

## 1. Résultats et discussion

### 1.1. Rendement d'extraction de la chitine et du chitosane des carapaces de crevettes

Les coproduits de crevettes (têtes et carapaces) représentent 50% du poids frais du crustacé. Leur utilisation est donc un enjeu important étant donné leur lente biodégradabilité naturelle. La chitine est le principal produit dérivé de ces coproduits. Elle est en effet un constituant majoritaire des carapaces de crustacés (de 17 à 33%), ainsi que des os de seiche et des plumes de calmars (Ifremer, 2010).

Après avoir effectué un prétraitement adéquat des carapaces de crevettes, suivi d'un traitement chimique en quatre étapes (déméralisation, déprotéinisation, blanchiment et désacétylation), le chitosane extrait s'est présenté sous forme d'une poudre inodore, sans saveur et de couleur blanche (Figure 13)



**Figure 13.** Poudre de chitosane.

Le rendement massique d'extraction de la chitine est de 19.37% à partir de 41.866g de carapaces de crevettes séchées et broyées. Le rendement massique du chitosane après désacétylation de la chitine est de 16.08%. Cela explique qu'une grande quantité de minéraux et de protéines ont été éliminées (Tableau 3)

**Tableau 3.** Rendement d'extraction de la chitine et du chitosane.

Poids du début des carapaces de crevettes séchées et broyées	Poids de poudre Après déminéralisation et déprotéinisation	Rendement des produits chitineux en (%)	Rendement du chitosane après désacétylation
41.866g	8.111g	19.37%	16.08%

Les cuticules des crustacés sont constituées essentiellement de minéraux, de protéines et de chitine (Kurita, 2006). Selon Mignotte et *al.*, (2012), 45g de matière sèche permettent d'obtenir 8 à 10g de chitine ce qui est en accord avec les résultats trouvés dans cette étude.

## 1.2. Etude de l'activité antibactérienne du chitosane

### 1.2.1. Résultats des tests d'orientation pour la caractérisation des souches isolées

#### 1.2.1.1. Revivification et purification des souches étudiées

##### ▪ Caractères cultureux

L'observation à l'œil nu des cultures sur milieux gélosés (Chapman pour *Staphylococcus aureus*, Mc-Conckey pour *Escherichia coli*, King A pour *Pseudomonas aeruginosa* et gélose Mossel pour *Bacillus cereus*), a été appréciée par des colonies visibles et de tailles similaires pour chaque genre (environ 1 à 2mm de diamètre pour les Staphylocoques, 2 à 3mm de diamètre pour *E. coli* et *P. aeruginosa* et de 5mm de diamètre pour *B. cereus*).

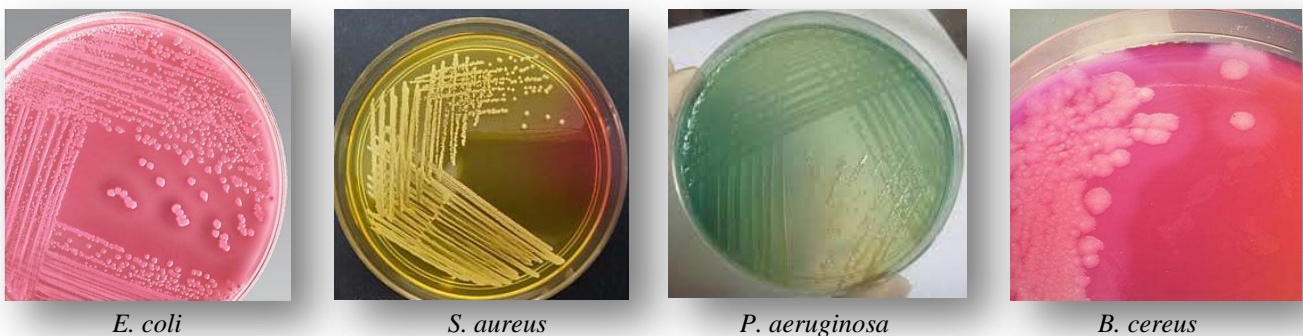
Les colonies de *Staphylococcus aureus* étaient de forme ronde, lisse et un peu bombée, avec une couleur blanchâtre à crème sur milieu GN. Cependant, Elles prennent une couleur dorée sur milieu Chapman dû à la fermentation du mannitol.

Les caractères cultureux d'*Escherichia coli* sur milieu Mc Conckey ont révélés aussi des colonies incolores, rondes, lisses et crémeuses.

La fluorescence des colonies de *Pseudomonas* due aux pigments diffusibles élaborés par la bactérie (Pyocyanine et Pyoverdine) et l'odeur florale du jasmin caractéristique de la bactérie ont été mise en évidence sur milieux King A et King B.

Les colonies de *Bacillus cereus* quand a eux, se sont révélées grandes, blanchâtres, à contours irréguliers (morphologie variable) et à bord filamenteux.

La figure 14, illustre l'aspect macroscopique des différentes souches sur leurs milieux sélectifs.



**Figure 14.** Aspect macroscopique des 04 souches isolées dans leurs milieux sélectifs. *E. coli* sur milieu Mc-Conckey, *S. aureus* sur milieu Chapman, *P. aeruginosa* sur milieu King A et *B. cereus* sur milieu Mossel.

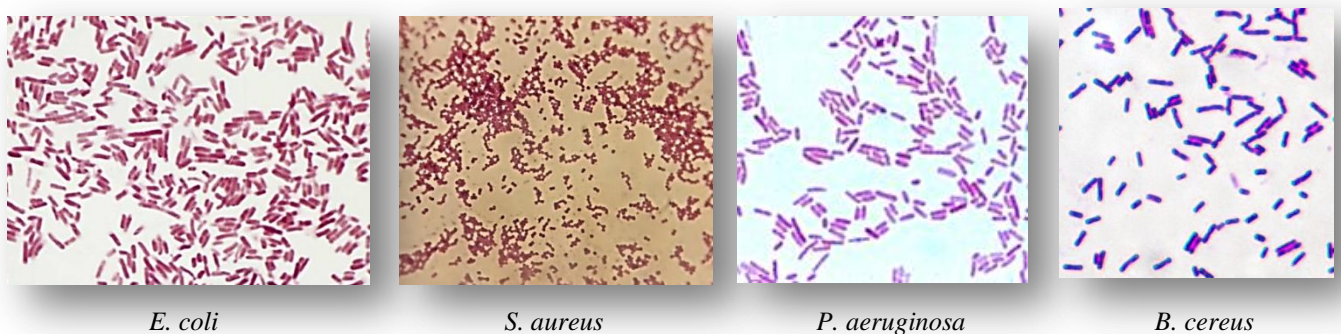
### ▪ Caractères morphologiques

La caractérisation microscopique du staphylocoque doré après coloration de Gram a dévoilé des coques Gram positifs, en amas réguliers (sous forme de grappes de raisin), associées en paires (diplocoques), ou en courtes chaînes. Une description tout à fait conforme à celle donnée par Carr et *al.* (2002).

Le résultat de cette même coloration effectuée sur la souche *E. coli*, a aussi confirmé ses caractéristiques morphologiques sous microscope. L'examen de la bactérie a révélé des cellules sous forme bâtonnets (bacilles) à Gram négatif et parfois sous forme de longs filaments, conséquence de la vieillesse de la culture.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont dévoilé une forme bacille des cellules, à Gram négatif, cependant, ceux appartenant au genre *Bacillus* ont confirmé l'aspect bacille des cellules et une positivité à la coloration de Gram.

La figure 15, démontre l'aspect microscopique des différentes souches étudiées après coloration de Gram.



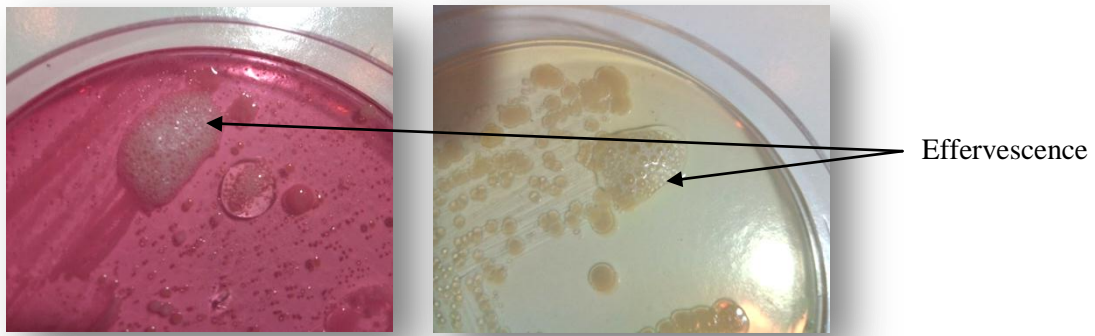
**Figure 15.** Aspect microscopique des 04 souches isolées (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus*) après coloration de Gram.

### ▪ Caractères biochimiques et physiologiques

#### ✓ Test de catalase

Le test de catalase étant aussi un examen clé de confirmation de la pureté des souches, à corroborer avec les résultats trouvée par plusieurs auteurs (Kihal (1996), Carr et *al.* (2002) et Badis et *al.* (2005)).

Les différentes souches isolées, se sont avérées être catalase positive (Figure 16).



**Figure 16.** Résultats du test de catalase pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

#### ✓ Test de l'oxydase

Le test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries (*S. aureus*, *E. coli* et *B. cereus*) n'a pas révélé un virage du réactif utilisé de l'incolore au violet, ce qui signifie que le résultat de ce test est négatif pour les trois souches étudiées.

L'absence de l'oxydase révèle l'incapacité des bactéries testées à oxyder la forme réduite incolore des dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, en leurs formes oxydées semi-quinoniques rose-violacées.

Cependant, un résultat positif à ce test pour *Pseudomonas aeruginosa* à été obtenu, ce qui confirme sa possession de l'enzyme oxydase.

#### 1.2.2. Détermination de l'activité antibactérienne

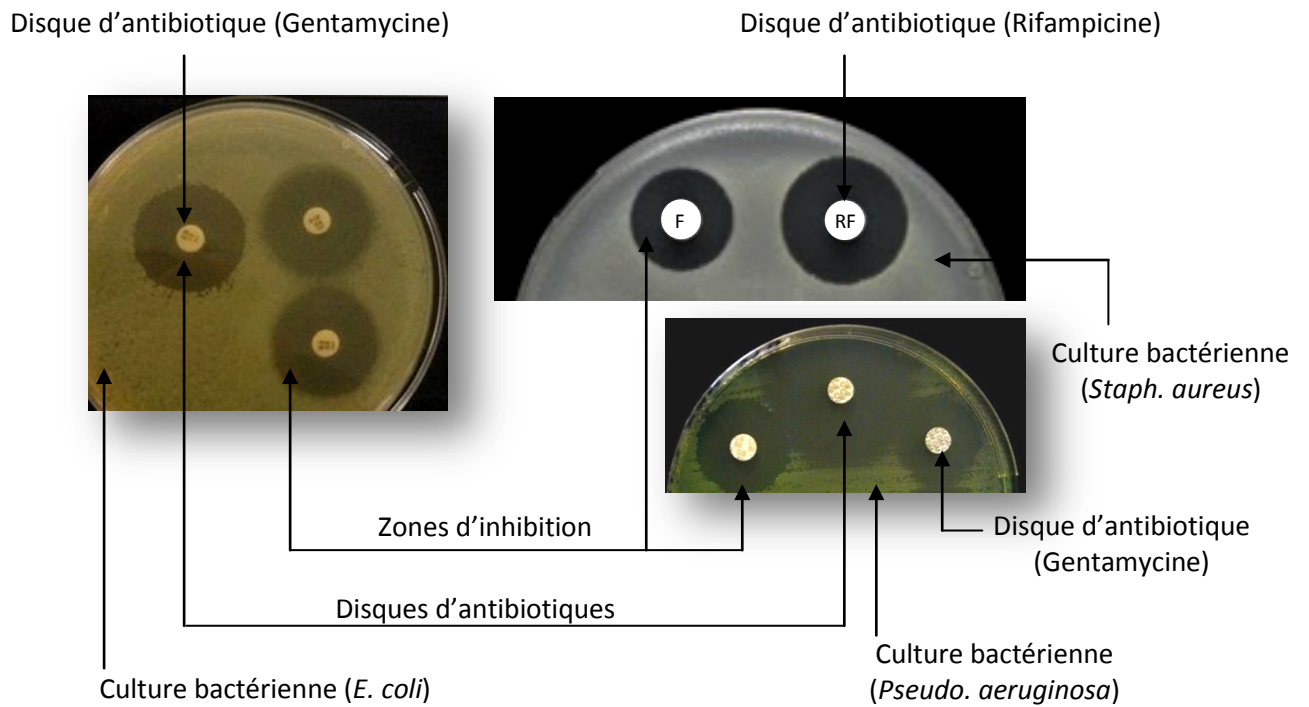
Pour tester la sensibilité de nos souches bactériennes (*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* et *P. aeruginosa*) vis-à-vis plusieurs antibiotiques supposés ou connus, un test d'antibiogramme a été effectué.

L'intérêt de cet examen est de déterminer au mieux le spectre d'activité antibactérienne des principales familles d'antibiotiques choisies contre ces germes et favoriser par la suite l'antibiotique qui a montré un degré d'activité élevé pour l'utiliser en tant que témoin positif dans le test d'activité antibactérienne de chitosane.

Le choix des antibiotiques (Gentamycine, Fosfomycine, Rifampicine, Acide fusidique et Acide nalidixique) a été fait en se référant aux données et expériences faites au préalable contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* et *P. aeruginosa*.

Les résultats obtenus après analyse de l'antibiogramme, ont tous montré une sensibilité des souches aux antibiotiques testés. Cette sensibilité est traduite par l'apparition de zones d'inhibition autour des disques comme il est montré dans la figure 17.

La lecture du diamètre des zones d'inhibition ou de lyse pour chaque antibiotique, illustre bien le spectre d'activité élevé de ces derniers contre les souches étudiées.



**Figure 17.** Résultats du test d'antibiogramme quelques souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) pour le choix du témoin positif.

Le tableau N°4, donne les valeurs du diamètre de lyse pour chaque antibiotique utilisé dans ce test et les limites acceptables des diamètres d'inhibition.

Souches étudiées	Antibiotiques testé	Charge du disque	Diamètre d'inhibition (en mm)	
			Cibles	Limites acceptables
<i>E. coli</i>	Fosfomycine	200µg	28	26 – 34
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rifampicine	5µg	32	30 – 36
<i>Bacillus cereus</i>	Rifampicine	5µg	33	30 – 36
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ciprofloxacine	5µg	29	25 – 33

**Tableau 4.** Valeurs des diamètres de lyse pour chacune des souches étudiées exprimées en millimètres.

D'après les résultats obtenus, mentionnés dans le tableau ci-dessus, on constate que les valeurs du diamètre des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotiques pour chaque souche étudiée, concordent avec celles donné par le comité d'antibiogramme de la société française de microbiologie (SFM), 2019 puisqu'elle entre dans l'intervalle des limites acceptables

La forte sensibilité de nos souches (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*) à la Fosfomycine, la Rifampicine et à la Ciprofloxacine respectivement nous ont conduit à les choisir comme témoins positifs dans le test d'activité antibactérienne du chitosane.

#### 1.2.2.1. Activité antibactérienne du chitosane

Les résultats de l'activité antibactérienne du chitosane, ont montré que ce biopolymère exerce un effet inhibiteur contre toutes les souches pathogènes mises à l'épreuve. Les diamètres d'inhibition respectifs contre les souches testées étaient de 11mm pour *E. coli*, 08mm pour *Staphylococcus aureus*, 09mm pour *Bacillus cereus* et 13.5mm pour *Pseudomonas aeruginosa* (Tableau 4).

L'effet inhibiteur du chitosane était plus important contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* par rapport aux autres souches testées.

Les résultats obtenus ont montré aussi que les molécules de chitosane manifestaient des activités antibactériennes efficaces contre les bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa* et *E. coli* sont les plus sensibles au chitosane) par rapport aux bactéries à Gram positif (*B. Cereus* et *S. aureus*) qui révèlent une sensibilité moyenne.

En parallèle, les différents antibiotiques utilisés comme témoins positifs dans ce test, ont confirmé les valeurs du diamètre obtenu dans le test de sensibilité des souches étudiées, à savoir 25mm de diamètre pour la Fosfomycine contre la souche *E. coli*, 33mm et 31.5mm de diamètre pour la Rifampicine contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* respectivement et 28mm de diamètre pour la Ciprofloxacine contre la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Le témoin négatif quant à lui, n'a exercé aucun effet sur la croissance de la bactérie (diamètre du disque).

**Tableau 5.** Diamètre des zones d'inhibition du chitosane vis-à-vis *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

	Souches testées	Concentration	Souches testées			
			<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Diamètre d'inhibition en mm	Chitosane	1%	11	08	09	13.50
	Témoins positifs	Fosfomycine	25			
		Rifampicine		33		
		Rifampicine			31.5	
		Ciprofloxacine				28
	Témoin négatif	Eau physiologique	6	6	6	6

Les résultats de l'activité antibactérienne du chitosane corroborent avec ceux de plusieurs travaux de recherche déjà effectués. On cite parmi eux, les travaux de Coma et *al.*, (2003), qui porte sur une étude de l'activité antimicrobienne des polymères de chitosane sur des contaminants liées aux produits laitiers. Dans cette étude, les résultats obtenus ont permis d'observer un large spectre d'activité antimicrobienne du chitosane incluant plusieurs bactéries à gram positif et à gram négatif.

L'activité inhibitrice du chitosane a été aussi étudiée sur la flore de détérioration et sur diverses bactéries pathogènes. Darmadji et Izumimoto, (1994) ont évalué la bioactivité du chitosane en milieu liquide et ont reporté qu'une concentration de 0.01% en chitosane est

suffisante pour inhiber la croissance de certaines bactéries dites d'altération telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Le tableau ci-dessous, donne les valeurs des CMI de quelques bactéries par le chitosane.

**Tableau 6.** Concentration minimale inhibitrice (CMI) de quelques bactéries par le chitosane (Crini et al., 2009)

<b>Bactéries</b>	<b>CMI (ppm)</b>
<i>Bacillus cereus</i>	1 000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	20

Plusieurs études ont démontré que le chitosane exerce une activité antibactérienne efficace contre les bactéries à gram négatif (Chung et al., 2004), alors que d'autres travaux ont illustré que les bactéries à gram positif étaient les plus susceptibles, probablement à cause de la membrane externe des bactéries à gram négatif (Zhong et al., 2008). D'autres chercheurs ont par ailleurs montré qu'il n'y pas de différence significative entre les activités antibactériennes contre les bactéries testées (Wang et al., 2005).

L'action antimicrobienne du chitosane apparaît comme fortement dépendante des caractéristiques du chitosane utilisé (origine, degré de polymérisation, pourcentage de résidus N acétylés) et des facteurs environnementaux tels que la teneur en eau de la matrice alimentaire et surtout son pH.

Concernant les tailles des molécules, il a été clairement démontré par plusieurs auteurs que les chitosanes de faibles masses molaires sont plus actifs comme antimicrobiens que les chitosanes macromoléculaires. Cependant les oligomères de très petites tailles se révèlent totalement inactifs (Shahidi et al., 1999).

Le mécanisme exact par lequel l'activité antimicrobienne s'exerce est encore assez mal connu mais passe à l'évidence par des interactions ioniques avec des composés bactériens anioniques (membranes, protéines, acides nucléiques,...) intra ou extracellulaires.

Plus de recherches prouvent la nature multifonctionnelle du chitosane. Son activité antibactérienne exprimée dans cette étude suggère son utilisation pour le traitement de nombreuses maladies infectieuses causées par des germes pathogènes.