



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies & Agro-Ecologie

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

**Extraction de la chitine à partir d'un orthoptère
pour des applications médicales et cosmétiques**

Présenté par : ZEMOUR Fatima Zahra et GHORAF Amina

Devant le Jury :

<i>Mme ZEROUTI</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV/USDB1</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme BENAZOUZ F</i>	<i>MAA</i>	<i>SNV/USDB1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme DJAZOULI F/Z</i>	<i>PROFESSEURE</i>	<i>SNV/USDB1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme ALILECHE R</i>	<i>MRB</i>	<i>CRAPC</i>	<i>Co-Promotrice</i>

Session 2021 / 2022

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail :

A ma tendre mère SORAYA et mon cher père MOHAMED

A ma sœur : IMENE

A mon frère : SIFOU

Spécial dédicace à : ma chère binôme AMIRA

A Tous mes amis d'enfance et du long parcours scolaire et universitaire.

Amina...

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail avec une grande fierté à tous ceux qui me sont chers :

*A mes chers parents : ma mère **Djamila** et mon père **Ahmed** pour leur amour, leur tendresse, Et pour leur soutien durant toutes les étapes de ma vie. J'espère qu'un jour, je pourrai leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que Dieu leur prête tout le bonheur.*

*A mes chers frères : **Mouhamed** et **Adem** et mes belles sœurs **Ratiba** et **Nour el houda** et **Djazia** puisse Dieu vous donner santé, bonheur et réussite.*

*A ma chère et belle binôme : **Amina**
qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail.*

*A toute mes chères amies
Merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.*

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail .

Enfin à tous ceux que j'aime et qui m'aiment .

Amira « Fatima Zahra »

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions « الله » qui nous a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements

À notre promotrice **Pr Mme DJAZOULI ALIM FZ** pour la confiance qu'elle nous a accordée en Acceptant cet encadrement pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire et pour son aide, Ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous tenons aussi à remercier notre Co promotrice **Dr ALILECHE** pour nous avoir dirigé et orienté dans la réalisation de ce mémoire.

*Nos remerciements vont aux membres du jury **Mme ZEROUTI et Mme BENAZOUZ** qui Nous ont fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.*

Nous voudrions remercier aussi les ingénieures du laboratoire **PFE** faculté SNV, université de Blida 1 pour leurs patiences, leur aide précieuse et ses valeureux conseils.

Et n'oubliez pas de remercier **Mr BELLATRECHE** pour son soutien et son aide.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce travail.

RESUMÉ

Dans cette étude la chitine a été isolé à partir de l'exosquelette, de deux arthropodes : crevette et criquet et la plume d'un mollusque : le calamar. Dans un premier temps la matière première a subi une déminéralisation à l'HCl. Une déprotéinisation chimique a été suivi à l'NaOH ou enzymatique à la protéase. Le rendement massique d'extraction par voie chimique le plus élevé de la chitine a été obtenu à partir de 24,48 % (plumes de calamars). Pour les crevettes et les criquets, les rendements massiques de chitine étaient respectivement de 12 % et de 8,75 %. Le rendement le plus élevé est à l'hydrolyse enzymatique (30%). La chitine extraite a été caractérisée par deux analyses : FTIR, qui nous a montré que la chitine des crevettes et des criquets est de type alpha par contre la chitine des calamars est de type beta, cette technique nous a permis aussi de calculer le DDA et le DA des chitines extraites. Le degré d'acétylation (DA), était de 59,75 % pour les crevettes, 64,03 % pour les plumes de calamars et 60,69 % pour les criquets. Le deuxième analyse c'est le microscope électronique à balayage (MEB), qui nous a montré que la structure de la chitine extraite par les crevettes est granuleuse et un peu fibreuse, et la chitine extraite à partir de plume de calmar a une structure fibreuse, et par rapport à la chitine de criquet sa structure est caractérisée par la présence des nanofibres et des granules et des pores.

La chitine a été transformée par la suite en chitosane par la réaction de désacétylation. Par ailleurs, des tests anti-microbiens ont été effectués par des dilutions de chitosane sur : E.coli, staphylococcus aureus, et le champignon aspergillus. Les résultats ont montré des zones d'inhibition sur E. coli et staphylococcus aureus et pas sur le champignon aspergillus.

En conclusion, notre travail a permis de mettre en évidence que le criquet constitué une bonne source de chitine qui peut être exploitée dans les recherches des bioproduits anti-microbiens.

Mots clés : Chitine, chitosane, exosquelette, criquet, crevette, plume de calamar, activité antimicrobienne, FTIR, MEB.

ABSTRACT

In this study the chitin was isolated from the exoskeleton, from two arthropods: shrimp and cricket and the feather of a mollusc: the squid. At first the raw material underwent a demineralization with HCl. Chemical deproteinization was followed with NaOH or protease enzymatic. The highest chemical mass extraction efficiency of chitin was obtained from 24.48% (squid feathers). For shrimp and locusts, the mass chitin yields were 12% and 8.75%, respectively. The highest yield is enzymatic hydrolysis (30%). The extracted chitin was characterized by two analyses: FTIR, which showed us that chitin of shrimp and locusts is alpha type whereas chitin of calamari is beta type, this technique also allowed us to calculate the DDA and DA of the extracted chitines. The degree of acetylation (DA) was 59.75% for shrimp, 64.03% for squid feathers and 60.69% for locusts. The second analysis is the scanning electron microscope (SEM), which showed us that the structure of chitin extracted by shrimp is granular and a bit fibrous, and chitin extracted from squid feather has a fibrous structure, and compared to chitin cricket its structure is characterized by the presence of nanofibres and granules and pores.

Chitin was subsequently converted to chitosan by the deacetylation reaction. In addition, anti-microbial tests were carried out by dilutions of chitosan on: E.coli, staphylococcus aureus, and the fungus aspergillus. The results showed inhibition zones on E. coli and staphylococcus aureus and not on the aspergillus fungus.

In conclusion, our work has shown that cricket is a good source of chitin that can be used in research on anti-microbial bioproducts.

Keywords: Chitin, chitosan, exoskeleton, cricket, shrimp, squid feather, antimicrobial activity, FTIR, MEB.

ملخص

في هذه الدراسة، تم عزل الكيتين من الهيكل الخارجي من مفصليين: الجمبري والجراد وريشة الرخويات: الحبار في البداية، خضعت المادة الخام لنزع المعادن باستخدام حمض الهيدروكلوريك. تبع نزع البروتين الكيميائي بواسطة هيدروكسيد الصوديوم أو الأنزيمي بالبروتياز.

تم الحصول على أعلى إنتاج كيميائي للكتلة من مادة الكيتين من 24.48% (ريش الحبار) بالنسبة للجمبري والجراد، بلغ إنتاج الكيتين الكتلي 12% و8.75% على التوالي. وأعلى عائد يكون مع التحلل المائي الأنزيمي (30%).

تميز الكيتين المستخرج بتحليلين: FTIR الذي اظهر لنا ان الكيتين المستخرج من الجمبري من نوع الفا ومن ناحية أخرى فان الكيتين في الحبار من نوع بيتا. وهذه التقنية سمحت لنا أيضاً بحساب: DA و DDA للكيتين المستخرجة. كانت درجة الاستلة للجمبري : 59.75% و60.69% لريش الحبار و60.69% للجراد.

التحليل الثاني هو المجهر الإلكتروني الماسح (MEB) ، والذي أظهر لنا أن هيكل الكيتين المستخرج من الجمبري محبب وقليل من الألياف، وأن الكيتين المستخرج من ريش الحبار له هيكل ليفي، ومقارنة بكيتين الجراد، فإن تركيبته تتميز بوجود ألياف نانوية وحببيات ومسام.

تم تحويل الكيتين لاحقاً إلى كيتوزان عن طريق تفاعل نزع الأسيتيل. بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء الاختبارات المضادة للميكروبات عن طريق تخفيف الشيتوزان على: *Staphylococcus aureus* ، *E. coli* ، وفطر *Aspergillus* . أظهرت النتائج مناطق التثبيط للإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية وليس على فطر الرشاشيات.

في الختام، جعل عملنا من الممكن تسليط الضوء على أن الجراد يشكل مصدرًا جيدًا للكيتين يمكن استغلاله في البحث عن المنتجات الحيوية المضادة للميكروبات.

الكلمات المفتاحية: كيتين، كيتوزان، هيكل خارجي، جراد، جمبري، ريش الحبار، نشاط مضاد للميكروبات، طيف الأشعة تحت الحمراء، المجهر الإلكتروني الماسح.

Table des matières

DEDICACES	
REMERCIEMENTS	
RESUME.....	A,B,C
LISTE DE FIGURES.....	I, II
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES ABREVIATIONS.....	IV
INTRODUCTION	01
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Sources naturelles de la chitine.....	03
II. Les insectes en tant que source naturelle de chitine.....	04
III. Les criquets en tant que sources de chitine.....	05
III.1. Cycle évolutif de criquet pèlerin.....	05
III.2. Anatomie de criquet pèlerin.....	06
IV. La cuticule en tant que source de chitine.....	07
IV.1. Composition biochimique de la cuticule.....	08
IV.2. Composition chimique de la chitine.....	09
V. Rôle de chitine chez les criquets.....	10
VI. Les applications de la chitine dans le domaine de santé.....	11
VI.1. Application dans le domaine médicale.....	11
VI.1.1. Action immunologique.....	11
VI.1.2. La cicatrisation des plaie.....	12
VI.1.3. Matériel de renforcement pour l'ingénierie tissulaire	13
VI.1.4. Action antimicrobienne.....	14
VI.1.5. Action anti-tumorale.....	14
VI.2. Application dans le domaine cosmétique.....	16
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	
I. Lieu et durée de la réalisation de la partie expérimentale.....	17
II. Modèle biologique.....	17
III. Modèle non biologique	17
IV. Méthodes d'étude.....	18
IV.1. Extraction de la chitine.....	18
IV.1.1. Méthode chimique.....	18
IV.1.1.1. Préparation du matériel brute.....	19
IV.1.1.2. Déminéralisation.....	19
IV.1.1.2.1. But.....	19
IV.1.1.2.2. Principe.....	19
IV.1.1.3. Déprotéinisation.....	20
IV.1.1.3.1. But.....	20
IV.1.1.3.2. Principe.....	20
IV.1.1.4. Blanchiment.....	20
IV.1.1.4.1. But.....	20
IV.1.1.4.2. Principe.....	21
IV.1.1.5. Déacétylation pour la production de chitosane.....	21
IV.1.1.5.1. But.....	21
IV.1.1.5.2. Principe.....	21
IV.1.2. Méthode biologique.....	22
IV.2. Observation de la texture de la chitine par le microscope électronique à balayage.....	23
IV.2.1. But.....	23

IV.2.2. Principe.....	23
IV.3. Caractérisation de la chitine par spectroscopie infrarouge (FTIR).....	24
IV.3.1. But.....	24
IV.3.1.1. Le degré désacétylation de la chitine (DDA%).....	24
IV.3.2. Principe.....	25
IV.4. Testes anti-microbiens.....	26
IV.4.1. But.....	26
IV.4.2. Principe.....	26
CHAPITRE III : RESULTATS DE L'EXTRACTION	
I. Extraction de la chitine et du chitosane.....	27
I.1. Aspect de chitine et chitosane.....	27
I.2. Rendements de la chitine et du chitosane à partir des matériaux brutes.....	27
II. Analyse spectroscopie infrarouge de la Chitine.....	30
II.1. Résultats d'analyse FTIR de chitine des crevettes.....	30
II.1.1. Interprétation.....	30
II.1.2. Calcul de degré de désacétylation de chitine des crevettes.....	31
II.2. Résultats d'analyse FTIR de chitine des plumes de calamars.....	31
II.2.1. Interprétation.....	31
II.2.2. Calcul de degré de désacétylation de chitine des plumes de calamars.....	32
II.3. Résultats d'analyse FTIR de chitine des Criquets.....	32
II.3.1. Interprétation.....	32
II.3.2. Calcul de degré de désacétylation de chitine des criquets.....	33
III. Analyse ultrafine de la texture tridimensionnelle du polymère de la chitine...	33
III.1. Carapaces de crevette.....	33
III.2. Plumes de calamar.....	34
III.3. Cuticule de criquet.....	36
IV. Activité antimicrobienne.....	37
IV.1. Activité antibactérienne.....	37
IV.2. Activité antifongique.....	40
CHPITRE IV : DISCUSSION DES RESULTATS	
I. L'extraction de chitine et du chitosane.....	41
II. Etude de résultats de spectre FTIR.....	42
III. Analyse ultrafine de la texture tridimensionnelle du polymère de la chitine.....	43
IV. Activité antimicrobienne du chitosane.....	44
Conclusion.....	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

Listes des figures

Figure 01 : le cycle biologique de Criquet pèlerin.....	06
Figure 02 : la durée de chaque stade de cycle biologique.....	06
Figure 03 : l'anatomie de criquet.....	07
Figure 04 : Représentations schématiques de la structure hiérarchique des cuticules chez les arthropodes et la structure multicouches de chitine.....	08
Figure 05 : structure chimique de la chitine.....	10
Figure 06 : Représentation des trois formes allomorphes de chitine dans la nature.....	10
Figure 07 : La chitine et ses effets sur les réponses inflammatoires et immunitaires.....	12
Figure 08 : Mécanisme d'action du chitosan métallique nanocomposite dans la cicatrisation des plaies.....	13
Figure 09 : Échafaudages de biocomposite à base de chitosane pour l'ingénierie des tissus osseux.....	14
Figure 10 : Les effets anti-tumoraux du chitosane.....	16
Figure 11 : Lavage et séchage des carapaces de crevette, des plumes de calamar et des criquets.....	18
Figure 12 : Les échantillons après broyage.....	18
Figure 13 : Déminéralisation.....	19
Figure 14 : déprotéinisation.....	20
Figure 15 : Aspect de la chitine des crevettes après blanchiment.....	21
Figure 16 : Désacétylation des trois échantillons.....	22
Figure 17 : Hydrolyse enzymatique des criquets.....	23
Figure 18 : Aspect du matériel brut obtenu après les réactions de déminéralisation, protéinisation et déacétylation pour l'obtention du chitosane.....	27
Figure 19 : Rendement massique de l'extraction de chitine.....	28
Figure 20 : Rendement massique de l'extraction de chitosane.....	29
Figure 21 : Rendement de la méthode chimique et la méthode biologique.....	30
Figure 22 : Spectre FTIR de chitine des crevettes obtenue par méthode Chimique.....	31
Figure 23 : Spectre FTIR de chitine des plumes de calamars obtenue par méthode chimique.....	32



Figure 24 : Spectre FTIR de chitine de criquets obtenue par méthode chimique..	33
Figure 25 : Micrographie électronique du polymère de la chitine des carapaces des crevettes.....	34
Figure 26 : Micrographie électronique du polymère de la chitine du calamar.....	35
Figure 27 : Micrographie électronique du polymère de la chitine de cuticules de criquet.....	36
Figure 28 : Culture de bactéries E. coli en A et staphylocoque en B avec les dilutions : 0.03%, 0.06%, 0.125% d'acide acétique, les flèches indiquent les zone d'inhibition.....	37
Figure 29 : Culture de bactéries E. coli en A et staphylocoque en B avec les dilutions : 0.03, 0.06, 0.125 % Chitosane /acide acétique.....	38
Figure 30 : Culture de avec les dilutions : 0.03, 0.06, 0.125 % Acide acétique, Chitosane /acide acétique.....	40



Liste des tableaux

Tableau 01 : les sources naturelles de la chitine.....	04
Tableau 02 : Quantités de chitine et de carbonate de calcium.....	07
Tableau 03 : Résultats de l'activité antibactérienne en mm effectué par l'acide acétique.....	39
Tableau 04 : Résultats de l'activité antibactérienne en mm effectué par l'acide acétique/ Chitosane.....	39



Liste des abréviations

CM-COS : carboxyméthylchitosan.

DDA : Degré de dés-acétylation.

DA : Degré d'acétylation.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier.

GlcNAc : N-acétyl-D glucosamine.

LTB4 : Leukotriene B4

M : Molarité.

MEB : Microscopie électronique à balayage.

MMP-2 : Matrix metalloproteinase-2.

MMP-9 : Matrix metalloproteinase-9.

N : Normalité.

Rdt% : Le rendement par %.

TSLP : La lymphopoïétine stromale thymique.

TNF α : facteurs de nécrose tumorale.

VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire.

INTRODUCTION

La découverte de la chitine est généralement attribuée à la fois à BRACONNOT Henri directeur du jardin botanique de Nancy en 1811 après isolement à partir de champignons supérieurs. le chitosane a été évoqué pour la première fois en 1859 par ROUGET lorsqu'il a porté à ébullition une solution de chitine avec de l'hydroxyde de potassium concentré [1].

Actuellement, les sources de chitine les plus courantes et les plus recherchées sont les mollusques (en particulier les crustacés) et d'autres invertébrés aquatiques. La quantité de mollusques et de crustacés disponibles est évidemment limitée par la quantité de déchets alimentaires qui est autorisée, c'est donc une ressource limitée. Par conséquent, les insectes sont les meilleurs choix puisque, sur 1,3 million d'espèces dans le monde, 900000 sont des insectes, ce qui en fait l'espèce la plus abondante au monde [2].

Il existe de nombreuses études de l'extraction de chitine sont été réalisées sur les carapaces de crevette et les plumes de calamars. Dans notre étude on a cherché à extraire la chitine à partir de criquet, Parce qu'il est souvent excédentaire aux criquets, surtout dans notre pays, et au lieu de la perdre, nous pouvons l'exploiter à notre avantage.

La chitine est très bien connue, Après la cellulose, la chitine est le biopolymère le plus répandu dans la nature [3,4].

La chitine et ses dérivés ont une grande valeur économique en raison de leurs activités biologiques [3]. Il a également trouvé de larges applications biomédicales telles que l'ingénierie tissulaire, l'administration de médicaments, le pansement des plaies, le diagnostic de cancer, etc. La majorité de ces applications polyvalentes viennent de sa non-toxicité, biocompatibilité et biodégradabilité [5].

La chitine et ses dérivés suscitent un grand intérêt pour les cosmétiques grâce à leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes [6].

La procédure pour la production de ce biopolymère comprend la déminéralisation et le processus de déprotéinisation, puis chitosane est produit par désacétylation de chitine [7].

L'objectif principal de cette étude est d'exploiter les criquets comme source principale de chitine car notre pays ainsi que les pays de l'Afrique du Nord sont menacés parfois par une probable invasion des criquets donc au lieu perdre le déchet pour

rien on a Cherché à extraire et de bénéficier de cette chitine et la comparer avec la chitine des crevettes et des calamars.

Ce travail s'organisera en 4 chapitres :

- Le premier chapitre fait l'état de la revue bibliographique concernant les sources naturelles de chitine en général et de criquets en particulier, Nous présenterons ensuite les différentes applications de chitine dans le domaine de la santé.
- Le deuxième chapitre présente le matériel et méthodes sur les criquets, les déchets de crevette et les plume de calmar, et aussi les expériences effectuées concernent Spectre FTIR et l'analyse ultrafine du chitine et l'activité antibactérienne et antifongique du chitosane.
- Le troisième chapitre représente les résultats de recherche (les tableaux, les graphes et les figures).
- Le quatrième la discussion que nous avons obtenue et à la fin on retrouve une conclusion ainsi que les perspectives préconisées pour cette thématique.

I. Sources naturelles de la chitine

Les arthropodes (crustacés, insectes, arachnides), comptant plus de 106 espèces qui constituent en particulier une source abondante de la chitine [8].

La chitine est un polymère, constituant le principal élément de l'exosquelette des invertébrés marins [4].

La chitine est présente par exemple dans les crevettes, les homards, les crabes, les langoustines, les calamars, les insectes (blattes, fourmis) ou encore les algues, les levures et les champignons [9].

Le pourcentage de chitine varie de 7 % chez le Barnacle (*Lepas anatifera*) et à 36 % chez les écrevisses (*Astacus fluviatilis*). Parmi les céphalopodes, l'os de seiche (*Sepia officinalis*) contient 20 % de α -chitine et le calamar (*Loligo vulgaris*) 40 % (voir Tab. 1). Chez les mollusques bivalves, l' α -chitine forme avec les protéines un complexe orienté de façon définie, distribué dans l'axe et sur le bord de la coquille. La chitine joue un rôle dans des forces mécaniques servant à intégrer les régions flexibles et à coordonner le changement au cours de la formation de coquille.

Chez les champignons, la chitine est rencontrée dans la membrane cellulaire. Elle est organisée sous forme de microfibrilles de 10-25 nm de diamètre, et de 2-3 μ m de longueur aléatoirement orientées. Ce biopolymère est lié par des liaisons covalentes avec d'autres polysaccharides tels que le glucane, formant ainsi un complexe chitine-glucane. Des études sur les basidiomycètes ont rapporté que la chitine constitue 8 à 19 % du mycélium, alors que le chitosane ne dépasse guère 1 %. La chitine est présente également dans le mycélium d'ascomycète *Aspergillus niger* (42 % de chitine et 11 % de chitosane). Chez le zygomycète, *Rhizopus oryzae*, le chitosane constitue 14 % alors que chez *Mucor rouxii*, le pourcentage est variable entre 8,9 et 35 %. Les estimations montrent que 3,2 x 10⁴ tonnes de chitine peuvent être produites annuellement dans la filière de la culture des champignons comestibles. Il faut retenir que la source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir des crustacés [9].

La production de la chitine et de chitosane provient, en effet, des crevettes et des crabes qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes en polymère. Ce sont donc des produits d'origine animale. Néanmoins, de nouvelles voies alternatives sont apparues comme par exemple la production de biopolymères à partir de cultures de moisissures (*Aspergillus niger*) [9].

Tableau 01 : les sources naturelles de la chitine [9].

Sources	Sites de presence	Chitine (%)
Arthropodes :		
➤ Crustacés (crevette)	➤ Exosquelettes,	
➤ Insectes	➤ cuticules	2-72
➤ Arachnides	➤ membranes	
Mollusque :		
➤ Seiche	➤ stomata	6-40
➤ Pieuvres /calmars	➤ plumes	
➤ Polyplacophores	➤ Tube	33
➤ Cnidaires	➤ Capsules d'oeufs,	3-30
	➤ membrane	
Annélides:		
➤ Sangsue	➤ Soies	0.2-38
➤ Lombric		
➤ Brachiopodes	➤ Cuticules,	4-29
	➤ coquilles	
➤ Champignons	➤ Paroi cellulaire,	/
	➤ tige,	/
	➤ spore	/
➤ Algues	➤ Paroi cellulaire	Faible

II. Les insectes en tant que source naturelle de chitine

Par « insectes », on entend des insectes à n'importe quel stade de développement, tel qu'un stade adulte, larvaire ou un stade de nymphe. De préférence, les insectes mis en œuvre dans le procédé selon l'invention sont comestibles. Plus particulièrement, les insectes peuvent être choisis parmi le groupe constitué par les coléoptères, les diptères, les lépidoptères, les orthoptères, les isoptères, les hyménoptères, les blattoptères, les hémyptères, les hétéroptères, les éphéméroptères et les mécoptères, de préférence, parmi les coléoptères, les diptères, les orthoptères et les lépidoptères [10].

Plus préférentiellement, les insectes sont choisis parmi le groupe constitué par *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens*, *Galleria mellonella*, *Alphitobius diaperinus*,

Zophobas morio, *Blattella fusca*, *Musca domestica*, *Chrysomya megacephala*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Acheta domesticus* et *Samia ricini*, et plus préférentiellement encore, *T. molitor* [11].

Une ou plusieurs espèces d'insectes peuvent être utilisées dans le procédé selon l'invention, de préférence une seule espèce d'insecte. Si plusieurs espèces sont utilisées, on choisira avantageusement deux espèces proches telles que par exemple, *Hermetia illucens* et *Musca domestica*.

Les insectes doivent être élevés et non prélevés de la nature. L'élevage des insectes dans une ferme spécifique permet non seulement de contrôler et d'éliminer les risques associés aux maladies véhiculées par des insectes, mais également de limiter les risques associés à la toxicité des produits alimentaires dérivés des insectes due par exemple à la présence d'insecticides. En outre, l'élevage permet de contrôler la qualité de l'approvisionnement en insectes et de limiter les coûts d'approvisionnement [10].

III. Les criquets en tant que sources de chitine

III.1. Cycle évolutif de criquet pèlerin

Le Criquet pèlerin, comme tous les autres acridiens, passe par trois stades successifs : l'œuf, la larve (ou nymphe) et l'ailé (voir Fig 01). Les œufs sont pondus par les femelles. Lors de l'éclosion, naissent de jeunes criquets dépourvus d'ailes, appelés larves. Les larves se débarrassent de leur cuticule cinq à six fois pendant leur développement et leur taille s'accroît à chaque fois. Ce processus s'appelle la mue et la période qui sépare deux mues successives s'appelle un stade. La dernière mue, du stade larvaire 5 (ou 6) dépourvu d'ailes à l'imago, ou ailé, s'appelle la mue imaginale. Le nouvel ailé, appelé « jeune ailé », doit attendre le séchage et le durcissement de ses ailes avant de pouvoir voler. Les ailés ne muent pas et leur taille ne s'accroît donc pas mais leur poids augmente progressivement. Les ailés qui peuvent voler sont, au départ, sexuellement immatures. Quand ils deviennent sexuellement matures, ils peuvent s'accoupler et pondre des œufs [11].

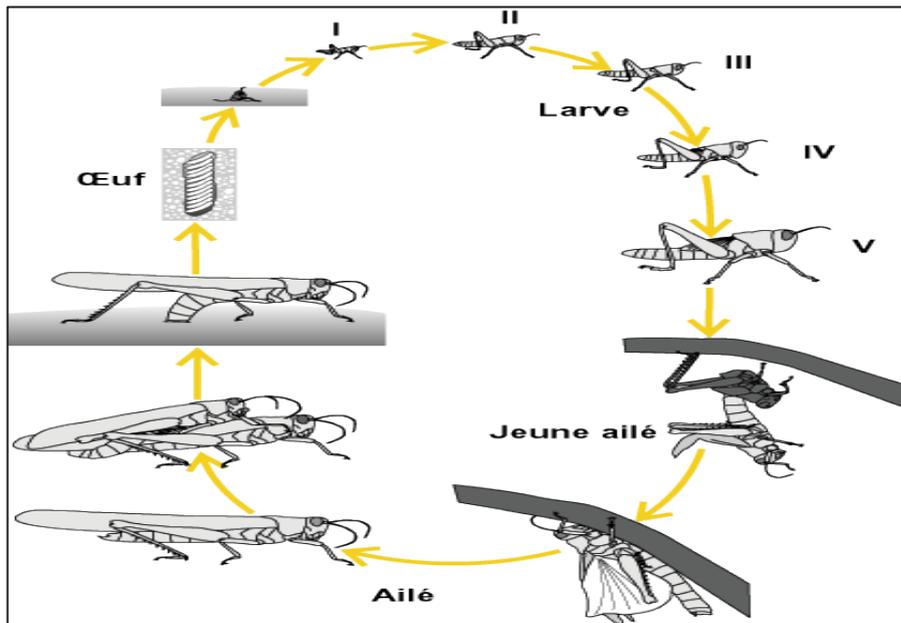


Figure 01 : le cycle biologique de Cricquet pèlerin [11]

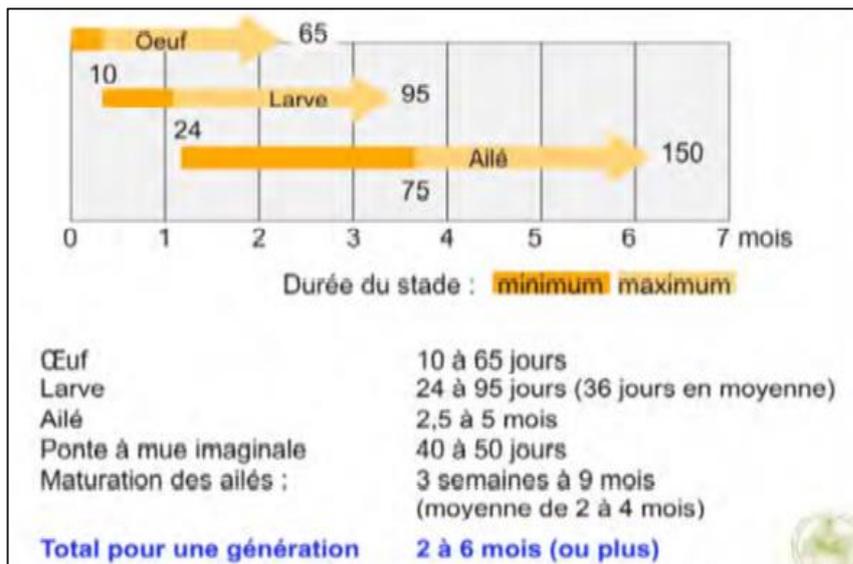


Figure 02 : la durée de chaque stade de cycle biologique [12]

III.2. Anatomie de criquet pèlerin

Chaque adulte mesure 70 mm de longueur environ (les mâles sont plus petits que les femelles) et pèse approximativement 2 grammes. Chez les insectes le corps comprend trois parties bien distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen [14].

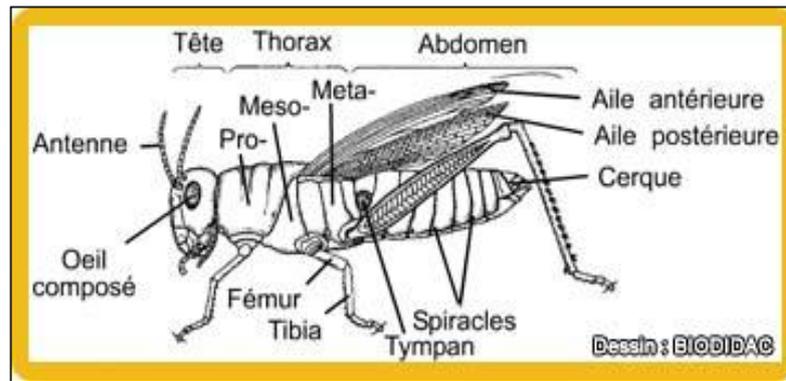


Figure 03 : l'anatomie de cricquet [14]

IV. La cuticule en tant que source de chitine

Les cuticules de crustacés sont constituées de chitine, protéines et minéraux (essentiellement le carbonate de calcium). Les proportions sont variables selon les espèces. Le tableau 2 illustre les quantités de chitine et de carbonate que l'on peut trouver selon la source. Les ressources traditionnellement exploitées pour extraire la chitine, sont composées de 15 à 40 % de chitine, 20 à 40 % de protéines et 20 à 50 % de carbonate de calcium (en poids sec). Pour une espèce donnée, la répartition est plus stable [15].

Tableau 02 : Quantités de chitine et de carbonate de calcium [15].

Source	Chitine (%)	CaCO ₃ (%)
Cuticule de crabe	15-30	40-50
Cuticule de crevette	30-40	20-30
Cuticule de bouquet	20-30	20-25
Plume de calmar	20-40	Négligeable
Coquille d'huître/ palourde	3-6	85-90
Cuticule d'insectes	5-25	Négligeable
Paroi de cellule fongique	10-25	Négligeable

IV.1. Composition biochimique de la cuticule

La cuticule est la composante la plus externe des insectes, elle couvre toute la partie externe du corps de ces invertébrés mais il est également présent dans certaines parties internes du corps des insectes, couvrant les invaginations ectodermiques, telles que la partie frontale, postérieure et le système trachéal.

La cuticule est composée de trois couches : Epicuticule, Exocuticule et endocuticule [17].

- L'épicuticule, qui est la couche la plus fine et la plus externe de la cuticule (inférieure à 4 μm) ; cette couche est imperméable à l'eau et comporte une couche de cire imperméabilisante, ainsi que des protéines et de la chitine, en quantité moindre.
- L'exocuticule, qui est la couche intermédiaire de la cuticule ; elle est composée essentiellement de protéines durcies, les tannées, qui sont responsables de la rigidité de la cuticule, de chitine et éventuellement de mélanine.
- L'endocuticule, qui est une couche fine, flexible, constituée d'un mélange de protéines et de chitine [10].

Ceux-ci diffèrent dans leur composition. L'exocuticule et l'endocuticule sont considérés comme une structure chitineuse alors que l'épicuticule ne contient pas de quantités importantes de chitine. En tout, il est estimé que la cuticule présente chez les insectes peut présenter environ 20 à 50% de son poids sec [17].

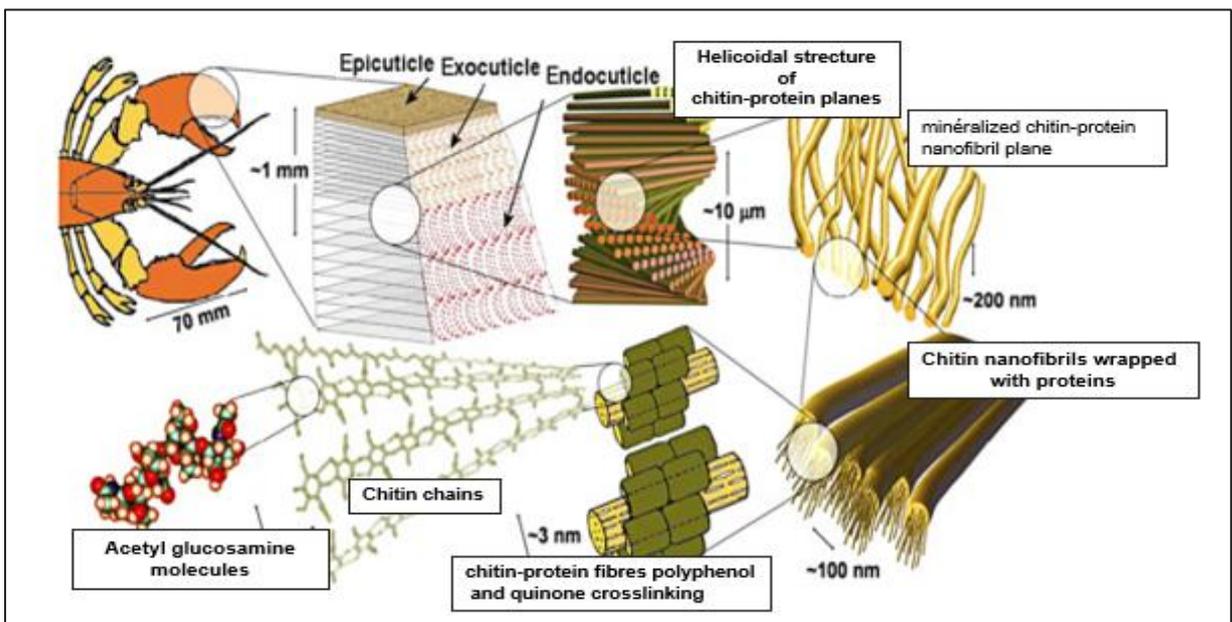


Figure 04 : Représentations schématisques de la structure hiérarchique des cuticules chez les arthropodes et la structure multicouche de chitine [17]

IV.2. Composition chimique de la chitine

La chitine ($C_8H_{13}O_5N$)_n est le deuxième biopolymère le plus abondant au monde, un polysaccharide polymérique à longue chaîne [5].

C'est un polymère constitué d'unités de répétition N-acétylglucosamine avec des liaisons β -(14) [18].

La présence des groupements acétamide confère à la chitine des fonctions biologiques telles que la biodégradabilité et la biocompatibilité, ce qui fait de la chitine un matériau fonctionnel de grande importance. La chitine est caractérisée par une composition similaire à celle de la cellulose. Elle possède également une grande stabilité structurale due à la présence de fortes liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires (Fig 05). Les principales caractéristiques d'un lot de chitine sont son degré d'acétylation et sa cristallinité. Ces paramètres sont importants car ils conditionnent un nombre important de ses propriétés.

La chitine présente trois formes cristallines, α , β et γ , qui diffèrent par l'arrangement de la chaîne polysaccharidique et par la disposition des liaisons hydrogène. L' α -chitine est la forme la plus stable. Elle est caractérisée par des chaînes antiparallèles constituant une structure cristalline régulière (Fig 06). Les liaisons hydrogène intermoléculaires confèrent au polymère une grande stabilité vis-à-vis des solvants et des solutions aqueuses. Cependant, l'utilisation de solvants spécifiques tels que le N, N-diméthylacétamide (DMAc) contenant de 5-10 % de LiCl et des solutions à base de fluorure hexafluoroacétone et hexafluoro-2-propanol favorise la solubilisation de l' α -chitine. Cette solubilité dépend également de la source du polymère.

Concernant la Beta-chitine, les macromolécules sont organisées sous un arrangement parallèle conduisant à des liaisons intermoléculaires de faible énergie. Dans ce cas les groupes N-acétyl jouent le rôle d'espaces, facilitant l'accès aux molécules d'eau, à des fins d'hydratation et de formation de gel. En opposition avec l' α -chitine, la Beta-chitine a une grande affinité pour les solvants organiques et l'eau. Elle se trouve essentiellement dans les épines des diatomées et l'endosquelette de seiche.

La Beta-chitine a été identifiée dans les cocons des insectes. Elle est principalement composée de 2 couches parallèles et 1 antiparallèle (Fig 06), sa force et sa résistance sont plus proches du type Beta, les groupes N-acétyl jouant le même rôle dans ces deux arrangements [8].

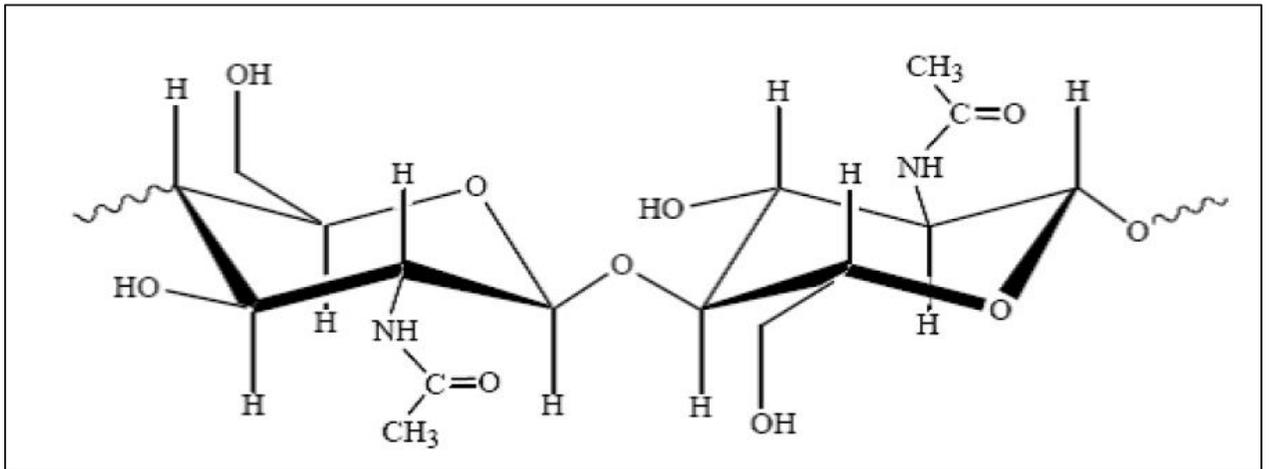


Figure 05 : structure chimique de la chitine [19]

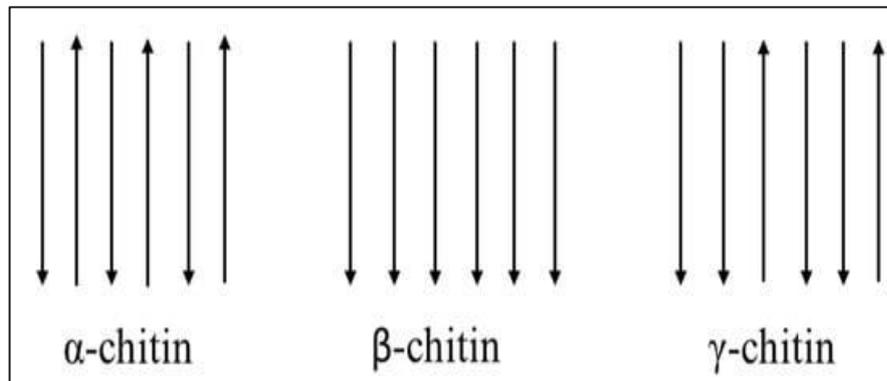


Figure 06 : Représentation des trois formes allomorphes de chitine dans la Nature [6]

V. Rôle de chitine chez les criquets

La chitine et ses modifications influencent fortement la structure de l'exosquelette ainsi que les fonctions physiologiques de l'insecte. Les tendons internes et les cellules épithéliales spécialisées appelées "cellules tendineuses" qui proviennent de la couche externe des cellules épidermiques fournissent des sites d'attachement aux deux extrémités des muscles des membres adultes. Les processus membranaires émanant à la fois des cellules tendineuses et musculaires s'interdisent considérablement pour renforcer l'attachement des muscles à la matrice extracellulaire (CME). Les ligands protéiques qui se lient aux complexes d'intégrines liés à la membrane améliorent davantage l'adhérence entre les muscles et les tendons. Les cellules tendineuses contiennent des réseaux de fibres de F-actine qui contribuent à leur rigidité. Dans le cytoplasme des cellules musculaires, des protéines comme le taline et d'autres protéines fournissent des sites d'attachement pour l'actine cytosquelettique, augmentant ainsi la liaison et l'activation des

intégrines pour coupler mécaniquement l'ECM avec l'actine dans les cellules musculaires [19].

VI. Les applications de la chitine dans le domaine de santé

VI.1. Application dans le domaine médical

La chitine et le chitosane (produit à partir de la réaction d'acétylation de la chitine), présentent d'excellentes propriétés biologiques, comme la non-toxicité, la biodégradation, la biocompatibilité et l'immunologique, antibactérienne, cicatrisante. Et l'activité hémostatique, dans la culture cellulaire, l'ingénierie tissulaire et l'administration de médicaments, puisqu'il est hautement biocompatible et biodégradable dans un environnement physiologique [3].

Les applications biomédicales consistent en un système d'administration de médicaments, l'ingénierie tissulaire, le pansement des plaies (peau artificielle) ; diagnostic de cancer [5].

VI.1.1. Action immunologique

Stimulation de la chitine des cellules immunitaires innées et régulation des réponses immunitaires allergiques adaptatives. Les dérivés de la chitine ou de la chitine activent les macrophages pour exprimer un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines (p. ex., GCP-2) et d'autres médiateurs (LTB₄) par le récepteur du mannose des macrophages, TLR-2 et récepteur de lectine de type C. Ensuite, les éosinophiles, basophiles et neutrophiles recrutés par ces médiateurs inflammatoires présentent des réponses allergiques de type II par sécrétion de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) et d'autres médiateurs allergiques (histamines, peroxydases). Ainsi, les éosinophiles et les basophiles induits par la chitine améliorent davantage les réponses inflammatoires adaptatives Th2 induites par les allergènes. D'autre part, de nombreuses études soutiennent également que la chitine active les macrophages, les cellules NK et les neutrophiles pour produire des cytokines de type I (TNF- α , IL-12, IL-1 β et IFN- γ), et supprime les réponses immunitaires adaptatives de type II induites par les allergènes.

TSLP induite par le chitosan l'expression à partir de cellules épithéliales, et inhibe la polarisation Th2 par l'interaction des cellules dendritiques TSLP. L'effet direct de la chitine et dérivés de chitine sur les cellules dendritiques reste à déterminer [20].

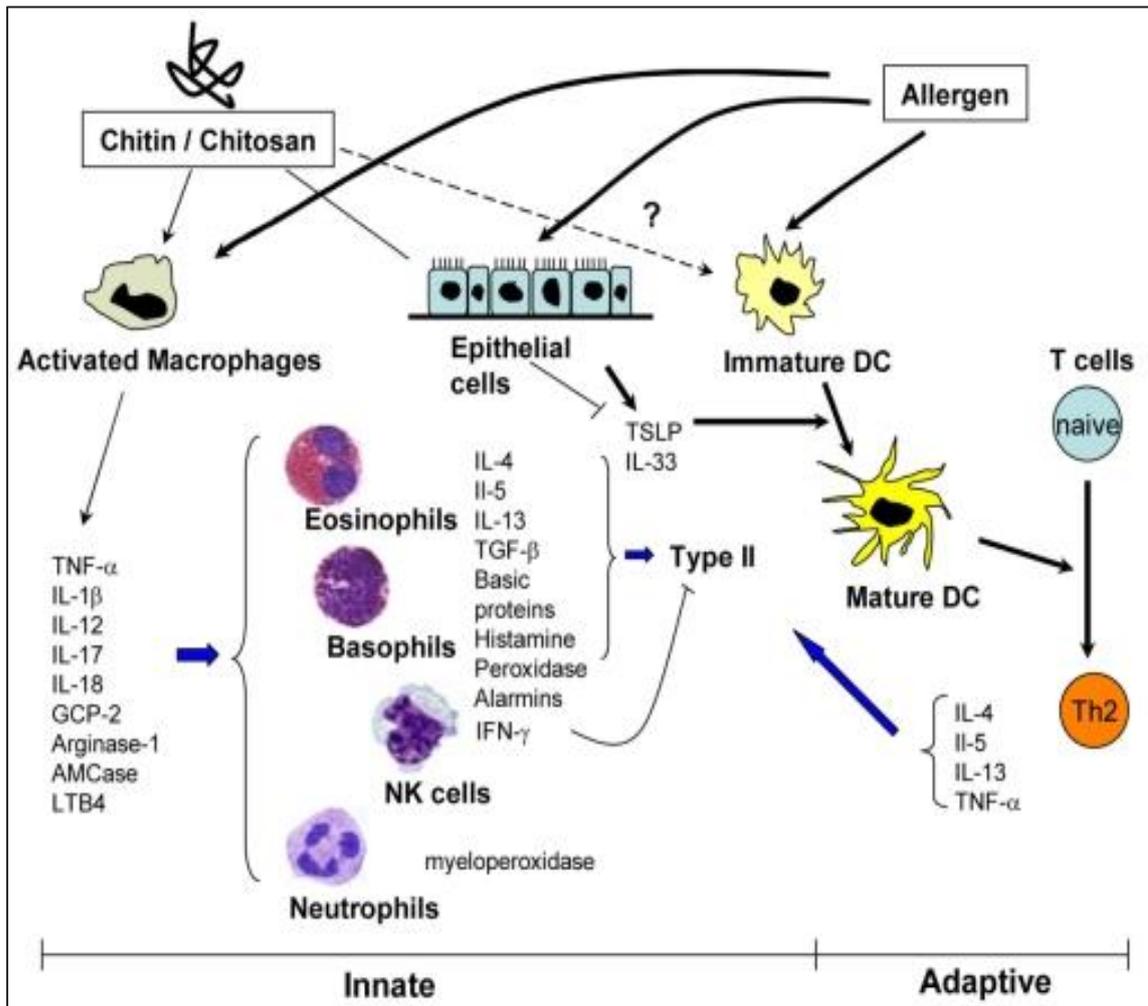


Figure 07 : La chitine et ses effets sur les réponses inflammatoires et Immunitaires [20]

VI.1.2. La cicatrisation des plaies

Le chitosane en tant que biopolymère polycationnique a été considéré pour l'application de pansement de plaie en raison de ses propriétés uniques souhaitables telles que les antimicrobiens, anti-inflammatoire, faible immunogénicité, propriétés tissulaires et antioxydantes.

Le chitosane et ses dérivés sont connus comme accélérateurs du processus de guérison des plaies. Ils peuvent influencer la phase de l'hémostase en coagulant le sang.

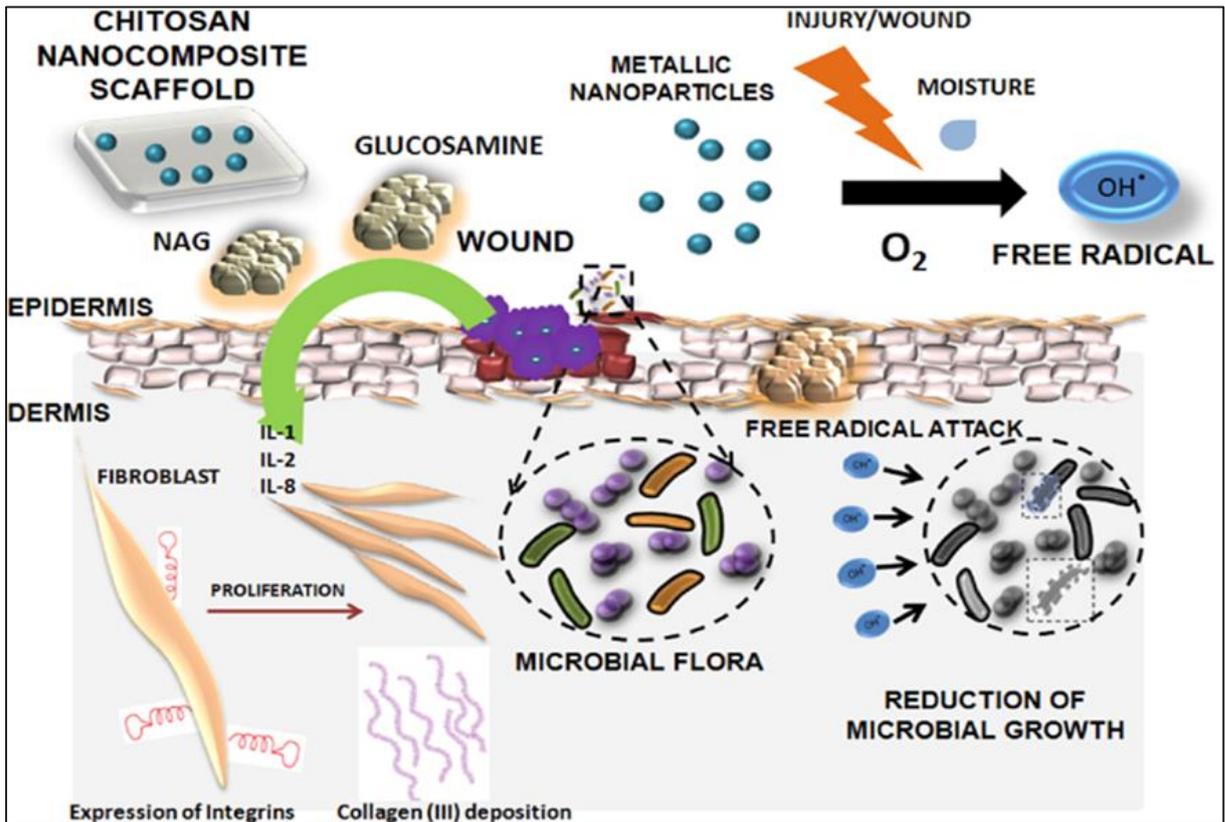


Figure 08 : Mécanisme d'action du chitosane métallique nanocomposite dans la cicatrisation des plaies [22]

Chitosane matrice dégrade et libère N-acétyl-glucosamine et D-glucosamine qui aide dans sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui régule la prolifération des fibroblastes et le dépôt de collagène. Les ions métalliques libérés de la matrice fournissent tour à tour des antimicrobiens effet par formation de radicaux libres [22].

VI.1.3. Matériel de renforcement pour l'ingénierie tissulaire

L'ingénierie des tissus artificiels représente des avancées majeures dans le domaine biomédical, car elle aide dans les processus de reconstruction, favorisant l'amélioration de la qualité de vie humaine. Elle implique la régénération de tissus perdus ou endommagés en utilisant des biomatériaux associés à des facteurs cellulaires ou de croissance [4].

En effet, les nanofibrilles de chitine peuvent être utilisées comme matériau de renforcement pour synthétiser des nanocomposites biodégradables, comme échafaudages pour l'ingénierie tissulaire. Pour retrouver ou améliorer la fonctionnalité, certains tissus ou organes doivent être réparés ou remplacés par l'implantation de substituts de tissus dans le corps. Le processus d'ingénierie tissulaire consiste à régénérer de nouveaux tissus qui se développent sur des

biomatériaux servant d'échafaudage en présence de molécules bioactives comme les cytokines et les facteurs de croissance. Pour obtenir des résultats appropriés, les échafaudages doivent être conçus avec une architecture appropriée pour déclencher une réponse cellulaire souhaitable de l'organe ciblé. Si la structure des échafaudages est comparable à la matrice extracellulaire native du corps humain, elle augmente la différenciation et la prolifération de l'adhésion cellulaire [23].

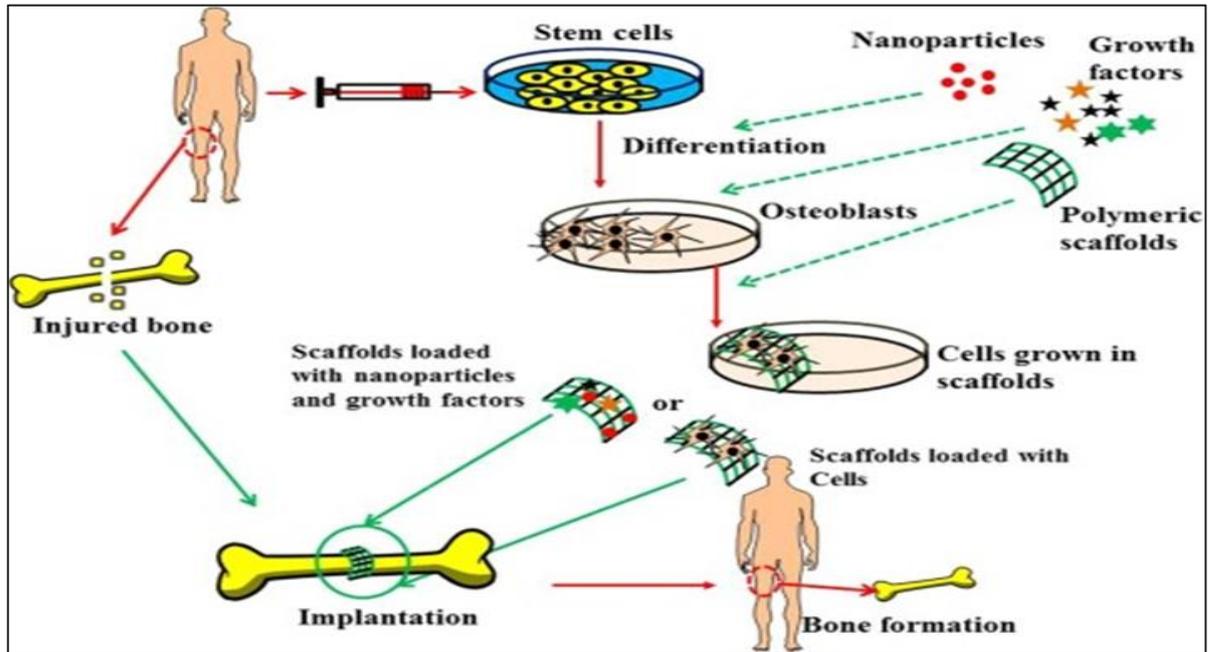


Figure 09 : Échafaudages de biocomposite à base de chitosane pour l'ingénierie des tissus osseux [24]

VI.1.4. Action antimicrobienne

De nombreuses études ont démontré que le chitosane a une importante activité antimicrobienne. Cependant, le mécanisme réel d'inhibition n'est pas encore entièrement compris. L'hypothèse la plus plausible est une modification de la perméabilité cellulaire due aux interactions entre le polysaccharide à charge positive (chitosane à pH inférieur à 6,5) et la membrane à charge négative. Le mécanisme sous-jacent à l'inhibition de la croissance bactérienne devrait être que le polymère chargé positivement se combine avec des composants anioniques tels que l'acide N acétylmuramique, l'acide sialique et l'acide neuraminique, à la surface des cellules [26].

VI.1.5. Action anti-tumorale

Les nanoparticules de chitosane ont un large éventail d'applications prometteuses dans les effets anti-tumoraux, y compris le carcinome hépatocellulaire, le cancer

gastrique, le cancer colorectal et le cancer du poumon. Comme l'indique la figure 10, le chitosane a une activité antiproliférative contre les cellules tumorales, et le chitosane induit une apoptose dans les cellules tumorales en diminuant la Bcl-2 et en augmentant l'expression de la Caspase-3 (Fig 10 A).

Le carboxyméthylchitosan (CM-COS) améliore la viabilité des macrophages, s'infiltré fortement dans le microenvironnement tumoral, produit des cytokines telles que le TNF- α et l'IL-1, améliore la phagocytose et augmente les niveaux de NO. En particulier, le CM-COS a des effets inhibiteurs sur les cellules de sarcome in vivo et sur la croissance cellulaire du BEL-7402 in vitro, mais n'est pas significativement toxique pour les cellules hépatiques normales (Fig 10 B).

En outre, le chitosane a un effet inhibiteur sur l'invasion des cellules tumorales et les métastases.

Les métalloenzymes matriciels (MMP) sont impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire pendant l'invasion tumorale et la métastase, et le MMP-2 peut coder une enzyme qui dégrade le collagène de type IV. La surexpression du MMP-2 est une caractéristique importante du cancer gastrique, étroitement associée aux métastases du cancer gastrique. Le chitosane peut réduire l'expression de la grappe de différenciation 147 (CD147) et, par conséquent, du MMP-2, montrant ainsi une inhibition dépendante du dosage des métastases des cellules cancéreuses gastriques (Fig 10 C). L'angiogenèse dans les tissus tumoraux peut être liée à la régulation ascendante de l'expression du MMP-9 conduisant à la libération du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les cellules tumorales est l'un des mécanismes de la métastase tumorale agressive, et le VEGF et ses récepteurs sont des signaux régulateurs pour l'angiogenèse. l'expression du VEGF était plus élevée dans les métastases pulmonaires que dans les tumeurs primaires. COS peut inhiber l'expression du VEGF en supprimant l'expression du MMP9, inhibant ainsi l'angiogenèse tumorale pour supprimer l'invasion tumorale et les métastases [27].

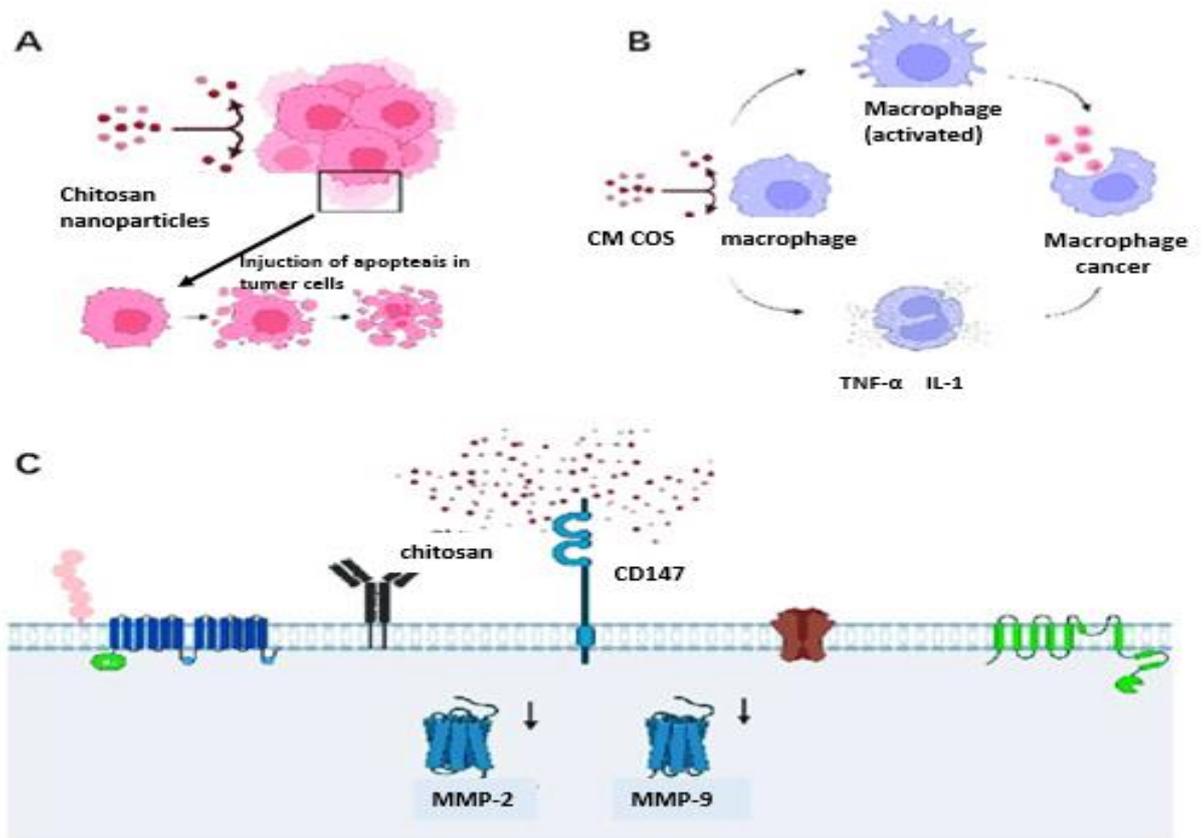


Figure 10 : Les effets anti-tumoraux du chitosane [26].

VI.2. Application dans le domaine cosmétique

La chitine et ses dérivés les plus importants, le chitosane, ont les propriétés comme les propriétés fongiques, fongicides et la capacité de se dissoudre dans les acides organiques, afin qu'ils puissent être aussi bons candidats à des applications cosmétiques. Utilisation cosmétique de la chitine et de ses dérivés dans les soins des cheveux, buccodentaires et de la peau. Il a des propriétés : pour permettre la souplesse des cheveux, la réduction de l'électricité statique et le traitement de l'acné le maintien de l'hydratation de la peau et son teint. Ainsi, il est utilisé dans les crèmes, lotions et lotions permanentes, dentifrices, gommes à mâcher, ongles émail, fond de teint, fard à paupières, rouge à lèvres, et dans les produits de la toilette aussi plusieurs de ses dérivés sont utilisés comme vernis à ongles. Ils peuvent également être utilisés pour prévenir l'endommagement des dents et la formation de plaque [5].

I. Lieu et durée de la réalisation de la partie expérimentale

Notre étude a été réalisée de la période 7 juin 2022 à 31 juillet 2022 et a comporté 03 volets d'expérimentations :

(I) Extraction de la chitine après déminéralisation, déprotéinisation et désacétylation, réalisées au niveau du laboratoire de PFE, faculté SNV, université de Blida 1.

(II) Analyse de la chitine par FTIR, MEB, DRX au niveau du centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimiques (CRAPC), Bousmail, Tipaza.

(III) Testes anti-microbiens au niveau du laboratoire d'hygiène, Blida.

II. Modèle biologique

Le matériel biologique utilisé comprend l'exosquelette des crevettes (***Palaemon elegans***), les plumes du calmar (***Loligo vulgaris***) et la cuticule des criquets (***Migratory locust***).

L'acquisition du matériel : pour les crevettes et le calmar : d'une poissonnerie à Blida et pour les criquets institut national de protection des végétaux (INPV), El Harrach, Alger.

III. Matériels non biologiques

Le matériel non biologique utilisé est représenté en **Annexe I**.

IV. Méthodes d'étude

IV.1. Extraction de la chitine

On a utilisé la méthode chimique pour tous les échantillons et la méthode biologique (hydrolyse enzymatique) seulement pour les criquets.

IV.1.1. Méthode chimique

Ce procédé est réalisé à l'aide des produits chimiques par plusieurs étapes la déminéralisation par HCl, déprotéinisation par NaOH et blanchiment.

IV.1.1.1. Préparation du matériel brute

Lavage et séchage à l'étuve (Fig 11) des carapaces de crevette et des plumes de calamar et des criquets, puis broyage (Fig 12) à des diamètres entre 0.5 et 1 cm se fait à l'aide d'un broyeur électrique.



Figure 11 : Lavage et séchage des carapaces de crevette, des plumes de calamar et des criquets



Figure 12 : Les échantillons après broyage

IV.1.1.2. Déminéralisation

IV.1.1.2.1. But

Cette étape nécessite l'élimination des sels inorganiques principalement le carbonate de calcium.

IV.1.1.2.2. Principe

- Après le broyage, nous avons préparé solution de HCl (0.5N pour crevettes et calamar et 2N pour les criquets).

- Les carapaces de crevettes et les plumes de calamar sont traité sous une agitation à une température à 50°C (Fig 13) pendant trois heures par la solution d'acide chlorhydrique le ratio substrat/solvant 1 :10 c'est-à-dire 1g d'échantillon pour 10 ml de solvant, par contre les criquets sont traité sous agitation à 70°C pendant 2h et le ratio substrat/solvant 1 :5.
- Cette étape elle est réalisé au niveau de la haute pour éviter les risques de HCl (dégagement de CO₂ par ex).

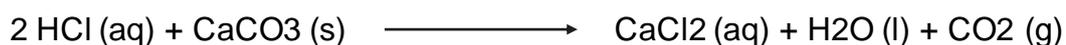


Figure 13 : Déminéralisation

- Après le traitement par HCL, le mélange sera filtré, puis une série de lavage avec l'eau distillé y compris 7 séries on obtient le PH neutre (PH=6).
- Mettre l'échantillon dans l'étuve à 70°C pendant 20h pour le sécher.
- Les criquets sont lavés par l'eau déminéralisé et séchés pendant 1h à l'étuve 80°C pour passer à l'étape suivante [27].

IV.1.1.3. Déprotéinisation

IV.1.1.3.1. But

La déprotéinisation de la chitine consiste à dissoudre les protéines présentes dans la matrice de chitine dans une solution aqueuse. Cela peut être fait par façon douce où sévère. La méthode plus douce utilise des enzymes qui décomposent les protéines en peptides solubles dans l'eau. Ces méthodes sont peu coûteuses mais n'éliminent pas complètement les protéines. L'utilisation d'hydroxyde de sodium à haute température est souvent utilisée pour dissoudre la plupart des protéines.

IV.1.1.3.2. Principe

- Préparer une solution de NaOH (0.5M)
- Traiter l'échantillon avec NaOH sous une agitation à 100°C pendant 2h.
- Filtrer la solution et une série de lavage a été réalisé jusqu'à PH neutre (de PH basique=13 à PH neutre=6).



Figure 14 : Déprotéinisation

- Et pour les criquets le traitement par NaOH (2N) se fait selon le rapport solide/liquide (1 :12.5/ g/ml) pendant 16h à l'étuve à 80°C [27].

IV.1.1.4. Blanchiment

IV.1.1.4.1. But

C'est une étape facultative qui consiste à décolorer l'échantillon et augmenter la purification.

IV.1.1.4.2. Principe

- Traiter les carapaces de crevettes par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %, Selon un ratio 1 :10 à une température de 30°C, pendant 3heures. Après lavage et séchage le produit final est de couleur légèrement brune (Fig 15).



Figure 15 : Aspect de la chitine des crevettes après Blanchiment

- Le blanchiment des criquets se fait par 2 composés chimique le chloroforme et le méthanol dont le rapport est (1 :2 :4) c'est-à-dire dans une solution de blanchiment on mélange 1 ml de chloroforme avec 2 ml de méthanol et 4 ml de l'eau distillé, le mélange filtré et lavé plusieurs fois puis séché à l'étuve pendant 24h à 60°C.
- Cette étape n'est pas nécessaire pour les plumes de calamar.

IV.1.1.5. Déacétylation pour la production de chitosane

IV.1.1.5.1. But

Cette étape s'effectue par un traitement avec NaOH dont elle nécessite une réduction dans la longueur de chaîne de la chitine par la substitution de groupement acétyle pour obtenir le chitosane,

IV.1.1.5.2. Principe

- Les chitines extraites ont été réaménagées à 40% solution de NaOH à 120°C pendant 2 heures [28].
- Lavage et séchage à 70°C pendant 24h.



Figure 16 : Désacétylation des trois échantillons

NB : Nous avons utilisé un protocole différent pour les criquets selon le travail de **Kaya 2014**, qui a extrait la chitine à partir des sauterelles, et nous savons aussi que les criquets ressemblent beaucoup aux sauterelles.

IV.1.2. Méthode biologique

Ce procédé est réalisé en une seule étape dans laquelle la chitine est obtenue par hydrolyse enzymatique d'une matière première selon le protocole suivant :

- Hydrolyse enzymatique par la protéase from rhizopus sigma aldrich la première.
- Le réactif utilisé pour maintenir le pH acide est l'acide phosphorique on a ajuster le pH jusqu'au PH = 3, la température ambiante pour cette enzyme est 37°C.
- Pour un échantillon de 5 g de matière première le teneur en protéines est 48 % cela correspond à environ 10,2% d'enzyme par rapport à la quantité de protéine, soit une quantité de protéase de 0,518 g.
- Une solution d'acide phosphorique a été préparé et chauffé à 30°C puis ajoutée la matière première. Le mélange est agité pendant 5 minutes pour qu'ils s'homogénéiser.
- La protéase est préalablement solubilisée dans un 1 ml d'eau et ajouter au milieu réactionnel.

- Le mélange est chauffé à 37°C sur la plaque chauffante puis incubé dans l'étuve à 37°C. Après 10h d'incubation le mélange filtré et rincé abondamment à l'eau distillée à chaque fois qu'on ajoute l'eau distillée pour l'échantillon on va l'agiter pendant 10 minutes avant d'être filtré et rincé à nouveau.
- La fraction solide obtenue est transférée dans une coupelle et séchée pendant une nuit à 90°C dans l'étuve [29].



Figure 17 : Hydrolyse enzymatique des criquets

IV.2. Observation de la texture de la chitine par le microscope électronique à balayage

IV.2.1. But

Le microscope électronique à balayage est utilisé pour l'observation des surfaces de l'échantillon.

IV.2.2. Principe

Lorsque l'échantillon est irradié avec un faisceau d'électrons fins (appelé sonde à électrons), électrons secondaires sont émis à partir de la surface de l'échantillon. Topographie de la face peut être observée par balayage bidimensionnel de la sonde électronique sur la surface et l'acquisition d'une image à partir de l'électron secondaire détectés [30].

La source d'électrons permet de contrôler l'intensité et la tension des électrons émis. Dans le cas des liquides ioniques, un compromis est nécessaire entre l'image obtenue, plus fine à haute tension et les effets d'irradiation et de charge dus au flux des électrons, plus faible à basse tension. Les nouvelles colonnes électroniques permettent de garder une bonne résolution à faible tension. Des lentilles dirigent et focalisent le faisceau à l'endroit voulu (sonde) afin de balayer l'échantillon. Des électrons secondaires sont générés par l'impact des électrons émis par la source et sont collectés par un détecteur (Voir annexe) grâce à une grille polarisée. Ce sont ces électrons qui vont donner l'image de l'échantillon.

L'observation de la microstructure des poudres a été effectuée en utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB-EDS Quanta 250 à filament de tungstène de la compagnie FEI). La poudre sèche a été déposée sur un support d'observation adhésif et conducteur, ensuite a été métallisé par plasma d'argon. L'observation a été réalisée sous vide à une tension accélératrice de 15 kV. (Energy Dispersive Spectroscopy).

IV.3. Caractérisation de la chitine par spectroscopie infrarouge (FTIR)

IV.3.1. But

La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier est une méthode d'imagerie chimique hautement polyvalente, sans étiquette et non destructive qui peut être appliquée à l'étude d'un large éventail d'échantillons et de systèmes [31]. Elle est largement utilisée pour étudier la composition et la structure de la chitine, pour distinguer la forme α de la forme β , pour déterminer le degré d'acétylation et enfin pour confirmer la pureté de la chitine extraite.

IV.3.1.1. Le degré désacétylation de la chitine (DDA%)

- Le calcul du degré de désacétylation de la chitine est obtenu selon la formule suivante :

$$DDA(\%) = 100 - DA$$

- Le calcul du degré d'Acétylation de la chitine est obtenu selon la formule suivante :

$$DA(\%) = \frac{\left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}}\right)}{1.33} * 100$$

Où :

- **A1655** est l'absorbance à la longueur d'onde 1655 cm^{-1} (amide I).
- **A3450** est l'absorbance à la longueur d'onde 3450 cm^{-1} (hydroxyle).
- Le facteur **1,33** représente le rapport **A1655/A3450** pour une chitine entièrement N-acétylée.

IV.3.2. Principe

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est une technique d'analyse basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection de certaines vibrations de déterminer les fonctions chimiques présentes dans le matériau.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre à Transformée de Fourier de marque Alpha de la maison Bruker. Lorsque l'énergie apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchi ou transmise. Le domaine IR entre 4000 et 400 cm^{-1} de nombre d'onde (**64 scans**, résolution **1 cm^{-1}**).

Les échantillons pour l'analyse FTIR sont préparés en broyant les poudres mélangées à sec avec du KBr en poudre, souvent dans le rapport de 1: 5 (Echantillon: KBr), puis compressés pour former des disques.

Le spectromètre FTIR comporte principalement 5 parties, la source IR, interféromètre, l'échantillon, détecteur et l'ordinateur. Le faisceau infrarouge provenant de la source se dirige vers l'interferomètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs de l'interferomètre vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite vers le détecteur pour être transformé en signal (voir annexe II).

IV.4. Tests anti-microbiens

IV.4.1. But

L'activité antimicrobienne du chitosane a été abondamment décrite et publiée ces dernières années pour son action contre une large variété de micro-organismes incluant des espèces bactériennes et fongiques. Une activité bactéricide a clairement pu être identifiée chez des flores pathogènes ou d'altération incluant des Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*) et des Gram- (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella dysenteriae*,....) [32].

IV.4.2. Principe

- Préparation de solution de chitosane. Solution mère de chitosane blanchi et écreu de 5 mg/ml de chitosane ont été dissous dans de l'acide acétique à 1 %. Après agitation, les solutions ont été filtrées (filtre de 0,45 µm) pour éliminer les contaminants et entreposé à 4 °C. L'acide acétique lui-même a une bonne activité antimicrobienne, selon la concentration et pour cette raison, dans ce travail, nous avons également testé l'acide acétique seul comme témoin.
- En particulier, pour les tests de diffusion d'agar, dilutions en série, obtenant des concentrations de 1,25, 0,6, 0,3 mg/ml de chitosane. Les dilutions en série ont également été faites pour l'acide acétique, obtenant concentrations de 0,125 %, 0,06 %, 0,03 %.
- L'activité antimicrobienne a été déterminées *in vitro* en utilisant la méthode de disque sur papier wattman (9mm) contre deux bactéries pathogènes Gram (+) : *Staphylococcus aureus* et Gram (-) et un champignon aspergillus.
- Le milieu de culture utilisé pour les bactéries est gélose Mueller–Hinton et pour les champignons c'est Sabouraud [33].

I. Extraction de la chitine et du chitosane

I.1. Aspect de chitine et chitosane

La matière sèche obtenue après séchage et broyage, est traitée pour l'extraction de la chitine et le chitosane. À la fin de l'extraction, la chitine présente une texture rugueuse par contre celle du chitosane est lisse. La figure 18, présente l'aspect final de la chitine obtenue après les réactions de déminéralisation, déprotéinisation et le chitosane après désacétylation. Le matériel obtenu à partir des plumes de calamar possède une couleur blanchâtre par rapport à celui des crevettes et des criquets.

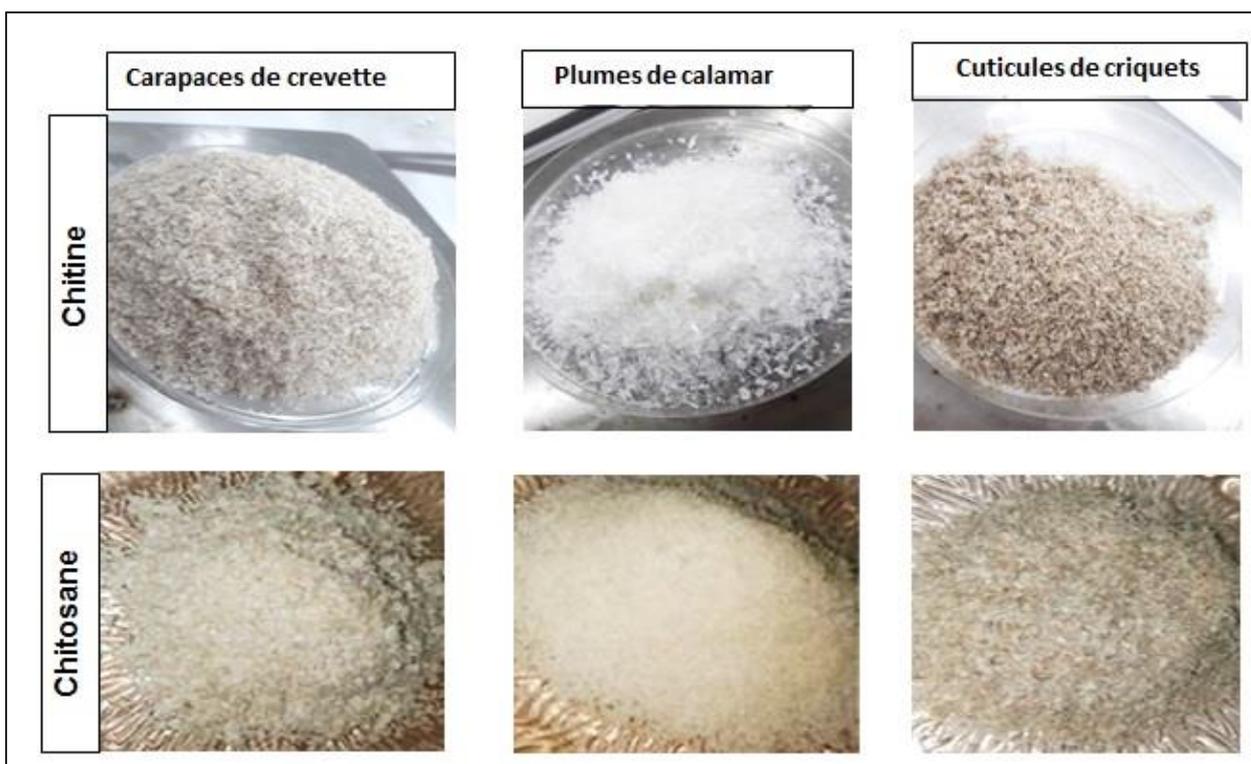


Figure 18 : Aspect du matériel brut obtenu après les réactions de déminéralisation, déprotéinisation et désacétylation pour l'obtention du chitosane

I.2. Rendements de la chitine et du chitosane à partir des matériaux brutes

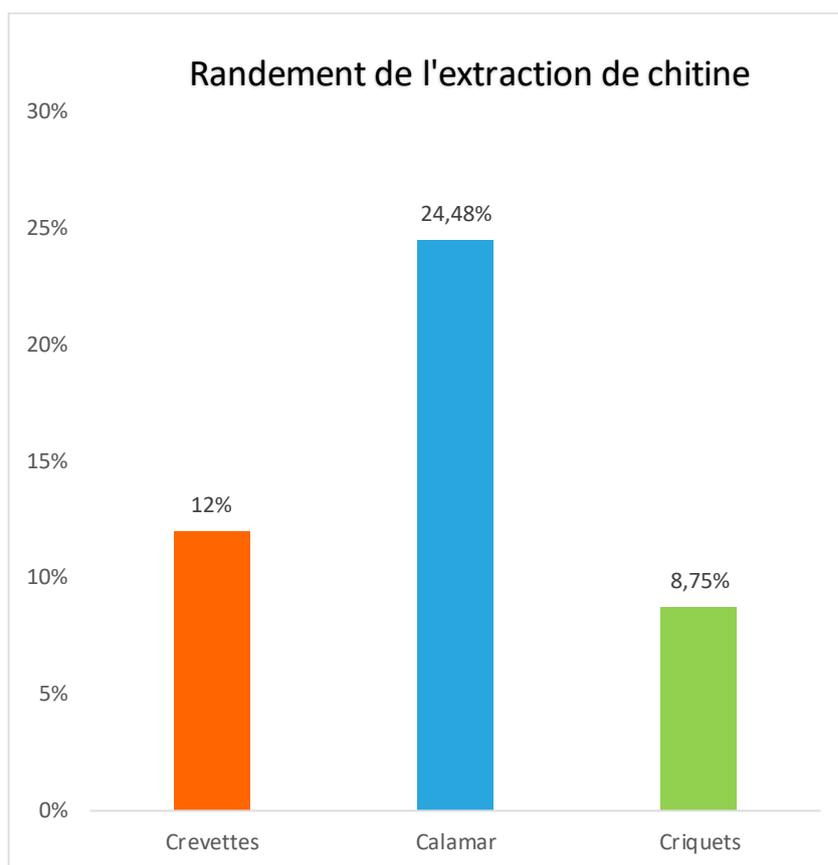


Figure 19 : Rendement massique de l'extraction de chitine

Le rendement massique d'extraction de chitine par la méthode chimique est de 12g à partir de 100 g de carapace de crevette soit 12 % et pour 9.5 g à partir de 38.8g de plume de calamar.

$$Rdt\% = \frac{100 * \text{Poid insoluble}}{\text{Poid de matière première sèche}}$$

$$Rdt\% = \frac{9.5 * 100}{38.8} = 24.48 \%$$

on trouve que le rendement massique d'extraction de chitine est de 8.75 % à partir de 40 g d'échantillon.

$$Rdt\% = \frac{3.5 * 100}{40} = 8.75 \%$$

Le rendement massique d'extraction de chitine par la méthode chimique est de 3.5g à partir de 40g de criquet soit 8,75 % et par la méthode enzymatique est de 1.5g à partir de 5g de criquet soit 30 %.

$$Rdt\% = \frac{1.5 * 100}{5} = 30 \%$$

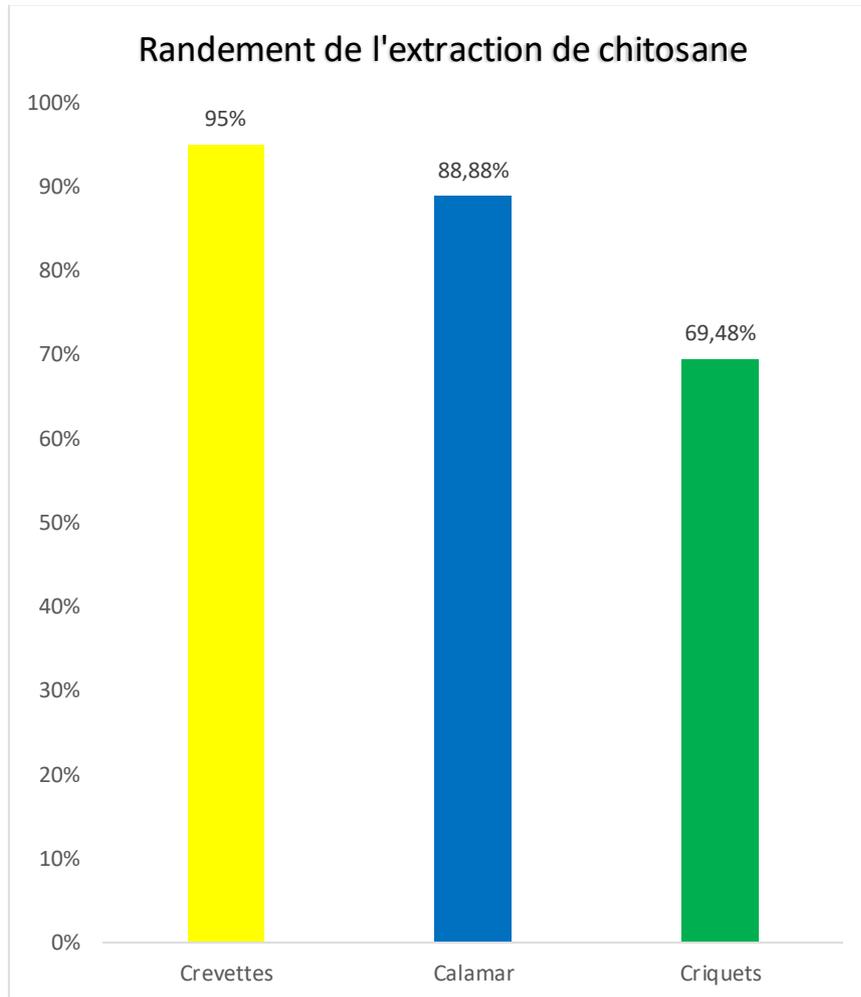


Figure 20 : Rendement massique de l'extraction de chitosane

Le rendement massique d'extraction du chitosane par la méthode chimique est de 3.8g à partir de 4 g des carapaces de crevette soit 95 % et 5.6g à partir de 6.3g de plume de calamar soit 88.88%. Par la méthode biologique, on trouve que le rendement massique d'extraction de chitine est de 69.48% à partir de 1.3 g d'échantillon.

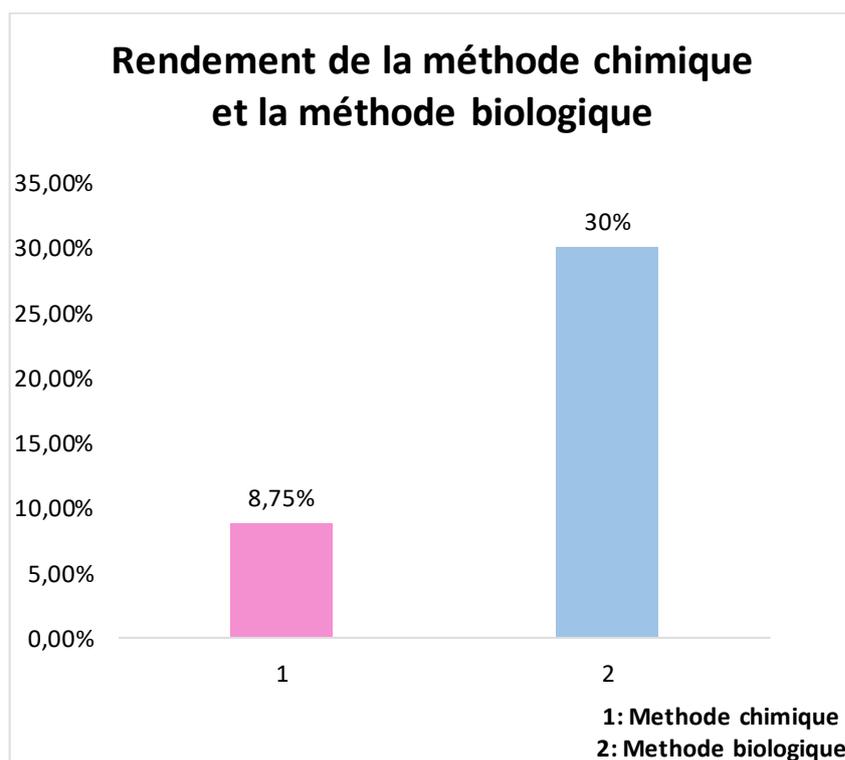


Figure 21 : Rendement de la méthode chimique et la méthode biologique

Dans le tableau et l'histogramme on observe que la méthode biologique a le plus grand rendement par rapport à la méthode chimique.

II. Analyse spectroscopie infrarouge de la Chitine

Dans notre travail les analyses spectroscopiques par infrarouge à transformée de Fourier ont été effectuées sur la chitine préparée à partir des carapaces des crevette, des plumes de calamars et chitine des criquets.

Le spectre FTIR de la chitine obtenue est représenté en pourcentage de transmittance (%T) en fonction de nombre d'onde (cm⁻¹).

II.1. Résultats d'analyse FTIR de chitine des crevettes

II.1.1. Interprétation

Le spectre infrarouge à transformation de Fourier – FTIR (Fig 22) montre plusieurs pics correspondant aux bandes on distingue : 3450 cm⁻¹/3250 cm⁻¹/1630 cm⁻¹/1660 cm⁻¹/1480 cm⁻¹/1280 cm⁻¹/1090 cm⁻¹/890 cm⁻¹.



Figure 22 : Spectre FTIR de chitine des crevettes obtenue par méthode chimique

II.2.2. Calcul de degré de désacétylation de chitine des crevettes :

D'après le spectre, **A1655 : 0.763 Abs et A3450 : 0.96 Abs**

$$DA(\%) = \frac{\left(\frac{0.763}{0.96}\right)}{1.33} * 100 = 59,75\%$$

D'où le DDA=100 – 59.75

$$=40,25\%$$

II.2. Résultats d'analyse FTIR de chitine des plumes de calmars

II.2.1. Interprétation

Le spectre infrarouge à transformation de Fourier – FTIR (Fig 23) montre plusieurs pics correspondant aux bandes on distingue : 3400 cm-1/3290 cm-1/1655 cm-1/1560 cm-1/1490 cm-1/1295 cm-1/1190 cm-1/1050 cm-1/900 cm-1.

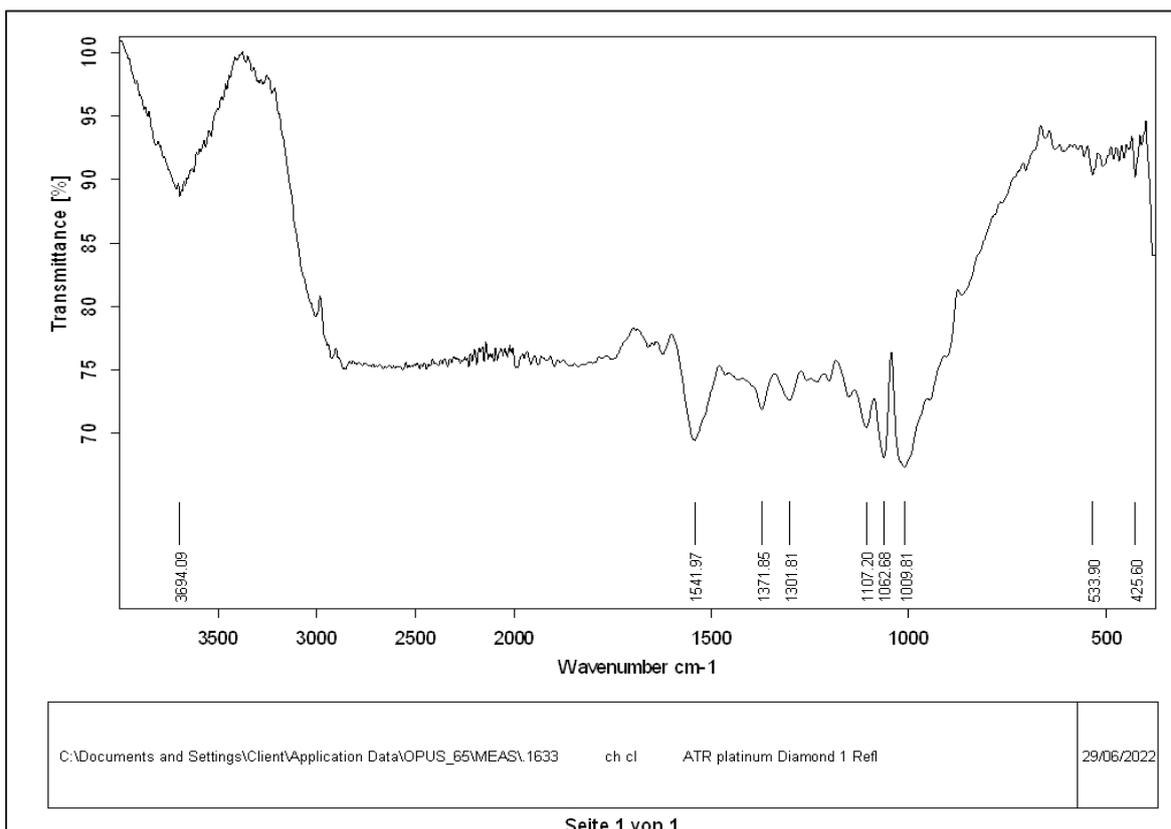


Figure 23 : Spectre FTIR de chitine des plumes de calamars obtenue par méthode chimique

II.2.2. Calcul de degré de désacétylation de chitine des plumes de calamars :

D'après le spectre , **A1655 : 0.775 Abs et A3450 : 0.91 Abs**

$$DA(\%) = \frac{\left(\frac{0.775}{0.91}\right)}{1.33} * 100 = 64.03\%$$

$$\begin{aligned} DDA(\%) &= 100 - 64.03 \\ &= 35.97\% \end{aligned}$$

II.3.RESULTATS d'analyse FTIR de chitine des Criquets

II.3.1. Interprétation

Le spectre infrarouge à transformation de Fourier – FTIR (Fig 24) montre plusieurs pics correspondant aux bandes on distingue : 3450 cm-1/3250 cm-1/1620 cm-1/1655 cm-1/1580 cm-1/1280 cm-1/1180 cm-1/1090 cm-1/880 cm-1.

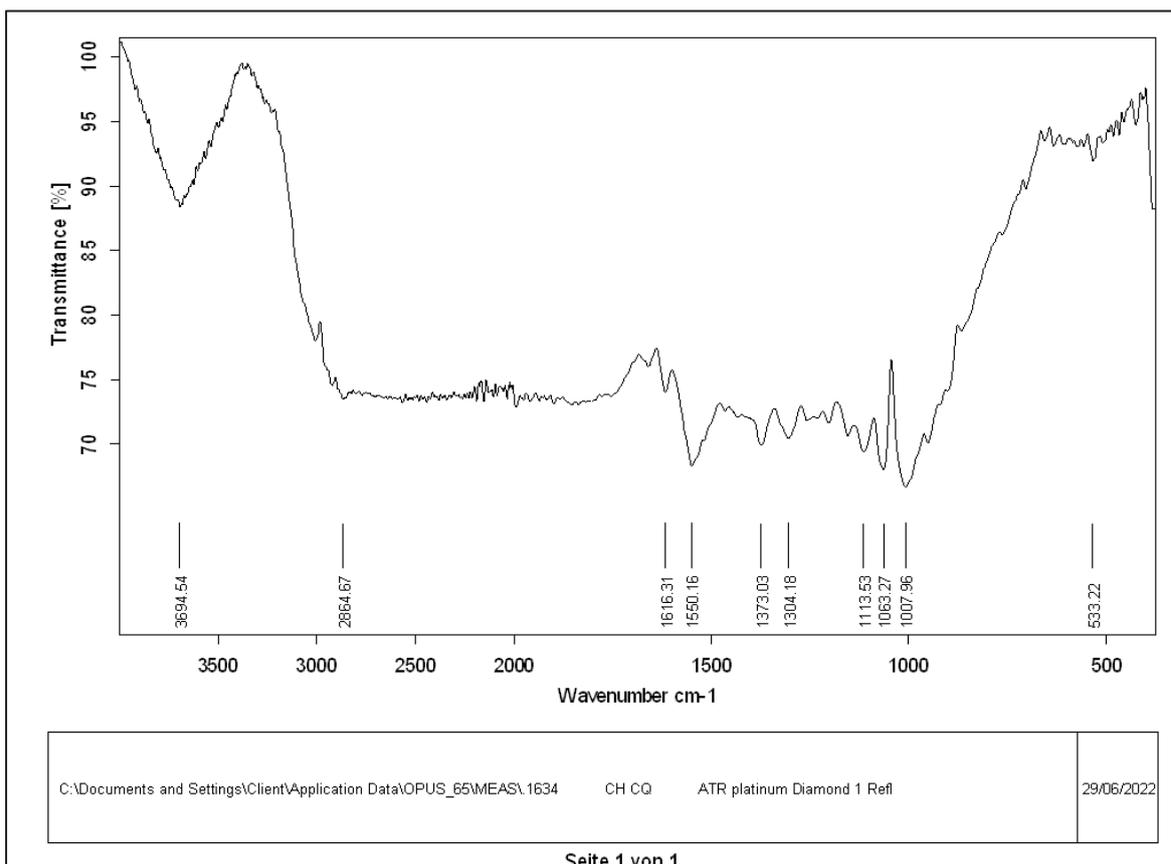


Figure 24 : Spectre FTIR de chitine de criquets obtenue par méthode chimique

II.3.2. Calcul de degré de désacétylation de chitine des criquets :

D'après le spectre , **A1655 : 0.775 Abs et A3450 : 0.96 Abs**

$$DA(\%) = \frac{\left(\frac{0.775}{0.96}\right)}{1.33} * 100 = 60,7\%$$

$$\begin{aligned} DDA(\%) &= 100 - 60,7 \\ &= 39,3\% \end{aligned}$$

III. Analyse ultrafine de la texture tridimensionnelle du polymère de la chitine

III.1. Carapaces de crevette

La figure 25 montre des micrographies sous microscope électronique à balayage (MEB) à différents grossissements de l'aspect du polymère de la chitine, de carapaces de crevette.

Selon la figure, la structure de la chitine extraite de la crevette est granuleuse et un peu fibreuse et ne contient pas des pores.

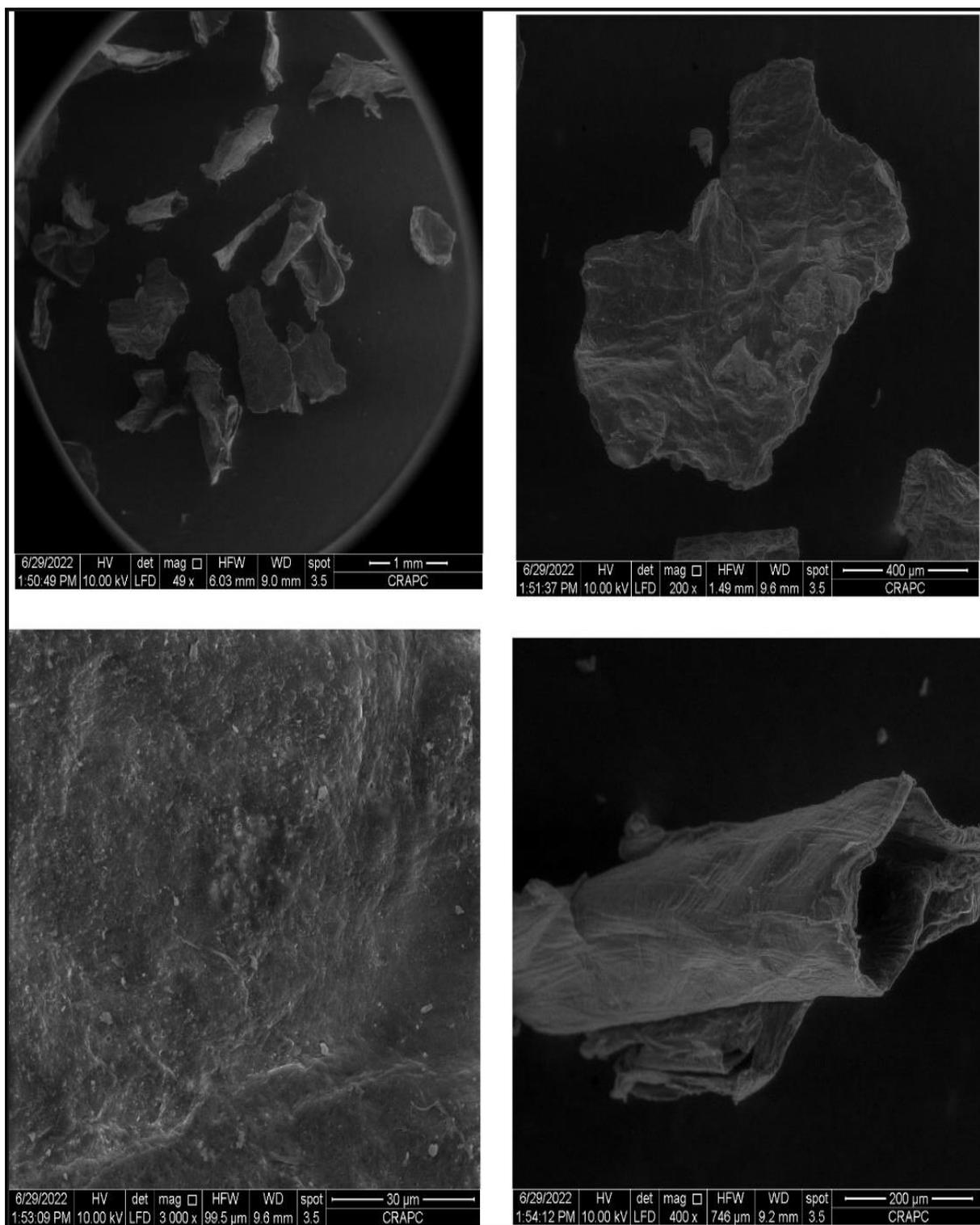


Figure 25 : Micrographie électronique du polymère de la chitine des carapaces des crevettes

III.2. Plumes de calamar

La figure 26 montre des micrographies sous microscope électronique à balayage (MEB) à différents grossissements de l'aspect du polymère de la chitine de plumes de calamar.

La figure montre que la structure de la chitine extraite à partir de plume de calmar est fibreuse et ne contient pas de nanopores.

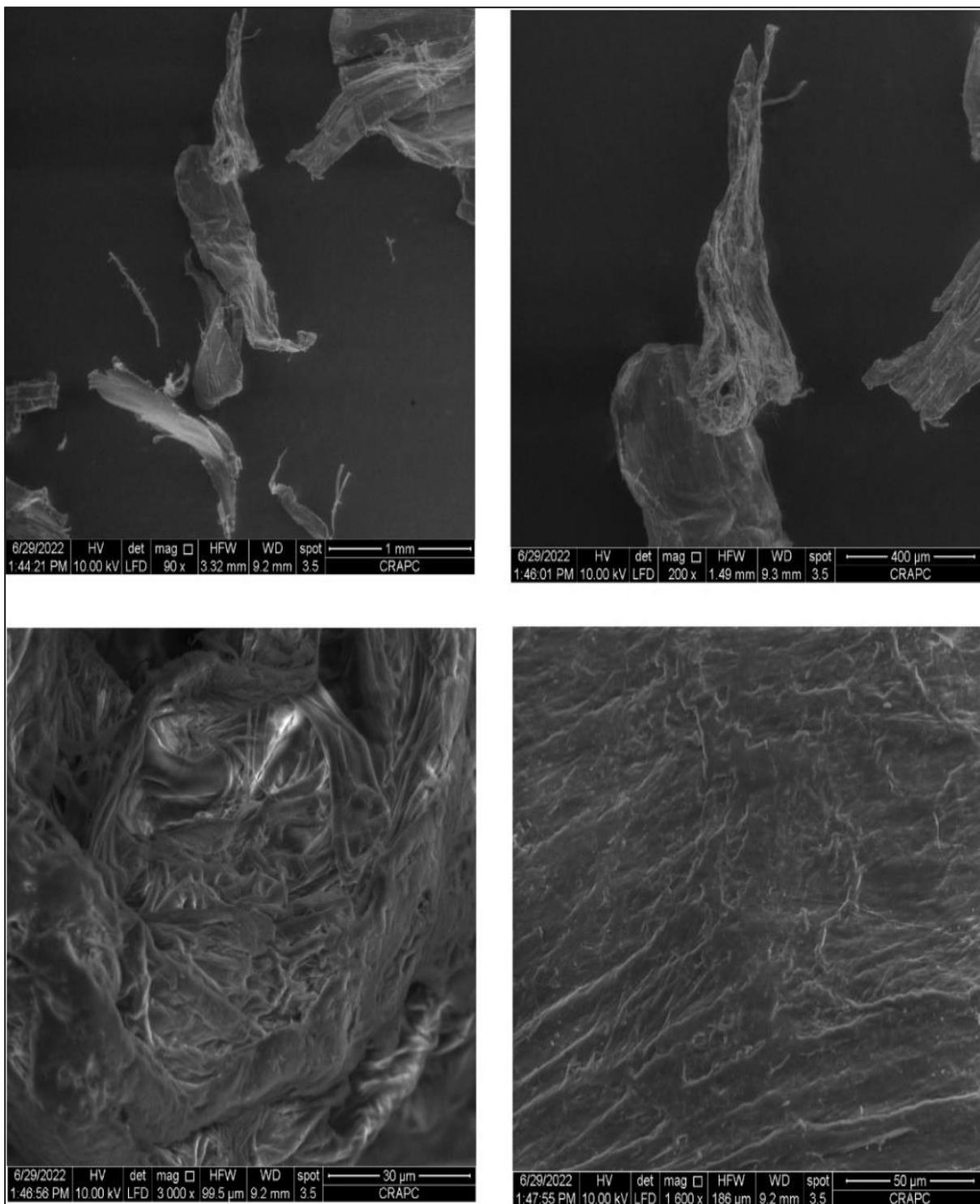


Figure 26 : Micrographie électronique du polymère de la chitine du calamar

III.3. Cuticule de criquet

La figure 27 montre des micrographies sous microscope électronique à balayage (MEB) à différents grossissements de l'aspect du polymère de la chitine de cuticules de criquets.

La figure montre que la morphologie de la surface de la chitine extraire à partir des criquets caractérisée par la présence des nanofibres et des granules et des pores.

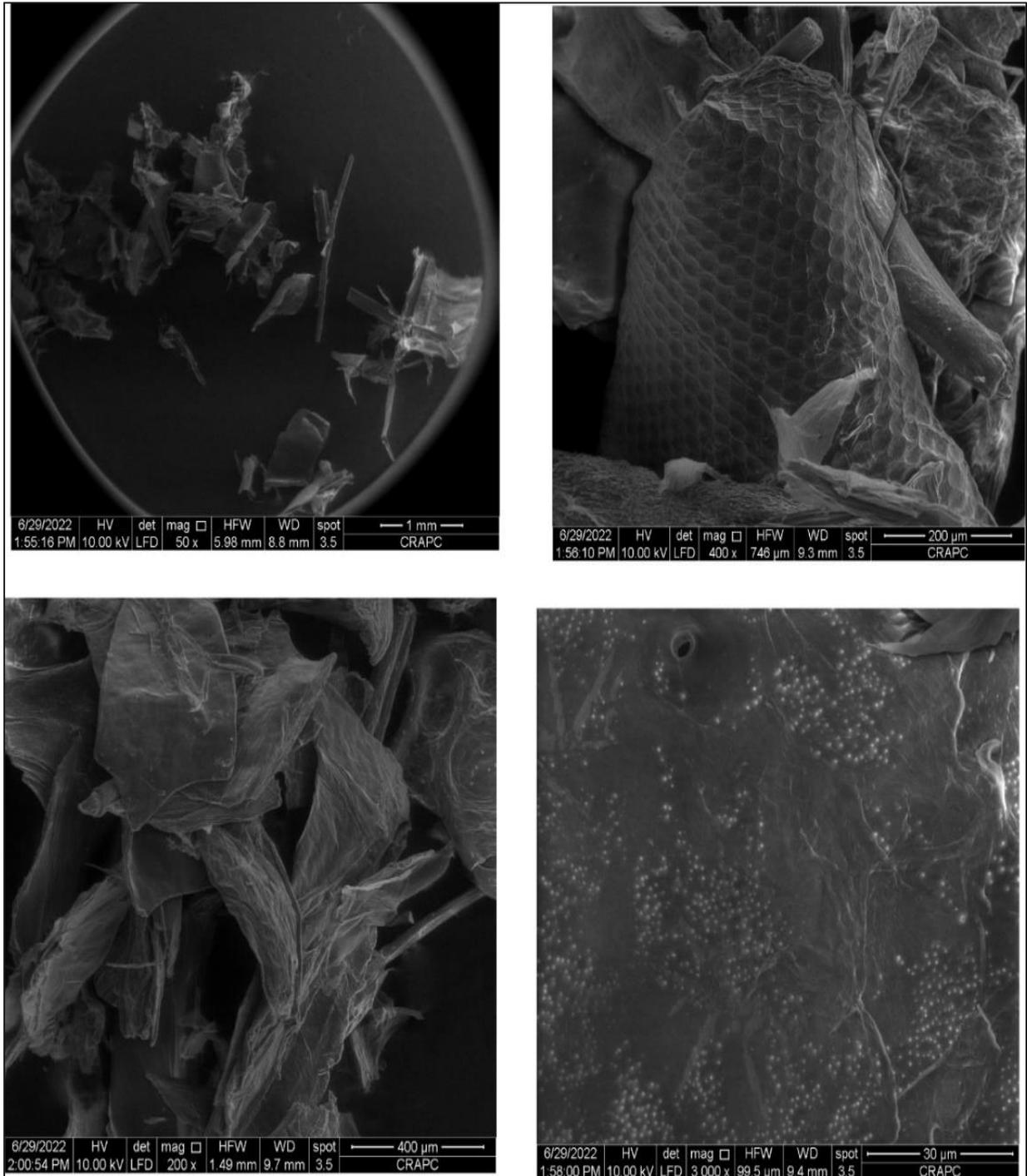


Figure 27 : Micrographie électronique du polymères de la chitine de cuticules de criquet

IV. Activité antimicrobienne

IV.1 Activité antibactérienne

Les activités antimicrobiennes ont été réalisées sur des cultures d'*E.coli* et *staphylococcus aureus*.

- Les colonies de *Staphylococcus aureus* étaient de forme ronde lisse et un peu bombée, avec une couleur crème sur milieu Mueller Hinton.
- Les caractères cultureux d'*Escherichia coli* ont révélés des colonies incolores, lisses et crémeuses.



Figure 28 : Culture de bactéries *E. coli* en A et staphylocoque en B avec les dilutions : 0.03%, 0.06%, 0.125% d'acide acétique



Figure 29 : Culture de bactéries E. coli en A et staphylocoque en B avec les dilutions : 0.03, 0.06, 0.125 % Chitosane /acide acétique

On a obtenu les résultats après 24h, les flèches indiquent les zones d'inhibition. Ces zones sont plus importantes que celle observées avec les dilutions d'acide acétique

D'après ces résultats, les séries de produits testés semblent être doués d'une activité inhibitrice sur les 2 micro-organismes testées mais se diffère par rapport à la dilution. Le diamètre d'inhibition est compris entre 10 et 15 mm.

Tableau 03 : Résultats de l'activité antibactérienne en mm effectué par l'acide acétique.

	Les dilutions			
	0.125%	0.06%	0.03%	
Diamètres d'inhibition en mm	Type de Microorganismes			
Diamètres d'inhibition en mm	Bactérie Gram- <i>E. coli</i>	12	10	10
	Bactérie Gram+ <i>Staphylococcus aureus</i>	12	/	/

Tableau 04: Résultats de l'activité antibactérienne en mm effectué par l'acide acétique/Chitosane.

	Les dilutions			
	0.125%	0.06%	0.03%	
Diamètres d'inhibition en mm	Type de Microorganismes			
Diamètres d'inhibition en mm	Bactérie Gram- <i>E. coli</i>	15	12	11
	Bactérie Gram+ <i>Staphylococcus aureus</i>	13	12	10

- Comme on a mentionné déjà que l'acide acétique c'est un témoin, l'acide acétique a une activité antimicrobienne à partir de cette information on a testé l'activité de la chitosane. Les diamètres d'inhibition de l'acide acétique seul est compris entre 10 et 12 mm (Tableau 03) mais pour l'acide acétique plus le chitosane le diamètre est compris entre 10 et 15 mm (Tableau 04) le diamètre est plus grand.
- Les diamètres d'inhibition respectifs contre les souches testées étaient de 15 mm pour *E. coli* et 13 mm pour *Staphylococcus aureus* dans le cas où on a utilisé la concentration la plus élevée de la solution acide acétique/chitosane.

IV.2. Activité antifongique

Dans cette partie nous avons utilisé l'aspergillus pour tester l'effet antifongique du chitosane. D'après la figure 30, l'effet n'est pas mis en évidence, car la croissance du champignon est aléatoire dans les boîtes de culture avec l'absence d'une zone d'inhibition bien délimitée.



Figure 30 : Culture de avec les dilutions : 0.03, 0.06, 0.125 % Acide acétique, Chitosane /acide acétique

I. L'extraction de chitine et du chitosane :

D'après les résultats obtenus, nous avons conclu que la quantité de chitine est plus élevée dans les sources marines (12 % pour les carapaces de crevette et 24.48 % pour les plumes de calmar) que les criquets (8.75 %) lorsqu'on utilise la méthode chimique.

Et quand on utilise la méthode enzymatique, la quantité est plus élevée chez les criquets.

Ibitoye et al (2018) ont produit de la chitine et du chitosan par extraction chimique à partir de criquet pour des quantités variant entre 4,3 % et 7,1 % et entre 2,4 % et 5,8 %, respectivement.

Selon Percot et al 2003 : Les carapaces de crevettes étaient composées d'environ 20 % de chitine. **Tolaimate et al (2003)** qui ont préparé de la chitine et du chitosan à partir de calmars et obtenu un rendement en chitine de 40 %. **Selon le rox et al (2011)** : La chitine constitue 20 à 30% des carapaces des crustacés, et 3 à 60% de l'exosquelette des insectes.

Que ce soit pour les carapaces des crustacés ou pour les insectes, les proportions des différents constituants varient en fonction des espèces et de la méthode de l'extraction et peuvent fluctuer en fonction des conditions environnementales. Les conditions d'extraction de la chitine doivent donc être adaptées en fonction de la matière première utilisée.

Dans le cas de criquet on pense que le rendement de chitine est lié à d'autres critères tel que les infections qui peuvent provoquer des pathologies graves chez les insectes comme les infections fongiques. **Huang et al (2021)** prouvent que *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* des champignons peuvent infecter de nombreuses espèces d'insectes ou s'accumulent dans le spiracle, les orbites, les pores de la glande de cire, les embouts sensoriels et la membrane articulée des jambes en conséquence la sécrétion de nombreuses enzymes pour dégrader la cire topique et la chitine pendant le processus d'infection et par observations en microscopie électronique à transmission indiquent que il y a eu dégradation des cuticules au début de la pénétration.

II. Etude de résultats de spectre FTIR

Selon **Galo Ca'rdenas and all, 2004** qui ont fait une étude de caractérisation de la chitine par le spectre FTIR :

Les structures des trois types des produits chitineux différents (carapaces de crevettes, plumes de calamars et criquets) ont été confirmées par spectre FTIR dans la gamme de 400-4000 cm^{-1} (figure 21, 22, 23). On a observé que les spectres de trois types de chitine avaient une bande d'absorption de (3450, 3400 et 3450 cm^{-1}) qui correspondait aux vibrations vibratoires et aliphatiques O-H, (3250, 3290 et 3250 cm^{-1}) vibrations NH des groupes amine libres.

De plus, les bandes(1630,1660 cm^{-1}) pour les crevettes, (1655 cm^{-1}) pour plumes de calamrs et (1620, 1655 cm^{-1}) pour criquets correspond aux (C=O secondaire amide stretch, Amide I), d'un groupe important dans la chitine et le chitosane, ont été observées dans les bandes (1590, 1560, 1580 cm^{-1}) respectivement pour les produits chitineux (Amide II), (1090, 1050, 1090 cm^{-1}) vibration d'étirement symétrique C-O. Alors que, les bandes (890, 900, 880 cm^{-1}) correspondaient à l'étirement du cycle pour les β -1,4 glycosidiques.

En outre, il n'y avait pas de bandes à 1540 cm^{-1} dans le spectre l'évaluation, qui ne suggère pas de résidus de protéines dans les chitines (**M. Kaya and all,2015**).

Études existantes ont révélé que la chitine avec la α -cristallinité affiche des bandes autour de 1650 et 1620 cm^{-1} (**R.L. Lavall, 2007**) (**J. Brugnerotto 2001**) dans notre étude les bandes de la chitine des crevettes étaient (1630,1660 cm^{-1}) et les bandes de la chitine des criquets étaient (1620, 1655 cm^{-1}) par contre les bandes de calamars étaient (1655 cm^{-1}), la β -chitine tous les groupes d'amide participent seulement à le premier type de liaisons hydrogène et la bande d'amide I apparaît à 1655 cm^{-1} , ce qui est un décalage de 35 cm^{-1} de la deuxième bande de la α -chitine. Par conclusion, cette méthode nous a permis de connaître les types de chitine étudiés la chitine des crevettes et la chitine des criquets est de type α (les arthropodes), et la chitine des calamars est de type β .

Selon BEREZINA et al 2017, La limite usuelle entre le chitosane et la chitine est déterminée par le degré d'acétylation : un composé ayant un degré d'acétylation inférieur à 50% est nommé chitosane, au-delà, un composé ayant un degré d'acétylation supérieur à 50% est nommé chitine. Nos résultats montrent que DA de crevettes est 59.75% DA de Calamars est 64.03% et DA de criquets est 60.7% tous sont supérieur à 50% cela confirmer la pureté de la chitine extraite.

III. Analyse ultrafine de la texture tridimensionnelle du polymère de la chitine

D'après **kaya et al,2015** la chitine d'insecte caractérisée par des pores et des fibres à la surface.

Selon Isa et al,2012 montré que la surface de la chitine des crevettes a peu de matériau fibrillaire et granulaire.

Et Notre résultat montre que la structure de la chitine extraite à partir de crevette caractérisée par des granules et des fibres et la chitine de plume de calamar a une structure fibreuse, et les deux n'ont pas de pores.

Et pour la structure de la chitine de criquet est caractérisée par la présence de nanofibres et de pores ensembles.

Selon Kaya et al,2015 la chitine peut être regroupée en quatre formes distinctes selon la morphologie de surface.

- La première forme est une morphologie de surface lisse sans fibres et pores de l'ordre de nanomètre.
- La seconde forme se compose de nanofibres mais pas de pores.
- La troisième forme a nanofibres et pores ensemble.
- La quatrième forme affiche deux types de pores de tailles différentes (l'un est grand et l'autre est petite) en combinaison avec des nanofibres.

Dans cette étude la chitine de criquet classé dans la troisième forme.

IV. Activité antimicrobienne du chitosane

La comparaison entre les résultats de l'acide acétique seul et les résultats de l'acide acétique + chitosane, révèle que l'activité antibactérienne du chitosane est montré que ce biopolymère a un effet inhibiteur sur toutes les souches pathogènes testées. L'activité antimicrobienne nécessite des concentrations élevées de chitosane pour qu'elle soit efficace (les concentrations $\geq 0.06\%$), plus la concentration de chitosane est élevée plus l'activité antimicrobienne est observée (**Zheng et Zhu., 2003 ; Sekiguchi et al., 1994**).

Les diamètres d'inhibition respectifs contre les souches testées étaient de 15mm pour *E. coli*, 13mm pour *Staphylococcus aureus* (Tableau 04). Ces résultats ont également montré que le chitosane présente une activité antibactérienne efficace contre les bactéries gram- (*E. coli* est plus sensibles au chitosane) (**Chen et Liu et al, (1998)** par rapport aux bactéries gram+ (*S. aureus*) qui montrent une sensibilité moyenne.

Selon **Rabea et al, 2003**, le chitosane, de par sa nature cationique, interagirait avec la paroi cellulaire anionique des microorganismes (interactions électrostatiques). Le chitosane adhère facilement aux cellules microbiennes puisque les amines chargées positivement agissent avec les charges négatives sur la membrane des cellules libérant ainsi les constituants intracellulaires.

Selon **Abdulhadi Aljawish, 2018**, concernant l'activité fongique de chitosane, la croissance d'*Aspergillus* est inhibée par l'addition de **chitosane**. Malheureusement, dans notre étude le teste antifongique effectué n'a pas produit des résultats satisfaisants à cause des contaminations dans la boite de pétri.

Conclusion et Perspective

Dans ce travail, et selon nos expériences pour extraire la chitine à partir un type d'orthoptère, nous avons démontré que les criquets forment une source importante de chitine, et c'était notre principal objectif.

Des réactions de déminéralisation et de déprotéinisation sur trois espèces (les crevettes, les calamars et les criquets) ont permis d'obtenir la chitine par la méthode chimique, une autre méthode a été utilisé sur les criquets c'est la méthode biologique par l'utilisation d'une enzyme protéase. Le rendement de l'hydrolyse enzymatique était le plus grand. Nous avons caractérisé la chitine par deux techniques : la Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier qui nous a montré que la chitine des crevettes et des criquets est de type alpha par contre la chitine des calamars est de type beta, cette technique nous a permis aussi de calculer le DDA et le DA des chitines extraites, DA de chitine des crevettes est 59.75%, DA de chitine de calamars est 64.03% et DA de chitine des criquets est 60.7%, le degré de désacétylation des trois échantillons est inférieur à 50% et cela confirmer la pureté de chitine. La deuxième technique utilisée c'est la microscopie électronique à balayage, grâce à laquelle nous avons pu observer la similarité entre la structure de la chitine des crevettes et la chitine criquets les deux possèdent des granules et des fibres par contre dans la micrographie de chitine de calamar on observe que des fibres.

Cette chitine a été traité par des solutions concentrés de NaOH pour déclencher la réaction de désacétylation et obtenir le chitosane. Nous avons testé l'efficacité de chitosane contre 3 souches microbiennes l'E. coli, staphylococcus et le champignon aspergillus pour montrer que la chitine extraite est de bonne qualité et peut être utilisé dans le domaine médical et cosmétique comme antimicrobien. Les résultats du test antibactérien ont montré que le chitosane présente une activité antibactérienne efficace contre les bactéries gram- par rapport aux bactéries de gram+. Malheureusement l'activité antifongique n'est pas marquée à cause des contaminations.

Par conclusion, les criquets peuvent être une source permanente et alternative pour la production de ce biopolymère par rapport à la chitine commerciale extraite des crustacés, nous espérons qu'il sera exploité et que sa production sera développée, notamment en Algérie.

On aurait souhaité développer d'avantage cette exploration Par d'autres analyses telle que :

- La Diffraction des rayons X.
- Les analyses physico chimiques.
- L'activité anti-oxydantes.
- Refaire l'activité antifongique

Mais malheureusement on a pas eu le temps et nous étions en retard.

Références bibliographiques :

1. Bornet A, Teissedre PL. Applications and interest of chitin, chitosan and their derivatives in enology. *OENO One*. 31 déc 2005;39(4):199.
2. Zainol Abidin NA, Kormin F, Zainol Abidin NA, Mohamed Anuar NAF, Abu Bakar MF. The Potential of Insects as Alternative Sources of Chitin: An Overview on the Chemical Method of Extraction from Various Sources. *Int J Mol Sci*. 15 juill 2020;21(14):4978.
3. Arbia W, Arbia L, Adour L, Amrane A. Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods – A Review. 2013;14.
4. Santos VP, Marques NSS, Maia PCSV, Lima MAB de, Franco L de O, Campos-Takaki GM de. Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *IJMS*. 16 juin 2020;21(12):4290.
5. Barikani M, Oliaei E, Seddiqi H, Honarkar H. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. *Iran Polym J*. avr 2014;23(4):307-26.
6. Triunfo M, Tafi E, Guarnieri A, Scieuzo C, Hahn T, Zibek S, et al. Insect Chitin-Based Nanomaterials for Innovative Cosmetics and Cosmeceuticals. *Cosmetics*. juin 2021;8(2):40.
7. Nwe N, Furuike T, Tamura H. Isolation and Characterization of Chitin and Chitosan from Marine Origin. In: *Advances in Food and Nutrition Research* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 9 juin 2022]. p. 1-15. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128002698000014>
8. Hassainia N, OBTENTION DU BIOPOLYMERE « CHITINE » A PARTIR DU CHAMPIGNON « AGARICUS BISPORUS » : EXTRACTION ET CARACTERISATION [thèse de doctorat en génie de procédés]. [Université 8 Mai 1945 Guelma].
9. Franche-Comté. Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application. Presses Univ; 2009. 310 p.
10. Boca Raton: Taylor & Francis. Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives: biological activities and applications; 2011. 643 p.
11. BEREZINA N, HUBERT A, LEVON jean, le roux K, SOCOLSKY C, SANCHEZ L, et al. chitine,hydrolysats et procede de production de produit(s) d'interet par hydroluse enzymatique avec traitement prealable avec un agent oxydant. 30 déc 2015;57.
12. Symmons PM, Cressman K. Directives sur le Criquet pèlerin 1. Biologie et comportement. :26.
13. Lecoq M. Module de formation sur la biologie et l'écologie du Criquet pèlerin. :218.
14. Mallamaire A, Roy J. La lutte contre le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria* Forsk.) en Afrique occidentale française. :121.

15. afbarthropodes [licensed for non-commercial use only] / Famille des Acrididae et apparentés (Criquets) [Internet]. [cité 1 août 2022]. Disponible sur: <http://afbarthropodes.pbworks.com/w/page/40466235/Famille%20des%20Acrididae%20et%20apparent%C3%A9s%20%28Criquets%29>
16. Karine LR. Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé. UNIVERSITÉ DE NANTES FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES; 2012.
17. Jantzen da Silva Lucas A, Quadro Oreste E, Leão Gouveia Costa H, Martín López H, Dias Medeiros Saad C, Prentice C. Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects. *Food Chemistry*. mai 2021;343:128550.
18. Chitin - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cité 6 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/chitin>
19. Djelad A. P RÉPARATION DES MATERIAUX COMPOSITES CHITOSANE - ZEOLITHES. APPLICATION DANS L'ADSORPTION DU CUIVRE. UNIVERSITE D'ORAN; 2010.
20. Muthukrishnan S, Mun S, Noh MY, Geisbrecht ER, Arakane Y. Insect Cuticular Chitin Contributes to Form and Function. *CPD*. 4 sept 2020;26(29):3530-45.
21. Lee CG. Chitin, Chitinases and Chitinase-like Proteins in Allergic Inflammation and Tissue Remodeling. *Yonsei Med J*. 2009;50(1):22.
22. Moeini A, Pedram P, Makvandi P, Malinconico M, Gomez d'Ayala G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*. avr 2020;233:115839.
23. Mohandas A, Deepthi S, Biswas R, Jayakumar R. Chitosan based metallic nanocomposite scaffolds as antimicrobial wound dressings. *Bioactive Materials*. sept 2018;3(3):267-77.
24. Lopes J, Correia M, Martins I, Henriques AG, Delgadillo I, da Cruz e Silva O, et al. FTIR and Raman Spectroscopy Applied to Dementia Diagnosis Through Analysis of Biological Fluids. *JAD*. 23 mai 2016;52(3):801-12.
25. Saravanan S, Leena RS, Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. déc 2016;93:1354-65.
26. Younes I, Rinaudo M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar Drugs*. 2 mars 2015;13(3):1133-74.
27. Kaya M, Baran T, Erdoğan S, Menteş A, Aşan Özüsağlam M, Çakmak YS. Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Materials Science and Engineering: C*. déc 2014;45:72-81.

28. BEREZINA nathalie, HUBERT antoine, LEVON jean, le roux karine, SOCOLSKY cecilia, SANCHEZ lorena, et al. chitine,hydrolysate et procede de production de produit(s) d'interet par hydroluse enzymatique avec traitement prealable avec un agent oxydant. 30 déc 2015;57.
29. le roux karine, bergé jean-pascal, baron régis, le roy eric, arhallass abdellah. extraction of s chitins a single step by enzymatic hydrolysis in an acid medium. :41.
30. Zhang M, Zhang F, Li C, An H, Wan T, Zhang P. Application of Chitosan and Its Derivative Polymers in Clinical Medicine and Agriculture. *Polymers*. 28 févr 2022;14(5):958.
31. Scanning Electron Microscope A To Z. :32.
32. Sghaier Ch, Philippe M, ISARA L. Chitosan: a new antimicrobial agent for the meat sector. 2009;183.
33. Guarnieri A, Triunfo M, Scieuzo C, Ianniciello D, Tafi E, Hahn T, et al. Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*. *Sci Rep*. déc 2022;12(1):8084.

Annexes
Annexe I

III. Instruments et produits

- Pour les instruments nous avons utilisé :
- Spectre infrarouge à transformée de Fourier.



Spectre FTIR

- Microscope électronique à balayage.



Microscope électronique à balayage.

- Pour les produits nous avons utilisé :
 - Acide chlorhydrique HCl.
 - Hydroxyde de sodium NaOH.
 - Eau déminéralisé.
 - Acide phosphorique.
 - Méthanol.
 - Chloroforme.

Annexe II

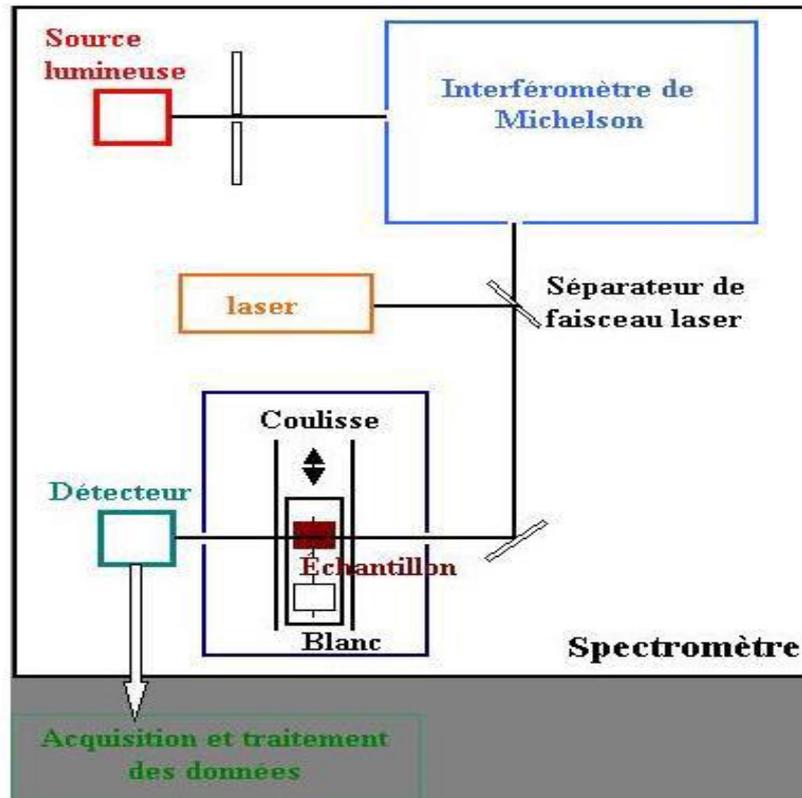


Schéma représente le principe de spectromètre infrarouge par transformée de Fourier.

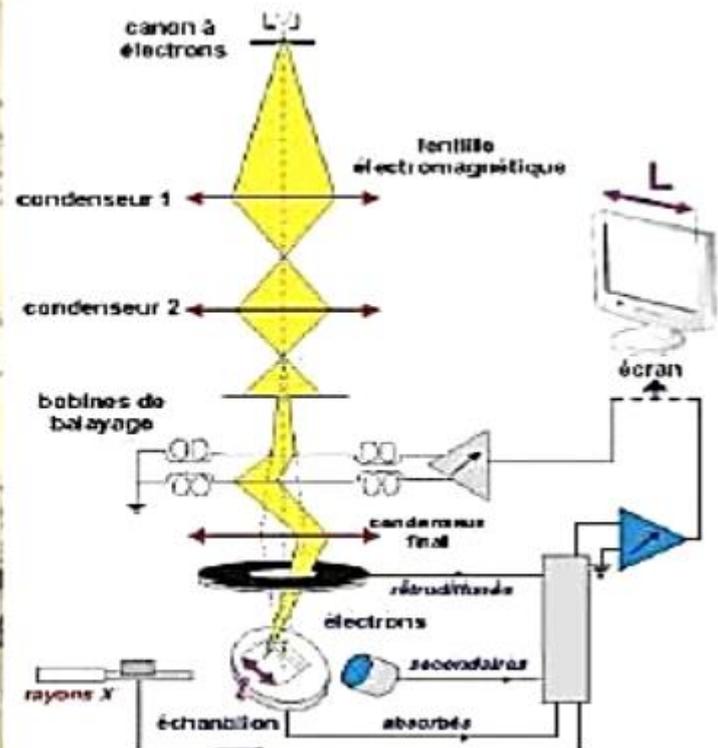


Photo de la coupe d'un MEB et schéma de fonctionnement

Annexe III

Glossaire

1. Antibactérienne : Substance active contre les bactéries.
2. Antifongique : Substance a la capacité de traiter les mycoses, c'est à dire des infections causés par des champignons.
5. Biocompatible : compatible avec un organisme vivant.
6. Biodégradable : il peut être décomposé (digéré) naturellement par des organismes vivants.
8. Biopolymère : Toute macromolécule d'un être vivant qui résulte de la polymérisation de petites unités.
10. Chitine : Substance organique azotée qui constitue le principal élément des exosquelettes des insectes, des crustacés
11. Degré de désacétylation (DDA) : rapport entre le nombre de motifs comportant un groupement acétyle sur le nombre de motifs dans la molécule.
13. Exosquelette : Formation squelettique externe de certains animaux d'invertébrés comme les insectes, les crustacés ou les mollusques.
14. Glucosamine : **La glucosamine est formée par l'organisme à partir du glucose et de la glutamine.** Elle fait partie de la famille des sucres aminés et sa structure moléculaire est proche du glucose

Annexe IV

Les milieux de culture utilisés

- **La gélose Mueller-Hinton** : pour tester l'action de chitosane sur les bactéries
- **Sabouraud** : pour tester l'action de chitosane sur les champignons

Les souches utilisées

E. coli, staphylocoque et aspergillus braziliensis pour comparer le pouvoir antibactérien et antifongique de chitosane.

- ✓ **E. coli** : *Escherichia coli* est classée comme bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet

dans la famille Entérobactéries. C'est un paradigme pour une espèce bactérienne polyvalente qui comprend des commensaux inoffensifs ainsi que différentes variantes pathogènes avec la capacité de causer des maladies intestinales ou extraintestinal chez l'homme et de nombreux hôtes animaux. En raison de ce large éventail de modes de vie et de phénotypes, E. coli est un organisme modèle bien adapté pour étudier l'évolution bactérienne et l'adaptation à différentes conditions et niches de croissance.

- ✓ **Staphylococcus aureus** : Les staphylocoques sont des bactéries Gram-positives, non sporulées, facultativement anaérobies, non motiles, catalases-positives ou négatives, sont l'une des causes les plus fréquentes d'infection cutanée. Il existe de nombreux types d'infections staphylococciques de la peau. La moins grave est la folliculite, une infection d'une racine de cheveux qui produit un bouton légèrement douloureux à la base d'un cheveu. La plupart de ces infections sont mineures (boutons et furoncles) ; cependant, les bactéries Staphylococcus peuvent également causer des infections graves. Impétigo provoque peu profonde.
- ✓ **Aspergillus brasiliensis** : *Aspergillus* section Nigri a un impact important sur la société moderne. De nombreuses espèces causent la détérioration des aliments, et plusieurs sont utilisées dans l'industrie de la fermentation pour produire des enzymes hydrolytiques, comme les amylases ou les lipases, et des acides organiques, comme l'acide citrique et l'acide gluconique. Ils sont également candidats.