

1. Matériel et méthodes

1.1. Objectif de l'étude

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et la valorisation des substances bioactives et des polymères naturels, issus des carapaces de crustacés, de l'endosquelette des céphalopodes ou de certaines algues chlorophycées.

Parmi ces ressources naturelles, le chitosane qui reçoit un intérêt grandissant auprès des chercheurs à travers les propriétés biologiques et physicochimiques qu'il offre, semble trouvé sa place dans de multiples applications, notamment dans les secteurs de l'emballage, de l'agriculture et du biomédical. Il est devenu aujourd'hui une alternative intéressante difficile de s'en passer.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'intérêt potentiel que présente le chitosane, après avoir documenté plusieurs ouvrages portant sur sa singularité biologique et les propriétés des molécules qui le caractérisent.

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire LMBAFS de l'Université de Mostaganem et son objectif consiste à :

- Déterminer l'activité antibactérienne du chitosane contre un panel de souches pathogènes choisies pour le test et ce après avoir effectué l'extraction de ce polymère à partir des carapaces de crevettes.

1.2. Origine et nature de l'échantillon

Les résidus de crevettes appartenant à plusieurs espèces marines, ont été fournis par les employeurs des différentes pêcheries de la wilaya de Mostaganem. Une totalité de 08kg de déchets ont été obtenu, cependant, un poids final d'un seul kilogramme de carapaces de crevettes a été récupéré après tri. La quantité reste tout de même suffisante pour notre étude.

1.3. Extraction de la chitine et du chitosane des carapaces de crevettes

1.3.1. Prétraitement des carapaces

Avant d'établir toute la panoplie de procédés d'extraction de la chitine et du chitosane, les carapaces de crevettes sont d'abord :

- Nettoyées soigneusement à l'eau du robinet pour éliminer tous les résidus organiques ;
- Laisser sécher à température ambiante, à l'air libre pendant 24 heures à 48 heures ;
- Les carapaces sèches ainsi obtenus sont ensuite broyées à l'aide d'un pilon mortier ou d'un broyeur à café de façon à obtenir une fine poudre, dont la taille est de l'ordre du millimètre

(0,5 à 0,8mm). Plus les carapaces de crevettes sont finement broyées, plus les réactions chimiques qui suivront le prétraitement seront complètes.

- Le produit obtenu (farine de carapaces) peut être conservé à l'étuve dans un flacon en verre hermétiquement fermé, même pour une longue durée de stockage.

La figure 8, montre en détail toutes les étapes de ce prétraitement jusqu'à l'obtention de la poudre ou de la farine de carapaces.

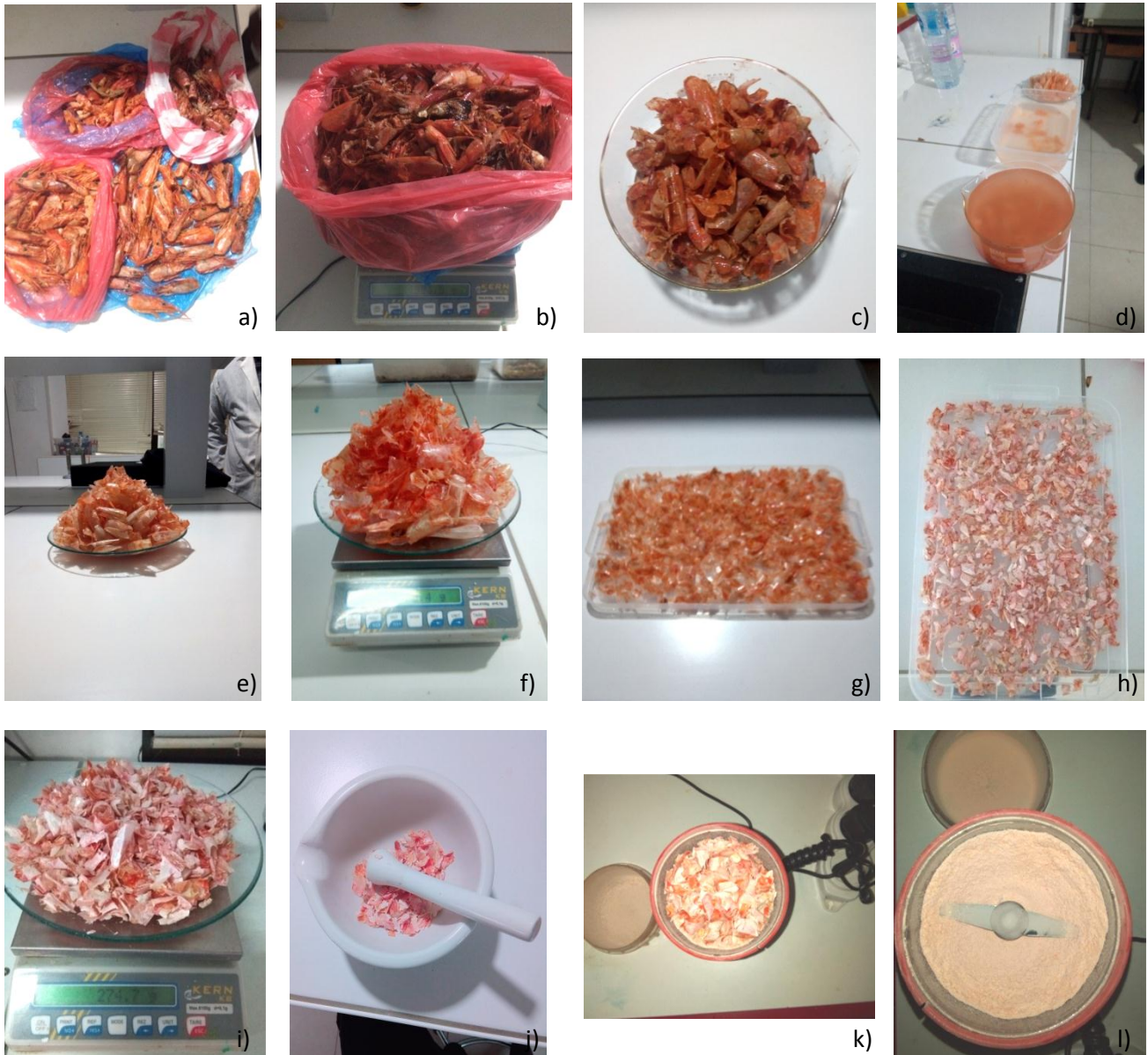


Figure 8. Différentes étapes de prétraitement des carapaces de crevettes.

a) collecte, b) Pesage, c) Nettoyage des résidus organiques, d) Lavage
e) et f) Pesage, g) et h) Séchage, i) Pesage, j) et k) Broyage, l) Farine de crevette

1.3.2. Extraction de la chitine

1.3.2.1. Traitement chimique

✓ Etape 1 : Déminéralisation en milieu acide

40g de poudre sèche des carapaces broyées seront dispersées dans 400ml d'une solution d'HCl (1M). Le rapport du solide par rapport au solvant et de 1:10 (p/10v) (c'est-à-dire le poids de la poudre sèche des carapaces / le volume de la solution d'HCl diluée).

Le mélange solide/solvant est laissé à température ambiante, sous agitation constante pendant 24 heures afin d'éliminer le CO₂ produit au cours de la réaction (Figure 9(a)).

Le produit obtenu est ensuite récupéré, puis filtré et lavé plusieurs fois à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre (pH 7). Le produit récupéré est ensuite séché à l'étuve pendant 24 heures à 50°C (Figure 9(b) et(c)).

La figure 9, montre quelques une des étapes de déminéralisation de la poudre de crevettes

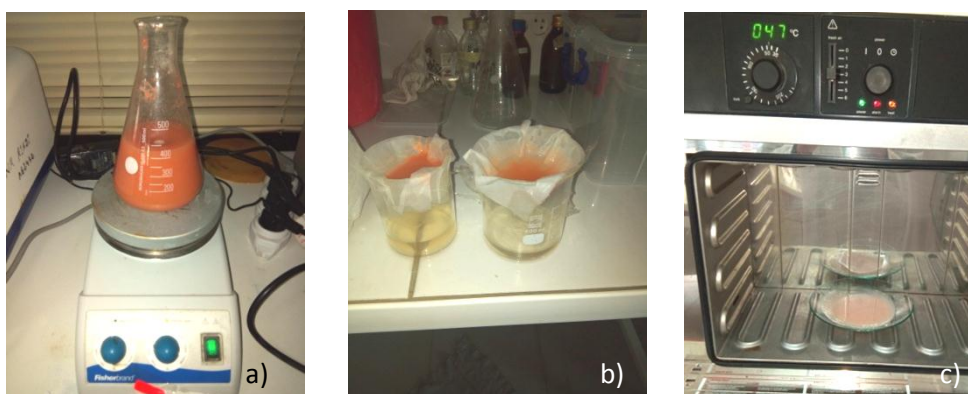


Figure 9. Quelques étapes du processus de déminéralisation en milieu acide.
a) Agitation, b) Filtration, c) Etuvage

✓ Etape 2 : Déprotéinisation (NaOH)

Le produit déminéralisé est mis sous agitation dans une solution alcaline de NaOH (1M) pendant 24 heures à haute température (80°C) (en proportion 1:10 (p/v) (poids de la poudre sèche des carapaces / volume de NaOH)).

Le produit traité est par la suite filtré de la solution basique, puis lavé à l'eau distillée et enfin mis à l'étuve pour sécher à 50°C pendant au moins 24 heures jusqu'à obtention d'un poids stable (Figure 10).

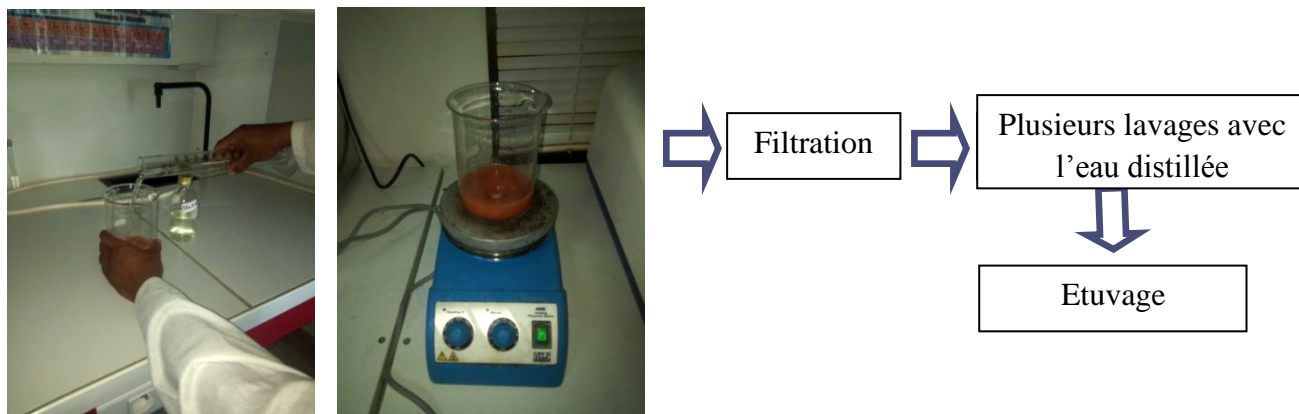


Figure 10. Quelques étapes du processus de déprotéinisation en milieu basique.

a) Agitation, b) Filtration, c) Etuvage

✓ Etape 3 : Décoloration (blanchiment)

Cette étape consiste à éliminer les pigments tels que la lutéine et la β -carotène, afin d'obtenir une chitine quasiment blanche.

La première opération de décoloration consiste à additionner la matière sèche obtenue lors de la précédente étape, avec un rapport solide/solvant de 1:10 (p/10v) à un mélange acétone/éthanol (v/v). Le mélange est laissé sous agitation magnétique durant toute une nuit (Figure 11(a)). L'opération est poursuivie par une filtration, puis plusieurs lavages à l'eau distillée et un dernier rinçage avec l'éthanol.

Après étuvage pendant toute une nuit à 50°C, la matière sèche obtenue, sera de nouveau traitée avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à une concentration de 0,135%, et un rapport solide/solvant (p/10v), sous agitation magnétique maintenue pendant 30 minutes (Figure 11(b)). Par la suite, le mélange est filtré, suivi de plusieurs lavages du culot à l'eau distillée et séchage à l'étuve pendant 24 heures à 50°C.



Figure 11. Quelques étapes du processus de blanchiment de la poudre de crevettes.

a) première étape de décoloration avec le mélange acétone/éthanol.
b) deuxième étape de blanchiment avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

1.3.3. Obtention du chitosane

✓ Etape 4 : Désacétylation

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine (cela a été déjà mentionné précédemment). C'est une opération qui est généralement effectuée dans une solution de NaOH (50%), sous une température de 100°C pendant 2 heures, selon un ratio (p/v) de 1:15.

Le chitosane obtenu sera ensuite filtré puis lavé à l'eau distillée afin d'éliminer la soude résiduelle et ce jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage atteigne la neutralité.

Après étuvage pendant 12 heures à 50°C, la poudre de chitosane acquise est prête à être utilisée suivant l'objectif assigné.

La figure 12, montre l'aspect du chitosane après l'étape de désacétylation.



Figure 12. Aspect du chitosane après l'étape de désacétylation.

1.4. Etude de l'activité antimicrobienne du chitosane

L'activité antibactérienne du chitosane contre les souches bactériennes choisies pour le test est évaluée par la technique de diffusion sur milieu solide (ou la méthode des disques).

Les bactéries de référence utilisées sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Bacillus cereus* ATCC 14579, Elles proviennent toutes du laboratoire LMBAFS de l'Université de Mostaganem.

Des tests confirmatifs de l'identité des souches ont été réalisés (culture sur géloses, coloration de Gram, test de catalase et d'oxydase) et un renouvellement de la conservation a été effectué après caractérisation.

1.4.1. Revivification des souches

Les souches identifiées auparavant et conservées sur milieux spécifiques (géloses inclinées) ont été revivifiées sur bouillon nutritif.

La revivification consiste à prendre quelques colonies des tubes contenant les souches conservées et les mettre dans un tube à essai stérile contenant 5ml de Bouillon nutritif préalablement préparé. Après incubation à 37°C (température optimale de croissance de ces bactéries) pendant 24 heures, la croissance est appréciée par l'apparition d'un trouble dans le milieu.

1.4.2. Purification des souches

L'étape de purification consiste à réaliser un isolement par stries à partir du bouillon d'enrichissement sur géloses spécifiques préalablement coulées sur des boîtes de pétri (milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus*, milieu Mc-Conkey pour *Escherichia coli*, milieux King A ou King B pour *Pseudomonas aeruginosa* et gélose Mossel pour *Bacillus cereus*). L'incubation est réalisée à 37°C pour toutes les souches isolées et ce pendant 24 heures.

L'obtention de colonies de même taille et de même aspect après étuvage, renseignent sur la pureté des souches. Cette pureté est confirmée par observation microscopique après coloration de Gram.

1.4.3. Conservation des souches

La conservation des souches purifiées peut être de courte ou de longue durée. Une conservation de courte durée se fait par ensemencement d'une colonie sur une gélose solide et incliné spécifique à la souche. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, ces derniers seront conservés à 4°C pendant quelques semaines.

Une conservation de longue durée permet quant à elle une préservation des souches allant de quelques mois à quelques années. Dans ce type de conservation deux cryoprotecteurs additionnés aux milieux de culture peuvent être utilisés. Ce sont soit le glycérol ou le DMSO (diméthylsulfoxyde). La conservation est faite à -20°C.

1.4.4. Tests d'orientation pour la caractérisation des souches isolées

1.4.4.1. Caractères culturels

Cette étude consiste à observer à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire les colonies obtenues sur milieux gélosés. C'est un examen direct qui permet de renseigner sur la forme, la taille, la consistance, l'odeur, le contour et la couleur des colonies.

1.4.4.2. Etude des caractères morphologiques

Après l'examen microscopique des colonies sur milieux gélosés, un examen microscopique d'un frotti coloré vient compléter l'étude. Cela permet d'avoir une idée sur la morphologie des cellules, leur mode de regroupement ou d'association et leurs caractères structuraux.

La coloration différentielle la mieux connue est celle de Gram (Voir annexe), qui permet de différencier les bactéries Gram + et Gram -.

1.4.4.3. Etude de quelques caractères biochimiques et physiologiques

- **Test de catalase**

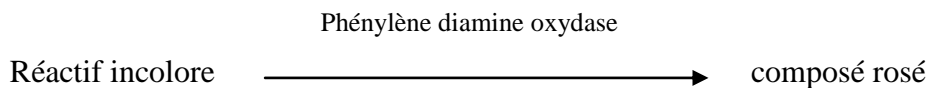
Une catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène selon la réaction suivante : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$

La technique consiste à déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame sèche et propre et y déposer, à l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette Pasteur, une colonie isolée d'une culture de moins de 24 heures (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester. La lecture du résultat est immédiate : s'il y a effervescence, signe d'un dégagement gazeux d'oxygène, la souche testée est dite catalase +, sinon elle est considérée comme étant catalase -.

- **Recherche de l'oxydase**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Une enzyme capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine.

Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air.



1.4.5. Détermination de l'activité antimicrobienne

Après avoir confirmé par ces quelques tests l'identité des souches caractérisés au préalables, nous nous sommes projetés par la suite à étudier l'effet du chitosane en tant qu'agent antimicrobien contre les souches sélectionnées.

1.4.5.1. Préparation de la solution de chitosane

La poudre de chitosane est solubilisée (préparation d'une solution de chitosane) en dissolvant 6g de ce polymère en poudre dans 250 ml d'acide acétique (1%), sous agitation constante pendant 1 à 4 heures, à température ambiante.

1.4.5.2. Préparation de l'inoculum bactérien

Les microorganismes choisis pour l'étude de l'activité antibactérienne de chitosane ont été cultivés dans un bouillon stérile de nutriments (Bouillon nutritif) et incubés pendant 4 à 8 heures dans une étuve à 37°C afin d'obtenir des résultats de croissance bactérienne en phase exponentielle.

Après incubation, les milieux de culture ont été centrifugés pour obtenir un culot puis reconstitués avec une solution saline stérile. La turbidité de la culture a été ajustée de manière similaire à la norme (en ajoutant 0,5 ml de BaCl₂ à 1% à 99,5 ml de H₂SO₄ 0,36 N) (Chakraborty et al., 2015).

1.4.5.3. Détermination de l'activité antibactérienne

Un prélèvement à partir de l'inoculum préparé, sert à ensemercer des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton par technique d'écouvillonnage. Des disques stériles de papier Wattman de 8 mm de diamètre, chargés de 15 µl de l'extrait aqueux de chitosane sont déposés sur la surface de la gélose.

Des disques imprégnés d'eau distillée stérile et des disques d'antibiotiques chargés de 5µg de Rifampicine pour *Bacillus cereus*, de 10UI de Gentamicine pour *Pseudomonas aeruginosa*, de 10UI d'acide Fusidique pour *Staphylococcus aureus* et de 200µg de Fosfomycine pour *Escherichia coli* sont aussi utilisés en tant que témoins négatifs et positifs respectivement.

Après incubation des boîtes à 37°C pendant 24 heures, les résultats obtenus seront exprimés en diamètre de zones d'inhibition produites autour des disques (Chakraborty et al., 2015). Cette analyse est réalisée en triplicata.