014**). Cette teneur en cendres peut s'expliquer par une teneur importante en carbonate de calcium, dans nos sources de chitine (carapaces de crevettes et crabes), c'est un indice d'une déminéralisation moyenne avec HCL 2M. (**Peter et al, 2002**).

## **VI.8 Le taux d'humidité :**

Après le pesage d'échantillons avant et après séchage nous avons obtenu les résultats suivants :

**M<sub>0</sub>** (le poids de la capsule vide) →39.92 g.

**M<sub>1</sub>** (le poids de la capsule avec 1g de produite) →40.92g.

**M<sub>2</sub>** (le poids de la capsule remplie après le séchage) → 40.86 g.

### **VI.8.1. Détermination de la teneur en eau dans les billes de chitosane préparés**

$W = [(M1-M2) / (M1-M0)] \times 100 \rightarrow (40.92- 40.86) / (40.92 - 39.92) \times 100$

**W = 6%**

Le taux d'humidité obtenue d'après nos résultats est de 6% ; ce qui confirme que les microbilles de chitosane après séchage et broyage deviennent assez sèches. En le comparant

avec les résultats de **Lower (1984)** qui montrent que le taux d'humidité du chitosane est compris entre 10 -14 %. Donc nos résultats sont acceptables.

***CONCLUSION  
GÉNÉRALE***

## Conclusion générale

Notre étude a porté sur la dépollution des eaux usées par les billes de chitosane élaborées à partir des déchets de crustacés ; aussi sur la démonstration de l'effet antibactérien de ces microbilles contre deux souches à savoir *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (bactérie Gram positive) et *Escherichia coli* CIP 76.24 (bactérie Gram négative), après avoir établie la cinétique bactérienne de ces deux souches. Nous avons en outre vérifié l'effet chélateur de ces billes, vis-à-vis de trois métaux lourds (Zn, Cd et Cu) et d'un colorant du textile : rouge d'alizarine. Enfin, nous avons fait, la mesure de certains paramètres physico-chimiques : le taux des protéines, des cendres et d'humidité de ces billes.

A la lumière des résultats obtenus : on a élaboré des billes (perles) de chitosane qu'on a transformé en microbilles pour augmenter la surface spécifique (donc surface d'adsorption) après séchage et mouture ; nous avons démontré l'effet antimicrobien par une réduction de la charge bactérienne supérieure à 50% pour les différentes concentrations de billes et pouvant atteindre presque les 80% pour *E. coli* et dépassant les 60% pour *B. subtilis*. En plus nous avons mis en exergue, le rôle chélateur de ces billes vis-à-vis de certains métaux lourds excessivement polluants, avec une chélation totale au bout d'environ deux heures ; et pour le colorant l'alizarine, un maximum d'efficacité pour une dilution au 1/10<sup>ème</sup>, dépassant ainsi les 90% de réduction ; bien que les billes extraites n'étaient que moyennement déminéralisées, avec probablement un taux de DD pas très élevé et une viscosité moyenne, nous avons constaté qu'elles ont agi même mieux que les billes de chitosane du commerce, spécialement concernant la chélation.

Notre étude permet de conclure que l'on peut valoriser des déchets, car notre pays se doit de suivre l'évolution du recyclage, des énergies renouvelables, etc.... tout en résolvant un problème environnemental, à savoir l'épuration des eaux résiduaires, avec un produit régénérable, biodégradable, ... Et qui, selon sa pureté et son mode d'extraction, il peut être utilisé même dans d'autres domaines plus sensibles comme : la santé humaine.

Nous ne pouvions, dans ce modeste travail, montrer toutes les possibilités d'utilisation de ce biomatériau, mais la voie reste ouverte pour d'autres éventuels travaux de recherches, comme l'ont prouvé des travaux antécédents au notre.

Pour la sauvegarde de notre planète nous devons penser et agir bio, recyclable et biodégradable.

***RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES***

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- **Abdesselem A. (1999).** Suive De La Qualité Microbiologique Et Physicochimique De Trois Serres Alimentant De La Région De Tlemcen, Mémoire d'ingénieur institut de biologie université de Tlemcen. p 2-18.
- **Abdulla M. et Chmielnicka J., (1990 ).** New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals. Biol Trace Elem Res .23 :25–53
- **Académie des science., (1998).** Contamination des sols par les éléments en trace : les risques et leur gestion. Rapport 42.
- **ADEME.** Organisation et fonctionnement d'une station d'épuration, ademe.fr.
- **Adosinda M., Martins M., Nelson L., Silvestre A. J.D., Queiroz M. J.,(2003)-** Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes, Chemosphere 52 -967–973, 2003.
- **Andrieux G. (2004).** La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture : état des lieux et analyse. Etude de l'OFIMER. 63 p.
- **Aoubed A., (2007).** les différents procédés des traitements des eaux, l'université BLIDA , 80 p.
- **Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Panos I., Miralles B., Acosta N., Galed G. et Heras A.(2009).** Functional characterzation of chitin and chitosan. Current Chemical Biology. 3 :203-230.
- **Ararem F., (2010)-** Synthèse et caractérisation de biopolymères. Application au Piégeage de Colorants. Univ. Oran Es-Sénia. 2010.

### B

- **Baghdad M. et Chadouli M., (2010),** Contribution à l'étude de la qualité des eaux épurées de la station de traitement des eaux, Mémoire de fin de stage, Alger, 78p.
- **Baldwin E.A., Nisperos-Carriedo M.O, and Baker R.A, (1995)-** Use of edible coating to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. Food Science and Nutrition, 35 (6) (1995) 509-523.

- **Barbier Olivier ., Grégory ., Jacquillet., Michel ., Tauc ., Marc ., Cougnon., Philippe et Poujeol. (2004).** Nephron physiology effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol* 99: 105–110
- **Barka N., (2008)-** L'élimination des colorants de synthèse par adsorption sur un phosphate naturel et par dégradation photocatalytique sur TiO<sub>2</sub> supporté. Thèse de doctorat ; Univ. Ibn Zohr, Faculté des Sciences. Agadir. Juillet 2008.
- **Bechac J.P., Boutin P., Mercier B. et Nuer P., (1984)-** Traitements des eaux usées. 1984. Eyrolles, Paris. 281 p.
- **Benabbou R., (2009)-** Développement et caractérisation de films antimicrobiens pour la biopréservation des produits marins prêts à consommer. Thèse, Doc, Uni, Laval.
- **Benaissa H. et Benguella B., (1998)-** Kinetic study of the cadmium biosorption from aqueous solution by chitin. Fourth International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries. Istanbul-Turky 23-25 Septembre,(1998).
- **Benaissa H. et Benguella B., (1999)** Essai de modélisation de l'équilibre de Biosorption du cadmium en solution par la chitine. Deuxième colloque de Génie Chimique. Boumerdes 23-24 Février, (1999).
- **Benaissa H., Ozil P., Caire J.P. et Delachaume J.C., (1994),** Essai de récupération du cuivre en solution sur un matériau biosorbant à l'état brut, Actes du 3ème colloque franco-Maghrébin de catalyse Rabat Mai, (1994).
- **Benguella B., (1998)-** Kinetic study of the cadmium biosorption from aqueous solution by chitin. Fourth International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries. Istanbul-Turky 23-25 Septembre,(1998).
- **Benguella B., (1999)-** Elimination du cadmium en solution aqueuse par un matériau biosorbant : la chitine. Thèse de Magister de L'Université Abou-Bekr BELKAID de Tlemcen, (1999).
- **Benguella B., (2009)-** Valorisation des argiles Algériennes application à l'adsorption des colorants textiles en solution. Thèse de Doctorat de l'Université de Tlemcen, juin 2009.
- **Bensaha S., (2010)-** La décontamination des eaux usées sur un support naturel. Mémoire de Magister Chimie, Tlemcen.
- **Bérend, I.,(1991),** "Mécanismes d'hydratation des montmorillonites homoioniques pour des pressions relatives inférieures à 0.95," Thèse d'Université (Institut National Polytechnique de Lorraine) (1991).

- **Berth G. Dautzenberg H. et Peter M. G., (1998)**- Physico-chemical Characterization of chitosan.
- **Besq, A.,(2000)**, "Ecoulements laminaires de suspensions de bentonite industrielles. Caractérisation rhéométrique - Ecoulements en conduites axisymétriques. Applications aux activités du Génie Civil," Thèse de doctorat de l'Université de Poitiers (2000).
- **Bouafia S.,( 2010)**- Dégradation des colorants textiles par procédés d'oxydation avancée basée sur la réaction de FENTON. Application à la dépollution des rejets industriels. Thèse de Doct.Génie des procédés. Univ. Saad Dahlab Faculté des Sciences de l'Ingénieur/ Univ. Paris-Est Inst. Francilien des Sciences Appliquées.
- **Bouranene S., Fievet P. et Szymczyk A.,(2009)**, Investigating nanofiltration of multi-ionic solutions using the steric, electric and dielectric exclusion model, Chem. Eng. Sci. 64 (2009) 3789-3798.
- **Bouranene,S., Fievet,F., Szymczyk,A., Samar M. E. H. et Vidonne, A., (2008)**, Influence of operating conditions on the rejection of cobalt and lead ions in aqueous solutions by a nanofiltration polyamide membrane, J. Membr. Sci. 325 (2008) P 150-157.
- **Bouziani M., (2000)**- L'eau de la pénurie maladie. Ed. IBN-KHALDOUN. , Oran: 59-64. Bureau d'étude et de réalisation des ouvrages U.R.T.O, PADV de Hassi ben abdellah Phase 1 : rapport d'orientation : p1-4.
- **Brady D., Letebele B., Duncan JR. et Rose PD., (1994)**, Bioaccumulation of heavy metals by scenedesmus, Selenastrum and chlorella algae Water,20 (1994) 213-218.
- **Brierley C.L., (1991)**., Biomediation of metal-contaminated surface and ground waters. Geomicrobiol .J, 8 (1991) 201-223.
- **Browing D. R.,(1974)**, Methodes Spectroscopique, Edition Masson cie. (1974).
- **Brown M.A., DeVito S.C.,(1993)**- Predicting azo dye toxicity, Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 23, 249-324, 12, 3, 405- 414. et 1993.
- **Budries N., (1997)**, Biosorption des métaux lourds sur une biomasse mycélienne. Thèse de Magister ENP Alger, (1997).

## C

- **Camci-Unal G, Pohl NLB:** Thermodynamics of binding interactions between divalent Carbohydr Polym 2007, 67(4), 640-644.

- **Camci-Unal G., Pohl NLB., (2010)**- Thermodynamics of binding interactions between divalent copper and chitin fragments by isothermal titration calorimetry (ITC). *Carbohydrate Polymers* Volume 81, Issue 1, 23 May 2010, Pages 8-13.
- **Cárdenas G, Orlando P, Edelio T:** Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. *Int J Biol Macromol*, 2001, 28(2), 167-174.
- **Cardot C., (1999)**, le traitement de l'eau. Première édition Paris : TEC & DOC, 247 p, 1999.
- **Caroline C., Rachel A et Marguerite R, (2006)**. Synthèse et étude d'hydrogels thermosensibles obtenus par modification chimique contrôlée du chitosane. *L'actualité chimique* N° 294– février,(2006).
- **Chatelet C., Damour O. et Domard A., (2001)**- Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomater.*, 22 (2001) 261-268.
- **Chatterjee S., Adhya M., Guha A.K. et Chatterjee B.P., (2005)**- Chitosan from *Mucor rouxii* : Production and physico-chemical characterization. *Proc. Biochem.*, 40, 395-400.
- **Chen C.S., Liau W.Y., Tsai G.J., (1998)** Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *J Food Prot* 61:1124–8.
- **Chen R.H. et Hwa H. (1996)**- Effects of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydr.Polym.*, 29, 353-358.
- **Chung K.T., Fluk G.E., Andrews A.E., (1981)**- Mutagenicity testing of some commonly used dyes, *Appl. Environ. Microbio.* 42 - 641-648, 1981.
- **Chung YC., Su YP., Chen CC., Jia G., Wang HL., Gaston JC WU. et Lin JG., (2004)**- Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin*, 25(7), p.p. 932.
- **Cid E., Gomis R.R., Geremia R.A., Guinovart J.J. et Ferrer J.C., (2000)**- Identification of two essential glutamic acid residues in glycogen synthase. *J Biol Chem* 275(43):33614-21
- **Clarke A.E., Anliker R., (1980)**- Organic dyes and pigments, in the handbook of environmental chemistry, Hutzinger, Editor. 1980, Springer-Verlag: Berlin.
- **Colour Index, (1975)**- The Society of Dyers and Colourists. Revised third edition, UK, 1975.
- **Crini G., P.M. Badot, (2007)**- Traitement et épuration des eaux industrielles polluées, PUFC Press, Besançon, France, (2007).

- **Crini, G., P.M. Badot, and G. Guibal, (2009)**- Chitine et Chitosan, du biopolymère à l'application. 2009: Presses universitaires de Franche Comté.

## D

- **Dabrowski A., Podkoxielny P., Hubicki Z. et Barczak M., (2005)**- Adsorption of phenolic compounds by activated carbon a critical review. Vol. 58, Issue 8, February 2005, 1049-1070.
- **Dasgupta S., Laplante B., Wang H. et Wheeler D., (2002)**. The Journal of Economic Perspectives, Vol. 16, No. 1. (Winter, 2002), pp. 147-168.
- **De Jin R, Suh JW, Park RD, Kim YW, Krishnan HB, Kim KY (2005)**- Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Nematology, 2005, 7, 125-132.
- **Denuzière M., (1998)**- Risques liés au colorant E122. Les colorants & leurs mystères.
- **Devlieghere F., Vermeulen A. et Debevere J., Food Microbiol., 21(2004) 703.**
- **Di Benedetto M., (1997)** - Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation, métaux lourds, Axe " Génie des Procédés", centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne, (1997).
- **Diard P., (1996)**, *Etude de la biosorption du plomb et du cuivre par des boues de stations d'épuration. Mise en oeuvre d'un procédé de Biosorption à contre-courant .Thèse de Doctorat de l'INSA Lyon, France, (1996).*
- **Diaz-Rojas E., Waldo M. Arguelles-Monal, Inocencio Higuera-Ciapara, Hernandez J., Lizardi-Mendoza J., Francisco F., Goycoolea M., (2006)**- Determination of Chitin and Protein Contents During the Isolation of Chitin from Shrimp Waste. Macromol. Biosci. 2006, 6, 340–347.
- **Djelad A., (2011)**- Préparation des matériaux composites chitosane-zéolithes. Application dans l'adsorption du cuivre. Thèse de Doct. Univ. D'Oran Faculté des Sciences.
- **Dubinín, M.M., (1979)**. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., p.1961.*
- **Dupasquier F. (2011)**; Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré. Thèse de Doctorat.

## E

- **El Ghaouth A., Arul J., Asselin A., et Benhamou N., (1992a)**- Antifungal activity of chitosane on two post-harvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathol.* **82**, 398-402.
- **Emilain K., (2004)**, Traitement des pollutions industrielles, p 1-24
- **Encyclopedia Universalis,(2017)**- URL :<http://www.universalis.fr/encyclopedie/garance>
- **Evans L.J., (1989)**.Chemistry of metals retention by soils, *Environmental Sciences and technology*. Vol.239; p1046-1056. 1989
- **Ezziane S., (2007)**, traitement des eaux de rejets, le Mémoire Présenté pour obtenir le diplôme de Magister, Université HASSIBA BEN BOUALI de CHLEF, 186 p.

## F

- **Fallon L MD Jr., (2006)**. Infancy through Adolescence : Heavy Metal Poisoning . *Gale Encyclopedia of Children's Health* . 4 :866-868.
- **Ferandon O., Mas G. et Waais M.T, (1998)**, *Tribune de l'Eau* 51 -25, 1998
- **Fourest E., (1993)**, Etude des mécanismes de biosorption des métaux lourds par des biomasses fongiques industrielles en vue d'un procédé d'épuration des effluents aqueux contaminés. Thèse de Doctorat de l'université Joseph Fourier-Grenoble, France, 1993.
- **Frang D., Jin W.Lee , Walter G. Yeomans, Alfred L. Allen, Richard A. Gross, and David L. Kaplan:(2001)** *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 9, 3970-3975.
- **Frehaut G. (2002)**- Un procédé "propre" de production du chitosane. *Bulletin Electronique (BE) Allemagne*, 121 p.
- **Fues D., (2017)**- <http://www.universalis.fr/encyclopedie/colorants/> (2017).,

## G

- **Ganesh R., (1992)**- Fate of azo dye in sludges. Th: chim : Virginia polytechnic institue and state university, 193 p, 1992
- **Gomez Ramirez M, Rojas Avelizapa LI, Rojas Avelizapa NG, Cruz Camarillo R. (2004)**. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of microbiological methods*, 2004, 56(2), 213-219.

- **Gommella M. et Gurree H., (1983)**, les eaux usées dans les agglomérations urbains ou rurales, Ed EYROLLES 61 boulevard saint – Germain, 249 p
- **Goudeau J.C., (1985)**, Valorisation énergétique de la biomasse traitements thermiques perspectives et limites. 2<sup>ème</sup> Séminaire National sur la chimie Université d'Oran 18-20 Novembre, (1985) Recueil des séminaires.
- **Goupy J. (1988)**- La méthode des plans d'expériences. Edition Bordas, Paris. 1988.
- **Greene J.C., Baughman G.L.,(1996)**- Effects of 46 dyes on population growth of freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*, Text. Chem. Color. 28 23-30, 1996.
- **Grim, R.E., (1968)**, Clay Mineralogy 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 596 pp. eds., Clay-Water Interface and its Rheological Implications. The Clay Minerals. (1968).
- **Groy, B. M. (1978)**, techniques de l'ingénieur, spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible 1978.
- **Guibal E, Roussy J, LeCloirec P (1996)**- Photochemical reaction of uranium with glucosamine, acetylglucosamine and related polymers: Chitin and chitosan. Water SA, 1996, 22(1), 19-26.
- **Guibal E., Roulph Ch, (1990)**-Fixation de l'uranium par un champignon filamenteux : Application au traitement d'effluents faiblement chargés. Journal Français d'Hydrologie , 21 (1990) 229-240.
- **Guivarch E.,( 2004)**- Traitement des polluants organiques en milieux aqueux par le procédé électrochimique d'oxydation avancée« Electro-Fenton ». Application à la minéralisation des colorants synthétiques, Thèse de doctorat de l'université de Marnela-Vallée, 2004.

## H

- **Hameed B. H., Salman J.M. et Ahmad A.L., (2009)**, Adsorption isotherm and kinetic modeling of 2, 4-D pesticide on activated carbon derived from date stones, journal of Hazardous Materials. 163 (2009) 121-126
- **Hammami S., (2008)**, Étude de dégradation des colorants de textile par les procédés d'oxydation avancée. Application à la dépollution des rejets industriels. Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Est et Tunis El Manar, 12 Décembre 2008

- **Hazourli S., Ziati M., Hazourli A. et Cherifi M., (2007)**, Valorisation d'un résidu naturel lignocellulosique en charbon actif -exemple des noyaux de dattes, Revue des Energies Renouvelables ICRES-07 Tlemcen. (2007) 187 – 192
- **Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., et Roller S., 2001-** Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microb.*, **71**, 235-244. (2001)
- **Hengye Zhongyuan Chemical Co., Beijing, China**
- **Hirano S. (1989)** Chitin and chitosan. Elsevier, New York, NY, Etats-Unis.
- **Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ (2001)-** The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, 2001, 22(22), 2959-2966.
- **Hsien TY, Rorrer GL (2004):** Effects of acylation and cross-linking on the material properties and Cadmium ion adsorption capacity of porous chitosan beads. *Immobilizations: a review. Enzyme Microb Technol*, 2004, 35(2-3), 126-139.
- **Hsien TY., et Rorrer GL.,(1995)** Effects of acylation and cross-linking on the material properties and Cadmium ion adsorption capacity of porous chitosan beads. *Sep Sci Technol*, 1995, 30(12), 2455-2475.

## I

- **Ilhan U**, Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitosane. *Dyes and Pigments*, 70 (2006) 76-83.

## J

- **Jalal Zohuruiaan-Mehr M, (2005)**, Advance in chitin and chitosan modification through draft copolymerization, *Iranian polymer journal* 14 (3) 235-265, 2005.
- **Jean Lederer., (1986)-** Encyclopédie de l'hygiène alimentaire. Tome IV Edition Nauwewearts. Malone S.A. Edition (1986).
- **Jeon, Y.J., Kamil, J., Shahidi, F., 2002-** Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *J Agr. Food Chem.* 50, 5167-5178.

- **JORA 2006. JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE n° 26. (2006).** Décret exécutif n° 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 avril 2006 définissant les valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels, ainsi que le cahier de charge, Algérie, p. 4-10.
- **JORA 2007. JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE n° 35. (2007).** Décret exécutif n° 07-149 fixant les modalités de concession d'utilisation des eaux usées épurées à des fins d'irrigation ainsi que le cahier des charges-type y afférent, Algérie, p. 8-12.
- **Jouen P.,Lanson J.M.,Vandanjon L. et Maleriat J.P., (2000),** Quemeneur F. decoloration by nanofiltration of effluent containing fountain-pen inks: pilot scale qualification industriel assessment. Environmental technology, vol. 21, pp. 1127-1138, 2000
- **Jumaa M., Furkert FH., Müller BW., (2002)-** A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Volume 53, Issue 1, January 2002, Pages 115-123
- **Jun HK, Kim JS, No HK, Meyers SP (1994)-** Chitosan as a coagulant for recovery of proteinaceous solids from tofu waste-water. J Agric Food Chem, **1994**, 42(8), 1834-1838.

## K

- **Kadirvelu.K., Goel.J. et Rajagopal.C., (2008),**Sorption of lead, mercury and cadmium ions in multi-component system using carbon aerogel as adsorbent, J. Hazard. Mater. 153 (2008) 502–507.
- **Kalia, K. et Flora S.J., ( 2005).** Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning. J Occup Health. , 47 :1–21
- **Kamiyama K., Onishi H. e Machida Y., (1999)-** Biodisposition characteristics of N-succinyl-chitosan and glycol-chitosan in normal and tumor-bearing mice, Biol. Pharm.Bull., Vol.22., p.p. 179-186.
- **Katti, D.R.,et Shanmugasundaram V., (2001),** Influence of swelling on the microstructure of expansive clays, Can. Geotech. J. 38, 175-182.
- **Klokkevold PR., Fukayama H., Sung EC., (1999)-** The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery Volume 57, Issue 1, January 1999, Pages 49-52.
- **Koch D., (2002).** Bentonites as a basic material for technical base liners and site encapsulation cutoff walls, Applied Clay Sci. 21, 1-11.
- **KOLLER E ., (2004) ,**traitement des pollution industrielles ,Paris ,pp424.

- **Kozaki K., Miyaishi O., Tsukamoto T., Tatematsu Y., Hida T., Takahashi T., Takahashi T., (2000)**- Establishment and Characterization of a Human Lung Cancer Cell Line NCI-H460-LNM35 with Consistent Lymphogenous Metastasis via Both Subcutaneous and Orthotopic Propagation. May 2000 Volume 60, Issue 9.
- **Kozaki T., Fujishima A., Saito N., Sato S. et Ohashi H., (2005)**, "Effects of dry density and exchangeable cations on the diffusion process of sodium ions in compacted montmorillonite" *Engineering Geology* 81, 246-254 (2005).
- **Krajewska B (2004)**- Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 35(2-3), 126-139.

## L

- **Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG (2000)**- Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. mercury ions. *J Chil Chem Soc*, 2000, 48(1), 7-12.
- **Laimé.M., (2003)**, le dossier de l'eau. Paris : édition du seuil, 401 p, 2003.
- **Laribi S., J. M. Feureau, J. L, Grossiord, and N. Kbir-Ariguib,(2005)**- Comparative yield stress determination for pure and interstratified smectite clays, *Rheol. Acta* 44 (2005) 262–269.
- **Lee K.Y., Ha W.S., et Park W.H.,1995**- Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives, *Biomaterials*, Vol(16)., p.p.1211-1216.
- **Lestaevel P.,Agay D., Peinnequin A., Cruz C., Cespuglio R., Clarencon D., Multon E. et Chancerelle Y., (2003)**- Effects of a thermal injury on brain and blood nitric oxide (NO) content in the rat, *Burns*, Vol. 29.,p.p. 557-562.
- **Li JM., Meng XG., Hu CW., Du J., (2009)** - Adsorption of phenol, p-chlorophenol and p-nitrophenol onto functional chitosan. *Bioresource technology*, 2009 - Elsevier
- **Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W. & Goosen, M.F.A. (1992)**. Applications and properties of chitosan. *J.Bioact. Compat.Polym.*, 7, 370-397.
- **Little L.W., Chillingworth M.A.,(1974)**- In Reports on selected dyes and their effect, Editor :, American Dye Manufacturers Institute, New York,1974.
- **Liu H., Fang HHP**, Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering*, 80 (2002) 806-11.

- **Liu L., Li S., Garreau H., et Vert M., (2000)**-Selective enzymatic degradations of poly (L-lactide) and poly ( $\epsilon$ -caprolactone) blend films. *Biomacromol.*, **1**, 350-359.
- **López C., Valade A. G., Combourieu B., Mielgo I., Bouchon B., Lema J. M.,(2004)**- Mechanism of enzymatic degradation of the azo dye Orange II determined by ex situ <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-ion trap mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 335- 135–149, 2004.
- **Luckham, P. F. et Rossi S. (1999)** "Colloidal and rheological properties of bentonite suspensions" *Adv. Colloid Interface Sci.* 82, 43-92 (1999).

## M

- **Malette WG., Quigley HJ., Gaines RD., (1983)** - Chitosan: A New Hemostatic The *Annals of Thoracic Surgery*. Volume 36, Issue 1, July 1983, Pages 55-58.
- **Malik R. et Ramteke D.S., (2007)**, Wate S.R. Adsorption of malachite green on groundnut shell waste based powdered activated carbon. *Waste management*, vol. 27, pp. 1129-1138, 2007.
- **Manole Greanca C.,(2007)**, AD-OX d'élimination de polluants organiques non biodégradables (par adsorption puis oxydation catalytique), Thèse de doctorat de INP Toulouse, 2007.
- **Mckenzie, A B., (1997)**. Isotope evidence of the relative retention and mobility of lead, and radiocesium in swtish ombrophic peats. *The science of the total environment*, 115-127.
- **Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y (2007)**- Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. *Carbohydr Polym* 2007, 67(4), 640-644.
- **Mohan .D. et Singh K.P.,(2002)**, *Water Res.* 36 (2002) 2304–2318.
- **Mohan D., Pittman C.U.et P.H. Steele Jr.,(2006)**, *Colloid Interface Sci.* 297 (2006) 489–504.
- **Mohan D., Sarswat A., V. K. Singh, M. Alexandre-Franco, C. U. Pittman Jr.,( 2014)**- Development of magnetic activated carbon from almond shells for trinitrophenol removal from water, *Chemical Engineering Journal* **2011**, 172, 1111.
- **Morlot M, (1996)**- Aspect analytique du plomb dans l'environnement. Editions Lvoisie, (1996).

- **MRE (2012). Ministère des Ressources en Eau, Algérie, 2012.**TAMRABET L. (2011). Contribution à l'étude de la valorisation des eaux usées en maraîchage. Thèse de Doctorat en sciences : Université Hadj Lakhdar, Batna Algérie.
- **Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ.** Comment in ACP J Club. **2002** Mar-Apr; 136 (2) : 53.
- **Mullen M.D , Wolf D.C , Ferris F.G Beveridge T.J Flemming C.A and Bailey G.W., (1989)** -Bacterial sorption of heavy metals. Applied and environmental Microbiology, 55 (1989) 3143-3149.
- **Mullen M.D., Wolf D.C., Ferris F.G., Beveridge T.J., Flemming C.A. et Bailey G.W., (1989),** Bacterial sorption of heavy metals. Applied and environmental Microbiology, 55 (1989) 3143-3149.

## N

- **Naseem .R et Tahir .S.S., (2001),** Removal of Pb(II) from aqueous/acidic solutions by using bentonite as an adsorbent. Wat. Res., 33(11) (2001) 3982–3986.
- **New N., Stevens WF., (2002)-** Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. Biotechnology letters, 2002 Volume 24, Issue 2, pp 131–134
- **No H.K., Cho Y.I., Kim H.R. et Meyers S.P., (2000)-** Effective acetylation of chitin under conditions of 15psi/121°C. Journal Agric. Food Chem., 48, 2625-2627.
- **No H.K., et Meyers S.P., (1995)-** Preparation and characterization of chitin and chitosan-a review. J. Aquatic Food Prod. Tech., 4, 27-52.
- **No H.K., Park N.Y., Lee S.H. et Meyers S.R., (2002)** .Antibacterial activity of chitosans and oligomers with different molecular weights, International Journal of Food Microbiology; Vol. 74, 65-72.
- **No HK, Meyers SP (2000)-** Application of chitosan for treatment of wastewaters. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. New York: Springer-Verlag; 2000, 1-27.
- **Nugraha E. (2006)-** Développement de films biodégradables à base de chitosane : Etudes du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation à Reims.

## O

- **Osnick J., (2009)**, Etude du potentiel d'utilisation de résidus agricoles haïtiens pour le traitement par biosorption d'effluents pollués. Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Lyon. 17 décembre 2009.
- **Otero M, Rozada F, Morán A, Calvo L.F, García A.I,(2009)**- Removal of heavy metals from aqueous solution by sewage sludge based sorbents: competitive effects, *Desalination* 239 (2009) 46–57.

## P

- **Paradossi G., Chiessi E., Venanzi M. Pispisa B. et Palleschi A., (1992)**- Branched-chain analogues of linear polysaccharides : a spectroscopic and conformational investigation of chitosan derivatives., *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol.14., p.p. 73-80.
- **Paul R., (1998)**, Eaux d'égout et eaux résiduaires industrielles: Épuraton, utilisation, Société d'Éditions techniques, 192 p.
- **Pédro, G., (1994)**, "Les minéraux argileux" dans "Pédologie Constituants et propriétés du sol". Eds. Duchaufour Ph. et Southier B. Masson, Paris 665p, 47-64 (1994).
- **Pejic B., Vukcevic M., Kostic M. et Skundric P., (2009)**- Biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions by short hemp fibers: effect of chemical composition, *J.Hazard. Mater.* 164 (2009) 146-153.
- **Peker S., Yapar S. et Besun N., (1995)**, *Colloid. Surf. A* 104 - 249, 1995.
- **Pelletier A. (1991)**- Valorisation de la chitine par sa transformation en produits Chitine/Chitosane variés grâce à des procédés thermo-mécano-chimiques et enzymatiques. Thèse de Doctorat, Université de Sherbrooke, QC, Canada, 160 p.
- **Peter M.G., 2002**-Chitin and chitosan from animal sources. *Biopolym.*, **6**, 481-574
- **Plonski B.A., Luong H.V. et Brown E.J., (1990)**- Arsenic sorption by chitosan and chitin deacetylase production by *Mucor rouxii*. *Biorecovery*, **1**, 239-253.

## Q

- **Qin CQ., Li HR., Xiao Q., Liu Y., Zhu JC., Du YM., (2006)** – Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydr Polym* ; 63:367-74

## R

- **Raafat D., von Bargaen K., Haas A., et al. (2008)** Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol* 74:3764–73.
- **Rabea E.I., M.E.T., Badawy C. V., Stevens G., Smagghe and Steurbaut W.,( 2003).** Chitosan as antimicrobial agent : applications and mode of action. *Biomacromol.*, 4,1457-1465.
- **Ramos JS., Song S., Pelaez FC., (2000)** - *Experimental Neurology* Volume 164, Issue 2, August 2000, Pages 247-256
- **Rao S.B. et Sharma C.P.,(1997)-** Use of chitosan as a biomaterial : studies on its safety and hemostatic potential., *J Biomed Mater Res.*, Vol(34),.p.p. 21-28.
- **Raymond D., (1997)-** *Le traitement des eaux*, 2<sup>ème</sup> édition, 304 p 68.
- **Reddad Z., Gerente C., Andres Y. et Le Cloirec P., (2002),** *Environ. Sci. Technol.* 36(2002) 2067- 2073.
- **Rhee JS, Jung MW, Paeng KJ., (1998)-** Evaluation of chitin and chitosan as a sorbent for the preconcentration of phenol and chlorophenols in water. *Anal Sci*, 1998, 14(6), 1089-1092.
- **Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P et al,(2009)-** Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen*, 2009, 17(6), 817-824.
- **Rio, S., Faur-Brasquet C., Le Coq L. et Le Cloirec P. (2005).** Structure Characterization and Adsorption Properties of Pyrolyzed Sewage Sludge, *Environ. Sci. Technol*, 39, 4249-4257.
- **Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P., (2001),** remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource technology*, vol. 77, pp. 247-255, 2001.
- **Rosenkranz H.S., Klopman G.,(1990)-** Structural basis of the mutagenicity of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes, *Mutagenesis* 5 (2) 137-146, 1990.

## S

- **Samuels R. J.,(1981)-** Solid state characterization of the structure of chitosan films. *Journal of Polymer Sciences*, 19 (1981) 1081–1105.
- **Shahidi et al., Shahidi F., J.K.V. Arachi and Y.J. Jeon, (1999)-**Food applications of chitin and chitosan. *Trends Food Sci. Tech.*, 10 (1999) 37-51.

- **Shigemasa Y. et Minami S., (1995)**- Application of chitin and chitosan for Biomaterials. *Biothechnology and Genetic Engineering Reviews* –vol. 13, p.p. 383-420.
- **Shoenfeldt L. Nielsen B. et Ayzma J.** (Brevet d'invention : depot: 1998 & publication 2002).
- **Shunitz Tanaka a,e, (2014)**- Preparation and characterization of chitosan caboxymethyl-b- cyclodextrin entrapped nanozero-valent iron composite for Cu (II) and Cr (IV) removal from wastewater; *Chemical Engineering Journal* 2014, 236, 378–387.
- **Siedlecka EM., Więckowska A., Stepnowski P., (2007)**- *Journal of Hazardous Materials* Volume 147, Issues 1–2, 17 August 2007, Pages 497-502
- **Sigg., Sturmm W. et Beha P., (1992)**, *Chimie des milieux aquatiques Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*, Edition Masson, 391p.1992.
- **Skorik YA, Pestov AV, Yatluk YG (2010)**- Evaluation of various chitin-glucan derivatives from *Aspergillus niger* as transition metal adsorbents. *Bioresour Technol*, 2010, 101(6), 1769-1775.
- **Specht K., Platzek T., (1995)**- *Textile dyes and finishes - Remarks to toxicological and analytical aspects*, *Deut. Lebensm.-Rundsch.* 91- 352-359, 1995.

## T

- **Taboada E, Cabrera G, Cardenas G (2003)**- Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *J Chil Chem Soc*, 2003, 48(1), 7-12.
- **Tae-Hee Kim, Hu-Lin Jiang, Dhananjay Jere, In-Kyu Park, Myung-Haing Cho, Jae-Woon Nah, Yun-Jaie Choi, Toshihiro Akaike, Chong-Su Cho. (2007)**-Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Review Article Progress in Polymer Scienc*, 2007, 32(7), 726-753.
- **Tajuddin Sikder Md. a,b, Yoshihiro Mihara c, Md. Shariful Islam a, Takeshi Saito d, Shunitz Tanaka a,e,(2014)**- Preparation and characterization of chitosan–caboxymethyl-bcyclodextrin entrapped nanozero-valent iron composite for Cu (II) and Cr (IV) removal from wastewater, *Chemical Engineering Journal* 2014, 236, 378–387.
- **Truong T.O., Hausier R., Monette F., et Niquette P.,( 2007)**- Valorisation des résidus industriels de pêches pour la transformation de chitosane par technique hydrothermo-chimique. *Journal of Water Science*, Vol, 20, n° 3, p.p253-26.
- **Tsai G., Tsai M., Lee J., et Zhong M., J Food Prot** 69 (2006) 2168.

- **Tsai G.J., et Su W.H., 1999-** Antimicrobial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Protect.*, **62**, 239-243.

## V

- **Valenti L., Mathieu J., Chacerelle Y., Levacher M., Chanaud B., De Soussa M., Strzalko S., Nh-Xuan A.T., Giroud J.P. et Florentin I.,(2003)-** Nitric oxide inhibits spleen cell proliferative response after burn injury inducing cytoarrest, apoptosis and necrosis of activated T lymphocytes : role of guanylate cyclase, *cellular Immunology*, Vol. 221. p.p. 50-63.

## W

- **Wan MW., Petrisor IG., Lai HT., Kim D., Yen TF., (2004)-** Copper adsorption through chitosan immobilized on sand to demonstrate the feasibility for in situ soil decontamination. *Carbohydrate Polymers* Volume 55, Issue 3, February 2004, Pages 249-254.
- **Wang R.C., Kuo C.C. et Shyu C.C. (1997).** Adsorption of phenols onto granular activated carbon in liquid-solid fluidized bed, *J. Chem. Tech. Biotech.*, 68, 187-194.
- **Wang W. et Xu D., (1994)-** Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan Schweigert (Eds.), *Advances in Food Research* ( Vol. 32, pp. 115-184): Academic Press.
- **Wiles J.L., Vergano P.J., Barron F.H., Bunn J.M., Testin R.F., (2000)-** Water Vapor Transmission Rates and Sorption Behavior of Chitosan Films. *Journal of Food* Volume 65, Issue 7 October 2000 Pages 1175–1179.

## X

- **Xue Jiang , Yongmei Sun, Lin Liu, Shugen Wang, Xiuzhi Tian, (2014)-** Adsorption of C.I. Reactive Blue 19 from aqueous solutions by porous particles of the grafted chitosan. *Chemical Engineering Journal* 2014, 235, 151–157

## Z

- **Zemmouri H, (2008)**- Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux usées. Thèse de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole national polytechnique, Alger (2008).
- **Zhang J., Xia W., Liu P., Cheng Q., Tahiron T., Gu W. et Bo L. (2010)**- Chitosan modification and Pharmaceutical/ Biomedical application. *Marines drugs* 8: 1962-1987.
- **Zhenwang L., Zhenlu C., Jianyan L., (2000)**- The PT dye molecular structure and its chromophoric luminescences mechanism. 15th World Conference on Non- Destructive Testing, 15-21 October 2000.
- **Zollinger H.,(1991)**- Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments, 2nd Ed, VCH, 1991.

## Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antibactérien des billes de chitosane vis-à-vis de deux souches (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) et (*Escherichia coli* CIP 76.24), du pouvoir chélateur de certains métaux lourds et d'un colorant, ainsi que quelques paramètres physico-chimiques: le taux de protéines, de cendres et d'humidité.

Ce travail est réparti en plusieurs étapes :

- ✓ L'extraction du chitosane à partir des carapaces de crevettes avec élaboration des billes de chitosane ;
- ✓ L'étude de l'effet antimicrobien de ces billes sur une bactérie Gram-positive (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) et une Gram-négative (*Escherichia coli* CIP 76.24) ;
- ✓ La chélation des microbilles sur trois métaux lourds (Zn, Cu et Cd) et sur un colorant (rouge d'alizarine) ;
- ✓ La mesure de certains paramètres physico-chimiques : le taux de protéines, de cendres et d'humidité.

Nous avons démontré :

- L'effet antimicrobien par une réduction de la charge bactérienne supérieure à 50% pour les différentes concentrations de billes et pouvant atteindre presque les 80% pour *E. coli* et dépassant les 60% pour *B. subtilis* ;
- Le rôle chélateur des billes de chitosane vis-à-vis de certains métaux lourds avec une chélation totale au bout d'environ deux heures ; et pour le colorant l'alizarine, un maximum d'efficacité pour une dilution au 1/10 ème, dépassant ainsi les 90% de réduction.

Les caractéristiques physico-chimiques des billes de chitosane extraites sont : taux de protéines : 2,45% ; taux de cendres : 3,2% ; taux d'humidité : 6%.

**Mots clés :** Billes de chitosane, antagonisme, chélation, métaux lourds, colorant.

## Abstract

In this work, we investigated the antibacterial activity of chitosan beads against two strains (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) and (*Escherichia coli* CIP 76.24), the chelating power of certain heavy metals and of a dye, as well as some physico-chemical parameters: the level of proteins, ash and moisture.

This work is divided into several steps:

- ✓ Extraction of chitosan from shrimp shells with the production of chitosan beads;
- ✓ Study of the antimicrobial effect of these beads on a Gram-positive bacterium (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) and a Gram-negative bacterium (*Escherichia coli* CIP 76.24);
- ✓ Chelation of microbeads on three heavy metals (Zn, Cu and Cd) and on a dye (alizarin red);
- ✓ The measurement of certain physicochemical parameters: the rate of protein, ash and moisture.

We have demonstrated:

- The antimicrobial effect by reducing the bacterial load by more than 50% for the various concentrations of beads and up to almost 80% for *E. coli* and exceeding 60% for *B. subtilis*;
- The chelating role of chitosan beads against certain heavy metals with total chelation after about two hours; And for the alizarin dye, a maximum efficiency for a 1/10 dilution, thus exceeding the 90% reduction.

The physico-chemical characteristics of the extracted chitosan beads are: protein content: 2.45%; Ash rate: 3.2%; Moisture content: 6%.

**Key words:** Chitosan beads, antagonism, chelation, heavy metals, dye.

## ملخص

في هذا العمل, وجهنا اهتمامنا لدراسة قوة مضادة للبكتيريا من حبيبات الكيتوزان وجها لوجه السلالتين (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 و (*Escherichia coli* CIP 76.24), قوة عملية إزالة معدن ثقيل لبعض المعادن الثقيلة و للملون , بالإضافة الى بعض الاعدادات الفيزيائية و الكيميائية : معدل البروتينات, الرماد و الرطوبة

وينقسم هذا العمل إلى عدة خطوات:

- ✓ استخراج الكيتوزان من ذرائع الجمبري مع انتاج حبيبات الكيتوزان.
  - ✓ دراسة تأثير مضادات الميكروبات من هذه الحبيبات على البكتيريا ايجابية الجرام (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 و سللية الغرام (*Escherichia coli* CIP 76.24)
  - ✓ عملية إزالة معدن ثقيل للحبيبات الميكروسكوبية على ثلاثة معادن ثقيلة (Zn, Cu, Cd) وعلى ملون (أحمر الأليزارين)
  - ✓ قياس بعض المعلمات الفيزيائية والكيميائية: معدل البروتين والرماد والرطوبة.
- لقد أثبتنا:

- تأثير مضادات الميكروبات عن طريق تقليل الحمل البكتيري من 50% لتركيزات مختلفة من الحبيبات المتمكنة للوصول إلى ما يقارب 80% لـ *E. coli* و ما يزيد عن 60% لـ *B. Subtilis*
- دور عملية إزالة معدن ثقيل لحبيبات الكيتوزان وجها لوجه بعض المعادن الثقيلة مع عملية كاملة في حدود ساعتين (2), و لملون الأليزارين فعالية قصوى لتخفيف الى 10/1 , وكذا تجاوز 90% من التخفيض الخصائص الفيزيائية والكيميائية لحبيبات الكيتوزان المستخرجة هي: معدل البروتين: 2.45%, معدل الرماد: 3.2%, معدل الرطوبة: 6%.

**الكلمات المفتاحية:** حبيبات الكيتوزان, التضاد البكتيري , عملية إزالة معدن ثقيل , المعادن الثقيلة , الملون.