

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE SAÏDA - Dr MOULAY TAHAR



FACULTE DES SCIENCES
Département de Chimie

MEMOIRE

Présenté par :

AMER Abdelazize

ET KERBOUCHE Kouider

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master en Chimie

Spécialité : Chimie Inorganique

Thème

**Etude de l'activité antibactérienne
des matériaux à base de Chitosane**

Soutenu le 14/07/2021, devant le jury composé de :

Présidente	P ^f A.RAMDANI	<i>Professeur</i>	<i>Université de Saida</i>
Encadrant	D ^f ZAOUI Fatiha	<i>MCA</i>	<i>Université de Saida</i>
Examinatrice	D ^f A.AMAME	<i>MCA</i>	<i>Université de Saida</i>

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier Dieu avant tout.

Nous remercions toutes les personnes qui ont été impliquées directement ou indirectement à la réalisation de ce mémoire, et qui l'ont rendu à la fois scientifiquement et humainement passionnante.

En premier lieu, nous tenons à remercier chaleureusement notre encadreur Dr Zaoui Fatiha, maître des conférences à l'université de Saida, pour sa disponibilité, et sa guidance.

Nous remercions également Dr A. AMAME docteur en microbiologie à l'université Dr. MOULAY Tahar à Saida pour son expertise dans le domaine biologique et pour ses commentaires constructifs et ses connaissances qu'il nous a transmises et qui ont été essentiels à la réalisation de notre travail, et d'avoir accepté d'examiner ce travail. Un grand merci à madame RAMDANI AMINA professeur à l'université Dr. MOULAY Tahar à Saida pour l'honneur qu'elle a fait en présidant ce jury.

Nous désirons aussi remercier les enseignants du département de chimie de la faculté des sciences de l'Université de Moulay Tahar de Saida, qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Dédicaces

A nos chers parents

A nos chers frères et sœurs

A tous nos Amis

A tous ceux qui nous sont chers

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

INTRODUCTION GENERALE..... 1

Chapitre I: Aperçu théorique sur l'argile

I.1.Introduction..... 2

I.2. l'origine de l'argile..... 2

I.3. Définition de l'argile :..... 3

I.4. structure de minéraux argileux :..... 3

 I.4.1.La couche tétraédrique :..... 4

 I.4.2 .La couche octaédrique :..... 5

I.5. Propriétés des minéraux argileux :..... 5

 I.5.1 .La surface spécifique :..... 5

 I.5.2.Hydratation et gonflement :..... 6

 I.5.3. Capacité d'échange cationique(CFC) :..... 6

 I.5.4. Espace Interfoliaire :..... 6

Références 7

CHAPITRE II : Aperçu Théorique Sur La Chitosane

II.1. Introduction : 10

II-2-Définition : 10

II-3-Propriétés du chitosane : 11

II-4-Application du chitosane : 11

 II-4-1-Application en médecine : 11

 II-4-2-Application en protection des cultures : 12

 II-4-3-Colle industrielle : 12

 II-4-4-Traitement des eaux usées : 12

 II-4-5-Efficacité controversée : 12

 II-4-6-Production et marché : 13

Conclusion..... 13

Références 14

CHAPITRE III : Le mode des bactéries et activité antibactérienne

III.1 Introduction	16
III.2.Définition des bactéries :	16
III-3- Structure d'une cellule bactérienne :	16
III-4 Les différents types de bactéries :	17
III-4-1- Bactéries à Gram positif :	17
III-4-2- Bactéries à Gram négatif :	18
III-5-Croissance des bactéries :	19
III-6-Infection bactériennes :	20
III-7- L'effet antibactérien :	20
III-8-Activité anti bactérienne.	20
III.8.1. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne.....	20
III.8.1.1. Méthodes de diffusion sur agar	21
III.8.1 .2Méthodes de détermination de la concentration minimale inhibitrice :	21
III.8.1.3. Méthode de porte germe	21
III.8.2.Propriétés antibactériennes du chitosane.....	22
III.8.2.1 Mécanisme antibactérien du chitosane	22
III.8.2.2. Effet sur la membrane bactérienne	22
Conclusion :	23
Références	24

CHAPITRE IV : Partie Expérimentale et Résultats.

IV.1 Introduction :	22
IV.2. Méthodes de caractérisations	22
IV.2.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)	22
IV.2.2.Diffraction des rayons X (DRX).....	23
IV.2.3. La spectrométrie de fluorescence des rayons X.....	24
IV.3.Préparation des matériaux composites	25
IV.3.1. Réactifs Utilisés	25
IV.3.2.Protocole de préparation	25
IV.3.3. Caractérisation des matériaux composites :	26
IV.3.3.1. Analyse chimique par fluorescence X :	26

IV.3.3.2. Analyse DRX :.....	27
IV.3.3.3. Analyse spectroscopique Infra Rouge :	28
Conclusion	
IV.3.4. Etude de l'activité antibactérienne	31
IV.3.4.1 Milieux de culture :	31
IV.3.4.2 Préparation de l'inoculum :.....	31
IV.3.4.2.1. La méthode par diffusion :	32
Conclusion.....	35
Références	36
Conclusion générale	37

LISTES DES FIGURES

N°	Titre	Page
Chapitre I : Aperçu théorique sur l'argile		
1	Altération des silicates	2
2	Schéma général de formation et d'évolution de roches	3
3	Représentation schématique de l'empilement des feuillets unitaires dans une argile (cas d'une smectite)	4
4	Eléments structuraux les tétraèdres	4
5	Eléments structuraux : les octaèdres	5
6	variation du rapport surface/volume en fonction u diamètre des particule	5
7	Argile gonflante	6
Chapitre II : Aperçu Theorique Sur La Chitosane		
1	La crevette	10
Chapitre III : Le mode des bactéries et activité antibactérienne		
1	Exemples de bactéries couramment rencontrées dans lanature	16
2	Morphologie des bactéries.	17
3	Paroi bactéries à Gram positif.	18
4	Paroi des bactéries à Gram négatif	19
Chapitre IV : Partie Expérimentale et Résultats.		
1	Représentation schématique d'un diffractomètre	23
2	Représentation schématique du principe d'un diffractomètre	24
3	Représentation schématique de la fluorescence X.	25
4	Principe d'intercalation du Chitosane dans les argiles	26
5	Diffractogramme de rayon X D'argile chitosane	27
6	Diffractogramme de rayon X D'argile Thiosulfate chitosane	27
7	Diffractogramme de rayon X D'argile sodé	28
8	Spectre Infrarouge de l'argile chitosane	28
9	Spectre Infrarouge de l'argile sodé chitosane	29
10	Spectre Infrarouge de l'argile thiosulfate chitosane	29
11	Spectre Infrarouge de l'argile sodé chitosane	29
12	Milieu de culture dans des boites de pétri	31
13	ensemencement	32
14	Tests de zone d'inhibition des matériaux adsorbants contre Staphlococcus	33
15	Tests de zone d'inhibition des matériaux adsorbants contre l'echerichia . coli	33
16	Tests de zone d'inhibition des matériaux adsorbants contre pseadomonas zeogenose	34
17	Tests de zone d'inhibition des matériaux adsorbants contre bacillus subtilis.	34

LISTES DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
01	Analyse chimique par fluorescence X pour les trois argiles modifié	26
02	résultats de l'évaluation de l'activité	34

INTRODUCTION

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Depuis plusieurs années, les polymères d'origine naturelle suscitent un intérêt important dans divers secteurs de la technologie chimique. Parmi ces polymères, ceux issus de la biomasse et tout particulièrement les polysaccharides ont connu un développement remarquable, grâce en particulier à leur image très positive de matériaux biocompatibles, biodégradables et ne présentant aucun danger pour la santé et l'environnement [1-2]. L'un des polymères de cette série étant le chitosane, obtenu par déacétylation de la chitine qui est elle-même extraite de la carapace des crustacés.

La préparation de nouveaux matériaux biodégradables et bioactifs, composés de polymères de polysaccharide renforcés par des argiles préalablement modifiées par intercalation avec des molécules réputées pour leur activité biologique est un domaine de recherche d'actualité [3-4].

En plus l'intérêt qu'on accorde aujourd'hui à l'étude des argiles, se justifie surtout par ces propriétés hydrophobiques et organophyliques très importantes [5]. Sa modification par le bio polymère connu sous le nom de chitosane est de plus en plus utilisée pour récupérer et éliminer des polluants présents dans les effluents industriels et présente une bonne activité antibactérienne [6].

Dans ce contexte, cette étude a été menée dans le but d'étudier l'activité antibactérienne des matériaux synthétisés à partir de l'argile et le chitosane .

Ce travail est structuré en trois parties :

La première partie est une synthèse bibliographique sur l'argile, chitosane, bactéries et activité antibactérienne.

La deuxième partie présente l'ensemble des expériences de l'étude de l'activité antibactérienne effectuée dans le laboratoire de biologie.

La troisième partie du travail concerne la présentation des résultats obtenus et interprétation.

En fin on termine par une conclusion générale et perspective.

Introduction générale

Références

- [1] Sanford , P.A. , 1989. Chitosan : Commercial uses and potential applications
- [2] Younes , I. , & Rinaudo , M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources . Structure , Properties and Applications . Marine Drugs , 13 (3) , 1133–1174 . a on Biomedical
- [3] Cui Z , S Nair L. Chitosan : versatile biomedical polymer . Recent Patents Engineering . ; 3 (3) : 129-137,2010 .
- [4] Venkatesan , J .; Kim , S.K. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview . Mar. Drugs , 8 2262–2266 , 2010 .
- [5] Abdelhadi EL HACHMI (2013). Argile et minéraux argileux: propriétés physico-chimiques et propriétés et propriétés colloïdales. Université Abdelmalek Essaadi - Master fondamentale Chimie 2013.
- [6] B. Velde. Chapter 2: Composition and Mineralogy of Clay Minerals, in "Origin and Mineralogy of Clays, Clays and Environment" Ed Springer, (1995), 8

Chapitre I

Aperçu théorique sur l'argile

I.1.Introduction

Les argiles sont utilisables pour différentes applications. En plus de fabriquer des matériaux de construction, ils sont utilisés comme exemple, pour le développement de matériaux polymères ou le raffinage de l'huile alimentaire, grâce à leurs propriétés micro et macroscopiques, les argiles et en particulier les Smétites jouent également un rôle important dans le stockage des déchets. A cet égard, le clash de claire neige a des propriétés intéressantes pour constituer un barrière étanche autour des déchets. En contact avec les eaux souterraines, le barrière d'argile va satisfaire progressivement. Ses propriétés physico-chimiques évolueront pendant cette phase de saturation. En particulier, le spectre de porosité de l'argile sera profondément modifié [1]. L'argile utilisé dans le travail est connu sous le nom de "Bentonite". Il fait généralement référence à une poudre minérale constituée essentiellement de Montmorillonite (famille de smectisite). Dans leur état naturel, la plupart des dentices de bentonite sont hétérogènes; Ils sont constitués de perturbation ou d'une timitation d'étanchéité ou d'irabotés et d'autres impuretés [2].

I.2. l'origine de l'argile

L'origine des argiles peut être attribuée à différents processus, tels que l'altération physique et chimique, le dépôt in situ et les processus hydrothermaux. La Figure 1 montre les degrés d'altération des différents silicates. A noter que si la plupart des minéraux sont attaqués, le quartz est particulièrement résistant et sera peu affecté par les intempéries. Il convient également de noter que les minéraux tels que le quartz, la muscovite, le feldspath, la biotite, l'amphibole et les plagioclases sont les principaux constituants du granite, tandis que le basalte est constitué de pyroxène, d'olivine et de plagioclase de calcium. C'est pourquoi le granit résiste mieux aux différents processus d'altération que le basalte [3].

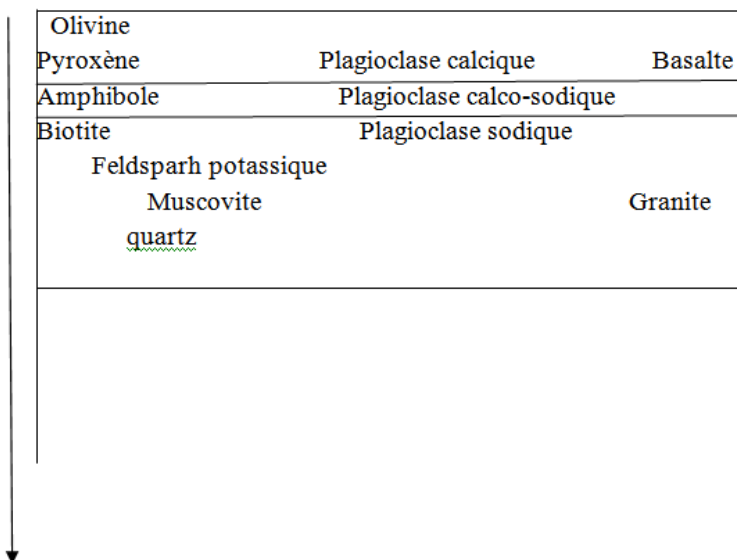


Figure 1 : Altération des silicates

Un exemple de l'altération des roches est montré sur la figure 2. On peut observer que le granite se décompose en un mélange de sable (quartz très peu altérable) et d'argiles. En effet, les minéraux silicatés autres que le quartz sont altérés progressivement en argiles.

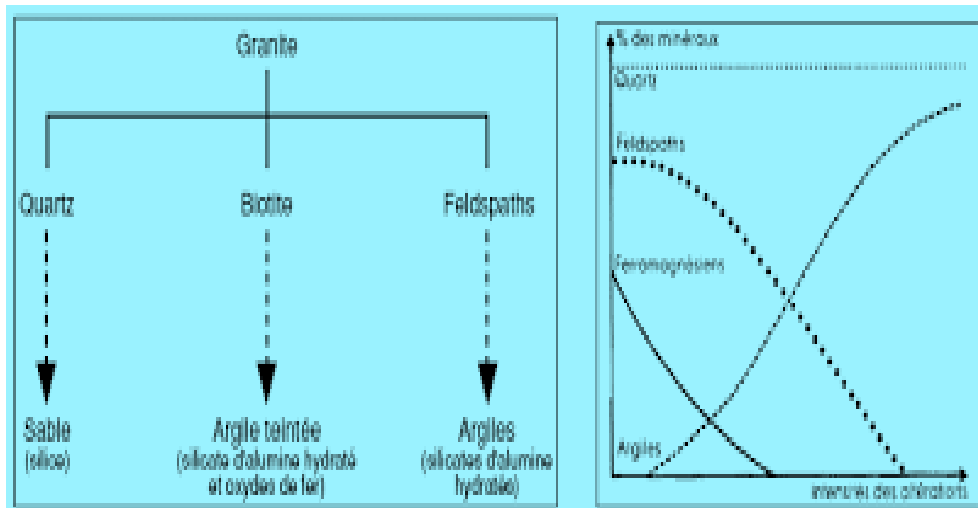


Figure 2: Schéma général de formation et d'évolution de roches.

I.3. Définition de l'argile :

L'argile est un matériau inorganique, connu depuis l'antiquité donc des utilisations industrielles ont également été faites sur sa structure cristalline et ses propriétés physico-chimiques. Les développements scientifiques et techniques et les progrès technologiques et sociaux qui en découlent ont donné lieu à une croissance économique qui nécessite l'utilisation de grandes quantités d'argile. Cela a donné lieu à de nombreux travaux afin de développer l'efficacité des matières premières argileuses et d'étudier leurs applications industrielles possibles. Actuellement, l'argile est utilisée soit à l'état brut ou naturel, soit après avoir subi un traitement. Les différents traitements comprennent le pontage et l'activation [4]. L'argile est une roche secondaire résultant de la décomposition d'autres matériaux grâce à ses propriétés, la roche argileuse peut être utilisée comme matériau premier dans la fabrication de céramiques, porcelaines, briques et tuiles. Il est également utilisé dans l'industrie du papier peint et dans les puits de pétrole [5].

I.4. structure de minéraux argileux :

Les cristallites d'argile sont formées d'un empilement parallèle de feuillets élémentaires dont le squelette est essentiellement constitué d'oxygène et d'ions hydroxyles. Les cations beaucoup plus petits se logent dans les cavités squelettiques [6]. Les minéraux argileux sont constitués d'un empilement de structure bien définie, séparés par des intervalles appelés espace interfoliaire [7]. La Figure 3 explique la terminologie utilisée pour définir la structure des argiles. Il existe quatre niveaux d'organisation : Les plans : sont constitués d'atomes. Couches : association de deux plans d'atomes d'oxygène et d'hydroxyle formant des couches de tétraèdres ou des couches d'octaèdres. Les feuilles correspondent à la combinaison de couches. « L'espace interfoliaire :

c'est le vide séparant deux feuillets de même structure, il peut être occupé par des cations (éventuellement hydratés). Cristal : résulte de l'empilement de plusieurs couches [8].

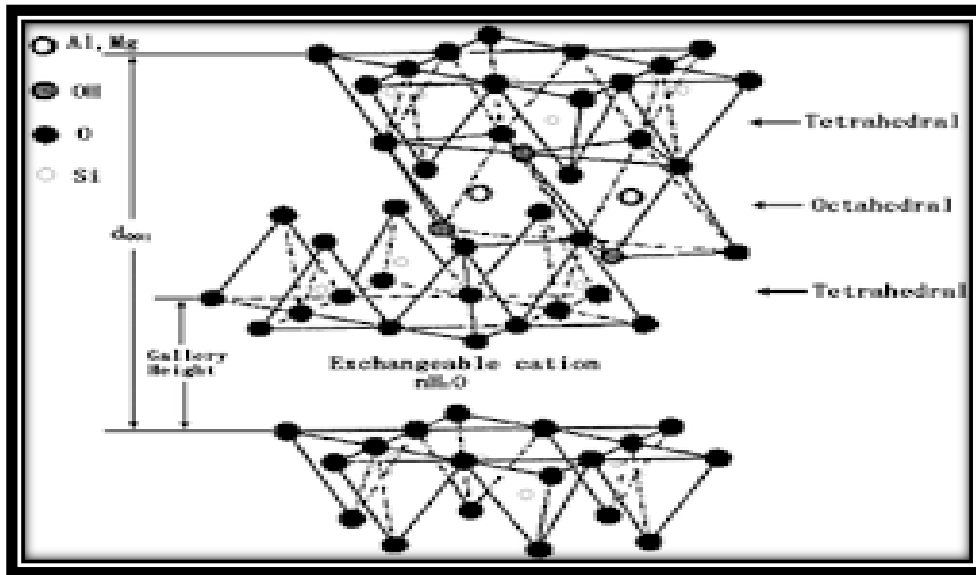


Figure 3 : Représentation schématique de l'empilement des feuillets unitaires dans une argile (cas d'une smectite).

I.4.1. La couche tétraédrique :

Il est formé de silice tétraédrique, c'est-à-dire d'un cation Si^{4+} entouré de quatre anions O^{2-} , qui constituent les sommets du tétraèdre. Chaque tétraèdre partage trois atomes d'oxygène avec des tétraèdres adjacents. Ces atomes d'oxygène partagés sont disposés dans un réseau hexagonal qui forme la base de la couche. L'équilibre des charges positives et négatives présentes dans cette structure n'est pas neutre. En effet, chaque tétraèdre est formé d'un cation Si^{4+} et de trois anions O^{2-} qui forment la base du feuillet et qui appartiennent également à un tétraèdre adjacent, et d'un quatrième anion O^{2-} qui n'est pas partagé. Le solde des charges est alors : $4 + 3 \times (-2) / 2 + (-2) = -1$. L'électro neutralité de la couche est obtenue par la liaison avec une couche chargée positivement, par la présence d'ions compensateurs à la surface de la couche, ou en ajoutant un proton H^+ sur de l' O^{2-} . L'épaisseur de cette couche tétraédrique est de 4.63 \AA

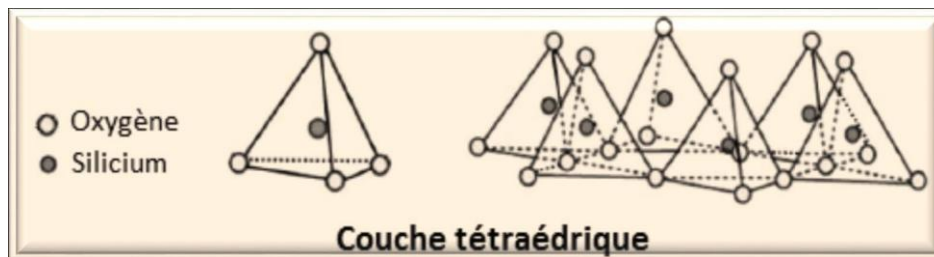


Figure 4: Eléments structuraux les tétraèdres.

I.4.2 .La couche octaédrique :

Il se compose d'un cation Al^{3+} ou Mg^{2+} entouré de six groupes OH hydroxyle. Ces octaèdres sont reliés entre eux par des anions communs et forment une couche plate. Le bilan de charge est de +3 pour le cation Al^{3+} et de -1 pour le groupe hydroxyle, mais chaque OH^- est partagé avec trois cations, ce qui donne : $+3 + 6 \times (-1) / 3 = +1$. Pour atteindre l'électro neutralité, seuls deux sites octaédriques sur trois sont occupés par un cation Al^{3+} ; c'est ce qu'on appelle une couche de gibbsite di-octaédrique. Dans le cas du cation Mg^{2+} , lorsque tous les sites sont occupés, la couche devient neutre. La couche octaédrique a une épaisseur de 5,05 .

Enchaînement Octaédrique

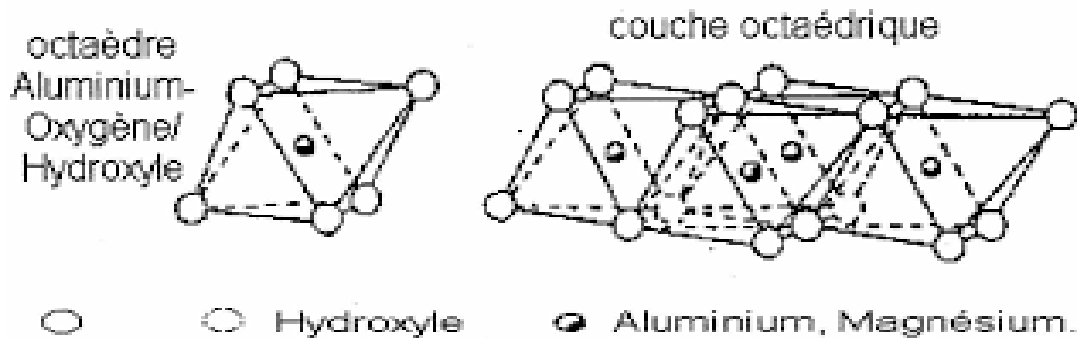


Figure 5 : Eléments structuraux : les octaèdres.

I.5. Propriétés des minéraux argileux :

I.5.1 .La surface spécifique :

La surface spécifique (SS) appelée aussi « Aire massique » représente la surface totale (AS) par unité de masse (M) et on l'exprime généralement en m^2/g [9] :

$S_s = A_s / M$ La fine taille des minéraux argileux leur confère une surface importante par rapport au volume des particules. La surface relative augmente avec la diminution du diamètre.

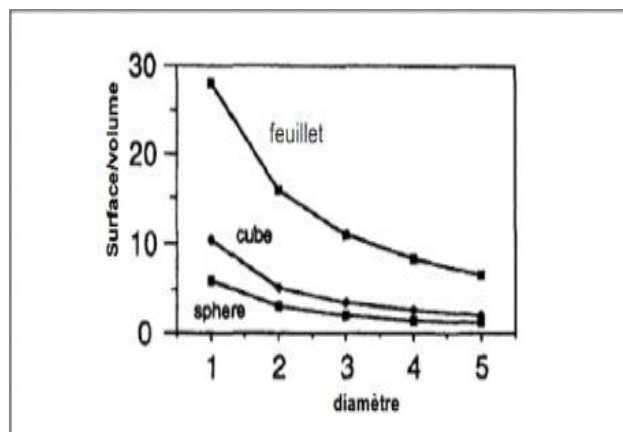


Figure 6: variation du rapport surface/volume en fonction u diamètre des particule.

I.5.2. Hydratation et gonflement :

Les processus d'absorption d'eau dans la structure des argiles sont complexes et peuvent être décrits de l'état sec à l'état hydraté ou de l'état hydraté à l'état sec. Mais ces deux séquences ne décrivent pas le même phénomène et il s'ensuit que les mécanismes sont différents lorsque l'on étudie l'hydratation ou la déshydratation. L'étude des isothermes d'adsorption montre l'existence d'hystérésis, ce qui montre que les mécanismes d'hydratation et de déshydratation ne sont pas totalement réversibles.

Les minéraux argileux se caractérisent généralement à des degrés divers selon la nature de la famille, par leur capacité d'adsorption d'eau. Cette eau existe sous de nombreuses formes : adsorbée sur les surfaces externes ou associée à des cations interfoliaires ou cristalline sous forme d'hydroxyle (OH), dont l'élimination se fait par déshydroxylation. [10].

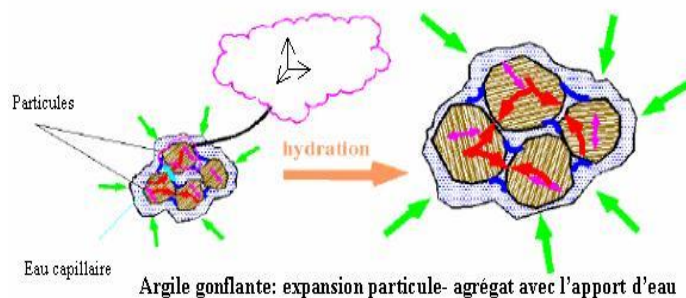


Figure 7: Argile gonflante.

I.5.3. Capacité d'échange cationique (CEC) :

Les atomes de valence substitués dans les couches octaédriques ou tétraédriques par d'autres atomes de valence inférieure, créent dans la feuille une charge globalement négative. La compensation de cette charge est assurée par des cations échangeables, localisés dans l'espace intrafoliaire [11]. La montmorillonite oscille généralement (CEC) entre 70 et 120 meq/100g [12].

I.5.4. Espace Interfoliaire :

L'espace interfoliaire des argiles est plus accessible et permet des phénomènes de nature physico-chimique qui donnent lieu à tous les phénomènes de gonflement et d'échange qui sont typiques des argiles (parfois de certains mica) [13].

Les espaces entre les feuilles peuvent être vides ou remplis : Ils sont vides lorsque les différents feuillets sont neutres et liés entre eux par des liaisons hydrogène dans le cas d'espèces 1:1, ou par des liaisons de Van Der Waals dans le cas de minéraux 2:1 [14].

Ils sont occupés par des cations dès que les couches du bâtiment présentent un déficit de charge suite à des substitutions isomorphes. Ces cations restaurent l'électro-neutralité du système et assurent en même temps la liaison entre les feuillets adjacents, ici de nature ionique [15].

Références bibliographiques

- [1] Montes-Hernandez, G. (2002). Etude expérimentale de la sorption d'eau et du gonflement des argiles par microscopie électronique à balayage environnementale (ESEM) et l'analyse digitale d'images (Doctoral dissertation, Université Louis Pasteur (Strasbourg)).
- [2] Lamia, M. D. Y. purification et caractérisation de l'attapulgite algérienne. Application à l'adsorption du bleu de méthylène.
- [3] Youcef, L. D. (2012). Purification et caractérisation de l'attapulgite Algérienne. Application à l'adsorption du bleu de méthylène, Mémoire of Magister.
- [4] Chenchouni, H. (2009, November). Place des argiles dans la caractérisation écopédologique du Chott de Djendli (Batna, Algérie) et mise en évidence de la relation salinité-répartition des halophytes. In Proceedings of the 3rd Maghreb Symposium on Clays 'SMA (Vol. 3, pp. 23-25).
- [5] Kadirvelu, K., Karthika, C., Vennilamani, N., & Pattabhi, S. (2005). Activated carbon from industrial soil
- [6] Garg, V. K., Gupta, R., Yadav, A. B., & Kumar, R. (2003). Dye removal from aqueous solution by adsorption on treated sawdust. *Bioresource technology*, 89(2), 121-124.
- [7] Goudarzi, A., Aval, G. M., Sahraei, R., & Ahmadpoor, H. (2008). Ammonia-free chemical bath deposition of nanocrystalline ZnS thin film buffer layer for solar cells. *Thin Solid Films*, 516(15), 4953-4957.
- [8] Goudarzi, A., Aval, G. M., Sahraei, R., & Ahmadpoor, H. (2008). Ammonia-free chemical bath deposition of nanocrystalline ZnS thin film buffer layer for solar cells. *Thin Solid Films*, 516(15), 4953-4957.
- [9] Ma, J., Yu, F., Zhou, L., Jin, L., Yang, M., Luan, J., ... & Chen, J. (2012). Enhanced adsorptive removal of methyl orange and methylene blue from aqueous solution by alkali-activated multiwalled carbon nanotubes. *ACS applied materials & interfaces*, 4(11), 5749-5760
- [10] Mane, V. S., & Babu, P. V. (2011). Studies on the adsorption of Brilliant Green dye from aqueous solution onto low-cost NaOH treated saw dust. *Desalination*, 273(2-3), 321-329.
- [11] Al-Degs, Y. S., El-Barghouthi, M. I., El-Sheikh, A. H., & Walker, G. M. (2008). Effect of solution pH, ionic strength, and temperature on adsorption behavior of reactive dyes on activated carbon. *Dyes and pigments*, 77(1), 16-23.
- [12] Bulut, Y., & Aydın, H. (2006). A kinetics and thermodynamics study of methylene blue adsorption on wheat shells. *Desalination*, 194(1-3), 259-267.

[13] Lv, L., He, J., Wei, M., Evans, D. G., & Duan, X. (2006). Uptake of chloride ion from aqueous solution by calcined layered double hydroxides: equilibrium and kinetic studies. *Water Research*, 40(4), 735-743.

[14] Airoidi, C., & Critter, S. A. (1997). Brazilian red Latosol a typic soil as an exchanger: A thermodynamic study involving Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Ca and Na. *Clays and clay minerals*, 45(2), 125-131

[15] Weber, W. J., & Morris, J. C. (1963). Kinetics of adsorption on carbon from solution. *Journal of the Sanitary Engineering Division*, 89(2), 31-60

CHAPITRE II
APERÇU THEORIQUE SUR LA CHITOSANE

II.1. Introduction :

L'histoire du CS a commencé lorsque Rouget Charles, en 1859, a discuté de la forme désacétylée du CS. Différents chercheurs ont discuté de la nécessité de comprendre et d'étudier ces matériaux, de l'amélioration des méthodes de production et de purification aux changements structurels fondamentaux et à leurs applications. Le CS a été considéré comme une source de matière bioactive potentielle, mais il présente également plusieurs limitations pour son utilisation dans un système biologique, notamment sa faible solubilité dans des conditions physiologiques. Pour surmonter ces limitations, les chercheurs se sont donc concentrés sur la dérivation du CS par des modifications chimiques et l'hydrolyse partielle du CS par des actions enzymatiques, car il contient divers groupes fonctionnels réactifs. Certains chercheurs ont rapporté que des changements chimiques dans les structures du CS conduisent à une solubilité accrue dans l'eau et les solvants organiques, et que le CS partiellement hydrolysé par des méthodes enzymatiques présente des propriétés considérablement améliorées [1].



Figure 1 : La crevette

II-2-Définition :

Le chitosan est le biopolymère le plus abondant après la cellulose. Il est utilisé depuis environ trois décennies dans les procédés de purification de l'eau. C'est le produit acétylé de la chitine, c'est un polysaccharide naturel présent dans le crabe, la crevette, le homard, les méduses coralliennes, etc. [2].

La nature cationique du chitosane est assez particulière, car la majorité des polysaccharides sont généralement neutres ou chargés négativement dans un environnement acide. Cette propriété lui permet de former des complexes électrostatiques ou des structures multicouches [3].

Le chitosan est un polysaccharide copolymère linéaire biocompatible, biodégradable et non toxique composé de B (1-4) -amino-2-désoxy-D-glucose (D-glucosamine) et de 2-acétamido-2-désoxy-D-glucose (N -acétyl-D-glucosamine) et a la même structure que la cellulose (composée de 1 à 4 unités D-glucose liées) [4].

Le chitosane est le dérivé N-désacétylé de la chitine, bien que cette N-désacétylation ne soit jamais complète, qui présente un certain nombre de groupes amino exposés, ce qui en fait un polysaccharide polycationique. En fonction d'autres polymères synthétiques ou naturels chargés

négativement [5]. sur la quantité / l'étendue de la désacétylation, il existe différentes qualités de chitosane. En raison de sa propriété gélifiante, il a été utilisé dans la conception de systèmes d'administration de médicaments [6].

Le chitosane est l'un des biomatériaux les plus largement utilisés pour le développement de pansements, d'échafaudages d'ingénierie tissulaire et de supports de médicaments, en raison de ses propriétés mucoadhésives, hémostatiques et cicatrisantes. La polyvalence du chitosane réside dans sa réactivité chimique, qui permet le développement d'une large gamme de dérivés de chitosane aux propriétés physiques, chimiques et biologiques variées. En bref, le chitosane est actuellement envisagé pour diverses applications biomédicales en raison de son excellente biocompatibilité, biodégradabilité et bioactivités [7].

II-3-Propriétés du chitosane :

Le chitosane est biodégradable et biocompatible (notamment hémocompatible). Il est également bactériostatique et fongistatique.

Application en cosmétique et diététique :

Le chitosane est utilisé dans les produits cosmétiques et diététiques. Il est connu depuis fort longtemps au **Japon** pour sa remarquable capacité de développer un gel protecteur dans l'estomac.

Le chitosane a des affinités chimiques avec les **lipides**, avec lesquels il se lie dès qu'il se trouve à leur proximité. Le chitosane peut ainsi "fixer" environ 15 fois sa propre masse de lipides. Cette liaison ne pouvant être métabolisée, les graisses ne seraient donc pas absorbées par l'organisme. Les graisses et le chitosane seraient donc éliminés par les voies naturelles. Sous une forme thérapeutique, le chitosane devrait, pour ces raisons, être pris avant les repas. Cependant, cette capacité dépend du type de graisse. De plus, le chitosane n'est pas soluble dans les milieux dont le pH est inférieur à 2 donc l'efficacité du chitosane absorbé sous forme de poudre (capsule ou pilule) serait très faible et donc limitée à la partie du haut intestin où le pH est au-dessus de pH^2 . Si le chitosane limite l'absorption de graisse, il ne fait pas perdre de poids : il en limiterait simplement l'apport.

Le chitosane abaisserait le niveau total de cholestérol LDL ("mauvais cholestérol") et élèverait le niveau de HDL ("bon cholestérol"). Il préviendrait également, aux dires **de certains**, l'apparition du **cancer du côlon**.

II-4-Application du chitosane :

II-4-1-Application en médecine :

Le chitosane est actuellement utilisé ou étudié pour diverses applications dans le domaine des biomatériaux, notamment pour la régénération tissulaire, l'**hémostase** (éponges hémostatiques) et l'ostéogénèse et la vectorisation de molécules biologiquement actives[8]. Il a une action contre le biofilm formé par le champignon aspergillus[9] .

II-4-2-Application en protection des cultures :

Le chitosane a des propriétés antivirales, antibactériennes et antifongiques, qui ont été explorées pour de nombreuses utilisations agricoles. Il a été utilisé pour lutter contre les maladies des plantes ou réduire leur propagation, ou pour améliorer les défenses naturelles des plantes [10].

II-4-3-Colle industrielle :

Le chitosane est un des composants d'une colle biosourcée conçue et brevetée⁴ par plusieurs organismes de recherche, dont Irstea. "Avec une résistance mécanique au cisaillement du joint de colle (la mesure de référence) supérieure à 7 mégapascal et qui peut atteindre jusqu'à 40 MPa, elle s'avère aussi efficace que les colles industrielles. Cette colle est également moins nocive pour la santé et l'environnement [11].

II-4-4-Traitement des eaux usées :

Le chitosane est également utilisé pour le traitement des eaux usées par filtration : comme c'est un polymère cationique, il permet de complexer les métaux lourds (liens de coordination), les graisses et certains composés phosphorés, et réduit la turbidité de l'eau de manière plus efficace que le sable. Il agit aussi comme aide-coagulant, réduisant ou éliminant ainsi les produits à base de polyacrylamide, d'aluminium(alun), actuellement utilisés dans les traitements d'eaux usées (Réf:Arnold Blais chimiste Marinard Biotech).

II-4-5-Efficacité controversée :

Le chitosane est un « capteur de gras ». Il a la capacité d'interagir avec les graisses du système digestif et donc limiter leur absorption. Ainsi, le chitosane peut être un complément efficace pour aider à la perte de poids durant les périodes de régime ou pour le stabiliser. La meta-analyse Cochrane de 2007[12], qui a évalué les essais cliniques disponibles relatifs aux effets du chitosane sur la perte de poids, a conclu que le poids corporel et tous les paramètres liés au cholestérol évoluaient de manière favorable après la prise de chitosane comparé au placebo. Pour les groupes de personnes prenant du chitosane, la différence moyenne dans la masse corporelle était de -1,7 kg (-2,1 à -1,3 kg), changement statistiquement significatif. Dans ces nombreuses études cliniques, aucun effet secondaire particulier n'a été observé à la suite de l'ingestion de chitosane. La qualité variée (en termes de durée, de nombre et des caractéristiques des patients, de doses, de type de régime, de qualité et de caractéristiques du chitosane, etc.) des essais cliniques effectués pour évaluer l'influence du chitosane sur la perte de poids pourraient expliquer certaines des disparités observées dans les résultats des essais cliniques. et les critiques exprimées quant à l'efficacité réelle du chitosane. Dans un modèle expérimental de l'estomac et du duodénum étendu, le chitosane a montré qu'il interagissait avec l'huile, ce qui en limitait l'absorption au niveau du duodénum et améliorait l'excrétion des lipides. Cependant, le mécanisme d'interaction entre le chitosane et les lipides est encore méconnu. Bien que certains détracteurs affirment que la version modifiée du chitosane stoppe l'absorption de quelques minéraux, plusieurs études animales contredisent cette affirmation en démontrant pas ou peu d'effet. Chez la souris, l'ingestion de chitosane n'a pas diminué le niveau de fer, le zinc ou cuivre. De plus, il n'y a aucune preuve chez l'homme d'effets secondaires néfastes, en particulier sur l'absorption de nutriments.

II-4-6-Production et marché :

En 2003, il existait environ 65 producteurs de chitosane dans le monde dont 95 % utilisent des crustacés comme source de matières premières, on peut également le produire à partir de certains végétaux. Le marché du chitosane est en pleine croissance grâce aux applications de plus en plus nombreuses. Par exemple, en 2000, les ventes de comprimé à base de chitosane pour la perte de poids aux USA étaient estimées à 6 millions US\$ [13] .

Conclusion

En raison des propriétés intéressantes de la chitosane , nous intéressants a l'utilisé dans la synthèse des matériaux a base d'argile ,afin d'étudier le pouvoir antibactérienne de ces derniers .

Références

- [1] Chen , Y.L. Preparation and Characterization of Water Soluble Chitosan Gel for Skin Hydration . Mph Thesis ,
- [02] L.Y. Zhou , Z. Wang , Liu , Q. Huang , Characteristics of equilibrium , kinetics studies for adsorption of Hg (II) , Cu (II) and Ni (II) ions by thiourea - modified magnetic chitosan microspheres , J. Hazard . Mater.161 995–1002,2009 .
- [3] Venkatesan , J .; Kim , S.K. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview . Mar. Drugs , 8 2262–2266 , 2010 .
- [4] T. W. Wong , L.W.Chan , S. B. Kho , and P.W. SiaHeng , “ Design of controlled - release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave , ” Journal of Controlled Release , vol . 84 , no . 3 , pp . 99–114 , 2002 .
- [5] Cui Z , S Nair L. Chitosan : versatile biomedical polymer . Recent Patents Engineering . ; 3 (3) : 129-137,2010 .
- [6] Younes , I . , & Rinaudo , M. () . Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources . Structure , Properties and Applications . Marine Drugs , 13 (3) , 1133–1174 . a on Biomedical
- [7] No , H.K ; Hur , E.Y. Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin . J. Agric . Food . Chem . 1998 , 46 , 3844–3846,2015 . A. Characterization
- [8] Percot , A .; Viton , C .; Domard , macromolecules , 1380–1385 , 2003 of shrimp shell deproteinization .
- [9] Sanford , P.A . , 1989. Chitosan : Commercial uses and potential applications . In : G. Skjak , T. Anthonsen and P.Sanford , eds . Chitin and Chitosan - sources , Chemistry , Biochemistry , Physical Properties and Applications , Elsevier : London , UK , pp : 51-69 .
- [10] Senstand , C. and B. Mattiasson..Biotech Bioeng . , 34 : 387-393 , 1989 .
- [11] . Allan , C. R. and L. A. Hadwiger . Exp . Mycol . , 3 (3) : 285-287 , 1979
- [12] . Balassa , L. L. and J. F. Prudden . MIT Sea Grant Rep . MITSG , 78-7 , Proc . Int . Conf . Chitin / Chitosan , 1st PB 285 640 , pp . 296-305 , 1978 .
- [13] . Malette , W. G. Jr . , H. J. Quigley and E. D. Adiches . In Chitin in Nature and Technology , R. Muzzarelli , C. Plenum Press , pp . 435-442,1986

CHAPITRE III
Le mode des bactéries et activité antibactérienne

III.1 Introduction

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. [1] De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multi résistance bactérienne. La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale [2].

III.2. Définition des bactéries :

Les bactéries typiques sont des organismes unicellulaires procaryotes, Elles n'ont pas de noyau et leur génome est le plus petit des cellules vivantes.

La taille d'une bactérie varie entre 1 à 10 μm . Le poids d'une bactérie est d'environ 10-12 g. Elle contient 70% d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (55%), de lipides (10%), de lipopolysaccharides (3%), de peptidoglycane (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%).

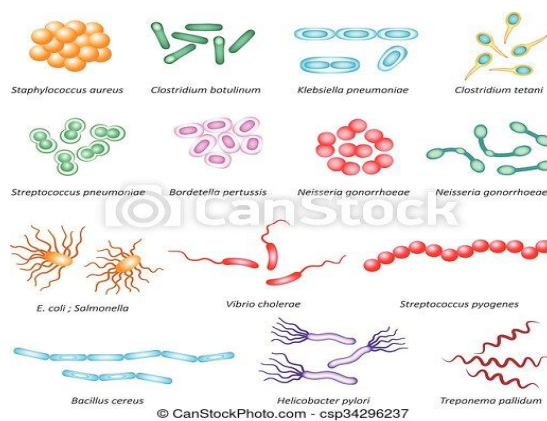


Figure 1 : Exemples de bactéries couramment rencontrées dans l'alimentation.

III-3- Structure d'une cellule bactérienne :

La cellule procaryote est constituée par :

Une membrane plasmique composée de lipides et de protéines et pauvre en glucides. Cette membrane est dépourvue de cholestérol.

Un cytoplasme homogène, limité par une membrane plasmique, qui renferme des ARN solubles (ARN messager et ARN de transfert), et ARN ribosomal.

Un nucléoïde: équivalent du noyau, occupe le centre du cytoplasme et est formé d'une seule molécule d'ADN circulaire d'une longueur de 1mm représentant le chromosome bactérien. Il n'est pas entouré d'une enveloppe qui le sépare du cytoplasme. L'ADN code pour 5000 protéines différentes.

CHAPITRE III

Le mode des bactéries et activité antibactérienne

Des plasmides: ce sont des fragments d'ADN extra chromosomiques circulaires et localisés dans le cytoplasme.

Des ribosomes: visibles dans le cytoplasme, le plus souvent groupés en polyribosomes.

Un mésosome: il s'agit d'une invagination de la membrane plasmique, sur laquelle se fixe l'ADN bactérien. Il contient les enzymes de la chaîne respiratoire, et assure donc la fonction des mitochondries.

III-3- Structures inconstantes :

1-un flagelle: qui est une expansion membranaire mobile dont le nombre est de 1 à 8.

2-des pilis (poils): qui sont des expansions membranaires rigides plus courtes que le flagelle, utiles à l'adhésion.

3-une capsule: inconstante de nature polysaccharidique, amorphe , souvent très mince. La paroi bactérienne: C'est une enveloppe rigide assurant l'intégrité de la bactérie, donc responsable de la forme des cellules. Elle mesure 8 à 30µm d'épaisseur.

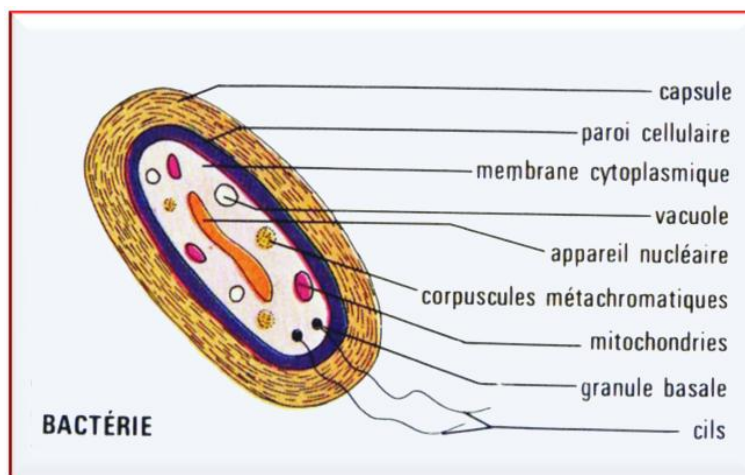


Figure 2 : Morphologie des bactéries.

III-4 Les différents types de bactéries :

Il existe deux grandes classes de bactéries:

Les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

La différence réside essentiellement dans la structure de la paroi cellulaire[3].

III-4-1- Bactéries à Gram positif :

Les bactéries à Gram + ont une structure unimembranée qui est organisée en trois grandes parties : (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- La couche de peptidoglycane composant la paroi cellulaire.
- L'espace périplasmique

- La membrane plasmique

La couche de peptidoglycane est très épaisse. L'espace périplasmique est beaucoup plus étroit que chez les Gram- et c'est un espace de stockage d'enzymes, de nutriments, de protéines, d'ions...

Cet espace a beaucoup d'autres fonctions, notamment dans certaines étapes de la synthèse de protéine et dans le métabolisme. Cette espace se situe entre la couche de peptidoglycane et la membrane plasmique.

Les bactéries à Gram positif se cultivent, pour la plupart, facilement dans les milieux de base; on dit que ce sont des germes non exigeants. La plupart des coques, les bactéries de formes rondes, sont des Gram+, et de nombreux bacilles,

bactéries de formes allongées en bâtonnets, sont aussi des Gram positif [4].

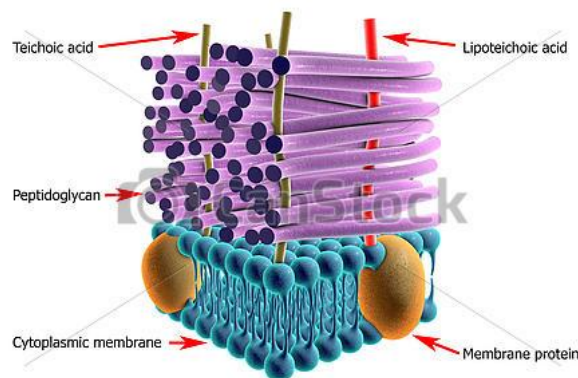


Figure 3: Paroi bactéries à Gram positif.

III-4-2- Bactéries à Gram négatif :

Les bacilles à Gram négatif ont manifesté vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui a abouti à des problèmes thérapeutiques encore aigus

Les bactéries à Gram négatif :ont une structure biomembrane qui est organisée en trois grandes parties:

-La membrane externe.

- L'espace périplasmique (comportant notamment la paroi avec le peptidoglycane). [5].

- La membrane plasmique qui est presque pareil que la membrane exter Les bacilles à gram négatif hôtes naturels de l'intestin et de l'environnement sont responsables d'infections urinaires.

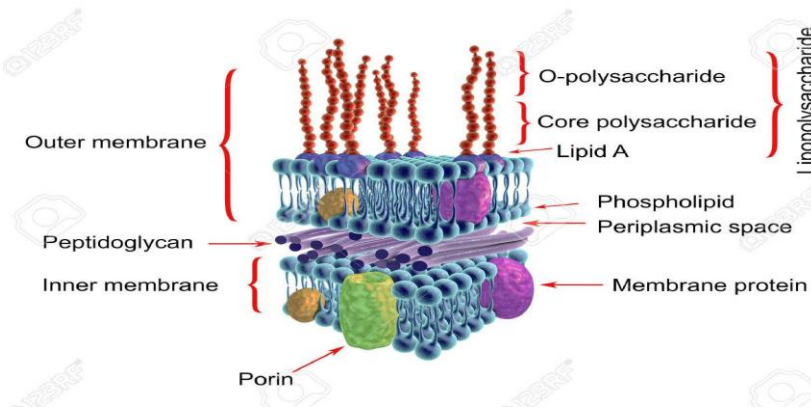


Figure 4 : Paroi des bactéries à Gram négatif

III-5-Croissance des bactéries :

La bactérie se multiplie par fission binaire la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants.

Pour leurs synthèses cellulaires, les bactéries ont besoin de différentes sources d'énergies, de carbone, d'azote, de soufre et d'autres besoins inorganiques.

Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquides ou solides. Plusieurs conditions physico-chimiques affectent leurs croissances telles que le pH, la température et l'effet de l'oxygène (Les bactéries aérobies strictes ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. Les bactéries microaérophiles se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air. Les bactéries aéro-anaérobies facultatives se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale. Les bactéries anaérobies strictes ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique).

Croissance des bactéries La bactérie se multiplie par fission binaire: la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Pour leurs synthèses cellulaires, les bactéries ont besoin de différentes sources d'énergies, de carbone, d'azote, de soufre et d'autres besoins inorganiques. Les bactéries peuvent être cultivées en milieux liquides ou solides. Plusieurs conditions physico-chimiques affectent leurs croissances telles que le pH, la température et l'effet de l'oxygène (Les bactéries aérobies strictes ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. Les bactéries microaérophiles se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air. Les bactéries aéro-anaérobies facultatives se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale. Les bactéries anaérobies strictes ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique).

III-6-Infection bactériennes :

Sur les infections bactériennes en général, il faut savoir que :

- Il y a deux catégories distinctes de maladies : l'infection (ou invasion): Une maladie infectieuse résulte partiellement de la multiplication bactérienne qui provoque souvent des altérations tissulaires. Et l'intoxication : Résulte de l'entrée d'une toxine spécifique dans le corps de l'hôte.
- Le pouvoir pathogène conditionne le type de maladie et va dépendre de l'espèce bactérienne responsable de l'infection. La virulence est une notion quantitative alors que le pouvoir pathogène est une notion qualitative. Ainsi pour un même pouvoir pathogène, on peut avoir des souches plus ou moins virulentes.
- Un agent pathogène primaire est un agent causant une maladie chez un hôte sain par interaction directe. Au contraire un agent opportuniste est un organisme soit normalement libre, soit faisant partie de la microflore normale de l'hôte mais qui peut devenir pathogène dans certaines circonstances.
- La relation parasite-hôte dépend de 3 facteurs : le nombre de parasites, leurs degrés de virulence et la défense de l'hôte qui détermine sa résistance.
- Le terme virulence fait référence à l'intensité du pouvoir pathogène qui est déterminé par 3 caractéristiques : les pouvoirs invasifs, infectieux et toxigènes.
- Le pouvoir invasif est la capacité de l'organisme à se répandre dans les tissus adjacents. Le pouvoir infectieux est la capacité qu'a l'organisme d'établir un foyer d'infection. Le pouvoir toxigène est la capacité du germe à produire des toxines.
- La maladie peut résulter parfois des réactions immunitaires exagérées de l'hôte vis-à-vis un agent pathogène et non à cause des toxines.

III-7- L'effet antibactérien :

- Les agents antibactériens agissent sur les bactéries au niveau moléculaire en perturbant certaines de leurs fonctions essentielles.
- Le reflet des interactions matériaux antibactériens –bactéries, nous permettra de définir les concentrations d'agents antibactériens nécessaires pour inhiber le développement d'une population bactérienne donnée ainsi que les facteurs qui peuvent influencer sur l'action des matériaux antibactériens[6].

III-8-Activité anti bactérienne.

L'effet antibactérien d'un agent peut être bactériostatique ou bactéricide.

Effet bactériostatique :

Il s'agit d'une inhibition de la croissance bactérienne qui reprend dès que la substance disparaît.

Effet bactéricide :

C'est une action létale sur les bactéries provoqué par l'agent antibactérien.

III.8.1. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

Il existe plusieurs méthodes qui permettent la mise en évidence de l'activité antibactérienne :

II.8.1.1. Méthodes de diffusion sur agar

Cette méthode consiste à la diffusion des extraits de plante existant dans les disques ou dans les puits :

a. Méthode des disques

Cette méthode a été développée en 1940. Elle a été largement utilisée pour l'analyse de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Son principe est basé sur la diffusion de la substance à tester à partir d'un disque de papier Wattman N°1 préalablement déposé sur une gélose appropriée comme Mueller-Hinton ou gélose nutritive ensemencée en surface avec une culture pure de microorganismes. Après incubation, des zones d'inhibitions apparaissent autour des disques si la substance testée est active .

b. Méthode des puits

Le principe de cette méthode consiste à mesurer après 24 heures d'incubation à 37 °C les zones d'inhibitions autour des puits de 6 mm de diamètre remplis d'une dilution d'agent antibactérien.

III.8.1 .2Méthodes de détermination de la concentration minimale inhibitrice :

La détermination précise de la CMI d'une substance bioactive est parfois nécessaire pour compléter les données de l'antibiogramme. Parmi ces méthodes on cite :

Dilution en milieu gélosé :

Elle consiste à préparer une série de milieux gélosés contenant des concentrations croissantes de la substance. Les souches bactériennes à tester sont ensemencées sur ces milieux en quantité standard. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, on détermine la plus faible concentration de substance pour laquelle aucune croissance n'est observée.

Dilution en milieu liquide :

Cette méthode consiste à préparer une série de tubes de bouillon nutritif contenant des concentrations croissantes d'extrait à étudier, ces tubes sont en suite ensemencés par une suspension bactérienne standardisée. La lecture est effectuée visuellement après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures.

La croissance bactérienne est indiquée par la turbidité. Le résultat est positif lorsqu'un trouble apparaît dans les tubes. Le premier tube où il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice.

III.8.1.3. Méthode de porte germe

Le porte-germes est constitué d'une bandelette de papier filtre. Il est immergé dans une culture d'un germe test, séché puis mis en contact avec des concentrations croissantes des extraits. La survie ou la destruction du germe est mise en évidence par immersion du papier préalablement séché dans un bouillon nutritif pendant 24 heures à 37°C.

III.8.2. Propriétés antibactériennes du chitosane

Les propriétés antimicrobiennes du chitosane et ses dérivés ne sont plus à prouver et plusieurs études ont démontré leur potentiel antimicrobien aussi bien in vitro qu'in situ (sur des aliments réels et les tissus biologiques). Toutefois, la majorité des travaux publiés portent sur les solutions et les films à base de chitosane. Le chitosane possède donc une puissante activité antimicrobienne contre un large spectre de souches bactériennes, fongiques et même contre des levures, virus et spores. Dans ce chapitre, il sera question des propriétés antibactériennes du chitosane, et de façon plus spécifique contre une large gamme de bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

III.8.2.1 Mécanisme antibactérien du chitosane .

Pour tenter d'expliquer le mécanisme antibactérien du chitosane, trois possibles modes d'action ont été proposés dans la littérature. Selon le premier mode d'action, le chitosane déstabiliserait la perméabilité membranaire en interagissant avec la paroi bactérienne via ses groupements fonctionnels protonés NH^{3+} . Le chitosane interagirait alors avec les charges négatives des éléments constituant la paroi bactérienne. Par conséquent, il perforerait la cellule bactérienne, provoquant ainsi le relargage du contenu cytosolique et la fuite des composants intracellulaires; Le second suggère que le chitosane formerait une enveloppe autour de la cellule bactérienne, empêchant ainsi les échanges avec le milieu extérieur, non seulement pour l'assimilation des nutriments mais aussi l'excrétion des toxines accumulées dans le cytoplasme de la bactérie. De plus, le chitosane déstabiliserait l'équilibre physiologique des bactéries en chélatant les oligoéléments essentiels à leur croissance; Selon le troisième mode d'action, la complexation du chitosane avec l'ADN génomique (chargé négativement) serait responsable de son activité antibactérienne. L'interaction chitosane-ADN interférerait avec la réplication de l'ADN, bloquant ainsi la transcription de l'ARN messager (ARNm) et la traduction de certaines protéines indispensables à la croissance bactérienne. Dans ces trois cas de figure, les interactions CS-bactérie mènent inévitablement à la lyse et à la mort cellulaire. Cependant, la probabilité du dernier mode d'action suggéré a été jugée faible et celui-ci a été considéré comme étant une conséquence de l'un des deux mécanismes susmentionnés car pour atteindre le matériel génétique de la bactérie, le chitosane doit d'abord perforer la paroi.

III.8.2.2. Effet sur la membrane bactérienne

Les propriétés antibactériennes du chitosane ont été largement étudiées contre une vaste gamme de bactéries. Certains auteurs considèrent le chitosane comme agent antibactérien bactériostatique. Autrement dit, le chitosane serait capable d'inhiber la multiplication des bactéries sans pour autant les tuer, tandis que d'autres lui attribuent un effet bactéricide, c'est à dire la capacité de tuer les bactéries et non juste freiner leur croissance. Peu de travaux sont disponibles quant à l'effet que le chitosane peut avoir sur la paroi bactérienne. Néanmoins, il semble que les interactions entre les fonctions amines protonées NH^{3+} du chitosane et les motifs chargés négativement des phospholipides membranaires soient responsables de la perturbation de l'homéostasie i.e. l'équilibre physiologique de la cellule. Le chitosane déstabiliserait la perméabilité membranaire et causerait la fuite du contenu intracellulaire dont protéines, matériel génétique (ADN, ARN), minéraux, etc. Toutefois, la perforation de la membrane plasmique par les chaînes du chitosane n'a pas été prouvée et ce malgré le fait que la rupture de la membrane ait bien été observée. Enfin, le mécanisme ainsi que les voies métaboliques via lesquelles le chitosane est internalisé à travers la paroi pour rejoindre

la membrane cytoplasmique restent à ce jour inconnus. Raafat et al. ont étudié le mécanisme d'action de solutions de chitosane contre la bactérie *S. aureus*. Ils ont conclu que le mode d'action du chitosane est un phénomène complexe qui n'a pas été entièrement élucidé. Néanmoins, les auteurs ont rapporté que l'acide lipoteichoïque (LTA), un glycolipide présent dans la membrane des bactéries à Gram positif pourrait être impliqué dans le mécanisme d'action du chitosane contre *S. aureus*, et ce par interaction entre les motifs NH^{3+} et les charges négatives du LTA. Cependant, l'implication du LTA dans le mécanisme d'action n'explique que partiellement la sensibilité de la bactérie *S. aureus* aux solutions de chitosane. En 20 effet, les bactéries à Gram négatif sont dépourvues de LTA et sont tout de même sensibles à l'action du chitosane. Récemment, Hammer et al. ont étudié l'implication possible du lipopolysaccharide (LPS) dans le mode d'action d'un aminopeptide synthétique (AMP) NK-2 contre les bactéries à Gram négatif dont *E. coli* et *Proteus mirabilis*. Les auteurs ont conclu que l'AMP s'intercale à travers les bicouches lipidiques pour se lier au LPS. Puisque la membrane bactérienne constitue la première barrière face aux agressions externes, l'intercalation de l'AMP à travers la membrane et son interaction avec sa cible, le LPS causerait alors des lésions hétérogènes dans les membranes bactériennes. Ceci suggère que les structures intracellulaires telles que l'ADN sont les cibles secondaires de l'AMP. On pourrait alors supposer que ce mécanisme d'action puisse s'appliquer au chitosane, étant donné la présence de fonctions amines dans les deux molécules (AMP et chitosane), une piste qu'il serait pertinent d'investiguer plus en profondeur afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du chitosane.

Conclusion :

En connaissant les différents types de bactéries et leurs structures, la synthèse de nouveaux matériaux à base de chitosane et ayant une activité antibactérienne a apporté un grand intérêt pour des chercheurs en raison du souci mondial concernant la santé publique.

Références

- [1] Choy J H, Chai S J, Oh J M, and Park T , Clay minerals and layered double hydroxides novel biological applications. Applied Clay Science.36, 122-132 ,2007.
- [2] Hu C, Xu Z, and Xia M, Antibacterial effect of Cu²⁺ exchanged montmorillonites on Aeromonas hydrophila and discussion on its mechanism, Veterinary microbiology. 109, 83- 88 ,2005.
- [3] Malachová K , Prau P, Rybková Z, and Kozák O , Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites, Applied Clay Science.53,642-645.2011.
- [4] Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.N. Microbiology. 4th Edition, The mcgraw- Hill Companies, Inc., New York
- [5] Yamada Z ,Ohta K , TAKEUCHI S , SUZUKI K , and MORI T, Preparation and properties of antibacterial clay interlayer compound. Kagaku Ronbunshu. 17, 29-34,1991.
- [6] Yang Q, Jiao Z ,Ouyang Y , and Chen Y , Preparation and characterization of antibacterial Zn²⁺ exchanged montmorillonites. Journal of Wuhan University of Technology Mater.sci. Ed. 25, 725-729 ,2010.

CHAPITRE IV
Partie Expérimentale et Résultats.

IV.1 Introduction :

Cette partie englobe les procédures et les techniques expérimentales adoptées pour la réalisation de cette étude. Dans notre travail nous avons adopté trois techniques d'analyse (IR – DRX-Fluorescence X) pour caractériser les matériaux composite synthétisés dans le but d'étudier leur activité antibactérienne .

IV.2. Méthodes de caractérisations

IV.2.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

La Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Le principe de la spectroscopie par transformée de Fourier est une façon moins intuitive d'obtenir la même information, plutôt que d'illuminer l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique, cette technique utilise un faisceau contenant une combinaison de multiples fréquences de la lumière, et on mesure l'absorption par l'échantillon. Le faisceau est ensuite modifié pour contenir une combinaison de fréquences différentes, on mesure de nouveau l'absorption par l'échantillon, et l'opération est répétée de nouveau, de multiples fois.

Une fois toutes les données acquises, un ordinateur prend toutes ces données et calcule à rebours pour en déduire l'absorption à chaque longueur d'onde [1].

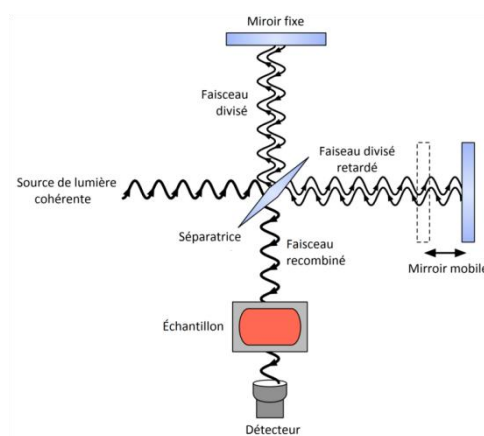


Figure 1 : Représentation schématique d'une spectroscopie FT-IR

Le faisceau décrit ci-dessus est produit à partir d'une source de lumière à large bande, contenant l'ensemble du spectre des longueurs d'onde à mesurer. La lumière passe par un interféromètre (un ensemble de miroirs réfléchissants ou semi-réfléchissants dans une certaine configuration, dont l'un est déplacé par un moteur de façon à faire varier le trajet parcouru par la lumière). Au fur et à mesure que le miroir se déplace, chaque longueur d'onde se trouve périodiquement bloquer ou transmise par l'interféromètre, par interférences. Différentes longueurs d'onde sont ainsi modulées à des vitesses différentes, de sorte que, à chaque instant, le faisceau sortant de l'interféromètre possède un spectre différent.

Comme mentionné précédemment, un traitement par ordinateur est nécessaire pour convertir les données brutes en données directement exploitables (lumière absorbée en fonction de la longueur d'onde). Ce procédé requiert un algorithme commun, la transformation de Fourier, qui donne son nom à cette technique. [2].

IV.2.2. Diffraction des rayons X (DRX)

La méthode de diffraction des rayons X permet de déterminer les distances interatomiques lors de l'étude de corps cristallin. L'appareillage utilisé est généralement un Goniomètre qui comme il est illustré en est constitué d'une source de rayons X (tube à rayon X), d'un monochromateur et d'un détecteur.

Lors de l'interaction des rayons X avec la matière, trois phénomènes principaux se produisent, l'effet photoélectrique, la diffusion incohérente (perte d'énergie de collision des photons incidents) et la diffusion cohérente [3].

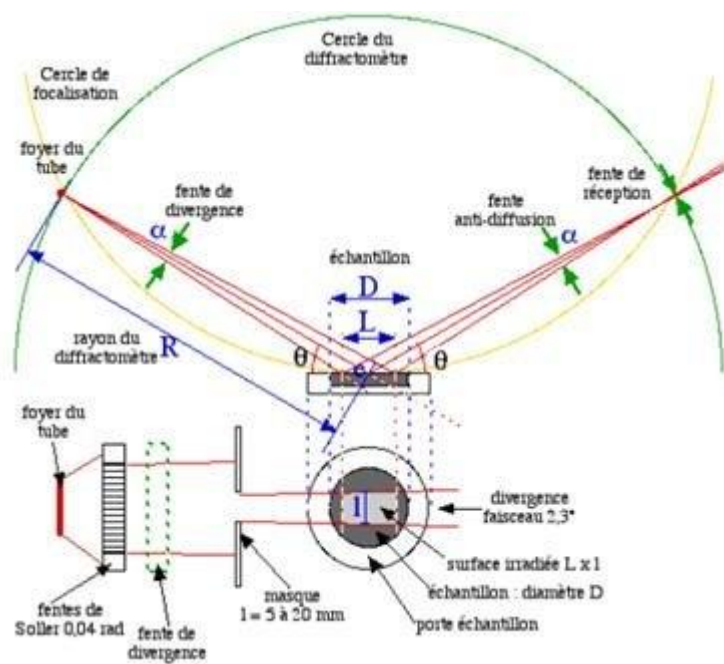


Figure 2: Représentation schématique d'un diffractomètre .

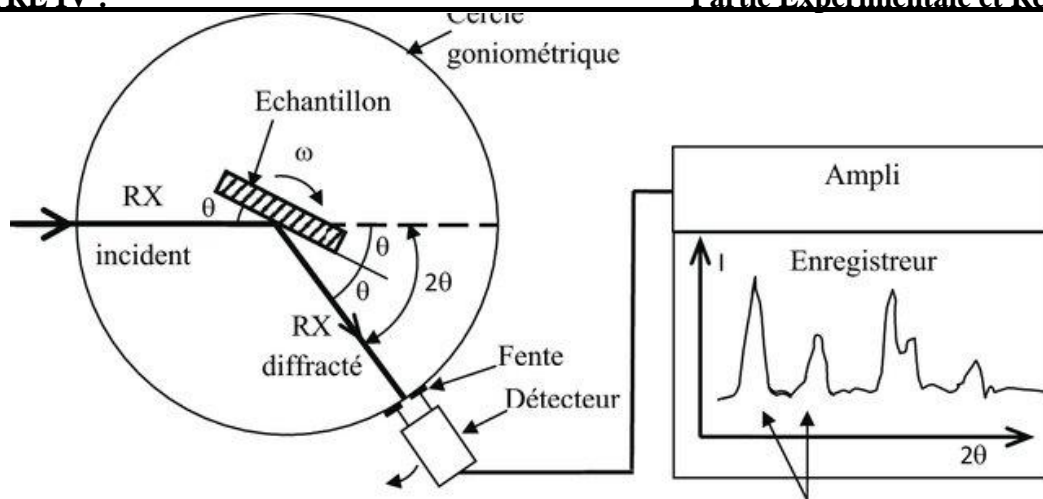


Figure 3: Représentation schématique du principe d'un diffractomètre .

IV.2.3. La spectrométrie de fluorescence des rayons X

(SFX ou FX, ou en anglais XRF pour *X-ray fluorescence*) [4]

La **spectrométrie de fluorescence des rayons X** est une technique d'analyse chimique utilisant une propriété physique de la matière, la fluorescence de rayons X.

Lorsque l'on bombarde de la matière avec des rayons X, la matière réémet de l'énergie sous la forme, entre autres, de rayons X ; c'est la fluorescence X, ou émission secondaire de rayons X.

Le spectre des rayons X émis par la matière est caractéristique de la composition de l'échantillon, en analysant ce spectre, on peut en déduire la composition élémentaire, c'est-à-dire les concentrations massiques en éléments.

L'analyse du spectre peut se faire de deux manières :

hpar analyse dispersive en longueur d'onde (WD-XRF, *wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry*) ;

par analyse dispersive en énergie (ED-XRF, *energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry*) [5]

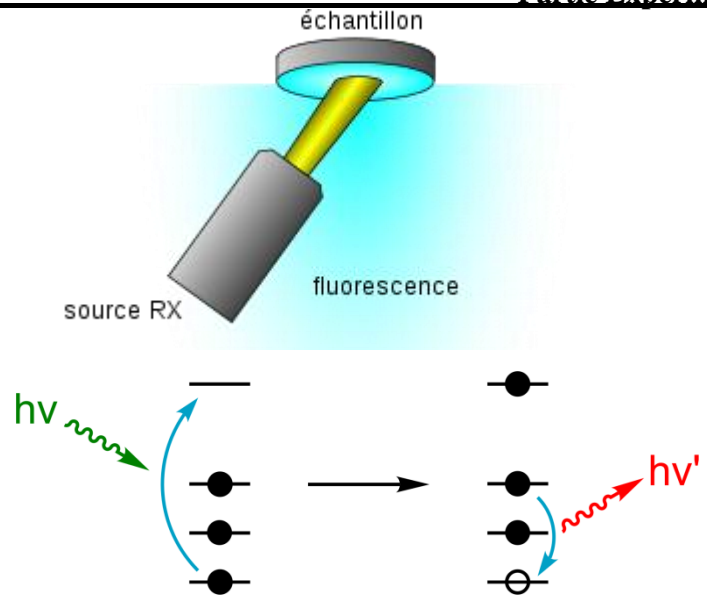


Figure 4 : Représentation schématique de la fluorescence X.

IV.3.Préparation des matériaux composites

IV.3.1. Réactifs Utilisés

Chitosane (Aldrich)

Acide acétique d= 1.05 (Prolabo)

Hydroxyde de sodium (Fluka)

Eau distillée

Argile AMN

Thiosulfate

Chlorure de sodium

IV.3.2.Protocole de préparation

La synthèse des matériaux composites a été préparée selon trois protocoles :

1-On prépare une suspension argileuse de 5g, sous agitation, dans laquelle on ajoute goutte à goutte les billes de chitosane. Après décantation, on récupère la phase solide et on sèche dans l'étuve pendant 24 heures.

2-On mélange la solution préparée à base du chitosane à la suspension argileuse préparée avec NaCl (1M) suivant la même procédure que le protocole N °1. Le produit est récupéré après décantation, puis il est séché et broyé.

3-On prépare une solution à base d'argile et de thiosulfate de sodium (1M), à laquelle on ajoute lentement, goutte à goutte, la solution chitosane. La suspension est séchée, broyée et stockée.



Figure 5 : Principe d'intercalation du Chitosane dans l'argile

IV.3.3. Caractérisation des matériaux composites :

IV.3.3.1. Analyse chimique par fluorescence X :

L'analyse chimique par fluorescence X nous a donné la composition chimique de nos matériaux composites ainsi préparées. Selon les résultats de cette analyse montrés dans le tableau N°1 une modification bien remarquable dans les compositions chimique de l'argile ce qui confirme l'intercalation de cette dernière par la chitosane, le sodium et le thiosulfate.

Tableau 1 : Analyse chimique par fluorescence X pour les trois argiles modifié

Composés	A brute (%)	A CHI (%)	A S CH (%)	A T CHI (%)
Na ₂ O	1.860	1.840	9.130	12.474
Mg O	3.767	3.470	2.823	1.959
Al ₂ O ₃	15.606	15.388	15.022	9.992
Si O ₂	57.006	55.725	55.123	36.140
SO ₃	0.216	0.021	0.012	10.190
K ₂ O	1.401	1.150	1.155	0.861
Ca O	0.637	2.536	0.044	0.007
Fe ₂ O ₃	2.204	2.364	2.010	1.438
Mn ₂ O ₃	0.028	0.022	0.020	0.011
P ₂ O ₅	0.042	0.028	0.034	0.024
TiO*	0.160	0.150	0.147	0.103
SrO	0.014	0.014	0.002	0.001
SiO ₂ / Al ₂ O ₃	3.65	3.62	3.66	3.61

IV.3.3.2. Analyse DRX :

Cette analyse a montrée que les matériaux composites (A CHI, A.S.CHI et A.T.CHI) sont vraisemblablement occupés par le chitosane .

D'après les figures (2.3.4), on remarque pour les trois argiles modifier a $2\theta = 5.828$ que $d = 15.15 \text{ \AA}$ pour argile chitosane et a $2\theta = 6.73$ $d = 13.13$ pour argile sodé chitosane et pour argile thiosulfate chitosane a $2\theta = 7.54$ $d = 11.47$ ces trois réflexions correspondant a l'espace basale d_{001} , l'ordre de changement de ces valeurs indique que les espèces interfoliaires de trois argiles modifier sont vraisemblablement occupés par chitosane dans le cas de A CHI , A.S.CHI et A.T.CHI .

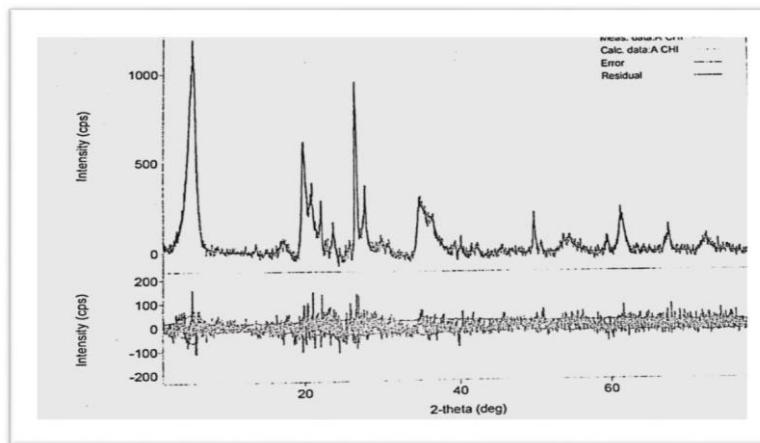


Figure 6 : Diffractogramme de rayon X D'argile chitosane

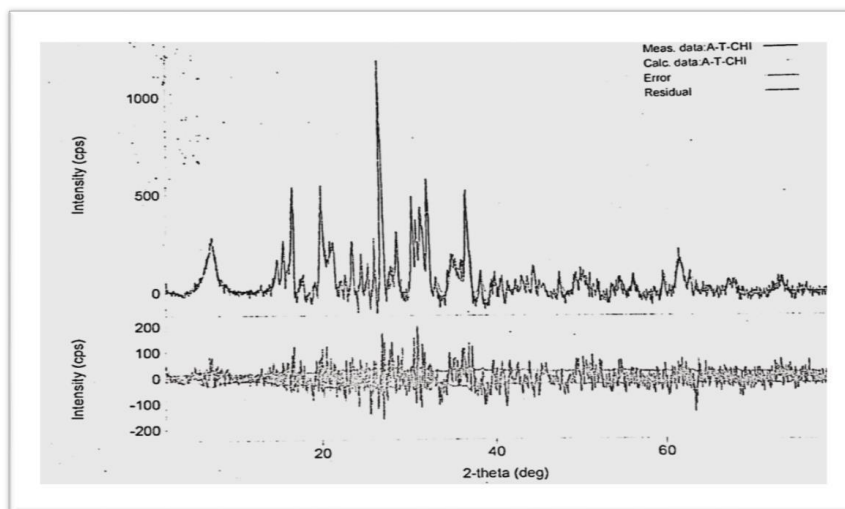


Figure 7 : Diffractogramme de rayon X de l'argile Thiosulfate chitosane

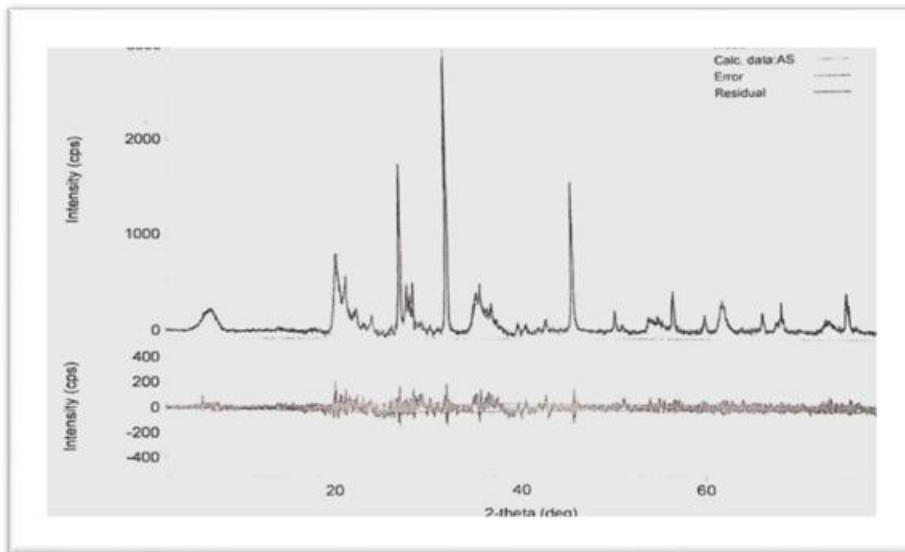


Figure 8 : Diffractogramme de rayon X D'argile sodé

IV.3.3.3. Analyse spectroscopique Infra Rouge :

Cette analyse a montré la présence des bandes caractéristiques de la chitosane dans les matériaux composite ainsi synthétisés qui sont :

1635.5 cm^{-1} : bande moyenne caractéristique des groupements NH_2 .

870 cm^{-1} : bande caractéristique d'un composé cyclique.

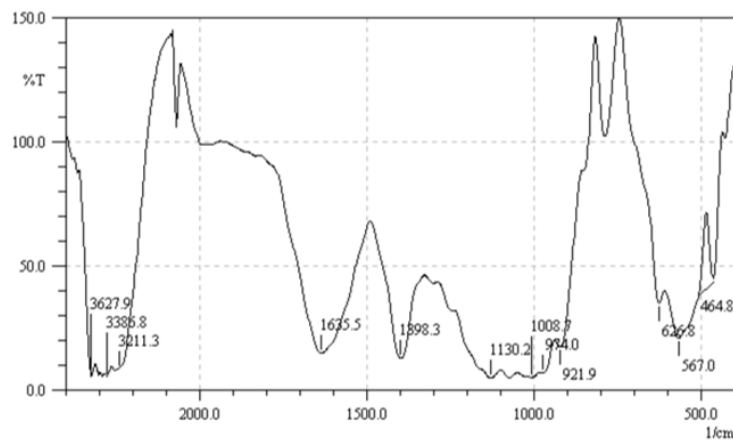


Figure 9 : Spectre Infrarouge de l'argile chitosane

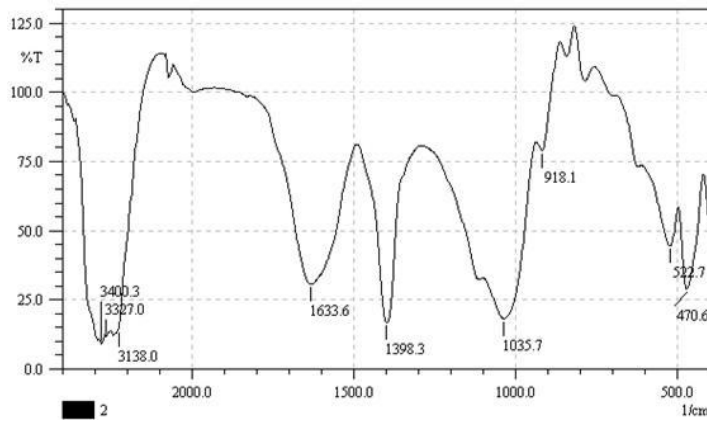


Figure 10 : Spectre Infrarouge de l'argile sodé chitosane

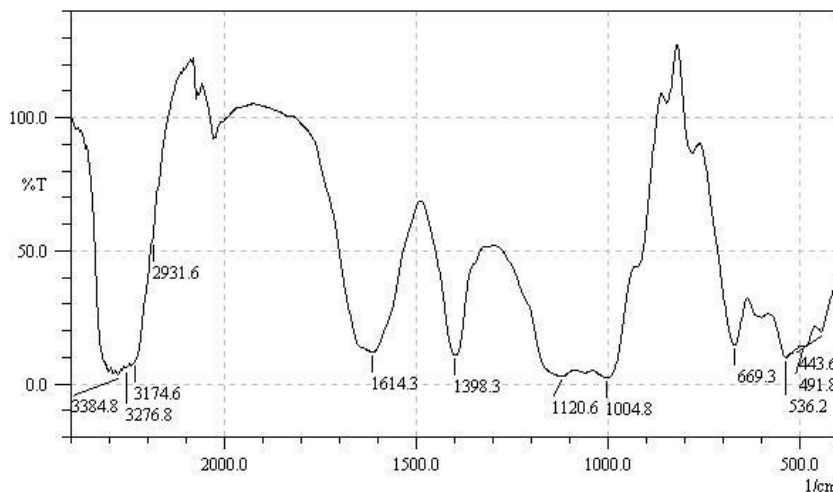


Figure 11 : Spectre Infrarouge de l'argile thiosulfate chitosane

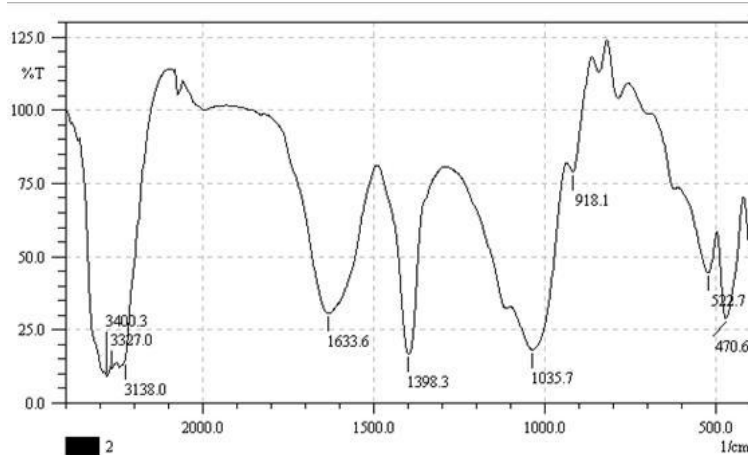


Figure 12 : Spectre Infrarouge de l'argile sodé chitosane

Conclusion

Les trois techniques d'analyse (Fluorescence X -DRX -IR) ont confirmés bien la présence de la chitosane dans les matériaux synthétisés. Nous allons testés par suite leur activité anti bactériennes vis - à - vis de 4 souches microbiennes.

IV.3.4. Etude de l'activité antibactérienne

Cette étude a été menée dans le laboratoire de biologie sous la direction du Dr A.AMAME.

L'étude de l'activité antibactérienne des matériaux composite ainsi synthétisés agit sur les bactéries au niveau moléculaire en perturbant certaines de leurs fonctions essentielles, elles sont variées en fonction de quatre facteurs :

Le temps

La concentration de l'agent antibactérien

Les conditions physico - chimiques du milieu

Le nombre et l'état des bactéries.

IV.3.4.1 Milieux de culture :

Pour l'étude de l'activité antibactérienne, le bouillon nutritif a été utilisé comme milieu d'enrichissement pour toutes les souches bactériennes (E. Coli , et Bacillus , Streptocoque) Les souches bactériennes ont été repiquées respectivement sur un milieu gélose nutritif (GN) ou gélose Sabouraud afin d'obtenir des colonies jeunes . Pour l'activité antibactérienne , par la méthode de diffusion en milieu solide , la gélose Mueller Hinton et milieu PDA ont été utilisés. 20 ML de chaque milieu en surfusion sont repartis dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre afin d'obtenir une épaisseur de 4 mm . Avant solidification la gélose , les boîtes ont été disposées sur une surface plane afin d'assurer une bonne uniformisation de la surface de la gélose .

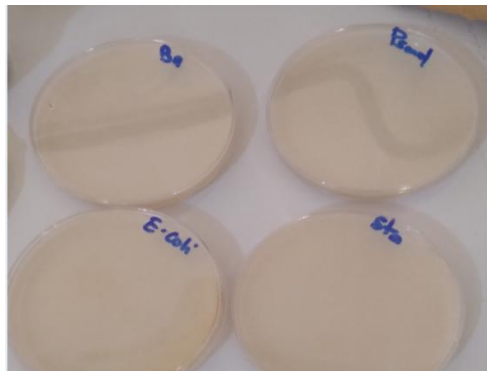


Figure 13 : Milieu de culture dans des boîtes de pétri

IV.3.4.2 Préparation de l'inoculum :

1 à 2 colonies bactériennes bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées, à partir des colonies jeunes, à l'aide d'une anse de platine, puis émulsionnées dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique puis agiter au vortex . La densité de l'inoculum a été ajustée à 0,5 Mc Farland . Des dilutions appropriées sont faites avec de l'eau physiologique afin d'obtenir une suspension bactérienne à l'UFC / ml.

IV.3.4.2.1. La méthode par diffusion :

La méthode par diffusion en milieu gélose est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis - à - vis d'une substance à tester réputée antimicrobienne . Cette méthode repose sur le pouvoir de diffusion de la solution antimicrobienne à l'intérieur d'une boîte de Pétri , à partir de puits creusés par carottage dans un milieu nutritif solide (Mueller Hinton ou PDA) préalablement ensemencé avec une culture microbienne .

a)-Ensemencement

Dans les boites de pétri , un à deux millilitres de chaque suspension bactérienne préalablement préparée sont distribués distinctement sur des boites gélosées de Mueller Hinton pour les souches bactériennes ou PDA pour la souche fongique puis homogénéisée dans tous les sens de sorte à couvrir toute la surface de la boîte gélosée . La suspension bactérienne est laissée au contact de la gélose pendant 1 mn puis l'excès de suspension est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile surmontée de poire . Les boites de gélose ainsi ensemencées sont laissées pendant 15 mn à la température du laboratoire

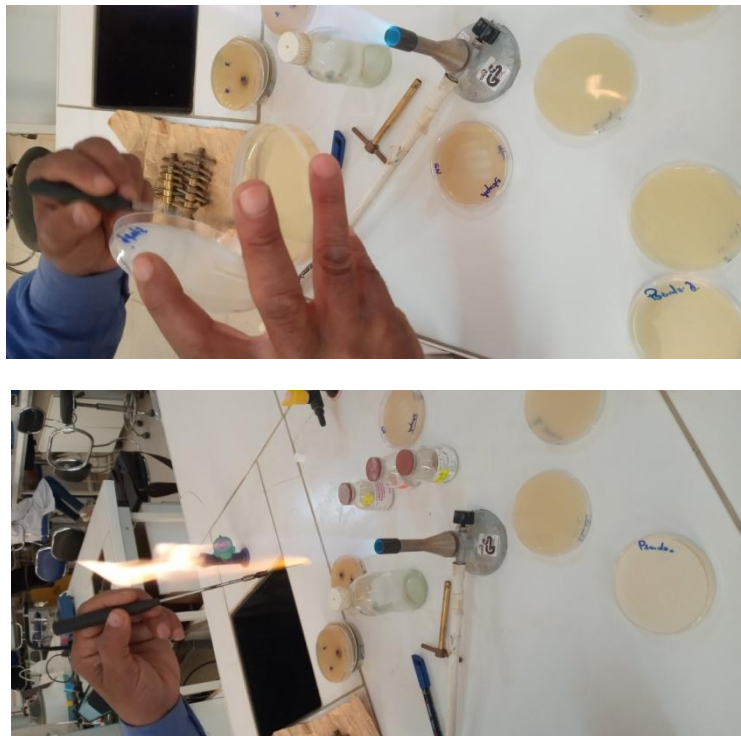


Figure 14 : Ensemencement

b)- Dépôts des matériaux

A l'aide d'une pipette pasteur flambée au Bec Bunsen , les puits sont creusés par carottage de la surface de la gélosée de Mueller - Hinton , Chis Archio Les différents matériaux élaborés Soet spky sont déposés dans leu puits respectifs . Les boites gélosées ainsi préparées sont maintenues à la température aboratoire pendant 15 min afin de permettre la pré - diffusion . Ensuite , elles sont incubées 7 ° C pendant 24 heures pour les souches bactériennes.

c) -La lecture des résultats

A l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle, les diamètres des zones d'inhibition autour des puits sont déterminés.

IV.4 Les résultats de l'activité antibactérienne :

Les figures suivantes montre les photos des boites de pétries pour le tests de zone d'inhibition du matériau l'argile chitosane (AC) , l'argile thiosulfate (AT) ,l'argile soudé (AS),contre les taches bactériennes. Les résultats de l'observation sont regroupés ci-dessous sachant que:

1 —————→ AC

2 —————→ AcT

3 —————→ AS



Figure 15: Tests de zone d'inhibition des matériaux adsorbants contre Staphylococcus.

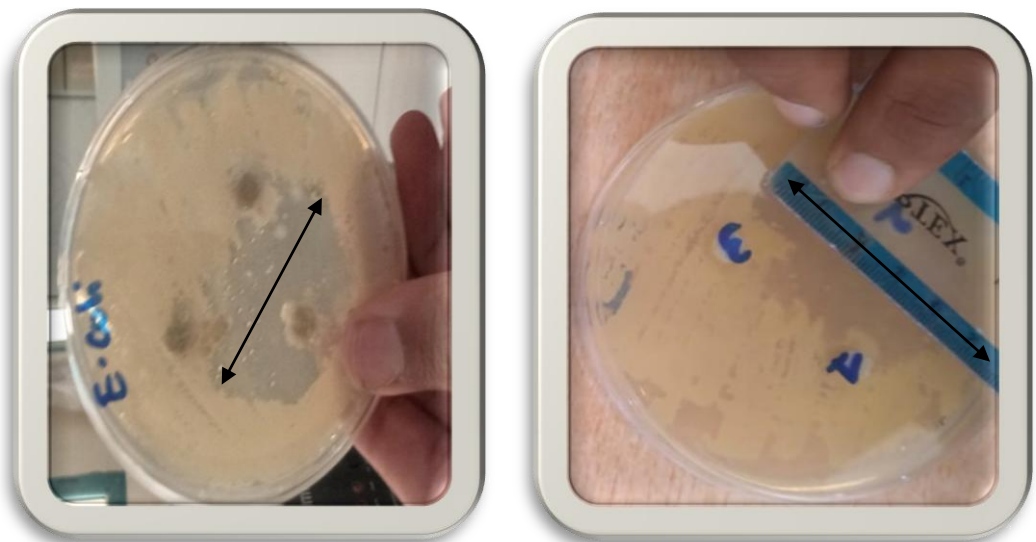


Figure 16: Tests de zone d'inhibition des matériaux adsorbants contre l'echerichia . coli

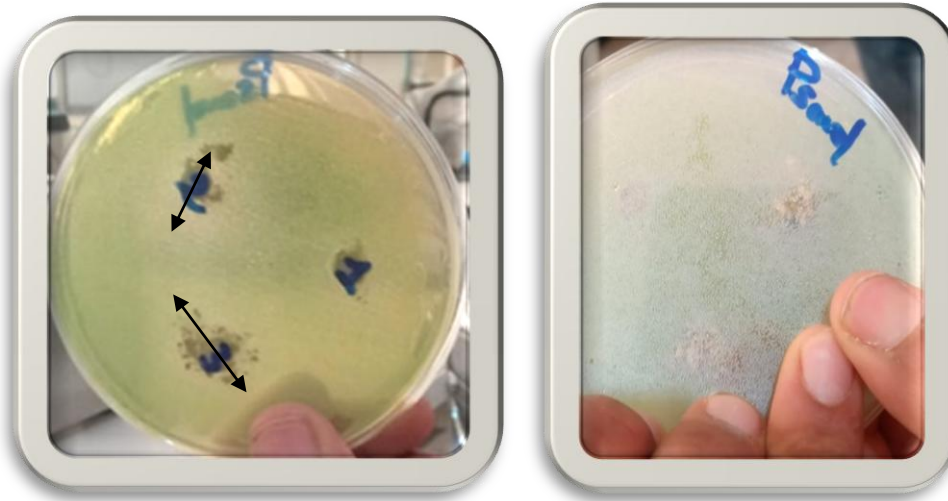


Figure 17: Tests de zone d’inhibition des matériaux adsorbants contre pseudomonas zeogenose.

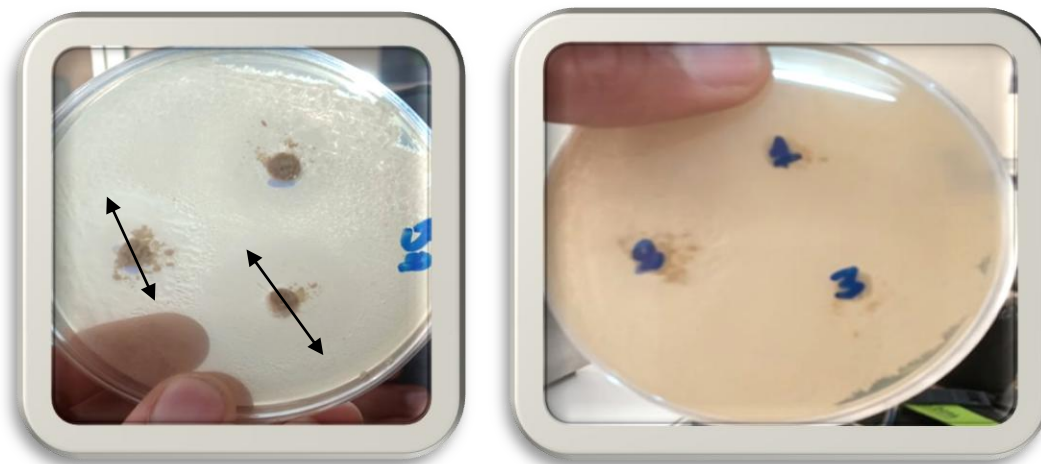


Figure 18: Tests de zone d’inhibition des matériaux adsorbants contre bacillus subtilis.

Le Tableau Montre les résultats de l’évaluation de l’activité antimicrobienne des différents matériaux adsorbants(AC) ,(ACT), et (AS)évaluée par la méthode de puits par la mesure des diamètres des zones d’inhibitions de figure.

	Souches Bactérienne			
	Gram négatif		Gram Positif	
	E.coli ATCC25022	pseudonas	Bacillus ATCC29522	Staphlococcus ATCC29422
AC	41 mm	NA	33,7 mm	NA
ACT	NA	18 mm	NA	NA
AS	NA	18 mm	20 mm	22

Tableau 2 : Résultats de l’évaluation de l’activité

Diamètre >15 mm un bonne l'activité antibactérienne

Diamètre <15 mm

NA : Non actif

L'interprétation des résultats de l'activité antibactérienne contre les bactéries Gram négatif (E.coli ATCC 25922 et pseudonas25922), Gram positif (Bacillus ATCC 25922 et Streptocoque ATCC 25922) montrent que:

Le matériau argile chitosane (AC) présente une meilleurs activité Antibacterienne par rapport au autre matériaux ACT . et AS ceci revient a la très bonne activite antibacterienne du chitosane donc le matériau argile chitosane peut être utilise dans la dépollution des eaux contaminés .

Conclusion

Les résultats trouvés montrent que nos matériaux composites manifestent une bonne activité microbienne vis avis les souches de bactéries choisis.

Références

- [1] Mokhtari F. Synthèse et caractérisations d'argiles pontées à l'aluminium et au titane, Thèse de Magistère. Université D'Oran .Es-senia(1991).
- [2] Solomons G., Fryhle C. chimie organique; 7ème édition, p 66, (2000).
- [3]] Naili S. Thèse de magister. Université des sciences et de la technologie d'Oran , Mohammed Boudiaf (2013)
- [4] Chen X., Yang H., Gu Z., Shao Z. Preparation and characterization of HY zeolite-filled chitosan membranes for pervaporation separation. J. Appl. Polym. Sci., 79, p (1144-1149).(2001).
- [5] Urbanczyk G.W., Lipp-Symonowicz B.J. ApplPolymSci , p 51, 2191 ,(1994

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Au cours de ce projet de fin d'étude. Nos objectifs fondamentaux visés ont été achevés. Les matériaux synthétisés sont caractérisés par différents techniques d'analyse à savoir la fluorescence X, analyse IR et DRX.

L'étude de l'activité antibactérienne des matériaux composite a base chitosane ainsi synthétisés a été effectuée par la méthode de diffusion en puits. Les résultats ont montré que les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles que celles à Gram négatif vis-à-vis de l'action du chitosane. Le matériau argile chitosane chimique a marqué un diamètre d'inhibition important égale à 41 sur la souche E.coliATCC25022.

L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt du chitosane, celui-ci présente un pouvoir antimicrobienne, assez attirant.

En perspective nous préconisons de tester l'activité antioxydant et anti fongique des matériaux envisage a base de chitosane.

Résumé

Le chitosane est un polymère d'origine naturelle possédant de puissantes propriétés antimicrobiennes contre les bactéries, levures et moisissures. Le présent travail consiste à élaborer des matériaux à base de chitosane, et à examiner leur activité antimicrobienne in vitro, sur des souches bactériennes commensales et pathogènes les plus souvent incriminées dans l'altération microbiologique des aliments. L'activité bactéricide des matériaux a été investiguée contre deux bactéries à Gram négatif, E.coli ATCC25022 et pseudonas et deux bactéries Gram positif, à savoir Bacillus ATCC29522 et Staphylococcus ATCC29422. La méthode des puits a été utilisée pour l'étude antibactérienne.

Les résultats trouvés montrent que les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles que celles à Gram négatif vis-à-vis de l'action du chitosane. Le matériau argile/ chitosane a marqué un diamètre d'inhibition important Q= 41 sur la souche E.coli ATCC25022.

Mot clés : argile –chitosane –composite –activité antibactérienne .

Abstract

Chitosan is a natural polymer exhibiting strong antimicrobial properties against a broad spectrum of bacteria, yeasts and molds. This work aims at developing chitosan-based antibacterial materials by the simple process and examine their antimicrobial mechanism of action in vitro against commensal and pathogenic bacterial strains most often incriminated in microbiological alteration of food. The bactericidal activity of materials was investigated against two Gram-negative bacteria namely E.coli ATCC25022 and pseudonas and two Gram-positive bacteria, Bacillus ATCC29522 and Staphylococcus ATCC29422. The well method was used for the antibacterial study. The results found show that the results showed that Gram positive bacteria were more sensitive than Gram negative to the action of chitosan. The chemical chitosan clay material showed a large inhibitory diameter (41) on the E.coli ATCC25022 strain.

Keywords: clay - chitosan - composite - antibacterial activity

ملخص

الشيتوزان عبارة عن بوليمر طبيعي له خصائص قوية مضادة للميكروبات ضد البكتيريا والخمائر والعفن، ويتكون العمل الحالي من تطوير مواد تعتمد على الشيتوزان. وفحص نشاطها المضاد للميكروبات في المختبر، على السلالات البكتيرية المتعايشة والممرضة التي غالبًا ما تكون متورطة في التلف الميكروبيولوجي للأغذية. تم فحص الفعالية القاتلة للجراثيم للمواد ضد نوعين من البكتيريا سالبة الجرام هما E.coli ATCC25022 و pseudonas واثنين من البكتيريا الموجبة للجرام وهما Bacillus ATCC29522 و Staphylococcus ATCC29422 وقد تم استخدام طرق البئر في الدراسة المضادة للبكتيريا وأظهرت النتائج التي تم التوصل إليها أن البكتيريا موجبة الجرام كانت أكثر حساسية من سلبية الجرام لعمل الشيتوزان. أظهرت مادة طين الشيتوزان الكيميائي قطرًا مثبطًا كبيرًا (41) على سلالة الإشريكية القولونية ATCC25022.

الكلمات المفتاحية: طين - شيتوزان - مركب - نشاط مضاد للجراثيم