

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCÉDES

Spécialité : Pollution traitement des effluent et protection de l'environnement

Intitulé du mémoire

**Etude de l'effet acaricide d'une biomolécule d'origine
environnementale contre le varroa de l'abeille**

Présenté par :

BOUMEHDI SOFIANE

Encadré par :

Dr HASSIBA LARIBI

Année universitaire 2016/2017

Résumé

Il existe de nombreux traitements chimiques et biologiques dans la lutte contre le varroa destructeur. Ce parasite qui affecte l'abeille à été remédié par l'amytraze, le thymol, L'acide fourmique, l'huile de moutarde etc.... tout les produits chimiques ont l'avantage d'éliminer un taux considérable de varroa mais ont une mortalité importante chez les abeilles, les produits biologique ne sont pas néfaste pour l'abeille mais présentent un résultat peu satisfaisants.

Le but de notre étude est de synthétiser un gel à base de chitosane qui soit efficace contre le parasite sans pour autant avoir un impact négatif sur l'abeille. Nos résultats ont montré une activité acaricide de 50% avec un gel préparé à 1.5g de chitosane. Durant ce traitement Aucune mortalité des abeilles n'a était observé. Contrairement à l'amitrazé acaricide de synthèse ou nous avons noté une perte d'un tiers de la colonie d'abeille. Le chitosane a été utilisé sous forme de membrane afin d'éliminer un autre ennemie de la ruche la fausse teigne. Les résultats obtenue on montrer après sa consommation par cette dernière une mortalité de 100% après arrête de croissance a l'état larvaire.

ملخص

تنتشر العديد من الأدوية الكيميائية و البيولوجية المضادة لطفيلي الفاروا . على غرار المبيد الحشري المعروف عند عموم النحالين بالاميتراز الذي تصل نسبة فعاليته الى 99 بالمئة لكن بالمقابل يرافق هته الفعالية في القضاء على أكاروس الفاروا موت عدد كبير من أفراد خلية النحل الى درجة تضرر وموت طوائف بأكملها بالاضافة الى الاميتراز توجد أدوية أخرى كالتيمول وحمض النمل وكلها تشكل خطر على سلامة طوائف النحل وكذا على الانسان نتيجة تلوث العسل وباقي منتجات الخلية ببقايا المعادن الثقيلة والجزيئات السامة الموجودة بتلك الادوية.

نهذف في هذا البحث الى استحداث دواء يمثل كفاح بيولوجي مضاد للفاروا حيث المادة الفعالة فيه هي الكيتوزان على شكل هلام دون أن يكون له تأثير جانبي على النحل وقد وصلنا الى نسبة فعالية 50 بالمئة دون أن تضرر أي نحلة بهذا الدواء مع استمرار وضع الملكة للبيض على عكس الادوية الأخرى التي نلاحظ فيها توقف كلي او نسبي للملكة عن التبيض .

تجدر الإشارة الى أننا قمنا ايضا بصنع غشاء يتكون من نفس المادة الفعالة و نسبة من حبوب الطلع التي تمثل غذاء لدودة الشمع للقضاء عليها و التي تعتبر من اشد أعداء النحل وكانت النتائج جد مرضية حيث تمكنا من تثبيط تطور يرقات دودة الشمع ومنع تطورها الى حشرة كاملة مع تسجيل موت الحشرات الكاملة بعد استهلاكها للغشاء الكيتوزاني.

Abstract

There are many chemical and biological treatments in the fight against destructore varroa. This parasite that affects the bee has been remedied by amytrazole, thymol, antinetic acid ect.... all chemicals have the advantage of eliminating a considerable amount of varroa but have a high mortality in bees, organic products are not harmful to the bee but present an unsatisfactory result. The aim of our study is to synthesize a chitosan-based gel which is effective against the parasite without having a negative impact on the bee. Our results showed a 50% acaricidal activity with a gel to prepare 1.5g of chitosan. During treatment No bee mortality was observed. In contrast to the amitraze synthetic acaricide or we noted a loss of one-third of the bee colony. Chitosan was used as a membrane in order to eliminate another enemy that is false ringworm. The results obtained show, after its consumption by the latter, a mortality of 100% after stopping of growth in the larval state

Remerciements

Je rend grace a Dieu

I made thanks to god

الحمد لله

Je remercie mes parents, ma promotrice Dr H.Laribi et mon co encadreur Mr Ouahib Ibrahim.

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Remerciements	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	12

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Biologie générale de l'hôte l'abeille <i>Apis mellifera</i>	14
1.1. Anatomie générale	15
1.2. Cycle de vie de l'hôte	15
1.3. Le rôle de l'abeille	17
1.4. La ruche	17
1.5. Les produits de la ruche.....	18
2. Maladie parasitaire de l'hôte la Varrose.....	19
2.1. Le varroa destructor.....	19
2.2. Anatomie du varroa.....	20
2.3. Cycle de vie du varroa	21
2.4. Effets pathogène de la Varrose.....	21
2.5. Traitement chimique contre la varrose	22
2.5.1. l'amitraze.....	22
2.5.2. l'acide oxalique.....	22
2.6. Traitement biologique	23
2.6.1. Le thymol.....	23
2.6.2. L'huile végétale.....	24
3. Chitine et chitosane	25
3.1. Source de la Chitine et du Chitosane.....	25
3.2. Structure de la Chitine et du Chitosane.....	26
3.3. Les caractéristique physico-chimiques du chitosane.....	27
3.4. Chitosane dans la lutte contre la Varrose de l'abeille.....	27
3.5. Mécanismes d'interactions Chitosane-Varroa.....	28

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel biologique.....	30
2.1.1. L'abeille <i>Apis mellifera</i>	30
2.1.2. Carapace de crevettes.....	30
2.2. Matériel non biologique.....	31
2.2.1. Les ruches d'abeille.....	31
2.3. Méthodes.....	31
2.3.1. Extraction de la Chitine	31
A. Déminéralisation.....	32
B. Déprotéinisation.....	33
C. Blanchiment.....	33
2.3.2. Obtention du Chitosane.....	34
2.3.3. Caractérisation de la molécule du chitosane.....	35
2.3.4. Préparation d'une membrane de Chitosane.....	40
2.3.5. Préparation d'un gel de Chitosane.....	40
2.3.6. Application de l'acaricide Chitosane sous forme de gel	41
2.3.7. Application du traitement chimique l'amitrazé.....	42
2.3.8. Application du traitement biologique l'huile de moutarde.....	42

CHAPITRE 3

RESULTAT ET DISCUSSIONS

3.1. Extraction de la chitine.	44
3.2. Obtention du Chitosane.....	44
3.3. Caractérisation physico chimique du chitosane	44
3.4. Caractérisation d'une membrane de chitosane.....	51
3.5. Préparation de la membrane de chitosane.	51
3.6. Préparation d'un gel de chitosane.....	52
3.7. Application d'un acaricide de chitosane sous forme de gel.....	52
3.8. Application du traitement chimique l'amitrazé.....	53
3.9. Application du traitement biologique l'huile de moutarde.....	53
3.10. Evaluation de l'efficacité du traitement du Chitosane.....	53

Discussions

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

Liste des figures

Figure 01 : Anatomie de l'abeille.....	15
Figure 02 : Cycle de vie de l'abeille.....	16
Figure 03 : une ruche d'abeille.....	17
Figure 04 : Face dorsale du Varroa.....	19
Figure 05 : Face ventral du Varroa.....	20
Figure 06 : Principales étapes du cycle de reproduction du Varroa.....	21
Figure 07: Application de l'Amitraze en lanières.....	22
Figure 08: Traitement par dégouttement d'une solution.....	23
Figure 09 : Fabrication de la chitine et du chitosane.....	25
Figure 10 : La composition de la chitine.....	26
Figure 11 : composition du chitosane.....	26
Figure 12: les ruches d'abeille.....	31
Figure 13: carapace de crevette prête à être sécher.....	31
Figure 14: broyage après séchage.....	32
Figure 15: Chitine dans une solution acide.....	32
Figure 16: rinçage de la chitine à l'eau distillé.....	33
Figure 17: Chitine dans une solution basique.....	33
Figure 18: Blanchiment de la chitine.....	34
Figure 19: Chitosane obtenu au laboratoire.....	34
Figure 20: Plateaux anti varroas.....	41
Figure 21: Valeur de la densité.....	45
Figure 22 : Spectre UV-Visible du chitosane.....	45
Figure 23 : Réaction de la protonation du chitosane.....	46
Figure 24 : Conductivité du chitosane en fonction du volume de NaOH.....	46
Figure 25 : Courbe de dosage pH- métrique du chitosane.....	47
Figure 26 : Spectre IR du chitosane obtenus.....	48

Figure 27: Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration de chitosane à 20°C, selon Huggins et Kraemer.....	50
Figure 28: membrane à base de chitosane a des concentrations différentes (originale)...	52
Figure 29: Gel à base de chitosane.....	52
Figure 30: Gel appliqué au niveau du couvain.....	52
Figure 31: Le nombre de varroa éliminé par gel de chitosane.....	53
Figure 32 : Le nombre de varroa éliminé par gel de chitosane et par l'amitraze.....	54
Figure 33 : Le nombre de varroa éliminé par gel de chitosane et par l'huile de moutarde.....	54

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques morphologiques de <i>Varroa destructor</i>	20
Tableau 02: La teneur en eau et en cendre de notre chitosane.....	44
Tableau 03: Test de solubilité de la chitine et du chitosane	44
Tableau 04: Les degrés d'acétylations (%DA) du chitosane	49
Tableau 05: Aspect des membranes préparées	54

Liste des abréviations

PH : Potentiel Hydrogène

IR : Infrarouge

UV : Ultra violet

DA : Degré d'acétylation

DDA : Degré de désacétylation

SA A: Spectroscopie d'absorption atomique

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Grace aux abeilles nous profitons d'une bonne qualité de vie et d'une diversité inouï, en effets grâce à la pollinisation des abeilles nous consommons des aliments riches en vitamine, nous bénéficions d'une large palette de fleurs, mais leurs rôle ne se limite pas qu'à l'agriculture les abeilles sauvages pollinisent de nombreuses plantes et contribue donc à la sauvegarde et à la préservation de l'écosystème. La protection de l'environnement est indubitablement lié à la protection des abeilles car Albert Einstein disait Si l'abeille disparaissait de la surface du globe, l'homme n'aurait plus que quatre années à vivre [1].

Depuis plusieurs décennies, le phénomène varroas est devenu une préoccupation pour les apiculteurs. Bien que les moyens de lutte contre la varroase soient nombreux, les apiculteurs en Algérie préfèrent utiliser les dispositifs artisanaux à base de lanieres et d'amitraze [2].

De manières quasi fréquente des traitements chimiques sont employée pour recourir au problème, Malgré une efficacité élevée l'effet néfaste n'est pas des moindres. Si ce produit comme ses semblables profite d'une notoriété en matière d'efficacité, ils sont connus aussi pour leur taux de mortalité important chez l'abeille.

Quand l'industrie des pesticides fait des ravages à notre planète, et à notre santé nous avons l'obligation de produire bio de consommer bio et de traiter bio.

Nous avons donc à travers ce projet essayé de travailler sur une méthode bio qui respecte l'environnement, qui soit efficace contre le varroa et le moins agressive possible envers l'abeille.

Nous nous sommes intéressés à la chitine, une matière première biodégradable, abondante et à faible coût, nous avons par la suite procédé à l'élaboration du chitosane un composé à caractère acaricide.

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Biologie générale de l'hôte l'abeille *Apis mellifera*

Dans la grande famille des insectes, l'abeille fait partie de l'ordre des Hyménoptères. Généralement elles vivent en communauté. L'espèce la plus connue l'*Apis Mellifera* ou l'abeille à miel, les abeilles sont sauvages ou domestiquées pour la production du miel [3].

La ruche qui compte environ 50 000 abeilles, est constituée d'une seule reine qui garantit la régénération de la colonie par la ponte des œufs (environ 2000 œufs), les ouvrières essentielles non seulement pour l'approvisionnement et la protection, mais aussi pour le nettoyage, la désinfection et autres tâches (nourrissement, ventilation et bâtisseuse), quant au faux bourdon il assure l'accouplement de la reine.

Leur rôle majeur dans la pollinisation des arbres fruités, des plantes ou des fleurs les rend indispensables pour une bonne récolte, sans parler de leur importance dans la production de miel, de la gelée royale de la propolis, et de venin.

La communication entre les individus de la colonie est basée sur des échanges tactiles à l'aide d'antennes, et aussi par voie chimique grâce aux phéromones.

En 1973 Konrad Lorenz et Nikolaas Tinbergen font une découverte majeure en ce qui concerne la communication des abeilles,[4] un mode de communication si particulier, incroyable, il s'agit d'un langage abstrait complexe permettant de transmettre une quantité considérable d'information. Les abeilles s'en servent pour indiquer avec précision l'emplacement de source de nourriture, d'un point d'eau, ou de récolte de résines pour la production de la propolis jusqu'aux lieux de la colonie.

1.1. Anatomie générale

C'est en 1758 que Linné décrit l'abeille et désigne par *Apis mellifera* l'ensemble des abeilles connues à l'époque ainsi que quelques guêpes [5]. Le corps de l'abeille est divisé en plusieurs segments. On distingue facilement trois parties, caractéristiques de la classe des insectes, composant le corps de l'abeille : la tête, le thorax et l'abdomen. La tête est en quelque sorte le centre nerveux et sensitif de l'abeille. On y retrouve les organes des sens (antennes, ocelles, yeux composés) et les pièces buccales. La tête renferme le cerveau de

L'abeille, très développé, dû au haut niveau de socialisation de l'abeille. Les glandes hypopharyngiennes, labiales et mandibulaires sont également situées dans la tête de l'abeille. Le thorax est composé de trois segments soudés : le pro-, méso- et métathorax. Il porte les éléments locomoteurs de l'abeille : trois paires de pattes et deux paires d'ailes membraneuses. Le thorax contient de puissants muscles alaires. [6]

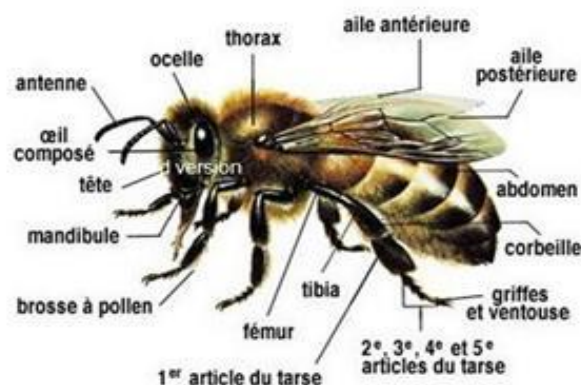


Figure 01 : Anatomie de l'abeille

1.2. Cycle de vie de l'hôte

Rentrée de son vol nuptial, la reine fécondée commence la ponte : jusqu'à 2 000 œufs par jour, pour un poids total équivalent à son propre poids. La ponte se réalise dans le centre de la ruche, communément appelé nid. Autour de ce nid se trouvent une couronne d'alvéoles remplies de pollen, et encore plus à l'extérieur, les alvéoles remplies de miel. Un mécanisme musculaire permet à la reine de choisir de féconder ou non les œufs qu'elle dépose au fond des alvéoles : les œufs non fécondés, haploïdes, donneront des mâles

(parthénogenèse arrhénotoque) tandis que les œufs fécondés, diploïdes, se développeront en femelles.

Le développement d'une abeille adulte, passe par trois étapes : le stade de l'œuf, le stade larvaire et le stade nymphal.[7]

L'œuf est blanc, translucide et ovale. Après trois jours d'incubation, une larve blanchâtre, apode et sans yeux éclot de l'œuf. Elle est arquée et grandit rapidement. Pendant les trois premiers jours, toutes les larves sont nourries avec de la bouillie royale. A partir du quatrième jour, certaines larves choisies par les ouvrières continuent à être alimentées par cette bouillie, ou gelée royale ; elles deviendront des reines. Les autres larves sont les futures ouvrières et sont nourries avec du miel ou du pollen.

La larve subit plusieurs mues successives puis tisse un cocon très fin à l'intérieur duquel elle se transforme en nymphe. Cette dernière possède de nombreuses caractéristiques morphologiques de l'adulte. La nymphe reste immobile et ne s'alimente pas. Une dernière mue, appelée mue imaginale, fait passer la nymphe au stade adulte (fig 2). La jeune abeille perce l'opercule et s'envole [8]

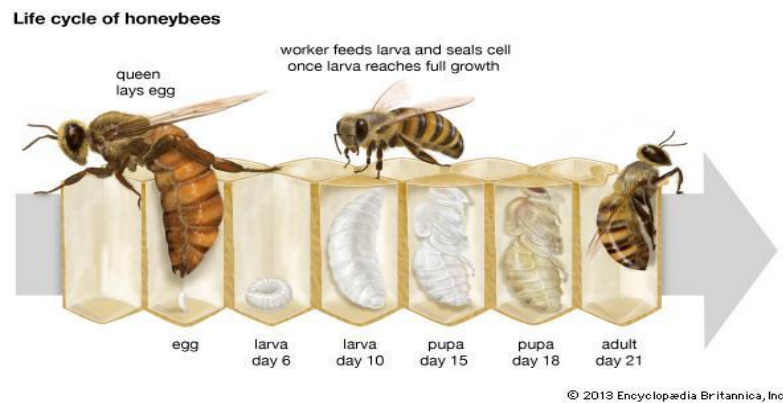


Figure 02 : Cycle de vie de l'abeille[8]

1.3. Le rôle de l'abeille

Les abeilles sont un élément indispensable pour la biodiversité, car elle assure la pollinisation le transport de grains de pollen qui permette la fécondation des arbres fruitier et des fleurs, 80% des cultures sont dépendantes des insectes pollinisateur, une colonie d'abeille peut butiner en une journée plusieurs millions de fleurs.

L'abeille sentinelle de l'environnement, une colonie peut couvrir un rayon de trois kilomètre à la ronde pour satisfaire ses besoin quotidien elle devient est l'indicateur bio par ses échange avec l'éco système tel que l'eau les fleurs et la résine de la propolis [9].

1.4. La ruche

La ruche d'abeilles constitue un lieu de vie artificiel construit par l'apiculteur pour les abeilles, les ruche on traverser le temps et les civilisations, les premiers témoignages remonte à la fresque égyptienne, quant à la première description des cellules en forme d'hexagone contenues dans les ruches a été faite par le grec Aristote

Le miel que nous consommons provient de l'apiculture, c'est-à-dire de l'élevage d'abeilles.

Il s'agit de domestiquer des abeilles dans une ruche selon des techniques spécifiques adaptées au contexte de la région.

Le peuplement de la ruche se fait par essaimage naturel, artificiel ou simplifié.

Les congénères (la reine et la moitié des ouvrières) vont à la recherche d'une nouvelle habitation dans la nature ou dans une nouvelle ruche de l'apiculteur :

- à l'intérieur, la première reine qui apparaît élimine toutes les autres, sauf en cas de grandes colonies.
- 7 jours après, elle effectue son premier vol nuptial.

La ruche est composée de différents éléments:

Un socle ou support pour que la ruche soit surélevée et n'est pas de problème d'humidité

Un plancher un élément qui sera aéré pour donner de l'air aux abeilles et pour évacuer l'humidité de la ruche

Le corps le lieu où vivent les abeilles toute l'année, le corps le plus connu est dit Dadant (nom de son inventeur) ou dit « cadres » car il contient les cadres cirés

Le couvre-cadre: qui permet d'isoler de la chaleur et du froid

Un toit

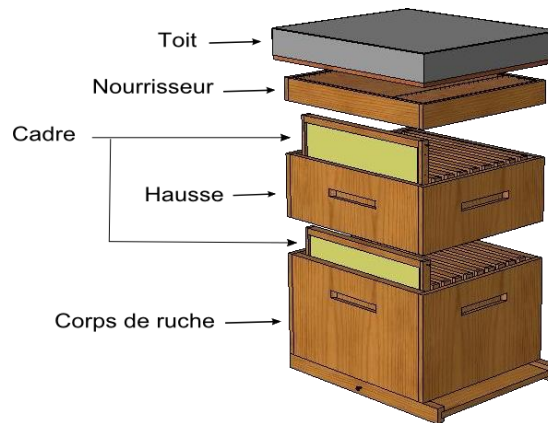


Figure 3 : une ruche d'abeille

1.5. Les produits de la ruche

Le miel est une substance sucrée et visqueuse que les abeilles produisent en recueillant le nectar des plantes puis en le transformant dans leur estomac grâce notamment à une enzyme appelée l'invertase, il est stocké comme réserve de nourriture pour la colonie.

La gelée royale est la substance la plus élaborée de la ruche c'est la sécrétion des glandes hypopharyngiennes des ouvrières, elle sert d'aliment aux larves les trois premiers jours puis uniquement aux reines. Elle comprend des vitamines des lipides des hormones et des principes antibiotiques.

Le pollen prélevé sur les fleurs puis stocké il est la source principale de protéine pour les abeilles, indispensable à la ponte de la reine.

Le venin seul les femelles sont pourvues d'un appareil vulnérant, lorsqu'elles sont menacées, les abeilles sécrètent un liquide à partir de leur dard, utilisé par l'homme pour ces propriétés thérapeutiques notamment le rhumatisme.

La cire sécrétée par les glandes cirières, la cire est utilisée pour la fabrication des alvéoles.

La propolis est une substance essentiellement composée de résines, que recueillent les abeilles à partir des bourgeons d'arbres et de certains végétaux, cette matière malléable à chaud, très

collante qui durci sert à sceller les fissures de la ruche, la propolis possédant aussi des propriétés antimicrobiennes, antiseptique et antioxydants.

2. Maladie parasitaire de l'hôte la Varrose

La varroose est une maladie parasitaire due à l'infestation des adultes et du couvain d'*Apis mellifera* par l'acarien ectoparasite *Varroa destructor*. Pathologie majeure en apiculture, sa contagiosité et ses effets en font un véritable fléau [10].

C'est une maladie à déclaration obligatoire en Algérie selon le décret exécutif n°95-66 du 22 ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995 fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables [11].

2.1. Le *Varroa destructor*

Est un phorétique et ectoparasite obligé de l'abeille. "Phorétique" signifie qu'il se déplace d'une colonie à l'autre en étant transporté par les abeilles. "Ectoparasite obligé" signifie que c'est un parasite externe (voir fig 04 et 05) qui ne peut se développer chez d'autres hôtes que l'abeille. Contrairement à l'abeille asiatique *Apis cerana*, l'abeille européenne *Apis mellifera* ne lui résiste pas, il est présent sur les cinq continents. Il est la cause de l'affaiblissement et l'effondrement des colonies, il provoque donc des pertes économiques considérables en apiculture. Il s'attaque aux abeilles adultes comme aux larves et aux nymphes, il se nourrit de l'hémolymphe de l'abeille [12].



Figure 04 : Face dorsale du *Varroa* [13].



Figure 05 : Face ventral du Varroa [14].

2.2. Anatomie du varroa

Varroa destructor présente un dimorphisme sexuel très marqué à l'état adulte ; la femelle étant presque deux fois plus grande que le mâle. Cette dernière, est facilement observable sur le corps des abeilles adultes tandis que le mâle et les formes immatures (formes larvaires et nymphales) sont cachés dans le couvain operculé [13].

Tableau 01 : Caractéristiques morphologiques de *Varroa destructor* [15]

	La femelle	Le male
Forme	ellipsoïdale	piriforme
Taille	1,1 mm de longueur pour 1,6 mm de largeur	0,7-0,9 mm de longueur pour: 0,7-0,8 mm de largeur
Face dorsale	Striée transversalement et couverte de soies différenciées selon les régions	Est uniformément et abondamment couverte de soies
Face ventrale	Divisé en deux parties : L'idiosoma est formé de dix sclérites et porte quatre paires de pattes. Le gnathosome est l'appareil buccal de type piqueur- suceur	La morphologie de cette face est néanmoins la même que chez la femelle. L'ouverture génitale est plus en avant
Caractéristiques	Extrêmement mobiles, elle est adaptée pour percer et déchirer le tégument de l'hôte.	Le varroa mâle est incapable de percer la cuticule de son hôte

2.3. Cycle de vie du varroa

La reproduction de Varroa se déroule dans les cellules operculées d'abeilles et dure le temps de l'operculation du couvain soit de 12 à 14 jours. La majorité des Varroas femelles va effectuer, au cours de sa vie jusqu'à 3 ou 4 cycles de reproduction successifs en pénétrant dans une cellule du couvain juste avant son operculation [16].

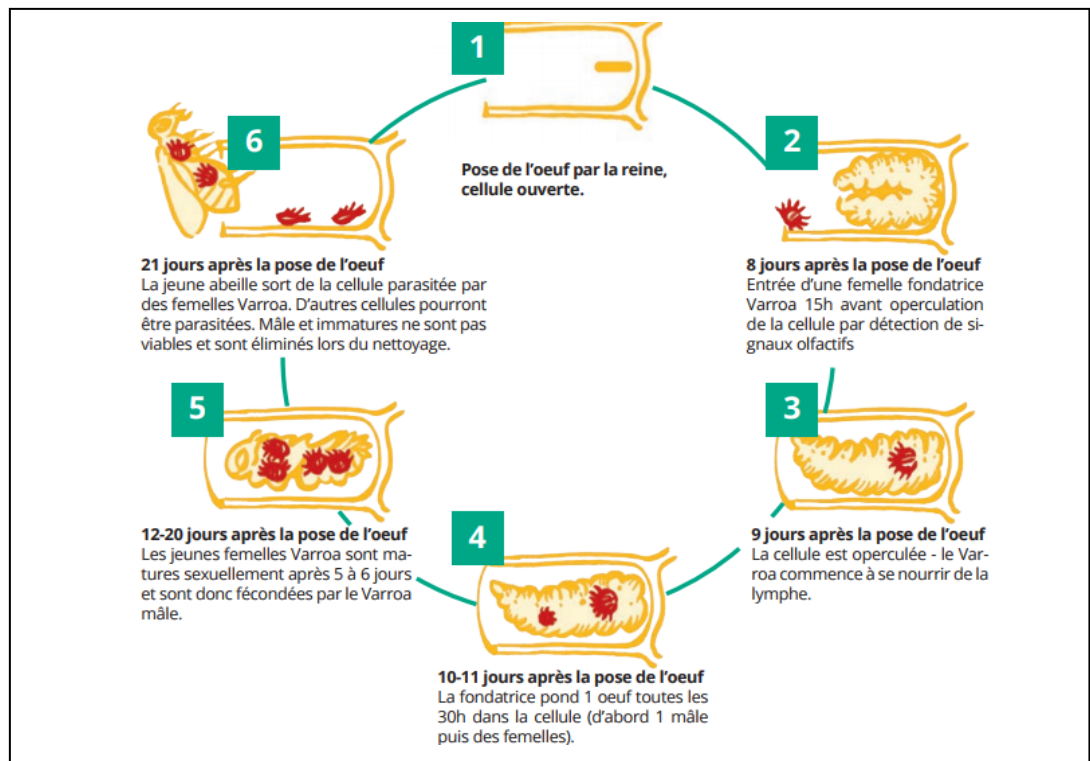


Figure 06 : Principales étapes du cycle de reproduction du Varroa [17].

2.4. Effets pathogène de la Varrose

1. Action mécanique et irritative. L'abeille adulte, ouvrière ou faux-bourdon, subit un ralentissement de son activité si elle porte plusieurs parasites qui occasionnent une surcharge. Dans le couvain, il semble que l'acarien ait une action irritative sur la larve d'abeille, qui se traduit par quelques mouvements désordonnés [18].

2. Action spoliatrice. Une action spoliatrice globale en protéine a été démontrée. Elle peut aller jusqu'à 20% du taux de protéines de la nymphe. Le bilan de cette action se traduit toujours par une diminution de la longévité des abeilles parasitées et aussi par une baisse

de l'activité des reproducteurs. De plus, quand l'infestation des nymphes d'abeille est très importante, elle provoque des malformations des imagos [18].

3. Action vectrice. Les lésions de la cuticule occasionnées par la piqûre de *Varroa jacobsoni* sont des portes d'entrée pour des infections secondaires. L'acarien peut aussi transporter des agents pathogènes de l'abeille qui compliquent la parasitose [19].

2.5.Traitement chimique contre la varrose

2.5.1.L'amytraze

L'amitrazé a d'abord été utilisé en micropulvérisation, puis en gouttelettes déposées sur le plateau des ruches. Il s'agissait de traitements ponctuels qui nécessitaient d'être répétés car l'amitrazé n'élimine pas les varroas du couvain operculé. En 1995, la spécialité vétérinaire APIVAR® a obtenu une AMM pour l'usage apicole. Ce sont des lanières de copolymères de 15 g contenant 0,50 g d'amitrazé. Il faut 2 lanières par ruche, placées entre les cadres. L'effet rémanent est de 10 semaines. Les colonies sont traitées aussitôt après la dernière miellée [20].



Figure 07: Application de l'Amitrazé en lanières

2.5.2. L'acide oxalique

L'acide oxalique L'acide oxalique, ou acide éthanedioïque d'après la nomenclature officielle, est naturellement présent dans les miels à hauteur de 10 à 119 mg/kg selon les origines florales. Un traitement à base d'acide oxalique n'augmente pas de façon significative cette concentration, même après deux traitements successifs au cours du même automne [21]. Cette molécule est hydrosoluble et non volatile, elle peut donc être utilisée par dégouttement ou pulvérisation sur les abeilles d'une solution aqueuse la contenant. Ce produit étant toxique pour l'Homme, il est impératif d'utiliser des vêtements

et lunettes de protection. La méthode par **dégouttement** est la plus rapide (une minute par ruche) et la moins dangereuse pour l'apiculteur. Les auteurs recommandent d'incorporer 35 à 45 g d'acide oxalique dihydrate dans un litre d'eau sucrée (rapport eau/sucre (poids) = 1/1). Sans sortir les cadres du corps de la ruche, 5 mL de la solution sont déversés directement sur les abeilles entre chaque cadre (figure20). Ce produit n'étant pas rémanent, son action ponctuelle nécessite obligatoirement un traitement hors période de couvain pour obtenir une bonne efficacité : entre novembre et décembre avec des températures supérieures à 3°C. Il est important de ne pas appliquer une solution d'acide oxalique plus concentrée, au risque de voir apparaître une mortalité des abeilles. Pour les mêmes raisons, il convient de ne réaliser qu'un seul traitement par an. Enfin, il semble que des affaiblissements à long terme peuvent intervenir, en lien avec des modifications d'organes internes chez les abeilles traitées [23].

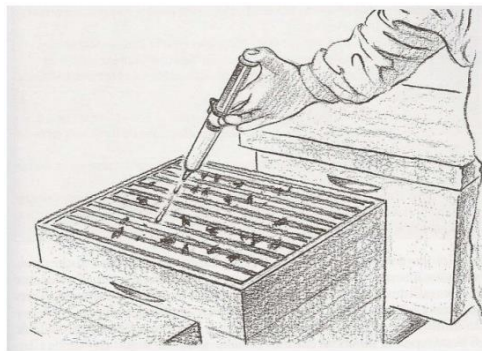


Figure 08: Traitement par dégouttement d'une solution [22].

2.6. Traitement chimique

2.6.1 Le thymol

Le thymol est un phénol contenu dans l'huile essentielle de plusieurs plantes. C'est une molécule liposoluble et volatile appartenant à la famille des mono-terpènes[24]. Les formes galéniques sont des supports qui permettent la diffusion aérienne du thymol dans l'enceinte de la ruche. Il agit par contact direct sur les parasites, par inhalation et franchissement de la cuticule. Son mode d'action acaricide n'est pas parfaitement connu [25]. Cette molécule s'accumule dans la cire, et peut être retrouvée dans le miel, à des doses toutefois très faibles, qui ne représentent aucun danger pour la consommation humaine [24]. La contre-indication du traitement pendant la miellée tient au seul risque d'altération du goût du miel.

2.6.2.L'huile végétale

De nombreuses études sont menées en laboratoire pour évaluer les effets acaricides et répulsifs des huiles essentielles de nombreuses plantes. Ainsi, l'huile essentielle de *Tagetes minuta* (tagète des décombres), administrée en pulvérisation, montre un effet acaricide in vitro, associé à une marge de sécurité élevée en ce qui concerne la toxicité chez l'abeille [26][27]. Il en est de même pour l'huile essentielle de *Minthostachys verticillata* [28] et celle de *Rosmarinus officinalis* (romarin), cette dernière présentant néanmoins une meilleure toxicité chez *Varroa* après séchage de la plante à l'air libre et non en chambre confinée ; Les huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* [29] et de *Heterotheca latifolia* [27] montrent également une toxicité avérée chez *Varroa destructor*, mais la toxicité chez *Apis mellifera* n'a pas été évaluée. En Argentine, de nombreuses huiles essentielles de plantes sauvages ont été testées.

Baccharis flabella présente des effets à la fois acaricides et répulsifs [28].

3. Le chitosane un bio polymère dans la lutte contre la Varrose de l'abeille

Ces biopolymères ont occasionné beaucoup d'intérêt dans le monde dans les années 30 et 40 dans la plus part des cas pour leurs application dans le domaine pharmaceutique et le traitement des eaux. C'est dans les années 70 que c'est développé une réelle industrie autour de ses biopolymères, dans divers catégories qui sont dans une augmentation croissante mais surtout dans le cadre de la sphère de la protection de l'environnement

Le Pr. Henri Braconnot, a isolé une substance d'un certain type de champignon, il constater que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides. En 1823 une substance a été découverte dans certains insectes (coléoptère) il s'est avéré que c'était la même substance et a été nommée chitine. C'est en 1859 que le Pr. C. Rouget a traité la chitine par une solution alcaline et a mesurer les différents solubilités de cette dernière. Cette substance a pu par la suite être dissoute dans les acides.

C'est finalement en 1894 que cette substance est nommée chitosane par Hoppe-Syler [30].

3.1. Source de la chitine et du chitosane

La chitine, du grec *χιτών* signifiant « tunique » est le polysaccharide naturel le plus abondant dans la nature après la cellulose [31]. C'est le matériau qui constitue l'exosquelette des coquilles de mollusques des cuticules des insectes et des carapaces de crustacés.

Associée à des protéines, En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique. Elle contribue à la cohésion de différentes couches qui constituent la coquille des mollusques ou la carapace des arthropodes [32].

Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique [32].

La principale source de la chitine demeure la carapace de crustacé, malgré les nombres considérable de source, ceci est un bon point pour l'environnement puisque c'est valorisation des déchets de l'industrie de l'agroalimentaire.

La principale source du chitosane reste la chitine par l'hydrolyse basique (désacétylation)

Pour produire 500g de chitosane il faut entre 25 kg de carapace.

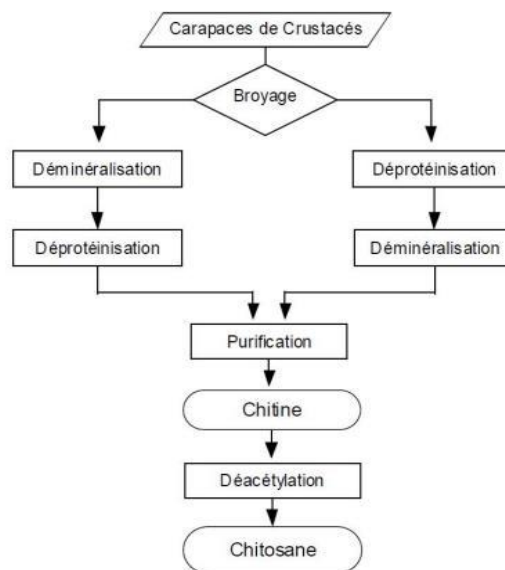


Figure 09 : Fabrication de la chitine et du chitosane [33].

Le chitosane est le produit de la désacétylation (enlèvement groupements acétyles) chimique en milieu alcalin ou enzymatique de la chitine. Cette dernière subit au préalable une déminéralisation à l'acide chlorhydrique, une déprotéinisation par la soude ou la potasse, et enfin un blanchiment par la présence d'un agent oxydant (Fig. 09). En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur la température, il est possible d'obtenir différents chitosane à partir d'une même chitine [33]

3.2. Structure de la chitine et du chitosane

La chitine est un polysaccharide linéaire formé d'unités de N-acétyl-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidique de type β (1-4). Le chitosane est un enchaînement de monomères β -D-glucosamine reliés par une liaison glycosidique (1-4) [34].

C'est un polymère de N-acétylglucosamine, une molécule dérivée du glucose.

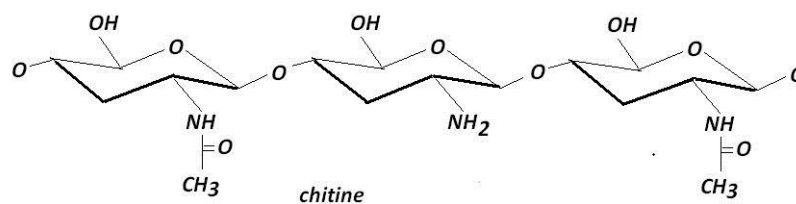


Figure 10 : La composition de la chitine [35].

Le chitosane est dérivé de la chitine, le terme chitosane est donné à tout copolymère formé d'unités constitutives N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine, dont le degré d'acétylation est inférieur à 50% [36].

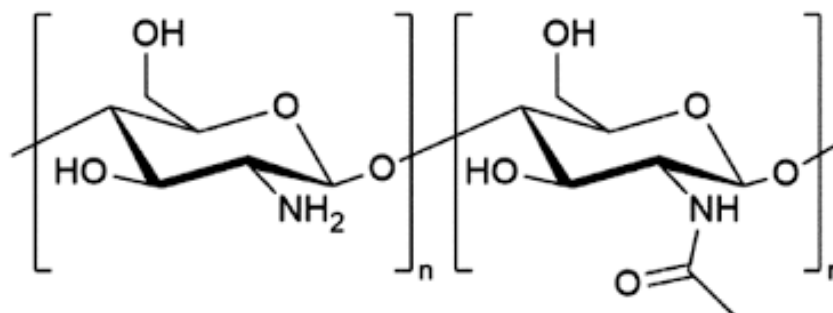


Figure 11 : composition du chitosane [35].

La nature chimique du chitosane fournit beaucoup de possibilité alternative pour des modifications covalentes et ioniques qui permette l'ajustement étendu des propriétés mécanique et biologique.

3.3. Les caractéristique physico-chimiques du chitosane

Le chitosane est caractérisé par son degré de désacétylation, sa viscosité et son poids moléculaire. Le degré de Désacétylation (DD) est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyle. Le degré de Désacétylation (DD) influe sur toutes les propriétés physico-chimiques (masse moléculaire en poids, viscosité, solubilité, ...) du chitosane et apparaît vraisemblablement comme étant le facteur déterminant. La détermination du DD est l'une des analyses primordiale lors de l'extraction de la chitine et la préparation du chitosane. Il existe plusieurs méthodes, le titrage volumétrique, la spectrométrie infrarouge (IR), la spectrophotométrie ultraviolet visible (UVVIS), l'analyse élémentaire, et la résonance magnétique nucléaire (RMN)]. La viscosité du chitosane dépend : de son degré d'acétylation : plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante; de sa concentration, de la température, et le pH. 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-Houwink et Sakurada [37]

3.4. Chitosane dans la lutte contre la Varrose de l'abeille

Le chitosane se présente sous la forme d'un solide amorphe. C'est l'un des rares polyelectrolytes naturels cationiques existant dans la nature. En solution dans un acide dilué, le chitosane se comporte comme un polycationique de forte densité de charge, en raison de la protonation des groupements $-NH_2$. Le chitosane est biocompatible et biodégradable par les microorganismes possédant des enzymes qu'on appelle chitosanase. Il ne présente aucun comportement antigénique, mais possède un caractère antithrombogène et hémostatique. Il montre des propriétés cicatrisantes remarquables. Le chitosane a également des propriétés inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et infections. Il a de plus des propriétés immunologiques, antitumorales, antibactériennes et antifongiques.

3.5. Mécanismes d'interactions Chitosane-Varroa

Le mécanisme d'action du chitosane sur les *Brettanomyces* fait l'objet d'hypothèses en cours de validation. Il est vraisemblable qu'il agisse à deux niveaux :

- interactions spécifiques entre certains groupements du chitosane et la membrane cellulaire des *Brettanomyces* qui provoquent une déstructuration de la barrière membranaire induisant une réponse transcriptionnelle de l'expression du génome, telle une réaction de stress, qui conduit à la mort des cellules
- adsorption du chitosane sur les parois de *Brettanomyces* et blocage des transferts entre les milieux intra- et extra-cellulaires, et entraînement dans les lies par sédimentation[38]

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel Biologique

2.1.1. L'abeille *Apis mellifera*

Apis mellifera, qui est notre abeille européenne, notre «mouche à miel». Ses ancêtres sont originaires d'Asie, comme pour *melliferaligustica*, abeille italienne, prolifère, comme son nom l'indique, plus au sud, en Italie. Le croisement entre *A. mellifera* et *A. melliferaligustica* a permis l'obtention d'une nouvelle race synthétique: l'abeille Buckfast, très présente en Europe (Europe centrale, Europe de l'Est et Europe de l'Ouest). Par rapport aux autres espèces, les abeilles de l'espèce *Mellifera* n'essaient pas beaucoup, pour peu que les conditions qu'on lui offre soient à son goût (réserves, espace, etc.). C'est ce qui permet à l'homme de l'élever en ruche. Il existe des différences notables entre les races. Elles sont dues à des mutations naturelles qui ont été sélectionnées. Les diverses races d'abeilles sont déterminées par biométrie, c'est-à-dire par le biais de mesures anatomiques: mesure des bandes abdominales, taille des poils, couleur de l'abdomen, largeur du tomentum, longueur de la langue, index cubital, transgression discoïdale, etc. Elles peuvent aussi l'être grâce à des marqueurs moléculaires (mitochondriaux et nucléaires), qui permettent d'établir des filiations entre les races d'abeilles. Ces dernières ont des particularités comportementales propres à leur groupe (essaimage, propolisage, tenue au cadre, etc [39]).

2.1.2. Carapace de crevettes

C'est à partir de la carapace de crevettes que se fait l'extraction de la chitine, qui représente la matière première pour l'obtention du chitosane.

Nous avons collecté de la carapace de crevette rouge, de différents poissonniers de la wilaya de Blida. La quantité nécessaire de carapace pour l'obtention de 100g de chitine est de 30 kg. Cette quantité a été acheminée au laboratoire de Microbiologie de la faculté de Génie industrielle, au niveau de l'université de Saad Dahleb. La collecte a duré près d'un mois.

2.2 Matériel non biologique

2.2.1. Les ruches d'abeilles

Nous avons évalué l'application du chitosane sous forme de membrane et de gel chez un apiculteur situé au niveau de la Province de Oued El Alleug, wilaya Blida. Mr Ouahib Ibrahim nous a permis d'appliquer le traitement sur 10 de ses ruches, chaque ruche contenant 10 000 abeilles.



Figure 12: les ruches d'abeille (originale)

2.3. Méthodes

2.3.1. Extraction de la chitine

La matière première utilisée pour cette étude est l'exosquelette de crevette rouge, elles sont décortiquée à température ambiante, les carapaces sont ensuite lavées puis séchées à l'aire libre. Les fragments obtenus sont séchés à 100°C pendant 24 h puis broyés et triés sur tamis afin de séparer plusieurs tailles. Le broyage et le tamisage des fragments ont donné des particules d'un diamètre variant majoritairement entre : 0.1 mm et 0.5 mm.

L'extraction chimique consiste en une déminéralisation acide et une déprotéinisation basique



Figure 13: carapace de crevette prête à être sécher (originale)



Figure 14: broyage après séchage (originale)

A. Déminéralisation

La déminéralisation s'effectue en dispersant la matière première obtenue dans une solution d'acide chlorhydrique 1.5 M (1 :10) (m : v) sous agitation constante pendant 1 h à Température ambiante, la réaction produit un violent dégagement de gaz carbonique qui doit être maîtrisé en ajoutant graduellement la matière première ainsi que l'ensemble doit être ouvert. Théoriquement la réaction se termine lorsqu'il n'y a plus de dégagement gazeux. Le contenu est ensuite filtré sur papier whatman et rincé abondamment à l'eau distillée.



Figure 15: Chitine dans une solution acide (originale)



Figure 16: rinçage de la chitine à l'eau distillé (originale)

B. Déprotéinisation

Le résultat est introduit dans un flacon, dans le quelle est ajouté (1 :10) (m :v) d' NaOH (1.25M) à une température de 90°C pendant 18 h. Le contenu du flacon est à nouveau filtré et rincé abondamment à l'eau distillée

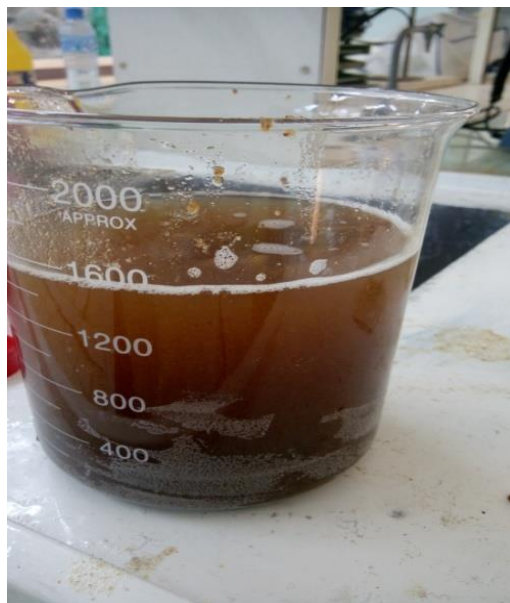


Figure 17: Chitine dans une solution basique (originale)

C. Blanchiment

Après le rinçage à l'eau distillée. Un autre rinçage avec un volume de 20 ml de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est réalisé pour faire blanchir le produit, ensuite un ultime rinçage à l'acétone permet d'entraîner les impuretés lipidiques résiduelles. Le contenu du flacon est à nouveau rincé abondamment à l'eau distillée et ce jusqu'à ce que le ph de l'eau du lavage atteigne la neutralité. Le filtrat est alors transféré dans une coupelle préalablement pesée qui sera par la suite placée en étuve à 30°C pendant 20 h et ensuite à 90°C pendant 12 h.



Figure 18: Blanchiment de la chitine (originale)

2.3.2. Obtention du Chitosane

Le chitosane a été obtenu par désacétylation de la chitine extraite par une solution de soude selon le mode opératoire suivant :

La chitine a été traitée avec une solution de soude à 50%, dont la proportion (m :v) (1 :10) ;

La solution est agitée pendant 24 h à 100°C.

La solution est ensuite filtrée, le chitosane retenu est lavé en continu, afin d'éliminer la soude résiduelle, et ce jusqu'à ce que le ph de l'eau du lavage atteigne la neutralité, le chitosane est rincé avec l'eau distillée puis séché à l'étuve à 80°C pendant 24h.



Figure 19: Chitosane obtenu au laboratoire (originale)

2.3.3. Caractérisation de la molécule du chitosane

A. Teneur en eau :

Pour estimer la part d'eau dans le produit, 1 à 2 g d'échantillon sont prélevés et pesés dans une coupelle de poids connu. Cette dernière est placée dans une étuve à 105°C pendant 24 heures, puis pesée après 30 min de refroidissement dans un dessiccateur.

La teneur en eau est évaluée selon la formule suivante :

$$\% \text{Humidité} = \frac{\text{poids de l'échantillon humide (g)} - \text{poids de l'échantillon sec (g)}}{\text{poids de l'échantillon humide (g)}} \times 100$$

B. Teneur en cendres :

Le principe de la détermination de la teneur en eau en minéraux sur leur résistance à la chaleur. Environ 1 g d'échantillon est pesé dans une feuille de papier en aluminium de poids connu, celle est repliée et placée au moins 5h à température égale 500 C °.

Après refroidissement, elle est de nouveau pesée, chaque mesure est répétée trois fois.

La teneur en cendres est évaluée selon la formule suivante[40] :

$$\% \text{ cendres} = \text{poids du résidu calciné (g)} / \text{poids de l'échantillon sec (g)} * 100$$

C. Test de solubilité :

Le chitosane obtenu est testé pour sa solubilité dans les milieux acide, basique et neutre. Selon Ngha et Fatinhan[], le test de solubilité est réalisé dans 5% (V/V) de l'acide acétique, 0,5 de NaOH et de l'eau distillée. On pèse environ 0,05g du produit, on y ajoute 50ml de ses trois solutions séparément, et on les laisse sous agitation pendant 24 heures [40].

D. Densité de la solution :

La densité de la solution est mesurée par un densimètre manuel selon les étapes suivantes

- Préparer une solution de chitosane 1% dans une solution d'acide acétique de 1%
- Remplir une éprouvette avec la solution à mesurer.
- Prolonger le densimètre délicatement sans lui faire toucher les parois de l'éprouvette.
- Laisser jusqu'à ce que le densimètre se stabilise.
- Lire la mesure où le liquide coupe l'échelle.

E. Caractérisation par UV- visible :

Une solution de chitosane de 1% a été préparée dans une solution d'acide acétique de 1%. Ensuite, un échantillon de cette solution a été balayé par un spectre UV- visible de 190 – 800 nm par le spectromètre UV- visible

F. Caractérisation par dosage pH-métrique :

Le dosage pH-métrique a permis de déterminer le pKa de l'échantillon de chitosane[41].

Il a été effectué selon les étapes suivantes :

- Solubilisation de 135 mg de cet échantillon dans 10ml de HCl 0,1 N ;
- Ajustement de volume de la solution obtenue à 200ml avec de l'eau distillée ;
- Titration de la solution, en l'agitant, avec une solution de NaOH 0,05N ;
- Mesure du pH de la solution après chaque ajout de NaOH

G. Mesure de degré d'acétylation :

Par dosage conductimétrique basique :

Le dosage conductimétrique a été effectué dans le but de déterminer le DA des différents échantillons du chitosane, selon les étapes suivantes [42] :

- Solubilisation de 200 mg de l'échantillon du chitosane dans 40 ml de HCl 0,054 M
- Ajustement du volume de la solution à 150 ml avec l'eau distillée
- Titration de la solution de chitosane, tout en l'agitant, avec une solution de NaOH 0,165 M par incréments de 0,5ml
- Mesure de la conductivité de la solution après chaque ajout du NaOH

Le calcul du DA se fait selon la formule suivante :

$$\%DA = \frac{[NaOH] \times (V_2 - V_1) \times PM_{C_6H_{11}O_4N}}{\text{masse chitosane}}$$

Ou [NaOH]= 0,165 M

P.M $C_6H_{11}O_4N$ = 161g / Mol (monomère)

Masse chitosane = 0,2g

V_1 = volume de NaOH utilisé pour neutraliser le HCl en excès (ml)

V_2 = volume de NaOH utilisé pour neutraliser le chitosane

Par dosage pH –métrique :

- Solubilisation de 100 mg de chitosane dans 3ml de HCl 0,3 M et 40 ml d'eau distillée sous agitation pendant 12 heures.
- Introduire l'électrode pH du pH-mètre dans la solution et vérifier que le pH de la solution de chitosane est inférieur à 3, sinon ajouter avec la pipette de l'HCl 0,3 M.
- Neutraliser l'HCl en excès par une solution de NaOH 0,1 M enfin d'obtenir un pH de l'ordre de 4,5 correspondants à pKa-2. Soit V1 ml le volume de NaOH versé.
- Continuer l'addition de NaOH pour obtenir un pH de 8,5 correspondants à pKa+1. Soit V2 ml le volume de NaOH versé (incluant le premier ajout V1).

Le degré d'acétylation est calculé selon la formule suivante:

$$\%DA = (1-162 \times Q) / (1+43 \times Q)$$

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

= nombre de moles de la fraction aminée du chitosane pour un échantillon de 1g.

M_{cs} : masse sèche de chitosane dans la prise d'essai, en g

$$V_{NaOH} = V_2 - V_1$$

= volume versé en ml de NaOH 0,1M

Par Infrarouge :

Le degré d'acétylation est déterminé à partir du spectre infrarouge en utilisant la formule de Khan et al:

$$\%DA = (A_{1655 \text{ cm}^{-1}} / A_{3450 \text{ cm}^{-1}}) \times 0,33/100$$

H. Mesure du poids moléculaire par le viscosimètre:

La mesure de la viscosité a été réalisée par utilisation d'un viscosimètre [42].

Selon la méthode de Mark-Houwink-Sakurada :

On prépare 50 ml d'un mélange de solution de chlorure de sodium NaCl (0,2 M) et d'acide acétique CH₃COOH (0,1 M) (50 : 50) (V ; V) puis on ajoute 0,4g de chitosane.

L'ensemble est mis sous agitation pendant 4h. Cette solution a une concentration de 0,08g/ml qui est utilisé pour préparer des dilutions.

On met la solution mère dans la cuve du viscosimètre puis on lit la valeur de la viscosité directement. On effectue les mêmes étapes pour l'ensemble des dilutions préparées. Finalement, on trace la courbe viscosité=f(concentrations du chitosane).

Le poids moléculaire viscosimétrique est calculé par l'équation de Mark-Houwink-Sakurada :

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Avec :

M_V : masse moléculaire moyenne viscosimétrique du polymère

K et α : sont les coefficients de Mark-Houwink dont les valeurs sont respectivement $1,81 \times 10^{-3}$ ml/g et 0,93 pour des solutions de chitosane préparées dans l'acide acétique 0,1M et NaCl 0,2M à température ambiante (20°C)

I. Caractérisation par FTIR :

La spectroscopie IR constitue une méthode de choix pour le suivi de la conversion de la chitine en chitosane. Nous pouvons ainsi mettre en évidence l'apparition de la disparition de certaines de façon très significative au cours de ces étapes de synthèse.

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR dans la plage de 400 _ 4000 cm^{-1} sur des pastilles de KBr (1mg chitosane ou/et chitine / 100 mg KBr). Avant d'effectuer le spectre, chaque échantillon a été étuvé à 50°C pendant 24 heures [43].

2.3.4. Préparation d'une membrane de Chitosane

Deux membranes a différentes concentrations de chitosane ont été préparé afin d'optimiser l'efficacité du traitement.

Nous avons prélevé 0.1g de chitosane qui a ensuite été dissout dans 10ml d'eau distillée, nous avons rajouté 0.1ml de solution d'acide acétique (1%). La solution obtenu a subit une agitation pendant 1h.la solution est verser dans une boite de pétrie à température ambiante et laisser sécher pendant 24h.

Pour la deuxième nous avons prélevé 0.15g de chitosane qui a ensuite été dissout dans 10ml d'eau distillée, nous avons rajouté 0.1 ml d'solution d'acide acétique (1‰).

2.3.5. Préparation d'un gel de Chitosane

Nous avons préparé neuf gels à base de chitosane associés à des complexes chimiques, tel que : glutéraldéhide, l'alginate de sodium et le pollen. Ces dernières présentes différentes concentrations. Cela dans le but de sélectionner le gel qui présentes les dosages les plus adaptés à la destruction du varroa.

Pour le premier gel : nous avons utilisé 20 mld'une solution d'acide acétiquea (1%), puis ajouter1g de chitosane, le tout agité pendant une heure.

Gel numéro deux nous avons utilisé 20 ml d'une solution d'acide acétique a (1%), mélanger a 0.4 ml d'une solution de glutéraldéhide a (25%), puis ajouter 1.09 g de chitosane, agitation pendant une heure.

Gel numéro trois nous avons utilisé 20ml d'une solution d'acide acétique a (1%), mélanger a 4.6 g d'alginate de sodium, puis ajouter un 1.12 g de chitosane, le tout agiter pendant une heure.

Gel numéro quatre nous avons utilisé 30ml d'une solution d'acide acétique (a 1%), mélanger a 1.52 g pollen, puis ajouter 1 g de chitosane, le tout agiter pendant une heure.

Gel numéro Cinq nous avons utilisé 20 ml d'une solution d'acide acétiquea (1%), mélanger a 0.45 g d'alginate sodium, 1.52 g de pollen, puis nous avons ajouté 1g de chitosane.

Gel numéro six nous avons utilisé 20 ml d'une solution de glutéraldéhide a (1%), puis nous avons ajouté une 1.3 g de chitosane.

Gel numéro sept nous avons utilisé 20 ml d'une solution d'acide acétique a (1%), mélanger a 0.45 g d'alginate sodium, 1 g de pollen, puis nous avons ajouté 1.6 g de chitosane

Gel numéro huit nous avons utilisé 20 ml d'une solution d'acide acétique a (1%), mélanger a 1.52 g de pollen, puis nous avons ajouté 1.5g de chitosane

Gel numéro neuf nous avons utilisé 20 ml d'une solution d'acide acétique a (1%), mélanger a 0.33 g d'alginate sodium, puis nous avons ajouté 1.5 g de chitosane.

Le stockage des gels à une température inférieur à 6°C a été fait, avant application sur les ruches.

2.3.6. Application de l'acaricide de chitosane sous forme de gel

Nous avons traité neuf ruches avec neuf gels à des concentrations de chitosane différentes et avec plusieurs agents gélifiants. Nos ruches était équipée d'un plateau anti varroas (fig 20). Afin de faciliter le comptage des varroas éliminer, le processus de dénombrement à été effectué selon les étapes suivantes :

On a d'abord appliqué cinq gel et attendu 24 h pour voir les résultats. Le traitement a été appliqué à une température de 25°C, afin d'éviter toute interaction avec la chaleur. Nous

avons continué a appliqué les quatre gels restants afin de sélectionné le gel qui présente les meilleur dosages chimiques.



Figure 20: Plateaux anti varroas (originale)

2.3.7. Application du traitement chimique l'amitraze

Nous avons préparé deux solution d'amitraze comme ceci :pour la premières solution nous avons pris 10 ml d'amitraze pure et ajouter a 1l d'huile alimentaire.

Pour la deuxième solution nous avons pris 6 ml d'amitraze pure et ajouter 1l d'huile alimentaire. Nous avons appliqué 6 gouttes par solution par ruche (le couvain).

2.3.8. Application du traitement biologique l'huile de moutarde

Nous avons appliqué 6 gouttes d'huile de moutarde par ruche.

CHAPITRE 3

RÉSULTAT ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSIONS

3.1. Extraction de la chitine

Nous avons obtenue 500g de chitine.

3.2. Obtention du Chitosane

Nous avons obtenu une quantité de 40g de chitosane de couleur blanchâtre.

3.3. Caractérisation physico chimique du chitosane

Après l'étape de l'extraction, le chitosane doit subir à quelques analyses physico-chimiques.

Parmi les analyses physico-chimiques de chitosane qui sont réalisées dans cette étape, la détermination de la teneur en eau et la teneur en minéraux (cendre)

Le résultats de deux caractérisations obtenues est regroupés dans le tableau 02

Tableau 02: La teneur en eau et en cendre de notre chitosane

Caractéristiques	Chitosane extrait
Teneur en eau (%)	11
Teneur en cendre (%)	2

A. Test de solubilité :

L'intérêt porté à la solubilité du chitosane est justifié par la nécessité de dissoudre la substance afin de faciliter les éventuelles de transformations chimiques.

Tableau 03: Test de solubilité de la chitine et du chitosane

Solution	Chitosane extrait	Chitosane commercial
Acide acétique	Soluble	Soluble
Eau	Insoluble	Insoluble
NaOH	Insoluble	Insoluble

Le chitosane est insoluble dans l'eau et dans les solvants alcalins concentrée ou diluée, cette insolubilité s'explique par la grande masse moléculaire de chacune de des chaines de polymères et aussi par la formation de liaisons hydrogène entre différents groupes fonctionnels portés par chacune des unités, par contre il est soluble en milieu aqueux acide grâce à la protonation de ses fonctions amine, son meilleur solvant est l'acide acétique.

La réaction de la solubilité :



B. Mesure de la densité :

Comme prévu suivant l'analyse de notre chitosane qui correspond la mesure de la densité et après la mesure on a trouvé que sa valeur est égale à 1, et vu que la densité d'un élastomère varie entre 0.86 et 1.8, donc on peut considérer notre chitosane comme un élastomère.

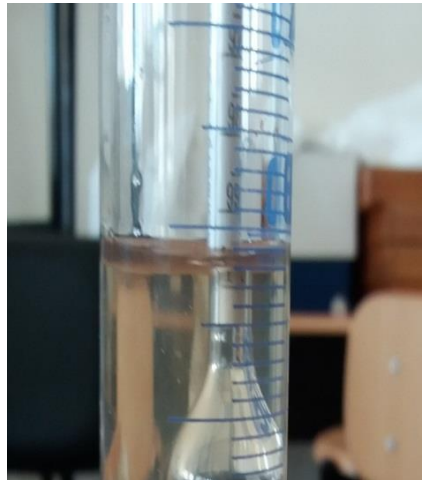


Figure 21: Valeur de la densité

C. Caractérisation par UV-visible :

Dans le But de connaître l'absorbance de notre chitosane, nous avons fait un balayage de 190 à 800 nm. Les résultats ont montré que réellement notre chitosane produit au niveau de laboratoire absorbe à une longueur d'onde égale à 297 nm.

Cette valeur est proche à 285 nm trouvé par Assad, 2006 [44]

La figure 22 présente la bande caractéristique de l'absorption du chitosane.

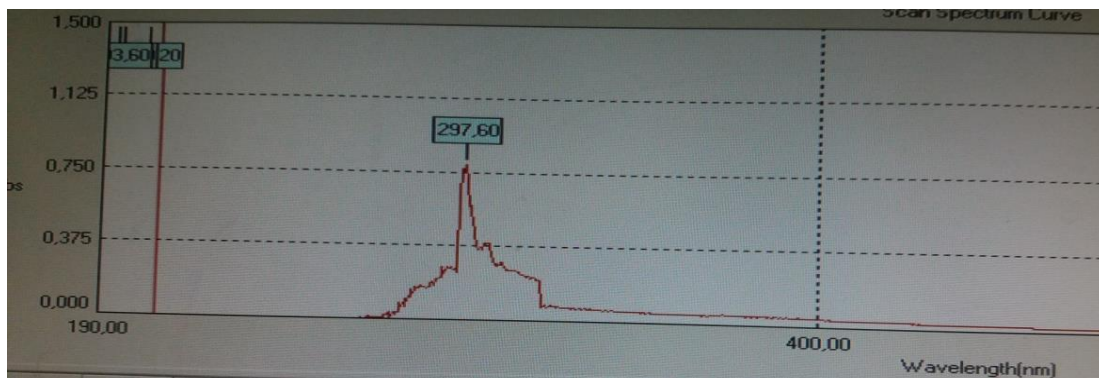


Figure 22 : Spectre UV-Visible du chitosane

D. Mesure de degré d'acétylation :

Plusieurs techniques ont été effectuées afin de déterminer le degré d'acétylation avec une plus grande précision. L'intérêt de calculer le degré d'acétylation est d'avoir une idée sur la solubilité de notre chitosane.

Nous avons déterminé le DA de notre chitosane par les trois méthodes suivantes :

Par dosage conductimétrique :

Nous avons choisi cette méthode car elle est considérée comme une méthode fiable, simple, et peu coûteuse comparée aux autres méthodes d'analyse, cette technique nécessite la protonation de l'échantillon de chitosane selon la réaction suivante :

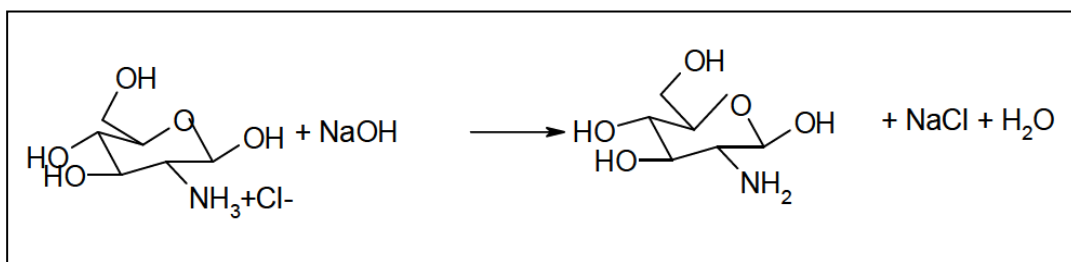


Figure 23 : Réaction de la protonation du chitosane

Les mesures du changement des conductivités permettent de tracer les courbes présentées dans la figure 24

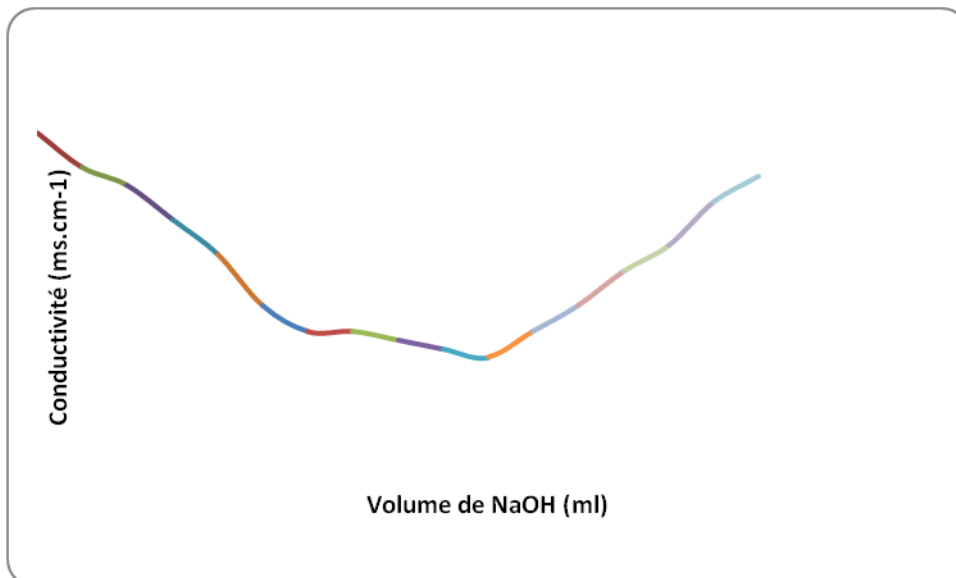


Figure 24 : Conductivité du chitosane en fonction du volume de NaOH

Cette courbe présente deux points d'inflexion. La différence de volume de NaOH entre ces deux points correspond à la quantité de HCl nécessaire pour protoner les groupements aminés de l'échantillon du chitosane, et elle contient trois segments :

- 1 pente descendante, ou le HCl en excès est neutralisé
- 1 pente redescendant faiblement, ou le chitosane déacétylé est neutralisé
- 1 redressement accru de la pente ou l'ajout de NaOH ne neutralise plus rien dans le système

Le %DA déterminé par cette méthode est égal à 26,5 donc le %DDA égal 73,5

Par Dosage pH métrique :

Le dosage pH métrique de la solution de chitosane par l'hydroxyde de sodium, nous a permis de déterminer le Pka du chitosane, qui est égal au pH correspondant au point de demi-neutralisation ou la concentration des groupements ($-\text{NH}_3^+$) est égal à la concentration des groupements ($-\text{NH}_2$) du chitosane.

La courbe obtenue correspondant au dosage de l'acide chlorhydrique utilisé pour la dissolution du chitosane par l'hydroxyde de sodium est présentée dans la figure 25

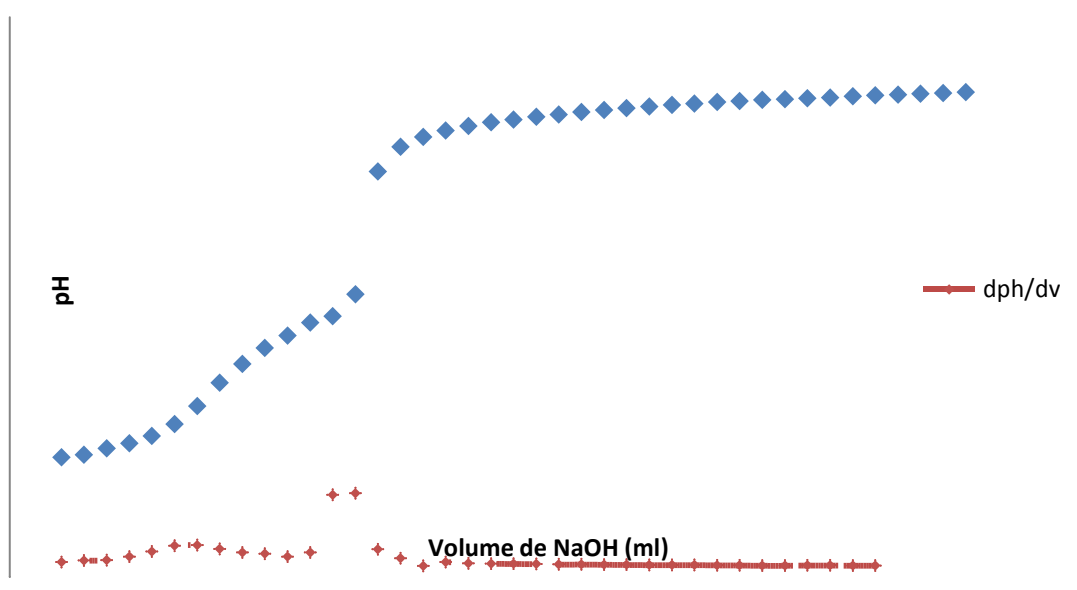


Figure 25 : Courbe de dosage pH- métrique du chitosane

D'après le graphe on peut repérer deux zones, la première partie correspond au dosage de l'excès d'acide chlorhydrique. La seconde correspond au dosage des fonctions amines ($-\text{NH}_3^+$) qui se déprotonent au fur à mesure de l'ajout du titrant (NaOH).

Le PKa est déterminée graphiquement selon la méthode numérique qui calcule la dérivé (dpH /dV) de la fonction pH=f(V) par ordinateur, cette méthode donne avec rescision l'ordonnée du point d'inflexion, dans notre cas le PKa = 6,5.

La valeur de PKa de notre chitosane se rapproche de celle qu'on a trouvé dans les travaux de FAREHAT MOURED, 2012 (PKA = 6,35) .

Cette méthode pH métrique nous a permet aussi de calculer le degré d'acétylation de notre chitosane en utilisant la valeur trouvé de PKa.

Le %DA = 30%

Le %DDA = 70%

❖ Par spectroscopie IR :

La spectroscopie infrarouge est un très puissant moyen de caractérisation qui nous a permet de déterminer la structure (groupements moléculaire) et le degré d'acétylation de notre chitosane.

La structure de chitosane obtenu :

Les spectres infrarouge sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR dans la plage de 400 – 4000 cm^{-1} sur des pastilles de KBr contenant notre chitosane et comparée au chitosane commercial.

Les résultats sont illustrés sur la figure 26

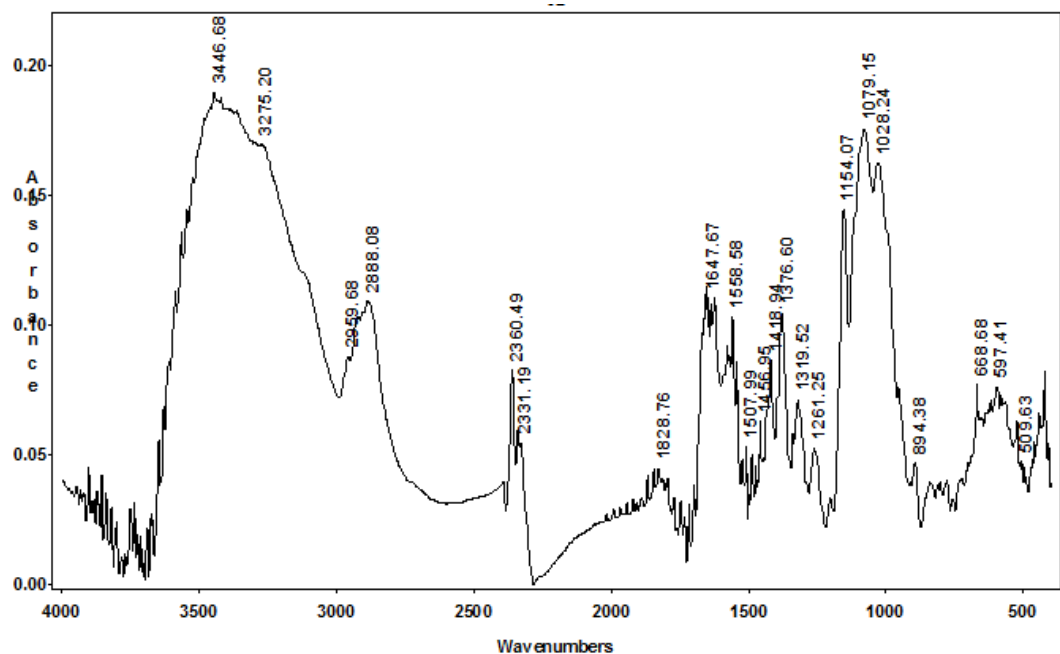


Figure 26 : Spectre IR du chitosane obtenus

Détermination du degré d'acétylation du chitosane obtenu :

Cette technique nous a permis de calculer le degré d'acétylation en utilisant l'intensité de la bande à 1655 cm^{-1} rapporté à l'intensité de la bande à 3450 cm^{-1} .

On a trouvé %DA égale à 35 % et donc %DDA = 65%.

Les résultats du degré d'acétylation et désacétylation obtenus par les trois méthodes précédentes sont présentés dans le tableau 04

Tableau 04: Les degrés d'acétylations (%DA) du chitosane

	Conductivité	pH métrie	Infrarouge
DA %	26,5	30	35,61
DDA%	73,5	70	64,39

La différence entre les DDA obtenues par les trois méthodes et due à l'erreur de la manipulation et aussi changement de technique.

D'après le tableau 5.4, on constate que le degré d'acétylation moyen est égal à 69,29% et qui est acceptable et compris entre 49,87% et 89% et supérieur à celui du chitosane commercial qui est égal à 55,77%

E. Détermination du poids moléculaire par viscosité :

Le poids moléculaire peut être déterminé par HPLC, toutefois le viscosimètre demeure une méthode simple et rapide pour connaître le poids moléculaire.

La variation de la viscosité réduite (η_{red}) en fonction de la concentration du chitosane selon Huggins et Kraemer est présentée dans la figure 27

Où la viscosité réduite s'agit du rapport de la viscosité spécifique sur la concentration en polymère dissout. (Avec la viscosité spécifique égale à la viscosité réelle (obtenu par le viscosimètre capillaire moins 1)).

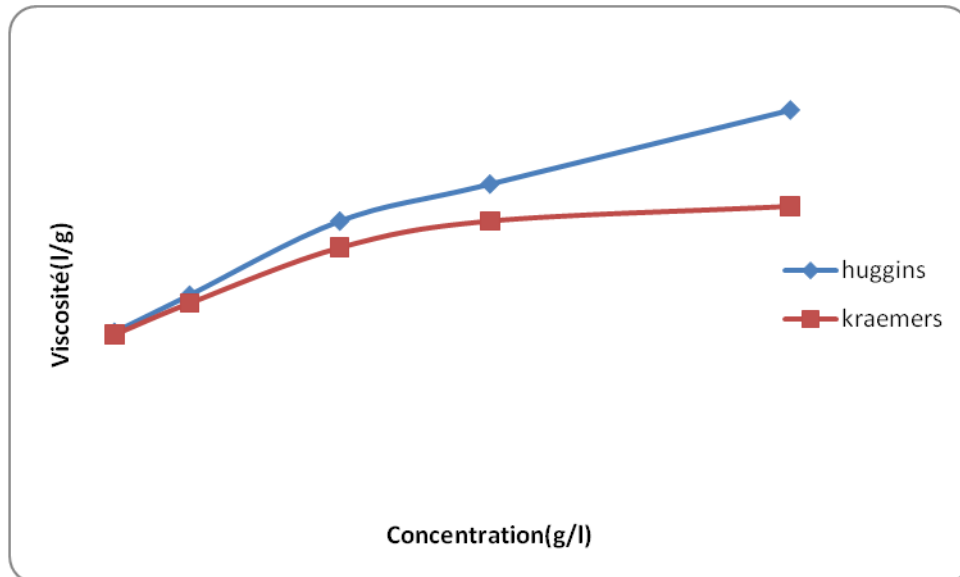


Figure 27: Variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration de chitosane à 20°C, selon Huggins et Kraemer

L'extrapolation à concentration nulle de la variation de η_{red} en fonction de C permet d'accéder à la valeur de la viscosité intrinsèque $[\eta]$, trouvée égale à 57,812 l/g.

A partir de cette valeur et de l'équation de Mark-Houwink, on peut calculer la masse molaire du chitosane : $[\eta] = kM^\alpha$

Dans cette relation, M représente la masse molaire moyenne viscosimétrique du polymère, k et α sont les coefficients de Mark-Houwink dont les valeurs sont respectivement $1,81 \cdot 10^{-3}$ g/l et 0,93 pour des solutions de chitosane préparées dans l'acide acétique 0,1 M / NaCl 0,2 M à 20°C.


La masse molaire de notre échantillon calculé est de 69 KDa, le poids moléculaire de notre chitosane est très faible par rapport au celui de [41]. qui ont trouvé le poids moléculaire compris entre 170 et 1221 KDa et c'est connue qu'il y a une relation directe entre le poids moléculaire et la viscosité.

3.4. Caractérisation d'une membrane de chitosane

A. Aspect de membranes préparées :

L'aspect de membranes préparées est présenté dans le tableau

Tableau 05: Aspect des membranes préparées

Membrane	Aspect
Chitosane	<ul style="list-style-type: none"> - Lisse - Flexible - souple - couleur jaunâtre transparente 

3.5. Préparation de la membrane de chitosane

Les membranes on était testé dans la ruche dans le but que l'abeille se nourrisse de ces derniers. Dans ce cas le chitosane agit par voie métabolique sur le varroa et le détruit. Dans notre présent travail, l'application du chitosane par le bai d'une membrane, n'a pas conduit à la destruction du Varroa. Cependant nous avons remarqué l'élimination des fausses teignes. Ces insectes s'attaquent aux rayons dont ils se nourrissent. Les larves des fausses teignes creusent des galeries dans les cadres de couvain et pollen qu'elles détruisent rapidement.

On a dénombré la destruction de 3 fausses teignes, qui on consommé la membrane de chitosane dans une ruche. Suite à ce résultat nous avons développé un autre mécanisme cette fois ci par contact direct d'un gel.



Figure 28: membrane à base de chitosane a des concentrations différentes (originale)

3.6. Préparation du gel de chitosane

Après obtention des gels à base de chitosane figure 29, une application au sein des ruches a été faite chez l'apiculteur figure30.



Figure 29: Gel à base de chitosane (originale) Figure 30: Gel appliqué au niveau du couvain
(originale)

3.7. Application acaricide du chitosane sous forme de gel :

L'évaluation de l'efficacité est présentée sous forme de histogrammes. Après chaque application des gels dans une ruche différente, nous avons dénombré les varroas éliminés ainsi que les abeilles mortes. L'histogramme ci-dessous démontre que les gels numéro 02 et 09 présentent les meilleurs résultats avec 160 et 155 de varroas éliminés respectivement. Les gels 03 et 07 ont permis d'éliminer 60 et 57 varroas respectivement. Les gels 01, 04,

05, 06, 08 ont permis une destruction inférieure à 25 varroas. Cependant il faut souligner qu'aucun gel à base de chitosane n'a conduit à la mort des abeilles.

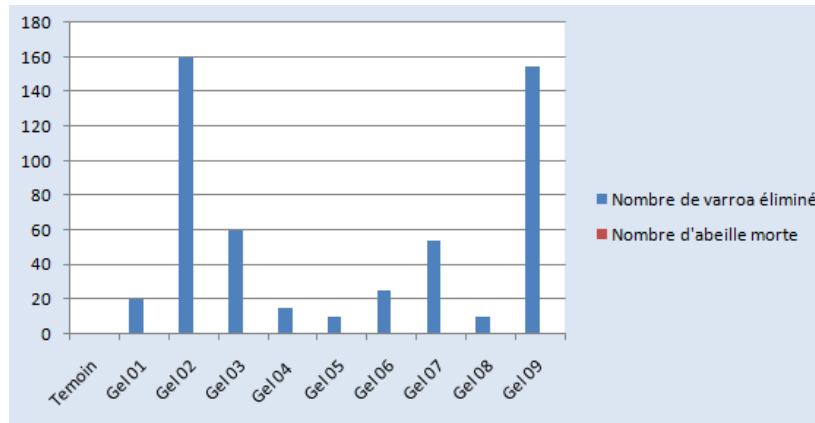


Figure 31: Le nombre de varroa éliminé par gel de chitosane

3.8. Application du traitement chimique l'amytraze

On ce qui concerne la première solution d'amytraze, on a eu 330 varroas éliminer et 590 abeilles mortes.

La deuxième solution nous a éliminé 273 varroas et a tué 54 abeilles.

Mais conséquence néfaste de l'amytraze on était observé à moyen terme, car les abeilles continue de mourir au fil du temps et a long terme conduit a la disparition totale de la ruche.

3.9. Application du traitement biologique l'huile de moutarde

La solution d'huile de moutarde a pu tuer 154 varroas et 00 abeilles mortes.

3.10. Evaluation de l'efficacité du traitement du Chitosane

Nous avons comparé le traitement par gel à base de chitosane par rapport aux traitements à base d'amytraze et d'huile de moutarde.

L'application de l'amytraze dans la ruche a conduit à l'élimination de 333 varroas ce qui représente pratiquement le double de varroas éliminé par rapport à l'élimination sous forme de gel à base de chitosane. Nous avons observé la perte de 590 abeilles, ce qui correspond à un tiers du nombre d'abeilles dans certaines ruches. Cette comparaison est sous forme de l'histogramme ci-dessous.

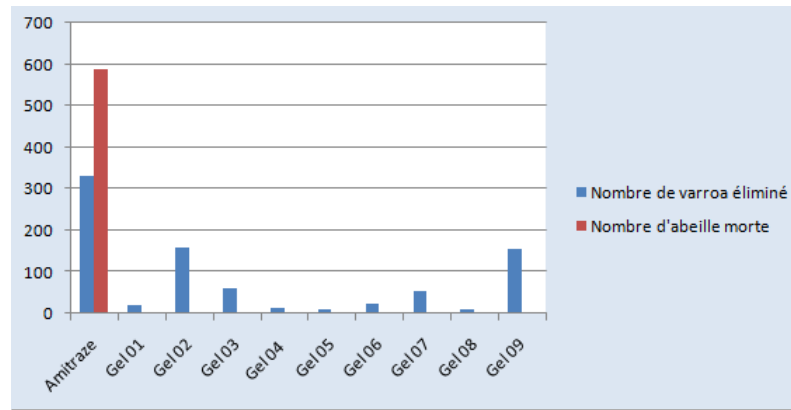


Figure 32 : Le nombre de varroa éliminé par gel de chitosane et par l'amitraze

L'application de l'huile de moutarde dans la ruche a conduit à l'élimination de 140 varroas ce qui représente pratiquement le même nombre de varroas éliminé sous forme de gel à base de chitosane. Nous n'avons observé aucune perte abeilles après traitement. Cette comparaison est sous forme de l'historgramme ci-dessous.

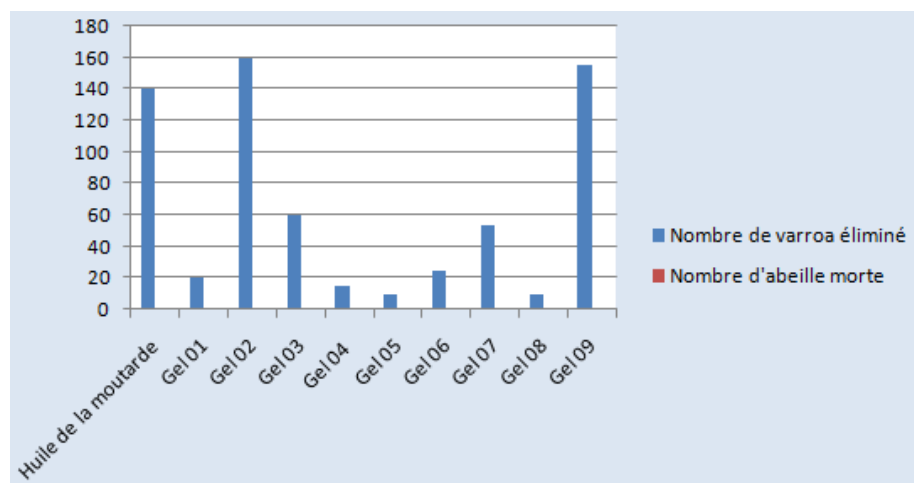


Figure 33 : Le nombre de varroa éliminé par gel de chitosane et par l'huile de moutarde

Discutions

Notre gel n'a fait aucun dégât sur la ruche, le nombre de mortalité des abeilles suite au traitement biologique à était nul, avec un taux de mortalité de varroa de 162. Contrairement au traitement chimique l'amitraze qui lui malgré un taux de mortalité de varroa de 333 a détruit plus de 590 abeilles. Alors que l'huile essentielle a eu un taux de mortalité de varroa de 140 et un taux de mortalité d'abeille nul.

Nous pouvons estimer le niveau de l'efficacité de notre gel à (50%)

Parmi les avantages majeurs d'un traitement biologique, contrairement à un traitement chimique comme l'amitraze qui inhibe l'invertase, et oblige l'apiculteur à le synthétiser pour que l'abeille puisse transformer le nectar en miel

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

On évalue la valeur économique de la pollinisation mondiale entre 30 et 73 milliards d'euros par an, la diminution du nombre d'abeilles pourrait entraîner de graves répercussions pour le secteur agricole. Le plus grand responsable de la disparition des abeilles est le parasite acarien Varroa

Le traitement biologique sous forme de gel réalisé dans notre laboratoire, a éliminé le varroa sans conséquence néfaste pour l'abeille, aucune mortalité n'a été observé ni aucune perturbation du comportement de l'abeille. Avec un taux d'efficacité de 50% par apport au traitement chimique ou on a noté 1/3 de la perte de la ruche

Les autres traitements biologique a base d'huile essentiels agissent par diffusion, les abeilles peuvent donc développées une résistance au traitement

Le chitosane est disponible, de faible cout et ajouter a cela c'est une valorisation d'un déche

Perspectives

Avec une recherche plus approfondie on pourrait envisager une amélioration du taux d'efficacité du traitement avec un dosage optimal de chitosane.

Les apiculteurs Algériens, pourrai bénéficier de ce traitement dans la lutte contre le varroa, car il présente aucun danger ni pour la ruche ni pour la santé public. On pourrait envisager aussi une prolongation du traitement tous au long de l'année pour obtenir la meilleur la période de traitements et sa durée.

La Connaissance du mécanisme du gel sur le varroa et de la membrane sur la fausse teigne serai découverte intéressante pour explorai d'autres traitements.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

[1] ENVIRONNEMENT PLANÈTE VERTE HUBERT REEVES et son équipe
Coordination: Nelly (Ligue Roc) opinions@canoe.com

[2] Faucon JP, Drajnudel P, Fleché C., Mise en évidence d'une diminution de l'efficacité de l'apis-tan utilisé contre la varroase de l'abeille. *Apidologie* 26 : 291-6. (1995)

[3] LE CONTE Y, *L'abeille dans la classification des insectes . Abeilles & Fleurs* n° 628, pp15-16. (2002)

[4] Karl von Frisch, *Le langage de la danse et l'orientation des abeilles* [« Tanzsprache und Orientierung der Bienen »], Berlin, Springer Verlag, (1965)

[5] BIRI M.. Tout savoir sur les abeilles et l'apiculture. Edition De Vecchi, Paris, 13-101. (2010)

[6] WINSTON ML. La biologie de l'abeille. Traduit de l'anglais par G. LAMBERMONT. Edition Frison Roche, Paris. (1993)

[7] VON FRISCH K.. Vie et mœurs des abeilles. Editions Albin Michel, Paris, 21-66. (2011)

[8] DONZE G., FLURI P. et IMDORE A., a- un si petit espace , une si grande organisation : la reproduction de varroa dans de couvain operculé de l'abeille . *Revue suisse de l'Apiculture* (12) :11-18. (1998)

[9] NAS, : Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards, Natinal Academy of Sciences, Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, Board on Environmental Studies and Toxicology and National Research Council, National Academies Press, ISBN: 0-309-59489-8, 176 pp. (1991)

[10] BERTRAND F. Les maladies de l'abeille domestique (*Apis mellifica*) et leurs conséquences sanitaires en France. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon, 187 p. .(2003).

[11] P12 (N° JORA : 012 du 05-03-1995) (Art.2).

[12] Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE). (Page consultée le 23 mars 2013). Maladies, infections et infestations de la Liste de l'OIE en vigueur en 2013 [en ligne]. Adresse URL : <http://www.oie.int/fr/santeanimale-dans-le-monde/maladies-de-la-liste-de-loie-2013>.

[13] LHOMME M. *Varroa jacobsoni* (Oudemans 1904) : morphologie, biologie et étude spécifique du système respiratoire et du comportement. Thèse de Doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes, 85p. (1990).

- [14] TREILLES M.. Utilisation d'huiles minérales dans la lutte contre *Varroa destructor*(Anderson et Truman, 2000) parasite de l'abeille. Thèse de Doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes, 71p(2002)
- [15] Coline fernandez 2007 la varroase.rev.sci.tech.off.int.Epiz
- [16] DE RUIJTER .A Reproduction of *VarroaJacobsoni* during successive brood cycles of the honeybee.Apidologie, 18, 321-326(1987).
- [17]BOOT WJ, CALIS JNM, BEETSMA J Does time spent on adult bees affect reproductive success of *Varroa* mites? Entomol. Exp. Appl., 75, 1-7. (1995).
- [18] Internationales Symposium überBienenbiologieund -pathologie. OberurselBadHomburg. Apimondia, Bucarest, 1980, 1981
- [19] La varroase, maladie de l'abeille mellifique. Apimondia, Bucarest, (1977).
- [20] Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., Kilchenmann, V. et Bogdanov, S. (2001), Study of acaricide stability in honey ; Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(12), 5835-5842,
- [21] BOGDANOV S., CHARRIÈRE J.-D., IMDORF A., KILCHENMANN V., FLURI P. Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions. Apidologie. 33 : 399-409. (2002).
- [22] FERNANDEZ N., COINEAU Y. *Varroa*, tueurs d'abeilles. Bien le connaître, pour mieux le combattre. Edition Atlantica, Biarritz, France, 237p(2002).
- [23] RADEMACHER E., HARZ M. Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies – areview.Apidologie. 37 : 98-120(2006).
- [24]WENDLING S.. *Varroa destructor*(ANDERSON et TRUEMAN, 2000), un acarien ectoparasite de l'abeille domestique *Apis mellifera*LINNAEUS, 1758. Revue bibliographique et contribution à l'étude de sa reproduction. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Créteil, 190 p. (2012)
- [25]Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (Page consultée le 16 novembre 2012). Index des Médicaments vétérinaires autorisés en France [en ligne]. Adresse URL : <http://www.ircp.anmv.anses.fr/>
- [26] EGUARAS M.J., FUSELLI S., GENDE L., FRITZ R., RUFFINENGO S.R., CLEMENTE G., GONZALEZ A., BAILAC P.N., PONZI M.I. An in vitro evaluation of *Tagetesminuta*essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaeraapis*, and the parasitic mite(2005).
- [27] RUFFINENGO S.R., MAGGI M.D, FAVERIN C., GARCIA DE LA ROSA S.B., BAILAC P., PRINCIPAL J., EGUARAS M. J.. Essential oils toxicity related to *Varroa*

destructor and *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Zootecnia Tropical*. 25 (1) : 63-69(2007)

[28] DAMIANI N., GENDE L.B., MAGGI M.D., PALACIOS S., MARCANGELI A., EGUARAS M.J.. Repellent and acaricidal effects of botanical extracts on *Varroa destructor*. *Parasitol. Res.* 108 : 79-86. (2011)

[29] MAGGI M.D., RUFFINENGO S.R., GENDE L.B., SARLO E.G., EGUARAS M.J., BAILAC P.N., PONZI M.I. a. Laboratory evaluations of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry Essential oil against *Varroa destructor*. *Journal of Essential Oil Research*. 22 (2) : 119-122. (2010)

[30] Obituary. Felix Hoppe-Seyler», in: *Br Med J.*, 1895 September 14; 2(1811): 687–688

[31] Rinaudo, M.. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, Vol. 31, pp. 603–632. (2006)

[32] Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A.,. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polym.*, 44: 7939- 7952. (2003)

[33] suyatma N. E Développement des films biodégradables à base de chitosane : Etude du Mélange Chitosane/PLA, de la plastification et de la comptabilisation Thèse de doctorat. Université de REINS-CHAMPAGNE. ,(2006)

[34] Crini, G., Badot, P.M., Guibal E. (Eds.), *Chitine and Chitosane* (in French), Presses Universitaires de Franche-Comté (France), Besançon, 2009, p. 307

[35] Chatelet, C., O, Damour, and A. Domard, {Influence of the degree of acetylation on some Biological properties of chitosan film} , *Biomater* ,, 22 (2001)261-268.

[36] Shahidi F., Abuzaytoun R. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.* , 49: 93-135(2005).

[37] Zemmouri H. Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux. Mémoire de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole Nationale polytechnique, Alger, Algérie. (2008).

[38] www.vignevin-sudouest.com/publications/fiches-pratiques/chitosane.php institut français de la vigne et du vin

[39] mellifère *Apis mellifera* - Editions France Agricole

[40] Gririfa Soufyane et Bourkaib Camilia, Formulation d'une suspension médicamenteuse à libération prolongée , Master en génie des procédés , Spécialité Génie chimique , Université de Blida 1 (2015/2016)

[41] Ferhat mourad ; Co-adsorption des métaux lourds sur la bentonite modifiée en présence de flocculants minéral et biologique ; mémoire de magister Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou 2012 ;

[42] La transformation de carapaces de crevettes en chitosane ; Rapport Intermédiaire- Groupe 1A ; Université de Sherbrooke ; 2015

[43] Meriem Keddou; Elaboration,caractérisation et application de membranes polymères à base de chitosane ; Mémoire de Magister Université M'Hammed Bougara 2008

[44] Elias Assaad; Etude du processus de coagulation-floculation du système montonorillonire-chitosane dans l'élimination de métaux de transition ; Université du Québec à Montréal

Annexe

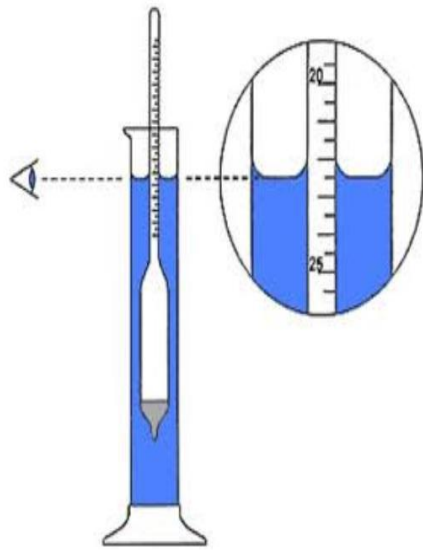


Figure 20: Principe du densimètre.



Figure22: Spectromètre UV-visible.



Figure 21: Mesure de la densité.



Figure 23: spectroscopie FTIR



Figure 24 : Mesure de pH de la solution du chitosane.

