

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة أبو بكر بلقايد- تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département de biologie



MÉMOIRE

Présenté par

M^{lle} ZOUHIRI Romaïssâa

M^{lle} BERRAHI Ikram

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

Sécurité Agroalimentaire et Assurance Qualité

Thème

Extraction du chitosane par voie hydro-chimique, étude de son pouvoir antioxydant et son effet antibactérien et anti biofilms

Soutenu le 26/06/2022, devant le jury composé de :

Président	M ^r AZZI Nour Eddine	MAA	Université de Tlemcen
Encadrante	M ^{me} YUCEFI Fatma	MCA	Université de Tlemcen
Co-encadrante	M ^{lle} KHARBECH Atiqa	Doctorante	Université de Tlemcen
Examineur	M ^r TEFFIANI Chourki	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

Remerciements



Avant toute chose, nous remercions **DIEU**, le tout puissant, pour nous avoir donné la force, la volonté et la patience pour la réalisation de ce travail.

Ce travail a été effectué au niveau du pôle de génétique -laboratoire- à l'Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. Je tiens tout particulièrement à remercier chaleureusement, **M^{me} Youcefi Fatma**, Maître de conférences au département d'agronomie Faculté SNV/STU université Abou bakr belkaid Tlemcen, pour nous avoir guidées et encouragées pendant toute la durée de ce travail. Ses conseils, ses orientations, sa sagesse, sa rigueur scientifique, sa confiance en nous et ses efforts fournis au cours de la rédaction de ce mémoire nous ont permis de mener à bien ce travail. Nous tenons à présenter également nos remerciements à **M^{lle} Kherbache.A** doctorante au département d'agronomie Faculté SNV/STU université de Tlemcen pour son aide, ses orientations et ses conseils judicieux.

Nous exprimons nos vifs remerciements à **M^r Azzi .N**, Maître de conférences au département d'agronomie Faculté SNV/STU université de Tlemcen, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider

Le jury de ce mémoire. Nous tenons à remercier également **M^r Teffiani.Ch**, Maître de conférences au département d'agronomie Faculté SNV/STU université de Tlemcen ait accepté de participer à ce jury et nous à lui exprimer nos remerciements les plus sincères.

Je voudrais adresser mes remerciements aux ingénieurs du laboratoire **M^r Salhi. B** et **M^r Loukili. A** pour son aide et conseils.

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.**

DEDICACE

Avec l'aide d'Allah le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience

J'ai pu accomplir cet humble travail. Je tiens c'est avec immense plaisir que je dédie à :

A l'être la plus chère à ma reine ma mère ♡ JIJI D'AMOUR ♡

Quoi que je fasse ou que je dis, je ne saurai point te remercier comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Ton amour et ta gentillesse ont conquis nos cœurs, tu es mon modèle à suivre.

A mon très cher père KHALED

Qui a semé en moi le respect et l'amour de la science

Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité

Tu es le meilleur Papa qui a toujours fait de ton mieux avec nous.

A ma grand-mère la plus douce MAMIE

Ceci est à profonde gratitude pour votre éternel amour. Que ce rapport soit le meilleur

Cadeau que je puisse t'offrir.

Que Dieu le tout puissant la protège et lui donne une longue et joyeuse vie.

A mon grand-père « Allah yerahmou »

Mon frère MOHAMED EL AMINE

Que Dieu le protège et leur offre la chance, la réussite et le bonheur.

A LA CLE DE MON BONEHUR...

*Une pensée particulière, et un remerciement spécial à **mes copines** : Kaoutar & Nour el houda qui m'ont toujours aidé sans jamais se plaindre.*

Son oublier mon binôme Ikram, pour son soutien moral, sa sympathie, sa compréhension tout au long de ce projet dont laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec elle. Nous avons formé une belle équipe kiko. Je te souhaite plein d'autres réussites et beaucoup de bonheur.

ROMAISSAA



DEDICACE

Avec l'aide d'Allah le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force et la patience

J'ai pu accomplir cet humble travail que je dédie à :

*A **mon cher papa** Ahmed, Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta disponibilité, tes sacrifices illimités, ton soutien moral et financier ne m'ont pas manqué durant ces longues années d'étude. Tout ça est grâce à toi et à tout ce que tu as déployé pour mon éducation et ma formation.*

*A **ma très chère maman** Saliha, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence je te remercie pour ton soutien permanent, ta compréhension, tes sacrifices tes prières et pour toute la confiance que tu m'as accordé afin de me motiver dans mes études et me voir satisfaite et heureuse. Je n'aurai jamais réussi sans toi.*

*A **mes sœurs** Fatima, Hanane, Ines et **mon frère** Younes, qui n'ont omis aucun refus à me porter aide et assistance. Je vous remercie pour tout votre appui et votre encouragement.*

*Sans oublier **ma nièce** notre princesse Lina et **mes neveux** Wassim, Rayan et Mouad les prunelles de mes yeux et ma source de bonheur..*

*A **mon binôme Romäissâa** qui a partagé les efforts et s'est investi autant que moi pour donner le meilleur de nous-même, je tiens surtout à la remercier pour sa patience, sa compréhension et sa tolérance lors de nos moments de fatigues, ton soutien moral m'a été d'une grande importance, je suis fière de nous et de tout ce qu'on a accompli cela n'a pas été facile mais on est arrivée. Merci **Romi** je te souhaite beaucoup de succès.*

*A **ma tante d'amour** Noria "ma deuxième mère" que je l'aime trop et à **mes chères grands parents** que dieu les gardes*

*A **mes cousins** Sofiane et Zaki, et **mes cousines** Sara et son mari Moussa et Fatima et **mon oncle** abd al ali et sa femme.*

*Une pensée particulière, et un remerciement spécial à **mes copines** : Lamia et Maïssa.*

IKRAM

الملخص

البوليمر الحيوي الذي كان موضوع دراستنا هو الكيتوزان ، والذي يتم استخراجه من قشور الجمبري. مر استخراج الأخير من خلال ثلاث مراحل: التنقية ، نزع البروتين ، وإزالة الأسيتيل.

الهدف من هذا العمل هو تحديد القوة المضادة للبكتيريا للكيتوزان بعد استخلاصه الهيدروكيميائي ضد الجراثيم المسببة أظهرت النتائج وجود للأمراض ، والنشاط المضاد للأكسدة المصحوب بتكوين الأغشية الحيوية والنشاط المضاد للبيوفيلم. نشاط مضاد للميكروبات للكيتوزان على جميع السلالات المختبرة ، بأقطار تثبيط حوالي 11.75 ± 1.25 مم. 9.75 ± 2.75 مم ؛ 14.9 ± 5.1 مم ؛ 11.1 ± 1.1 مم للمكورات العنقودية الذهبية و 9 ± 1 مم ؛ 9.75 ± 1.25 مم ؛ 12.25 ± 2.75 مم ؛ 15.25 ± 1.25 مم ؛ 2.75 MICs المضاد وللنشاط المضاد 0.5% وبتركيز الشيتوزان 0.77% في الأغشية الحيوية ، خضعت IC_{50} للأكسدة ، يعتبر الكيتوزان مضادًا طبيعيًا ممتازًا للأكسدة مع تركيز السلالات لفحص في المختبر لتقييم قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية. كان لديه سلالات موجبة الجرام وسالبة الجرام قادرة على تكوين أغشية حيوية على لوحات ميكروتيتر 96 جيدًا على أجار. تسلط هذه الدراسة الضوء على أن معرفة الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة بأسطح منتجات الألبان يمكن أن تساعد في تطوير استراتيجيات لتحسين المعايير التشغيلية المثلى للبسترة وعمليات التنظيف المكاني في مصانع الألبان.

الكلمات : الاستخلاص . الكيتوزان . البيوفيلم. التأثير المضاد للبكتيريا . التأثير المضاد للبيوفيلم . النشاط المضاد للأكسدة . المفتاحية

Résumé

Le bio polymère qui a fait l'objet de notre étude est le chitosane qui est extrait à partir des carapaces des crevettes. L'extraction de ce dernier est passée par trois étapes : déminéralisation, déprotéinisation, et la déacétylation.

L'objectif de ce travail est de mettre en place de déterminer le pouvoir antibactérien du chitosane après son extraction par voie hydro-chimique vis-à-vis des germes pathogènes, l'activité anti oxydant accompagnés avec la formation des biofilms et l'activité anti-biofilm.

Les résultats ont révélé une activité antimicrobienne du chitosane importante sur toutes les souches Testées, avec des diamètres d'inhibition de l'ordre de $11,75 \pm 1,25$ mm ; $9,75 \pm 2,75$ mm ; $14,9 \pm 5,1$ mm ; $11,1 \pm 1,1$ mm Pour *Staphylococcus aureus* et de 9 ± 1 mm ; $9,75 \pm 1,25$ mm ; $12,25 \pm 2,75$ mm ; $15,25 \pm 1,25$ pour *Enterococcus faecalis*, respectivement avec des CMI de concentration du chitosane 0,5% pour *S. aureus* et *Enterococcus faecalis*. Et Pour l'activité anti oxydant le chitosane est un excellent antioxydant naturel avec une IC_{50} de 0.77%. Dans les biofilms, Les souches ont été soumises à un essai in vitro pour évaluer leur capacité de formation de biofilm. Il avait des souches à Gram positif et à Gram négatif étaient en mesure de former des biofilms sur les microplaques de titration à 96-puits, sur la gélose. Cette étude souligne que la connaissance des micro- organismes attachés aux surfaces laitières peut aider au développement de stratégies pour améliorer les paramètres opérationnels optimaux pour les processus de pasteurisation et de CIP dans les usines de produits laitiers.

Mots clé : extraction, chitosane, biofilms, effet antibactérien, effets anti-biofilm, activité anti oxydant.

Abstract

The biopolymer that was the subject of our study is chitosan, which is extracted from the shells of shrimp. The extraction of the latter went through three stages: demineralization, deproteinization, and deacetylation.

The objective of this work is to set up to determine the antibacterial power of chitosan after its hydro-chemical extraction against pathogenic germs, the antioxidant activity accompanied with the formation of biofilms and the activity anti-biofilm.

The results revealed significant antimicrobial activity of chitosan on all the strains tested, with inhibition diameters of around 11.75 ± 1.25 mm; 9.75 ± 2.75 mm; 14.9 ± 5.1 mm; 11.1 ± 1.1 mm For *Staphylococcus aureus* and 9 ± 1 mm; 9.75 ± 1.25 mm; 12.25 ± 2.75 mm; 15.25 ± 1.25 for *Enterococcus faecalis*, respectively with MICs of chitosan concentration 0.5% for *S. aureus* and *Enterococcus faecalis*. And For antioxidant activity, chitosan is an excellent natural antioxidant with an IC_{50} of 0.77%. In biofilms, the strains were subjected to an in vitro assay to assess their biofilm-forming capacity. He had Gram-positive and Gram-negative strains were able to form biofilms on the 96-well microtiter plates on agar. This study highlights that knowledge of microorganisms attached to dairy surfaces can help in the development of strategies to improve optimal operational parameters for pasteurization and CIP processes in dairy factories.

Keywords : extraction, chitosane, biofilm, antibacterial effect, antibiofilm effect, antioxidant activity

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Le chitosane

1.Historique.....	3
2.La chitine.....	4
2.1. Définition de la chitine.....	4
2.2.Source de la chitine.....	4
2.3. Les caractéristiques de chitine	5
3. Le chitosane	6
3.1. Définition de la chitine.....	6
3.2. La structure chimique de chitosane	6
3.3. Sources du chitosane.....	7
3.4. Les caractéristiques de la chitine et du chitosane.....	7
3.5. Production du chitosane à partir de la chitine	7
3.5.1. traitement chimique.....	7
-La Déminéralisation.....	8
-Déprotéination.....	8
-La déacétylation	9
3.5.2. traitement biologique	10
3.6. Propriétés du chitosane	12
3.6.1. Propriétés physico-chimiques.....	12
-Degré de déacétylation (DD)	13
-La solubilité.....	13
-Viscosité	13
-Poids moléculaire.....	14
-La structure cristalline du chitosane	14
3.6.2. Propriétés biologique	14
-Innocuité / toxicité.....	14
-Biocompatibilité	14
-L'activité antibactérienne du chitosane	15
-Biodégradabilités	15
-Activité antioxydant	16

-La mucoadhésion	16
3.6.3. Propriétés bactériostatiques et fongostatiques	17
4. Applications du chitosane	18
4.1 Agriculture	18
4.2 Génie biomédical	18
4.3 Cosmétique	19
4.4 Industrie alimentaire	19
4.5. Photographie.....	20
4.6 Domaine du traitement de l'eau	20

Chapitre II . Les biofilms

1. Historique	21
2. Définition de biofilm.....	21
3. La composition	22
3.1. La matrice extracellulaire ou (EPS)	22
3.2 Le quorum sensing	23
4. Comment se forment Le biofilm ?	24
4.1 Adhésion réversible	24
4.2 Adhésion irréversible	25
4.3 Formation des micro-colonies	25
4.4 Maturation de biofilm	25
4.5 Détachement des cellules du biofilm	25
5. Facteurs influençant la formation de biofilm	26
5.1 La surface	26
5.2 Les caractéristiques du milieu	26
5.3 Propriété des cellules	27
6. Le modèle du biofilm industriel	28
6.1 Le biofilm en industrie laitière	29
6.2 Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières	30
7. Les bactéries formatrices de biofilm	31
Formation de biofilm par P.aeruginosa....	32
Formation de biofilm par E. coli....	32

Formation de biofilm par <i>Klebseilla pneumoniae</i> ...	33
Formation de biofilm par <i>S. aureus</i> ...	34
Formation de biofilm de <i>Bacillus cereus</i> ..	34
8. Prévention et élimination des biofilms	35
8.1. Nettoyage appliqué à la filtration membranaire.....	35
8.2 Dé colmatage physique.....	35
8.2.1. Rétro-lavages.....	35
8.2.2 Ultrasons	37
8.3 Rinçages et nettoyage chimique	38
8.3.1 Qualité de l'eau	39
8.4 Nettoyage En Place (NEP) par une cascade de détergents	40
8.5 Nettoyage enzymatique	42

Matériels et Méthodes

1. L'objectif	44
2. Matériels d'expérimentation	44
-Les milieux de culture	44
-Les souches pathogènes	44
3. Partie physicochimiques	45
3.1. Production de la chitine et du chitosane	45
3.1.1. Prétraitement des carapaces de crevette	45
-Le broyage des carapaces	46
3.1.2 Extraction du chitosane	46
-Déminéralisation	46
-Déprotéinisation	47
-Déacétylation	47
3.2 La solubilisation du chitosane	48
3.3 Caractérisation physicochimique	48
3.4 Activité antioxydant	49
-Principe	49
-Procédure	49
4. Caractérisation microbiologique	50

4.1. L'étude de la cinétique de croissance des microorganismes pathogènes	50
4.2 Evaluation du pouvoir antimicrobien du chitosane par la méthode des puits disque....	51
4.3 Evaluation du pouvoir antimicrobien du chitosane par la méthode des puits disque (Agar well Diffusion Test)	52
4.4 Formation de biofilm	53
4.4.1 Lecture des microplaques	54
4.5 Evaluation de la concentration minimale inhibitrice du chitosane (CMI)	54
4.6 Etude du pouvoir anti-biofilm du chitosane par la méthode des micros- dilutions	55

Résultats et Discussion

1. Résultat de l'extraction du chitosane	56
1.1. Caractérisation visuel de la chitine et de chitosane	56
1.2. Taux de cendre	56
2. La solubilisation de chitosane.....	57
2.1. Taux de solubilité	58
3. Le pouvoir anti oxydant	58
(originale)	58
4. La cinétique de croissance bactérienne	59
5. Démonstration du pouvoir antibactérien du chitosane	61
6. Capacité de la formation du biofilm par la méthode des microplaques de titration appliqué	63
7.Évaluation de l'activité anti biofilm du chitosane	65
Références	67

Liste d'abréviations

- **ATC** : American type culture colonie
- **Bc** : Bacillus cerus
- **BHIB** : Brain-heart-infusion
- **CMI** : concentration minimale inhibitrice
- **CO₂** : gaz dioxyde de carbone
- **CV** : crystal violet
- **DD** : Degré de déacetylation
- **DO** : Densité optique
- **DPPH** : 1,1 diphényl-2-pictylhydrazyle
- **EC** : Escherchia coli
- **H₂O₂** : Proxide d'hydrogène
- **HCl** : Acide chlorhydrique
- **Kp** : Klepsiella pneumoniae
- **LM** : listeria monocytogene
- **MEB** : microscope électronique à balayage
- **MES** : microscope électronique à scanner
- **MH** : Muller-Hinton
- **ML** : Micrococcus luteus
- **MW** : Le poids moléculaire
- **NaOH** : Hydroxyde de sodium ou de potassium
- **NH³⁺** : groupement amino (ammoniac)
- **P/V** : poids par volume
- **Pa** : Pseudomonas aeruginosa
- **PH** : potentiel d'hydrogène
- **PVC** : Poly Chlorure de Vinyle
- **QS** : Quorum sensing
- **Sa** : Staphylococcus aureus
- **TCP** : Tissu culture plate
- **UV** : ultraviolet

Figure 01: la structure chimique de la chitine	4
Figure 02: source de la chitine	5
Figure 03: la structure chimique de chitosane	6
Figure 04: conversion de la chitine en chitosane par déacétylation	9
Figure 05: mode de preparation de la chitine et du chitosane	10
Figure 06: l'extraction de la chitine par traitement chimique et biologique	11
Figure 07: schéma présentent les étapes du développement du biofilm	24
Figure 08: séquences des événements dans la formation des biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments	29
Figure 09: aspect de biofilm P. Aeruginosa par microscopiques	32
Figure 10: aspect d'E.coli en microscope électronique	33
Figure 11: aspect de buildup de K.pneumoniae en MEB	33
Figure 12: aspect de biofilm de S.aureus par microscopiques	34
Figure 13: aspect de biofilm de B.cereus en MES	35
Figure 14: representation de l'évolution de la perméabilité	37
Figure 15: exemple de cascades de détergents pour un nettoyage en place	41
Figure 16: traitement des coproduits de crevettes	45
Figure 17: carapaces des crevettes broyées	46
Figure 18: les étapes de la demineralisation	47
Figure 19: les étapes de la déprotéinob	47
Figure 20: les étapes de la déacétylation	48
Figure 21: la solubilisation du chitosane	48
Figure 22: détermination du taux de cendres	49
Figure 23: spectrophotomètre de type pharma spec 1700 visible U.V visible	51
Figure 24: pouvoir anti bactérien du chitosane par la méthode des disques	51
Figure 25: schéma de la méthodes de diffusion en puis ADT (agar well diffusion test).....	52
Figure 26: protocole de formation de biofilm en microplaque à 96 puits en PVC associé à une coloration au CV	53
Figure 27: détection et lecture de biofilm par méthode de CV	54
Figure 28: Caractéristique visuelle de la chitine et chitosane	56
Figure 29: résultat visuel de la calcination des différents extraits de chitosane	57

Figure 30: la solubilisation du chitosane.....	58
Figure 31: les cuves de l'activité antioxydant de différentes concentrations du chitosane	58
Figure 32: augmentation du pourcentage de réduction du DPPH proportionnelle aux concentrations du chitosane.....	59
Figure 33: photos représentative du dénombrement des souches pathogène utilisées	60
Figure 34: courbe illustrant la cinétique bactérienne des souches	60
Figure 35: photos illustrant les zones d'inhibitions de l'effet de chitosane sur les souches	62
Figure 36: photo de microplaque de CMI	63
Figure 37: résultats de la production du biofilm par la méthode TCP	63
Figure 38: diagramme de formation de biofilm des souches testés	64
Figure 39: photo de microplaque de l'effet anti biofilm	65

Liste des Tableaux

Tableau 01: la source de chitosane	5
Tableau 02: comparaison entre l'extraction chimique et biologique de la chitine et du chitosane	12
Tableau 03: relation entre les paramètres structuraux et les propriétés du chitosane	18
Tableau 04: composition typique d'un biofilm bactérien	23
Tableau 05: les principaux milieux de culture utilisés	44
Tableau 06: l'identification de différentes souches pathogènes utilisées	45
Tableau 07: l'effets inhibiteurs du chitosane pour les deux souches.....	61
Tableau 08: classification des souches selon la capacité de former un biofilm.....	64
Tableau 09: les pourcentages d'inhibitions de la formation du biofilm.....	65



Introduction générale

Introduction :

Il existe une très grande diversité de bio polymère issu des produits marins. Parmi lesquels on trouve la famille des polysaccharides tels que l'alginate de sodium et le chitosane. Ces bio-polymères constituent une alternative intéressante dans le cadre du remplacement des polymères issus de la pétrochimie, car ils possèdent des propriétés physico-chimiques et biologiques importantes. Ces propriétés trouvent des applications ciblées dans des domaines très variés notamment dans les secteurs de l'agriculture, pharmaceutique et biomédicale. Ce polymère est aujourd'hui principalement extrait des crevettes ou des crabes. Cependant, compte tenu des nombreuses applications qui utilisent cette molécule, il est important d'en chercher de nouvelles sources de chitine et chitosane de qualité supérieure avec des caractéristiques physico-chimiques meilleures telles que le degré de déacétylation. (touati, 2019).

Le chitosane démontre un large spectre d'activité antimicrobienne incluant plusieurs bactéries à Gram positif et Gram négatif. L'activité antibactérienne reste un processus complexe qui diffère entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif à cause des différentes caractéristiques de la surface cellulaire. Plusieurs études ont démontré que les molécules de chitosane manifestaient des activités anti bactérienne efficaces contre les bactéries à Gram négatif que les bactéries à Gram positif (Chung et la.2004).

Les biofilms sont le résultat du développement des microorganismes sur une surface vivante ou inerte. Ce mode de vie sessile est très avantageux pour les microorganismes qui y trouvent refuge pour vivre et survivre. Les biofilms microbiens peuvent être bénéfiques ou causer des nuisances dans les environnements où ils se développent. Ils peuvent être impliqués dans les processus infectieux ou induire des effets néfastes en terme de qualité, d'hygiène et de santé publique. Au sein des biofilms, les microorganismes acquièrent de nouvelles caractéristiques phénotypiques notamment une résistance importante aux agents antimicrobiens.

Notre étude vise à trouver des conditions optimales pour affirmer avec un risque d'erreur raisonnable les meilleures conditions pour l'extraction du chitosane, qui pourront donner du chitosane de qualité supérieure avec des caractéristiques physico- chimiques meilleures telles que le degré de déacétylation, la solubilité, la cristallinité, par déminéralisation, déprotéinisation et déacétylation, ainsi que l'étude de pouvoir antimicrobien du chitosane et du biofilm au contact des germes de contamination.

Dans cette optique, notre travail sera structuré comme suit :

La première partie consiste en une synthèse bibliographique qui a pour objet

- La présentation du chitosane avec la description de ses propriétés d'utilisation ;
- L'évaluation du potentiel de formation du biofilm par des souches de références.

La deuxième partie s'intéresse au protocole expérimental et comporte :

- L'extraction du chitosane ;
- Détermination du taux de cendres ;
- La solubilisation du chitosane ;
- Evaluation de l'activité antioxydant ;
- Evaluation de l'activité antimicrobienne du chitosane par méthodes des puits et la méthode des disques ;
- Evaluation du pouvoir de formation des biofilms par les souches pathogènes étudiées ;

Dans cette partie, nous discuterons les résultats obtenus lors de cette étude. Une conclusion résumera le parcours expérimental ainsi que les perspectives envisagées.

A decorative horizontal banner with a blue gradient background and white scrollwork at both ends. The text is centered within the banner.

Synthèse bibliographique



Chapitre I
Le chitosane

1. Historique

Le développement de la chitine est divisé en cinq périodes : découverte en 1799 à 1894, une période de confusion et de controverse de 1894 à 1930, l'exploration en 1930-1950, une période de doute de 1950 à 1970, et finalement la période d'application à partir de 1970 (Crini, 2019).

En 1799, Hatchett décalcifiait les carapaces de crevette, de crabe, des homards et de langoustine avec des acides minéraux, en observant qu'elles produisaient d'une effervescence modérée et en peu de temps se sont révélées souples et plastiques d'une couleur jaunâtre et comme un cartilage, qui a conservé la figure originale. Bien que ce soit la première mention de la chitine calcifiée chez les invertébrés.

La découverte de la chitine est généralement attribuée à la fois à Braconnot Henri directeur du jardin botanique de Nancy (France) en 1811 qui a découvert la chitine à partir des champignons, qu'il a appelée Fungina. Il observa que cette substance n'était pas soluble dans les solutions aqueuses d'acides.

Une décennie plus tard, 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).

L'histoire du chitosane, principal dérivé de la chitine, remonte à 1859 avec les travaux de Rouget. Le nom de chitosane a cependant été introduit en 1894 par Hoppe-Seyler (Jaouen, 1994).

Entre 1930 et 1940, ces biopolymères ont suscités beaucoup d'intérêt dans le monde oriental, principalement pour l'application dans le domaine médical et la purification de l'eau (Kumar, 2000).

Aujourd'hui, nous savons que la chitine et le chitosane se trouvent abondamment dans la nature et sont des ressources renouvelables (Muzzarelli, 1977).

La production annuelle de chitine dans la nature est estimée à 10⁹ tonnes et actuellement elle n'est pas très exploitée et commercialisée par rapport à la cellulose (Peter, 2002).

2. La chitine

2.1. Définition de la chitine

La chitine est un polymère formé d'une répétition d'unités de N-acétyl-D-glucosamine. C'est le second composé organique le plus abondant, après la cellulose, sur la Terre (Muzzarelli, 1977). Ces chitines ont la structure α -cristallographique où les principales chaînes s'organisent dans une forte liaison hydrogène intermoléculaire (Tolaimate et al, 2000). Mais ce polymère n'est pas soluble dans les solvants usuels et pour son utilisation, par contre le chitosane dérivé préparé par modification chimique de la chitine est soluble dans les acides organiques dilués (Tolaimate et al, 2003).

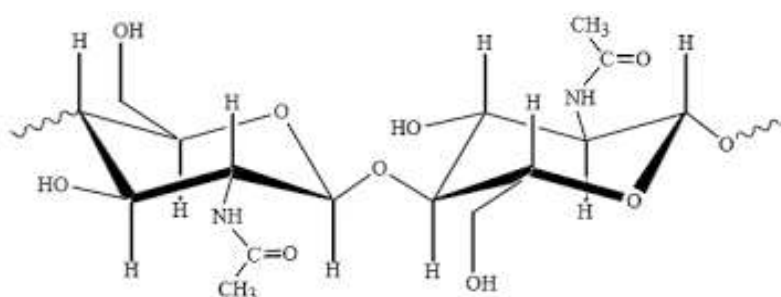


Figure 01 : la structure chimique de la chitine (Nugraha, 2006).

2.2. Source de la chitine

On retrouve la chitine dans les insectes (blattes, coléoptère, fourmis) ; les arachnides (scorpions, araignées) ; les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calmars) et les champignons.

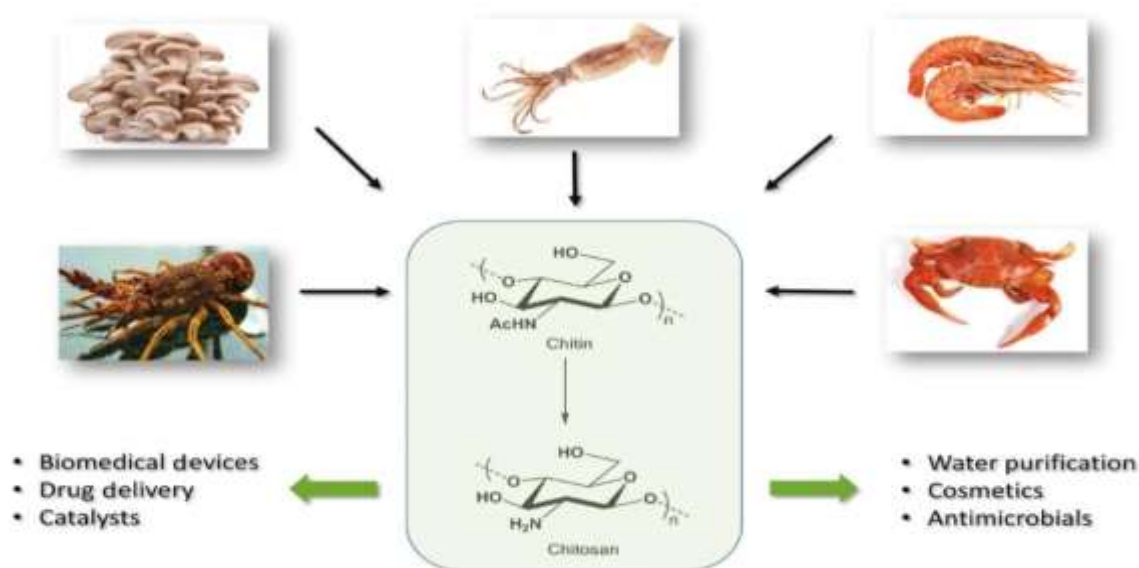


Figure 02 : Source de la chitine (Jardin et Sayed, 2017).

D'un point de vue pratique, les coquilles des crustacés marins tels que les crabes et les crevettes sont les déchets de l'industrie de transformation des produits de la mer, se sont les sources les plus utilisés pour la production commerciale de la chitine (Kurita, 2006).

Tableau 01 : les sources de chitine (kurita, 2006).

Source	Chitine %
Cuticule de crevette	30-40
Cuticule de bouquet	20-30
Cuticule de crabe	15-30
Plume de calmar	20-40
Coquille d'huitre/palourde	3-6
Cuticule d'insecte	5-25
Paroi de cellule fongique	10-25

2.3. Les caractéristiques de chitine

La chitine joue plusieurs rôles structurels et fonctionnels vitaux. Elle forme une barrière physique entre le corps de l'organisme et son environnement. Elle participe à sa protection contre les radiations, la chaleur, les agressions chimiques et physiques. Elle est également le site d'attachement des muscles et le lieu d'échange

et de transport de substances, notamment l'adsorption de composés anioniques. Enfin, elle joue un rôle dans le système immunitaire (Tokura et Tamura, 2007).

3. Le chitosane

3.1. Définition du chitosane

Le chitosane est un polymère glucidique naturel modifié de poids moléculaire élevé (kandasay, 2005) obtenu par la déacétylation partielle de la chitine (Jörg et al., 2011) à partir de la carapace des crustacés (crabes, crevettes) par des processus chimiques ou microbiologiques.

Le chitosane est une fibre comme la cellulose, mais contrairement aux fibres végétales, il possède des propriétés uniques, notamment la capacité de former des films, des structures optiques (Youcefi et Riazi, 2012).

3.2. La structure chimique de chitosane

La déacétylation en milieu basique de la chitine permet d'obtenir le chitosane qui est un copolymère linéaire à arrangement aléatoire d'unité D-glucosamine et d'unité N-acétyl-D-glucosamine relié par les liaisons β -(1 \rightarrow 4). Le chitosane est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycane (Robert GAF.1992). Sa structure chimique idéale est un enchainement de monomères β -D-glucosamine reliés par une liaison glycosidique (1 \rightarrow 4).

Le terme chitosane est habituellement utilisé quand les polymères sont solubles dans une solution d'acide dilué (Jalal Zohuriaan-Mehr, 2005).

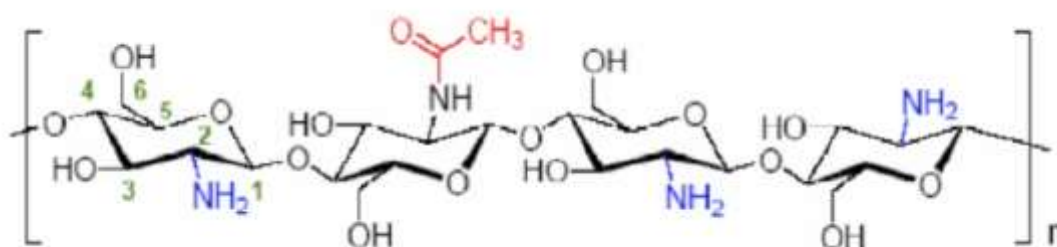


Figure 03 : la structure chimique du chitosane (Nugraha, 2006).

3.3. Sources du chitosane

Contrairement à la chitine, le chitosane est très peu répandu dans la nature. Il est le composant principal d'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calmars, ...), des cuticules des insectes. Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries (Tolaimate et al, 2003).

La chitine est ainsi la source la plus intéressante du chitosane (Shahidi, f Arachi J.k.V and Jeon (1999).

3.4. Les caractéristiques de la chitine et du chitosane

La principale différence entre la chitine et le chitosane est le degré d'acétylation (DA) ou le degré de déacétylation (DD) selon les cas et les auteurs. La chitine présente un DA supérieur à 80%, alors qu'il ne dépasse pas 30% pour le chitosane.

La nature chimique du chitosane fournit beaucoup de possibilités alternatives pour des modifications covalentes et ioniques qui permettent l'ajustement étendu des propriétés mécaniques et biologiques (Nugraha, 2006).

3.5. Production du chitosane à partir de la chitine

La chitine et le chitosane sont obtenus par deux procédés d'extraction chimiques et biologiques.

Les méthodes chimiques impliquent l'utilisation d'acides et de bases fortes pour dissoudre les carbonates de calcium et les protéines (El Knidri et al, 2018). Les méthodes biologiques d'extraction réussissent à maîtriser les conditions spécifiques qui peuvent être contrôlées (Tyliszczak et al, 2020).

3.5.1. Le traitement chimique

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

➤ La Déminéralisation

La déminéralisation est généralement effectuée par traitement acide comprenant HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH et HCOOH ; Cependant, le HCl semble être le réactif préféré (Arabia et al., 2013). Afin de transformer les minéraux non solubles de la carapace en sels solubles. Le carbonate de calcium, principal composé minéral de la carapace, réagit avec le HCl pour former du chlorure de calcium, de l'eau et du gaz carbonique comme décrit dans la réaction suivante :



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

➤ Déprotéination

Dans cette étape, les protéines liées à la chitine (Chitinoprotéines) sont éliminées par hydrolyse basique en utilisant des agents parmi lesquels : le Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, Na₃PO₄ et Na₂S (Badaoui, 2012). Une solution aqueuse diluée de NaOH à une température assez élevée (entre 65°C et 100°C) peut être effectuée pour éliminer les protéines (Aljawish, 2013).

(Al Sagheer et al., 2009), Montre que la déprotéinisation de la chitine est effectuée avec une solution de NaOH 1M avec un rapport solide/liquide (1:20 g/ml) à 70° C, pendant une nuit. En effet une étude réalisée par (EL Knidri et al., 2016) montre que la déprotéinisation est effectuée avec un traitement alcalin de solution d'hydroxyde de sodium à 10% à température de 80 ° C pendant 2 h avec un rapport solide /liquide (1:10 g/ml) pour éliminer les protéines.

➤ La déacétylation

Certains ou tous les groupements acétyle de la chitine sont généralement éliminés par traitement basique généralement avec de l'hydroxyde de sodium ou de potassium concentré (40-50 %) à ≥ 100 °C pendant au moins 30 minutes (No et Meyer, 1995).

Les réactifs acides ne peuvent pas effectuer la déacétylation (Muzzarelli, 1977).

Plusieurs facteurs de base affectent le rendement de la déacétylation, tels que la température, le temps de la réaction, la concentration en base, le traitement initial pour obtenir la chitine, l'atmosphère (air ou azote), la quantité de chitine par rapport à la solution alcaline, la densité de la chitine et la taille des particules. Compte tenu de ces paramètres, le but idéal de la déacétylation est de produire du chitosane qui ne se dégrade pas et qui soit complètement soluble dans les acides dilués (acétique, lactique, citrique, etc.).

La déacétylation signifie l'hydrolyse des groupements acétyles présents dans la chitine pour avoir des groupes amines. D'habitude, la chitine est partiellement déacétylée par N-désacétylation alcalines (Bensaha, 2007).

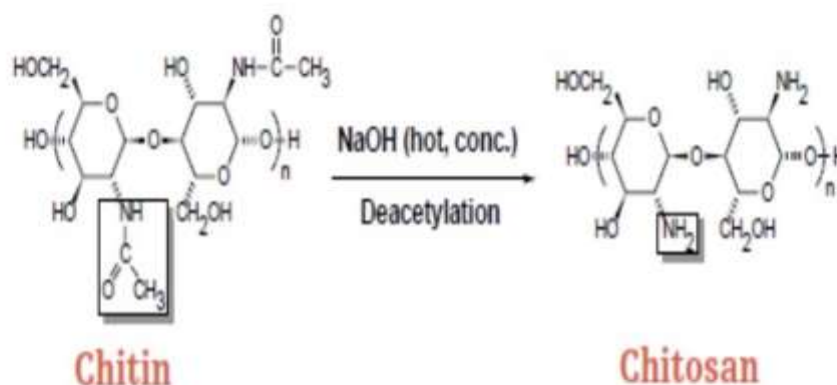


Figure 04 : Conversion de la chitine en chitosane par déacétylation (Bensaha, 2010).

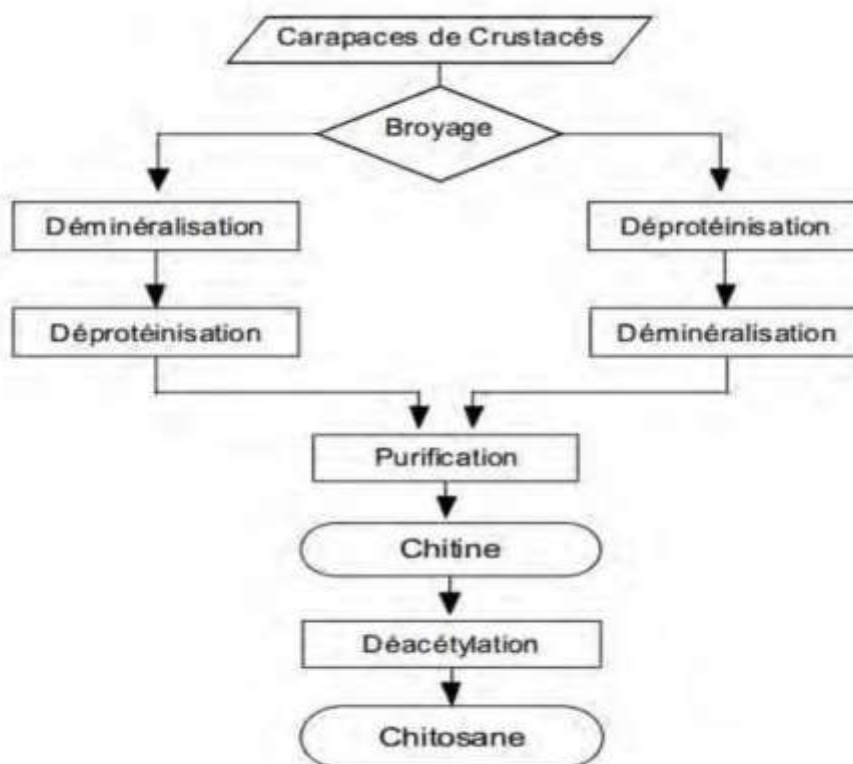


Figure 05 : mode de préparation de la chitine et du chitosane (Crini et al., 2009).

3.5.2. Le traitement biologique

(Sedaghat et al., 2017) Il a mentionné que la fermentation microbienne peut être considérée comme une méthode avantageuse pour la préparation de la chitine, cependant, il existe plusieurs paramètres qui affectent l'efficacité de cette dernière. En particulier, les concentrations du glucose et du carbone, le pH initial, le pH pendant la culture, la taille de l'inoculum, le temps et la température de fermentation rendent cette méthode plus compliquée que les méthodes chimiques.

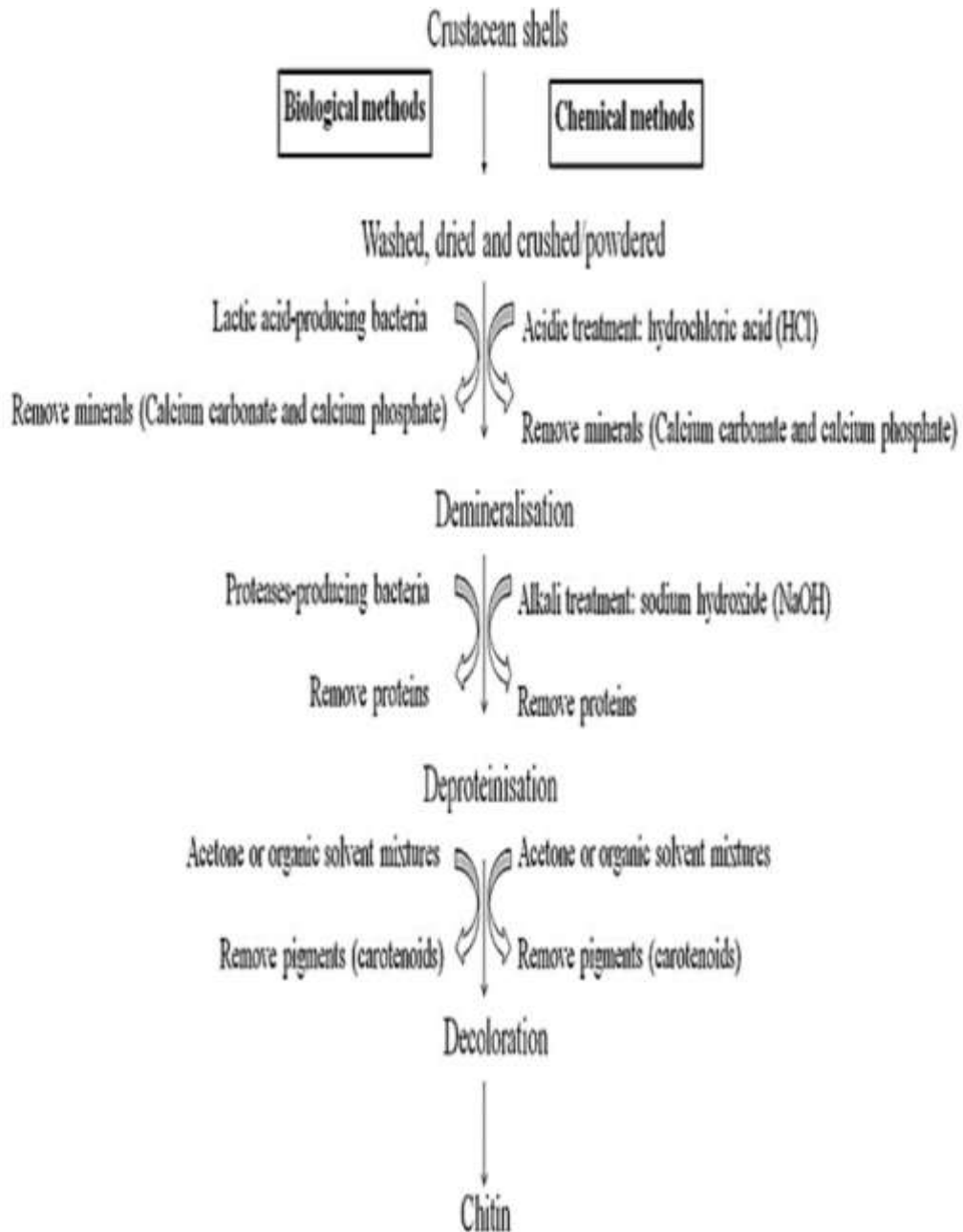


Figure 06 : L'extraction de la chitine par traitement chimique et biologique (Hamed et al., 2015).

Tableau 02 : comparaison entre l'extraction chimique et biologique de la chitine et du chitosane (El kinidri, 2018).

Extraction	Traitement	Avantage	Inconvénient
Chimique	Déminéralisation : par traitement acide avec HCl, HNO ₃ , H ₂ SO ₄ ... Déprotéinisation : par traitement alcalin à l'aide de NaOH ou KOH. Déacétylation : par traitement alcalin avec un fort NaOH ou KOH.	Temps de traitement court. DD% élevé du produit final. Utilisé à l'échelle industrielle. Élimination complète des sels organiques.	Respectueux de l'environnement. Les minéraux et protéines solubilisés ne peuvent pas être utilisés comme nutriments humains et animaux.
Biologique	Déminéralisation : utilisation d'un traitement à l'acide lactique produit par les bactéries. Déprotéinisation : par les protéases sécrétées dans le milieu de fermentation. Déacétylation : chitine déacétylase produite par des bactéries.	Haute qualité du produit final. Sans danger pour l'environnement. Les minéraux et protéines retirés peuvent être utilisés comme nutriments humains et animaux	Long temps de traitement (plusieurs jours). Limité aux études à l'échelle du laboratoire.

3.6. Propriétés du chitosane

3.6.1. Propriétés physico-chimiques

La différentes méthodes de préparation du chitosane est susceptible d'influencer le degré de déacétylation, la distribution des groupements acétyles et la conformité de la structure du chitosane (Tsai et al., 2006).

➤ Degré de déacétylation (DD)

Le degré de déacétylation (DD) est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyl. Ce paramètre (DD) influe sur toutes les propriétés physico-chimiques (masse moléculaire, viscosité, solubilité,...) du chitosane et apparaît donc comme le paramètre le plus important.

La détermination du DD est l'une des analyses de routine lors de l'extraction de la chitine et la préparation du chitosane. Plusieurs méthodes sont proposées à savoir, le titrage potentiomètre ou volumétrique, la spectrométrie infra-rouge (IR), la spectrophotométrie ultraviolets visible (UV-VIS), l'analyse élémentaire, et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Onesippe, 2005).

➤ La solubilité

La solubilité de chaque chitosane a été définie comme la teneur en solide soluble dans l'eau (p/v) dans la solution de test et dépend de différents facteurs tels que le poids moléculaire du polymère, le degré d'acétylation, le pH, la température et la cristallinité du polymère (Aranaz et al., 2021).

Le chitosane par rapport à la chitine peut être facilement solubilisé dans certains acides dilués (solutions acides polaires uniquement car il possède des propriétés de cristallinité élevées) dépendant des types (minéraux ou organiques) et de la concentration des acides utilisés (Hazmi et al., 2021). Il est généralement soluble dans des solutions d'acide : acétique à 1% au pH avoisinant 4 par protonation du groupe amino NH_3^+ provoquant une répulsion électrostatique entre les chaînes polymères du chitosane ce qui rend la solubilité correspondante du sel de chitosane, formique (0,2–100 %), chlorhydrique à 1 % au pH allant jusqu'à 6,5 (nombre décroissant de groupes N-acétylés et de ses groupes amino primaires), lactique, glutamique et l'acide nitrique dilué. Par ailleurs, il se présente tel insoluble dans les acides sulfuriques et phosphoriques (Zhang & Yang, 2021 ; Casadidio et al., 2019).

➤ Viscosité

La viscosité du chitosane dépend : de son degré d'acétylation : plus il est déacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante, elle dépend aussi de sa concentration (elle augmente avec

sa concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente), et le pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée) (Zemmouri, 2008).

➤ Poids moléculaire

Le poids moléculaire du chitosane peut être déterminé par HPLC. Toutefois, le viscosimètre demeure une méthode simple et rapide pour connaître le poids moléculaire en utilisant la formule de Marc-Houwnik et sakurada (Zemmouri, 2008).

➤ La structure cristalline du chitosane

La présence des trois arrangements α , β et γ varie selon le type de tissu. Elle est associée à des effets physiologiques spécifiques. L' α -chitine est caractérisée par des chaînes antiparallèles. En revanche, les brins de β -chitine sont alignés en parallèle. Une troisième iso-forme, γ , est moins fréquente et alterne alignements parallèles et antiparallèles (Rinaudo, 2008).

3.6.2. Propriétés biologique

➤ Innocuité / toxicité

Le chitosane est connu pour son profil d'innocuité et sa faible cytotoxicité a été démontrée par diverses études cliniques in vitro ainsi que des études cliniques in vivo chez l'animal et l'homme. Cette particularité permet au chitosane d'être utilisé dans une variété d'applications allant de l'alimentation à la médecine, en passant par la biomédecine, ce qui explique la polyvalence de ce biopolymère. Une étude chez l'homme sur la chélation des graisses par administration orale de 4,5 g par jour de chitosane (DDA et PM non déterminés) n'a montré aucune toxicité ni effet secondaire (Kean et Thanou 2010 ; Gades et Stern 2003).

➤ Biocompatibilité

La chitine et le chitosane possèdent une bonne biocompatibilité vis-à-vis des cellules hôtes, mais cette propriété dépend des caractéristiques du polymère à savoir la source d'extraction, la méthode de préparation, MW et le DD.

Le chitosane présente une cytocompatibilité que la chitine et cela a été démontré un vitro sur des cellules myocardique, endothéliale, épithéliale et sur des fibroblastes, hépatocytes, condriocytes et kératynocytes .La biocompatibilité est reliée uniquement a la DD, quand la

charge positive du polymère augmente les interactions entre le chitosane et les cellules augmentent en présence du groupement amine libre.

L'adhésion cellulaire dépend à la fois du DD et de la nature des cellules, elle est plus importantes avec des cellules fibroblastes qui présentent des charges négatives à leur surfaces que les kératinocytes et leur prolifération diminue avec l'augmentation du DD ([Aranaz et al., 2009](#)).

Le chitosane ne présente aucun comportement antigénique, mais possède un caractère antithrombogénique et hémostatique (Hémocompatibilité), et des propriétés cicatrisantes remarquable (Cyto-compatibilité).

Les recherches actuellement disponibles montrent que le chitosane est un matériau sûr et sain. Cependant, des contre-indications interdisent son utilisation en cas d'allergie aux fruits de mer ([Canada, 2013](#)).

➤ **L'activité antibactérienne du chitosane**

De plus, le chitosane incarne des propriétés immunologiques, anti-tumorales, antibactériennes et antifongiques, engendrant ainsi des actions antivivobitrives sur le développement de nombreux parasites et infections.

Deux mécanismes ont été suggères pour expliquer l'actions antimicrobiennes du chitosane :

Le premier mécanisme serait dû essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaire chargés négativement. L'interaction crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges des nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire. Par ailleurs, ([Helander et al., 2001](#)), ont prouvés que la clé de l'activité antimicrobienne du chitosane provient de la charge positive des groupements amine. Le mécanisme d'action antimicrobienne du 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.

Le second mécanisme implique la perturbation du chitosane de la synthèse des ARN messages en interaction avec l'ADN.

➤ **Biodégradabilités**

Le chitosane est dégradé par le milieu vivant, principalement par des phénomènes d'hydrolyse enzymatiques et non enzymatiques, entre autre par le monoxyde d'azote

(NO) qui joue un rôle pivot a l'immunodépression consécutive aux brûlures graves (Valenti et al.,2003 ; Lestaevel et al.,2003).

Le lysozyme est principalement responsable de la dégradation enzymatique du chitosane, en agissant sur des fractions plus acétylées (Hinaro et al., 1989). Les oligomères du chitosane dégradés ont une large distribution de taille, Selon la structure, ses propriétés biologiques sont encore mal connues. Le taux de dégradation du chitosane est en fonction de la DA, qui affecte également la forme solide et la cristallinité des hydrogels. Par conséquent, le chitosane à faible DA connaît la vitesse de dégradation la plus lente (jusqu'à plusieurs mois), tandis que le chitosane a un DA élevé se dégrade rapidement (Paradossi et al., 1992 ; Kamiyama et al., 1999).

➤ **Activité antioxydant**

Ces antioxydants présentent des risques potentiels pour la santé et leur utilisation est restreinte dans certains pays. Ces dernières années, une plus grande attention a été accordée à l'activité antioxydant du chitosane et de ses dérivés. Il a été rapporté que le chitosane et ses dérivés agissent comme antioxydants en piégeant les radicaux d'oxygène (tels que hydroxyle, super oxyde, alkyle) ainsi que les radicaux DPPH hautement stables testés in vitro (Younes et Rinaudo, 2015).

➤ **La mucoadhésion**

De nombreux facteurs affectent la mucoadhésion du chitosane, tels que les variables physiologiques et les propriétés physicochimiques du chitosane. Le mucus est composé de glycoprotéines appelées mucines, riches en charges négatives dues aux résidus d'acide sialique. Dans l'estomac, le chitosane est chargé positivement en raison de l'environnement acide, il peut donc interagir avec les mucines par le biais de force électrostatique. Il a été constaté que lorsque le poids moléculaire du chitosane augmente, la pénétration dans la couche de la mucine augmente également et donc la mucoadhésion est plus forte, alors que plus la DA est élevée, plus la densité de charge de la molécule est élevée et plus les propriétés d'adhésion sont pertinentes (Aranaz et al., 2009).

Des expériences *in vitro* suggèrent qu'un pourcentage élevé de DA avec un faible poids moléculaire favorise simultanément une dissection plus ancienne (**Casadidio et al., 2019**).

3.6.3. Propriétés bactériostatiques et fongistatiques

Ces propriétés se caractérisent par la charge cationique du chitosane et le poids moléculaire (**Younes et Rinaudo, 2015**).

La surface cellulaire de la membrane (phospholipides) d'une bactérie le plus chargée négativement interagit avec la couche polysaccharidique du chitosane qui est chargée positivement, dans des conditions acides. Leurs résultats ont montré une valeur élevée du coefficient de corrélation entre le chitosane adsorbé et l'efficacité d'inhibition.

Le poids moléculaire MW : Le chitosane (en particulier les particules à faible MW) pourrait pénétrer la paroi cellulaire des bactéries, se combinent avec l'ADN et inhibent la synthèse de l'ARNm et la transcription de l'ADN. Le chitosane à haut MW pourrait interagir avec la surface cellulaire et par conséquent altérer la perméabilité cellulaire, ou former une couche imperméable autour de la cellule, bloquant ainsi le transport de solutés essentiels dans la cellule (**Younes et Rinaudo, 2015**).

En plus d'une faible MW, un niveau élevé de DD augmente l'activité antibactérienne du chitosane avec une amélioration de la perméabilisation et une meilleure liaison électrostatique à la membrane bactérienne (**Casadidio et al., 2019**).

Tableau 03 : Relation entre les paramètres structuraux et les propriétés du chitosane (Hijazi, 2014).

Propriété	Caractéristique structurel
Biodégradabilité	↑DD ↑MW
Biocompatibilité	↑DD ↓MW
Activité antioxydant	↑DD ↓MW
La mucoadhésion	↑DD ↑MW
Activité antimicrobienne et antifongique	↑DD ↓MW
La solubilité	↑DD ↑MW
La cristallinité	↑DD ↓MW

4. Applications du chitosane

Le chitosane est le bio polymère qui a reçu de nombreux intérêts de recherche en raison de leur nombreuses applications potentielles dans l'agriculture, l'alimentation l'industrie, la biomédecine, la fabrication du papier et l'industrie textile. (Youcefi et Riazi, 2012).

4.1 Agriculture

La chitine sert de substrat aux microorganismes producteurs de chitinase et d'antraquinone par *Morinda citrifolia* par exemple. De plus, la chitine et ses dérivés jouent un rôle d'éliciter sur les plantes. Il consiste à favoriser la production de métabolites secondaires qui renforcent les défenses immunitaires. Les dérivés de chitine stimulent par exemple la production de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et de la tyrosine ammonia-lyase (TAL), qui interviennent dans la synthèse de composés du système de résistance contre les pathogènes. Par conséquent, de meilleurs rendements de germination et de récolte sont obtenus. Enfin, les produits chitineux apportent de l'azote (7 %) lorsqu'ils se décomposent, contribuant à l'enrichissement du sol et de la plante (Rabea et al., 2003).

4.2 Génie biomédical

La chitine et le chitosane existent sous différentes formes d'application (hydrogels, membranes, nano fibres, billes, micro/nanoparticules, échafaudages et éponges), sont utilisés dans de nombreux applications biomédicales telles que la cicatrisation des plaies, ingénierie tissulaire et fabrication de lentilles ophtalmiques (Hamid et

al., 2015). Le chitosane et ses dérivés ont été largement utilisés comme agents antibactériens non toxiques ou peu toxiques. Parmi eux, le sel d'ammonium le chitosane quaternaire est le plus largement utilisé. Le chitosane est utilisé dans la fabrication des médicaments anti-inflammatoires ou Comme fibres de remplissage dans les matériaux de pansement (**Wang et al. 2020**).

4.3 Cosmétique

Beaucoup d'applications dans le domaine cosmétique reposent sur ces propriétés filmogènes. Des principes actifs peuvent être piégés dans des films ou des billes de chitosane. Ces principes actifs sont libérés au contact de la peau par l'effet de la diminution du pH. Les produits le plus couramment rencontrés sont des soins pour la peau, contre l'acné et pour les cheveux, notamment pour leur souplesse. Cette application repose sur les propriétés électrostatiques du chitosane (**Rinaudo, 2006**).

4.4 Industrie alimentaire

Le chitosane a été approuvé comme additif alimentaire, fibre diététique (effet hypocholestérolémie) et ingrédients fonctionnels pour le consommateur. Le chitosane est également approuvé comme additif alimentaire en Japon et Corée depuis les années 1990. En raison de sa nature bioactive et de sa charge cationique. Le chitosane est utilisé comme ingrédient nutritionnel (additifs alimentaires, aliments fonctionnels), antimicrobien et agent antioxydant (protection des aliments), pour les revêtements antimicrobiens des fruits et légumes, dans les produits alimentaires anti-cholestérolémiques et comme nutraceutiques. (**Crini et al., 2019**).

Les activités antimicrobiennes du chitosane en solution, en poudre, et des films comestibles et un revêtement contre les microorganismes. De meilleurs résultats ont été obtenus avec le chitosane de faible poids moléculaire. Peuvent être appliqués comme agent antimicrobien contre les micro-organismes alimentaires. Le chitosane et ses dérivés ont un large éventail d'applications uniques dans l'industrie alimentaire, y compris la conservation des aliments provenant détérioration microbienne, prolongation de la durée de conservation, formation les films biodégradables, et les emballages alimentaires. Le produit utilisé comme matériau d'emballage ou de revêtement (**Crini et al., 2019**).

4.5 Photographie

Le chitosane aurait conféré une résistance à l'état humide au papier. L'hydroxyméthyl chitine et d'autres dérivés solubles dans l'eau sont des additifs finaux utiles dans la fabrication du papier. Ce polymère, bien que potentiellement disponible en grande quantité, n'est jamais devenu un produit commercialement important. L'entrepreneur en fabrication de papier peut utiliser ce polymère pour améliorer les propriétés du papier de finition (**Kumar, 2000**).

4.6 Domaine du traitement de l'eau

L'eau est la substance la plus critique sur Terre ; toute contamination de l'eau peut avoir des conséquences néfastes pour l'ensemble des êtres vivants. Aujourd'hui, l'élimination de divers polluants de l'eau est l'une des préoccupations les plus importantes. L'extraction de chitosane a été évaluée pour l'élimination des métaux lourds comme vert du chrome d'eau (**Pourmortazavi et al., 2019**). Le bio polymère dérivé de la chitine et du chitosane peut adsorber des ions de métaux lourds, des colorants et des molécules de protéines.

Les dérivés sont protonés. Le comportement de bio sorption prononcé du chitosane pour le métal lourd L'hydrophile élevé du chitosane due aux groupes hydroxyles et à l'élimination primaire des groupes amino à la surface en plus du rôle vital des interactions électrostatiques. En outre, une structure flexible de la chaîne polymère du chitosane permettant d'obtenir des supports de configuration appropriés phénomène de bio sorption. (**Sarode et al., 2018**).



Chapitre II
Les biofilms

1. Historique

La découverte des biofilms est attribuée à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de microorganismes au niveau de ses dents ([Donlan et al., 2002](#)).

En 1932 ; **Henerici** observa des communautés bactériennes fixées sur des lames lors d'une expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il émit alors une hypothèse que la plupart des bactéries vivant dans des milieux aqueux ne sont pas sous forme planctonique, mais plutôt organisée sous forme de communauté sessile fixe à une surface ([Henerici, 1932 ; trautner et al., 2009](#)).

Le terme « biofilm » a été proposé pour la première fois par ([Costerton, 1978](#)) et son équipe, en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes. Depuis, un nombre croissant d'études ont été consacrées au biofilm, aussi bien dans le domaine industriel et environnemental que dans le domaine médical. Le nombre de publications scientifiques annuelles consacrées aux biofilms est passé d'une dizaine en 1996 à plus de 1200 en 2002 ([Donlan et al, 2002](#)).

2. Définition de biofilm

Les biofilms sont des communautés sessiles de micro-organismes enfermés à l'intérieur d'une matrice de substances polymères extracellulaires et attachées aux surfaces biotiques ou abiotiques. Les biofilms sont fréquemment associés aux maladies chroniques chez l'homme et chez les animaux, et protéger les bactéries en diminuant leur sensibilité aux biocides conventionnels et au système immunitaire de l'hôte ([Hathroubi et al., 2015](#)).

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes capables de synthétiser et de sécréter une matrice protectrice en se liant fortement à un support. ([Phillips PL et al., 2010](#)).

La vie microbienne associée aux surfaces a reçu de nombreuses définitions construites autour des trois éléments clés du biofilm, qui sont le microorganisme, la

surface et la matrice organique (Marshall et al., 1971 ; Costerton et al., 1978 ; 1987 ; 1995).

La production de biofilm est le mode de vie par lequel les bactéries se développent au contact d'une surface et forment des structures capables de les protéger des agents antimicrobiens (Donlan et Costerton., 2002). Le biofilm est une communauté de microbes incorporés dans une matrice de polymères organiques et adhérant à une surface (Carpentier et Cerf 1993) n'importe quel type de micro-organismes, y compris ceux qui causent les altérations des aliments et les pathogènes, pourrait former un biofilm et jouer un rôle clé dans de nombreuses infections (Sery et al., 2013).

3. La composition

Les biofilms sont essentiellement constitués d'eau. Les microorganismes, qu'ils soient procaryotes, protozoaires ou métazoaires, et la matrice d'EPS ne représentent que quelques pourcents de la masse totale. Néanmoins, la matrice seule peut représenter jusqu'à 50 à 90% du carbone organique total du biofilm (Bakke et al., 1984). Les EPS qui composent la matrice sont déterminantes pour l'acquisition de la structure morphologique. Elles confèrent notamment aux biofilms leur densité et leur force de cohésion interne et donc leur résistance aux phénomènes de détachement. Leur composition est très variable, puisqu'elle dépend des microorganismes qui les produisent mais aussi de signaux environnementaux qui vont générer des métabolismes et des communications intercellulaires qui influencent leur synthèse (Liu and Tay, 2002 ; Stoodley et al., 2002).

Sa composition globale est détaillée dans le Tableau 04

Tableau 04 : Composition typique d'un biofilm bactérien. (Characklis and Marshall, 1990; Flemming and Wingender, 2001).

Composés		Fraction	
Eau		87 à 99%	
Bactéries		1 à 2 %	
EPS	Polysaccharides	2 à 5 %	40 à 95%
	Protéines		< 1 à 60%
	Acides nucléiques		<1 à 10%
	Lipides		<1 à 40%

3.1 La matrice extracellulaire ou (EPS) :

La matrice extracellulaire assure la cohésion de la communauté bactérienne et permet la mise en place d'une architecture complexe et ainsi de différents microenvironnements. L'architecture et la composition d'un biofilm varient en fonction des espèces et des conditions environnementales (Tolker-nielsen et Molin, 2000). De manière générale, le biofilm est composé d'agrégats de cellules les micro-colonies englués dans une matrice d'EPS et séparés les uns des autres par des canaux d'eau permettant entre autres la diffusion de nutriments et de molécules signal (Donlan, 2002). un biofilm peut être composé d'une monocouche de cellules ou au contraire constituer une structure tridimensionnelle dans le temps en fonction de facteurs internes et externes (Tolker-nielsen et al., 2000).

Dans l'environnement, les biofilms sont généralement constitués de plusieurs espèces bactériennes. L'organisation tridimensionnelle de ces communautés permet le maintien des interactions entre les microorganismes au cours du temps, ce qui leur confère un avantage écologique par rapport à leurs équivalents planctoniques (Flemming et Wingender, 2010).

3.2 Le quorum sensing

C'est un phénomène qui permet aux bactéries de communiquer entre elles non seulement dans une même espèce mais aussi entre espèce différentes. Il permet aux

bactéries de se comporter comme une population et non comme des cellules individuelles (Balestrino et al., 2005)

.Le quorum sensing est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices chimiques appelées « auto-inducteurs » qui sont produites en phase de croissance bactérienne (Waters et al., 2005).

4. Comment se forment Le biofilm ?

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (Parot ,2007). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (Adhésion réversible, Adhésion irréversible, Formation des micro-colonies, Maturation du biofilm, Détachement du biofilm) (Figure 07.).

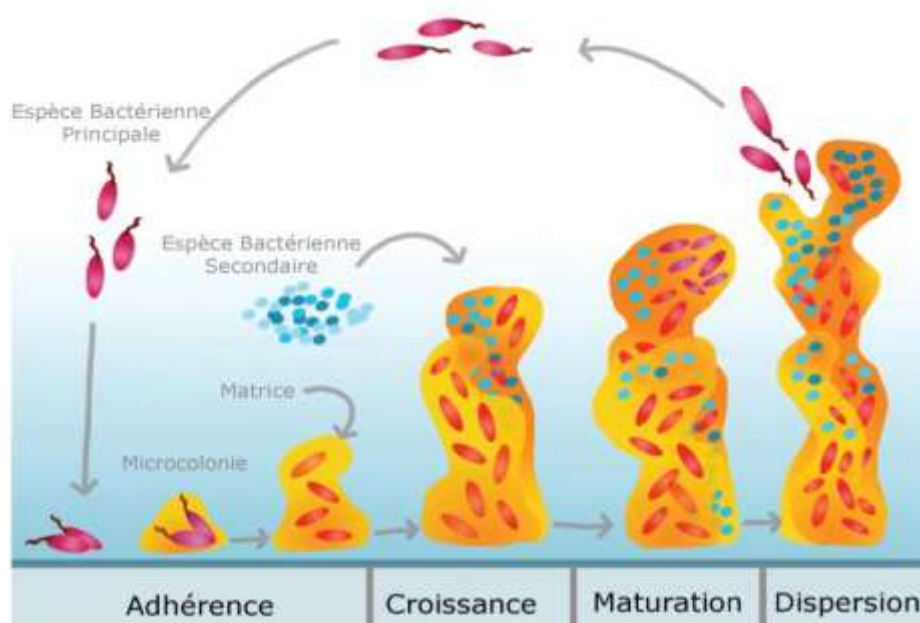


Figure 07 : schéma présentent les étapes du développement du biofilm (Yannick et al., 2014).

4.1 Adhésion réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par sédimentation ou par mobilité active (Phillips PL et al., 2010). Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques.

Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, la température, la concentration en oxygène et en nutriments (Beloin et al., 2008). Les bactéries adhèrent plus facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire.

4.2 Adhésion irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E. coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (Beloin et al., 2008 ; Van Houdt et Michiels, 2005).

4.3 Formation des micro-colonies

Dès qu'il y'a un attachement irréversible, les bactéries commencent à se diviser et à former des micro-colonies, à partir d'une concentration suffisamment dense, les micro-colonies commencent la sécrétion du biofilm (Chmielewski et Frank, 2003).

Pendant la multiplication, les bactéries émettent des signaux chimiques pour se permettre une intercommunication. Une fois l'intensité de ses signaux atteint un certain niveau, les mécanismes génétiques contrôlant la production d'EPS sont activés (Costerton et al., 1999).

4.4 Maturation de biofilm

Au sein du biofilm mature, les microorganismes sont séparés par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfuies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets (Filloux et Vallet, 2003). Le développement de ces micro-colonies traduit le stade de maturation du biofilm et la colonisation de nouvelles surfaces. Le biofilm grandit et muri, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique, voire géant en conditions optimales (Filloux et Vallet, 2003).

4.5 Détachement des cellules du biofilm

Cette étape correspond à la phase de dispersion. Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables

: limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (Sauer et al., 2004).

5. Facteurs influençant la formation de biofilm

Le conditionnement de la surface, le type du milieu de croissance, la température, le pH, les interactions électrostatiques et physiques entre les cellules bactériennes et la surface, la communication cellule-cellule et la signalisation, sont autant de facteurs qui peuvent influencer l'adhérence bactérienne et le développement ultérieur du biofilm (Davies et al., 1998 ; Doyle, 2000 ; Gilbert et al., 2002 ; Palmer et al., 2007). La morphologie des cellules bactériennes joue également un rôle (Van Loosdrecht et al., 1989 ; Wirtanen et Salo, 2005).

5.1 La surface

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (De Chalvet De Rochemonteix, 2009).

5.2 Les caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux (Donlan et al, 2002).

La température est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité électro-phorétique cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (Bellifa Samia, 2014), L'augmentation de la température favorise la multiplication bactérienne. Elle semble stimuler l'adhésion des micro-organismes et modifier la sécrétion de slime (Baillif et

al., 2010). Le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides, suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation /déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (bellifa samia, 2014). Ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (Boutaleb, 2007). La Concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques, Sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007) Concentrations en nutriments : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008).

5.3 Propriété des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exo-polysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. (Donlan, 2002).

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y voir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. (Donlan, 2002).

Les exo-polysaccharides et les lipo-polysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan et al., 2002).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si

déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uro-pathogènes (*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas ou température basse). (Lucie., 2020).

L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate, fer et croissance ralentie (Goller, 2008).

6. Le modèle du biofilm industriel

Les biofilms peuvent être divisés en deux catégories : les positifs, lorsque ces derniers sont bénéfiques à leur environnement ou ont une utilité technologique, et les biofilms négatifs lorsqu'ils présentent des aspects nuisibles. L'industrie agro-alimentaire est un environnement propice au développement de ces deux types de biofilms dès qu'il y a un certain taux d'humidité dans l'air et que nous ne sommes pas dans des conditions stériles. En effet, les biofilms positifs sont régulièrement utilisés dans le processus de fabrication ou de transformation d'aliment (raffinage de fromages, charcuterie...) alors que les biofilms négatifs, dont la présence est accidentelle, peuvent faire leur apparition suite à l'entrée de la phase de colonisation, chaque partie de l'usine peut être susceptible d'accueillir un biofilm négatif. Les équipements ouverts comme les tapis de convoyeurs ou les sols. Par leur physiologie, les biofilms bactériens sont plus difficiles à éliminer des surfaces et peuvent devenir résistants aux opérations de nettoyage-désinfection par rapport aux cellules planctoniques. La transformation de biofilms permet donc aux bactéries pathogènes de persister au sein des ateliers agro-alimentaires et favorise les transferts bactériens vers les produits alimentaires (Pan et al., 2009).

La notion de bactéries persistantes est un concept mal défini. La communauté scientifique ne semble toutefois pas être d'accord sur la définition des souches transitoire et de souches persistantes (Carpentier et Cerf, 2011).

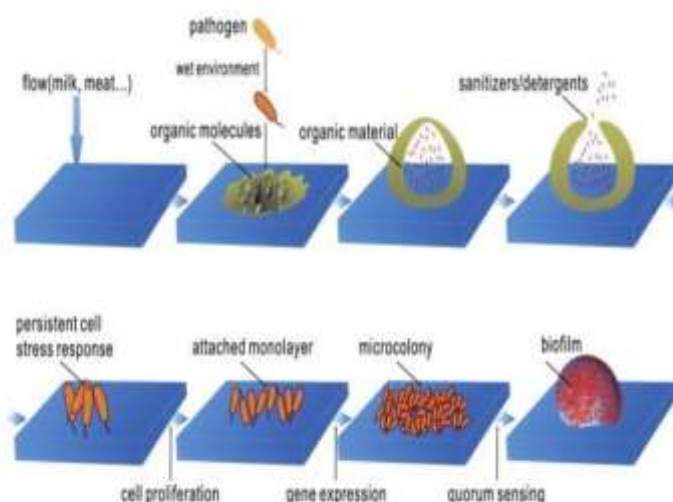


Figure 08 : Séquences des événements dans la formation des biofilms sur les surfaces en contact avec les aliments (Shi et Zhu, 2009).

6.1 Le biofilm en industrie laitière

Un important réservoir de contaminations microbiennes qui a reçu relativement peu d'attention en industrie laitière est le biofilm microbien (Marchand et al., 2012). La formation de biofilms peut avoir lieu dans les différents sites de la chaîne de transformation du lait (Parkar et al., 2004). Les équipements laitiers, principalement les tanks de stockage du lait et le système de canalisation ainsi que les appareils de traitement tels que les pasteurisateurs et des évaporateurs (figure 15), sont reconnus pour être une source de contamination du lait traité par des germes d'altérations ainsi que des pathogènes (Austin et Bergeron, 1995; Kusumaningrum et al., 2003; Brooks et Flint, 2008 ; Salutiano et al., 2010 ; Marchand et al., 2012). Le développement de biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8-12 h), avec des nombres de bactéries souvent supérieurs à 10^6 bactérie/cm² (Bremer et al., 2009). Le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les lactoducs est grand, ce qui implique la contamination microbienne des produits laitiers transformés et la diminution de leur sécurité et durée de vie.

En raison de leur résistance au traitement thermique et aux agents antimicrobiens, les biofilms de l'environnement laitier sont difficiles à éliminer même avec des procédures de nettoyage et de désinfection acceptables (Bore et Langsrud, 2005 ; Bremer et al., 2006 ; Brooks et Flint, 2008). En outre il a été montré (Le Gentil et

al., 2010), que la ré-adhésion des bactéries à la surface des équipements du système de canalisation du lait survient même durant le nettoyage en place (CIP : cleaning-in-place). Dans ce domaine-là, l'émergence de la résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens conventionnels est également soulignée (Chmielewski et Frank, 2003, Murthy et Venkatesan, 2008 ; Vlkova et al., 2008 Shi et Zhu, 2009 ; Simoes et al., 2010).

6.2 Problèmes liés aux biofilms dans les industries laitières

La formation de biofilm pose des problèmes dans beaucoup de branches de l'industrie alimentaire (Poulsen ,1999). En industrie laitière, les biofilms se forment habituellement sur les surfaces qui sont en contact avec des fluides, et peuvent être une source de contamination bactérienne responsable de la réduction de la durée de conservation des produits et de la transmission de maladies (Carpentier et Cerf, 1993 ; Zottola et Sasahara, 1994 ; Dunne, 2002 ; Agarwal et al., 2006). Ils peuvent en effet servir de niche à des espèces pathogènes comme *Listeria monocytogènes* (Wong, 1998) et causent alors de sévères problèmes de santé publique (Cerf, 2002). La formation des biofilms sur les équipements d'industrie laitière peut mener à des problèmes d'hygiène et à des pertes économiques (Bremer et al., 2006; Zhao et Liu,2006 ;Gram et al., 2007).

Les biofilms sont plus résistants aux agents antimicrobiens comparés aux cellules planctoniques ce qui fait de leur élimination à partir des équipements de traitement des denrées alimentaires un défi important (Simões et al., 2006 ; Simões et Vieira, 2009). Des études ont montré que les micro-organismes organisés en biofilm sur une surface sont plus résistants aux antibiotiques et aux désinfectants, que les cellules planctoniques, cette résistance dépend de leur activité métabolique et augmente avec l'âge du biofilm (Mattila-Sandholm et Wirtanen, 1992 ; Lechevallier et al., 1998 ; Zottola et Sasahara ,1994 ; Costerton et al., 1995), l'état de la matrice d'exopolymères, la surface et les conditions de croissance (Mustapha et Liewen,1989 ; Frank et Koffi,1990).

Généralement, les micro-organismes vivant dans les biofilms sont beaucoup plus résistants aux désinfectants que des micro-organismes dans une culture planctonique. La résistance accrue est provoquée par plusieurs facteurs. Le

glycocalyx limite la diffusion et peut causer la désactivation des désinfectants. La densité de la suspension bactérienne à l'intérieur du biofilm et l'état physiologique de cellules affectant la production des enzymes dégradantes sont également impliqués (Vidal *et al.*, 1997 ; Wirthlin *et al.*, 2005).

Les micro-organismes dans les biofilms peuvent catalyser des réactions chimiques et biologiques (sulfate-réductases ou les bactéries productrices d'acide) causant ainsi la corrosion des canalisations et des tanks de stockage. Ils peuvent également réduire l'efficacité de transfert de chaleur si les biofilms deviennent suffisamment épais (Costerton et Lappin-Scott, 1989 ; Mittelman, 1998 ; Vieira *et al.*, 1993).

Dans les biofilms, la concurrence pour les nutriments a comme conséquence une insuffisance nutritive, a également un rôle important dans la plus grande résistance des biofilms aux traitements antimicrobiens (Berg *et al.*, 1982 ; Jones et Pickup, 1989). Certaines études ont montré que les bactéries portées par les aliments étaient plus résistantes aux divers désinfectants. Cette résistance est encore plus grande dans des biofilms âgées (plus de 24 h) que dans des biofilms jeunes (Anwar *et al.*, 1990 ; Frank et Koffi, 1990 ; Lee et Frank, 1991 ; Wirtanen et Mattila-Sandholm, 1992).

Compte tenu des différents facteurs décrits précédemment, les micro-organismes adhérents et/ou en biofilms sont très difficiles à éliminer et sont donc une source récurrente de contamination des aliments dans le secteur agro-alimentaire et les biofilms formés sur les canalisations ou d'autres surfaces dans l'environnement de traitement des denrées alimentaires sont identifiées comme source potentielle pour l'intoxication alimentaire (Allion, 2004). La résistance des biofilms aux traitements conventionnels augmente la nécessité de développer de nouvelles stratégies de prévention (Singh *et al.*, 2002 ; Simoes *et al.*, 2009).

7. Les bactéries formatrices de biofilm :

Études de quelques modèles de biofilm bactériens

De nombreuses espèces bactériennes sont caractérisées par leur capacité de former des biofilms impliqués dans leur virulence et notamment leur résistance aux agents antimicrobiens.

➤ Formation de biofilm par *P.aeruginosa*

Les biofilms formés par *P. aeruginosa* caractérisés par un complexe bactérien très structuré, leur structure des biofilms étant variable d'une espèce à une autre, certains forment un biofilm plats homogène ou troués d'autres sous forme de ruban (Romain, 2012). Ils sont initiés par l'attachement d'une cellule planctonique unique sur une surface (Vallet et al., 2001). Sa croissance commence sous la forme de micro colonies, qui fusionnent ensuite pour former des biofilms (Mittal et al., 2009). Sa capacité de former un biofilm lui confère plusieurs caractéristiques, dont une augmentation importante de la résistance aux antibiotiques (Brooun et al., 2000), ainsi qu'aux mécanismes de défense de l'hôte et par conséquent sont difficiles à éradiquer. Les biofilms contribuent à la pathogénicité de *P. aeruginosa* et conduisent souvent à des infections persistantes et récurrentes et souvent mortel dans le cas de la mucoviscidose, les infections chronique a biofilm sont responsable de près de 100% de l'issue fatale de la maladie. Le plus souvent un biofilm prend le contrôle des tissus pulmonaires, jusqu'au point de non-retour où les traitements antibiotiques ne permettent plus de juguler l'infection (Romain et al., 2012). Ainsi ils produisent et libèrent en grand quantité des rhamnolipides capable de détruire nos globule blancs (Romain et al., 2012).



Figure 09 : Aspect de biofilm de *P. aeruginosa* par microscopiques (sage journal, 2014).

➤ Formation de biofilm par *E. coli*

Parmi les nombreux facteurs de virulence décrits chez *E. coli*, un certain nombre sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation du biofilm. On peut citer les flagelles. Ces derniers leur permettent d'entrer en contact avec une surface puis de s'y fixer (Goller, 2008). Cependant, la motilité flagellaire n'est pas essentielle pour l'attachement initial et la formation d'un biofilm. L'absence de flagelle est compensée par l'existence d'autres molécules

adhésives, comme les curli, permettant l'attachement de la bactérie à la surface (Beloin, 2008). Certaines bactéries sont capables d'établir un contact avec une surface par des mécanismes de signalisation et d'exprimer par la suite des adhésines à leur surface (Wang, 2004). Ce mécanisme est appelé « surface sensing ». Il existe chez *Escherichia coli*, (système de signalisation Cpx) mais les modes de fonctionnement ne sont pas encore connus (Goller, 2008). La pathologie des infections des voies urinaires est associée au biofilm d'*E. coli* (Romain et al., 2012).

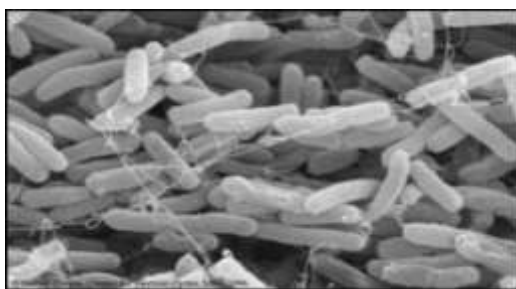


Figure 10 : Aspect d'*E.coli* en microscope électronique (marion jasnin, 2007).

➤ **Formation de biofilm par *Klebseilla pneumoniae***

Klebseilla a une capacité importante à former des biofilms surtout sur du plastique tel le cathéter urinaire, elle est considérée comme un des majeur agents responsable d'infection nosocomiale ce qui rend le traitement par les antibiotiques inefficace (Sanjary et al., 2013). La formation de biofilm est modulée par le Q.S à travers une synthèse d'auto inductrice (AL-2) et possédante des gènes homologues à ceux d'*E.coli*. L'expression des fimbriae de type 1 et 3 de *Klebseilla* augmente sa capacité à former des biofilms puissants, a noté aussi qu'un des types de fimbriae peut compenser le rôle de l'autre durant la formation mais ils sont plus puissants à deux (Sleen et al., 2012).

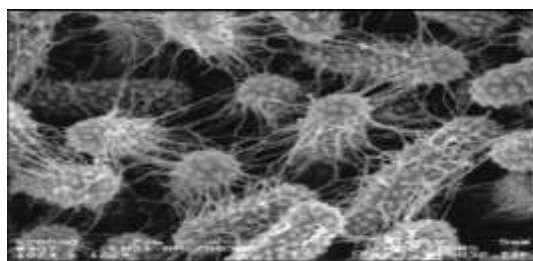


Figure 11 : Aspect de biofilm de *K.pneumoniae* en MEB (Rozyne 2013).

➤ Formation de biofilm par *S. aureus*

La formation de biofilm par *S. aureus* est un processus qui se déroule en deux phases la première phase consiste en l'attachement initial des cellules sur une surface, exprimant à leur surface des molécules, les MSCRAMM11, capables de se lier aux molécules adhésives des matrices protéiques, comme le fibrinogène ou la fibronectine (Patti, 1994). Ces interactions spécifiques entre matrice protéique de l'hôte et MSCRAMM sont très importantes pour l'établissement de la colonisation bactérienne, et la seconde à la multiplication et à la formation d'une communauté structurée, mature et multicouche. Ces deux phases sont physiologiquement différentes l'une de l'autre et requièrent chacune des facteurs spécifiques. Le détachement des cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme (Otto, 2008). La pathologie des rhino sinusites chronique est associée au biofilm produit par *S. aureus* (Romain et al., 2012).

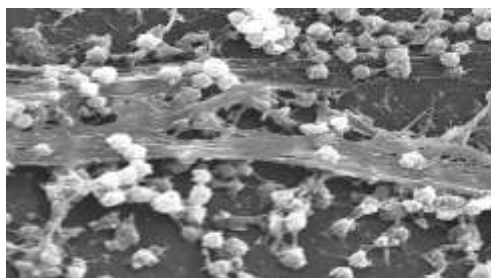


Figure 12 : Aspect de biofilm de *S.aureus* par microscope (Rodney M. Donlan 2005).

➤ Formation de biofilm de *Bacillus cereus*

Le pouvoir d'adhésion aux surfaces et la formation de biofilm de *B. cereus* sont attribués aussi bien aux propriétés physico-chimiques de surface des spores (Peng et al., 2001; Lequette et al., 2011), qu'à son potentiel génétique (Oosthuizen et al., 2002; Sauer, 2003). Le rôle de la mobilité et la présence du flagelle dans la formation du biofilm de *B. cereus* a également été rapporté (Houry et al., 2010). Cette propriété est mise à profit pour permettre à la bactérie d'atteindre des sites favorables à son développement.

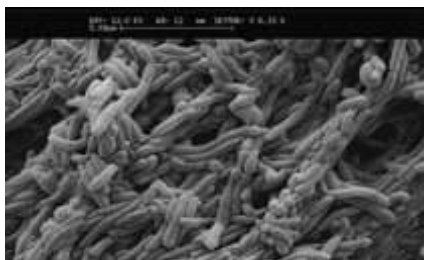


Figure 13 : Aspect de biofilm de *B.cereus* en MES (Simoès, 2010).

8. Prévention et élimination des biofilms

8.1 Nettoyage appliqué à la filtration membranaire

Comme expliqué précédemment, les procédés membranaires sont utilisés dans de nombreux processus de séparation et de concentration. Dans tous les cas d'utilisation, les membranes doivent être nettoyées régulièrement pour retirer toute souillure, organique et inorganique, déposée en surface ou dans la membrane. Cette étape de nettoyage est inévitable pour maintenir les propriétés de la membrane : perméance, sélectivité, productivité. Cependant les réponses sont au cas par cas et l'empirisme est encore trop fréquent d'où un besoin de rationalisation de la démarche et en général un seul détergent ou processus physique est insuffisant pour venir à bout du colmatage généré par un milieu complexe. (S. Platt, M. Nyström., 2006)

L'efficacité d'un nettoyage doit être optimale mais il faut aussi ne pas dégrader la membrane. En effet, la durée de vie des membranes est aussi très importante. (A. Chahboun, R. Coratger, F. Ajustron, J. Beauvillain, P. Aimar, V. Sanchez., 1992)

Il existe plusieurs méthodes conventionnelles pour éliminer le colmatage dans le domaine de la filtration membranaire : le dé colmatage physique, le nettoyage chimique ou enzymatique, qui sont définis ci-dessous.

8.2 Dé colmatage physique

8.2.1 Rétro-lavages

Le dé colmatage physique utilise une ou plusieurs forces telles que les forces hydrauliques, mécaniques ou électriques (X. Shi, G. Tal, N.P. Hankins, V. Gitis,

(2014). Les forces hydrauliques et mécaniques fonctionnent en alternant les contraintes de cisaillement en surface de la membrane, ce qui rend le dépôt plus propice à être éliminé. Ceci peut être fait en inversant la pression transmembranaire pendant un temps court de quelques secondes (par exemple le « back Wash » ou « back flush », en augmentant les turbulences grâce à la filtration dynamique (disques rotatifs, VSEP) ou en appliquant un frottement mécanique (par exemple par insufflation d'air). En revanche, les forces électriques se traduisent par une tension qui traverse la membrane et repousse les résidus chargés de la membrane.

Le « back washing » (ou rétro lavage) est le mode le plus utilisé dans le domaine membranaire. Le flux est inversé depuis le côté du perméat jusqu'au retentât. Le flux inverse permet donc de déplacer la souillure au cœur des pores mais aussi le dépôt en surface. Le back washing est facile d'utilisation avec des membranes céramiques et des membranes organiques homogènes mais ne peut pas être utilisé avec des membranes asymétriques car dans ce cas la peau active se décolle du support ce qui endommage la membrane de façon irréversible. La filtration d'un fluide d'intérêt entrecoupée de rétro filtrations régulières est classique en UF et MF dans le traitement de l'eau potable. **(Lucie, 2020)**

Les paramètres du rétro lavage principalement étudiés dans la littérature sont : fréquence, durée, pression ainsi que la qualité de l'eau (perméat, eau déionisée, force ionique etc.) et l'existence de temps de relaxation et de rinçage. En fonction du mode opératoire, on favorise plus ou moins l'établissement de colmatage irréversible et donc des étapes de nettoyage chimique restent indispensables pour récupérer (totalement) les flux entre plusieurs cycles de rétro lavages figure 14 L'optimisation du rétro lavage est nécessaire car les gains de flux apportés par le rétro lavage ne sont pas systématiquement associés à des gains de productivité globale. La problématique dépend clairement de la qualité de l'eau à potabilités **(Vroman, 2020).**

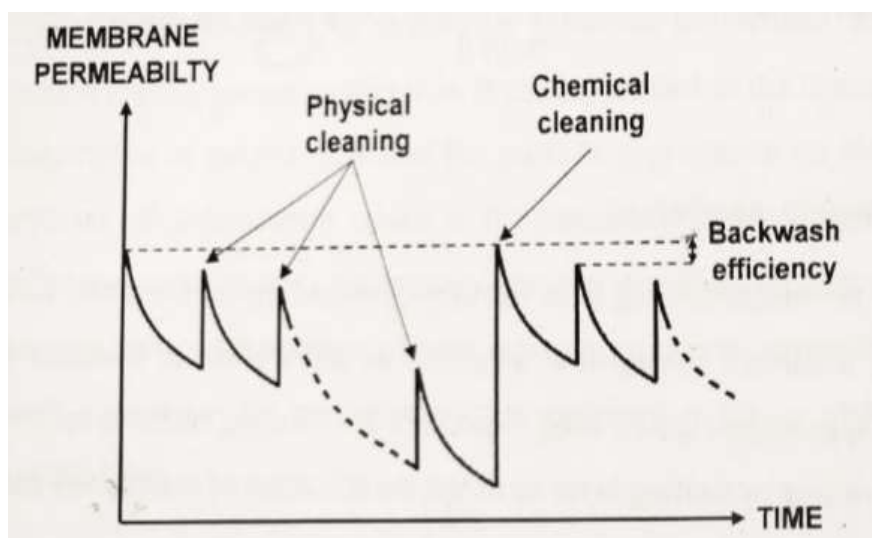


Figure 14 : Représentation de l'évolution de la perméabilité de la membrane en fonction du temps et des cycles de filtration/nettoyage (cas de l'eau potable) (Vroman, 2020.)

Le rétro lavage peut être assisté par de l'insufflation d'air (air sparging) dans le cas de fibres creuses out/in pour apporter du cisaillement complémentaire et décoller le dépôt (bio réacteur à membrane, BRM). (M. Aslam, A. Charfi, G. Lesage, M. Heran, J. Kim., 2017 ; T. Kurita, K. Kimura, Y. Watanabe., 2015)

(Thomas Vroman, 2020) a travaillé dans le cas de sa thèse sur la déformation des membranes afin d'améliorer l'efficacité du rétro lavage. En effet, pendant le rétro lavage, la déformation de la membrane polymère peut contribuer au dé colmatage global par déformation des pores : élargissement des gros, compression des petits pour des fibres creuses en UF in/out (le colmatage se faisant en out/in), en particulier si le polymère présente un faible module d'Young (pour une membrane en PVDF pour UF : de l'ordre de 20MPa).

8.2.2 Ultrasons

Comme dit précédemment, un nettoyage aux ultrasons utilise une onde sonore à haute fréquence qui agite le milieu et agit directement sur la couche colmatant en surface de membrane. D'autres travaux ont suivis ceux de Dorange et Gondrezon mais en ajoutant cette fois des détergents lors de l'application des ultrasons au cours de la phase de nettoyage. (N. Hengl., 2016, A. Simon., 2000)

(Luján-Facundo et al., 2016) Ont étudié le nettoyage par ultrasons de membranes colmatées par plusieurs solutions (BSA (bovine serum albumin), BSA + CaCl₂ et concentré de protéines de lactosérum) sur plusieurs membranes d'ultrafiltration (différents seuils de coupure, PES et céramique).

Les solutions de nettoyage utilisées sont le P3-Ultrasil (Ecolab) et NaOH (à différents pH). Ils ont prouvé qu'il y avait une meilleure efficacité de nettoyage sous ultrasons, et surtout à basse fréquence. Ils ont ensuite testés plusieurs modes, module dans le bain ultrasons et ultrasons pour la solution de nettoyage, qui n'ont pas montré de différences significatives (Rabiller-Baudry et al., 2015).

Ils ont aussi prouvé qu'un nettoyage aux ultrasons améliorerait la récupération de la perméance de 9% (Luján-Facundo et al., 2016), et que ce procédé était plus écologique, plus ancré dans un processus pour le développement durable (Luján-Facundo et al., 2017).

(Muthukumar et al., 2005) ont aussi étudié l'effet des ultrasons sur le nettoyage d'une membrane d'UF en polysulfone colmatée avec du lactosérum (solutions reconstituées à partir de lactosérum en poudre, 6% w/w, à différents pH), nettoyée avec des solutions de NaOH avec et sans tensioactif anionique (SDS), totalement immergée sous ultrasons. Ils ont démontré que les ultrasons améliorent l'efficacité du nettoyage dans toutes les conditions testées (entre 5 et 10%). En revanche, l'effet des ultrasons est meilleur en l'absence de tensioactifs. Dans tous les cas, les ultrasons augmentent la turbulence de la solution de nettoyage, ce qui est forcément un avantage.

En revanche, l'utilisation des ultrasons peut affecter les membranes comme l'ont montré (Masselin et al., 2001). En effet, la PES est affectée sur toute sa surface par le traitement ultrasons alors que les membranes en PAN (50 kDa) et en PVDF (40 kDa) seuls les bords sont affectées.

8.3 Rinçages et nettoyage chimique

Le nettoyage chimique intervient après un rinçage à l'eau pour vider l'installation du fluide filtré (pousse à l'eau) et éliminer l'ensemble du colmatage réversible. La

qualité de l'eau et le choix des détergents généralement utilisés en cascades est déterminant sur le résultat.

8.3.1 Qualité de l'eau

La première validation à effectuer dans un processus de nettoyage est de vérifier la qualité de l'eau utilisée. La mesure de l'indice de colmatage de l'eau (fouling index) doit être faite. (Lucie., 2020)

Le principe de la mesure du fouling index est la suivante : l'eau est filtrée sur une membrane à 0,45 ou 0,2 μm , de 47 mm de diamètre, sous une pression constante de 2 bars relatifs. Les matières colmatantes seront retenues par le filtre et le débit d'eau diminuera. On mesure la durée nécessaire pour le passage de 100 ml (ou 500 ml) aux quatre temps suivants : 0,5, 10 et 15 minutes. Ces valeurs permettent de calculer un index qui donne une bonne idée du caractère plus ou moins colmatant de l'eau en vue de son utilisation dans les installations d'ultrafiltrations. (Lucie., 2020)

L'eau est utilisée dans les différentes étapes de filtration : préparation des solutions détergentes et rinçages du fluide filtré et du détergent. Sa qualité est une information primordiale car l'eau peut provoquer du colmatage si elle n'est pas correctement traitée. En effet, les silicates de calcium et magnésium en particulier sont très stables et précipitent facilement sur/dans les membranes. (Lucie., 2020)

Les industries utilisent encore souvent de l'eau de forage plus ou moins bien prétraitée pour les différentes étapes citées ci-dessus, ce qui participe souvent à un colmatage minéral des membranes en plus du colmatage dû au fluide filtré. (D. Delaunay., 2007)

Les fabricants de membranes fournissent en général des guides sur la qualité de l'eau comme celui donné en Annexe 7 (Koch). Il est recommandé de respecter ces indications. Outre le colmatage minéral induit par une mauvaise qualité de l'eau, la teneur globale en sel a un impact sur la CMC des tensioactifs. (Lucie., 2020)

En effet, il faut premièrement une faible teneur en silicate ($\text{SiO}_2 < 10 \text{ ppm}$) (D. Delaunay., 2007) pour éviter le colmatage minéral.

(Tran-Ha et al., 2005) ont étudié l'impact des minéraux séparément : calcium, chlorure, sodium, nitrate, sulfate, magnésium, fer III sur l'efficacité des nettoyages et ont identifié lesquels favorisaient et défavorisaient une bonne efficacité à travers leurs impacts sur les tensioactifs. Ils ont démontré que le calcium n'a pas d'effet sur le nettoyage alors que les chlorures réduisent l'efficacité. Le sodium, nitrates et sulfates aident à la récupération du flux. De plus, cette augmentation est d'autant plus importante à haute force ionique.

8.4 Nettoyage En Place (NEP) par une cascade de détergents

Le nettoyage en place NEP (ou CIP « Cleaning In Place ») est une technique de nettoyage et désinfection largement utilisée dans les industries agroalimentaires, surtout l'industrie laitière (Leveau, 1999). Ce nettoyage concerne les systèmes fermés composés de réseaux de connections tubulaires reliant les différents équipements et cuves par la circulation d'eau ou de détergents. L'installation n'est pas démontée.

Un NEP se divise en plusieurs étapes : d'abord un rinçage initial à l'eau (deminéralisée), puis un premier détergent à haute température en boucle fermée (par exemple un détergent alcalin à 50°C) suivi d'un rinçage à l'eau pour éliminer toute trace de ce détergent, puis le passage éventuel d'un second détergent (par exemple un détergent acide à 50°C) suivi d'un rinçage à l'eau. Une étape de désinfection est généralement ajoutée à la dernière étape. (Lucie., 2020)

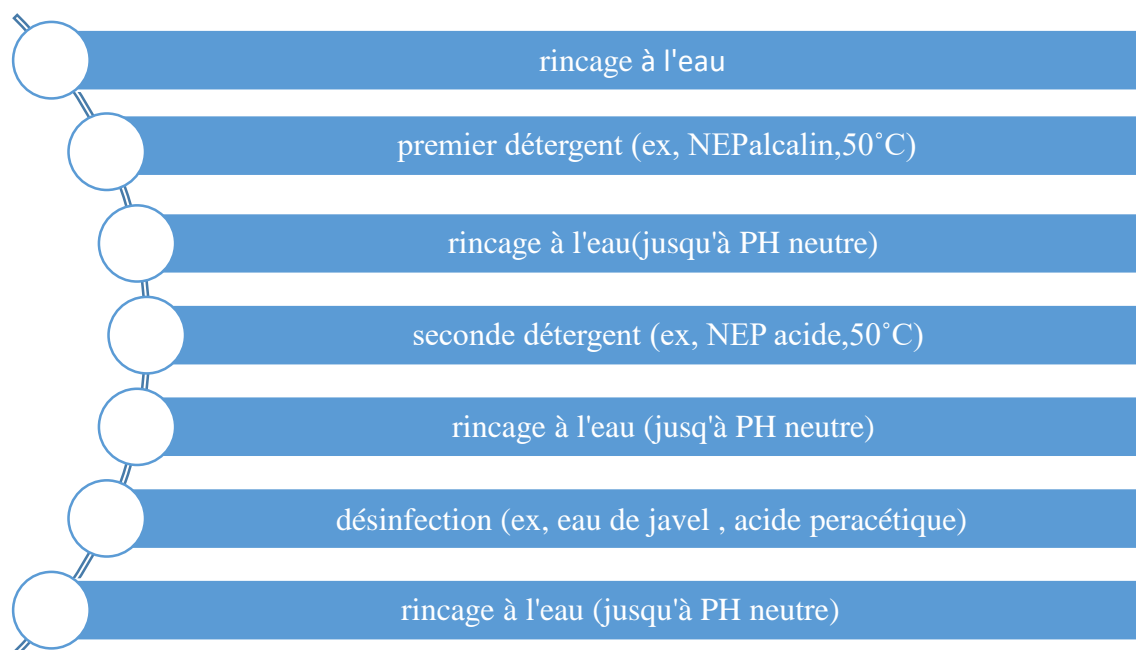


Figure 15 : Exemple de cascades de détergents pour un nettoyage en place. (Lucie., 2020)

Le choix des solutions détergentes et de leur ordre d'utilisation est fonction de l'application visée. Dans le cas du lait écrémé ultra filtré par une membrane PES/PVP une séquence classique peut être par exemple (L. Bégoïn, et al., 2006). Solution alcaline à pH = 11.5 contenant NaOH et un mélange de tensioactifs (Ultraclean II à 0.3% vol, Koch International).

- 1) Acide nitrique à pH = 1.6
- 2) Solution alcaline contenant 200 mg.L-1 de NaOCl à pH = 11.5 (désinfection).

La durée de ce nettoyage complet est d'environ 2h (environ 30 minutes pour chaque solution détergentes et 10 minutes pour les rinçages inter-nettoyages).

Par contre avec le même type de membrane dans le cas de lactosérum acide (L. Bégoïn, et al., 2006). la séquence peut être :

- 1) Solution acide à pH = 1.6 (Ultrasil 75, Ecolab)
- 2) Solution alcaline à pH = 11.4 (P3-Ultrasil 115, Ecolab)
- 3) Solution alcaline (mélange Ultrasil 90 + Ultrasil 102, Ecolab)
- 4) Solution alcaline (Ultrasil 90, Ecolab) en mélange avec NaOCl (désinfection)

L'efficacité du nettoyage dépend de nombreux facteurs comme l'installation elle-même, le temps de séjour du détergent dans l'installation, la vitesse de circulation, la température, les détergents...

Le NEP chimique peut prendre jusqu'à 30% du temps. Il y a une forte consommation d'eau, de produits chimiques et d'énergie. Il est souvent l'étape limitant du procédé et celle-ci est souvent gérée empiriquement.

8.5 Nettoyage enzymatique

Le nettoyage enzymatique a été développé pour des membranes sensibles à certains réactifs chimiques, au pH ou à la température, mais aussi pour améliorer les performances de nettoyage lorsque les nettoyages chimiques ne sont pas assez efficaces (G. Daufin, F. René et P. Aimar, 1998).

Les détergents enzymatiques ne sont pas utilisés de façon journalière comme les détergents classiques mais plutôt de façon ponctuelle (une fois par semaine ou par mois) comme traitement de choc car ils sont très efficaces mais aussi beaucoup plus chers. Industriellement, ils sont généralement utilisés lorsqu'une chute de flux est visualisée (signe de fort colmatage). Ainsi, le détergent enzymatique est quand même utilisé en cascade, intégré dans une séquence de nettoyage classique ponctuellement. Par exemple dans la publication de Berg et al., (2015), ils réalisent d'abord un nettoyage alcalin, puis un nettoyage enzymatique et enfin un nettoyage acide (avec inter-rinçages).

De plus, comme décrit précédemment, une étape de désactivation est nécessaire car une activité enzymatique résiduelle dans les installations pourrait avoir un impact sur la qualité des produits filtrés. Les enzymes ayant des limites de température et de pH à ne pas dépasser, un passage alcalin ou acide entraînera donc la perte d'activité de l'enzyme. Ainsi, les industriels ont 2 choix : passage d'un détergent soit alcalin (NaOH) soit acide (HNO₃) à la suite du nettoyage enzymatique. Les deux sont pratiqués industriellement. (Lucie., 2020).

Paugam et al., (2013), ont étudié l'impact du nettoyage acide comme étape de désactivation après colmatage avec du lait écrémé et nettoyage avec le détergent

enzymatique P3-Ultrasil 53 (Ecolab). La séquence de nettoyage recommandée par le fournisseur est la suivante :

- 1) Nettoyage enzymatique avec P3-Ultrasil 53 (1%)
- 2) Etape de désactivation avec HNO₃ à pH = 2.6
- 3) Etape de désinfection : NaOH + NaOCl (150-200 ppm)

Cependant, le flux après étape de désactivation à l'acide nitrique est 30% plus élevé qu'après le nettoyage enzymatique. **Paugam et al., 2013** expliquent qu'il n'y a aucune corrélation avec le départ probable de protéines puisque la concentration avant et après nettoyage à l'acide nitrique est la même (dosage en ATR-FTIR). L'utilisation de HNO₃ induit donc en erreur à propos de la réelle efficacité du nettoyage. Ils proposent de retirer cette étape acide pour un gain de temps, d'énergie, de produits chimiques et de rejets de déchets nitrates. Ici, un passage à la soude suffirait pour une étape de désactivation.

En ce qui concerne la dégradation des membranes polymères, il est communément admis que les détergents enzymatiques avec hydrolases ont peu d'impact, excepté pour les membranes ayant des liaisons amides. Dans ce cas, une étude d'innocuité est nécessaire avant utilisation d'un détergent enzymatique (**Rabiller-Baudry, Causserand et Gesan-Guiziu, 2012**).

Enfin, les solutions de NEP enzymatiques ne sont pas recyclables comme pourraient être recyclées des solutions de nettoyage classiques. (**N.W. Diagne., 2013**).



*Matériels et
Méthodes*

1. L'objectif

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antioxydant et le pouvoir antibactérien et anti-biofilms du chitosane testé vis-à-vis des souches pathogènes Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Listeria monocytogène* ATCC15313) et Gram-négative (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Klebseilla pneumoniae* ATCC 700603).

2. Matériels d'expérimentation

➤ Les Produits chimiques utilisées

HCl, NaOH, Acide Acétique, acide lactique, DPPH

➤ Les milieux de culture

Tous les milieux de culture préparés sont autoclavés à 121°C pendant 15 min.

Tableau 05 : les principaux milieux de culture utilisés

Caractéristiques Les milieux	Référence	pH	Application
Mueller-Hinton MH	Mueller-Hinton II agar, réf CM0337 Oxoid, Biomérieux, France	7.5	-Dénombrement des souches pathogènes utilisées dans l'expérimentation.
Brain-Heart-Infusion BHIB	réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France	7.4	-Réactivation et culture des souches -pouvoir antimicrobienne de chitosane

➤ Les souches pathogènes

Les différentes souches pathogènes utilisées dans ce travail sont reportés dans le tableau 06.

Tableau 06 : l'identification de différentes souches pathogènes utilisées

Les souches	Référence	Milieu de culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	BHIB (Brain-HeartInfusion, réf. CM0225 Oxoid, Biomérieux, France)
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC15313	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC13311	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC9341	

Toutes les souches pathogènes ont été réactivées et cultivées sur BHI (Brain-Heart-Infusion : Réf.CM0225 Oxoid, Biomérieux, France) et incubées en aérobiose à 37°C.

3. Partie physicochimiques

3.1 Production de la chitine et du chitosane

3.1.1 Prétraitement des carapaces de crevette

Les carapaces de crevettes ont été collectées dans des pêcheries d'Ain Temouchent (Beni saf) Tlemcen (Ghazaouat). Ces déchets contenant la paroi molle, la tête, patte et autres débris ont été débarrassées tout d'abords de leurs antennes, ils subissent ensuite un lavage avec de l'eau chaude et froide afin d'éliminer les résidus organiques puis sont séchées à température ambiante. .



Figure 16 : Traitement des coproduit de crevettes (**Originale**).

➤ Le broyage des carapaces

Le broyage avec des diamètres spécifiques, entre 0.1, 0.3 et 0.5mm.



Figure 17 : carapaces des crevettes broyées (originale).

3.1.2 Extraction du chitosane

L'obtention du chitosane à partir de chitine, passe par trois étapes simultanées selon le protocole, retenu, ci-après :

La déminéralisation en milieu acide (1ère étape) suivie d'une déprotéinisation (2eme étape), et d'une déacétylation (3eme étape) par voie hydro thermo-chimique en milieu basique. Lors du processus 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.

➤ 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 1/10 (poids du solide / volume du solvant (Al Shaqsi et al. 2020) puis l'ensemble est soumis à une agitation pendant 30 min à une température de 50°C afin d'éliminer les sels minéraux (figure 04). La solution est ensuite filtrée et lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée jusqu'à neutralisation et séchée à l'étuve à 45°C pendant 24 heures.



Figure 18 : les étapes de la déminéralisation (**originale**).

➤ Déprotéinisation

La chitine brute provenant de l'étape précédente a fait l'objet d'un traitement par une solution d'hydroxyde de sodium à 60% en masse dans un rapport 1/10 (poids du solide / volume du solvant) (Aldila et al. 2020) L'ensemble est soumis à une agitation pendant 1 heure à une température de 90°C pour retirer les protéines des carapaces .

Le mélange ainsi obtenu, est filtré puis lavé plusieurs fois avec l'eau distillée pour éliminer les résidus de NaOH. Après un séchage à température ambiante, nous obtenons une chitine déprotéinée.

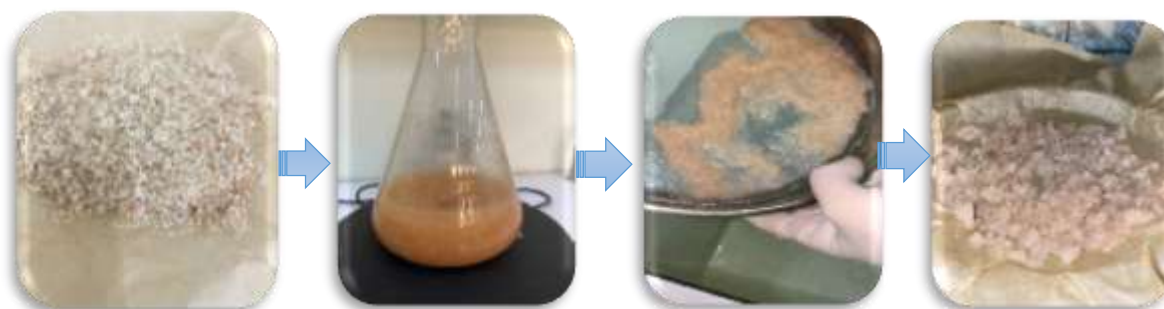


Figure 19 : les étapes de la déprotéination (**originale**).

➤ Déacétylation

Dans ce cas la chitine obtenue est mise en contact avec une solution d'hydroxyde de sodium NaOH 50% en masse à une température de 130 °C, pendant 30 min dans un rapport 1/10. Le produit obtenu est ensuite filtré et lavé plusieurs fois avec l'eau distillée et séché à température ambiante. Le produit obtenu est le chitosane de couleur blanchâtre (No et al. 2000).



Figure 20 : les étapes de la déacétylation (**originale**).

3.2 La solubilisation du chitosane

Des solutions homogènes ont été préparées en ajoutant 1g du chitosane dans 1% (v/v) d'acide acétique (**Zeng Xianfang et al., 1996**), les solutions de chitosane ont été homogénéisées par agitation constante à 50°C (Figure 21). Les solutions de chitosane ont été autoclavées à 121°C pendant 15 mn.



Figure 21 : la solubilisation du chitosane (**originale**).

3.3 Caractérisation physicochimique

➤ Détermination de taux de cendres avant et après la déminéralisation

Le principe de la détermination de la teneur en minéraux repose sur leur résistance à la résistance de la chaleur.

La teneur en cendres est déterminée par incinération de la matière organique à 600°C pendant 3 heures. Environ 5g d'échantillons sont alors soumis à une T⁰ de 600°C dans un four à moufle pendant 3 heures. Après refroidissement dans un dessiccateur, les capsules contenant les cendres sont pesées à nouveau (**Boualem et**

hocine, 2018). La teneur en cendres des échantillons est calculée suivant la formule suivante :

$$C\% = [(M_1 - M_2) / (M_1 - M_0)] \times 100 \dots \dots \dots \text{(Eq 01)}$$

C% : teneur en cendre

M₀ : masse en g de la capsule vide

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

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



Figure 22 : détermination du taux de cendres (**originale**)

3.4 Activité antioxydant

➤ Piégeage du radical DPPH

La méthode de piégeage du radical de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH) a été décrite pour la première fois par **Blois (1958)**.

➤ Principe

A température ambiante, le radical DPPH présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance donneuse de protons.

Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517nm (**Moon et shibamoto, 2009**).

➤ Procédure

La méthode utilisée pour l'évolution du piégeage du radical DPPH par le chitosane est celle décrite par **Dandlen et al., (2010)**.

Après la préparation de chitosane dans l'éthanol à 96%(v/v), on prend 25µl de chaque concentration qu'on met dans un tube Eppendorf et on additionne 975µl de la solution DPPH (à 60µM). Le mélange réactionnel est immédiatement agité avant

d'être placé pendant 1heure à l'obscurité et à T° ambiante. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517nm en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu 160-Ultraviolet (Tokyo, japon) contre un control négatif (contenant de l'éthanol au lieu du chitosane). Chaque test est répété trois fois.

Le pourcentage d'inhibition du radical de DPPH a été calculé suivant la formule :

$$PI = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \dots \dots \dots (Eq02)$$

Avec :

PI : pourcentage d'inhibition.

A₀ : absorbance du control (sans échantillon)

A₁ : absorbance de l'échantillon après 1heur

L'étude de la variation de l'activité anti radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC₅₀). Une faible valeur d'IC₅₀ correspondant à une grande efficacité de chitosane.

Mesure des paramètres microbiologiques.

4. Caractérisation microbiologique

4.1 L'étude de la cinétique de croissance des microorganismes pathogènes

L'étude de l'évolution de la croissance des souches est effectuée dans le milieu BHIB à ph 7,4 à 37 °C. Des prélèvements stériles sont effectués périodiquement afin d'évaluer la croissance (DO) à 600 nm par une spectrophotométrie sur un spectrophotomètre de type PHARMASPEC 1700 visible UV-visible ; la détermination de l'évolution de la charge microbienne en micro culture s'effectue par isolement sur milieu Muller-Hinton gélose ; cette méthode est utilisée dans le but de déterminer le temps d'incubation pour atteindre une charge microbienne de 10⁹ UFC/ml.



Figure 23 : spectrophotomètre de type PHARMASPEC 1700 visible UV-visible (**originale**)

4.2 Evaluation du pouvoir antimicrobien du chitosane par la méthode des puits disque

Les boîtes de Pétri sont remplies de 15 ml de Gélose molle Mueller-Hinton et sont ensuite séchées pendant 10 minutes à 37°C à l'étuve, la suspension bactérienne à 10^9 UFC/ml a été mise en contact avec le milieu de culture par ensemencement en surface à l'aide d'écouvillons stériles, les disques imbibés avec les différentes concentrations du chitosane sont ensuite déposés sur la gélose ensemencée. Les solutions du chitosane diffusent radialement en donnant une zone d'inhibition à la surface de la gélose préalablement ensemencé avec la suspension bactérienne (**Eymard, 2003**). Une inhibition est considérée positive si le diamètre est supérieur à 8mm (**Schillinger et lucke, 2001**) cité par (**Doumandji et al., 2010**).



Figure 24 : pouvoir antibactérien du chitosane par la méthode des disques (**originale**).

4.3 Evaluation du pouvoir antimicrobien du chitosane par la méthode des puits disque (Agar well Diffusion Test)

Les boîtes de Pétri contenant 1000 µl de suspension bactérienne à 10^9 UFC/ml sont remplis de 15 ml de Gélose molle BHIB, le contact du germe cible avec les solutions de chitosane se fait par Homogénéisation pendant 3min. Les boîtes sont ensuite séchées pendant 10 minutes à 37°C à l'étuve. A l'aide d'un emporte-pièce stérile, on pratique des cavités dans gélose, ensuite chaque cavité est remplie par 50 µl de solutions de chitosane. Les boîtes de Pétri avant de les incuber à 37°C pendant 24 h sont placées à 4°C pendant 3 heures pour faciliter la diffusion des solutions de chitosane. Les solutions de chitosane diffusent radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003). L'activité inhibitrice du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits. (figure 25)

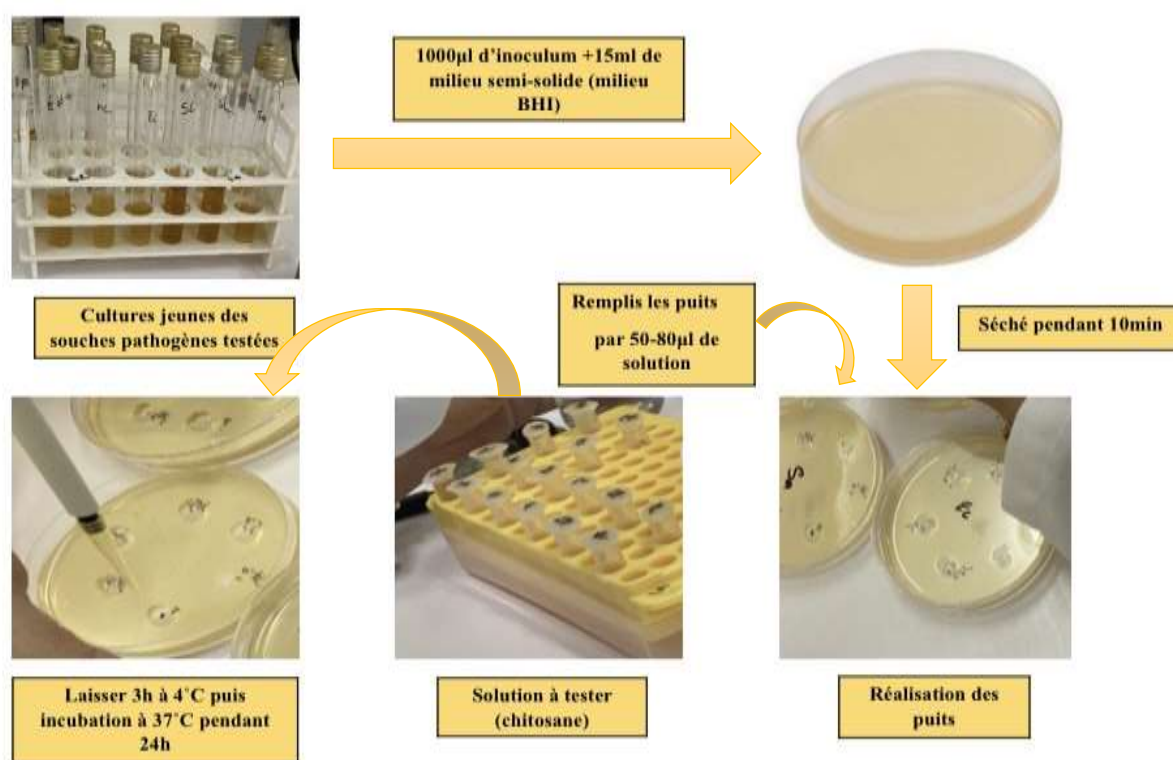


Figure 25 : schéma de la méthode de diffusion en puits ADT (agar well diffusion test).

(Originale).

4.4 Formation de biofilm :

Les 96 puits de la plaque sont remplis par 200 μl de BHIB et inoculés avec 10 μl de la culture bactérienne de chaque souche issue de la culture de BHIB. Chaque souche est ensemencée dans trois puits tandis que les puits du contrôle ne contiennent que le BHIB. Chaque souche est testée deux fois. Après incubation pendant 24 h à 37°C, les cultures sont éliminées de la plaque. Les puits sont lavés deux fois avec de l'eau distillée pour l'élimination des cellules non adhérentes. Les plaques sont laissées à l'air libre pendant 15 min pour le séchage. À ce stade, les puits sont remplis avec 250 μl de CV à 1%. On laisse le tampon agir pendant 15 min à la température ambiante. Les puits sont alors rincés plusieurs fois avec l'eau distillée avant d'être séchés à l'air libre pendant 15 min. Pour la solubilisation du colorant lié à la plaque, 200 μl de l'acide acétique à 33% sont ajoutés à chaque puits. On laisse agir 30 min avant de mesurer la densité optique à 595 nm en utilisant un lecteur automatique de plaque de micro-titration. Un contrôle négatif (BHIB). (Delgado et al., 2009).

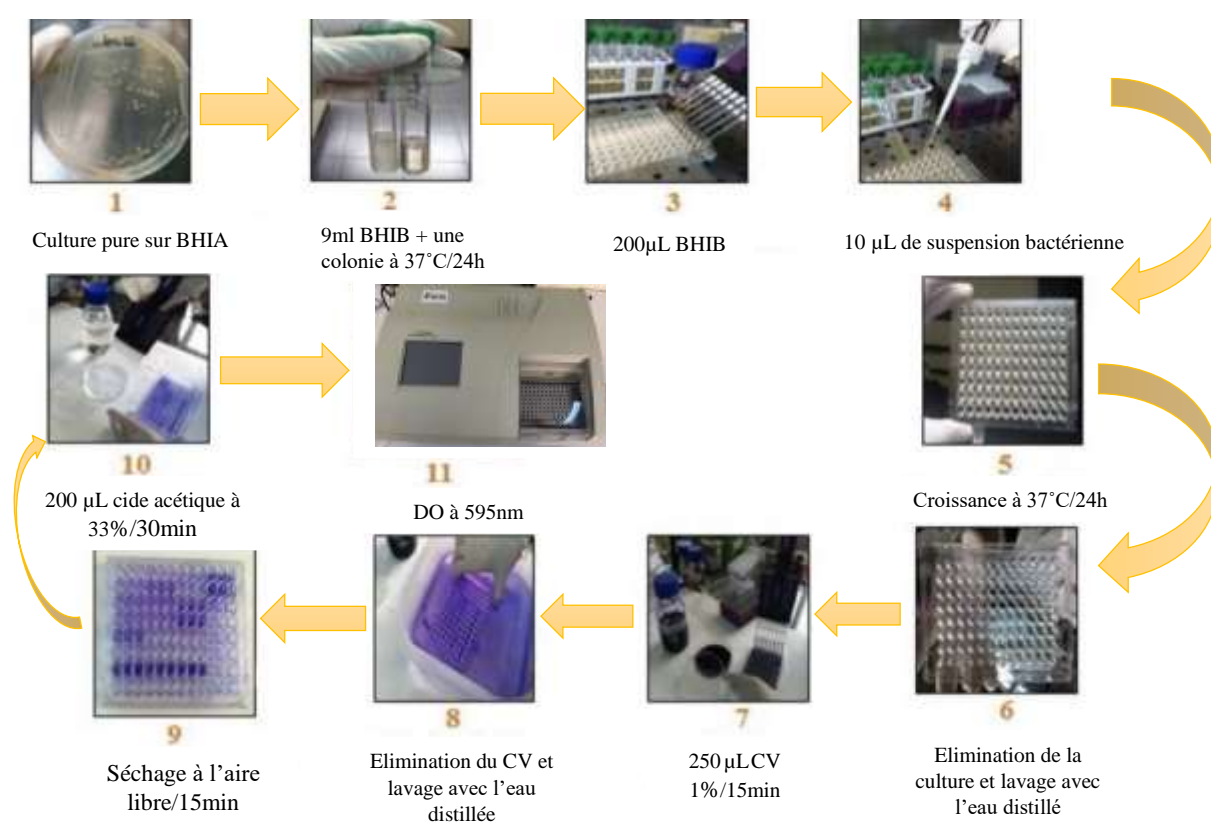


Figure 26 : protocole de formation de biofilm en microplaque à 96 puits en PVC associé à une coloration au CV

4.4.1 Lecture des microplaques

Après coloration par la méthode au cristal violet et comparaison à l'œil nu des puits colorés, les souches ont été classées en trois catégories selon l'intensité de la coloration qui correspond à leur degré de formation de biofilm :

- Non productrice de biofilm $DO \leq DO$ témoin
- Modérément productrice de biofilm ($0,50 \leq DO < 1$)
- Fortement productrice de biofilm ($DO \geq 1$)



Figure 27 : Détection et lecture de biofilm par méthode de CV (à gauche la plaque contenant de CV et à droite le lecteur ELISA) (originale)

4.5 Evaluation de la concentration minimale inhibitrice du chitosane (CMI)

Les CMIs sont aussi déterminées vis -à vis des bactéries cibles. L'inoculum de chaque bactérie testé est obtenu à partir d'une pré-culture de 8h d'incubation, la charge microbienne était ajuster à 10^8 UFC /ml à l'aide d'une turbidité standards 0,5 McFARLAND

Les CMIs des différents composés vis-à-vis des souches bactérienne sont déterminées par la méthode de micro-dilutions en puits.

A cet effet, des plaques contenant 96 puits (Iwaki brand, Asahi techno gladd , japan) sont utilisées. Dans les premiers puits de chaque plaque, des témoins à base d'antibiotique (amoxicilline 1g), des souches et de chitosane à différentes concentrations (0.25 ; 0.5 ; 0.75 et 1%) sont fixés.

Les différentes souches à raison de 100 μ l, sont ajoutées aux solutions à base de chitosane à différentes concentrations pour un volume de 100 μ l, avec une répétabilité de deux (essais).

Le volume finale de chaque puits était de 200 micro L .les plaques incubés à 37°C /18- 24h.

Après incubation, tous les puits étaient examinés et la CMI (%: v/v) est déterminée en prenant en compte la plus faible concentration de chitosane qui inhibe tout développement bactérien (absence de turbidité).

4.6 Etude du pouvoir anti-biofilm du chitosane par la méthode des micro-dilutions

Les effets de chitosane ont été déterminés sur la forme sessile des souches de *S. aureus* hautement adhérents. Les concentrations minimales inhibitrices du biofilm (CMIB) ont été déterminées par la technique de cristal violet (décrite précédemment).

100 µL de suspensions bactériennes (10⁸ UFC/mL cultivées dans du BHIB) ont été distribués dans les plaques de micro titration à 96 puits contenant de 100µL de chitosane. Après incubation des microplaques pendant 24 h à 37 °C, chaque puits a été lavé trois fois avec l'eau distillée, séchée et coloré par l'ajout de 100 à 200 µL colorant cristal violet (CV). Par la suite, le cristal violet a été enlevé et la plaque a été lavée avec de l'eau. Les biofilms colorés ont été mis en suspension dans 200 µL de l'acide acétique à 33 % pendant 1 h et l'expérience a été réalisée en triple. La densité optique (DO) a été mesurée à une longueur d'onde à l'aide d'un lecteur de microplaques pour déterminer la CMIB ([Jafri et al., 2014](#)) ; ([Merghni et al., 2016](#)) ; ([Merghni et al., 2018](#)) ; ([Ben Abdallah et al., 2020](#)) ; ([Achmit et al., 2021](#))



*Résultats et
Discussion*

1. Résultat de l'extraction du chitosane

1.1. Caractérisation visuel de la chitine et de chitosane :

Visuellement, la couleur de chitine avant la déminéralisation est rosâtre grâce à la présence des pigments, après la déprotéinisation la chitine devient rose claire due à l'élimination d'impuretés des caroténo-protéines. Après la déacétylation la couleur de chitosane varie du blanc au jaune pâle et de texture plastique (figure 28). Cette différenciation peut être attribuée au fait que le niveau d'association de la chitine et le pigment varie d'un traitement à l'autre. (Lower, 1984) ; (Benhabile et al., 2013).



Figure 28 : Caractéristique visuelle de la chitine et chitosane (originale).

1.2. Taux de cendre

La teneur en cendre est un paramètre important qui influe sur la qualité de la chitine extraite, la mesure des cendres est un indicateur de l'efficacité de l'étape de déminéralisation pour l'élimination du carbonate de calcium. En effet si on veut produire du chitosane à partir d'une chitine qui contient un taux élevé de cendre peuvent affecter la solubilité, contribuant ainsi à réduire la viscosité, ou peut affecter d'autres caractéristiques plus importantes du produit final. Une qualité élevée de chitosane devrait avoir moins de 1 % de la teneur en cendres. (Nessa et al., 2010) Des études antérieures ont montré que la teneur en cendres du chitosane provenant des déchets de crevettes désacétylés par 50% de NaOH pendant 30min à température 130°C (No et al. 2000).

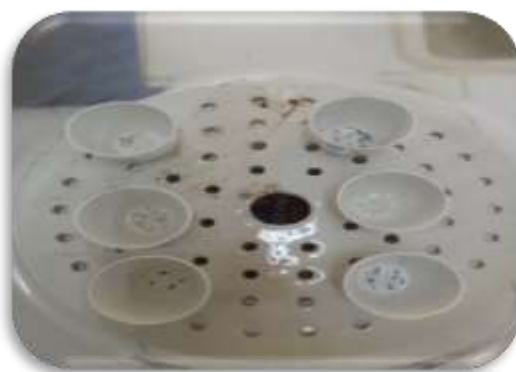


Figure 29 : Résultat visuel de la calcination des différents extraits de chitosane (**originale**)

2. La solubilisation de chitosane :

La solubilisation de chitosane se fait seulement dans des solutions acides diluées (l'acide lactique 1% et l'acide acétique 1%). L'eau est le substrat le plus important dans la solubilisation du chitosane, il participe à la formation des liaisons hydrogène responsable de la solubilisation du chitosane (**Howard, 2002**).

Il apparaît que l'acide acétique est un plastifiant dit « interne » car il y a réaction chimique avec le chitosane. En effet, il a été montré que l'acide acétique était utile dans le processus de plastification du chitosane car son groupe carboxyle réagit avec le groupe amide du chitosane. Le gonflement du chitosane, suggérant une augmentation de la distance entre les plans du chitosane et une déstructuration de celui-ci. Ce résultat est en accord avec le travail publié par Meng et al. (**Meng, et al., 2014**). Meng propose une réaction entre l'acide lactique, qui est le solvant utilisé dans son étude, et le chitosane qui entraîne la détérioration des liaisons hydrogènes entre les plans successifs du chitosane. L'eau de la solution acide a aussi son importance pour la plastification du chitosane. En effet, **Marie et al.**, ont été montré qu'une quantité importante de solution est nécessaire afin de mouiller la surface spécifique totale de la poudre de chitosane. ont été proposé que le chitosane à une structure tridimensionnelle composée d'une succession de feuillets unis par des liaisons hydrogènes (**Marie et al.,2014**).



Acide acétique

Acide lactique

Figure 30 : la solubilisation du chitosane (originale).

2.1. Taux de solubilité

La solubilité du chitosane dans l'acide acétique à 2 % a été déterminée par la méthode du poids (Chung, Kuo, & Chen, 2005). Tous les échantillons secs (1 g) ont été dissous dans 100 ml d'AA à 2 % et agités pendant 24 heures à 4°C. La solution était filtrée à travers un filtre à membrane (0,45 μm) puis séché avant utilisation. (Zhu et al. 2018).

3. Le pouvoir anti oxydant :

La figure ci-dessous montre une augmentation du pourcentage de réduction du DPPH proportionnelle aux concentrations du chitosane.



Figure 31 : Les cuves de l'activité antioxydant de différentes concentrations du chitosane (originale)

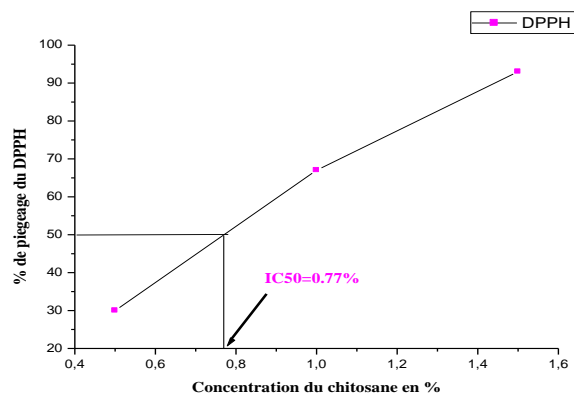


Figure 32 : Augmentation du pourcentage de réduction du DPPH proportionnelle aux Concentrations du chitosane.

La figure ci-dessus montre une augmentation du pourcentage de réduction du DPPH proportionnelle aux concentrations du chitosane en effet l'inhibition de ce radical atteint la valeur maximale de 98 % avec une concentration de 1,5 % de chitosane.

L'activité antioxydant de chitosane exprimée en IC_{50} a été déterminée graphiquement, elle est définie comme étant la concentration de l'antioxydant nécessaire pour produire ou inhiber 50% du DPPH en solution ; comme il est indiqué le chitosane est un excellent antioxydant naturel. Les résultats obtenus concernant l' IC_{50} est de 0.77% de chitosane.

Notre résultat concorde avec ceux de (Kaminski et al., 2008 ; Wydro et al., 2007). Lin et Chou, (2004) qui ont déterminé que l'activité antioxydant du chitosane augmente avec la concentration.

Park et al. (2004) ont suggéré que le chitosane peut éliminer divers radicaux libres par L'action de l'azote sur la C-2 position du chitosane.

4. La cinétique de croissance bactérienne

Le but de la cinétique bactérienne est de suivre l'évolution de la charge bactérienne pendant 24h afin de déterminer la charge des souches utilisées évaluée à 10^9 UFC/ml.



Figure 33 : photos représentative du dénombrement des souches pathogène utilisées
(originale)

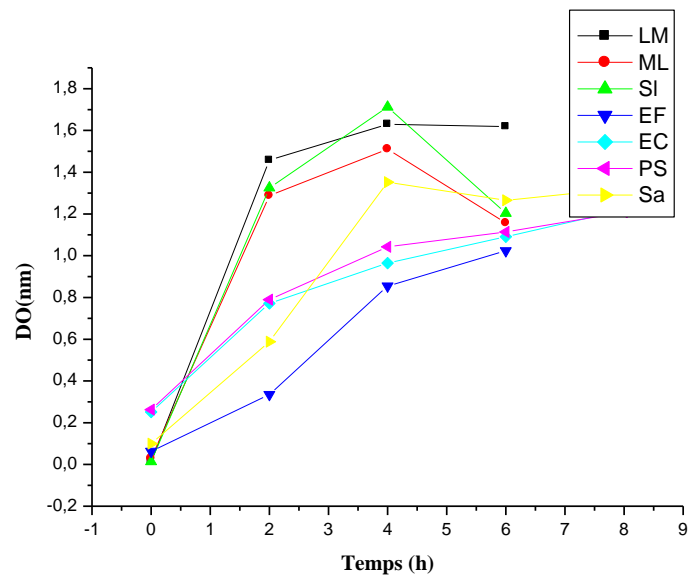


Figure 34 : Courbe illustrant la cinétique bactérienne des souches

La figure 34 Présenté ci-dessous indique la cinétique de croissance bactérienne des sept souches étudiées pendant 10h. Les résultats obtenus montrent que

Micrococcus luteus, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* atteignent la charge microbienne 10^8 UFC/ml au bout de 2h

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* atteignent t la charge microbienne 10^8 UFC/ml au bout de 4h

Enterococcus faecalis atteignent la charge microbienne 10^8 UFC/ml au bout de 8h

5. Démonstration du pouvoir antibactérien du chitosane

L'étude du pouvoir antibactérien du chitosane a été mise en évidence par l'utilisation de deux souches de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Enterococcus faecalis* ATCC 45492.

Les résultats obtenus dans le tableau 08 montrent que l'effet inhibiteur du chitosane pour les deux souches est très significatif avec un diamètre d'inhibiteur entre 7 mm et 16,5 mm.

Les souches utilisées donnent un diamètre d'inhibition pour les concentrations 0.25, 0.5, 0.75, 1% respectivement :

Tableau 07 : l'effet inhibiteur du chitosane pour les deux souches

Les concentrations de chitosane Les souches	0,25%	0,5%	0,75%	1%
	Les zones d'inhibition			
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,75±1,25	9,75±2,75	14,9±5,1	11,1±1,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	9±1	9,75±1,25	12,25±2,75	15,25±1,25

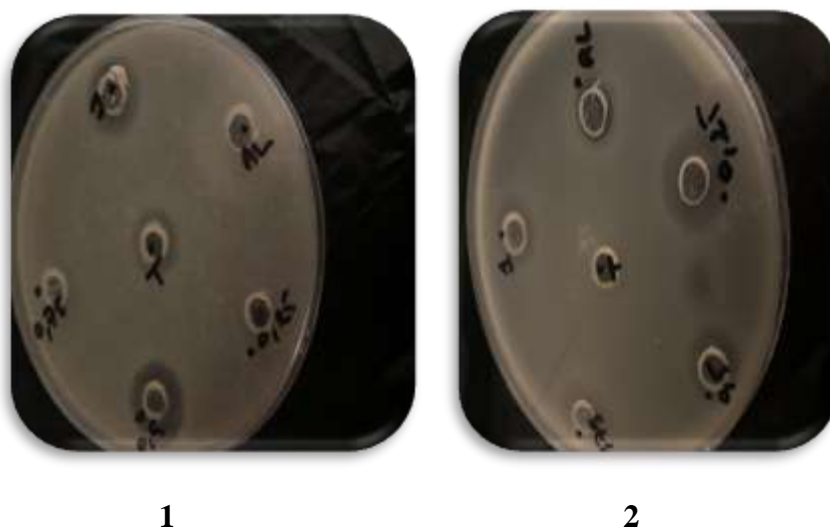


Figure 35 : photo illustrant les zones d'inhibitions de l'effet de chitosane sur les souches

(1 : *Staphylococcus aureus*, 2 : *Enterococcus faecalis*)(Originale)

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour élucider le mécanisme de l'activité antibactérienne de chitosane.

Les résultats obtenus dans cette expérimentation mettant en exergue l'effet antibactérien bénéfique du chitosane, sont proches de ceux déjà soulignés par [Senthilkumar et jeyaprakash\(2012\)](#) sur les bactéries.

En outre, [Chang et la.,\(1989\)](#) ont montré dans une étude que des concentrations de 0.005% du chitosane étaient suffisante pour inactiver le staphylococcus aureus.

L'activité antibactérienne augmente avec le DDA du chitosane. Un chitosane à DDA élevé, ayant donc une densité de charge positives haute, était particulièrement efficace pour l'inhibition des bactéries staphylococcus aureus ([Takashi,et la.,2008](#)).

La même constatations sont faites quant a l'impact du pouvoir antibactérien du chitosane sur la bactérie *Enterococcus faecalis*.

La concentration minimale inhibitrice est définie comme la faible concentration agent antimicrobien, inhibant toute croissance visible d'un micro-organismes sur un milieu de culture après Une incubation de 24h .ceci permet d'évaluer l'efficacité d'une substance anti microbienne ([Nejjahet la., 2006](#)).pour les CMI, l'échelle de grandeurs des valeurs est en $\mu\text{L} / \text{ml}$ ([Nicolas et Daniel, 1998](#)).

D'après les résultats obtenus pour cette méthode, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice de l'Extrait de chitosane. Les résultats obtenus sont positifs par rapport aux

souches pathogènes. Les CMI obtenus est de l'ordre de 0.05% cette valeur s'applique pour les deux souches testées.

La nature de la bactérie cible joue aussi un rôle important dans la détermination de la concentration minimale inhibitrice du chitosane.

Au regard, de ces résultats, nous pouvons confirmer que le chitosane hydrosoluble peut avoir un effet bactéricide contre les agents pathogènes et en particulier staphylococcus aureus.

Bien que le mécanisme exact de l'action inhibitrice du chitosane reste inconnu, la libération des Constituants Intracellulaire peut-être un des farceurs entraînant l'inactivation de la cellule.



Figure 36 : photo de microplaque de CMI (originale).

6. Capacité de la formation du biofilm par la méthode des microplaques de titration appliqué

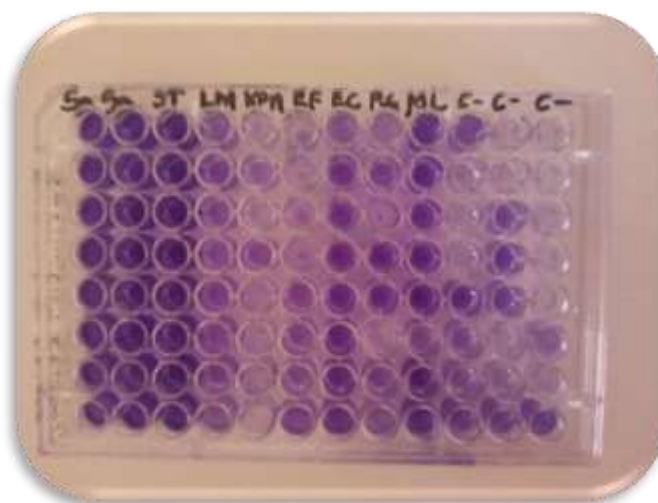


Figure 37 : Résultat de la production du biofilm par la méthode TCP (originale)

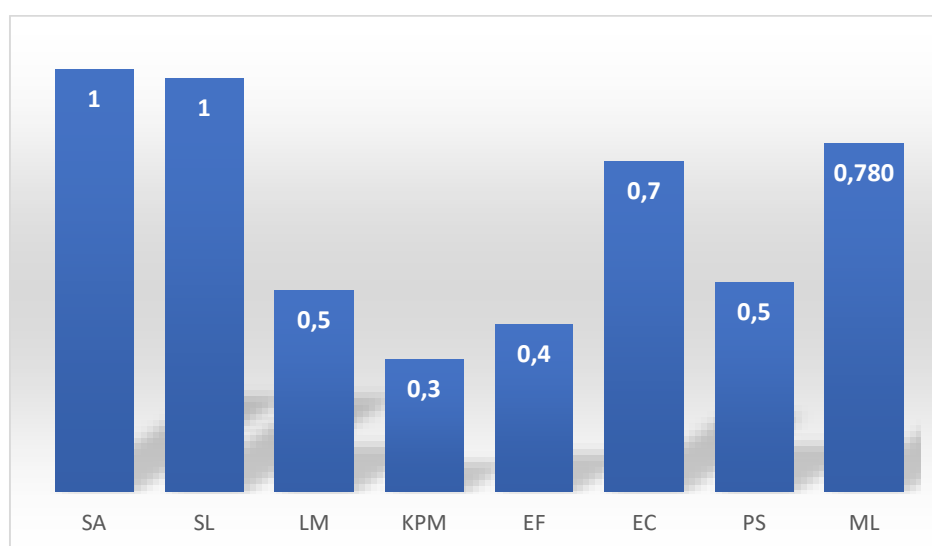
Tableau 08 : Classification des souches selon la capacité de former un biofilm

Formation du biofilm	Faible	Modéré	Forte
DO 490	$0,1 < DO_{620} \leq 0,4$	$0,4 < DO_{620} \leq 0,8$	$DO_{620} > 0,892$
Nbr de souches	2	4	2

la détection de la formation de biofilm a été faite par la méthode de TCP décrit par [Christensen et al., 1985](#) c'est le test le plus utilisé et considéré comme test standard pour formation de biofilms ([Mathur et al., 2006](#)).

Les souches ont été classées on se basant sur les valeurs de DO obtenus ([Ouchar et al., 2013](#)). La quantité de cristal violet solubilisé est mesurée par la lecture de la DO à 490 nm dans un lecteur ELISA (Les résultats obtenus par cette méthode sont illustrés sur la figure 37 et le Tableau 08

Les résultats de l'évaluation de la formation de biofilm par un dosage quantitatif de l'adhésion sur les plaques de titration en Poly Chlorure de Vinyle à 96-puits ont révélé que seulement deux souches (*salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*), sont fortement formatrices de biofilm, quatre souches (*Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Listeria monocytogénèse*) *Listeria monocytogénèse*) montrent une capacité modérée à former un biofilm. En revanche, *Klepseilla pneumoniae* et *Enterococcus faecalis* sont classées comme faiblement formatrice de biofilm étaient incapables d'adhérer à la surface de PVC (figure 38)

**Figure 38** : Digramme de formation de biofilms des souches testés

7.Évaluation de l'activité anti biofilm du chitosane

Sur un total de 8 souches étudiées, nous avons sélectionné seulement 6 souches, fortement à faiblement formatrice de biofilm.

L'activité anti biofilm a pour but de déterminer l'effet inhibiteur du chitosane celui-ci a exercé un effet anti-attachement et inhibiteur sur la capacité d'adhésion des 6 souches sélectionnées dans cet étude. L'efficacité d'inhibition du biofilm par le chitosane à différentes concentrations (0.25, 0.5, 0.75 et 1%) est représentée dans la figure 39

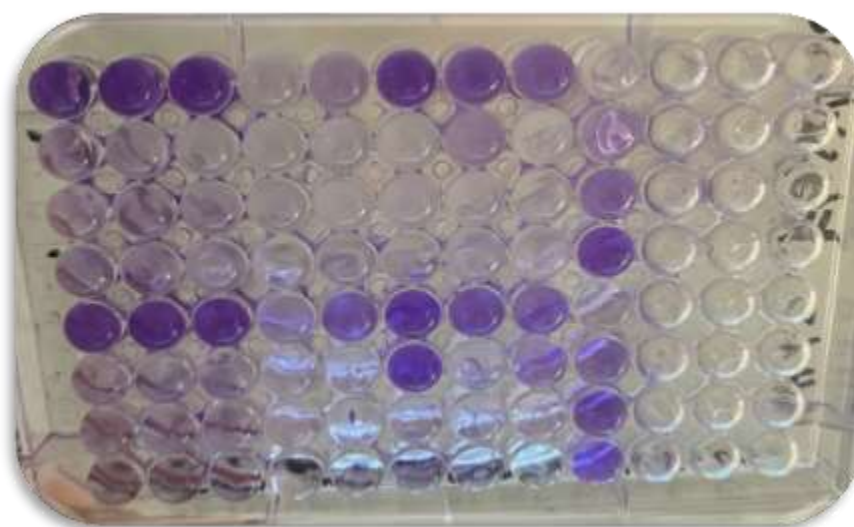



Figure 39 : photo de microplaque de l'effet anti-biofilm (**originale**).

La **Figure 39** a montré que le biofilm non traité contrôlé après 24 heures présente un réseau dense de cellules avec des polymères extracellulaires. La présence du chitosane a permis de réduire efficacement le nombre de micro colonies, ce qui indique que la formation du biofilm a été inhibée à différents niveaux.

Les pourcentages d'inhibition de la formation du biofilm des différentes souches étudiées sont présentées dans le **tableau 09**, elles varient de **99%** à **99.5%** et sont observées avec les concentrations en chitosane de 1% et 0,75%.

Tableau 09 : Les pourcentages d'inhibition de la formation du biofilm

Les souches	SL	ST	ML	EC	ML	PS
% d'inhibition	99%	99%	99.2%	99.3%	99.5%	99.5%



Références
Bibliographiques

Références

A

- A. Chahboun, R. Coratger, F. Ajustron, J. Beauvillain, P. Aimar, V. Sanchez,** Comparative study of micro- and ultrafiltration membranes using STM, AFM and SEM techniques, *Ultramicroscopy*. 41 (1992) 235–244. [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(92\)90112-W](https://doi.org/10.1016/0304-3991(92)90112-W).
- A. Makardij, X.D. Chen, M.M. Farid,** Microfiltration and Ultrafiltration of Milk, *Food Bioprod. Process*. 77 (1999) 107–113. <https://doi.org/10.1205/096030899532394>.
- Agarwal S., Sharma K., Swanson B. G., Yuksel G. U., Clark S. 2006.** Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 89:1452-1466.
- Al Sagheer F A., Al-Sughayer M A., Muslim S. et Elsabee M Z. 2009** –Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*. 77: 410–419.
- Aljawish A., 2013** - Fonctionnalisation enzymatique de chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères. Mem. Doctorat Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Université de Lorraine, 302 P.
- Allion A.2004.** Mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. Thèse de Doctorat l'ENSIA sciences alimentaires.
- Anwar H., Dasgupta M., Costerton J. W. 1990.** Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother*. 34: 2043–2046.
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Caballero, A. H., & Acosta, N. (2021).** Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
- Arbia W., Arbia L., Adour L. et Amrane A., 2013** - Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods. *Food Technol. Biotechnol*, 51 (1) : 12–25.
- Austin, J.W., G. Bergeron. 1995.** Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal of dairy research* 62: 509-519.

B

Badaoui F., 2012 - Comportement Rhéologique De Solutions De Biopolymères. Application au Chitosane, au Poly (vinyle alcool) et à leurs mélanges. Mém. Magister. Génie des polymères, Université Boumerddes, p.13.

Baillif S., Hartmann D., Freney J., Kodjikian L.2010. Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementale, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. Journal français d'ophtalmologie.33:210-221.

Bellifa S. Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Th. Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, 2014.

Beloin, C. R., A et Ghigo,J.M. (2008). "Escherichia Coli biofilms." 289, 249, 322.

Bensaha S. 2010-La décontamination des eaux usées sur un support naturel. Thèse, Magister, Univ, Tlemcen, 113p.

Berg J.D., Matin A., Roberts P. V. 1982. Effect of the antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. Appl. Environ. Microbiol. 44: 814–818.

Bore, E., and S. Langsrud . 2005. Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. J. Appl. Microbiol. 98: 96-105.

Boutaleb N. (2007). "Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable." 174.

Bremer P.J., S. Fillery, and A.J. McQuillan. 2006. Laboratory scale clean in place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. International journal of food microbiology 106: 254-262.

Bremer PJ, Seale B, Flint S, Palmer J. 2009. Biofilms in dairy processing. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, IV, editors. Biofilms in the food and beverage industries. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head, p 396–431.

Brooks J.D., and S.H. Flint. 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. International journal of food and science technology vol. 43 (12): 2163-2176.

C

Carpentier B., Cerf O. 1993. A review: Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. J. Appl. Bacteriol. 75: 499–511.

Carpentier B., O. Cerf. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygien in the food industry-a review. Journal of applied bacteriology, 75: 499-511.

Casadidio C., Peregrina D V., Gigliobianco M R., Deng S.,Censi R. et Martino P., 2019 - Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science.Mar. Drugs, 17: 369.

Casadidio, C., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Deng, S., Censi, R., & Di Martino, P. (2019). Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. Marine Drugs, 17(6). <https://doi.org/10.3390/md17060369>

Cerf O. 2002. Risques bactériens liés aux produits laitiers. Revue Française des Laboratoires. 2002:67-69.

Chmielewski R.A.N., and J.F. Frank. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive reviews in food science and food safety Vol. 2: 23-32.

Costerton J. W. G.G. Geesey, K.J. Cheng. 1978. How bacteria stick. Scientific American, 238: 86-95.

Costerton J. W., Lappin-Scott H. M. 1989. Behavior of bacteria in biofilms. Am. Soc. Microbiol. News. 55: 650–654.

Costerton J. W., Z lewandowski, D.E. Caldwell, D. R. Corber, H.M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. Annual reviews of microbiology, 49: 711-745.

Costerton J.W., Geesey G-G., Cheng K.J. (1978)."How Bacteria Stick Sci A.M." 238:86-95.

Costerton J.W., J.J. Cheng, G.G. Geesy, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta, T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual reviews of microbiology, 41: 435-464.

Crini G., 2019 -Historical review on chitin and chitosan biopolymers. Environ ChemLett. 17: 1623-1643.

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

D

D. Delaunay, Nettoyage éco-efficace de membranes planes et spirales d'ultrafiltration de lait écrémé. Approches physico-chimiques et hydrodynamiques concertées, Thèse de l'Université de Rennes 1, 2007.

Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., Greenberg E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science. 280: 295–298.

De Chalvet De Rochemonteix A. (2009). "Les biofilms et la peau."

Donlan R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases. 8: 881–890.

Donlan R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases. 8: 881–890.

Donlan R.M. Biofilm: microbial life on surfaces. 2002. Emerg Infect Dis., 8: 881-90.

Donlan, R.M., and J.W. Costerton. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews, Vol.15 (2): 167-193.

Donlan, R.M.et Costerton, J.W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." clinic microbial rev 15: 167-193.

Doyle R. J. 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial adhesion. *Microbes Infect.* 2:391–400.

Dunne W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 155–166.

E

El Knidri H., Belaabed R., Addaou A., Laajeb A. et Lahsini A., 2018 - Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120: 1181–1189.

El Knidri H., Belaabed R., Addaou A., Laajeb A. et Lahsini A., 2018 -Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120: 1181–1189.

F

Frank J. F., Koffi R. A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53: 550-554.

G

G. Daufin, F. René, P. Aimar, *Les Séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire*, Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 1998.

Gilbert P., Maira-Litran T., McBain A.J., Rickard A.H., Whyte F.W. 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol.* 46:202–256.

Goller C.C, Romeo T. (2008). "Environmental Influences on Biofilm Development". *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 37- 66.

Gram L., Bagge-Ravn D., Ng Y. Y., Gymoese P., Vogel B. F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 18: 1165–1171.

H

Hamed I., Özogul F. et Regenstein J M., 2016 - Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides). Trends in Food Science & Technology, 48: 40 -50.

Hazmi, A. T., Ahmad, F. B., Maziati Akmal, M. H., & Ralib, A. A. M. (2021). Microbial chitosan for the fabrication of piezoelectric thin film. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 1173(1), 012043. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1173/1/012043>

Hathroubi S., Fontaine-Gosselin S-E., Tremblay Y.D.N., Labrie J., M Jacques. Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Microbiol, 2015.

Henerici A.T. (1932). "Studies of Fresh Water Bacteria : I.A Direct Microscopic Technique." Journal of bacteriology 25(3), 277.

Hijazi N., 2014 - Développement de composites nanostructurés à base de biopolyesters et de nanoparticules de chitosane générées par des procédés assistés par CO₂ supercritique. Mém. Doctorat. Génie des procédés et de l'environnement, Univ de Toulouse, 182 P.

Hirano S. (1989) Chitin and chitosan. Elsevier, New York, NY, Etats-Unis.

Hsiao Y., Tsai C., Chen M., Hsieh C et Chen C. 2004- Spectrophotometric determination of deacetylation degree of chitinous materials dissolved in phosphoric acid. Macromol Biosci, 4(10):919-921.

I

I. Masselin, Effect of sonication on polymeric membranes, J. Membr. Sci. 181 (2001) 213– 220. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)00534-2](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)00534-2).

J

J.-Y. Leveau, M. Bouix, Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries, Lavoisier, Paris, France, 1999.

Jalal Zohuriaan-Mehr M., Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization, Iranian Polymer Journal 14 (3) (2005) 235-265.

Jaouen D., 1994- Chitine, Chitosane et Dérivés. PhD Thèse en pharmacie, Université d'Angers, Angers (France).

Jardine A. et Sayed S., 2017 - Valorisation of chitinous biomass for antimicrobial applications. 6th International Conference on Green Chemistry, Vénice (Italie), Du 4 au 8 Septembre 2016, UNV. Stckholm ; p. 2.

Jones J. G., Pickup R.W. 1989. The effect of organic carbon supply in water on the antibiotic resistance of bacteria. *Aqua*. 33: 131–135.

K

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.

Kashyap P L., Xian X. et Heiden P., 2015 - Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77: 36–51.

Kumar R., 2000 - chitin and chitosane application M. N. V. *React. Function polymer*,

Kumar R., 2000 - chitin and chitosane application M. N. V. *React. Function polymer*, 46 : 1-27.

Kurita K. 2006- Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol*, 8(3):203-226.

Kurita K., 2006-Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans, *Mar. Biotechnol*, 8: 203.

Kusumaningrum, H. D., G. Riboldi, W.C. Hazeleger, and R.R0 Beumer. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International journal of food microbiology* 85: 227-236.

L

L. Bégoin, M. Rabiller-Baudry, B. Chaufer, C. Faille, P. Blanpain-Avet, T. Bénézech, T. Doneva, Methodology of analysis of a spiral-wound module. Application to PES membrane for ultrafiltration of skimmed milk, *Desalination*. 192 (2006) 40–53.

<https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.10.010>

L. Bégoïn, M. Rabiller-Baudry, B. Chaufer, M.-C. Hautbois, T. Doneva, Ageing of PES industrial spiral-wound membranes in acid whey ultrafiltration, *Desalination*. 192 (2006) 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.10.009>.

L. Paugam, D. Delaunay, N.W. Diagne, M. Rabiller-Baudry, Cleaning of skim milk PES ultrafiltration membrane: On the real effect of nitric acid step, *J. Membr. Sci.* 428 (2013) 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.013>.

Le Gentil C., Y. Sylla, et C. Faille. 2010. Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of food engineering* 96: 37-42.

Le petit Lucie, « Développement de méthodologie, conception et validation de détergents/biocides pour le nettoyage en place de membranes polymères de l'industrie laitière », thèse de l'université de rennes le 22 juin 2020.

Lechevallier M. W., Cawathon C. D., Lee R. G.1998. Factors Promoting Survival of Bacteria in Chlorinated Water Supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:649-654.

Lee S. H., Frank J. F. 1991. Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes*. Hypochlorite and heat. *J. Food Prot.* 54: 4–6.

M

M. Rabiller-Baudry, A. Bouzin, C. Hallery, J. Girard, C. Leperoux, Evidencing the chemical degradation of a hydrophilised PES ultrafiltration membrane despite protein fouling, *Sep. Purif. Technol.* 147 (2015) 62–81. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.056>.

M. Rabiller-Baudry, C. Causserand, G. Gesan-Guiziu, Le Nettoyage des équipements à membrane Une étape clef dans ma production durable: applications : fluides alimentaires, eau potable, eaux usées, Cahier n°5, Club français des membranes, CFM, Aix en Provence, 2012

M. Tranha, V. Santos, D. Wiley, The effect of multivalent cations on membrane?protein interactions during cleaning with CTAB, *J. Membr. Sci.* 251 (2005) 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.10.045>.

M.H. Tran-Ha, D.E. Wiley, The relationship between membrane cleaning efficiency and water quality, *J. Membr. Sci.* 145 (1998) 99–110. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(98\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(98)00053-2).

M.-J. Luján-Facundo, J.-A. Mendoza-Roca, B. Cuartas-Uribe, S. Álvarez-Blanco, Membrane fouling in whey processing and subsequent cleaning with ultrasounds for a more sustainable process, *J. Clean. Prod.* 143 (2017) 804–813. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.043>.

M.J. Luján-Facundo, J.A. Mendoza-Roca, B. Cuartas-Uribe, S. Álvarez-Blanco, Cleaning efficiency enhancement by ultrasounds for membranes used in dairy industries, *Ultrason. Sonochem.* 33 (2016) 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.04.018>.

M.J. Luján-Facundo, J.A. Mendoza-Roca, B. Cuartas-Uribe, S. Álvarez-Blanco, Study of membrane cleaning with and without ultrasounds application after fouling with three model dairy solutions, *Food Bioprod. Process.* 100 (2016) 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.011>.

M.J. Luján-Facundo, J.A. Mendoza-Roca, B. Cuartas-Uribe, S. Álvarez-Blanco, Ultrasonic cleaning of ultrafiltration membranes fouled with BSA solution, *Sep. Purif. Technol.* 120 (2013) 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.10.018>.

Marchand, S. J. De Block, V.e De Jonghe, A. Coorevits, M. Heyndrickx, L. Herman. 2012. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 133-147.

Martínez LR, Casadevall A. (2007). " Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light". *Applied and Environmental Microbiology*. 4592- 4601.

Mattila-Sandholm T., Wirtanen G. 1992. Biofilm formation in the industry: A Review. *Food Rev. Inter.* 8: 573-603.

Morin-Crini N., Lichtfouse E., Torri G. et Crini G., 2019 - Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*, 17 (4) :1667 - 1692.

Muatapha A., Liewen M. B. 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *J. Food Prot.* 52: 306-311.

Murthy PS., Venkatesan R. 2008. Industrial biofilm and their control. Springer series in biofilms.

Muzzarelli R.A.A., 1977-Chitin; Pergamon: Oxford..

Muzzarelli, R.A.A. (1977). Chitin. Pergamon Press, Oxford, Great Britain, 1-309.

N

N. Wemsy Diagne, M. Rabiller-Baudry, L. Paugam, On the actual cleanability of polyethersulfone membrane fouled by proteins at critical or limiting flux, *J. Membr. Sci.* 425–426 (2013) 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.09.001>.

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 K., Hur Y .1998- Control of Foam Formation by Antifoam during Demineralization of Crustacean Shell in Préparation of Chitin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46 : 3844-3846.

Nugraha E ., 2006 -Développement de films biodégradables à base de chitosane : Etude du mélange chitosane/ PLA, de la plastification et de la compatification et de la comptabilisation a Reims.

P

Palmer J., Flint S., Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 577–588.

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.

Parkar S.G., S.H. Flint; J.D. Brooks. 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 96: 110-116.

Peter M.G., 2002-Chitin and chitosan from animal sources. *Biopolym.*, 6, 481-574.

Philips PL; Wolcott RD ; Feltcher J ; Schultz GS. (2010). "Biofilm Made Easy." *Wonds International*. 1-8.

Poulsen L. V. 1999. Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.* 32: 321-326.

R

Rinaudo M .2008- Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polym Int*, 57(3):397-430.

Roberts G.A.F., Structure of chitin and chitosan. In: *Chitin chemistry*, edited by G.A.F. Roberts, Mac Millan Press, Houndmills. (1992) 1-53.

S

S. Muthukumaran, S. Kentish, S. Lalchandani, M. Ashokkumar, R. Mawson, G.W. Stevens, F. Grieser, The optimisation of ultrasonic cleaning procedures for dairy fouled ultrafiltration membranes, *Ultrason. Sonochem.* 12 (2005) 29–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.05.007>.

S. Platt, M. Nyström, Colorimetric staining of ultrafiltration membranes fouled with BSA, *Desalination*. 199 (2006) 210–212. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.050>.

Sedaghat F., Yousefzadi M., Toiserkani H. et Najafipour S., 2017 - Bioconversion of shrimp waste *Penaeus monodon* using lactic acid fermentation: an alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. *Int. J. Biol. Macromol*, 104 : 883–888.

Shi X., and X. Zhu. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in food science and technology* 20: 407-413.

Simões M., Bennett R. N., Rosa E. A. S. 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*. 26: 746–757.

Simoes M., L.C. Simoes, and M.J.Vieira. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 43: 573-583.

Simões M., Simões L. C., Machado I., Pereira M. O., Vieira M. J. 2006. Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts Processing*. 84: 338–345.

Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., Welsh M. J. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 417:552-555.

Spormann, AM. (2008). "Physiology of Microbes in Biofilms Stability of Burkholderia Cenocepacia Biofilms." *Applied and Environmental Microbiology*, 5208- 5218.

T

T. Vroman, Mécanismes de décolmatage de membranes fibres creuses en traitement des eaux : Flux critique de rétrolavage et déformation de la membrane pour une amélioration de l'efficacité du rétrolavage, Thèse de l'Université de Toulouse 3, 2020.

Tokura S et Tamura H .2007- Chitin and Chitosan. In: *Comprehensive Glycoscience*. Edited by Johannis PK. Oxford: Elsevier; 449-475.

Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M. et Alaguic A., 2003 -Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled Physico-chemical properties. *Polymer*, 44: 7939 - 7952.

Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M. et Alaguic A., 2003 -Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled Physico-chemical properties. *Polymer*, 44: 7939 - 7952.

Tolaimate A., Desbrières J., Rhazi M., Alaguic A., Vincendon M. et Vottero P., 2000 -On the influence of deacetylation process on the physico chemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, 41: 2463 - 2469.

touati hamed.B, djari hicham, ramdani yacine. « Extraction et optimisation de degré déacétylation du chitosane » mémoire de l'université Echahid Hamma lakhder-El-oued 2019

Trautner B.W, Darouiche R.O.(2009). "Role of biofilm in Catheter-associated Urinary Tract infection,A." *Am J Infect Control*32 (3): 177-183.

Tsai G., Tsai M., Lee J., et Zhong M., J Food Prot 69 (2006) 2168.

Tyliszczak B Z., Drabczyk A., Kramarczyk S K.et Kupiec A S., 2020 – Sustainable Production of Chitosan. *Studies in Systems, Decision and Control*, 45-60.

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 brain injury inducing cytoapoptosis, apoptosis and necrosis of activated T lymphocytes : role of guanylate cyclase, *cellular Immunology*, Vol. 221. p.p. 50-63.

Van Houdt, R et Michiels .C.W.(2005). "Role of bacterial Cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation." *Res Microbiol*156: 626-633.

Van Loosdrecht M. C .M., Norde W., Zehnder A. J. B. 1990. Physical and chemical description of bacterial adhesion. *J. Biomaterial Appl.* 5: 91–106.

Vidal D. R., Ragot C., Thibault F. 1997. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* 55: 49–54.

Vieira M. J., Melo L., Pinheiro M. M. 1993. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling.* 7: 67–80.

Vlkova H., V. Babak, R. Seydlova, I. Pavlik, and J. Schlegelova. 2008. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and effectiveness on biofilms – a review. *Czech j. food.sci.* Vol. 26, (5): 309-323.

W

Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z. et Zhao K., 2020 – Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2): 487.

Wirtanen G., Salo S. 2005. Improper dairy hygiene – Case studies on poor microbial ecology in the Nordic DairyNET project. In: 36th R3 – Nordic Symposium and 5th European Parenteral Conference of ESPC, 23–25, Linköping: 171–182.

Wirtanen G., Salo S. 2005. Improper dairy hygiene – Case studies on poor microbial ecology in the Nordic DairyNET project. In: 36th R3 – Nordic Symposium and 5th European Parenteral Conference of ESPC, 23–25, Linköping: 171–182.

Wong A. C. L. 1998. Biofilms in food processing environments. *J. Dairy Sci.* 81: 2765-2770.

X

X. Shi, G. Tal, N.P. Hankins, V. Gitis, Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review, *J. Water Process Eng.* 1 (2014) 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2014.04.003>.

X. Shi, G. Tal, N.P. Hankins, V. Gitis, Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review, *J. Water Process Eng.* 1 (2014) 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2014.04.003>.

γ

Youcefi F. et Riazi A., 2012-Extraction, Physicochemical Characterization and in Vitro Antioxidative Potential of Chitosan in Shrimp Shell Waste from Beni Saf Sea, Algeria. *International Journal of Science and Research*, 3: 955-959.

Younes 1. et Rinaudo M., 2015-Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources Structure, Properties and Applications. *Mar Drugs*, 13 : 1133-1174.

Z

Zhao Q., Liu Y.2006. Modification of stainless steel surfaces by electroless Ni-P and small amount of PTFE to minimize bacterial adhesion. *J. Food. Eng.* 72: 266–272.

Zottola A. E., Sasahara K. C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* 23:125-148.

Zhang, H., & Yang, F. Q. (2021). Equipment-free quantitative determination of urea based on paper-based sensor via urease-mediated chitosan viscosity change. *Enzyme and Microbial Technology*, 148(February), 109830. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109830>