

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
ÉCOLE DOCTORALE INGÉNIERIE & ENVIRONNEMENT
Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés



MEMOIRE DE MAGISTER

Pour l'obtention du titre de

Magister en Génie de l'Environnement

Option : **Biotechnologie Environnementale**

Thème:

***EFFETS DE LA CHITINE ET DE SES DERIVEES
SUR LES LIGNEES CANCEREUSES HUMAINES
HEP2 ET RD.***

Soutenu le 20/12/2011

Présenté par :

M^r Bouhenna Mustapha

Ingénieur d'Etat en Génie Biologique (U.S.T.H.B.)

| | | | |
|-------------------------------|-----------|-----------------------|------------|
| Président : | H.LOUNICI | Professeur | C.U.B. |
| Directeur de mémoire : | N. MAMERI | Professeur | E.N.P. |
| Examineurs : | R.BAKOUR | Professeur | U.S.T.H.B. |
| | N.ABDI | Professeur | E.N.P. |
| | N.CHIKHI | Maître de Conférences | E.N.S.V. |
| Invitée : | R.SALAH | Maître Assistante | U.M.M.T.O. |

ENP 10, avenue Hassen Badi, El-Harrach, Alger.

الملخص:

- الهدف من ه ذه الدراسة هو تقييم القشرة الخارجية للجمبري الأبيض *Parapenaeus longirotris* لذلك قمنا بـ:
1. تحضير السكريات متعددة الوحدة السكرية "كيتين" و "كيتوزان" و نواتج تفككها المحضرة بين وحدتين سكريتين و عشرة.
 2. إيجاد الشروط المثلى لـ:
 - أ. مرحلة نزع الأملاح المعدنية، بحيث وجدنا :
 - درجة الحرارة المثلى: حرارة الغرفة.
 - تركيز حمض الـ HCl : 2 مول/ل.
 - المدة الزمنية : 30 د.
 - الكسر: وزن القشرة الخارجية/ حجم الحمض : 1غ/15 مل.
 - ب. مرحلة نزع البروتينيات، بحيث وجدنا :
 - درجة الحرارة المثلى: 55°م.
 - تركيز حمض الـ NaOH : 2 مول/ل.
 - المدة الزمنية 90 د .
 - الكسر: وزن القشرة الخارجية/ حجم القاعدة : 1غ/20 مل.
 3. لجأنا لإستعمال تقنية "FTIR" لتأكد من ماهية السكريات السابق ذكرها.
- لقد اختبرنا في وقت لاحق تأثير مضاد للسرطان من منتجاتنا على خط خلوي الإنسان Hep2 .

الكلمات المفاتيح: كيتين، كيتوزان، نواتج تفكك الكيتين والكيتوزان، تقييم، للجمبري، تأثير مضاد للسرطان.

Résumé :

Cette étude consiste en la valorisation des carapaces de la crevette blanche *Parapenaeus longirotris* par la préparation de chitine, de chitosanes et de leurs oligomères par voie chimique. L'optimum de l'étape de déminéralisation est atteint à la température ambiante, 15ml d'HCl 2 M pour 1g de carapaces pendant 30 min. Par contre, l'optimum de la déprotéinisation est atteint à la température de 55°C, 20ml de NaOH 2 M pour 1g de carapaces pendant 2 heures. La caractérisation des différentes substances sus-citées était réalisée par spectroscopie FTIR. Nous avons, par la suite, testé l'effet anticancéreux de nos produits sur la lignée cellulaire humaine Hep2.

La chitine et le chitosane ont montré un grand effet inhibiteur envers les lignées cancéreuses HEp2.

Mots clés : chitine, chitosane, oligomères de la chitine et du chitosane, valorisation, crevette, effet anticancéreux.

Abstract:

This study is the valuation of the white shrimp shells *Parapenaeus longirotris* the preparation of chitin, chitosan and their oligomers by chemical means. The optimum stage of demineralization is achieved at room temperature, 15 ml of 2 M HCl for 1 g of shells for 30 min. For cons, the optimum is reached at the deproteinization temperature of 55 ° C, 20 ml of 2 M NaOH for 1 g of shells for 2 hours. The characterization of various substances mentioned above was carried out by FTIR spectroscopy. We have subsequently tested the anticancer effect of our products on the human cell line Hep2. Chitin and chitosan showed a great inhibitory effect against cancer cell lines HEp2.

Keywords: chitin, chitosan oligomers of chitin and chitosan, recovery, shrimp, anti-cancer effect.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur H.Lounici pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein de son laboratoire « biotechnologie-environnement », pour sa disponibilité et pour avoir bien voulu participer au jury et d'en assurer la présidence.

Je suis particulièrement reconnaissant à Monsieur N.Mameri, Professeur à l'ENP, pour les très précieux conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail dont il a assuré la direction.

Que Monsieur R. Bakour, Professeur à l'U.S.T.H.B, avec qui j'ai eu de fructueuses discussions, veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude.

J'exprime tous mes remerciements à Madame Tazdaït pour les conseils qu'elle m'a prodigués et pour avoir accepté de juger ce travail.

Que Madame N. Abdi, Maître de Conférences à l'ENP et Madame N. Chiki, Maître de Conférences à l'ENSV, trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements pour avoir bien voulu accepter de participer au jury ce travail malgré leurs nombreuses occupations.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur M.Seghier, Chef de service « virologie humaine » de l'I.P.A, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire, et à toute son équipe, en particulier Monsieur A. Chouchen, pour sa générosité, sa pertinence et la qualité de ses conseils et avis sur les travaux que j'ai pu mener.

Merci à Monsieur M.Brahimi Chef du service « vaccins et sérums antirabiques » de l'I.P.A, pour sa générosité et ses précieux conseils qui m'ont aidé à mettre en marche notre laboratoire de culture cellulaire.

J'adresse tous mes remerciements à l'ensemble des enseignants et étudiants de notre laboratoire avec qui j'ai passé des moments agréables au cours de mes travaux, en particulier : M^{elle} Arbia Leila, Madame Arbia Wassila , Monsieur Agouillal Farid, Monsieur chami Amine, Monsieur Moktari Moussa, Monsieur Hariti Mohamed, Monsieur KERAT Mohamed, M^{elle} Azzouz Latifa et Madame Chemlal Radia.

Je ne saurais oublier l'attitude sympathique à mon égard et les facilités qui m'ont été accordées par le personnel de l'ENP et de l'I.P.

Que Madame Hamida, secrétaire du département Génie de l'Environnement de l'E.N.P soit assurée de sincère gratitude pour l'aide qu'elle ma apportée.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Introduction..... | 1 |
| Chapitre I :La chitine et ses dérivés..... | 3 |
| I-1- Historique..... | 3 |
| I-2- Définitions..... | 3 |
| I-2- Structure chimique de la chitine | 3 |
| I-3- Sources de la chitine | 6 |
| I-4- Propriétés de la chitine | 7 |
| I-4- 1- Propriétés biologiques | 8 |
| I-4- 2- Propriétés physicochimiques..... | 8 |
| I-5- Préparation de la chitine et du chitosane | 11 |
| I-6- Les dérivés de la chitine | 13 |
| I-6- 1- Le chitosane | 13 |
| I-6- 2- Historique | 14 |
| I-6- 3- Caractéristiques | 14 |
| I-6- 4- Les oligomères de la chitine et du chitosane..... | 18 |
| I-6- 5- Intérêts des chitooligosaccharides | 20 |
| I-6- 6- Application de la chitine et de ses dérivés | 20 |
| A- Domaines biomédical et pharmaceutique | 21 |
| B- Cosmétique | 21 |
| C- Agroalimentaire | 22 |
| D- Agriculture | 23 |
| E- Traitement des eaux | 23 |
| F- Autres domaines d'application | 25 |
| I-6- 7- Applications des chitooligosaccharides | 26 |

| | |
|--|--------|
| Chapitre II : La cellule cancéreuse | 28 |
| II - Connaissances actuelles sur les cancers | 28 |
| II -1- Biologie du cancer | 28 |
| II -1-1- Principales caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses | 28 |
| A- La cellule cancéreuse : vision globale..... | 28 |
| B- Caractères généraux de la cellule cancéreuse | 28 |
| II -1-2- Mécanismes moléculaires de l'oncogénèse | 29 |
| II -1-2-1- Les proto-oncogènes | 29 |
| A- Définition | 29 |
| B- Mécanismes d'activation des oncogènes | 31 |
| II -1-2-2- gènes suppresseurs de tumeur (anti-oncogène) | 33 |
| II -1-2-3- Circuits auxiliaires | 33 |
| A)- Mitochondrie ; apoptose | 33 |
| A-1)- Les mitochondries | 33 |
| A-2)- L'apoptose | 34 |
| B)- Les gènes de réparation de l'ADN | 34 |
| B-1)- Système de réparation des mésappariements (mismatch repair)..... | 35 |
| B-2)- Système de réparation NER (Nucleotide Excision Repair)..... | 35 |
| C)- Télomérase..... | 35 |
| II -2- Traitement actuel..... | 36 |
| II -2- 1- La chimiothérapie..... | 36 |
| II -2- 2- L'Hormonothérapie..... | 36 |
| II -2- 3- La radiothérapie..... | 36 |
| Chapitre III : Matériels et méthodes | 37 |
| III -1- Matériels..... | 37 |
| III-2- Méthodes | 38 |
| III-2-1- Extraction et préparation des différentes substances | 38 |
| III-2-2- Détermination des propriétés physico-chimiques | 41 |
| III-2-2-1- Détermination du taux de cendres dans la carapace..... | 41 |

| | |
|---|-----------|
| III-2-2-2- Mesure de la teneur en protéines lors de l'optimisation de la déprotéinisation | 42 |
| III-2-2-3- Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl | 43 |
| III-2-2-4- Mesure du degré de désacétylation..... | 46 |
| III- 2-2-5- Mesure du poids moléculaire..... | 47 |
| III- 2-2-5- Mesure de la densité réelle..... | 50 |
| III-2-3- Préparation de l'O-Carboxyméthyl chitine | 50 |
| III-2-4- Préparation du N,O-carboxyméthyl chitosane | 50 |
| III-2-5- Préparation du 2 phtalimide chitine..... | 51 |
| III-2-6- Etude de l'effet inhibiteur de la chitine et de ses dérivées..... | 52 |
| III-2-6-1- Culture cellulaire | 52 |
| III-2-6-2- Test de cytotoxicité | 54 |
| III-2-6-3- Test d'exclusion au bleu de Trypan | 55 |
| | |
| Chapitre IV : Résultats et discussion..... | 56 |
| IV- 1- Préparation des différents produits..... | 56 |
| IV-1-1- Optimisation de la déminéralisation..... | 56 |
| IV-1-1-1- Optimisation de la concentration en acide chlorhydrique..... | 57 |
| IV -1-1-2- Optimisation de la durée de la déminéralisation..... | 56 |
| IV -1-1-3-Optimisation du volume d'acide chlorhydrique..... | 59 |
| IV -1-2- Optimisation de la déprotéinisation | 58 |
| IV -1-2-1- Optimisation de la concentration en hydroxyde de sodium..... | 58 |
| IV -1- 2-2- Optimisation de la durée de la réaction de déprotéinisation..... | 59 |
| IV -1-2-3- Optimisation de la température de la réaction de déprotéinisation..... | 59 |
| IV -1-2-4- Optimisation du volume en hydroxyde de sodium..... | 60 |
| IV -2- Spectre infrarouge de la chitine et de ses dérivées..... | 61 |
| IV -3- Détermination de la viscosité et du poids moléculaire du chitosane..... | 64 |
| IV -5- Discussion..... | 65 |
| IV -6- Etude de l'effet inhibiteur de la chitine et de ses dérivées envers les lignées cancéreuses | 69 |
| Conclusion..... | 76 |
| | |
| Références bibliographiques..... | 81 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| 1- Pourcentage de chitine dans les êtres vivants marins..... | 7 |
| 2- Propriétés de la chitine et du chitosane..... | 8 |
| 3- Caractéristiques résultantes de la cristallinité de la chitine et du chitosane..... | 10 |
| 4- Application industrielles de la chitine et du chitosane dans le domaine agroalimentaire..... | 22 |
| 5- Applications de la chitine et du chitosane dans le domaine agricole..... | 23 |
| 6- Applications de la chitine et du chitosane dans le domaine de l'environnement..... | 24 |
| 7- Autres domaines d'applications de la chitine et du chitosane..... | 25 |
| 8- Protocoles utilisés pour la préparation du chitosane..... | 42 |
| 9- Protocoles utilisés pour la préparation des oligomères de la chitine et du chitosane..... | 42 |
| 10- Les conditions optimisées de la déminéralisation pour 1g de carapaces..... | 60 |
| 11- Les conditions optimisées de la déprotéinisation pour 1g de carapaces..... | 63 |
| 12- IC ₅₀ de la chitine et de ses dérivés (Hep2)..... | 72 |
| 13- IC ₅₀ de la chitine et de ses dérivés (RD)..... | 72 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| 1- Production mondiale globale de la crevette..... | 1 |
| 2- Interpretation schématique de la matrice organique de la cuticule des insectes..... | 2 |
| 3- Structures du D-glucose, du D-glucosamine et du N-acétyl D-glucosamine..... | 4 |
| 4- Structure de la cellulose..... | 4 |
| 5- Structure de la chitine..... | 4 |
| 6- Structure moléculaire et représentation conventionnelle de l' α - chitine.... | 5 |
| 7- Structure moléculaire et représentation conventionnelle de la β - chitine ... | 6 |
| 8- La représentation conventionnelle de la γ -chitine | 6 |
| 9- Méthode de production de la chitine et du chitosane | 13 |
| 10- Structure du chitosane..... | 14 |
| 11- Vue générale des changements cellulaires qui causent le cancer | 30 |
| 12- Localisation cellulaire et fonction des oncoprotéines | 32 |
| 13- Méthodes utilisées pour la préparation de la chitine et ses dérivés..... | 43 |
| 14- Viscosimètre de type Ubbelohde..... | 49 |
| 15- Synthèse de l'O-Carboxymethyl chitine..... | 52 |
| 16- Synthèse du N,O-Carboxymethyl chitosane..... | 52 |
| 17- N-phtalimido chitosane..... | 53 |
| 18- Cultures des cellules Hep2 et RD dans une étuve à CO ₂ à 37 °C..... | 54 |
| 19- Culture des lignées tumorales observées au microscope photonique à phase inversé | 54 |
| 20- Mise en évidence de la forme isolées et décollées du fond de la boîte des cellules RD..... | 55 |
| 21- Test de cytotoxicité dans une boîte à 24 puits..... | 56 |
| 22- Comptage des lignées cellulaire dans la cellule de Mallasses..... | 57 |
| 23- Optimisation de la concentration en acide chlorhydrique..... | 58 |
| 24- Optimisation de la durée de la déminéralisation | 59 |
| 25- Optimisation du volume d'acide chlorhydrique..... | 59 |
| 26- Optimisation de la concentration en hydroxyde de sodium | 60 |

| | |
|--|----|
| 27- Optimisation de la durée de la réaction de déprotéinisation | 61 |
| 28- Optimisation de la température de la réaction de déprotéinisation | 62 |
| 29- Optimisation du volume en hydroxyde de sodium | 62 |
| 30- Spectre infrarouge de la chitine..... | 63 |
| 31- spectre infrarouge de la chitine irradiée..... | 64 |
| 32- Spectre infrarouge du chitosane..... | 64 |
| 33- Spectre infrarouge du O carboxymethylchitine..... | 65 |
| 34- Spectre infrarouge du N,O carboxymethylchitosane..... | 65 |
| 35- Évolution de la viscosité réduite et inhérente en fonction de la concentration du chitosane..... | 66 |
| 36- Effet cytotoxique de la chitine et de l'OCM chitine sur les cellules Hep2..... | 75 |
| 37- Effet cytotoxique du chitosane et du NOCM chitosane sur les cellules Hep2... | 75 |
| 38- Effet cytotoxique de la chitine irradié et du 2 phtalimido chitine sur les cellules Hep2..... | 76 |
| 39- Effet cytotoxique de la chitine et du chitosane sur les cellules RD..... | 76 |
| 40- Effet cytotoxique du OCM chitine et du N,OCM chitosane sur les cellules RD. | 77 |
| 41- Effet cytotoxique de la chitine irradié et du 2 phtalimido chitine sur les cellules RD..... | 78 |

Liste des symboles et abréviations

| Symboles | Désignation |
|--|---|
| a : | Constante de Mark-Houwink |
| C : | Concentration |
| CPE : | complexes polyélectrolytes |
| Da : | Dalton |
| DA : | Degré d'acétylation |
| DC : | Décoloration. |
| DD : | Degré de désacétylation. |
| DM : | Déminéralisation. |
| DP : | Déprotéinisation. |
| FTIR : | Fourier Transformed InfraRed spectroscopy |
| HPLC : | Chromatographie en phase liquide à haute performance |
| IC₅₀ : | La concentration qui inhibe la croissance de 50% de la croissance cellulaire. |
| IR : | Infra Rouge (Infra Red) |
| k : | Constante de Mark-Houwink |
| kDa : | Kilo Dalton |
| M : | Masse molaire |
| NOCMC : | N,O, Carboxy-methyl chitosane |
| O CMC : | O, Carboxy-methyl chitine |
| PM : | Poids moléculaire |
| pKa : | Constante d'acidité |
| pH : | Potentiel d'hydrogène |
| RMN : | Résonance magnétique nucléaire |
| UV : | Ultraviolet |
| η_{solvant} : | Viscosité du solvant |
| η_{relative} | Viscosité relative |
| $\eta_{\text{spécifique}}$: | Viscosité spécifique |
| $\eta_{\text{réduite}}$: | Viscosité réduit |

Introduction :

Notre civilisation a pris progressivement conscience que notre modèle de développement économique et technologique implique l'utilisation massive de ressources non renouvelables fossiles. Notre société est confrontée à de nombreux problèmes environnementaux comme par exemple l'effet de serre, les pollutions chimiques et biologiques de l'eau, de l'air et des sols ou encore la réduction de la biodiversité. Or, les réserves de combustibles fossiles s'épuisent.

La question se pose donc de trouver des matières premières renouvelables susceptibles d'être substituées au pétrole dans toutes ses applications énergétiques et non-énergétiques. Il existe une recherche active visant à produire des matériaux plus respectueux de l'environnement et de notre santé. Parmi les matières premières bon marché, renouvelables et non nocives pour l'environnement, on peut citer les matériaux issus des ressources marines, et en particulier la chitine et son principal dérivé, le chitosane. Ces biopolymères satisfont aux exigences de développement durable car ils diminuent la dépendance à l'égard des combustibles fossiles et sont facilement biodégradables.

La crevette est l'exemple le plus probant, sa carapace commence à offrir des produits tout aussi intéressants, en raison de leur richesse en protéines et en chitine. En effet, Les carapaces les plus exploitées sont celles des crevettes et des crabes à cause de leur teneur élevée en chitine qui représente 14%-27% et 13%-15% respectivement (No et al., 1989). La production mondiale aquacole est en augmentation permanente et en particulier la production de crevettes. La figure1 montre l'évolution de la production mondiale de crevettes entre les années 1980 et 2005 selon les données de la F.A.O. (Food and Agricultural Organisation Statistical Databases) (2009).

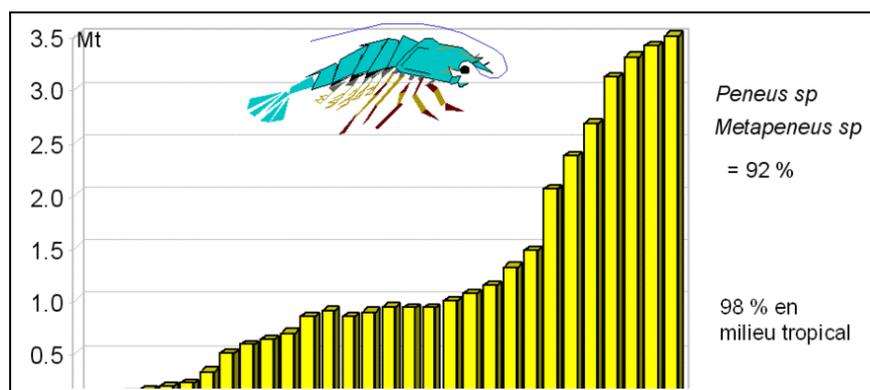


Figure 1 : Production mondiale globale de la crevette (en tonnes métriques) (FAOSTAT, 2009).

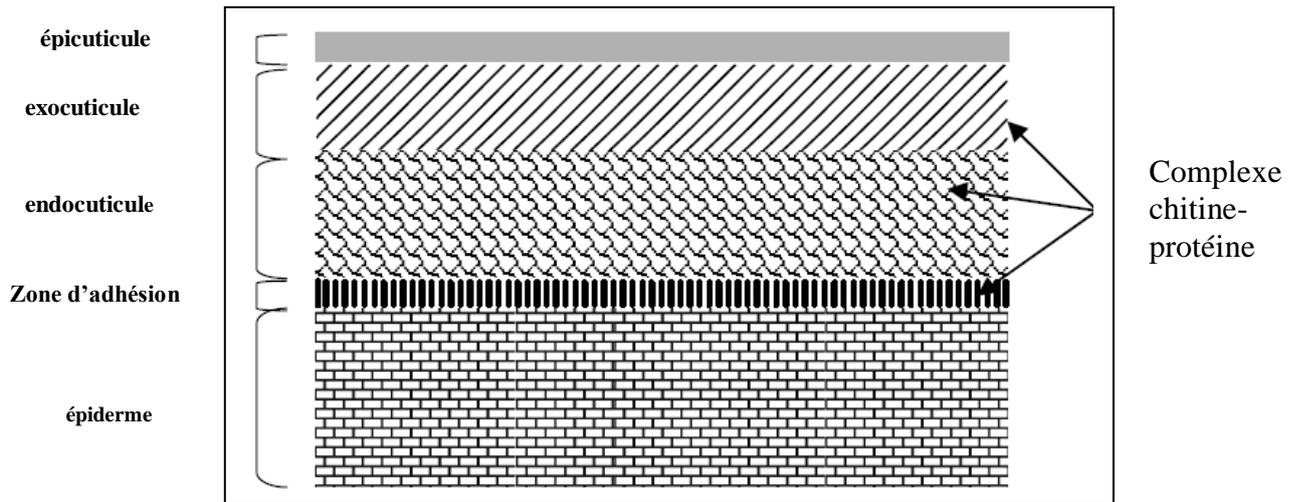


Figure 2 : Interpretation schématique de la matrice organique de la cuticule des insectes (Se-Kwon Kim,2001, Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives ;1 :4).

La chitine et surtout son principale dérivé le chitosane, trouvent des applications importantes dans différents domaines en raison de leurs nombreuses et diverses propriétés.

Concernant notre travail, nous nous sommes intéressés à valoriser la carapace des crevettes en tirant plusieurs substances aux qualités antitumorales. Ces composés ont pour avantages majeurs d'être non toxiques, biodégradables, biocompatibles et bioactives et donc permettent de nombreuses applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques.

Nous avons donc effectué :

- I. l'extraction de la chitine à partir de carapaces de crevettes par voie chimique ;
- II. l'optimisation des paramètres physico-chimiques de cette extraction ;
- III. la préparation, par voie chimique, du chitosane, du N,O carboxymethylchitosane ; O,carboxymethylchitine et du 2phtalimido chitine.
- IV. l'étude de l'effet anticancéreux des quatre produits sus-cités.

I -1- Historique :

La chitine a été découverte en 1811 par le français Henri Braconnot, qui a isolé un résidu impur à partir des parois cellulaires des champignons (Braconnot, 1811). Il appela cette substance « fungine ». En 1823, Odier a extrait un composé similaire, à partir de la cuticule de l'exosquelette d'un insecte (Odier, 1823). En traitant une cuticule de coléoptère par de la potasse à chaud, il a obtenu un produit insoluble qu'il nomma chitine (mot grec qui signifie tunique ou enveloppe). Odier fut intrigué par le fait que les insectes et les champignons possédaient le même composant structural.

I-2- Définition et structure chimique de la chitine :

La chitine est un polymère linéaire qui a une structure similaire à la cellulose, mais c'est un aminopolysaccharide ayant des groupements acétamide en position C-2 à la place des hydroxyles (Blackwell, 1973). Sa structure chimique est un enchainement d'unités monomères *N-acétyl- β- D-glucosamine reliées par une liaisons glycosidique(1→4)*. La nomenclature définit cette structure comme celle d'un poly [*β-(1 → 4)-2- acétamido-2-déoxy-D-glucopyranose*]. En réalité, la chitine commerciale contient également des monomères D-glucosamine. En fait, le terme chitine est donné à tout copolymère formé d'unités constitutives *N-acétyl-D glucosamine* et *D-glucosamine*, dont le DA est supérieur à 50%.

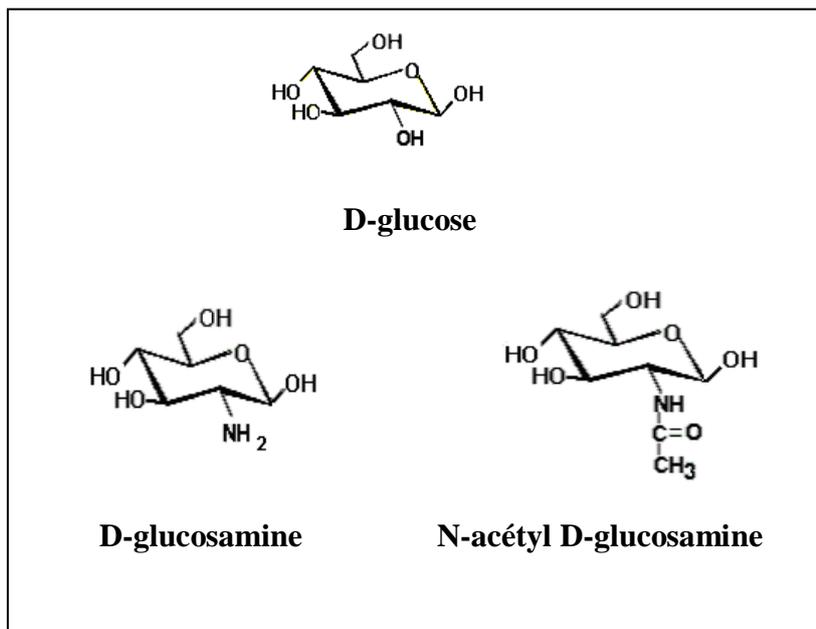


Figure 3: Structures du D-glucose, du D-glucosamine et du N-acétyl D-glucosamine.

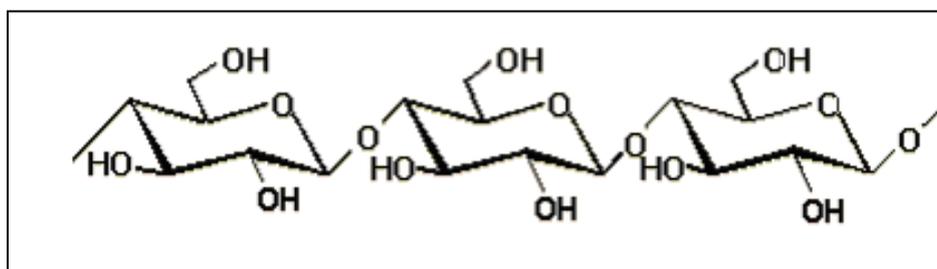


Figure 4 : Structure de la cellulose.

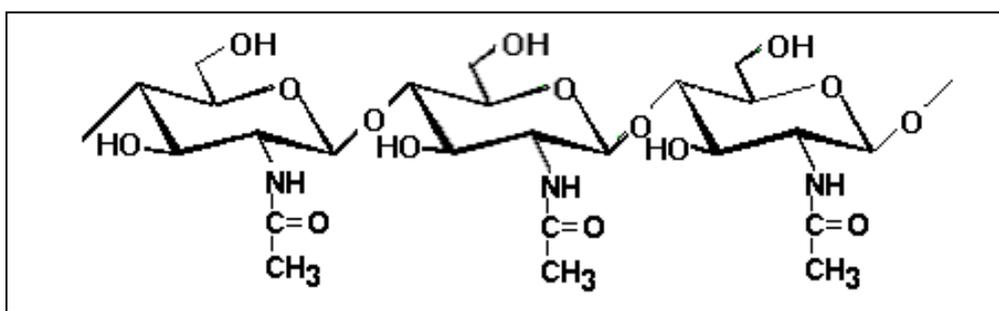


Figure 5 : Structure de la chitine.

L'analyse aux rayons X montre que la chitine est une substance polymorphe qui se rencontre sous trois formes : α , β , γ et dont la différence réside dans l'orientation des chaînes polysaccharidiques (Tabaoda *et al.*, 2003), le degré d'hydratation, la taille de la cellule unitaire et le nombre de chaîne de chitine par cellule unitaire (Merzendorfer et Zimoch, 2003; Allache, 2005).

La forme α (**Fig. 4**) constituée de chaînes antiparallèles (Minke et Blackwell, 1978 ; Pawadee *et al.*, 2003) représente la forme la plus répandue et la plus stable dans la nature (Svitil *et al.*, 1997). Elle est rencontrée chez les mollusques, les planctons et dans les cuticules des arthropodes tels que les crustacés (crevettes, crabes, langoustes,...) et dans la paroi des champignons (levures et moisissures) (Zhang *et al.*, 2000 ; Hobel, 2004).

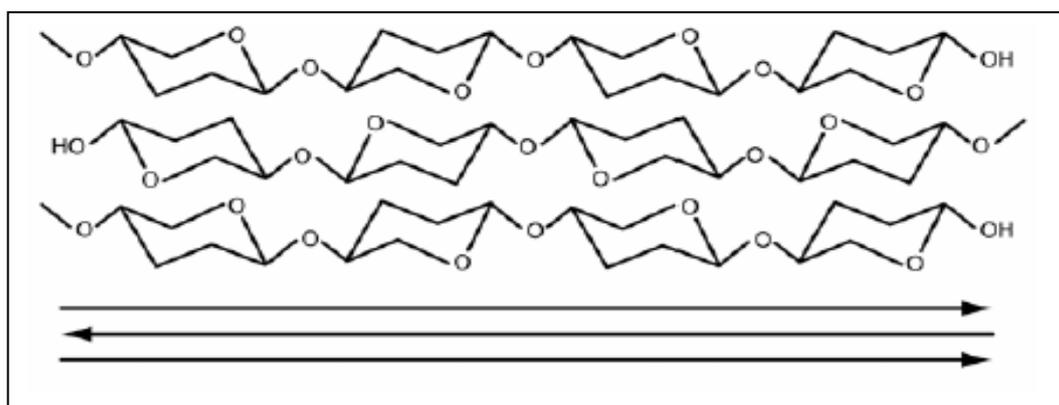


Figure 6 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle de l' α -chitine (Tharanathan et Kittur, 2003).

La forme β (**Fig. 5**) caractérisée par un alignement parallèle des chaînes polysaccharidiques (Tomoya *et al.*, 2003) représente la forme la moins stable et la plus dégradabile de la chitine (Manisara *et al.*, 2003). Elle est rencontrée chez les mollusques tels que les calmars, les cocons d'insectes ainsi que la paroi des champignons (Hobel, 2004).

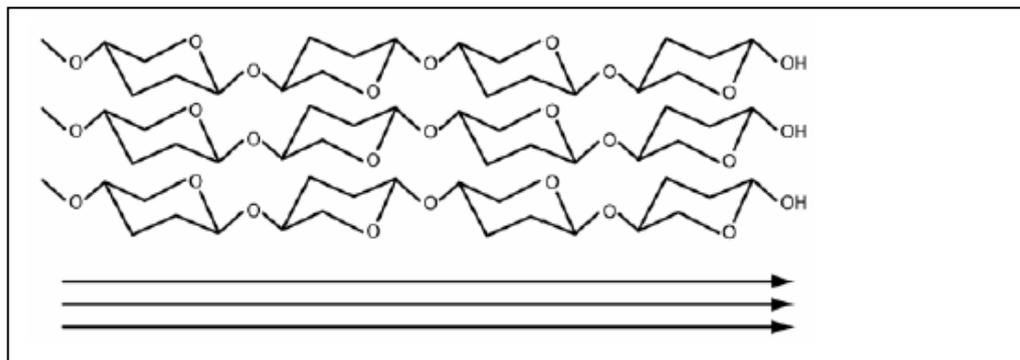


Figure 7 : Structure moléculaire et représentation conventionnelle de la β - chitine (Tharanathan and Kittur, 2003).

La forme γ constituée d'un mélange de chaînes parallèles et antiparallèles (**Figure 6**), est rencontrée dans l'estomac du calmar *Loligo* sp (Hobel, 2004) et les cocons des insectes (Falini *et al.*, 2003).

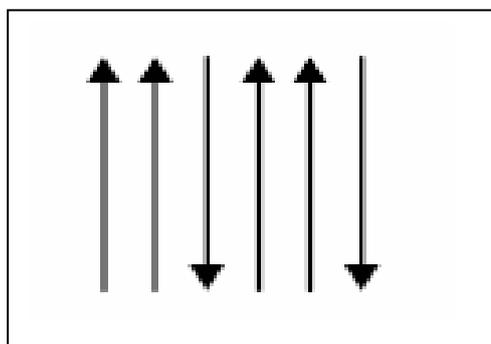


Figure 8 : La représentation conventionnelle de la γ -chitine (Donadel, 2004)

I-3- Sources de chitine :

La chitine est produite par les insectes (blattes, coléoptères, fourmis), les arachnides (scorpions, araignées), les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calamars) et les champignons (Kurita, 2006). Dans le règne animal, la chitine est un élément de soutien des téguments de certains invertébrés (insectes, crustacés, mollusques, nématodes). On la retrouve en particulier dans la composition de leur cuticule, et à un degré moindre au niveau de la paroi intestinale, du tube digestif, des trachées, des tendons musculaires et du squelette interne. Cette cuticule contient également des protéines, des lipides et du carbonate de calcium. En réalité, les structures chitineuses ne sont jamais constituées de chitine seule ; elle est

généralement complexée à des protéines sous la forme de glycoprotéines, ce qui confère des propriétés de rigidité (ou de souplesse) aux cuticules. La chitine est également un constituant majeur des endosquelettes de céphalopodes comme les sèches et les calmars. A noter que la synthèse de chitine est une propriété apparue très tôt au cours de l'évolution de la cellule animale (Muzzarelli, 1985). Au niveau des autres règnes biologiques, elle est signalée dans les parois cellulaires des champignons et de certaines algues chlorophycées. La chitine est également présente dans certaines levures et bactéries.

Tableau 1 : Proportion de chitine au niveau des organismes marins (Tolaimate *et al.*, 2003).

| Source de chitine | Type de chitine | Pourcentage de chitine |
|--|-----------------|------------------------|
| Anatife (<i>Lepas anatifera</i>) | α | 7 |
| Crabe marbré (<i>Grapus marmoratus</i>) | α | 10 |
| Crabe rouge (<i>Portunus puber</i>) | α | 10 |
| Araignée de mer (<i>Maia squinado</i>) | α | 16 |
| Homard (<i>Homarus vulgaris</i>) | α | 17 |
| Petite-cigale de mer (<i>Scyllarus arctus</i>) | α | 25 |
| Langouste (<i>Palinurus vulgaris</i>) | α | 32 |
| Ecrevisse (<i>Astacus fluviatilis</i>) | α | 36 |
| Crevette (<i>Palaemon fabricius</i>) | α | 22 |
| Mante de mer (<i>Squilla mantis</i>) | α | 24 |
| Seiche (<i>Sepia officinalis</i>) | β | 20 |
| Calamar (<i>Loligo vulgaris</i>) | β | 40 |

I-4- Les propriétés de la chitine :

La chitine et ses dérivés, principalement le chitosane (la forme désacétylée de la chitine) présentent de nombreuses propriétés intrinsèques, physiques, chimiques et biologiques qui sont résumés dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Propriétés de la chitine et du chitosane (Muzzarellu *et al* ,.2005).

| Propriétés physiques et chimiques | Propriétés polyélectrolytes du chitosane en milieu acide | Propriétés biologiques | Autres propriétés |
|--|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Structure D-glucosamine rigide et cristalline. - Aminopolysaccharide linéaire et hydrophile - % azote élevé - Capacité à former des liaisons hydrogène (pouvoir viscosifiant). - Réactivité des groupements amino (chitosane) et hydroxyle (chitine et chitosane). - Base faible (pKa = 6,3) (caractère nucléophile de la fonction amine). - Insoluble dans l'eau et les solvants organiques. - Soluble dans les solutions acides diluées (chitosane). - De nombreux groupements réactifs (activation chimiques). - Conductivité ionique. | <ul style="list-style-type: none"> - Polyamine cationique (interactions avec des molécules anioniques). - Forte densité de charge. - Excellent flocculant. - Propriétés chélatantes et complexantes. - Propriétés d'encapsulation. - Matériaux pour l'isolation. | <ul style="list-style-type: none"> - Non toxiques. - Biodégradable. - Biocompatible (hémobiocompatible, absorbable, non fermentable). - Bioadhésif (muco-adhésivité, formation de films biologiques). - Bioactif (activités antimicrobienne et antifongique, agents antiacide, antiulcère et antitumorale, propriétés anticoagulantes et anticholestérol). | <ul style="list-style-type: none"> - Propriétés de rétention d'eau. - Propriétés d'adhésion à des surfaces chargées négativement (chitosane). - Propriétés filmogènes. |

I-4-1- Les propriétés biologiques :

Il s'agit de :

- **La biodégradabilité** : la dégradation biologique de la chitine est réalisée par une série d'enzymes : chitinases, lysozyme et glucanases (Shigemasa *et al.*, 1994 ; Chih-Min *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2004). Parmi les chitinases, les endo-chitinases hydrolysent le polymère de façon aléatoire pour produire des dimères et des trimères de N-acétylglucosamine (NAG), tandis que les exo-chitinases (Laura *et al.*, 2006) hydrolysent la chitine de haut poids moléculaire en produisant uniquement des dimères de NAG. Finalement, les N-acétylglucosaminidases aussi appelées chitobiasés ou N-acétyl hexoaminidases hydrolysent les dimères de NAG et parfois le NAG des extrémités non-réductrices des chaînes de chitine pour produire des monomères de NAG (Plouffe, 1997).
- **La biocompatibilité** : sa présence dans l'organisme vivant n'induit aucun effet néfaste à la santé du receveur (Foscolo et Phillipon, 1997 ; Bal *et al.* 2006).
- **La bioactivité** : activités antimicrobienne et antifongique, agents antiacide, antiulcère et antitumorale, propriétés anticoagulantes et anticholestérol (Hudson et Jenkins, 2003).

I-4- 2- Les propriétés physicochimiques :

- Cristallinité :

Les chitines rencontrés dans le milieu naturel diffèrent non seulement par leur MM et leur DD, mais également par leur état cristallin (Domard *et al.*, 1983). La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles (Kurita, 2006).

La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayon X. Elle peut être également mesurée par spectrométrie infrarouge ou RMN du solide. Cette mesure expérimentale permet, par exemple, de comparer différents matériaux. Le **Tableau 3** donne des caractéristiques résultantes de la cristallinité de la chitine et du chitosane. La chitine est présente naturellement sous forme cristalline ou sous forme de complexes chitino-protéiques (Ronerts, 1992).

Les chaînes du polymère peuvent être agencées de différentes manières suivant l'origine du matériau diffusionnelles (Kurita, 2006). A l'état solide, les chaînes de chitine se présentent sous forme d'hélice avec une unité de répétition d'environ 1,03 nm (Desbrières, 2002).

Comme dans le cas de la cellulose, chaque unité est constituée de deux résidus. En conséquence des divers arrangements des macromolécules, trois formes distinctes ont été mise en évidence :

La chitine α qui est la plus stable et la plus abondante : elle existe principalement dans les exosquelettes des crevettes et des crabes, et la membrane de certains champignons.

La forme β que l'on trouve dans la plume de calamar et l'endosquelette de seiche.

La forme γ qui a été identifiée dans la cuticule d'un brachiopode inarticulé et les cocons des insectes.

Tableau 3 : Caractéristiques résultantes de la cristallinité de la chitine et du chitosane (Roberts, 1992).

| Produit | Maille | Ponts hydrogène | Caractéristique(s) | Pics de diffractions |
|------------------|----------------|-----------------|--|----------------------|
| Chitine α | orthorhombique | nombreux | rigidité | 3 |
| Chitine β | monoclinique | peu nombreux | solubilité affinité pour les solvants hydrophilie | 3 |
| Chitosane I | orthorhombique | | plus désordonné | 2 |
| Chitosane II | orthorhombique | | moins désordonné | 2 |

- La solubilité :

La chitine est une substance inerte, insoluble dans l'eau, et également dans la plupart des solvants, comme la cellulose (Austin, 1984). Les acides concentrés la dégradent. Par chauffage, la chitine se décompose vers 250°C sans fondre. Elle est soluble dans un mélange diméthylacétamide/chlorure de lithium. En revanche, sa désacétylation partielle en milieu basique permet d'obtenir le chitosane qui, lui, est soluble en milieux aqueux acide grâce à la protonation de ses fonctions amines.

- Le poids moléculaire :

La définition du poids moléculaire des polysaccharides et la compréhension de ses conséquences sur les propriétés physico-chimiques, ont présenté un vrai défi aux chimistes pendant un certain nombre d'années. Dans le cas de la chitine, la connaissance de tel paramètre est très importante pour les usages industriels (Montserrat, 2002). Il varie entre 1,03 et 2,5 MDa (Fernandez-Kim, 2004).

- Le degré d'acétylation (DA) : C'est l'une des plus importantes caractéristiques de la chitine (Muzzarelli et Riccardo, 1980). Il est défini comme étant le nombre de groupe Nacétylglucosamine présent sur le polymère par rapport au nombre total d'unités (Montserrat, 2002).

On parlera de chitine lorsque DA est supérieur à 70% (Kiefer, 1999). Cependant, une désacétylation peut avoir lieu au cours de l'extraction de la chitine, on parle alors du degré de désacétylation qui varie en fonction de l'origine et la méthode d'extraction de la chitine (Kurita, 2001).

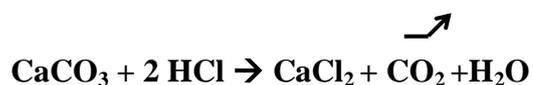
Le degré de désacétylation (DD), défini comme étant le nombre de groupes D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités, est relié au DA ($DD = 100 - DA$). C'est un paramètre structural important qui influence les propriétés physico-chimiques de la chitine (poids moléculaire, viscosité, solubilité, l'activité physiologique, la réactivité chimique et la biodégradabilité,...) (Suzuki *et al.*, 1990 ; Kittur *et al.*, 2002).

Afin de déterminer le degré d'acétylation avec une plus grande précision, plusieurs techniques ont été testées. La technique qui semble la plus adaptée pour une caractérisation rapide est la spectroscopie infrarouge (Muzzarelli *et al.*, 1980 ; Montserrat, 2002).

I-5- Préparation de la chitine et du chitosane :

Le procédé de fabrication de la chitine et du chitosane est résumé dans la **figure 7**. Pour obtenir la chitine, les déchets sont d'abord broyés, puis les protéines ainsi qu'une partie des colorants naturels sont extraits par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration variable (en générale 0,1-5 M) ; la température et la durée du traitement alcalin peuvent également varier. Cette étape de **déprotéinisation** peut se faire également par voie enzymatique (Sandforf, 2003). Le carbonate de calcium présent dans la carapace est ensuite extrait par dissolution dans une solution d'acide chlorhydrique (concentration 1-10 M) à température ambiante (la durée du traitement acide est variable). Le résidu, une fois séché, constitue la chitine brute (faiblement désacétylée, DD = 20-30%) qui peut être stockée comme un intermédiaire stable., cette étape est nommé **déminéralisation**.

Dans cette réaction, le carbonate de calcium CaCO_3 réagit avec l'HCl pour former du chlorure de calcium soluble CaCl_2 et du dioxyde de carbone gazeux CO_2 :



A la fin de ces deux traitements (déprotéinisation et déminéralisation), il peut subsister une coloration due à des pigments incomplètement éliminé (Rinaudo, 2006) : On effectue alors une étape de décoloration par un agent oxydant (KMnO_4 , NaOCl ou H_2O_2) avec un risque de dépolymérisation et/ou d'oxydation des unités situées aux extrémités de la chaîne polymérique.

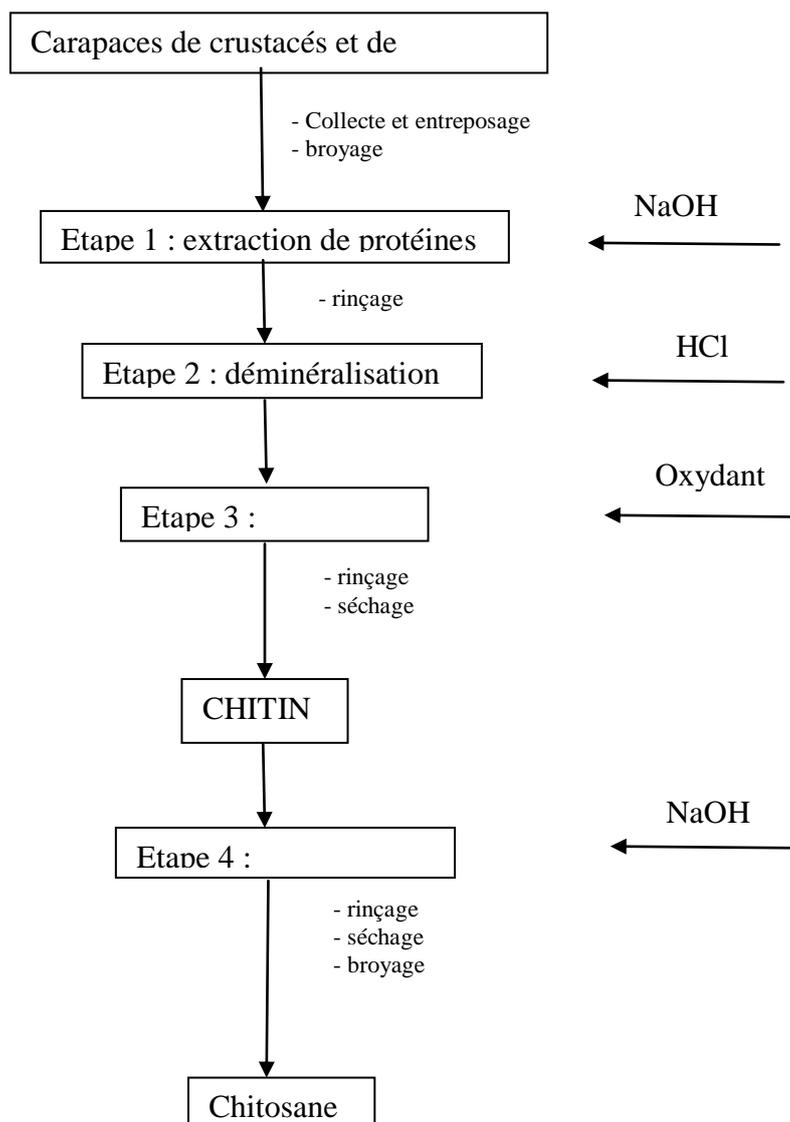


Figure 9 : Méthode de production de la chitine et du chitosane (Onsoyen et Skaugrud,1990)

I-6- Les dérivés de la chitine :

I-6-1- Le chitosane :

Le chitosane est un copolymère cationique, constitué d'unité de β (1-4) 2 amino-2 desoxy-D-glucose (D-glucosamine) et β (1-4) N-acétyl 2- amino 2- desoxy- D-glucose (Graham et Mark, 1995 ; Hitoshi et Yoshihiro, 1999 ; Berger *et al.*, 2004).

La désacétylation en milieu basique de la chitine permet d'obtenir le chitosane qui est un copolymère linéaire à arrangement aléatoire d'unités D-glucosamine et d'unités N-acétyl-D-glucosamine reliées par des liaisons β -(1 \longrightarrow 4). Le chitosane est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (Rauch et Dornish, 2006). Le terme chitosane est donnée à tout copolymère dont le DA est inférieur à

50%. Ainsi, chaque lot est caractérisé par la fraction de groupements *N-acétamide* résiduels (DA) ou par la quantité relative de groupements acétylés retirés à la macromolécule de chitine lors de sa préparation (DD). Les propriétés du chitosane seront donc dépendantes du DD et de la MM, masse qui est souvent très élevée comme pour tous les polysaccharides.

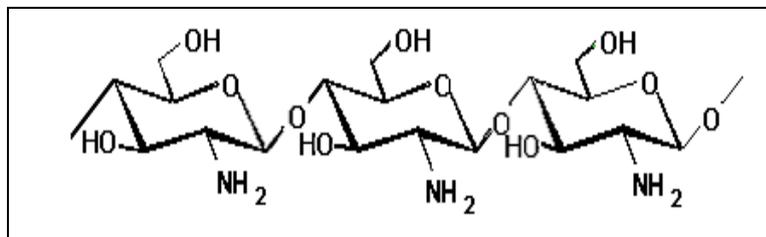


Figure 10 : Structure du chitosane.

Le chitosane a deux avantages majeurs par rapport à la chitine : sa solubilité dans les acides faibles et l'existence de groupements amines (sites actifs pour de nombreuses réactions chimiques) (Fernandez-Kim, 2004).

Le chitosane est retrouvé dans la plupart des zygomycètes. Il est extrait directement à partir de *Mucor rouxii* (Da Silva Amorim, *et al.*, 2001).

I-6-2- Historique :

En 1859, Rouget remarqua que la chitine modifiée, préparé à partir de chitine traité par de la potasse à chaud, était soluble dans des solutions aqueuses acides (Roudget, 1859). Cette propriété a alors été utilisée pour distinguer cette nouvelle substance de la chitine. Le nom chitosane a été introduit pour la première fois en 1894 par Hoppe-Seyler (Hoppe-Seiler, 1984). Mais la découverte du chitosane est néanmoins attribuée à Rouget.

I-6-3- Caractéristiques :

- Solubilité :

Le chitosane est, par contre, soluble dans la plupart des solutions organiques acides (Austin, 1984). L'acide le plus couramment utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué. En général, le chitosane est parfaitement soluble à pH 3-4. Il est également soluble dans des solutions diluées (0,1-1%) d'acides nitrique et chlorhydrique. En effet, les groupes aminés du chitosane sont protonés à partir de pH 3-4 et le polymère chargé positivement devient soluble. Le chitosane est insoluble dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau. Il est donc relativement stable en milieu acide concentrés, même s'il se dégrade après une longue exposition. En revanche, en présence d'une faible quantité d'acide, il est soluble dans les mélanges aqueux contenant par exemple, 60% de méthanol ou 40% d'acétone. Cependant, il faut noter, que la solubilité du chitosane est un paramètre très difficile à contrôler (Rinaudo, 2006) car la valeur de DD influence fortement sa solubilité.

- Poids moléculaire :

Le poids moléculaire de l'agent polymérique coagulant est considéré comme étant une des caractéristiques les plus importantes, affectant la fonctionnalité des polymères. Parmi les différentes méthodes décrites dans la littérature, la chromatographie par perméation de gel est la plus couramment utilisées pour la détermination du poids moléculaire du chitosane ainsi que de sa polydispersité (Berth *et al.*, 2002 ; Yomota, 1993), mais la viscosimétrie demeure une méthode simple et rapide (Felt *et al.*, 1999).

A l'instar de sa composition, le poids moléculaire du chitosane varie avec la source du matériel brut ainsi que sa méthode de préparation. En général, les hautes températures, l'oxygène dissout, et les conditions drastiques peuvent provoquer la dégradation du chitosan induisant la diminution du poids moléculaire (Felt *et al.*, 1999).

- Degré de désacétylation (DD) :

En pratique, le chitosane et la chitine sont considérés comme des copolymères de même structure chimique globale constitués d'unités *N-acétyl-D-glucosamine* et *D-glucosamine*, dont la répartition fixe le DD.

La principale différence entre la chitine et le chitosane est le degré d'acétylation (DA) ou le degré de désacétylation (DD) selon le cas et les auteurs. La chitine présente un DA supérieur à 70%, alors qu'il ne dépasse pas 30% pour le chitosane.

Le degré d'acétylation (DA) est défini comme étant la fraction molaire des unités acétylées (unité acétyl glucosamine). Le degré de désacétylation (DD) représente la proportion d'unités amine-D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités glycosidiques (Zhang *et al.*, 2005). DA et DD sont reliés par l'équation :

$$DD = 1 - DA$$

Le paramètre DD est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leurs comportements en solution (Hudson et Jenkins, 2003), à savoir :

- La solubilité du chitosane.
- La flexibilité des chaînes macromoléculaires.
- La conformation du polymère.
- La viscosité des solutions.

Le DD peut être déterminés par analyse élémentaire (analyse du % d'azote) (Kasaai *et al.*, 2000), par titrages potentiométriques ou conductimétriques (Broussignac, 1968), par diffraction de RX (Darmon et Rudall, 1950), par spectrophotométries infra-rouge à transformée de Fourier et UV, ou encore par résonance magnétique nucléaire (RMN) liquide ou solide (essentiellement proton ^1H et carbone ^{13}C , voire azote ^{15}N (Rinaudo *et al.*, 2006). La technique infrarouge est la plus adaptée pour une caractérisation rapide et simple, et la technique RMN la plus précise, dès lors que le polymère est parfaitement soluble dans l'eau deutérée en présence d'acide chlorhydrique par exemple.

- Polyélectrolytes en milieu acide :

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques (Sorlier *et al.*, 2001). En milieux acide, il se comporte comme un polycation, à forte densité de charge.

Le chitosane est une base faible de pKa voisin de 6,3-6,7, valeurs moyennes des échantillons commerciaux. Il se dissout donc en milieu acide par protonation des fonctions amine présentes sur la macromolécule (Sorlier *et al.*, 2001). Pour un polymère faiblement acétylé (c'est-à-dire proche de 10-15%, représentatif des échantillons commerciaux, de pKa voisin de 6,3), la plupart des groupes aminés sont protonés en milieu acide ($\text{pH} < 5,5$). Lorsque le pH devient inférieur au pKa, le chitosane devient cationique et par conséquent soluble. Comme pour tout polyélectrolyte, le pKa du chitosane dépend plus particulièrement du degré de neutralisation des groupes NH_3^+ auquel ce pK est déterminé, et donc du DD. En général, la valeur du pKa augmente quand le DD diminue (Sandford, 2003).

- La viscosité :

La viscosité des solutions de chitosane est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. Ce paramètre est déterminé par viscosimétrie. La viscosité va également dépendre, non seulement du DD, mais aussi du pH car ces deux paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère. Lorsque celle-ci est élevée, la conformation des macromolécules est très étendue en raison des phénomènes de répulsions des charges et la viscosité des solutions est alors importante. En revanche, lorsque le polymère est peu chargé, les chaînes macromoléculaires sont sous forme de pelotes statistiques caractérisées par une faible viscosité (phénomènes d'interactions entre les chaînes). Plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte. La viscosité augmente également avec le DD car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion de groupements amine libres est importante et plus il est soluble. La viscosité augmente également avec la concentration et elle est fonction de la MM des chaînes macromoléculaires. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente.

Pour caractériser le comportement viscosimétrique d'une solution de polymère, il existe différentes méthodes. La plus employée consiste à déterminer la viscosité intrinsèque du polymère qui nécessite de connaître les paramètres **K** et **a** de la relation de Mark-Houwink -Sakurada (Rinaudo *et al.*, 1999) suivante :

$$\eta = k M^a$$

η : Viscosité intrinsèque ;

M : La masse molaire ;

K et **a** : constantes.

Certains problèmes peuvent apparaître lors de la mesure de la viscosité du chitosane. En effet, la présence possible de micro-gels ou d'agrégats, favorisés par les liaisons hydrogène et hydrophobes, l'influence du vieillissement des solutions, et des effets électrostatiques (dus aux charges des groupes amine protonés) induisent des erreurs.

I-6-4- Les oligomères de la chitine et du chitosane:

Comme tous les polysaccharides, la chitine et le chitosane peuvent être dépolymérisé par des agents hydrolytiques par rupture des liaisons glycosidiques. La dégradation de la chitine et du chitosane mène à la production d'oligomères ayant différents degrés de polymérisation et des propriétés biologiques spécifiques. Parmi les méthodes de préparation des oligomères, on peut citer : la dépolymérisation mécanique (Kasaai *et al.* 2003), l'hydrolyse chimique (Horowitz *et al.*, 1957 ; Domard et Cartier, 1989) et l'hydrolyse enzymatique (Izume et Ohtakara, 1987).

La dépolymérisation mécanique du chitosane peut être obtenue par microfluidisation (Kasaai *et al.*, 2003). Ce procédé implique le transfert d'énergie mécanique aux particules du fluide sous haute pression. La solution est pompée et partagée en deux microcourants qui s'entrechoquent l'un contre l'autre dans une chambre d'interaction. Les chaînes du polymère de chitosane sont alors soumises à un fort cisaillement, se rompent et le degré de polymérisation est abaissé. La microfluidisation peut être utile pour une dépolymérisation partielle du chitosane dans le but de réduire la viscosité des solutions de chitosane, mais cette méthode n'est pas appropriée à la production de faibles masses moléculaires de chitosane.

L'hydrolyse chimique de la chitine et du chitosane consiste à chauffer des suspensions du polymère dans des solutions aqueuses concentrées d'acides inorganiques tels que l'acide chlorhydrique (Horowitz *et al.*, 1957 ; Domard *et al.*, 1989), l'acide sulfurique (Nagasawa *et al.*, 1971), l'acide fluorhydrique (Defaye *et al.*, 1989) ou encore l'acide nitreux (Allan et Peyron, 1995).

L'hydrolyse enzymatique :

La structure des liaisons glycosidiques joue un rôle important lors de l'hydrolyse enzymatique. En effet, la chitine et le chitosane possèdent quatre types de liaisons glycosidiques :

- 1 liaison entre deux unités acétylées (A-A)
- 1 liaison entre une unité acétylée et une unité désacétylée (A-D)
- 1 liaison entre une unité désacétylée et une unité acétylée (D-A)
- 1 liaison entre deux unités désacétylées (D-D)

Selon leur spécificité, les enzymes cliveront sélectivement un type de liaison glycosidique. Les chitinases clivent la liaison glycosidique entre deux unités *N*-acétyl-D-glucosamine tandis que les chitosanases clivent la liaison glycosidique entre deux unités D-glucosamine.

Hydrolyse enzymatique par les chitinases :

Les chitinases clivent les liaisons glycosidiques de type A-A. Elles sont présentes dans les bactéries, les champignons, les plantes et les insectes mais sont absentes chez la plupart des mammifères à l'exception des vaches, des chèvres et des moutons (Takamori *et al.*, 1996).

La plupart des chitinases isolées de bactéries sont utilisées pour obtenir des chitoooligosaccharides *N*-acétylés avec un degré de polymérisation supérieur à deux.

Hydrolyse enzymatique par les chitosanases :

Les chitosanases clivent les liaisons glycosidiques de type D-D. Elles se trouvent dans les bactéries, les champignons et les plantes (Somashekar et Joseph, 1996), tout comme les chitinases.

Elles peuvent toutes deux dégrader des chitosanes de différents degrés d'acétylation (Osswald *et al.*, 1994). Cependant, les chitinases clivant spécifiquement les liaisons glycosidiques de type A-A, elles attaquent préférentiellement les chitines et chitosanes de haut degré d'acétylation. Les chitosanases clivant les liaisons glycosidiques de type D-D sont plus efficaces sur des chitosanes ayant un faible degré d'acétylation. Les chitosanases se distinguent également des chitinases par leur plus petite masse molaire (Grenier et Mo, 1990).

I-6-5- Intérêts des chitooligosaccharides :

Les oligomères de chitosane présentent plusieurs avantages par rapport au chitosane non dépolymérisé. Leurs faibles poids moléculaires les rendent solubles dans l'eau et les solutions d'oligomères ont une viscosité plus faible que les solutions de chitosane. De plus, contrairement au chitosane qui agit comme une fibre, les oligomères sont facilement absorbés à travers l'intestin, et passent rapidement dans le système sanguin (Kim et Rajapakse, 2005).

I-6-6- Application de la chitine et de ses dérivés :

La chitine et surtout le chitosane trouvent des applications importantes dans différents domaines en raison de leurs nombreuses et diverses propriétés. En pratique, toutes les applications du chitosane sont intimement liées à son caractère polycationique qui est unique parmi les polymères naturels.

I-6-6-1- Domaines biomédical et pharmaceutique :

L'utilisation thérapeutique du chitosane est récente. Jusqu'à présent, les usages industriels de ces matériaux étaient, en effet, limités à certaines industries (les cosmétiques par exemple). Les propriétés biologiques de biocompatibilité et de bioactivité de la chitine et du chitosane permettent de nombreuses applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques (Shi *et al.*, 2006). Il trouve de ce fait des applications en tant que revêtement d'objets mis en contact avec le sang comme les prothèses vasculaires ou les valves cardiaques (Struszczyk, 2002). Zarzycki et Modrzejewska (Zarzycki et Modrzejewska, 2003) ont montré que le chitosane peut être utilisé pour fabriquer des organes ou des tissus artificiels, notamment en raison de son potentiel anti-thrombose. Le chitosane accélère la cicatrisation des plaies (activité bio-stimulante).

Des études récentes tendent à montrer que le chitosane exerce un effet bénéfique sur le renforcement du système immunitaire, le contrôle du niveau de cholestérol et de sucre dans le sang, et prévient le phénomène de vieillissement (Domszy et Roberts, 1985). Le chitosane diminue les risques d'hypertension et de cancer tout en stimulant les fonctions hépatiques et immunitaires et en régulant le transit intestinal. C'est aussi un agent antifongique et bactériostatique.

La chitine et le chitosane sont également utilisés dans les domaines de l'odontologie (implants, gel dentaire), l'ophtalmologie et la médecine vétérinaire. Par exemple, des lentilles de contact à base de chitine, sans propriétés optiques, sont utilisées pour la cicatrisation de cornées endommagées.

I-6-6-2- Cosmétique :

Dans l'industrie des cosmétiques, les évolutions des réglementations européennes vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement et la pression des consommateurs ont entraîné l'intégration de substances d'origine naturelle à la fois au niveau des produits, des formulations et des procédés. Ces tendances ont poussé au développement des recherches sur les macromolécules renouvelables d'origine végétale ou marine, dont les polysaccharides. Ces produits naturels peuvent présenter un cumul de fonctions en jouant plusieurs rôles à la fois qui leur permettent de s'adapter parfaitement aux formulations cosmétiques contemporaines.

En effet, ces produits peuvent être utilisés à la fois comme agent hydratant, mouillant, tensioactif, microencapsulant, et/ou antimicrobien dans une même formulation cosmétique. Grâce à son caractère polycationique, le chitosane peut interagir, avec les molécules chargées négativement. C'est le cas des protéines de la peau, des lipides, des tensioactifs, des détergents et des graisses de cheveu (Rinaudo, 2006). Les glycosaminoglycane (**GAG**) sont utilisés dans les soins capillaires. Il a été montré que les sujets qui ne perdent pas leurs cheveux (comme les populations asiatiques) possèdent dans leurs follicules pilo-sébacés un taux de GAG supérieur aux personnes présentant une alopécie. Le caractère cationique et l'aptitude à former un film sur les cheveux expliquent ainsi son incorporation à de nombreuses préparations (shampoings, gels fixant, lotions et produits de rinçage). La chitine et le chitosane sont également utilisés comme conservateurs antimicrobiens dans les préparations cosmétiques.

I-6-6-3- Agroalimentaire :

Dans les industries alimentaires, l'utilisation de la chitine et le chitosane n'est pas encore généralisée, à l'exception des pays asiatiques comme le Japon où on peut trouver de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pâte de soja). Aux États-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient dans certaines applications et comme film comestible pour protéger les aliments. En Europe, la réglementation sur l'utilisation du chitosane dans le domaine alimentaire est encore restrictive : le chitosane n'est autorisé que comme complément alimentaire pour réguler la flore intestinale et favoriser l'élimination du cholestérol. Les applications de la chitine et du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont décrites dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Application industrielles de la chitine et du chitosane dans le domaine agroalimentaire (Struszczyk, 2000).

- Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation).
- restructuration des purées de fruits, de légumes ou de viande.
- Stabilisation de la couleur et des arômes.
- Libération d'arômes ou de pigments.
- Clarification, désacidification et détoxification des boissons et des liquides alimentaires.
- Activité anti-bactérienne (préservation des aliments) enrobage alimentaires.
- Effet antioxydant (préservation de l'oxydation).
- Extraction du fer (mauvaise odeur dans les viandes).
- Support d'immobilisation d'enzymes ou de cellules (fromagerie, domaine diététique, aquaculture).
- Ingrédient fonctionnel (agent fixateur, capacité prébiotique).
- Alimentation diététique (fixation du cholestérol, acides gras, mono-glycérides).
- Formation de films (emballage).

I-6-6-4- Agriculture :

Les matériaux encapsulés à base de chitine et de chitosane se retrouvent également dans des produits agricoles (Struszczyk, 2002) (**Tableau 5**). En effet, la chitine, en particulier, pourrait devenir l'engrais naturel et le pesticide du futur. L'emploi de bio-pesticides est en augmentation et représente une alternative prometteuse. En agronomie, l'enrobage de semences des céréales avec des oligosaccharides de chitosane leur permet de résister aux attaques de champignons et de bactéries pathogènes. Le chitosane permet de conserver les aliments pour bétail et protège les animaux contre des problèmes bactériologiques ou viraux. En tant qu'adjuvant dans les vaccins, il permet de lutter contre les infections respiratoires qui affectent les troupeaux bovins. Il peut être aussi appliqué sous forme de spray oculaire (Rebeca *et al.*, 2003).

Tableau 5 : Applications de la chitine et du chitosane dans le domaine agricole (Ravi Kumar, 2000).

- Enrobage de semences (encapsulation).
- Immobilisation cellulaire (horticulture).
- Fongicide (bio-pesticide).
- Fertilisant.
- Protection des cultures.
- Traitement des sols.
- Contrôle des métaux essentiels à la croissance des plantes.
- Augmentation des rendements.
- Alimentation animale.
- Vaccination animale.

I-6-6-5- Traitement des eaux :

Les propriétés polyélectrolytes, chélatantes et complexantes du chitosane en font un bon candidat pour des applications environnementales (Muzzarelli, 1983) dans le domaine du traitement des eaux usées (Peter, 1995) comme le montre le tableau suivant :

Tableau 6 : Applications de la chitine et du chitosane dans le domaine de l'environnement (Peter, 1995).

| Champ d'application | Applications |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Traitement de l'eau potable. - Traitement des eaux usées. - Traitement des eaux de piscines. - Chélation de métaux lourds. - Récupération de métaux précieux. - Décoloration des eaux. - Filtration membranaire. - Traitement des boues. | <ul style="list-style-type: none"> - Ingénierie de l'eau (coagulation/floculation, filtration, adsorption). - Agent coagulant. - Agent chélatant de cations. - Réduction des métaux toxiques et radio-isotopes. - Récupération de métaux réutilisables. - Enlèvement du fer et du manganèse des piscines. - Agent décolorant. - Agent de déshydratation des boues. |

I-6-6-6- Autres domaines d'application :

La chitine et le chitosane trouvent également des applications dans d'autres domaines (Krajewska, 2005). Par exemple, en chimie, ils sont utilisés en tant que super-absorbants, phases stationnaires pour la chromatographie (Gocan, 2002) et l'osmose inverse, capteurs ou encore supports pour la catalyse. Un autre domaine potentiel est celui des peintures. A l'heure actuelle, les peintures anti-salissures à base de composés organométalliques (à base d'étain ou de cuivre), constituent la méthode la plus efficace pour lutter contre le développement des organismes marins sur les surfaces immergées. Ces peintures servent notamment à empêcher que ne s'agglutinent sur les parois des navires des couches de bactéries et d'algues, ce qui réduit la durabilité et l'hydrodynamicité du navire et augmente sa consommation de carburant. Cependant, les conséquences environnementales de ces biocides sont considérables et des efforts ont été mis en œuvre pour la formulation d'alternatives plus éco-compatibles pour les écosystèmes marins. Le chitosane, connu pour ses

propriétés antibactériennes et anti-algue, est utilisé dans les nouvelles formulations de peintures non toxiques pour protéger la coque des bateaux (Ravi Kumar, 2000), le reste des applications sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Autres domaines d'applications de la chitine et du chitosane (Guibal, 2005).

| Domaine d'application | Exemples d'applications |
|-----------------------|--|
| - Chimie | - Catalyse. - Capteurs chimiques. - Films biodégradables (emballage). - Super-absorbants. - Séparations membranaires (filtration). - Osmose inverse. - Chromatographie (liquide, gazeuse). - Cristaux liquides. |
| - Biotechnologie | - Immobilisation des cellules et des enzymes. - Matrice pour culture et régénération cellulaire. - Membranes. |
| - Papeterie textile | - Rétention d'eau (filières papetière et textile). - Additifs pour pâtes à papier (augmentation de la résistance du papier à la déchirure). - Agent anti-bactérien et imperméabilisant dans la filière textile. - Nanomatériaux (intelligents). |
| - Œnologie | - Clarification, désacidification et stabilisation des vins. - Traitement préventif ou curatif des vignes. |
| - Photographie | - Films photographiques, extraction de l'argent. |
| - Autres | - Acoustique (membrane des haut-parleurs). |

I-6-7- Applications des chitooligosaccharides :

Grâce à leurs intéressantes propriétés biologiques, les chitooligosaccharides sont susceptibles d'être utilisés dans de nombreux domaines tels que la médecine et la pharmacie (effets protecteurs contre les infections bactériennes, agents antitumoraux, diminution du cholestérol, accélération de l'absorption du calcium), l'agriculture (enrobage des semences (Izume et Kinooka 1998), l'industrie alimentaire (agents antimicrobiens, conservateurs), les cosmétiques (Jeon, Shahidi et Kim, 2000)... Grâce

à leurs propriétés antimicrobiennes, les chitooligosaccharides peuvent trouver des applications dans le domaine de la conservation de produits alimentaires. Par exemple, l'ajout de 4g/L de chitooligosaccharides permet de conserver le jus de pomme à 37°C pendant 70 jours au lieu de 9 jours grâce à leur pouvoir bactériostatique (Xia *et al.*, 1998).

Les propriétés antimicrobiennes des chitooligosaccharides peuvent également être exploitées par l'industrie textile. Ainsi, deux chitooligosaccharides possédant un degré d'acétylation de 0% et des degrés de polymérisation respectifs de 3 et 10 ont été incorporés dans des tissus en coton (Seong, Ko et Song, 1998). Après cinquante lavages, les tissus contenant 2.4% de chitooligosaccharides sont capables de maintenir une réduction des bactéries de 95% pour le DP 3 et de 100% pour le DP 10. De plus, ces tissus résistent plus longtemps à l'usure entraînée par les lavages.

Les chitooligosaccharides peuvent aussi intéresser les domaines pharmaceutique et biomédical. Des chitooligosaccharides de degrés de polymérisation variant de 1 à 30 sont par exemple additionnés à des gels ou des crèmes pour améliorer la vectorisation des médicaments (Zhou, Liu et Yao, 2005). L'utilisation de chitooligosaccharides dans des chewing-gums (Ai *et al.*, 2007) ou des dentifrices permettrait de limiter les caries grâce à leurs propriétés antimicrobiennes.

II - Connaissances actuelles sur les cancers :

Les cancers correspondent à la prolifération non contrôlée de cellules dites malignes, en raison de certains caractères anormaux. La prolifération peut rester localisée (tumeur) ou se propager dans d'autres sites, soit par voie lymphatique (envahissement ganglionnaire), soit par voie sanguine (métastases) (Joyeux, 2004).

Les cancers, dont on connaît plus d'une centaine de formes, sont dus à des mécanismes génétiques communs. On sait aujourd'hui qu'une tumeur se développe toujours selon un nombre d'étapes bien déterminé, histologiquement identifiables, chacune d'elles correspondant à une nouvelle mutation apparue dans un gène participant au contrôle de la croissance cellulaire. L'observation que les cancers résultent de l'accumulation de mutations au sein d'un même clone cellulaire est à la base de la notion d'expansion clonale des cellules tumorales (Callen, 2005).

II -1- Biologie du cancer :

Grâce au développement de nouvelles technologies, notamment moléculaires, et à l'évolution des concepts et des modèles, la biologie tient aujourd'hui une place essentielle dans la recherche sur le cancer.

Les connaissances produites par la recherche fondamentale en biologie contribuent aujourd'hui, aux avancées diagnostiques, thérapeutiques et pronostiques de la prise en charge du cancer.

Qu'il s'agisse de signatures moléculaires, permettant le typage des cancers, de biomarqueurs cellulaires ou extracellulaires permettant le diagnostic et le suivi, ou de molécules thérapeutiques ciblées, les transferts entre la biologie et la clinique sont actuellement en plein essor.

II -1-1- Principales caractéristiques phénotypiques des cellules cancéreuses : (figure 11)

II -1-1-1- La cellule cancéreuse : vision globale

La cellule cancéreuse possède les caractéristiques phénotypiques suivantes :

1. perte de l'inhibition de contact ;
2. perte de la dépendance vis à vis de l'ancrage ;
3. indépendance par rapport aux facteurs de croissance ;

4. immortalité ;

5. tumorigénicité.

II -1-1-2- Caractères généraux de la cellule cancéreuse :

En ce qui concerne les caractères résiduels, la cellule garde un certain degré de différenciation caractéristique du tissu originel.

Les caractères morphologiques acquis sont :

- Les anomalies du noyau (volumineux, multiples et avec nucléoles visibles) ;
- Les anomalies de la taille des cellules (hétérogènes) ;
- Les anomalies cytoplasmiques (augmentation du rapport cyto-nucléaire) ;
- Les anomalies de la membrane cytoplasmique (perte de l'inhibition de contact, modification de l'adhésivité et modifications des antigènes de surface).

Les caractères dynamiques acquis sont le taux élevé, l'autonomie, l'anarchie et indéfini de mitose.

II -1-1-3- Anomalies biochimiques :

De nombreuses anomalies ont été décrites, touchant par exemple le métabolisme (prédominance de la glycolyse anaérobie malgré la présence d'oxygène), ou les protéines des systèmes membranaires (défaut de fibronectine, anomalies du cytosquelette, anomalies d'expression des antigènes de surface). Mais ces anomalies ne sont ni systématiques, ni spécifiques, et leur étude n'a pas permis de démontrer les mécanismes intimes du dérèglement cellulaire (Kaplan et Delpech, 1992).

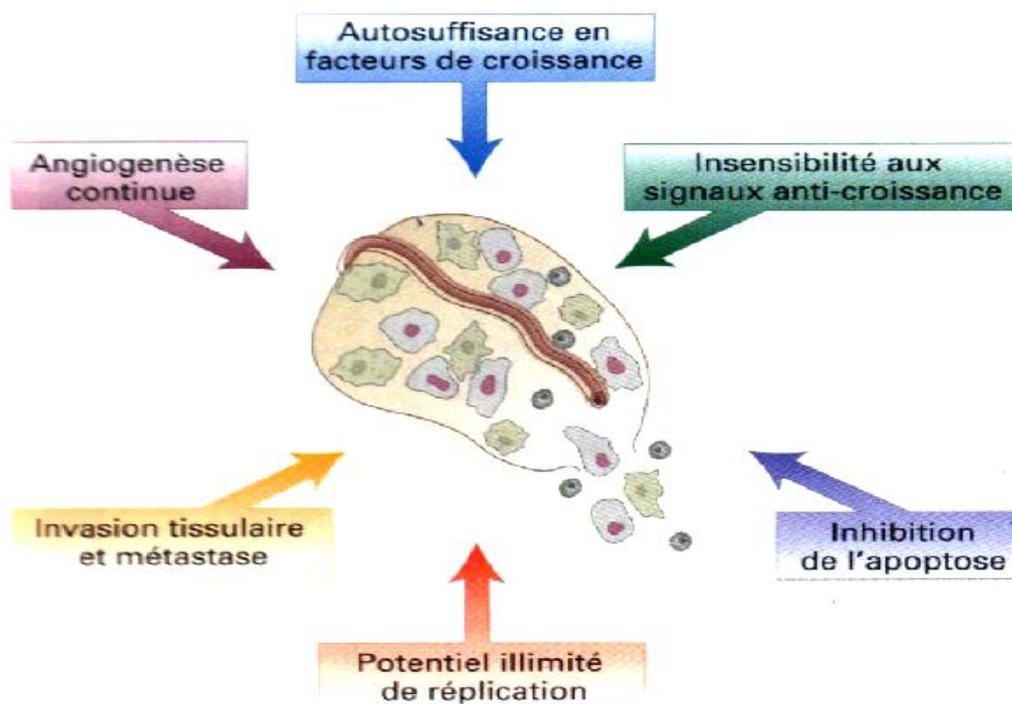


Figure 11 : Vue générale des changements cellulaires qui causent le cancer (Hanahan et

II -1-2- Mécanismes moléculaires de l'oncogénèse :

II -1-2-1- Les proto-oncogènes :

II -1-2-1-1- Définition :

Nous possédons tous (ainsi d'ailleurs que les autres mammifères et même d'autres eucaryotes), à l'état normal, des gènes qu'on appelle des proto-oncogènes (du grec «protos» : premier, précurseur ; et «onkos» : masse). Ces gènes codent des protéines qui ne sont pas encore toutes connues mais qui jouent vraisemblablement un rôle physiologique très important au niveau de la croissance cellulaire ainsi que de la différenciation. Certains rétrovirus peuvent, lorsqu'ils parasitent les cellules de leur hôte naturel (souris, poulet, etc.), capter accidentellement un proto-oncogène.

La transformation du proto-oncogène cellulaire en oncogène viral se produit selon un mécanisme que l'on ne connaît pas encore bien. Le virus pourra transmettre ultérieurement cet oncogène à un hôte animal. En règle générale un proto-oncogène cellulaire est décrit précédé de la lettre **c** tandis qu'un oncogène viral est précédé de la lettre **v**. Ainsi **c-src** est le proto-oncogène trouvé dans les cellules normales, **v-src** est

l'oncogène de virus de Rous qui peut être transmis au poulet par ce virus (Etienne, 2001).

Les oncogènes sont répartis en 6 grandes classes en fonction des onco-protéines pour lesquels ils codent (Figure 12) :

- Les facteurs de croissance : Ce sont des protéines extracellulaires.

Exemple : proto-oncogènes codant pour les protéines de la famille FGF (fibroblast growth factor).

- Les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance : Ce sont des glycoprotéines comportant généralement

Exemple : le proto-oncogène *c-erb B₁* code pour le récepteur de l'EGF (epidermal growth factor).

- Les G-protéines ou protéines membranaires liant le GTP.

Exemple : proto-oncogènes de la famille *ras*

- Les tyrosines protéine-kinases membranaires :

Les oncogènes de cette famille codent pour des protéines différentes ayant la propriété commune de phosphoryler leur cible protéique sur une **tyrosine**, au lieu d'une sérine ou d'une thréonine comme le font les protéines kinases « classique » (Kaplan et Delpech, 1992).

- Les protéine-kinases cytosoliques.

- Les protéines à activité nucléaire : contrôlent la transcription de gènes cibles en interagissant avec l'ADN.

Exemple : proto-oncogène *c-erbA* codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes, les proto-oncogènes *fos*, *jun* et *c-myc*.

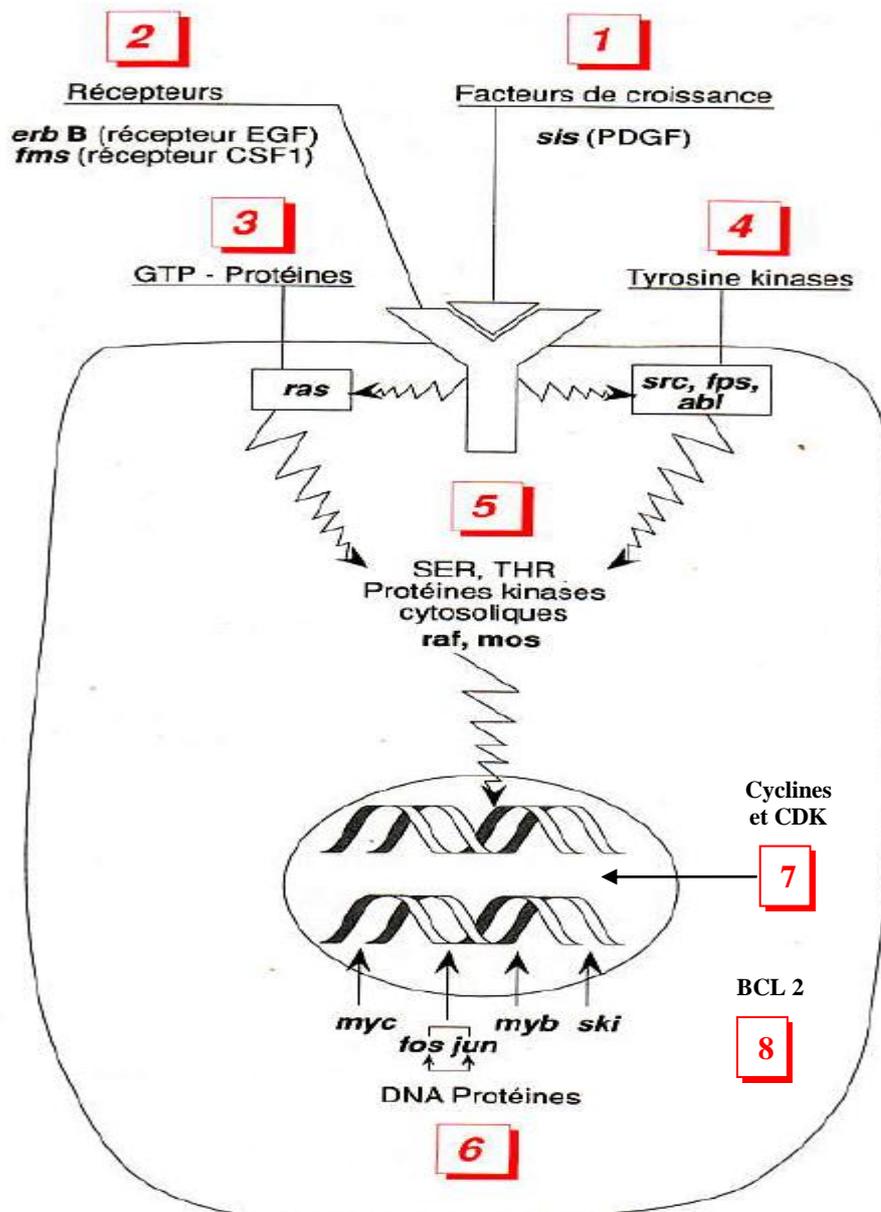


Figure 12 : Localisation cellulaire et fonction des oncoprotéines (Kaplan et Delpech , 2001).

II -1-2-1-2- Mécanismes d'activation des oncogènes :

Ils sont multiples :

- **Intégration virale** : les situations diffèrent selon les virus :

Exemple 1 : pour l'HBV, il y a un mécanisme d'intégration par chimérisme. Dans ce cas, l'insertion d'ADN viral au niveau d'un gène régulateur aboutit à un gène chimère à l'origine de la synthèse d'une protéine hybride.

Exemple 2 : pour le HTLV I, le HTLV II et le HPV, il y a insertion au hasard du virus qui possède ses propres séquences activatrices.

- Mutation ponctuelle :

Une mutation ponctuelle est un changement dans une seule paire de base dans un proto-oncogène qui produit une protéine active de manière constitutive.

- Délétion :

Les délétions, qui aboutissent le plus souvent à une perte de fonction, peuvent parfois entraîner une activation anormale si elles touchent une région régulatrice.

Exemple : l'activation du proto-oncogène c-erb B qui code pour le récepteur à l'EGF peut résulter de la délétion de la partie extra-membranaire et le domaine kinase intracytoplasmique est alors actif de façon constitutive.

- Réarrangement structural :

Des altérations chromosomiques (translocations, inversions...) peuvent avoir pour conséquence moléculaire la formation d'un gène hybride généré par la fusion de régions codantes entraînant la synthèse de protéines chimériques non fonctionnelles.

- Amplification génique :

Il n'existe en général que 2 exemplaires de proto-oncogène par cellule produisant donc une certaine quantité de ARNm et de protéines. Dans certains cas, on note une surexpression due à l'existence, dans l'ADN d'une cellule, de multiples copies d'un proto-oncogène. Ainsi, dans une lignée cellulaire (HL 60) dérivée d'une leucémie myéloïde aigue humaine, le proto-oncogène «myc» a été trouvé en de multiples copies. Quand il a été observé qu'une expression était augmentée (surexpression), il est possible de rechercher si celle-ci est due à une amplification génique ou à une seule augmentation de la transcription. Si l'on a trouvé des exemples de surexpression (due à une amplification génique ou à une augmentation de la transcription) dans des cas de cancer, on n'a toutefois pas prouvés que ces surexpressions soient effectivement responsables de ces cancers.

- Stabilisation du RNA messenger d'un oncogène :

Ce phénomène concerne essentiellement les oncogènes dont les transcrits ont une durée de vie très courte (oncoprotéines nucléaires). Il a été démontré pour MYC dans certains lymphomes de Burkitt avec amputation de la partie 5' non codante de l'ARNm.

II -1-2-2- Gènes suppresseurs de tumeur (anti-oncogène) :

Ces gènes sont des régulateurs négatifs de la croissance cellulaire. Ils agissent de façon récessive au niveau cellulaire, c'est-à-dire que la perte d'activité de ces gènes nécessite l'altération de leurs deux allèles. Deux étapes successives sont donc nécessaires :

Une 1^{ère} étape somatique (cancer sporadique) ou **germinale** et une **2^{ème} étape somatique**.

II -1-2-3- Circuits auxiliaires :

Aux voies essentielles dans le déclenchement des cancers, s'ajoutent des voies connexes qui jouent un rôle important dans la croissance, l'extension et la dissémination des tumeurs malignes. Il s'agit de :

II -1-2-3-1- Mitochondrie ; apoptose :**II -1-2-3-1-1- Les mitochondries :**

Les mitochondries sont impliquées dans les cancers à de nombreux titres. On sait depuis les travaux d'Otto Warburg (années 1930) que le métabolisme des cellules cancéreuses est perturbé, car en aérobiose elles tirent leur ATP de la glycolyse (avec hyperproduction de lactate) au lieu de faire appel à la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ce phénomène de «glycolyse anaérobie en aérobiose» a reçu une explication en 1998 avec la découverte par le groupe de Vogelstein de l'existence de mutations somatiques et homoplasmiques dans le génome mitochondrial de nombreux cancers coliques. Depuis on a identifié des anomalies somatiques dans le mtDNA de nombreux autres tissus cancéreux. Le dysfonctionnement mitochondrial qui en résulte

aggrave encore les dégâts par une production de radicaux libres d'oxygène réactif et un affaiblissement de l'**apoptose** (Kaplan et Delpuch, 2001).

II -1-2-3-1-2- L'apoptose :

La **mort programmée**, ou **apoptose**, désigne un événement de mort cellulaire fondamentalement différent de la mort par accident ou par nécrose, puisqu'il s'agit d'un phénomène contrôlé et provoqué par la cellule elle-même (suicide).

Elle se manifeste par une séquence reproductible de symptômes caractéristiques tels que le gonflement du noyau, la désorganisation de la chromatine et la dégradation de l'ADN, l'émission par la cellule de prolongements cytoplasmiques qui se détachent du corps cellulaire, etc. Chez les Animaux, les fragments de cellules contenant des micronoyaux sont enfin phagocytés par des cellules spécialisées.

Si les cellules ne meurent pas quand elle le devrait et continuent à proliférer, une tumeur se forme. C'est le cas par exemple de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Même si la plupart des cellules ne se divisent pas exagérément, elles s'accumulent lentement car elles ne meurent pas. Les cellules de LLC ont des translocations chromosomiques qui activent un gène appelé *bcl-2*, un inhibiteur puissant de l'apoptose. La surproduction inadéquate de la protéine *Bcl-2* qui en résulte empêche l'apoptose normale et permet la survie de ces cellules tumorales. La LLC est donc attribuable à un défaut dans le processus menant à la mort cellulaire. Une douzaine de proto-oncogènes impliqués normalement dans la régulation de l'apoptose sont devenus oncogènes à la suite de mutations. La surproduction des protéines correspondantes évite l'apoptose alors qu'elle serait nécessaire pour s'opposer à la prolifération des cellules cancéreuses.

II -1-2-3-2- Les gènes de réparation de l'ADN :

Ils interviennent *indirectement* dans ce processus.

En plus de la correction d'épreuves, les cellules disposent de systèmes de réparation pour éviter les mutations dues aux fautes de copie et à l'exposition aux mutagènes.

Les systèmes de réparation sont répartis en 2 catégories en fonction de l'origine de la mutation.

II -1-2-3-2-1- Système de réparation des mésappariements (mismatch repair) :

Intervient lorsque les mutations de l'ADN résultent d'erreurs de la réplication (dérapage de l'ADN polymérase ou DNA polymerase slippage)

Il comprend les gènes hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6

Implication clinique : l'altération constitutionnelle de ces gènes est à l'origine du cancer colorectal familial non associé à une polypose colique, ou syndrome HNPCC (Hereditary non Polyposis Colorectal Cancer), ou syndrome de Lynch qui représente une des premières cause de cancer colorectal héréditaire touchant exclusivement l'adulte.

II -1-2-3-2-2- Système de réparation NER (Nucleotide Excision Repair) :

Il s'agit d'un système de réparation de mutations induites par des carcinogènes environnementaux (UV, carcinogènes chimiques).

Implication clinique : l'altération constitutionnelle des gènes du système excision-resynthèse prédispose à des maladies caractérisées par une hypersensibilité aux rayonnements UV tel le Xeroderma Pigmentosum. Cette pathologie à transmission autosomique récessive est caractérisée par une prévalence élevée de tumeurs cutanées dès l'âge de 4 ans.

II -1-2-3-3- Télomérase :

Les télomères, les extrémités physiques des chromosomes linéaires, consistent chez les vertébrés en une répétition d'une courte séquence d'ADN, TTAGGG. Les télomères fournissent la solution au problème de réplication aux extrémités, les ADN polymérases étant incapables de répliquer complètement le bout d'une molécule d'ADN double brin. La télomérase, une transcriptase inverse qui contient une matrice ARN, ajoute des unités répétitives de TTAGGG aux extrémités des chromosomes pour allonger ou maintenir ces régions, qui dans les chromosomes humains, atteignent 5 à 20 kb. Les cellules germinales et les cellules somatiques qui se divisent rapidement (e.g. cellules souches) produisent de la télomérase, mais la plus part des cellules somatiques en sont dépourvues. En conséquence, leur perte complète abouti à la fusion des extrémités des chromosomes et à la mort cellulaire. Un raccourcissement prononcé des télomères est considéré par la cellule comme une sorte de lésion de

l'ADN ; il s'ensuit alors une stabilisation et une activation de **p53**, qui déclenche l'apoptose. La plupart des cellules tumorales, malgré leur prolifération rapide, échappent à ce destin en exprimant la télomérase. De nombreux chercheurs pensent que l'expression de la télomérase est essentielle pour qu'une cellule tumorale devienne immortelle, et des inhibiteurs spécifiques de cette enzyme ont été proposés pour traiter le cancer.

II -2- Traitement :

Le traitement nécessite :

- d'avoir un diagnostic de certitude et de connaître le type de cancer,
- d'évaluer son extension locale, régionale et la présence ou non de métastases,
- d'évaluer l'état général du patient (âge, fonctions cardiaque et rénale, présence d'autres maladies).

Suivant les cas, il repose sur :

- **L'exérèse (l'ablation) chirurgicale** de la tumeur quand cela est possible ;

- La chimiothérapie :

- Deux types d'effet sur les cellules tumorales :

- Cytostatique : inhibition des divisions cellulaires.
- Cytotoxique : induction de la mort des cellules tumorale par nécrose cellulaire et/ou apoptose.

- Leur principale cible d'action est directement ou indirectement l'ADN génomique.

- L'Hormonothérapie :

Surtout utilisée dans le traitement des cancers du sein et de la prostate : la prolifération des cellules tumorales peut être stimulée par des hormones stéroïdes grâce à la présence de récepteurs spécifiques.

- La radiothérapie.

III - Matériels et méthodes :

III -1- Matériels:

Carapace :

Pour notre étude, nous avons opté pour la valorisation de la carapace de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846). Cette espèce est présente en abondance à différentes profondeurs de 150 à 900 m, le long du littoral algérien (Nouar et Maurin, 2001). *Parapenaeus longirostris* (**Lucas, 1846**) possède plusieurs avantages pour notre étude : Tout d'abord, ce crustacé est très répandu sur les côtes algériennes et de ce fait très consommé. En 2003, mille trois (1003) tonnes de crevettes *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) ont été pêchées dans notre pays. Ensuite, sa pigmentation permet d'obtenir aisément des produits incolores.

Parapenaeus longirostris (Lucas, 1846) est classé comme suit :

Règne : métazoaires

Sous-règne : eumétazoaires

Embranchement : arthropoda

Sous-embranchement : mandibulata

Classe : crustacea

Sous-classe : malacostraca

Super-ordre : eucarida

Ordre : decapoda

Sous-ordre : natantia

Famille : penaidae

Genre : Parapenaeus

Espèce : longirostris

(Jessop, 1973; Tyrra, 1999).

La lignée cellulaire tumorale Hep-2 :

Désignation : Hep-2.

Organisme: Homosapiens (l'homme).

Tissu: larynx.

Morphologie: épithéliales.

Type de cellules: Carcinome.

Croissance: Monocouche.

La lignée cellulaire tumorale RD :

Désignation : RD.

Organisme: Homosapiens (l'homme).

Tissu: Cellules musculaires striées (rhabdomyosarcome).

Morphologie: Fusiforme.

Type de cellules: Sarcome.

Croissance: Monocouche.

La chitine irradiée (Dziril Maya, 2010).**III-2- Méthodes :****III-2-1- Extraction et préparation des différentes substances :**

La préparation de la chitine, du chitosane et leurs oligomères a été réalisée comme suit :

1- Les carapaces de crevettes sont d'abord débarrassées de leurs pattes et antennes, lavées puis bouillies dans de l'eau pendant une heure. Elles sont ensuite séchées à 163°C à l'étuve, les tissus secs sont éliminés plus aisément.

2- Comme l'étape « quenching » est employée par certains auteurs, nous avons effectué des essais avec « quenching » et d'autres sans « quenching » pour comparer et estimer la valeur de ce prétraitement. Lors de cette étape, la carapace est chauffée, dans l'étuve, à 80°C pendant 48h, puis, refroidie immédiatement dans l'acétone glacé (Mukherjee, 2001).

3- La carapace est enfin broyée, à l'aide d'un moulin à café, en fine poudre.

4- Pour la déminéralisation et la déprotéinisation , nous avons optimisé les paramètres suivants :

- ✓ Les concentrations en HCl pour la déminéralisation et en NaOH pour la déprotéinisation,
- ✓ Le rapport poids de carapace/volume de solution (p/v).
- ✓ Le temps de réaction (t).
- ✓ La température de la réaction (T°) a été optimisée pour la réaction de déprotéinisation.

Nous avons fixé trois paramètres et avons varié le quatrième.

La déminéralisation peut être observée grâce à l'effervescence produite.

La réaction de déminéralisation est appréciée, par détermination du taux de cendres (plus le taux de cendre est faible et plus efficace aura été la réaction de déminéralisation).

L'appréciation de la déprotéinisation, se fait par dosage des protéines dans le surnageant (plus le taux de protéines dans le surnageant est élevé et plus efficace aura été la réaction de déprotéinisation).

5-La dépigmentation est réalisée en imbibant la poudre de carapace déprotéinée et déminéralisée avec de l'acétone et en la laissant sécher à l'air libre pendant 2 heures. Puis, nous plongeons cette poudre dans une solution d'eau de Javel (blanchiment) à 0,315% (1 :10 p/v) sous agitation pendant une heure (No *et al.*, 1989). Nous obtenons ainsi de la chitine.

6-Pour le chitosane, nous avons utilisé deux protocoles, présentés dans le tableau n°8.

Tableau 8 : Protocoles utilisés pour la préparation du chitosane
(Kolodziejska *et al.*, 2000; Mirzadeh *et al.*, 2002).

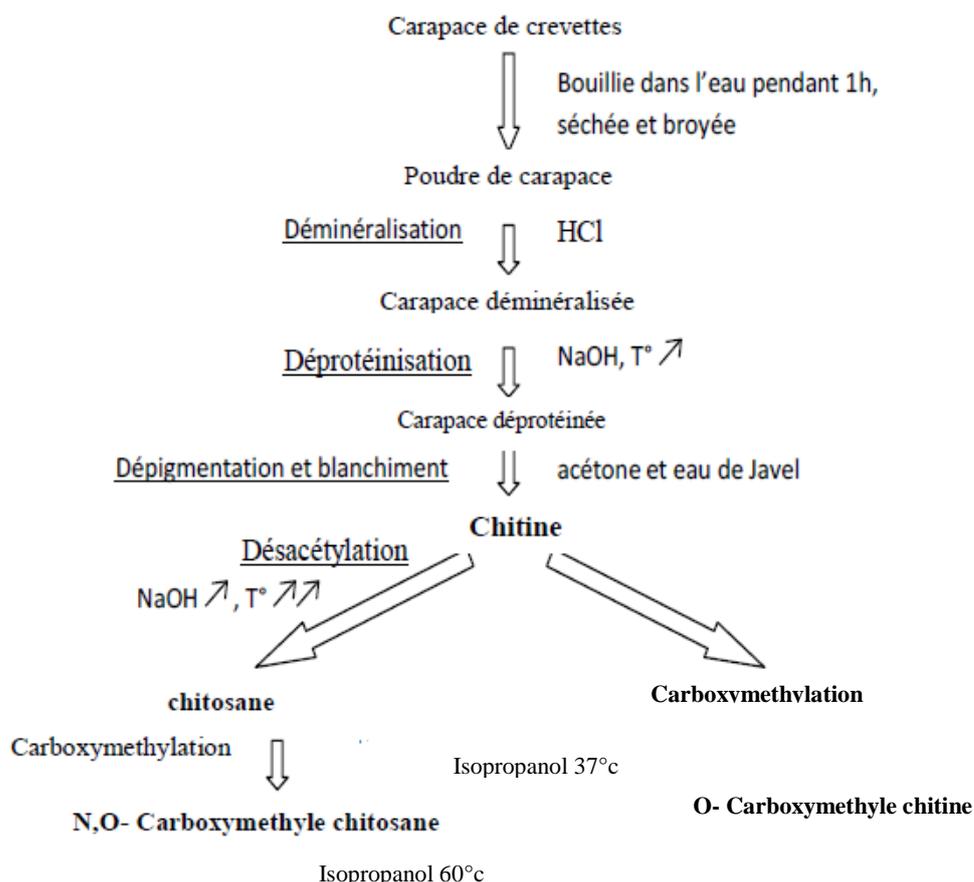
| | [NaOH] (%) | T° ($^{\circ}\text{C}$) | p/v (g/ml) | t (h) |
|-----------|------------|------------------------------------|------------|-------|
| Protocole | 50 | 140 | 1/10 | 1 |

7-L'hydrolyse de la chitine et du chitosane se fait selon les conditions présentées sur le tableau 9:

Tableau 9 : Protocoles utilisés pour la préparation des oligomères de la chitine et du chitosane (Chang *et al.*, 2000).

| Protocole | [HCl] (N) | T° (°C) | p/v (g/ml) | t (h) |
|--------------------------|-----------|---------|------------|-------|
| Oligomères de la chitine | 7 | 70 | 2/100 | 3 |
| Oligomères du chitosane | 6,27 | 56 | | |

Nous terminons la réaction en refroidissant immédiatement la solution dans un bain glacé. La solution est ensuite séchée sous vide à -46°C . Les particules solides ainsi obtenues sont redissoutes dans 100ml d'eau distillée et séchées à nouveau dans les mêmes conditions. Cette dernière opération est répétée une troisième fois pour enlever le maximum d'HCl résiduel. La solution finale est neutralisée avec du NaOH 1N et filtrée ($0,22\mu\text{m}$) pour enlever les impuretés. Le filtrat est concentré par évaporation sous vide jusqu'à une concentration finale de 20%. Du méthanol (9 volumes) est additionné à la solution pour précipiter les oligosaccharides avec un degré de polymérisation $\text{DP} \geq 8$. Le méthanol est ensuite évaporé (Chang *et al.*, 2000).



III-2-2- Détermination des propriétés physico-chimiques :

III-2-2-1- Détermination du taux de cendres dans la carapace:

Le taux de cendres correspond au pourcentage de la matière minérale présente dans la carapace. Il nous a permis, dans notre travail, de déduire le taux ou le pourcentage de déminéralisation de la carapace mesuré à la fin de la fermentation. Le principe repose sur l'incinération de 1g de poudre de carapace à 900°C pendant 2,5h dans un four à moufle (AFNOR, 1988).

Le taux de minéralisation (TM) (%) se calculera par :

$$TM = \left[\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right] \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

m_2 : masse du creuset chargé de la prise d'essai après incinération (g).

m_0 : masse du creuset vide (g).

m_1 : masse du creuset chargé de la prise d'essai avant incinération (g).

TM : taux de minéralisation (avant la fermentation).

Ainsi, il en déduira le pourcentage de déminéralisation noté DM:

$$DM = \left[\frac{TM_0 \times m_i - TM_f \times m_f}{TM_0 \times m_i} \right]$$

TM₀ : taux de minéralisation avant fermentation.

TM_f : taux de minéralisation à la fin de la fermentation.

m_i : masse d'échantillon initial (avant fermentation) (g).

m_f : masse d'échantillon final (à la fin de la fermentation) (g).

III-2-2-2- Mesure de la teneur en protéines lors de l'optimisation de la déprotéinisation:

A la fin de la réaction de déprotéinisation, le surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue et transvasé dans une fiole jaugée de 50 ml, le pH est ramené à la neutralité par une solution d'acide chlorhydrique 1N dont le volume rajouté est soigneusement noté. Nous effectuons par la suite le dosage colorimétrique de Biuret.

➤ Principe :

Le principe de cette méthode est le suivant :

En milieu alcalin, les composés contenant au moins deux groupements -CO-NH- ou -CO-NH₂ voisins forment avec les ions cuivriques (Cu⁺⁺) un complexe bleu-violet. Cette coloration se développe en particulier avec le biuret (NH₂-CO-NH-CO-NH₂) d'où son nom.

L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques. Il en résulte que pour une protéine pure, l'intensité est proportionnelle à la concentration de celle-ci. Toutefois cette concentration ne doit pas excéder 10mg/l.

➤ **Mode opératoire :**

La gamme d'étalonnage se fait comme suit : A partir d'une solution de peptone étalon mère à 5g/l, nous préparons la gamme suivante :

Dans cinq tubes à essai, nous introduisons des volumes de la solution étalon contenant : 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 mg de protéines.

Nous complétons chaque tube à 2 ml avec de l'eau physiologique, puis nous ajoutons 8 ml de réactif de Biuret préparé comme suit :

Sulfate de cuivre (CuSO₄)..... 1,5g

Ethyldiméthyltétracétique (EDTA)..... 6g

KI..... 1g

NaCl..... 0,9g

Dans 300ml d'eau distillée.

Nous ajoutons en une fois 300 ml de NaOH à 2,5M, puis complétons à 1000 ml.

Nous plaçons les tubes 30 min à l'obscurité pour développer la coloration.

Nous mesurons l'absorbance à 545 nm contre un blanc, dans lequel la solution protéique est remplacée par de l'eau physiologique.

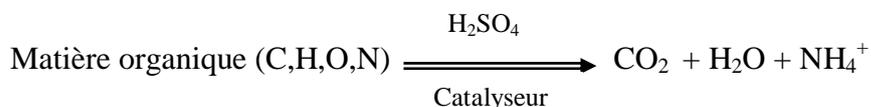
Pour le dosage des protéines, nous procédons comme pour la gamme sur 0,5ml de la solution à doser (surnageant), éventuellement diluée pour se situer dans la gamme.

III-2-2-3- Dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl :

La plus grande partie de l'azote des substances biologiques est contenue dans les protéines. La proportion d'azote est remarquablement constante pour un type de protéine donné (de l'ordre de 16% en masse).

Le mode opératoire :

- ✓ **Minéralisation** : a lieu à chaud en milieu sulfurique concentré en présence de catalyseur.



- ✓ **Déplacement de l'ammonium** :



- ✓ **Séparation de l'ammoniac** : se fait par :

- distillation simple.
- entraînement à la vapeur.

- ✓ **Dosage de l'ammoniac** : peut être :

- Direct : l'ammoniac est dosé directement par un acide étalonné au fur et à mesure qu'il distille.

- En retour : l'ammoniac est recueilli dans un excès connu d'acide, nous dosons le reste par une base étalonnée.

a. Minéralisation : dans ce travail, la minéralisation a été réalisée de la manière suivante:

a.1. L'essai : nous introduisons dans un tube matras :

- 2g de carapaces broyées ;
- 10 ml d'acide sulfurique concentré à 98% ;
- une pointe de spatule de catalyseur de minéralisation ;

a.2. Le blanc : 10 ml d'acide sulfurique additionnés de catalyseur.

La minéralisation est accomplie à 100°C pendant 30 minutes ensuite à 300°C pendant 2 heures.

Après minéralisation, le minéralisât est transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 200 ml puis complétée à 200 ml avec de l'eau distillée.

b. Distillation de l'ammoniac du minéralisât : nous introduisons, successivement, dans un ballon de distillation :

- 20 ml de minéralisât dilué ;
- 100 ml d'eau distillée ;
- quelques gouttes de phénophtaléine ;
- 10 ml de lessive de soude ;

Nous adaptons le ballon immédiatement au réfrigérant et chauffons.

Nous recueillons le distillat dans 20 ml d'acide sulfurique de concentration connue voisine de 0,01 M.

Nous distillons durant 30 minutes.

c. Dosage de l'ammoniac distillé : nous dosons l'excès d'acide sulfurique contenu dans le distillat à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire égale à 0,015 M.

Calculs : Au point d'équivalence le nombre de moles d'ions H^+ captés par les bases (NaOH, NH_3) est égal au nombre de moles d'ions H^+ cédés par l'acide (H_2SO_4), on écrit :

$$C(NH_3) \text{ (en moles/l)} = \frac{[2 \times C(H_2SO_4) \times V(H_2SO_4)] - [C(NaOH) \times V(NaOH)]}{V(NH_3) \text{ (minéralisât)}}$$

Dans 200ml (donc dans 2g de carapaces), nous avons :

$$N = [C(NH_3) \times M(N) \times 0,1] \text{ g / g de carapaces}$$

Et dans 100g de carapaces, nous avons :

$$N = [C(NH_3) \times M(N) \times 10] \text{ g / 100 g de carapaces}$$

Avec :

C (NH₃): concentration molaire d'ammoniac (mole/l).

C (H₂SO₄): concentration molaire de l'acide sulfurique (mole/l).

V (H₂SO₄) : volume de l'acide sulfurique (l).

C (NaOH) : concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium (mole/l).

V (NaOH) : volume de la solution d'hydroxyde de sodium, nécessaire à la neutralisation de l'excès d'acide sulfurique (l).

N : teneur en gramme d'azote par gramme de carapaces.

M (N) : masse molaire de l'azote, égale à 14 g/mole.

L'azote protéique est déterminé comme suit :

$$\mathbf{N(\text{protéines}) = N - N(\text{chitine})}$$

La teneur des protéines en grammes dans 100g de carapaces est déterminée comme suit :

$$\mathbf{\text{Teneur en protéines en g dans 100g de carapaces} = (N (\text{protéines}) / 0,16)}$$

Le facteur 0,16 représente la fraction moyenne d'azote dans les protéines.

III-2-2-4- Mesure du degré de désacétylation par analyse au FTIR :

Les échantillons destinés à l'analyse infrarouge ont été conditionnés sous forme de pastilles à la concentration de 1% (1 mg d'échantillon dans 100 mg de KBr).

Les spectres infrarouges des échantillons ont été enregistrés sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier, de type NICOLETS 380, en mode transmission dans la gamme spectrale de 4000 cm⁻¹ à 400 cm⁻¹. Pour chaque spectre, il a été effectué 64 balayages avec une résolution de 4 cm⁻¹. Les spectres ont été traités par le logiciel OMNIC.

Les différents degrés d'acétylation des polysaccharides ont été calculés selon la formule suivante : **D.A. = (A₁₆₅₅ / A₃₄₅₀) x 100 / 1,33**

Avec A₁₆₅₅ et A₃₄₅₀ sont les absorbances à 1655 cm⁻¹ de la bande amide-I donnant la mesure des groupements N-acétyle et à 3450 cm⁻¹ de la bande hydroxyle indiquant le standard interne

pour la correction. Le facteur 1,33 est la valeur de A_{1655} / A_{3450} lorsque tous les groupements du polymère sont N-acétylés.

Le degré de désacétylation est déduit de l'équation suivante :

$$D.D.=100-D.A. \text{ (Khan et al., 2002).}$$

III-2-2-5- Mesure du poids moléculaire :

Pour déterminer, le poids moléculaire de la chitine et des deux chitosanes, nous avons utilisé la méthode viscosimétrique. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un viscosimètre de type **Ubbelohde** (Technico, ASTM D. 445) de constante $k= 0,01\text{cS/s}$.

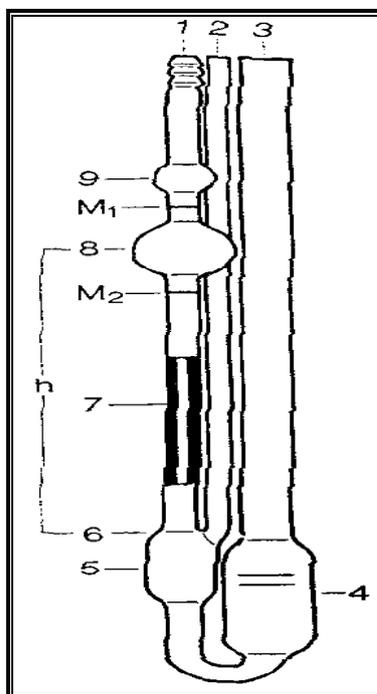


Figure 14 : Viscosimètre de type Ubbelohde

➤ Description :

Le viscosimètre est constitué de trois parties tubulaires principales **1**, **2** et **3** (Figure n°17). Le tube capillaire **7** avec la sphère de mesure **8**, la sphère des avant-coulants **9** et le vase à niveau **5**. Au-dessus et au-dessous de la sphère de mesure **8**, les

marques annulaires M_1 et M_2 sont imprimées sur le tube **1**. Ces marques définissent le débit de l'échantillon. Le tube capillaire **7** se termine dans la partie supérieure, réalisée comme une calotte sphérique **6**, du vase à niveau **5**. Par la surface intérieure de cette calotte sphérique **6**, l'échantillon s'écoule du tube capillaire **7** sous forme d'un film mince.

➤ **Mode de remplissage :**

Pour remplir le viscosimètre, nous inclinons celui-ci d'environ 30° sur la verticale, le réservoir **4** se trouvant en dessous du capillaire **7**; nous introduisons ensuite suffisamment de liquide dans le tube **3** pour amener le niveau jusqu'au trait inférieur lorsque le viscosimètre est redressé. Le volume du liquide étudié sera toujours le même. Pour faire monter le liquide dans le viscosimètre, nous plaçons un doigt sur le tube **2** et aspirons par le tube **1** jusqu'à ce que le liquide atteigne le centre du réservoir **9**, puis retirons le doigt du tube.

Nous mesurons le temps d'écoulement du liquide entre les repères M_1 et M_2 , à l'aide d'un chronomètre.

Le viscosimètre sera lavé à l'eau, puis séché à l'acétone entre chaque mesure.

➤ **Calcul de la viscosité et du poids moléculaire :**

Nous pouvons obtenir la viscosité réduite, η_r , et la viscosité inhérente, η_i , à partir des relations suivantes :

$$\eta_r = \eta_{sp} / [C] \quad \text{avec : } \eta_{sp} = (\eta / \eta_s) - 1$$

$$\eta_i = 1/[C] \times \ln (\eta / \eta_s)$$

η : représente la viscosité absolue de la solution de polymère (chitine ou chitosane) à la concentration $[C]$.

η_s : la viscosité absolue du solvant.

Pour un même viscosimètre, la viscosité cinématique (viscosité absolue) s'exprime par la relation :

$$\eta = k.t$$

k : constante de l'appareil (**k= 0,01cS/s**).

t : temps d'écoulement en secondes.

Le poids moléculaire moyen des polymères préparés dans le cadre de ce travail, a été déterminé à partir de l'équation de **Mark-Houwink** :

$$[\eta]=k M^{\alpha}$$

avec :

[\eta] : la viscosité intrinsèque.

k et **α** : des constantes.

Pour la chitine: **k =0,24 cm³/g** et **$\alpha= 0,69$** .

Pour le chitosane : **k =0,078 cm³/g** et **$\alpha= 0,76$** .

Pour la mesure de la viscosité, le chitosane est dissout dans un mélange d'acide acétique à 0,2 M et d'acétate de sodium à 0,3 M, alors que la chitine est dissoute dans un mélange de LiCl et de diméthylacétamide à 5% (Mirzadeh *et al.*, 2002).

➤ **Mode opératoire :**

Nous préparons cinq solutions de concentrations croissantes de chaque polymère dans son solvant approprié (0,0223 ; 0,042 ; 0,065 ; 0,081 ; 0,1 (g/100ml)) et évidemment une solution à 0g de polymère (η_s). Nous chronométrons le passage de chaque solution. Les mesures ont été réalisées en introduisant le viscosimètre dans un bain thermostaté réglé à 25°C.

Nous calculons les η ($\eta = k.t$) et η_s et déduisons les η_{sp} ($\eta_{sp} = (\eta / \eta_s) - 1$) afin de pouvoir retrouver η_r ($\eta_r = \eta_{sp} / [C]$) et η_i ($\eta_i = 1/[C]. \ln (\eta / \eta_s)$) pour tracer les droites **$\eta_r = f([C])$** et **$\eta_i = f([C])$** .

Nous déterminons les ordonnées à l'origine des deux droites tracées. La moyenne des deux valeurs est la viscosité intrinsèque.

Il suffit par la suite d'appliquer l'équation Mark-Houwink ($[\eta]=k M^a$) pour retrouver le poids moléculaire (M) de chaque polymère (Zhang et Neau, 2001).

III- 2-2-6- Mesure de la densité réelle:

La densité réelle était mesurée en plaçant 15g d'échantillon dans un pycnomètre de 50ml et utilisant l'équation suivante :

$$dr = \frac{B-A}{(B+D) - (A+C)}$$

Avec :

A : Poids du pycnomètre vide (g)

B : Poids du pycnomètre contenant 15g d'échantillon bien séché (g)

C : Poids du pycnomètre contenant 15g d'échantillon rempli d'eau (g)

D : Poids du pycnomètre rempli avec 50ml d'eau (g)

III-2-3- Préparation de l'O-Carboxyméthyl chitine :

Mélanger jusqu'à dissolution 0,1 g de chitine avec 0,4 ml de NaOH (60%) et 1 ml de SDS (2%) et laisser à -20°C pendant toute la nuit après avoir fait baisser la température graduellement. Ajouter 2 ml d'isopropanol à 25 °C et de l'acide monochloroacétique sous agitation jusqu'à neutralité. Le sel de O C M Chitine est filtré et lavé avec du l'éthanol (Muzzarelli, 1988).

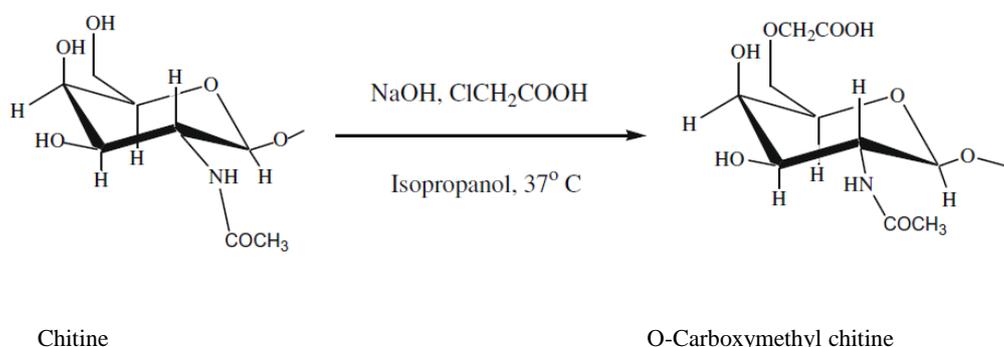


Figure 15 : Synthèse de l'O-Carboxyméthyl

III-2-4- Préparation du N,O-carboxyméthyl chitosane :

- On mélange 20g de chitosane avec 200 ml d'isopropanol.

- 50,4 ml de NaOH (10 M) sont rajouté en 6 portions égales sur 20 min.
- On laisse agir pendant 45 min.
- On ajoute 24 g d'acide monochloreacétique en 5 portions égales à 5 min d'intervalle.
- On chauffe à 60°C pendant 3heures.
- On incorpore 17 ml d'eau distillée et on aguste le pH à 7 avec l'acide acétique glacial.
- On filtre sur in tamis (140 µm).
- On lave avec du méthanol (70% méthanol et 30 % eau) puis avec du méthanol anhydre.
- On sèche à 60°C (Muzzarelli, 1988).

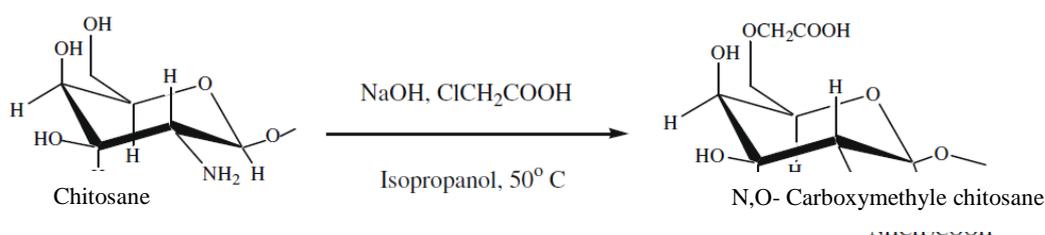


Figure 16 : Synthèse du N,O-Carboxymethyl chitosane.

III-2-5- Préparation du 2 phtalimido chitine :

- 0,1 g de chitine sint dissouts dans 10 ml d'acétone (1%).
- On ajoute 10 ml de méthanol, puis on précipite dans 10 ml de NaHCO₃ à 4% et mélanger pendant 2 heures. (Baumann et Faust, 2001).

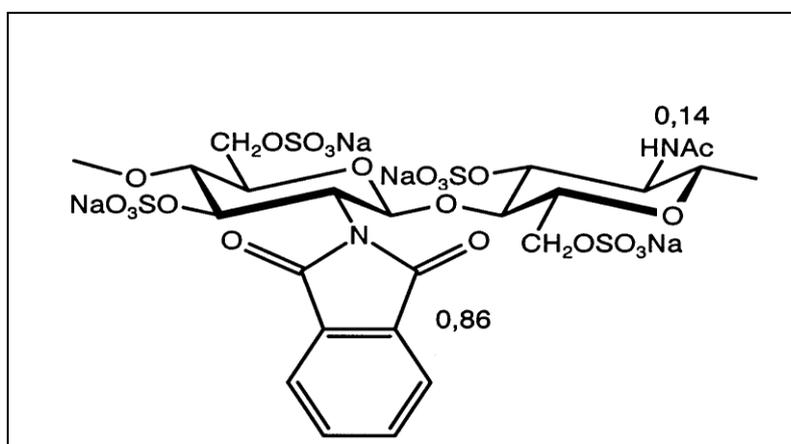


Figure 17 : N-phthalimido chitosane.

III-2-6- Etude de l'effet inhibiteur de la chitine et de ses dérivées :

III-2-6-1- Culture cellulaire :

Pour se faire, la méthode de la culture trypsinée a été utilisée pour évaluer l'effet inhibiteur de la chitine et de ses dérivées. L'entretien des cellules a été réalisé en milieu de Eagle . Ce milieu a été supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté dans des flacons en plastique, stériles, type « Falcon » (**Figure 12**). L'incubation a été réalisée à 37°C sous 5% de CO₂. A confluence, c'est-à-dire 10⁵ cellules /ml, les tapis cellulaires sont décollés sous l'action de la trypsine à 0,25%.

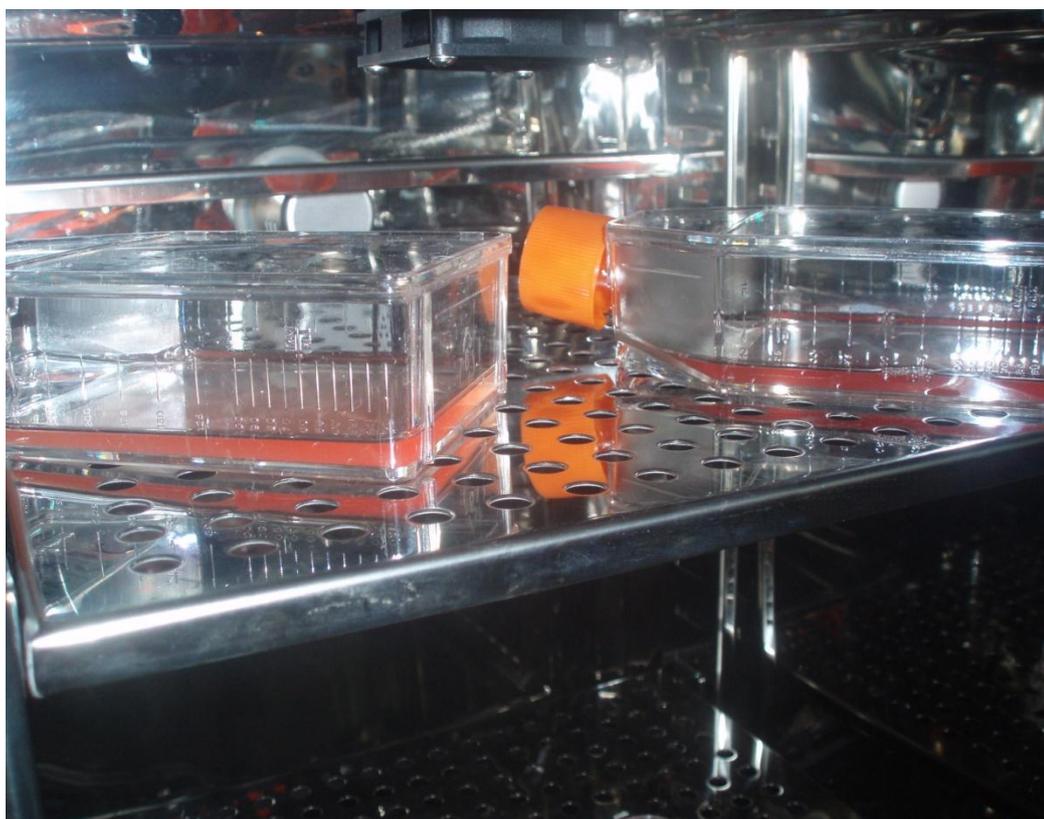


Figure 18 : Cultures des cellules Hep2 et RD dans une étuve à CO₂ à 37°C

Les cellules ainsi décollées sont mises en suspension dans du milieu de Eagle. Les suspensions cellulaires obtenues sont remises en culture dans des boîtes de 75 cm² à une concentration de 2,5 10⁶ cellules /ml. Les cellules mises en culture finissent par former une monocouche sur le fond de la boîte de culture. Cette étape correspond à la confluence totale des cellules.

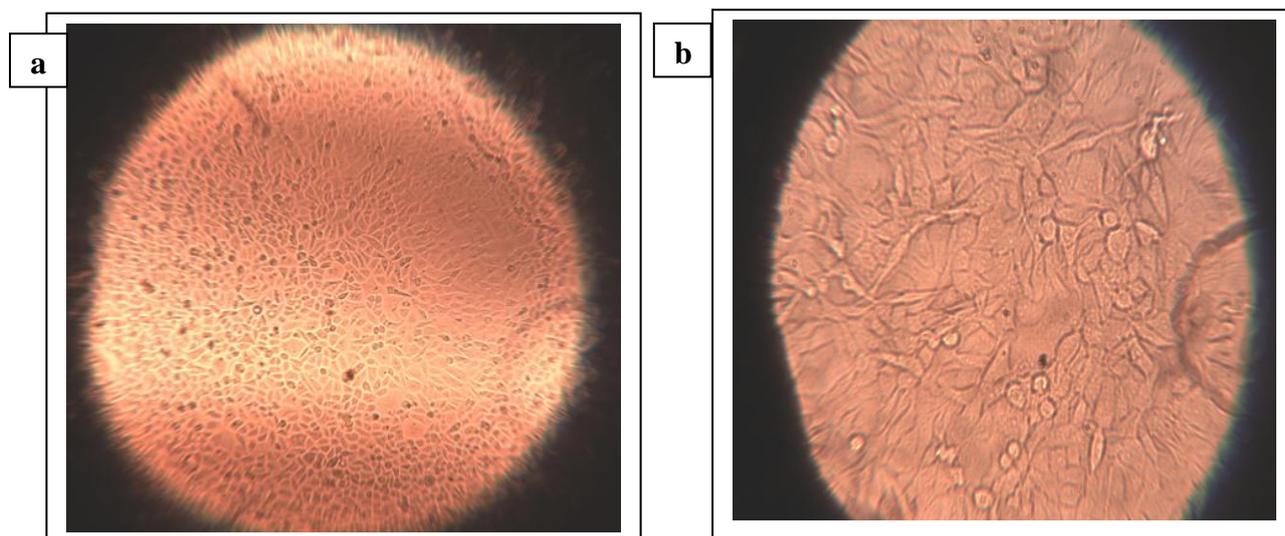


Figure 19 : Culture des lignées tumorales observées au microscope photonique à phase inversé :
a- Cellules Hep2 ; b- Cellules RD.

Le milieu de culture contenu dans la boîte est vidé et trypsiné. Le volume nécessaire de solution de trypsine est mis dans la boîte de culture. Le fond de cette boîte est recouvert par la solution de trypsine de manière à mettre les cellules en contact avec la trypsine. Cette solution de trypsine est ensuite vidée et la boîte est mise à l'étuve à 37°C pendant 5 minutes, à l'issue desquelles, la boîte est observée au microscope inversé de type **OPTIKA**.

L'observation met en évidence des cellules isolées et décollées du fond de la boîte. 10 ml de milieu de culture sont aussitôt ajoutés dans la boîte de 75 cm² pour arrêter l'action de la trypsine. Des aspirations et des refoulements sont faits dans chacune des boîtes de culture à l'aide d'une pipette pour mieux détacher les cellules les unes des autres donnant ainsi une suspension cellulaire homogène. La numération ou le comptage de cette suspension cellulaire se fait ensuite afin d'évaluer la quantité suffisante de cellules pour une mise en culture. Cette opération se réalise en ajoutant 100 µl de bleu trypan à 100 µl de suspension cellulaire dans la cellule hématimétrique de NEUBAUER.

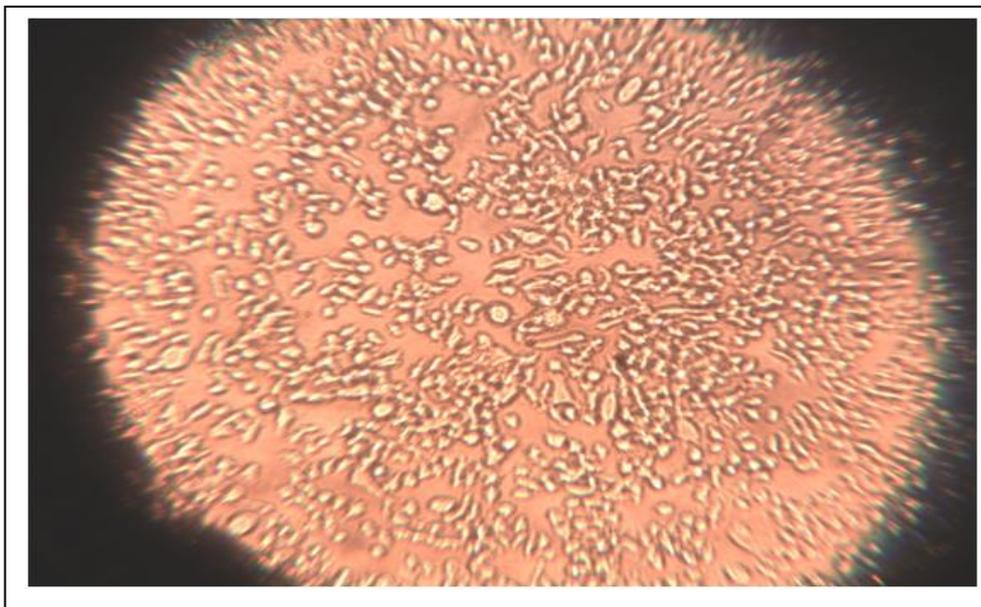


Figure 20 : Mise en évidence de la forme isolées et décollées du fond de la boîte des cellules PD

III-2-6-2- Test de cytotoxicité :

Pour étudier l'effet inhibiteur de la chitine, du chitosane et de ses dérivés, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 24 puits. Après 24 h de croissance, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations des molécules à tester. Les cellules ont été incubé à 37 °c pendant 24h et le teste de viabilité a été effectué en utilisant la technique de coloration au bleu de Trypan au second jour de la culture.

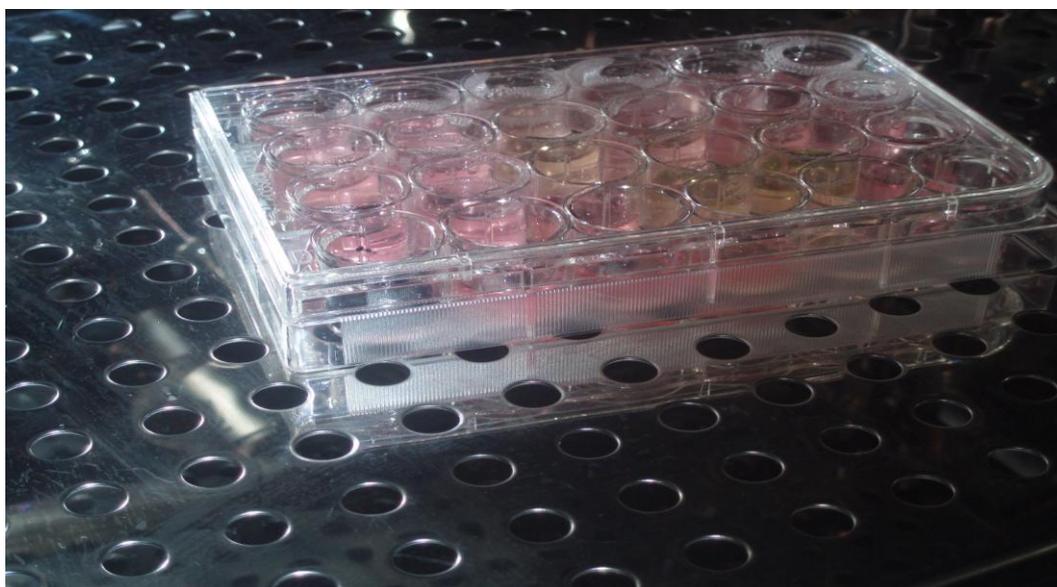


Figure 21 : Test de cytotoxicité dans une boîte à 24 puits.

III-2-6-3- Test d'exclusion au bleu de Trypan :

Environ 300 μ l de suspension cellulaire a été échantillonnée et mélangé avec un volume égal de 300 μ l bleu Trypan.

Le nombre total de cellules vivantes a ensuite été compté en utilisant un hémocytomètre en microscopie optique.

L'activité cytotoxique a été calculée par la relation suivante établie par **cuedta et al., (2003)** :

$$\text{Activité cytotoxique (\%)} = 100 \times \frac{(\% \text{ échantillon} - \% \text{ témoin})}{(100 - \% \text{ témoin})}$$

$$\text{Viabilité (\%)} = 100 - \text{activité cytotoxique.}$$

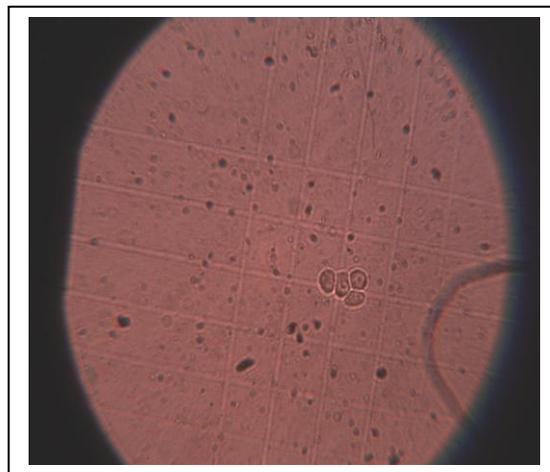
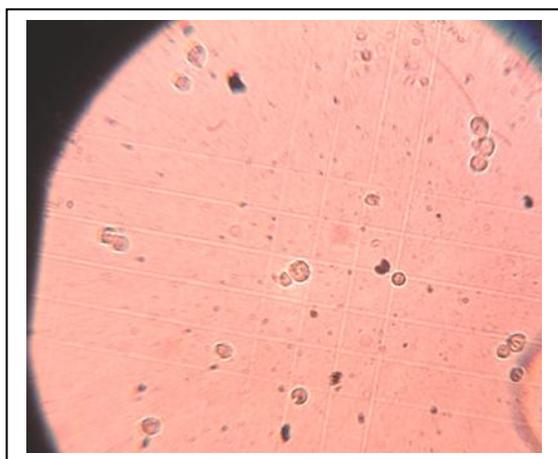


Figure 22 : Comptage des lignées cellulaires dans la cellule de Mallassez.

IV-1- Préparation des différents produits :

IV-1-1- Optimisation de la déminéralisation :

IV-1-1-1- Optimisation de la concentration en acide chlorhydrique:

Pour cette optimisation, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en acide chlorhydrique est de 20 ml, la température est ambiante (25°C) et la durée de la réaction est de 24 heures. Les essais sont effectués en triplicata. Les résultats sont représentés dans la figure 23:

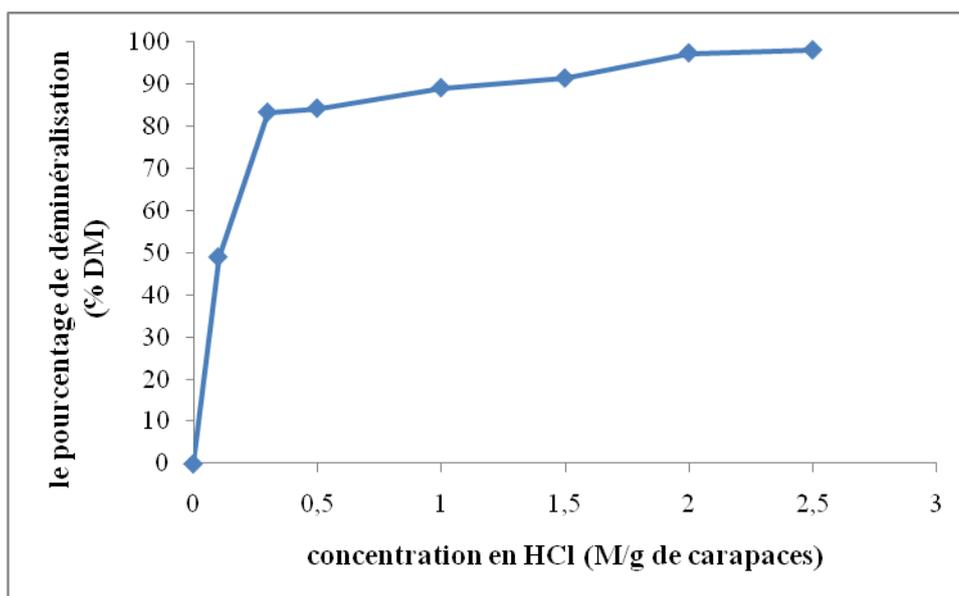


Figure 23 : Optimisation de la concentration en acide chlorhydrique

Nous remarquons que la réaction de déminéralisation s'effectue à de faibles concentrations en acide chlorhydrique et atteint son maximum à 2 M.

IV -1-1-2- Optimisation de la durée de la déminéralisation :

Pour cette opération, les paramètres suivants sont restés invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en acide chlorhydrique est de 15 ml, la température est ambiante (25°C) et la concentration en acide chlorhydrique est de 1,5M. Les essais sont effectués en triplicata. Les résultats sont représentés dans la figure 24:

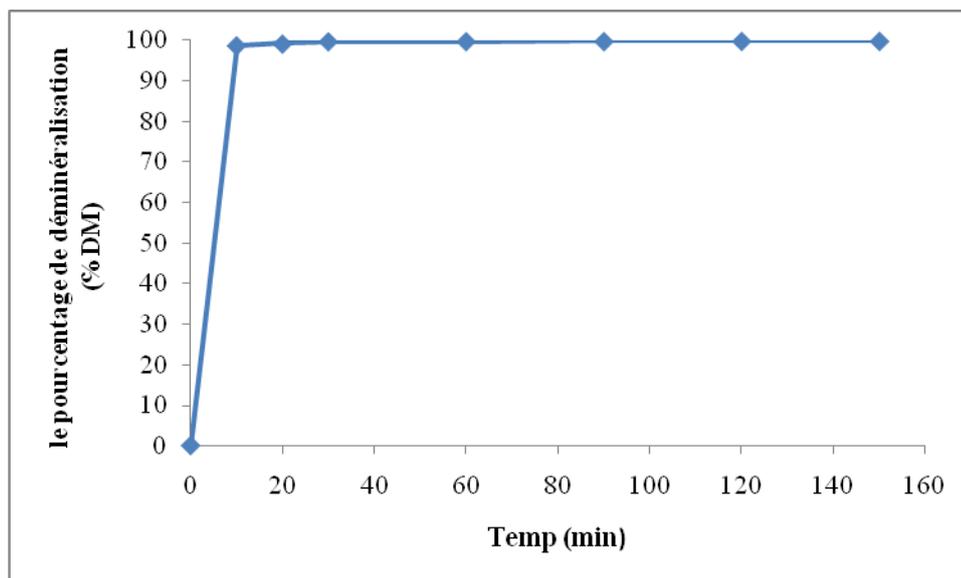


Figure 24 : Optimisation de la durée de la déminéralisation

Nous remarquons que la réaction de déminéralisation par l'acide chlorhydrique est une réaction très rapide. Elle est achevée au bout de 30 min.

IV -1-1-3-Optimisation du volume d'acide chlorhydrique :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, la température est ambiante (25°C) et la concentration en acide chlorhydrique est de 2 M et le temps de réaction est de 30 min. Les essais sont effectués en triplicata. Les résultats sont représentés dans la figure 25 :

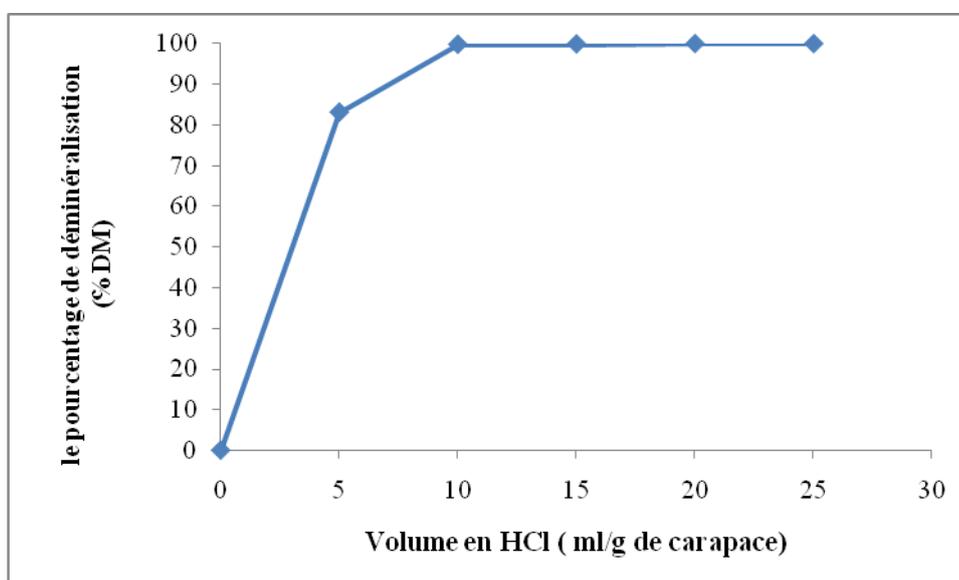


Figure 25 : Optimisation du volume d'acide chlorhydrique

Nous remarquons que la plus grande partie des minéraux contenus dans la carapace de crevettes est éliminée par 10 ml d'acide chlorhydrique à 2 M. L'optimum de la déminéralisation se situe à 15ml d'acide chlorhydrique et est achevée au bout de 30 min.

Les conditions optimisées de la déminéralisation sont présentées dans le tableau 10 :

Tableau 10 : Les conditions optimisées de la déminéralisation pour 1g de carapaces.

| Température (°C) | Temps (min) | Volume de HCl (ml) | Concentration en HCl (M) |
|------------------|-------------|--------------------|--------------------------|
| Ambiante | 30 | 15 | 2 |

IV -1-2- Optimisation de la déprotéinisation :

IV -1-2-1- Optimisation de la concentration en hydroxyde de sodium :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en soude caustique est de 20 ml, la température est ambiante (25°C) et la durée de la réaction est de 3 heures. Les essais sont effectués en triplicata. Les résultats sont représentés dans la figure 26 :

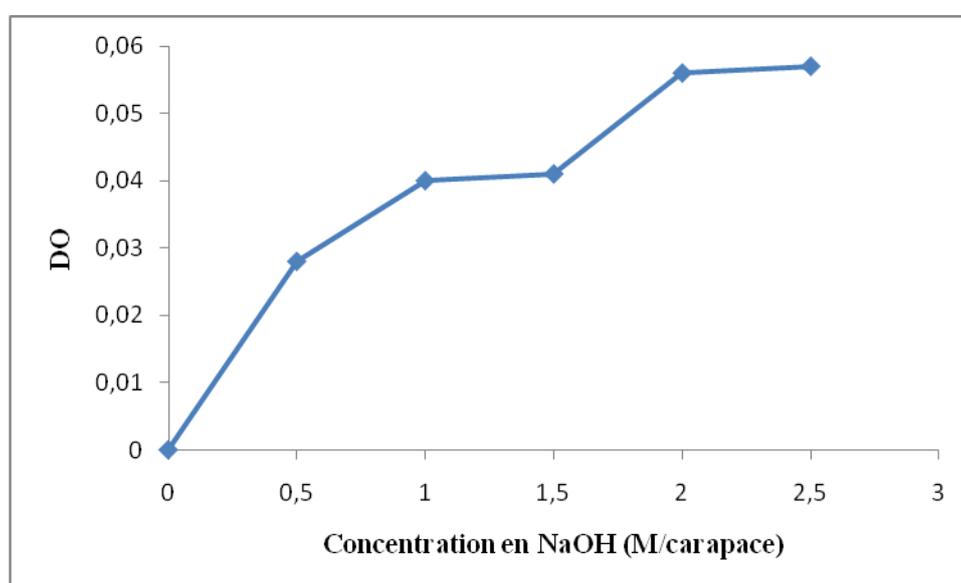


Figure 26 : Optimisation de la concentration en hydroxyde de sodium

Nous remarquons que la réaction de déprotéinisation s'effectue à de faibles concentrations en NaOH et est à son maximum à 2 M.

IV - 1-2-2- Optimisation de la durée de la réaction de déprotéinisation :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en soude caustique est de 20 ml, la concentration en NaOH est de 2 M et la température est ambiante (25°C). Les essais sont effectués en triplicata. Les résultats sont représentés dans la figure 27 :

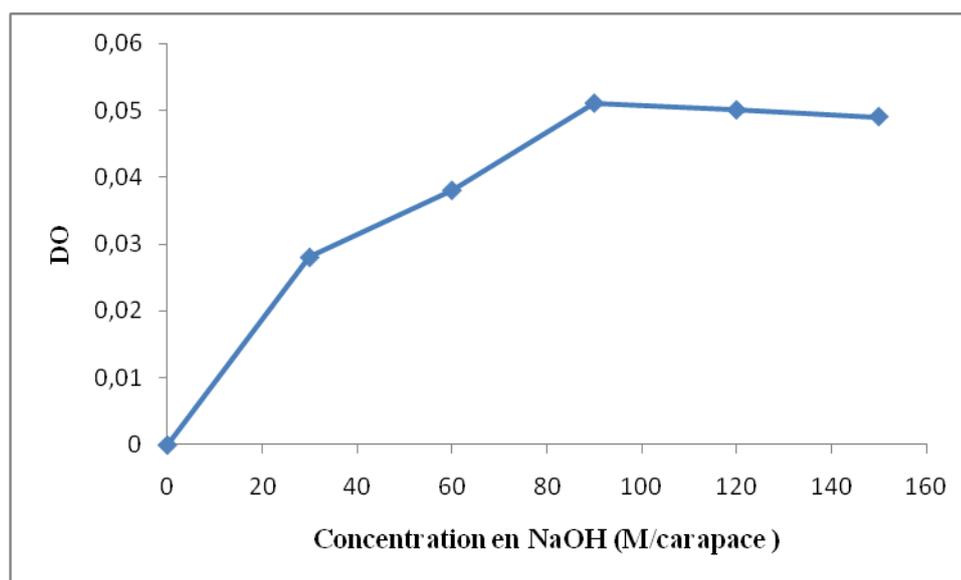


Figure 27 : Optimisation de la durée de la réaction de déprotéinisation

Nous remarquons que la déprotéinisation est proportionnelle à la durée de la réaction jusqu'à 90 min. Au-delà, nous atteignons un palier.

IV -1-2-3- Optimisation de la température de la réaction de déprotéinisation :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, le volume en soude caustique est de 15 ml, la concentration en NaOH est de 2 M et la durée de la réaction est de 90 min. Les essais sont effectués en triplicata. Les résultats sont représentés dans la figure 28 :

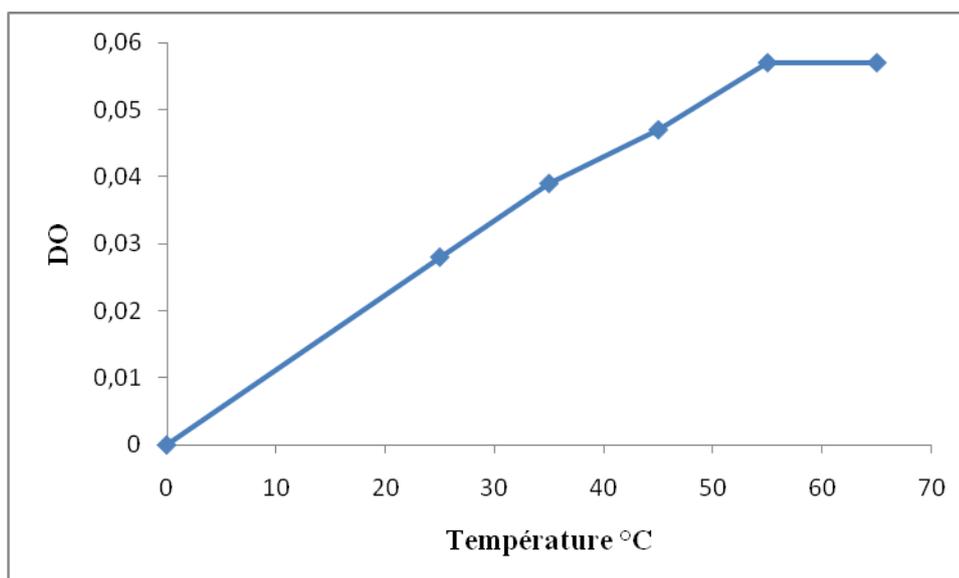


Figure 28 : Optimisation de la température de la réaction de déprotéinisation

Nous remarquons que la déprotéinisation peut se faire à température ambiante, mais est optimale à 55°C.

IV-1 -2-4- Optimisation du volume en hydroxyde de sodium :

Pour cela, les paramètres suivants restent invariables : le poids des carapaces est de 1g, la concentration en NaOH est de 2 M, la température de la réaction est de 55°C et la durée de la réaction est de 90 min. Les essais sont effectués en triplicat. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 29 :

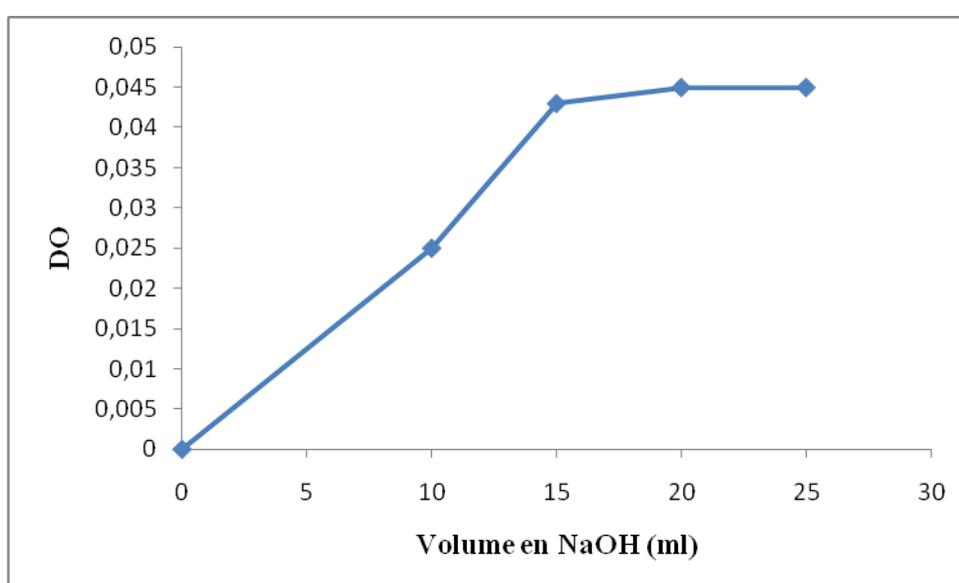


Figure 29 : Optimisation du volume en hydroxyde de sodium

Nous constatons que le volume optimal de NaOH pour déprotéiner les carapaces de crevettes est de 20ml.

Les conditions optimisées de la déprotéinisation sont résumées dans le tableau 11:

Tableau 11: Les conditions optimisées de la déprotéinisation pour 1g de carapaces.

| Température (°C) | Temps (min) | Volume de NaOH (ml) | Concentration en NaOH (M) |
|------------------|-------------|---------------------|---------------------------|
| 55 | 90 | 20 | 2 |

IV-2- Caractérisation de la chitine et de ses dérivés par spectroscopie infrarouge :

Les spectres infrarouges de la chitine et du chitosane sont représentés dans les figures 28 et 29 respectivement.

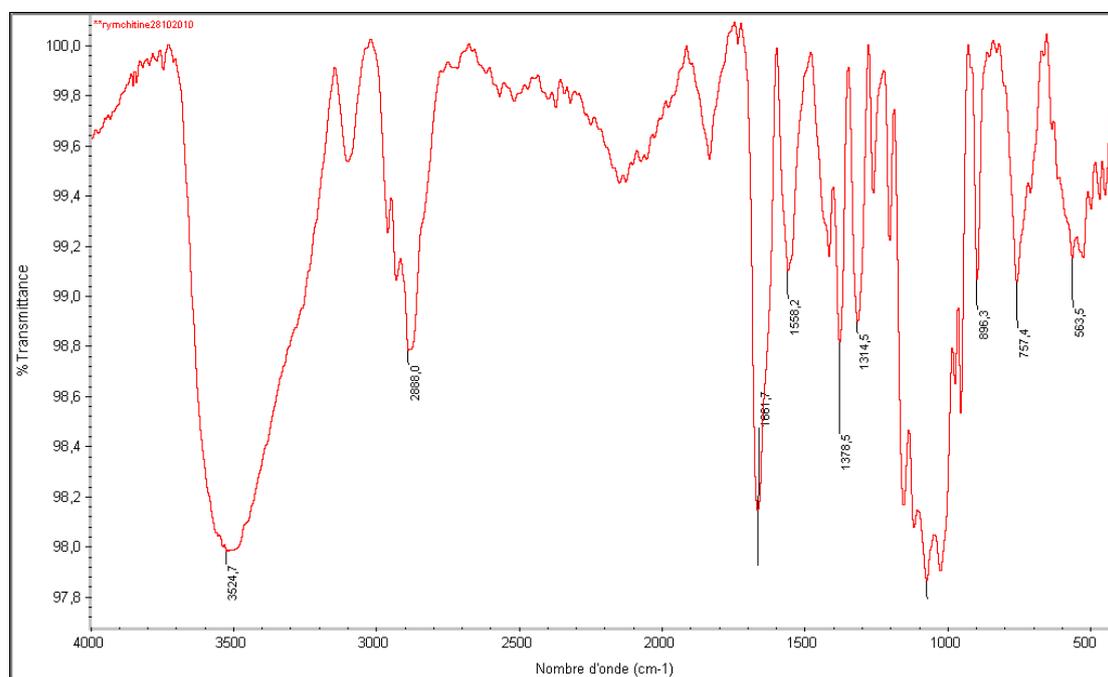


Figure 30 : Spectre infrarouge de la chitine.

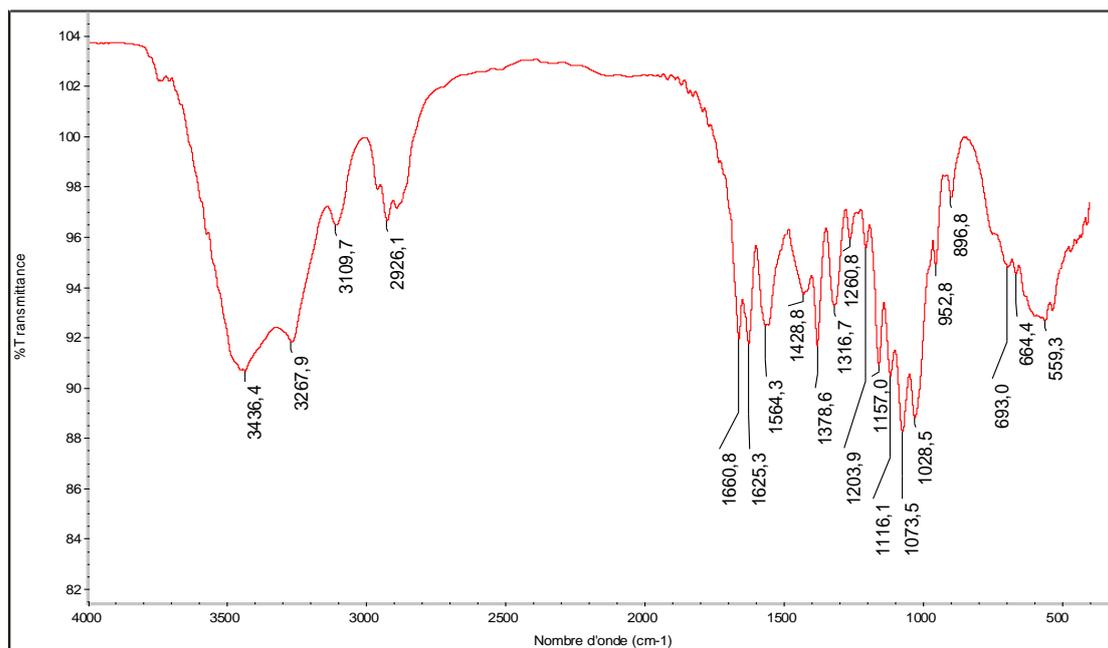


Figure 31 : spectre infrarouge de la chitine irradiée.

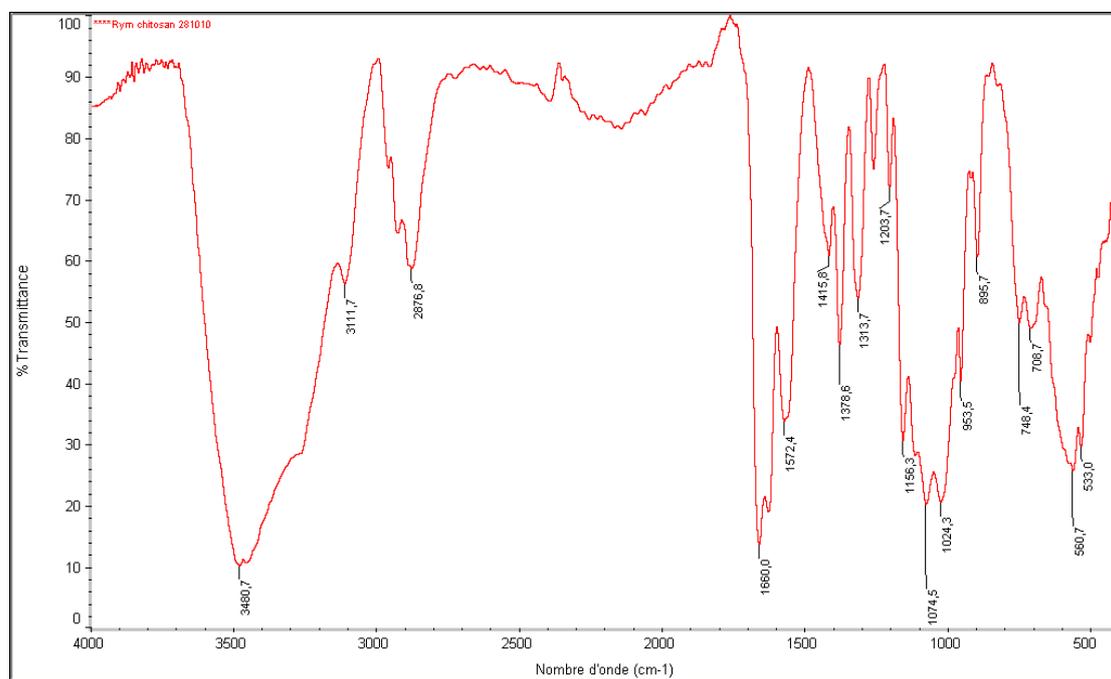


Figure 32: Spectre infrarouge du chitosane.

Les spectres d'absorption de la chitine et du chitosane obtenu présentent les mêmes pics cités par la littérature (Brugnerotto *et al.*, 2001; Rinaudo, 2006 ; Kasaai, 2008) :

Les principales bandes d'absorption caractéristiques de la chitine et du chitosane :

- La Bande de vibration d'élongation O-H à 3450 cm^{-1} ;
- La Bande de vibration d'élongation C-H entre 2870 et 2880 cm^{-1} ;
- Les Bandes de vibration d'élongation C-O-C à 1030 ou 1070 cm^{-1} ;
- La Bande de vibration déformation de la liaison -CH₂ à 1420 cm^{-1} ;
- La Bande de vibration d'élongation antisymétrique C-O-C à 1160 cm^{-1} ;
- La Bande de l'amide III entre 1315 et 1320 cm^{-1}
- La Bande de vibration de déformation de -NH du NH₂ entre 1620 et 1630 cm^{-1}
- La Bande de la liaison osidique C-O-C à $890-900\text{ cm}^{-1}$.

La désacétylation effective de la chitine est traduite par le déplacement de la bande amide II présente à $1558,2\text{ cm}^{-1}$ dans la chitine vers $1572,4\text{ cm}^{-1}$ dans le chitosane.

Toutes ces bandes sont retrouvées au niveau des spectres de la chitine et du chitosane préparés à partir des carapaces de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) (Figures 28 et 29).

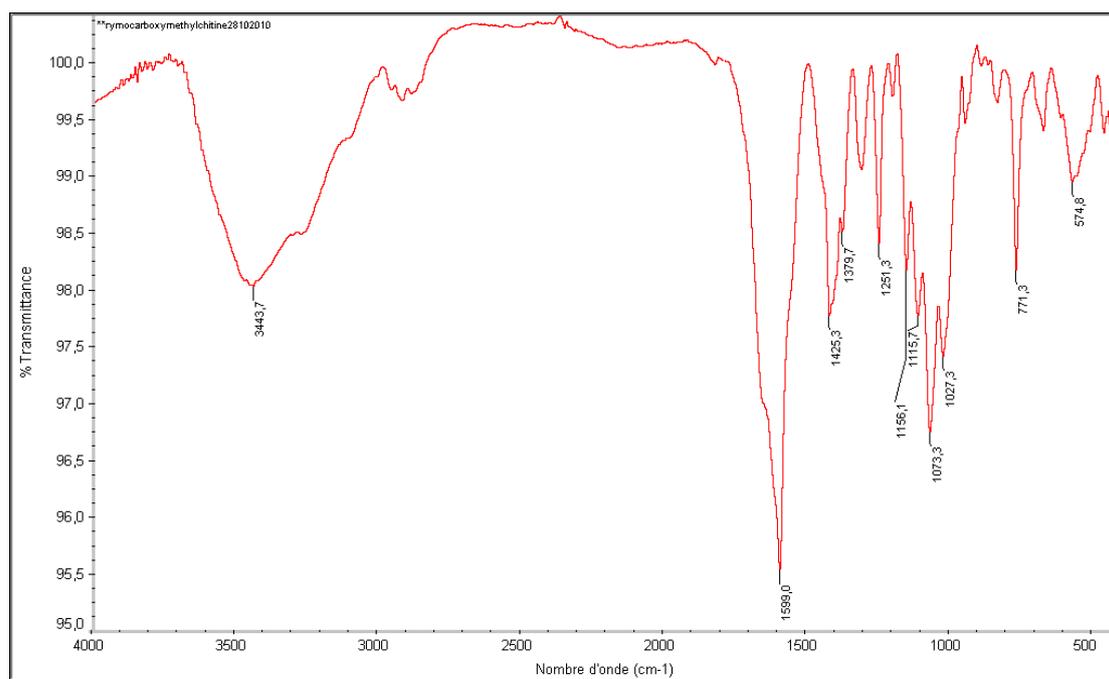


Figure 33 : Spectre infrarouge du O carboxymethylchitine .

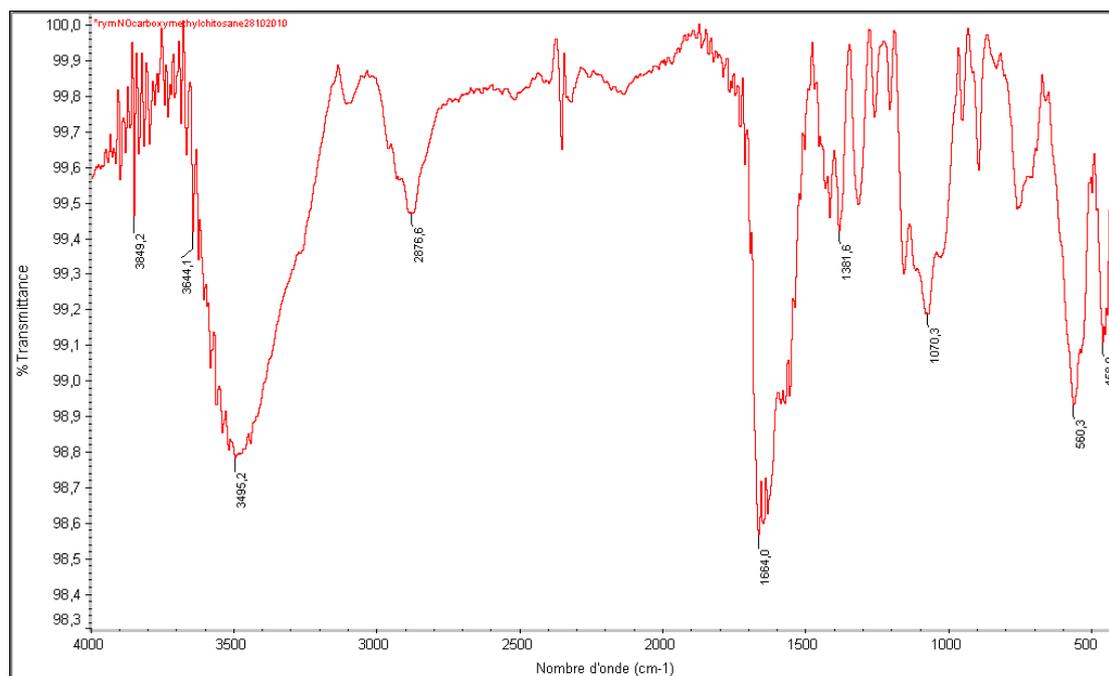


Figure 34 : Spectre infrarouge du N,O carboxyméthylchitosane .

Dans le spectre du carboxyméthylchitosane, le pic d'absorption à 1640 cm^{-1} est attribué aux vibrations d'élongations asymétriques du groupement COO^- qui coïncide avec les vibrations d'élongations de la bande amide I à 1660 cm^{-1} .

Le pic à 1450 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongations symétriques du groupement COO^- et le pic 1308 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongations de la liaison C-O. En comparant avec le spectre du chitosane, le pic à $1313,7\text{ cm}^{-1}$ qui correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-N, a légèrement augmenté après la réaction de carboxyméthylation du chitosane. Les pics d'absorbance à 1156 cm^{-1} et à $1070,3\text{ cm}^{-1}$ montrent l'existence des liaisons C-O-C et confirme que le OH du chitosane a été remplacé par le groupement COO^- .

IV-3- Détermination de la viscosité et du poids moléculaire du chitosane :

L'évolution de la viscosité réduite et de la viscosité inhérente en fonction des concentrations en chitosane est représentée sur un même graphique (figure 19). À partir de ce graphique nous obtenant directement la valeur de la viscosité intrinsèque de notre chitosane : $[\eta] = 0,775\text{ 100cm}^3/\text{g}$.

En remplaçant $[\eta]$ par sa valeur dans l'équation de **Mark-Houwink** nous obtenons un poids moléculaire du chitosane égal à 20,51 kDa.

Le poids moléculaire de la chitine irradiée à la dose de 210 kGy est de 11271 Da.

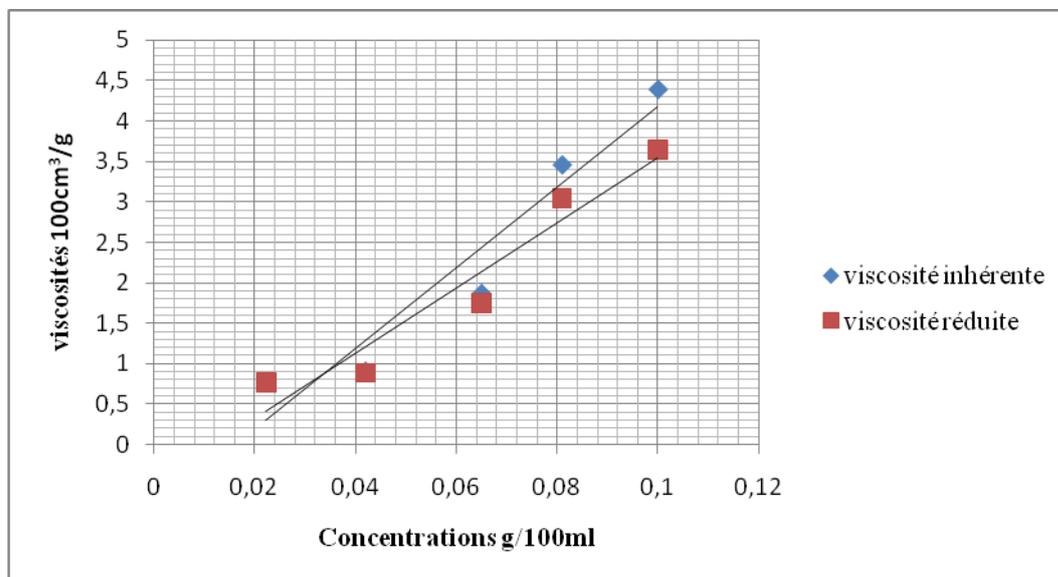


Figure 35 : Évolution de la viscosité réduite et inhérente en fonction de la concentration du chitosane.

IV-4- Discussion :

Les degrés de désacétylation du chitosane et de la chitine étaient calculés par spectrophotométrie à Infra-Rouge. Les D.D. sont de l'ordre de 60% pour le chitosane, de 39% pour la chitine et 17% pour la chitine irradié.

Les résultats de la spectrophotométrie à Infra-Rouge de la chitine sont proches de ceux trouvés par Kiefer en 1999, par contre les résultats concernant les spectrophotométries à Infra-Rouge du chitosane ; du N,O carboxymethylchitosane ; et du O, carboxymethylchitine diffèrent de ceux déjà publiés. Cet écart est probablement dû aux réactions partielles de désacétylation de la chitine et de carboxyméthylation de la chitine et du chitosane.

Quant à nos futurs travaux de recherche, nous axerons nos efforts sur l'optimisation du procédé de désacétylation de la chitine et la préparation de ses dérivées.

L'analyse des carapaces de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) a démontré la présence de 39% de protéines et de 35 % de minéraux. Nos résultats sont en accord avec ceux de No et ses collaborateurs (No *et al.*, 1989). Il faut avoir à l'esprit,

toutefois, que ces données ne sont pas constantes car chez les crustacés, des variations quantitatives et qualitatives de la chitine en fonction de l'espèce, du stade physiologique de l'organisme ou des variations saisonnières peuvent être observés (Seng, 1988 ; Fernandez-Kim, 2004).

L'étape « quenching », négligée par la plupart des auteurs, permet, par un choc thermique, d'améliorer le rendement de la déminéralisation et facilite le broyage des carapaces. Ceci est dû au relâchement de la structure cristalline de la chitine (Mukherjee, 2001).

L'optimum de la déminéralisation des carapaces de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) est atteint en utilisant 15ml d'HCl à 2 M à la température ambiante sous agitation pendant 30 min. Nos résultats sont proches de ceux trouvés dans la littérature :

Tolaimate et ses collaborateurs (2003) ont trouvés que l'optimum de la déminéralisation est atteint en utilisant 1g de carapaces de crevettes dans 10 ml d'HCl à 0,55 M pendant 60 min (Tolaimate *et al.*, 2003). No et ses collaborateurs (1989) ont extrait la chitine à partir de la langouste et ont mis en évidence que l'optimum de la déminéralisation est situé à la température ambiante pendant 30 minutes avec de l'HCl à 1M et un rapport de 1/15 g/ml (poids de carapace/volume d'HCl) (No, *et al.*, 1989).

L'optimum de la déminéralisation des carapaces de crevette chez Madhavan et ses collaborateurs (1974) été atteint en utilisant 1g de carapaces dans du HCl à 1,25 M à température ambiante pendant 1 h (Madhavan *et al.*, 1974).

Roberts (2008), a trouvé que la déminéralisation des carapaces de crevettes été complète en utilisant 0,25 M d'HCl durant 15 min à température ambiante (Roberts, 2008).

Muzzaerilli et ses collaborateurs (1980) ont utilisés 1g de carapaces dans du HCl à 1,57 M, à température ambiante et pendant 5h (Muzzaerilli *et al.*, 1980).

Mukherjee (2001) a travaillé, lui aussi, sur l'extraction de la chitine à partir de la langouste (l'espèce n'a pas été mentionnée) et a mis en évidence que l'optimum de la déminéralisation est situé à la température de 25°C pendant 2 heures avec de l'HCl à 1M et un rapport de 1/15 g/ml (Mukherjee, 2001). Mirzadeh et ses collaborateurs

(2002) ont travaillé sur l'extraction de la chitine à partir de la crevette du Golf persique et ont mis en évidence que l'optimum de la déminéralisation est situé à la température ambiante pendant 3 à 5 heures avec de l'HCl à 10% (Mirzadeh *et al.*, 2002). Ceci indique que la structure, la conformation et les propriétés de la chitine diffèrent d'une espèce à l'autre. La structure minérale des carapaces de crevettes blanches *Parapenaeus longirostris* semble être plus proche de celle des langoustes que celle de la crevette rose *Solenocera melantho* ou celle de la crevette du Golf persique.

L'optimum de la déprotéinisation des carapaces de *Parapenaeus longirostris* est atteint en utilisant 20ml de NaOH 2 M à 55°C sous agitation pendant 90 min et un rapport de 1/20 g/ml. Nos résultats diffèrent de ceux indiqués dans la littérature. Citons entre autres : Chang et Tsai (1997) ont déterminé que les conditions optimales de déprotéinisation sont : une température de 75°C, une concentration en NaOH de 2,5 M et un rapport de 5 ml/g (Chang et Tsai, 1997). Whistler et BeMiller, ont utilisés une solution de NaOH à 10%, à une température de 100°C et pendant 72h pour la déprotéinisation des carapaces (Whistler et BeMiller, 1962). Certains auteurs ont mis en évidence que l'optimum de la déprotéinisation est situé à la température de 65°C et une durée de réaction de 2 heures avec du NaOH à 3,5% et un rapport de 1/10 g/ml (Mukherjee, 2001 ; No *et al.*, 1989). Mirzadeh et ses collaborateurs (2002), quant à eux, sont parvenus à la conclusion que l'optimum de la déprotéinisation est situé à la température de 60-65°C avec du NaOH à 2M (Mirzadeh *et al.* 2002). Sahidi et Synowiecki (1991), ont trouvé que l'optimum de la déprotéinisation des carapaces de crevettes et des crabes été atteint en utilisant une solution de KOH (1%-2%) à 90°C et rapport de 1/20 g/ml. La durée minimale pour extraire 90% des protéines est de 1f et de 2h pour une déprotéinisation totale (Shahidi et Synowiecki, 1991).

L'obtention de la chitine blanche sans avoir recours à la décoloration a été possible en utilisant 30% HCl pour la déminéralisation et 1,5 M de NaOH pour la déprotéinisation (Naznin, 2005). Les protéines, ainsi extraites, peuvent être récupérées et valorisées (Synowiecki et Ali Abdul Quawi Al-Khateb, 2000).

Quant au chitosane, il peut être produit par désacytilation de la chitine en utilisant de fortes concentrations de NaOH (40%-50%) à des températures élevées (100°C)

(Peniston et Johnson 1980, Johnson et Peniston 1982). Les fortes températures réduisent le poids moléculaire du chitosane (Lusena et Rose 1953).

Une autre méthode, qui requiert des conditions moins sévères et donne de meilleurs résultats en désacétylation a été décrite par Domard and Runaudo (1983) qui a ajouté le thiophenol comme capteur d'oxygène et comme catalyseur durant la désacétylation.

D'autres auteurs ont proposé des optimums de désacétylation, citons entre autres :

Sergio et ses collaborateurs ont fixé l'optimum de la désacétylation à 115°C pendant 6 heures et avec du NaOH à 40% et un rapport de 1/48 g/ml (Sergio *et al.*, 2001).

Campana et Signini, qui ont utilisé de la chitine commerciale, ont désacétylé la chitine à 115°C pendant 6 heures avec du NaOH à 40% (Campana et Signini, 2001).

Mukherjee a travaillé sur l'extraction de la chitine à partir de la langouste et a mis en évidence que l'optimum de la désacétylation est situé à la température de 80°C pendant 96 heures avec du NaOH à 50% et un rapport de 1/25 g/ml (Mukherjee, 2001).

Kolodziejska et ses collaborateurs, qui ont travaillé sur la chitine du krill *Euphasia superba* ont utilisé du NaOH à 50% avec un rapport de 1/10 g/ml à la température de 140°C pendant 1 heure (Kolodziejska *et al.*, 2000).

Mirzadeh et ses collaborateurs ont utilisé du NaOH à 50% avec un rapport de 1/50 g/ml à la température de 95°C pendant 3 heures (Mirzadeh *et al.*, 2002).

Les caractéristiques physico-chimiques du chitosane varient selon l'espèce et la méthode de préparation. En général, les hautes températures, l'oxygène dissout et les fortes agitations peuvent causer la dégradation du chitosane. Par exemple, à des températures supérieures à 280°C, le polymère est rapidement dégradé (Fernandez-Kim, 2004). Ce dernier a aussi indiqué que l'ordre des étapes d'extraction de la chitine et de la production du chitosane (DM, DP, DC, DD) déterminées les caractéristiques du chitosane.

Durant le processus de préparation du chitosane, plusieurs facteurs tels le degré de désacétylation, le poids moléculaire, la concentration de la solution, les forces ioniques, le pH et la température affectent la production du chitosane et ses propriétés. Par exemple, la viscosité du chitosane diminue avec l'augmentation du temps de la déminéralisation (Fernandez-Kim, 2004).

IV-5- Etude de l'effet inhibiteur de la chitine et de ses dérivées envers les lignées cancéreuses :

Résultats :

Sur les figures 36,37, 38,39, 40,41, on peut constater que la chitine et ses dérivées ont montré une nette inhibition de la croissance des cellules Hep2 et RD, après 24 h de contact.

On peut remarquer également que la chitine et ses dérivées ont exercé une inhibition dose dépendante. En effet, comme le montrent les figures ,36, 37, 38, 39,40,41 la viabilité des cellules a diminué et donc la cytotoxicité de la chitine et de ses dérivées a augmenté proportionnellement aux concentrations des molécules testées.

Nos résultats ont montré clairement que la chitine a été cytotoxique avec une $IC_{50} = 400 \mu\text{g/ml}$ (Tableau 12) et la cytotoxicité totale (100%) est atteinte à une concentration de $2000 \mu\text{g/ml}$ pour les cellules Hep2 ; par contre la IC_{50} est de $200 \mu\text{g/ml}$ et la cytotoxicité totale (100%) n'est pas atteinte même à une concentration de $3000 \mu\text{g/ml}$ pour la lignée RD. En comparant avec les autres dérivés l' IC_{50} la plus faible est attribuée au chitosane. En effet, elle était de $300 \mu\text{g/ml}$ chez les Hep2 et de $190 \mu\text{g/ml}$ chez les RD. La mort de la totalité des cellules a été observée à la concentration de $3000 \mu\text{g/ml}$, tandis qu'elle n'a pas été atteinte pour les Hep2.

Pour les Hep2, les trois molécules (N,O, Carboxy-methyl chitosane-chitine irradié-2 phtalimido chitine) ont la même $IC_{50} = 450 \mu\text{g/ml}$ et seule le N,O, Carboxy-methyl chitosane ne provoque pas la mort totale des cellules même à $3000 \mu\text{g/ml}$. La O,Carboxy-methyl chitine a la IC_{50} la plus élevée ($500 \mu\text{g/ml}$) et provoque la mort totale des cellules à la concentration de $3000 \mu\text{g/ml}$. La lignée RD, quant à elle réagit différemment aux Hep2 face à l'action de ces molécules. En effet, le N,O CMC a une IC_{50} égale à $990 \mu\text{g/ml}$, et les deux molécules (2phtalimido chitine), (OCM chitine) ont respectivement des IC_{50} de $210 \mu\text{g/ml}$ et $240 \mu\text{g/ml}$.

Discussion :

Les résultats de l'étude de l'effet antiprolifératif sur la lignée RD ont montré que, mis à part le chitosane qui a une $IC_{50} = 300 \mu\text{g/ml}$, toutes les molécules testées ont une IC_{50} allant de $400 \mu\text{g/ml}$ à $500 \mu\text{g/ml}$ et donc ont un effet cytotoxique équivalent

envers la lignée cancéreuse Hep2. L'effet de nos molécules sur les cellules de la lignée RD a été légèrement différent de celui observé pour les Hep2.

En effet, on peut remarquer que les IC_{50} des molécules testées sur les RD sont plus petites que celles observées chez les Hep2 ; elles varient de 190 $\mu\text{g/ml}$ à 300 $\mu\text{g/ml}$ sauf pour le N,OCMC qui a présenté une IC_{50} de 990 $\mu\text{g/ml}$.

Dans les deux cas, il y'a un effet cytotoxique et inhibiteur de nos molécules envers les cellules cancéreuses et le chitosane a la plus petite IC_{50} et donc la plus importante efficacité.

La différence de cytotoxicité des 2 lignées par rapport aux diverses molécules testées peut être liée à leurs spécificités morphologiques et structurale mais aussi à l'efficacité de leur système de réparation des lésions.

L'efficacité du chitosane peut être attribuée à son caractère polyelectrolyte cationique et donc à ses charges positives. En effet, la présence de groupements amines dans les unités du D-glucosamine ajoute une particularité au chitosane par rapport aux autres polysaccharides. Le chitosane se dote de charges positives à $\text{pH} < 6,2$, ce qui lui permet de se lier à des molécules à charges négatives (lipides, collagène, glycosaminoglycans, lignosulfonates, alginates et ADN) par des interactions électrostatiques, donnant des complexes poly-électrolytes (CPE).

La formation et les propriétés de ces CPE dépendent fortement du pH, du DD du chitosane et de la charge des deux polymères (Kekkonen *et al.*, 2001 ; Ganzazode et Nasibov 2002).

La formation du complexe ADN/chitosane a été démontrée par Mumper *et al.*, en 1995.

Des travaux similaires aux nôtres ont été menés par Lee *et al.*, (2002), ils ont porté sur la cytotoxicité des dérivées cationiques du chitosane envers des lignées cancéreuses humaines et la conclusion est que cette cytotoxicité est probablement due aux interactions entre les groupements à charges négatives des cellules tumorales et les groupements à charges positives des dérivées. Je *et al.*, (2006) sont arrivés aux mêmes conclusions que **les auteurs précédents**. Leurs travaux ont porté sur la

cytotoxicité des dérivés du chitosane avec différents degrés de désacétylation envers des lignées cancéreuses humaines.

De nombreux auteurs (Illum *et al.*, 1994 ; Aspden *et al.*, 1997) attribuent aussi l'efficacité du chitosane à son DD, sa charge électrique, sa morphologie et sa taille. Cette dernière conditionne le passage de la molécule à travers les parois et membranes plasmiques. Le passage à travers les pores par les molécules polaires est possible à des MM < 40 kDa.

On peut aussi constater que nos résultats, obtenus avec la chitine, n'ont pas abouti aux mêmes conclusions étant donné que cette dernière est une molécule non chargée. Nos résultats peuvent être expliqués par le fait que la préparation des dérivés de la chitine et du chitosane n'a pas été complète comme le montrent les spectres infrarouges (par exemple : le taux de carboxylation du N,O, Carboxy-méthyl chitosane et de la O,Carboxy-méthyl chitine), contrairement à la préparation de la chitine et du chitosane de provenance commerciale. En effet, comme les propriétés du chitosane peuvent être affectées par son degré de DD, les propriétés des dérivés peuvent être aussi affectées par leur degré de carboxylation (N,O, Carboxy-méthyl chitosane et du O,Carboxy-méthyl chitine). Les propriétés de ces molécules ont largement été étudiées par Mourya *et al.*, (2010) et par Jayakumar *et al.*, (2010). Nous supposons que l'efficacité de ces dérivées aurait été meilleure que celle de la chitine et du chitosane si leur préparation avait été complètement achevée.

Le mécanisme d'action exacte de l'OCCMC et du NOCCMC, comme celui du chitosane est encore méconnu, cependant plusieurs hypothèses ont été émises notamment par Rabea *et al.*, 2003 :

Comme pour le chitosane, on suppose que l'OCCMC et le NOCCMC, interagissent avec les différentes molécules des cellules cancéreuses grâce à leurs charges négatives ou positives selon le pH du milieu (caractère amphotère), aussi grâce à leur petite taille qui leur permet de passer à travers les différentes liaisons chimiques des molécules existantes dans la cellule cancéreuse. En ce qui concerne le 2 phtalimido chitine, on suppose qu'il interagit grâce à son groupement hydrophobe avec les autres groupements hydrophobes de la cellule cancéreuse.

Ce qu'il faut retenir de nos résultats, est que toutes les molécules ont un effet inhibiteur et cytotoxique envers les lignées Hep2 et RD, et qu'on peut supposer qu'il existe plusieurs types d'interactions entre les groupements chargés des molécules et des cellules tumorales telles que les interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupements des cellules tumorales et les charges positives des groupements des molécules testées et aussi des interactions entre groupes hydrophobes des dérivées et des cellules tumorales.

Tableau 12 : IC₅₀ de la chitine et de ses dérivés (Hep2).

| Molécules testés | IC ₅₀ µg/ml |
|----------------------|------------------------|
| Chitosane | 300 |
| Chitine | 400 |
| NOCM Chitosane | 450 |
| Chitine irradié | 450 |
| 2 phtalimido chitine | 450 |
| OCM Chitine | 500 |

Tableau 13 : IC₅₀ de la chitine et de ses dérivés (RD).

| Molécules testés | IC ₅₀ µg/ml |
|----------------------|------------------------|
| Chitosane | 190 |
| Chitine irradié | 200 |
| 2 phtalimido chitine | 210 |
| OCM Chitine | 240 |
| chitine | 300 |
| NOCMC | 990 |

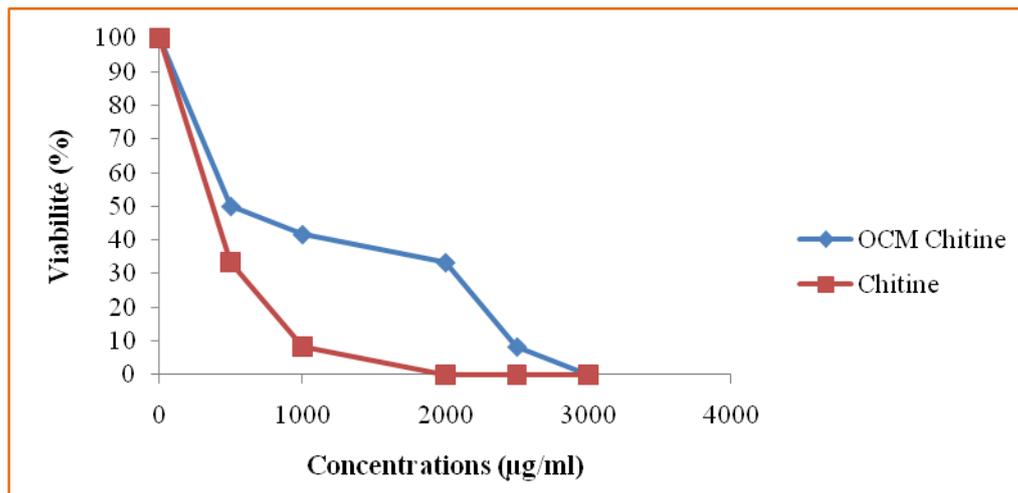


Figure 36 : Effet cytotoxique de la chitine et de l’OCM chitine sur les cellules Hep2.

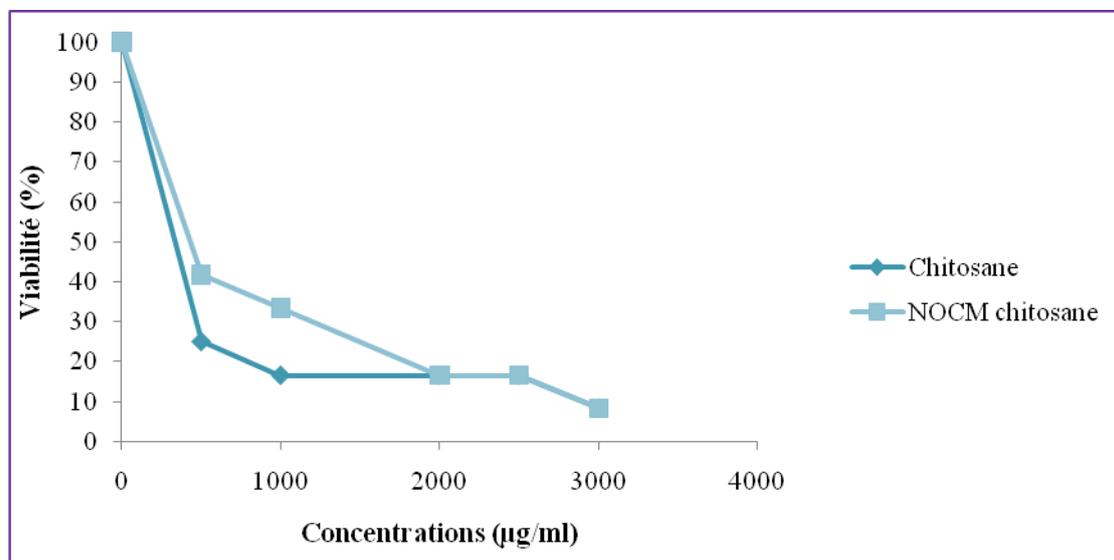


Figure 37 : Effet cytotoxique du chitosane et du NOCM chitosane sur les cellules Hep2.

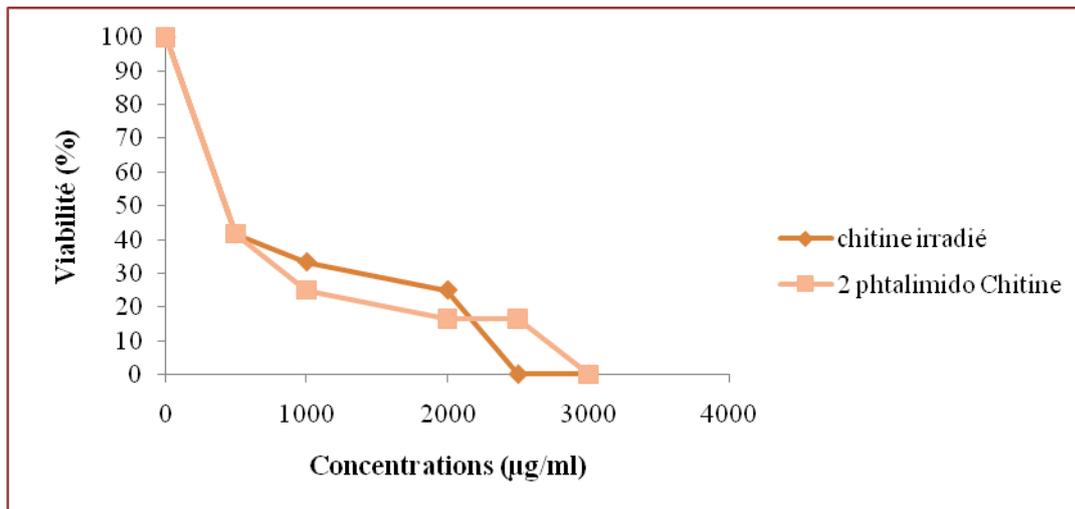


Figure 38 : Effet cytotoxique de la chitine irradié et du 2 phthalimido chitine sur les cellules.

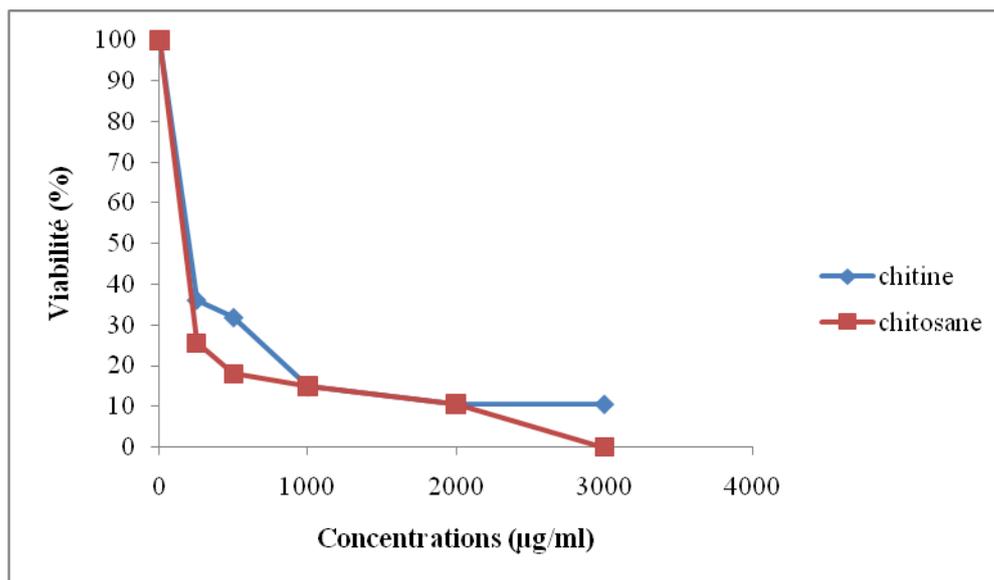


Figure 39 : Effet cytotoxique de la chitine et du chitosane sur les cellules RD.

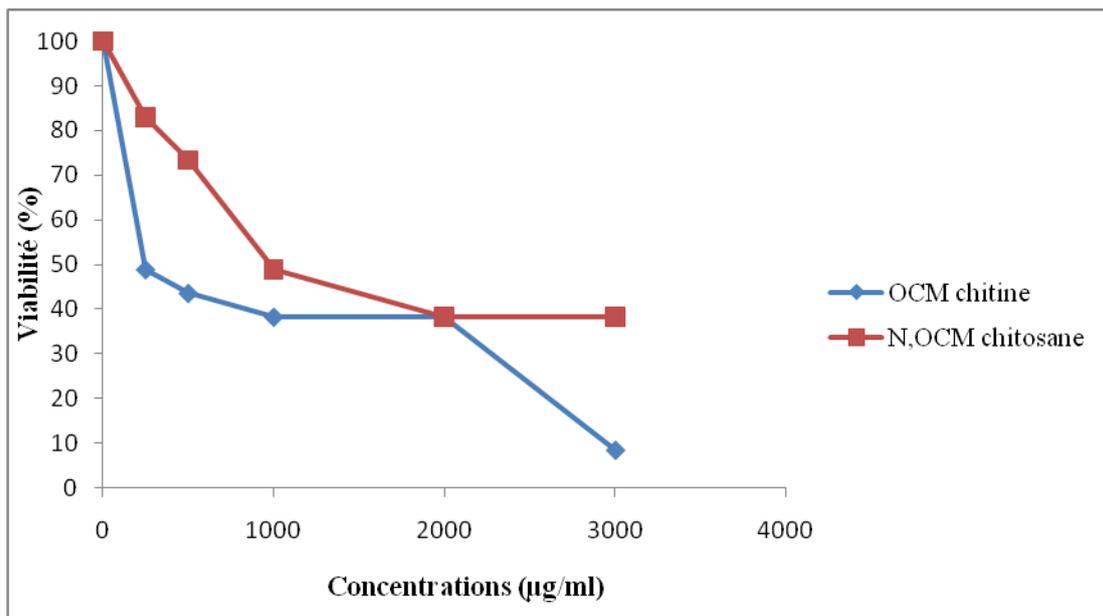


Figure 40 : Effet cytotoxique du OCM chitine et du N,OCM chitosane sur les cellules RD.

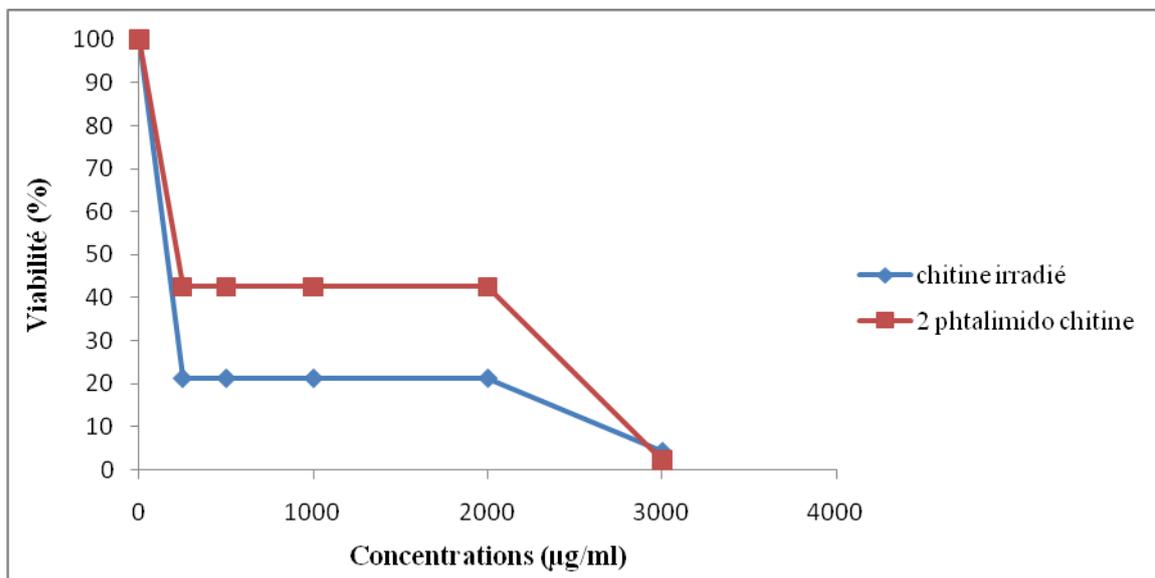


Figure 41 : Effet cytotoxique de la chitine irradié et du 2 phthalimido chitine sur les cellules. RD.

Conclusion :

La chitine et le chitosane sont des biopolymères d'une importance croissante pour l'industrie et ont des impacts significatifs sur la recherche et le développement dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, la santé ou encore la protection de l'environnement. Leurs propriétés exceptionnelles expliquent l'engouement pour ces macromolécules naturelles, extraites de carapaces de crustacés, considérées il ya encore peu comme des déchets.

Notre étude a révélé que la composition de la carapace de *Parapenaeus longirotris* (Lucas, 1846) est composée de 39% de protéines et de 35% de minéraux.

L'optimisation de la déminéralisation de la carapace de *Parapenaeus longirotris* est atteinte en utilisant 15ml d'HCl à 2 M par gramme de carapaces à la température ambiante sous agitation pendant 30 min. Tandis que l'optimum de la déprotéinisation est atteint en utilisant 20ml de NaOH à 2M par gramme de carapaces à 55°C sous agitation pendant 90 min.

Les degrés de désacétylation des chitosanes et de la chitine étaient déterminés par spectrophotométrie à Infra-Rouge. Les D.D. sont de l'ordre de 60% pour le chitosane et de 39% pour la chitine.

Les résultats de la spectrophotométrie à Infra-Rouge de la chitine sont proches de ceux trouvés dans la bibliographie, par contre les résultats concernant la spectrophotométrie à Infra-Rouge du chitosane, du N,O carboxymethylchitosane, et du O, carboxymethylchitine diffèrent de ceux déjà publiés. Cet écart est probablement dû à la partielle désacétylation de la chitine et la partielle carboxymethylation de la chitine et du chitosane.

Notre étude a aussi permis de démontrer, que la chitine et ses dérivées ont un effet cytotoxique envers les lignées cellulaires Hep2 et RD de type dose dépendante ; aussi peut-on supposer qu'il existe plusieurs types d'interactions entre les groupements chargés des molécules et des cellules tumorales telles que les interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupements des cellules tumorales et les charges positives des groupements des molécules testées ainsi que des interactions entre groupes hydrophobes des dérivées et des cellules tumorales. Cependant, il serait

Conclusion

intéressant d'améliorer les propriétés nos molécules testées dans ce travail en axant nos futurs travaux sur l'optimisation de leurs procédés de production.

Ces molécules étant insolubles dans l'eau, leur utilisation est limitée. Pour pallier à ce problème, nous proposons de produire d'autres molécules ayant comme particularité la capacité d'interagir avec d'autres molécules chargées tout en étant soluble dans l'eau.

Il serait nécessaire aussi d'élargir la gamme de lignées cellulaires étudiée et de poursuivre des recherches sur le mécanisme exact de fonctionnement de la chitine, du chiosane et leurs dérivées sur les cellules cancéreuses. Il faudrait étudier, par la suite, l'éventuel mécanisme de résistance des cellules cancéreuses à l'effet inhibiteur de ces substances. Ce travail sera complété, au sein de notre laboratoire, par l'étude de l'effet anticancéreux d'autres molécules dérivées de la chitine.

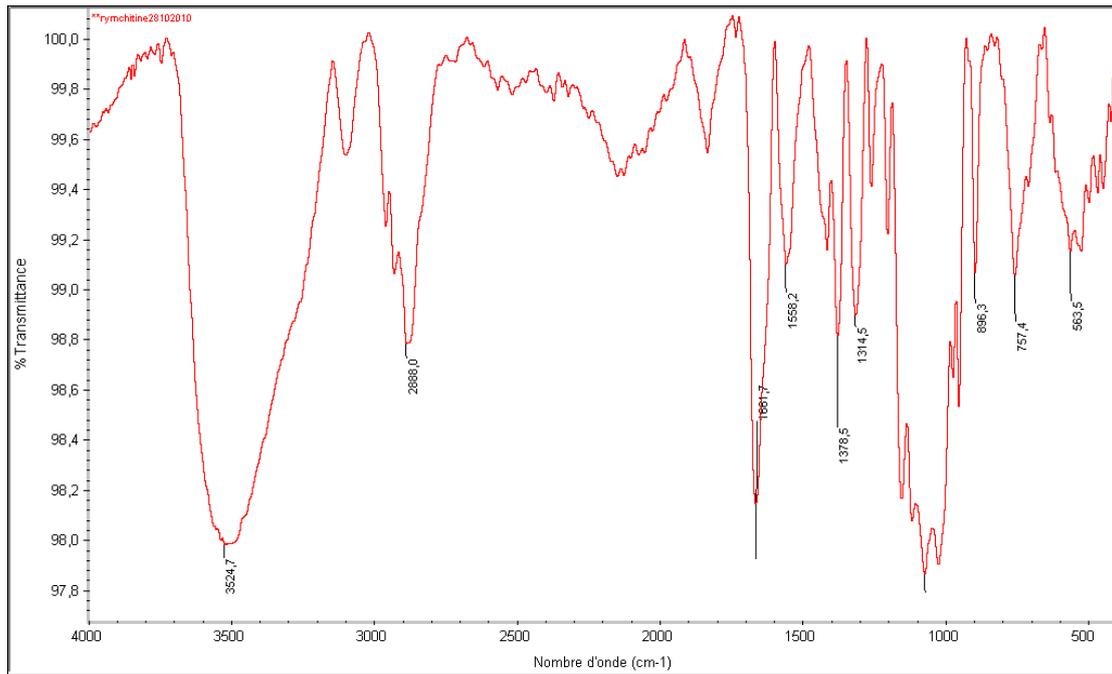


Figure 30 : Spectre infrarouge de la chitine.

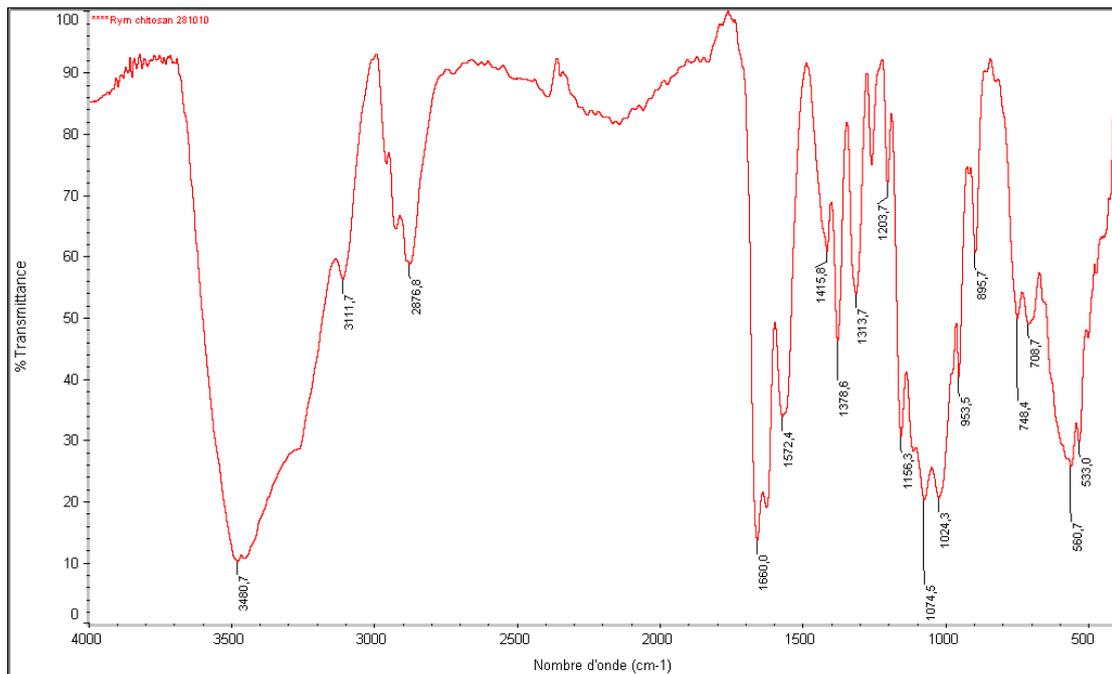


Figure 31: Spectre infrarouge du chitosane.

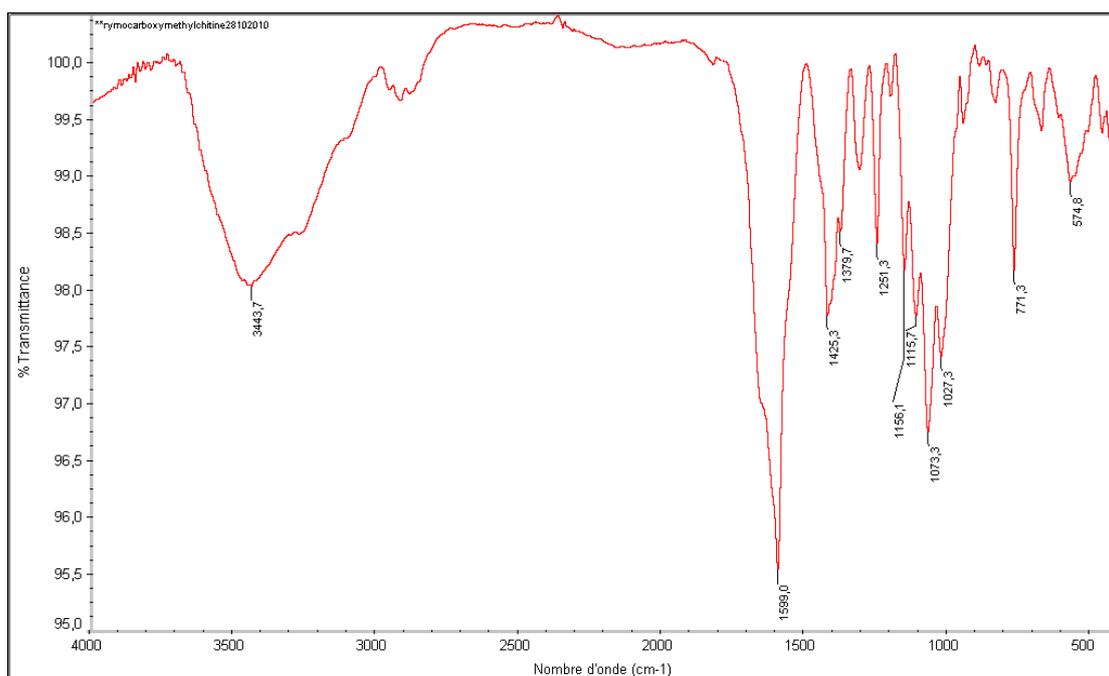


Figure 32 : Spectre infrarouge du O carboxymethylchitine.

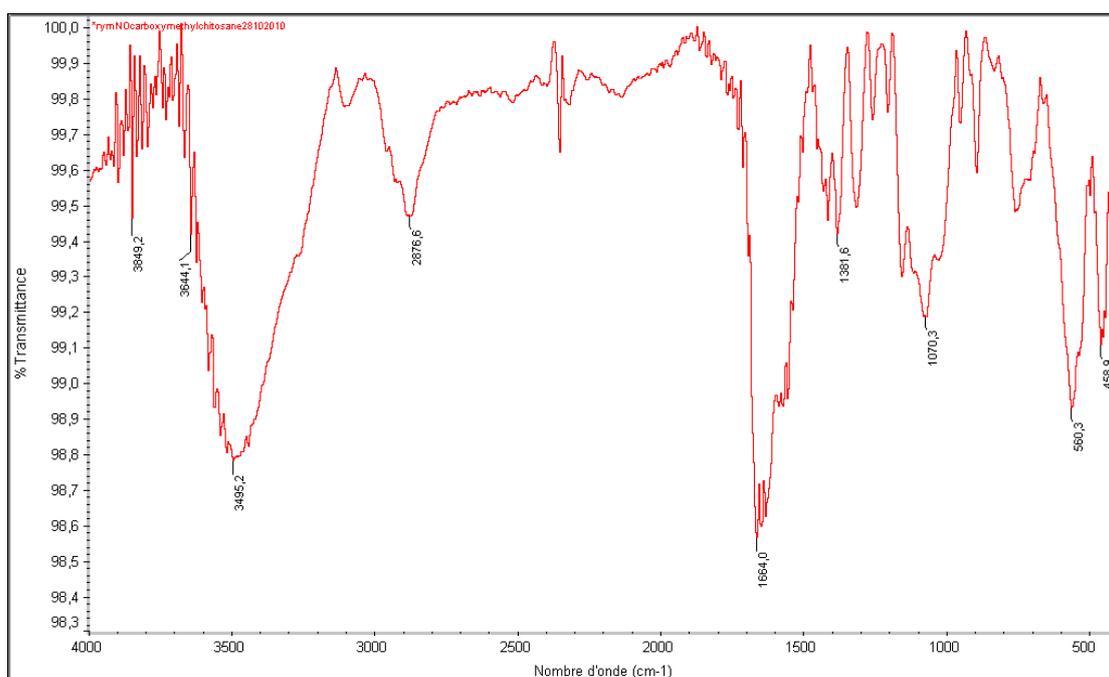


Figure 33 : Spectre infrarouge du N,O carboxymethylchitosane.

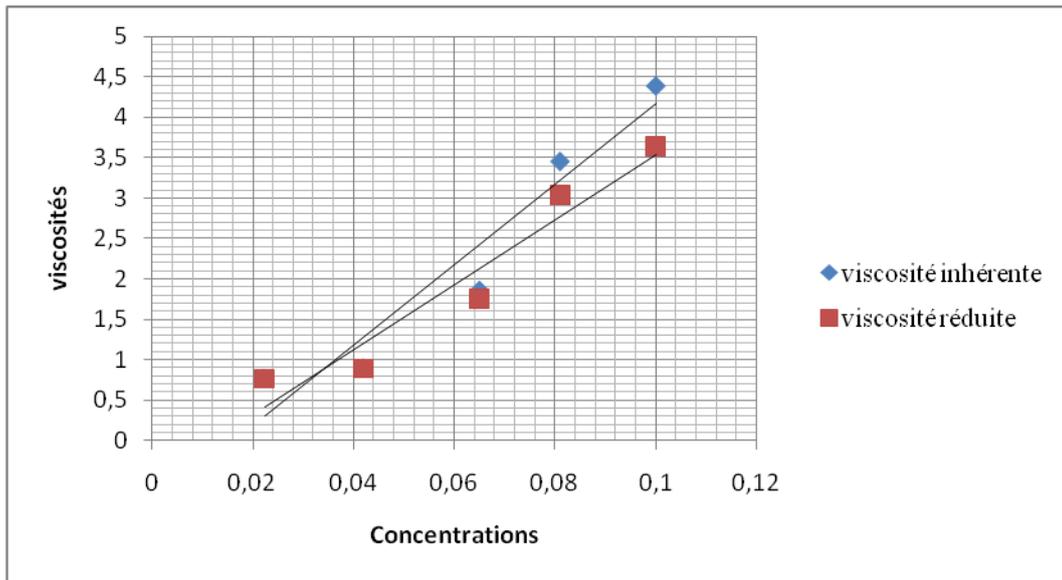


Figure 35 : Évolution de la viscosité réduite et inhérente en fonction de la concentration du chitosane.

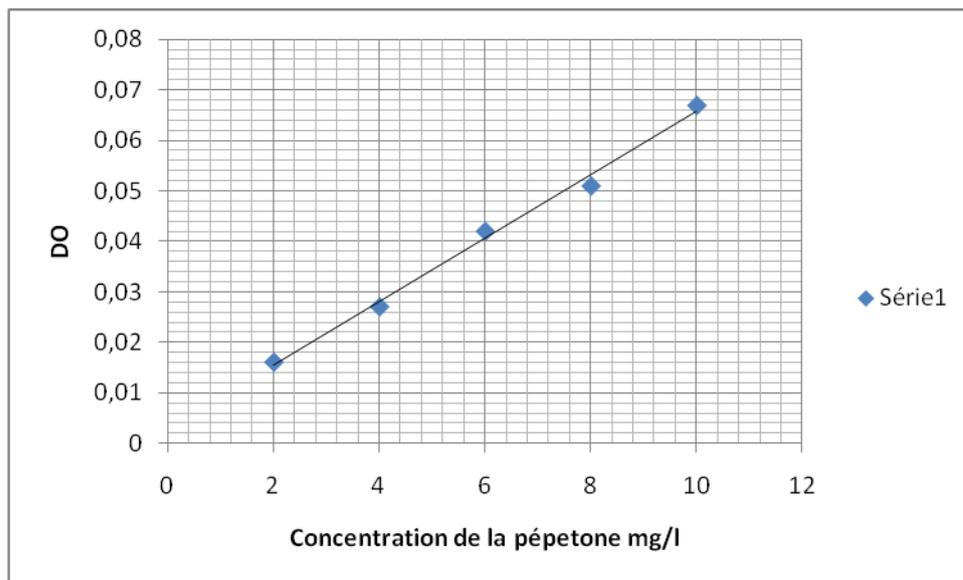


Figure 41: Courbe d'étalonnage de la coloration de Biuret effectuée avec de la péptone de caséine.

Références bibliographiques

- Allan, G.G.; Peyron, M. **1995**. Molecular weight manipulation of chitosan. I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydr. Res.*, 211, 257-272.
- Austin PR, 1984, *Chitin solvents and solubility parameters* in : Chitin and Chitosan and related enzymes. Zikakis JP, ed. Orlando: Academic Press ;227.
- Aspden, T. J., Mason, J. D. T., Jones, N. S., Lowe, J., Skaugrud, O., and Illum, L. 1997. Chitosan as a nasal delivery systems: The effect of chitosan solutions on in vitro in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.* 86:509–513.
- Bal Y., Bal K. E., Laarabi- Bouamrane O. and Lallam A., 2006. Copper (II) uptake by *Pleurotus mutilus* biomass, chitin and chitosan. *Mineral Eng.*, 19 (14), 1456- 1458.
- Baumann, H. et Faust, V. (2001) Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl, and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. *Carbohydrate Research*, 331 : 43-57
- Berger J., Reist M., Mayer J. M. Felt O. Peppas N. A. and Gurny R., 2004. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Europ. J. of Pharmac. and Biopharmac.*, 57, 19-34.
- Berth G., Dautzenberg H., (2002). *The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution*. *Carbohydrate Polymers*, 47: 39-51.
- B.Krajewska, 2005, *Sep Purif Technol* 41,305.
- Blackwell J; 1973, Chitin in : *Biopolymers*. Walton AG, Blackwell J, eds. New York :Academic Press ,474.
- Braconnot H. 1811, la nature des champignons ;79 : 265.
- Broussignac P ; 1968 ; *Chim Ind Genie Chimia* 99 , 1241.

Références bibliographiques

- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goyoolea, F., Arguelles-Monal, W., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, pp. 3569–3580.
- Campana, S.P.; Signini, R. (2001). Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Polimeros: Ciência Tecnologia*, 11 (4) : 169-173.
- Chang, K.L.; Tsai, G. (1997). Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1900-1904.
- Chang, K.L.B.; Lee, J.; Fu, W.-R. (2000). HPLC Analysis of N-acetyl-chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *Journal of Food and Drug Analysis*, 8(2) : 75-83.
- Chih- Min Wen, Chien- Sheng Tseng, Chih- Yu Cheng and Yaw- Kuen Li,
2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 213-219.
- Da Silva Amorim, R.V.; De Souza, W.; Fukushima, K.; De Campos-Takaki, G.M, 2001; Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 20-23.
- D. Hanahan et R.A. Weinberg.2000, *Cell* 100 : 57.
- Domard A, Gey C, Rinaudo M, Terassin C ; 1983 ; *Int J Biol Macromol* 5 ,49.
- Domard, A.; Cartier, N. **1989**. Préparation, séparation and characterisation of the D-glucosamine oligomer séries. *In Chitin and Chitosan*, Skjak-Braek, G.; Anthonsen, T.; Sandford, P. (eds), Elsevier, London, pp.383-387.
- Domszy JG, Roberts GAF. *Makromol Chem* ; 1985 ;186, 1671.
- Donadel K., 2004. Estrutura, propriedades e aplicações da quitina et quitosana.
Universidade federal de Santa Catarina pos- graduação em ciência e engenharia de materials disciplina : Tópicos especiais biomaterials.
- Dziril Maya (2010). Etude de l'hydrolyse enzymatique de la chitine irradiée

Références bibliographiques

par des chitinases extraites de la biomasse marine.

- Falini, G.; Weiner, S.; Addadi, L. (2003). Chitin-silk fibroin interactions: relevance to calcium carbonate formation in invertebrates. *Calcified Tissue International*.
- Felt, O., 1999. Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. *Thèse de doctorat*. Université de Genève.
- Fernandez, M.; Fox, P.F. (1997). Fractionation of cheese nitrogen using chitosan. *Food Chemistry*, 58 (4): 319-322.
- Fernandez-Kim, S.-O. (2004). Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. *A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Department of Food Science*. Seoul National University.
- Foscolo J. and Phillipon P., 1997. Des molécules qui miment le vivant. *Biofutur* 171, 14-17.
- Gamzazade, A. I. and Nasibov, S. M. 2002. Formation and properties of polyelectrolyte complexes of chitosan hydrochloride and sodium dextran sulfate. *Carbohydr. Polym.* 50:339–343.
- Gocan S.J,2002, *Chromatographic Sci* 40 , 538.
- Graham G. Allan and Mark P., 1995. Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohy. Resea.*, 277, 257- 272.
- Guibal E,2005, *Prog Polym Sci* 30, 71.
- H. Ai, B. Liu, W. Huang, Z. Lei, X. Zhou ;2007 *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* CN 1883306 (2006)) ou des dentifrices (L. Wang. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* CN 1969801.

Références bibliographiques

- Hallmann, J.; Rodriguez-Kabana, R.; Kloepper, J.W. (1998). Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 551.
- Henri Joyeux, 2004, l'alimentation ou la troisième médecine, 23 : 489-490.
- Hitoshi S. and Yoshihiro S., 1999. Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N- acetylated or N-alkylated partially deacetylated chitins. *Carbohydr. Polymers*, 39, 127-138.
- Hobel C. F. V., 2004. Access to biodiversity and new genes from thermophiles by special enrichment methods. PhD thesis, University of Iceland.
- Hoppe-Seiler F ;1984 ; Uber chitin und zellulose. *Ber Deut Chem Gesell* 27 , 3329.
- Horowitz, S.T.; Roseman, P.; Blumental, H.J. **1957**. The Préparation of Glucosamine Oligosaccharides, I. Séparation. *J. Am. Chem. Soc*, 79, 5046-5049.
- Hudson SM, Jenkins DW ; 2003, *chitin and chitosan* in : EPST.Mark HF,ed. New York : Wiley 569.
- H.-S. Seong, S.-W. Ko, K.-G. Song ;1998 ; *Korean Fiber Society* 35, 716-720.
- Illum, L.; Chatfield, S.N. (2002). Vaccine compositions including chitosan for intranasal administration and use thereof. *United States Patents*, 6,391,318.
- Izume, M.; Ohtakara, A. 1987. Préparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Agric. Biol. Chem.*, 51 (4), 1189-1191.
- Izume.M. Kinooka,Y. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* JP, 1998 6329,7305.
- Jacqueline Etienne ;2001, *biologie moléculaire*, 9 : 247-248.
- Jae-Young Je, Young-Sook Cho and Se-known Kim ;2006; cytotoxic activities of water-soluble chitosan derivatives with different degree of deacetylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16 : 2122–2126.
- Jean claude Callen. 2005, *biologie cellulaire*, 14 : 409-411.

Références bibliographiques

- Jean Claude Kaplan, Marc Delpech ; 2001 biologie moléculaire et médecine ; 13 : 499.
- Jean Claude Kaplan, Marc Delpech ; 1992 biologie moléculaire et médecine ; 15 : 342-343.
- J. Grenier, A. Asselin. *Mo* ;1990 ; *Plant Microb. Interact.* 3, 401.
- Johnson, E.L. and Peniston, Q.P. 1982. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. In: *Chemistry & Biochemistry of Marine Food products*, eds. G.J. Martin, C.E. Hebard, and W.R. Ward, pp. 514–522. Westport, CT: AVI Publishing Co.
- Jung-Kul Lee, a Hyun-Soo Limb and Jung-Hoe Kim, 2002, Cytotoxic Activity of Aminoderivatized Cationic Chitosan Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12 : 2949–2951.
- Kasaai, M. R. (2008). A review of several reported procedures to determine the degree of Nacetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* , 71, pp. 497–508.
- Kasaai, M.R.; Charlet, G.; Paquin, P.; Arul, J. 2003. Fragmentation of chitosan by microfluidization process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 403-413.
- Kasaai ; 2000 ; MR, Arul J, Charlet G. *J Polym Sci Polm Phys* 38,2591.
- Kekkonen, J., Lattu, H., and Stenius, P. 2001. Adsorption kinetics of complexes formed by oppositely charged polyelectrolytes. *J. Colloid Interface Sci.* 234:384.
- Khan T.A. ; Peh, K.K. ; Chang, H.S. (2002). Reporting degree of deacetylation of chitosan : the influence of analytical methods. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 5(3) : 205-212.
- Kiefer, 1999. Le chitosane : <http://www.France.com/kiefer/Es.htm>.
- Kim, S.K.; Rajapakse, N. **2005**. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS) : A review. *Carb. Polym.*, 62, 357-368.
- Kittur F. S., Harish P. K. V., Udaya S. K., Tharanathan R. N., 2002;

Références bibliographiques

- Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry carbohydrate polymers. 49, 185-193.
- Kolodziejska, H.; Wojtasz-Pajak, A.; Ogonowska, G.; Sikorski, Z.E. (2000). Deacetylation of chitin in a two-stage chemical and enzymatic process. *Bulletin of the Sea Fisheries Institute*, 2(150): 15-24.
 - Kurita K. Marine ; 2006 ; *Biotechnol* 8,203.
 - Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer science*, 26: 1921-1971.
 - Laura Ramírez- Coutiño, María del Carmen Marín- Cervantes, Sergio Huerta, Sergio Revah and Keiko Shirai, 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*, 41, 1106-1110.
 - Lusena, C.V. and Rose, R.C. 1953. Preparation and viscosity of chitosan. *J Fish Res Board Can.* 10:521–522. Mahlous, M., Tahtat, D., Benamer, S., and Nacer Khodja, A. 2007. Gamma irradiation-aided chitin/chitosan extraction from prawn shells. *Nucl Instrum Methods Phys Res B.* 265:414–417.
 - Majeti, N.V.; Kumar, R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46: 1–27.
 - L. Wang. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* CN 1969801.
 - Manisara P., Ratana R. and Pitt S., 2003. Characterisation of beta- chitin/ poly (vinyl alcohol) blend films. *Polymer testing*, 22, 381- 387.
 - Madhavan, P. and Nair, K.G.R. 1974. Utilisation of prawn waste—Isolation of chitin and its conversion to chitosan. *Fishery Tech.* 11: 50–53.
 - Mirzadeh, H. ; Yaghoobi, N. ; Amanpour, S. ; Ahmadi, H. ; Mohagheghi, M.A. ; Hormozi, F. (2002). Preparation of chitosan derived from shrimp's shell of Persian Gulf as a blood hemostasis agent. *Iranian Polymer Journal*, 11 (1) : 63-68.
 - Montserrat R. P., 2002. Developpement of techniques based on natural

Références bibliographiques

- polymers for the recovery of precious metals. Memdria presentada per optar al grau de doctor en ciències químiques- Menicio doctor Europeu.
- Mukherjee, D.P., (2001). Method for producing chitin or chitosan. *United States Patents*, 6,310,188.
 - Mumper, R. J., Wang, J., Claspell, J. M., and Rolland, A. P. 1995. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22:178–179.
 - Muzzarellu RAA, Muzzarelli C ;2005, Chitosan chemistry : relevance to the biomedical sciences in : Polysaccharides I. Structure, caractérisation and use.Springer.ADV Polym Sci 186 ,151.
 - Muzzarelli, R.A.A.; Terbojevich, M.; Muzzarelli, C.; Francescangeli, O. (2002). Chitosans depolymerised with the aid of papain and stabilized as glycosylamines. *Carbohydrate Polymers*, 50: 69-78.
 - Muzzarelli, R.A.A. (1988) Carboxylated chitins and chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 8 : 1-21
 - Muzzarelli RAA,1985, Chitin in: The polysaccharides. Aspinall GO, ed. London: Academic Press ; 3: 417.
 - (Muzzarelli RAA, 1983 ; Carbohydr Polym ,3 : 53).
 - Muzzarelli A. A. Riccardo, Fabio Tanfani, Gianfranco Scarpini and Giuseppe Laterza, 1980. The degree of acetylation of chitin by gas chromatography and infrared spectroscopy. *J. of Biochem. and Biophys. Methods*, 2, 299-306.
 - Nagasawa, K.; Tohira, Y.; Inoue, Y.; Tanoura, N. **1971**. Reaction between carbohydrates and sulfuric acid : part I. Depolymerization and sulfation of polysaccharides by sulfuric acid. *Carbohydr. Res.*, 18, 95-102.
 - Naznin, R. 2005. Extraction of chitin and chitosan from shrimp (*Metapenaeus monoceros*) shell by chemical method. *Pak J Biol Sci.* 8:1051–1054.

Références bibliographiques

- No, H.K. ; Meyers, S.P. and Lee, H.S. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 37 (3): 575-579.
- No, H.K.; Park, N.Y.; Lee, S.H.; Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 65– 72.
- Nouar, A.; Maurin, C. (2001). Nature of and typical populations on the characteristic facies of substratum of *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) along the algerian coast. *Crustaceana*, 74 (2): 129-135.
- Odier ,1823, Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes, 1 : 29.
- Onsoyen E, Skaugrud O,1990, J Chem Technol Biotechnol 49,395.
- Peniston, Q.P. and Johnson, E.L. 1980. Process for the manufacture of chitosan. Patent no. 4,195,175.
- Peter MG,1995, JMS Pure Appl Chem 32 : 629.
- Plouffe B., 1997. Production de chitosanases modulaires munies d'un site d'attachement à la cellulose et étude de leur activité en bioréacteur. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., and Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6): 1457–1465.
- Rauch F, Dornish M. *chitosan in : An introduction to biomaterials*.Gulcher SA, Hollinger JO ; 2006 ;eds.CRC press14,249.
- Ravi Kumar MNV ;2000 ; React Funct Polym 46.
- Rebeca EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W.*Biomacromolecules* ; 2003 ; 4, 1457.

Références bibliographiques

- Rinodo M., Milas M. Dung P. L. (1999). *Characterization of chitosan. Influence of ionir: strength and degree of acetylation on chain expansion*. Int. J. Biol. Macromol., 15: 281-285.
- Rinaudo M. Prog ; 2006 ; Polym Sci 31 ,603.
- R. Jayakumar , M. Prabakaran , S.V. Nair , S. Tokura , H. Tamura ,
N. Selvamurugan ;2010 ;Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. Progress in Materials Science 55 : 675–709.
- Rolland, A.; Mumper, R.J. (2001). Chitosan related composition and methods for delivery of nucleic acids and oligonucleotides into a cell. *United States Patent*, 6,184,037.
- Ronerts GAF ; 1992 ; Chitin chemistry. London : MacMillan.
- Rouget C. Des substances amy lactées dans le tissu des animaux, compte rendus, 48,1859.
- Sandforf PA ; 2003 ; *Commercial sources of chitin and chitosan and their utilization in : Advances in chitin science*. Varum KM, Domard A, Smidesrod O, eds. Trondheim : NTNU 6, 35.
- Seng, J.-M. (1988). Chitine, chitosane et dérivés : de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, Septembre : 40-44.
- Sergio, P.; Campana, F.; Signini, R. (2001). Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Plimeros: Ciência Tecnologia*, 11(4) : 169-173.
- Shahidi, F. and Synowiecki, J. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *J Agric Food Chem*. 39:1527–1532.
- Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T.j, 2006 ; Surgical Research 133-185.
- Shigemasa Y., Saito K., Sashiwa H. and Saimoto H., 1994. Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. Int. J. Biol. Macromol., 16 (1) : 43-49.
- Se-Kwon Kim, 2001, Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives ; 1 : 4

Références bibliographiques

- Shigememasa, Y.; Usui, H.; Morimoto, M.; Saimoto, H.; Okamoto, Y.; Minami, S.; Sashiwa, H. (1999). Chemical modification of chitin and chitosan 1: preparation of partially deacetyled chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydres in lithium chloride / N,N-dimethylacetamide. *Carbohydrate Polymers*, 39: 237-243.
- Struszczyk MH, 2002 ; *Polimery* 47 : 396.
- Somashekar, D.; Joseph, R. 1996. Chitosanases - Properties and applications : a review. *Bioresource technology*, 55, 35-45.
- Sorlier P, Denuzière A, Viton C, Domard A ; 2001 ; *Biomacromolecules* 2 ,765.
- Suzuki S., Watanabe T., Mikami T. and Suzuki M., 1990. Proceedings of the 5th International Conference on chitin and chitosan, USA, 96- 105.
- Synowiecki, J.; Ali Abdul Quawi Al-Khateb, N. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68: 147-152.
- Tharanathan R. N. and Kittur F. S., 2003. Chitin- the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 43, 61-87.
- Tolaimate A, Desbrieres J, Rhazi M, Alagui A. *Polimer*, 2003 ; 447 : 939.
- Tomoya I., Watanabe T., Toshifumi Y. and Junji S., 2003. The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. *Biochem. J.*, 374, 755-760.
- Tsai, G.-J.; Su, W.-H.; Chen, H.-C. ; Pan, C.-L. (2002). Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*, 68: 170-177.
- V.K Mouryaa, Nazma N. Inamdara and Ashutosh Tiwarib, 2010; Carboxymethyl chitosan and its applications. *ADVANCED MATERIALS Letters*, 1 : 11-33.
- Whistler, R.L. and BeMiller, J.N. 1962. Alkaline degradation of amino sugars. *J Org Chem.* 27(4):1161–1164.
- W.-F. Osswald, J.-P. Shapiro, R.-E. McDonald, R.-P. Niedz, C.-J. Nairn, J. Hearn, R.-T. Mayer ; 1994 ; *Plant Cell Physiol.* 35, 811.

Références bibliographiques

- W. Xia, F. Zhang, X. He. *Wuxi*, 1998 ; *Qingong Daxue Xuebao Bianjibu* 17 : 10-14.
- X. Zhou, D. Liu, K. Yao, 2005, *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu* CN 1686559.
- Yang Y- P., Xu X- H., Chen H- F., 2004. Treatment of chitin-producing wastewater by micro- electrolysis- contact oxidization. *Journal of Zhejiang University Science*. 5 (4): 436- 440.
- Y.-J. Jeon, F. Shahidi, S.-K. Kim, 2000 ; *Food Rev. Int.* 16 : 159-176 .
- Y. Takamori, H. Sashiwa, H. Saimoto, Y. Okamoto, S. Minami, A. Matsuhashi, Y. Shigemasa ; 1996 ; "*Proceedings from the 2nd Asia Pacific Chitin Symposium*", Bangkok, 249-256.
- Yomota C., Miyazaki T., Okada S. (1993). *Determination of the viscometric constants for chitosan and the application of universal calibration procedure in its gel permeation chromatography*. *Colloid Polym. Sci.*, 271: 76-82.
- Zarzycki R, Modrzejewska Z ; 2003 ; *Polim Med* 33, 47.
- Zhang, H. ; Neau, S.H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22 : 1653-1658.
- Zhang Y., Xue C., Xue Y., Gao R., Zhang X. (2005). *Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction*. *Carbohydrate Research*, 340 : 1914-1917.

Références bibliographiques