



المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات
Ecole Nationale Polytechnique

Ecole Nationale Polytechnique
Département du Génie de l'Environnement
Laboratoire des Biotechnologies Environnementales
et du Génie des Procédés (BioGeP)



Thèse de Doctorat en Génie de l'Environnement Option : Biotechnologies Environnementales

Présentée par :

M^{me} SALAH Rym

Ingénieur d'Etat en Biologie option Génie Biologique de l'USTHB
Magister en Génie de l'Environnement option Biotechnologies Environnementales de
l'ENP

Intitulée

Utilisation des dérivés de la chitine en pharmacothérapie

Soutenue publiquement le 04 juillet 2013 devant le jury composé de :

Président :	BOUARAB Rabah	Professeur	ENP
Rapporteur :	MAMERI Nabil	Professeur	ENP
Examineurs :	ABDESSEMED Djamel	Professeur	USTHB
	BAKOUR Rabah	Professeur	USTHB
	GRIB Hocine	Professeur	ENP
	CHIKHI Nassima	MC	ENV
Invité :	MICHAUD Philippe	Professeur	UBPCF (France)

ENP 2013

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم القشرة الخارجية للجمبري الأبيض

Parapenaeus longirotris (Lucas, 1846) لذلك قمنا بـ:

1. تحضير السكريات متعددة الوحدة السكرية "كيتين" و مشتقاتها.
2. لجأنا لإستعمال تقنيات FT-IR،HPAEC،¹³CRMN،¹HRMN،SEC-MALLS لتأكد من ماهية السكريات السابق ذكرها.
3. و أخيرا درسنا تأثير المضاد الحيوي البكتيري، المضاد الحيوي الطفيلي و المضاد الحيوي للسرطان على صنفين من البكتريا (*Escherichia coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ، على صنفين من الطفيليات (*Leishmania infantum* LIPA 137 و *Leishmania infantum* LIPA 155/1) و ثلاثة أصناف من الخلايا الانسانية السرطانية (THP-1، ، RD) و صنف من الخلايا الانسانية العادية (MRC-5).
4. على ضوء النتائج المتحصل عليها يمكننا التصنيف كما يلي:
السكريات متعددة الوحدة السكرية "كيتين" و مشتقاتها مضادات حيوية طفيلية و سرطانية و ليست مضادات حيوية بكتيرية.
الكلمات المفاتيح: كيتين، مشتقات الكيتين، المضاد الحيوي السرطاني، المضاد الحيوي الطفيلي، المضاد الحيوي البكتيري، تقييم، الجمبري.

Résumé

Cette étude consiste en la valorisation des carapaces de la crevette blanche *Parapenaeus longirotris* (Lucas, 1846) par la préparation de chitine et de ses dérivés par voie chimique. La caractérisation des différentes substances sus-citées était réalisée par FT-IR, SEC-MALLS,¹HRMN, ¹³CRMN et HPAEC. Nous avons, par la suite, testé l'effet antibactérien, l'effet antiparasitaire et l'effet antitumoral de nos produits sur deux souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), 2 souches parasitaires (*Leishmania infantum* LIPA 137 et *Leishmania infantum* LIPA 155/10), 3 lignées cellulaires tumorales humaines (THP-1, Hep-2 et RD) et 1 lignée cellulaire normale humaine (MRC-5).

La chitine et ses dérivés ont démontré un effet antitumoral et un effet antiparasitaire. Par contre, le chitosane oxydé n'a démontré aucun effet antibactérien.

Mots clés : chitine, dérivés de la chitine, activité anticancéreuses, activité antiparasitaire, activité antibactérienne, valorisation, crevette.

Abstract

The aim of this study is to valorize the white shrimp shell *Parapenaeus longirotris* (Lucas, 1846). This valorization consists in the chemical preparation of chitin and its derivatives. The characterization of the various substances is done with FT-IR, SEC-MALLS,¹HNMR, ¹³CNMR and HPAEC. Then, we tested the antibacterial effect, the antiparasitic effect and the tumouricidal effect of the substances two bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), two parasites (*Leishmania infantum* LIPA 137 and *Leishmania infantum* LIPA 155/10), three human tumour cell lines (THP-1, Hep-2 and RD) and one human normal cell line (MRC-5).

Chitin and derivatives exhibit a tumouricidal activity and an antiparasitic activity. However, oxide chitosan don't exhibit an antibacterial activity.

Key words : chitin, chitin derivatives, tumouricidal activity, antiparasitic activity, antibacterial activity, valorization, shrimp.

SOMMAIRE

Introduction	1
PARTIE I : Synthèse des connaissances actuelles	5
CHAPITRE I : Chitine	5
1- Définition	5
2- Historique	5
3- Structure chimique	5
4- Solubilité de la chitine	7
5- Biosynthèse de la chitine	8
6- Dégradation de la chitine	10
7. Préparation de la chitine	11
7.1- Méthode chimique	12
7.2- Méthode biologique	13
CHAPITRE II : Dérivés de la chitine	13
1- Chitosane	13
1.1- Historique	15
1.2- Obtention du chitosane	16
1.3- Solubilité du chitosane	16
1.4- Poids moléculaire	17
1.5- Viscosité du chitosane	17
2- Oligomères de la chitine et du chitosane	18
3- 2-phtalimido chitine et 2-phtalimido chitosane	19
4- O-carboxyméthyle chitine et N,O-carboxyméthyle chitosane	20
5- Carboxy N-acétyl-chitooligosaccharides et carboxy chitooligosaccharides	21
6- Chitosane oxydé	22
7- Oligochitosanes oxydés	23
CHAPITRE III : Applications et limites de la chitine et de ses dérivés	23
1- Applications	23
1.1- Applications biomédicales	
1.1.1- Traitement du cancer	23
1.1.2- Rétention du calcium et diminution du cholestérol	24
1.1.3- Distribution de médicaments dans l'organisme et élimination des effets secondaires des médicaments	24
1.1.4- Activation immunologique	25
1.1.5- Traitement des brûlures, des ulcères et cicatrisation des plaies	25

1.2- Applications environnementales et contrôle de la pollution	26
1.2.1- Elimination des métaux lourds, teintures, nitrates et déchets radioactifs et la récupération des métaux précieux	26
1.2.2-Traitement de l'eau de rejet	27
1.3- Applications à l'industrie alimentaire	27
1.4- Applications à l'agriculture	27
1.5- Autres applications	28
2- Limites et risques d'allergies	29
CHAPITRE IV : Cancer et culture cellulaire	29
1- Mécanismes moléculaires de l'oncogénèse	32
1.1- Proto-oncogènes	32
1.2- Circuits auxiliaires	33
1.2.1- Mitochondries	33
1.2.2- Apoptose	33
2- Défenses naturelles contre le cancer	34
3- Culture cellulaire	35
3.1- Définition de culture cellulaire	35
3.2- Historique	35
CHAPITRE V : Leishmaniose et bactériologie	36
1- Leishmaniose	36
1.2- Historique et classification	38
2- Bactériologie	39
1- <i>Escherichia coli</i>	39
2- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
PARTIE II : Matériel et méthodes	40
CHAPITRE I : Matériel biologique	40
CHAPITRE II : Méthodes	42
SOUS-CHAPITRE I : Extraction de la chitine et préparation de ses dérivés	42
1- Extraction de la chitine	42
2- Préparation du chitosane	43
3- Préparation des N-acétyl chitooligosaccharides et des chitooligosaccharides	43
4- Préparation du O-carboxyméthyle chitine	44
5- Préparation du N,O-carboxyméthyle chitosane	44
6- Préparation de carboxychitooligosaccharides et de carboxy-N-acétyl chitooligosaccharides	44

7- Préparation de la 2-phtalimido chitine et du 2-phtalimido chitosane	44
8- Préparation du chitosane oxydé	45
9- Préparation des oligochitosanes oxydés	46
9.1- depolymerisation du chitosane oxydé à l'aide de la glucuronane lyase	46
9.2- Dépolymérisation du chitosane oxydé à l'aide de la cellulase	46
SOUS-CHAPITRE II : Caractérisation des différentes substances	46
1- Mesure du taux de cendre	46
2- Mesure de la teneur en protéines	47
3- Mesure du degré de désacétylation	47
4- Mesure du poids moléculaire	47
5- Mesure de la densité apparente	47
6- Mesure de la densité réelle	48
7- Mesure du taux de chitine dans la carapace	48
8- Dosage de l'azote total par la méthode de KJELDAHL	49
9- Estimation du degré d'oxydation par conductimétrie	49
10- Caractérisation des oligosaccharides par HPAEC	49
11- Caractérisation des produits par SEC-MALLS	50
12- Caractérisation des produits par ¹³ CRMN et ¹ HRMN	50
13- Caractérisation des produits par FT-IR	51
14- Caractérisation des produits par FPLC	52
SOUS-CHAPITRE III : Applications	52
1- Etude de l'effet anticancéreux	52
1.1. Pré-culture des cellules	52
1.2- <i>Etude de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité</i>	53
1.2.1- Méthodes colorimétriques (test au bleu de Trypan et test au MTT)	53
1.2.2- Détermination de la fragmentation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	54
2- Etude de l'effet antiparasitaire	54
3- Etude de l'effet antibactérien	55
4- Calcul de l'ETR	56
PARTIE III : Résultats et discussion	57
CHAPITRE I : Analyses et caractérisations	57
1- Analyse des carapaces de la crevette blanche <i>Parapenaeus longirostris</i> (lucas, 1846)	57
2- Préparation de la chitine et de ses dérivés	57
2.1- Extraction et caractérisation de la chitine	57

2.2- Préparation et caractérisation du chitosane	62
2.3- Dépolymérisation de la chitine et du chitosane et caractérisation des produits	65
2.4- Carboxyméthylation de la chitine et du chitosane et caractérisation des produits	70
2.5- Carboxylation des produits de dépolymérisation de la chitine et du chitosane et leur caractérisation	72
2.6- Préparations de la « 2-phtalimido chitine » et du « 2-phtalimido chitosane » et caractérisation des produits	73
2.7- Préparation et caractérisation du chitosane oxydé	75
2.8- Préparation des oligochitosanes oxydés	75
2.8.1- Dépolymérisation du chitosane oxydé à l'aide de la glucuronane lyase	75
2.8.2- Dépolymérisation du chitosane oxydé à l'aide de la cellulase	76
CHAPITRE II : Applications de la chitine et de ses dérivés	77
1- Etude de l'activité antitumorale	78
1.1- Etude de l'innocuité sur les cellules saines	78
1.2- Etude de l'activité antitumorale sur la lignée Hep-2	81
1.3- Etude de l'activité antitumorale sur la lignée RD	85
1.4- Etude de l'activité antitumorale sur la lignée THP-1	89
2- Etude de l'activité antiparasitaire	102
3- Etude de l'activité antibactérienne	106
Conclusion	110
Références bibliographiques	112
Annexes	132

LISTE DES ABREVIATIONS

¹³CRMN	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
¹H-NMR	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
ABC	ATP binding cassette
ADCC	Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléaire
ARN	Acide RiboNucléaire
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine TriPhosphate
CD	Clusters de différenciation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DA	Degré d'Acétylation
DD	Degré de Désacétylation
DMAc	N,N-DiMéthylAcétamide
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMF	DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DO	Densité Optique
Do	Degré d'oxydation
DP	Degré de Polymérisation
EDTA	EthylDiméthylTétrAcétique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ETR	Ecart-Type Relatif
FAO	Food and Agriculture Organization
Fc	Fragment cristallisable
FcγR	Fc γ Receptor
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FT	Fourier Transform
FT-IR	Fourier Transform-InfraRed
GTP	Guanosine TriPhosphate
HCT-116	Cellules humaines du carcinome du colon
Hep-2	Cellules humaines du carcinome de l'épithélium

HEP-G2	Cellules humaines du carcinome hépatique
HL-60	Cellules humaines leucémiques promyélocytaire
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
CI₅₀	Concentration Inhibitrice 50
IgG	Immunoglobine G
IR	InfraRouge
LIPA	Leishmania de l'Institut Pasteur d'Algérie
LPS	LipoPolySaccharides
MALLS	Multi-Angle Laser Light Scattering
MCF7	Cellules humaines du carcinome du sein
MDR	Multi-Drug Resistance
MEM	Minimum Essential Medium
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MRC-5	Cellules du fibroblaste embryonnaire humain
MTT	(3-[4,5-diMethylThiazol-2-yl]-2,5-diphenyl)Tetrazolium bromide
NK	Natural Killer
NMP	N-Méthyl-2-Pyrrolidinone
PAD	Pulsed Amperometric Detection
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	potentiel Hydrogène
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acétate
RD	Cellules humaines de rhabdomyosarcome
RI	Refractive Index
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPMI 1640	Roserv Park Memorial Institute 1640
SDS	Sodium Dodécyl Sulphate
SEC	high pressure Size Exclusion Chromatography
SEC-MALLS	high pressure Size Exclusion Chromatography with on-line Multi-Angle Laser Light Scattering
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBE	Tris Borate EDTA
TE	Tris EDTA
TEMPO	2,2,6,6-TetraMethylPiperidine-1-Oxy radical
THP-1	Cellules humaines leucémiques monoocytaires
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-Violet

VIH

Virus de l'Immunodéficience Humaine

YKL-40

ou HC gp-39 ou CHI3L1 : Chitinase 3-Like 1

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la chitine	4
Figure 2 : Structures de la D-glucosamine et du N-acétyl D-glucosamine	4
	5
Figure 3 : Les différentes formes polymorphiques de la chitine	
Figure 4 : Biosynthèse de la chitine	7
Figure 5 : Action des différentes enzymes sur la chitine	9
Figure 6 : Structure du chitosane	12
Figure 7 : Hydrolyse enzymatique de la chitine et du chitosane	17
Figure 8 : Structure de la 2-phtalimido chitine	18
Figure 9 : Structure du 2-phtalimido chitosane	18
Figure 10 : Structure du O-carboxyméthyle chitine	19
Figure 11 : Structure du N,O-carboxyméthyle chitosane	19
Figure 12 : Structure des carboxy N-acétyl-chitooligosaccharides	20
Figure 13 : Structure des carboxy chitooligosaccharides	20
Figure 14 : Structure du chitosane oxydé	20
Figure 15 : Structure des oligochitosanes oxydés	21
Figure 16 : Vue générale des changements cellulaires qui causent le cancer	28
Figure 17 : Cycle de développement du parasite <i>Leishmania</i>	35
Figure 18 : Variation de la viscosité de la chitine en fonction de la concentration	57
Figure 19 : Spectre FT-IR de la chitine	60
Figure 20 : Variation de la viscosité du chitosane en fonction de la concentration	62
Figure 21 : Spectre FT-IR du chitosane	63
Figure 22 : Spectre ¹³ CRMN de la chitine de faible poids moléculaire	65
Figure 23 : Spectre ¹ HRMN de la chitine de faible poids moléculaire	65
Figure 24 : Chromatogramme HPAEC de la chitine de faible poids moléculaire	66
Figure 25 : Spectre FT-IR de la chitine de faible poids moléculaire	67
Figure 26 : Spectre FT-IR des « chitooligosaccharides »	68
Figure 27 : Spectre FT-IR de la carboxyméthyle chitine	69
Figure 28 : Spectre FT-IR du « N,O-carboxyméthyl chitosane »	69
Figure 29 : Spectre FT-IR de la « carboxychitine de faible poids moléculaire »	70
Figure 30 : Spectre FT-IR des « carboxy chitooligosaccharides »	71
Figure 31: Spectre FT-IR de la « 2-phtalimido chitine »	72
Figure 32 : Spectre FT-IR du « 2-phtalimido chitosane »	72

Figure 33 : Courbe de détermination du degré d'oxydation du chitosane oxydé par conductimétrie	73
Figure 34 : Cinétique de dégradation du chitosane oxydé par la glucuronane lyase	74
Figure 35 : Cinétique de dégradation du chitosane oxydé par la cellulase	75
Figure 36 : Activité cytotoxique de la chitine, du chitosane et de la chitine de faible poids moléculaire sur la lignée MRC-5	77
Figure 37 : Activité cytotoxique de la « carboxychitine de faible poids moléculaire », des « carboxy chitooligosaccharides » et des « chitooligosaccharides » sur la lignée MRC-5	77
Figure 38 : Activité cytotoxique de la « 2 phtalimido chitine » et du « 2 phtalimido chitosane » sur la lignée MRC-5	78
Figure 39 : Activité cytotoxique de la carboxyméthyle chitine et du « N,O carboxyméthyle chitosane » sur la lignée MRC-5.	78
Figure 40 : Activités anticancéreuses de la chitine et du chitosane sur croissance de la lignée Hep-2.	79
Figure 41 : Activités anticancéreuses de la chitine de faible poids moléculaire et du chitosane oxydé sur la croissance de la lignée Hep-2	80
Figure 42 : Activités anticancéreuses de la « 2 phtalimido chitine », du « N,O carboxyméthyle chitosane » et du carboxyméthyle chitine sur la croissance de la lignée Hep-2	81
Figure 43 : Activités anticancéreuses des « chitooligosaccharides » et du « 2 phtalimido chitosane » sur la croissance de la lignée Hep-2	81
Figure 44 : Activité anticancéreuse de la « carboxychitine de faible poids moléculaire » sur la croissance de la lignée RD	82
Figure 45 : Activités anticancéreuses de la chitine et du chitosane sur la lignée RD	83
Figure 46 : Activités anticancéreuses de la chitine de faible poids moléculaire et du chitosane oxydé sur la lignée RD	84
Figure 47 : Activités anticancéreuses du carboxyméthyle chitine, du « N,O carboxyméthyle chitosane » et de la « 2 phtalimido chitine » sur la lignée RD	85
Figure 48 : Activités anticancéreuses du « 2 phtalimido chitosane » et des chitooligosaccharides sur la lignée RD.	85
Figure 49 : Activités anticancéreuses de la « carboxychitine de faible poids moléculaire » et des « carboxy chitooligosaccharides » sur la croissance de la lignée RD.	86
Figure 50 : Activités anticancéreuses de la chitine, du chitosane et de la chitine de faible poids moléculaire sur la lignée THP-1.	88

Figure 51 : Activités anticancéreuses du chitosane oxydé et des « chitoooligosaccharides » sur la lignée THP-1	88
Figure 52 : Activités anticancéreuses de la carboxyméthyle chitine et du « N,O carboxyméthyle chitosane » sur la lignée THP-1.	89
Figure 53 : Activités anticancéreuses du « 2 phtalimido chitosane » et de la « 2 phtalimido chitine » sur la lignée THP-1	90
Figure 54 : Activités anticancéreuses des « carboxy chitoooligosaccharides » et de la « carboxy chitine de faible poids moléculaire » sur la lignée THP-1	90
Figure 55 : Résultats de l'électrophorèse des ADN extraits des cellules de la lignée cellulaire THP-1 traitées ou non avec de la chitine ou l'un de ses dérivés.	97
Figure 56 : Résultats de l'électrophorèse des ADNs extraits des cellules de la lignée cellulaire THP-1 traitées ou non avec du tampon de lyse, de la protéinase K, de la chitine de faible poids moléculaire et incubés à 56°C pendant 1 heure.	99
Figure 57 : Résultats de l'électrophorèse des ADNs extraits des cellules de la lignée cellulaire THP-1 traitées ou non avec de la chitine ou l'un de ses dérivés	100
Figure 58 : Effet de la chitine et de ses dérivés sur la croissance de <i>Leishmania infantum</i> LIPA 155/10	101
Figure 59 : Effet de la chitine et du chitosane sur la croissance de <i>Leishmania infantum</i> LIPA 137	102
Figure 60 : Effet de la chitine de faible poids moléculaire et du chitosane oxydé sur la croissance de <i>Leishmania infantum</i> LIPA 137	103
Figure 61 : Effet du chitosane oxydé (300µg/ml) sur la croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	104
Figure 62 : Effet du chitosane oxydé (300µg/ml) sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	105
Figure 63: Viscosimètre de type Ubbelohde	138
Figure 64 : Quadrillage de la cellule Malassez	152
Figure 65 : Quadrillage de la cellule de Thoma	152
Figure 66 : Corrélation dans le moyen infrarouge entre structure et $\bar{\nu}$ de vibration	156

Figure 67 : Principaux déplacements chimiques en ^1H RMN	158
Figure 68 : Principaux déplacements chimiques en ^{13}C RMN	159
Figure 69 : Chromatogramme HPAEC de la glucosamine	160
Figure 70: Courbe d'étalonnage pour le dosage de la méthode d'Elson et Morgan	161
Figure 71 : Courbe d'étalonnage de la coloration de Biuret effectuée avec de la peptone de caséine	162
Figure 72 : Cinétique de dégradation du glucuronane par la glucuronane lyase	162
Figure 73 : Courbe étalon de la dégradation par la cellulase	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II : Résultats de l'analyse des carapaces de la crevette blanche <i>Parapenaeus longirostris</i> (Lucas, 1846)	57
Tableau III : Résultats de l'analyse de la chitine	58
Tableau IV : Résultats de l'analyse du chitosane	62
Tableau V : Valeurs des CI_{50} de la chitine et de ses dérivés sur la lignée Hep-2	84
Tableau VI : Valeurs des CI_{50} de la chitine et de ses dérivés sur la lignée RD	89
Tableau VII: Valeurs des CI_{50} de la chitine et de ses dérivés sur la lignée THP-1	93
Tableau VIII: Poids moléculaires de la chitine et de ses dérivés identifiés	94
Tableau IX : Résultats de l'expérience de la lyse cellulaire en présence de chitine de faible poids moléculaire	100
Tableau X : Milieux de culture des tissus standards utilisés	132
Tableau XI: Milieu de culture Mueller-Hinton	134
Tableau XII : Déplacements chimiques des protons et carbones en RMN	158

INTRODUCTION

La thématique de cette étude s'inscrit dans la valorisation des coproduits de crustacés. Les coproduits marins désignent les parties (de poissons, céphalopodes, crustacés, etc.) issues d'un procédé de transformation pour la consommation humaine (filetage, éviscération, étêtage, pelage ou cuisson). Les coproduits de crustacés représentent plus de 60 % du poids frais. Ce volume constitue une ressource abondante de chitine. Ce polysaccharide constitue l'exosquelette des crustacés. Il est l'un des polymères les plus abondants sur Terre, à la fois dans le milieu terrestre et marin.

Le marché de la chitine et de son dérivé principal, le chitosane, est en pleine croissance. Ceci est principalement lié aux diverses activités biologiques de ces molécules et au fait qu'elles peuvent être utilisées pour diverses applications dans l'industrie biopharmaceutique, bio-alimentaire et comme ingrédient nutraceutique.

La chitine, une matière semblable à du plastique retrouvée dans la carapace des crustacés et des insectes.

La recherche s'intéresse de plus en plus à la chitine et ses dérivés. D'après les conclusions de ces publications, ces produits sont sous-exploités par rapport à leurs potentiels. De nombreux laboratoires s'investissent dans la mise au point de nouvelles applications, notamment dans le domaine médical. De plus, il existe un engouement pour les produits d'origine naturelle et de surcroît d'origine marine.

En effet, la production mondiale aquacole est en augmentation permanente. Selon les données de la FAO, en 2010, la production globale de crevettes était plus de 14 fois supérieure à celle du crabe et de l'araignée de mer et plus de 2300 fois supérieure à celle du homard et de la langouste. Ceci nous a donc incité à choisir la crevette comme déchet à valoriser pour l'extraction de la chitine.

La production mondiale de crevettes a quasiment triplé en l'espace d'une dizaine d'années. En 2010, près de 3,8 millions de tonnes métriques de crevettes ont été produites mondialement. La crevette la plus répandue sur les côtes algériennes, et qui a donc intéressé cette étude, est la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846).

La carapace des crevettes est constituée de chitine, protéines, lipides, pigments et composés aromatiques. La crevette contient 14-27% de chitine alors que les autres crustacés

en contiennent bien moins (le crabe est composé de 13-15% de chitine). La carapace de crevette est donc entièrement valorisable.

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés à valoriser la carapace des crevettes en exploitant la chitine présente au niveau de celle-ci. La chitine a pour avantages majeurs d'être non toxique et biodégradable, d'où une infinité d'applications dans le domaine pharmaceutique.

Le présent travail a pour objectif la synthèse de nouveaux médicaments anticancéreux, antibactériens et antiparasitaires sans ou avec très peu d'effets secondaires, rentables et contribuant à la protection de l'environnement. Ce travail s'effectue en trois phases principales que sont :

- ◆ la conception de nouvelles molécules basée sur les connaissances récentes ;
- ◆ la caractérisation de ces molécules et enfin ;
- ◆ l'évaluation biologique de ces nouveaux produits.

Les travaux de recherche de notre étude envisagent :

- ◆ de valoriser un déchet marin constitué par les carapaces de crevettes ;
- ◆ d'extraire la chitine à partir de ces carapaces par voie chimique ;
- ◆ de préparer, par voie chimique, un certain nombre de dérivés de la chitine : le chitosane, les chitooligosaccharides, les N acétyl chitooligosaccharides, le 2 phtalimido chitine, le 2 phtalimido chitosane, le O carboxyméthyle chitine, le N,O carboxyméthyle chitosane, les carboxy N acétyl chitooligosaccharides, les carboxy chitooligosaccharides, le chitosane oxydé, ainsi que les oligochitosanes oxydés,
- ◆ d'étudier l'activité biologique de la chitine et de ses dérivés représentée par les activités antitumorales, antiparasitaires et antibactériennes et ;
- ◆ d'étudier l'innocuité de la chitine et de ses dérivés vis-à-vis d'une lignée cellulaire humaine normale.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE DES CONNAISSANCES ACTUELLES

1- Chitine et dérivés

1.1- Chitine

La chitine est un produit naturel issu de la biomasse, particulièrement abondant dans les carapaces d'arthropodes (crevettes, crabes et coléoptères) et de céphalopodes, les toiles d'araignées et les parois cellulaires des champignons et levures (MINCEA *et al.*, 2012). Elle est, toutefois, absente chez les végétaux (SAGUEZ *et al.*, 2007). Elle a une structure cristalline et constitue un réseau de fibres organisées. Elle confère la rigidité et la résistance aux organismes qui en contiennent (MAJETI et KUMAR, 2000).

La chitine est un bio-polymère de haut poids moléculaire ($1,033 \times 10^6$ à $2,53 \times 10^6$ Da), non toxique et biodégradable. C'est après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature. De plus, la chitine est dotée de propriétés chimiques et biologiques exceptionnelles utilisables dans de nombreuses applications industrielles et médicales (JEON et KIM, 2000 (a) ; MAJETI et KUMAR, 2000).

1.1.1- Historique

La première description de la chitine a été faite par BRACONNOT, en 1811. En traitant des champignons avec une base forte diluée, il isola un produit qu'il nomma « fungine ». ODIER a découvert, en 1823, la même substance qu'il renomma « chitine » du grec « kheiton » signifiant tunique ou enveloppe. La composition chimique de la chitine (glucosamine et acide acétique) fut mise en évidence par LEBBERHOSE, en 1878, et confirmée par GILSON, en 1894 (KERKUT ET GILBERT, 1985).

1.1.2- Structure chimique

La chitine (**Figure 1**) est un copolymère constitué d'unités de répétition de deux sucres aminés : le D-glucosamine et le N-acétyl D-glucosamine, liés par des liaisons β -(1 \rightarrow 4) (**Figure 2**) (TAN et LEE, 2002).

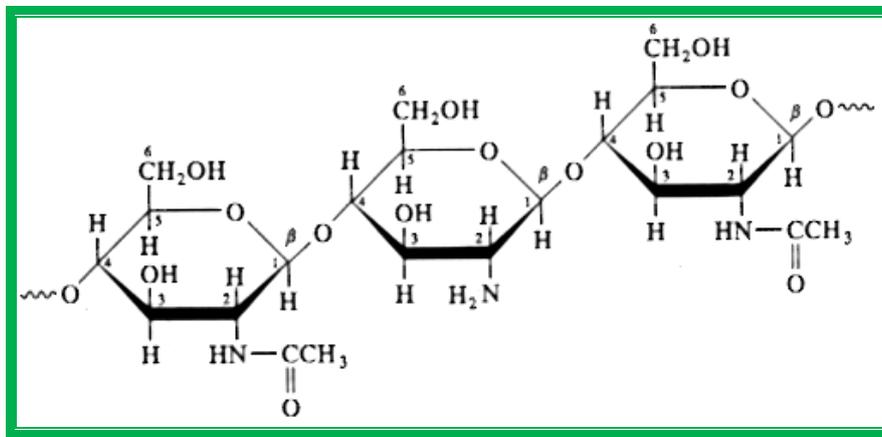


Figure 1 : Structure de la chitine

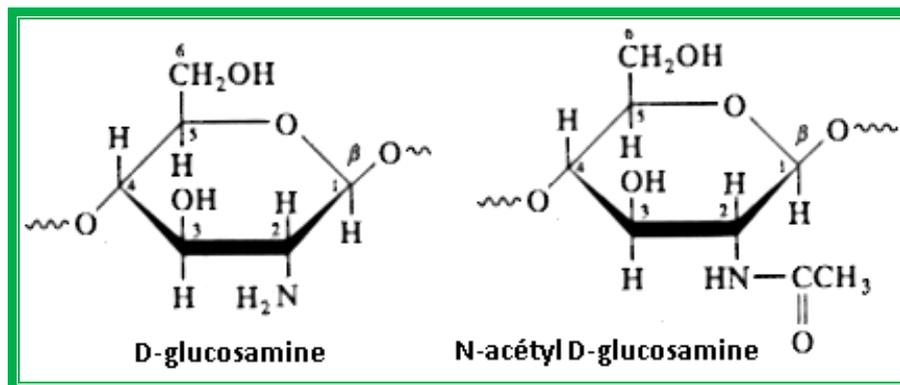


Figure 2 : Structures du D-glucosamine et du N-acétyl D-glucosamine

Les longues chaînes de chitine pouvant atteindre 500 monomères, prennent trois formes polymorphiques (**Figure 3**) qui peuvent être distinguées par RMN, Rayons X ou spectrophotométrie (**SUN *et al.*, 2006**) :

- ◆ La chitine α : C'est la forme la plus abondante, la plus stable et la plus rigide des trois, elle fut proposée par CARLSTROM (1957). Elle est formée de chaînes qui sont associées de manière antiparallèle (**FALINI *et al.*, 2003** ; **TABOADA *et al.*, 2003**) et est surtout retrouvée dans la paroi des crustacés, mollusques, insectes et champignons (**TABOADA *et al.*, 2003**). Généralement, la chitine est retrouvée à l'état liée à des protéines ou des composés inorganiques (**HAMODRAKAS *et al.*, 2002**; **TAN et LEE, 2002**).
- ◆ La chitine β : Elle est supposée être moins stable que la chitine α et est formée de chaînes parallèles (**FALINI *et al.*, 2003** ; **TABOADA *et al.*, 2003**). Flexible et résistante (**TAN et LEE, 2002**). Elle est retrouvée dans les crochets de calamars, dans les parois des diatomées et les tubes des pogonophores (**TABOADA *et al.*, 2003**).

- ◆ La chitine γ : Comparée aux chitines α et β , la chitine γ est plus rare. Elle est formée de chaînes parallèles et antiparallèles. Elle est flexible et résistante (TAN et LEE, 2002). La chitine γ est essentiellement retrouvée dans les cocons des insectes (TABOADA *et al.*, 2003) et la paroi intestinale des calamars (TAN et LEE, 2002).

Remarque : Les formes β et γ peuvent se changer en forme α après différents traitements (TABOADA *et al.*, 2003).

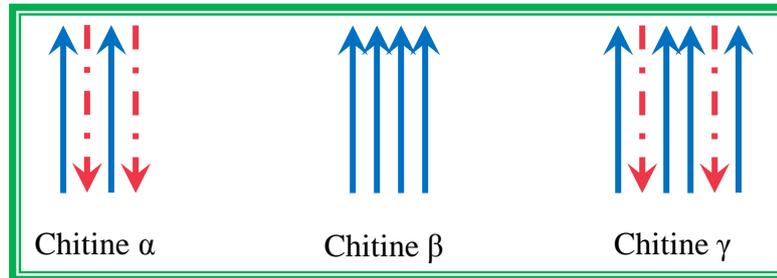


Figure 3 : Les différentes formes polymorphiques de la chitine

Les molécules de chitine ont une structure micro-fibrillaire hélicoïdale avec une configuration relativement rigide due à ses liaisons glycosidiques singulières. Par conséquent, la chitine forme facilement des films torsionnables et le matériau qui en résulte a de très bonnes propriétés mécaniques (TAN et LEE, 2002).

1.1.3- Solubilité de la chitine

A cause des fortes liaisons hydrogène intermoléculaires, la chitine a une affinité très limitée pour les solvants. La chitine α est insoluble dans la plupart des solvants. Elle est soluble dans le DMAc contenant 5-10% LiCl et quelques solvants fluorés tels que l'hexafluoroacétone et l'hexafluoro-2-propanol, et l'importance de cette solubilité varie selon la source de la chitine. Des mélanges de DMAc et NMP contenant 5-8% de LiCl sont fréquemment employés pour préparer des films. Le méthanol saturé avec du chlorure de calcium dihydraté (utilisé comme solvant pour les nylons) permet de solubiliser la chitine (AUSTIN, 1977 ; MAJETI et KUMAR, 2000 ; KURITA, 2001 ; MUZZARELLI *et al.*, 2004).

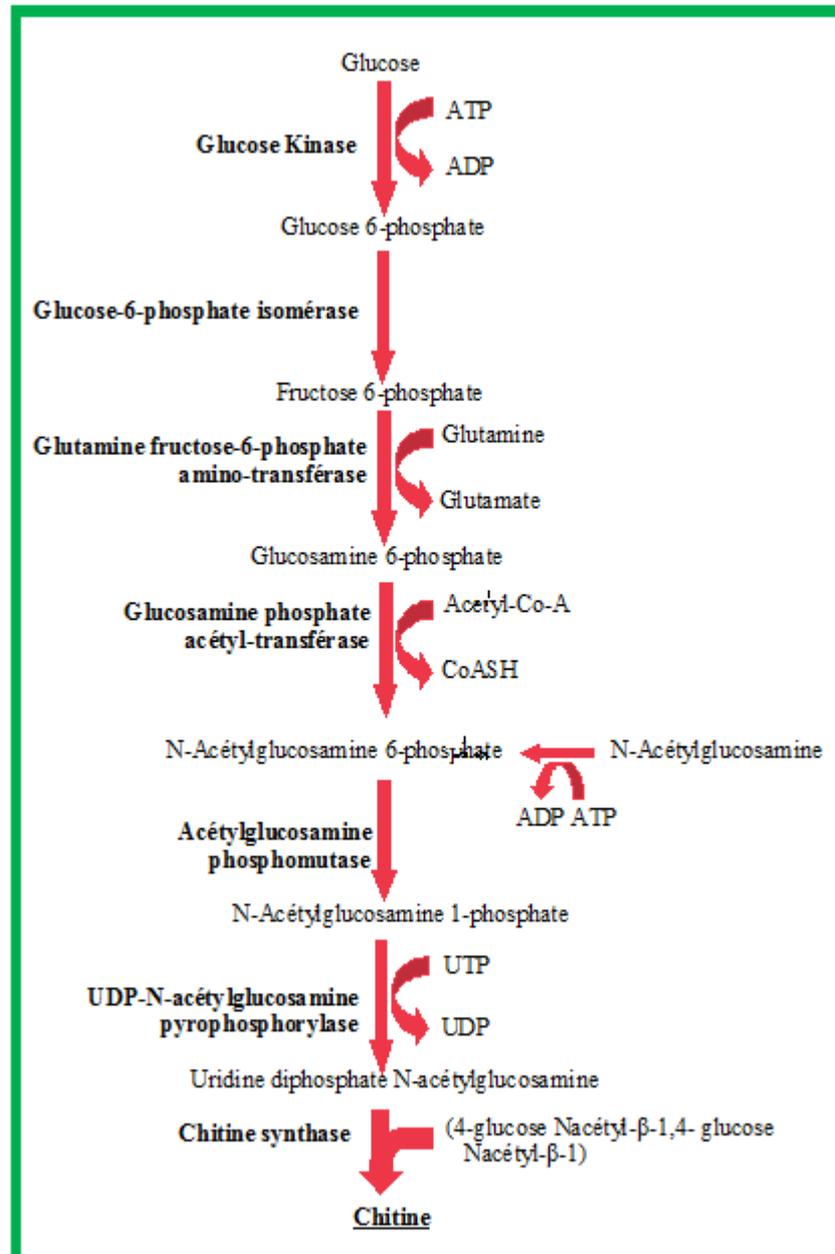
La chitine β , contrairement à la chitine α , est caractérisée par une grande affinité pour l'eau et les solvants organiques grâce à ses faibles liaisons hydrogène intermoléculaires. La chitine β est soluble dans l'acide formique (MAJETI et KUMAR, 2000 ; KURITA, 2001).

1.1.4- Biosynthèse de la chitine

La biosynthèse de la chitine est assurément une acquisition ancienne des êtres vivants : elle existe notamment chez les champignons inférieurs et supérieurs, les chlorophycées, les

protozoaires, etc. La figure 4 illustre la biosynthèse de la chitine selon **MANSENCAL (1999)**, **IMAI *et al.* (2003)** et **MERZENDORFER et ZIMOCH (2003)**.

Plusieurs recherches ont démontré que le glycogène peut être un précurseur de la biosynthèse de la chitine chez les crustacés (**KERKUT et GILBERT, 1985**).



*Figure 4 : Biosynthèse de la chitine (MANSENCAL, 1999 ; IMAI *et al.*, 2003 ; MERZENDORFER et ZIMOCH, 2003)*

1.1.5- Dégradation de la chitine

Plusieurs enzymes peuvent catalyser la réaction de biodégradation de la chitine :

- ◆ Les chitinases : Il s'agit d'un groupe d'enzymes ubiquitaires, que l'on peut retrouver chez les eucaryotes, procaryotes et les virus. Ces enzymes hydrolytiques sont capables de fragmenter la chitine en N-acétyl chitoooligosaccharides (chaînes de 3 à 10

monomères), diacétyl chitobioses et N-acétyl glucosamines. Il existe 2 sortes de chitinases :

- ⊙ Les endochitinases hydrolysent les ponts glycosidiques à l'intérieur du polymère.
 - ⊙ Les exochitinases ôtent le dernier résidu N-acétyl glucosamine à la terminaison non réductrice de la chitine.
- ◆ Les chitobiosidases : Elles libèrent des diacétyl chitobioses de l'extrémité non réductrice du polysaccharide.
 - ◆ Lysozyme : En plus de son action bactéricide, le lysozyme (mucopeptide N-acétyl muramoyl hydrolase) peut fragmenter aussi les chaînes chitineuses.

Le monomère *N*-acétylglucosamine ainsi obtenu peut être métabolisé pour générer de l'énergie, du CO₂, de l'H₂O et du NH₃ (**KERKUT et GILBERT, 1985 ; WARREN, 1996 ; COHEN-KUPIEC et CHET, 1998 ; ZHANG *et al.*, 1999 ; GUTOWSKA, 2002**).

L'action des différentes enzymes intervenant dans la dégradation de la chitine est illustrée sur la figure 5.

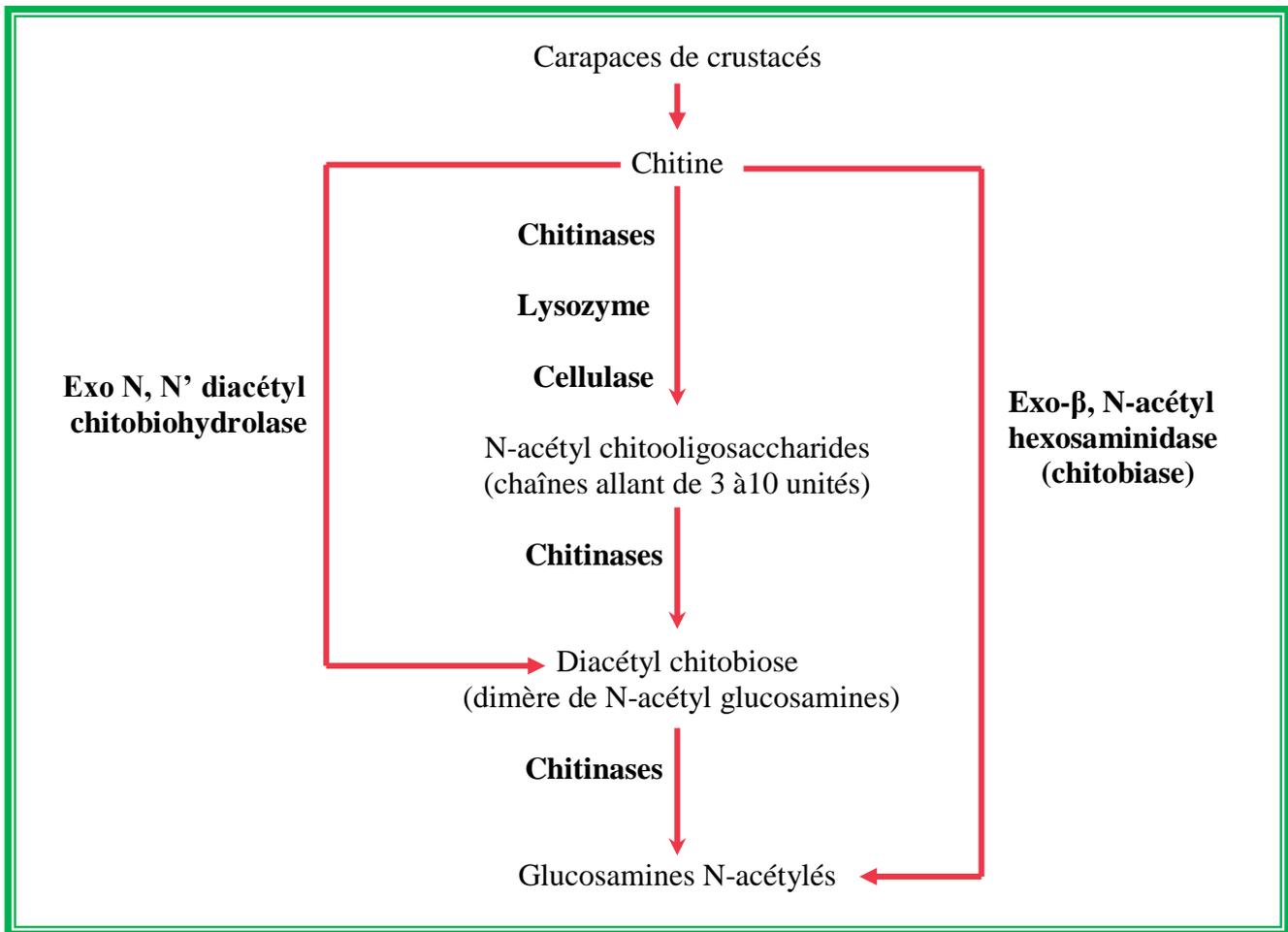


Figure 5 : Action des différentes enzymes sur la chitine (BRISON, 1971 ; SAGUEZ, 2002 ; HAKI et RAKSHIT, 2003)

La chitine peut aussi être dépolymérisée chimiquement en combinant l'effet de la chaleur à celle d'un acide fort concentré. Les monomères sont obtenus en augmentant le temps de l'hydrolyse (LOISELEUR, 1963). L'oxydation, les rayons UV, les ultrasons et l'irradiation sont aussi des méthodes alternatives pour obtenir des oligosaccharides (GAO *et al.*, 2012).

1.1.6. Préparation de la chitine

Dans la nature, la chitine est généralement associée à des protéines, des lipides, des pigments et des dépôts de calcium (Ca CO₃). Pour cela, la chitine doit être purifiée avant toute utilisation commerciale. Cette purification consiste en deux étapes majeures :

- ◆ La déminéralisation qui consiste en l'élimination des minéraux en utilisant un acide dilué ;

- ◆ La déprotéinisation qui est la séparation des protéines moyennant une base diluée ou des enzymes protéolytiques.

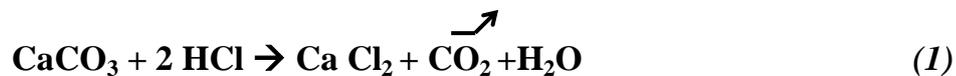
D'autres étapes facultatives, dépendant de la spécification d'utilisation du produit fini, peuvent être rajoutées aux étapes précédentes, telle que la décoloration pour éliminer les pigments en utilisant de l'acétone ou du peroxyde d'hydrogène (TAN et LEE, 2002).

Il existe deux méthodes pour produire de la chitine : la méthode chimique et la méthode biologique.

1.1.6.1- Méthode chimique

La méthode chimique consiste en :

◆ Une déminéralisation qui est effectuée par extraction des minéraux contenus dans les carapaces avec de l'HCl dilué et à température ambiante. 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 (1) :



Le processus de déminéralisation ne dépasse pas, en général, 2 à 3 heures lorsqu'il est effectué avec une bonne agitation. Les études ont démontré que le degré de déminéralisation dépend étroitement de la concentration de l'acide utilisé. En général, la quantité d'acide utilisée, pour assurer une réaction complète, doit être stoïchiométriquement égale ou supérieure à la quantité de minéraux présents dans la carapace (TAN et LEE, 2002).

◆ Une déprotéinisation : Dans ce cas, les protéines sont extraites des carapaces par traitement avec de l'hydroxyde de sodium dilué à des températures élevées (65°C à 100°C). Le temps de réaction usuel est de 30 minutes à 6 heures, selon la méthode de préparation utilisée. Un traitement alcalin prolongé sous des conditions sévères entraîne une dépolymérisation et une désacétylation (TAN et LEE, 2002).

1.1.6.2- Méthode biologique

L'intérêt croissant à trouver des méthodes alternatives pour l'extraction de la chitine, pouvant maximiser l'utilisation des carapaces tout en préservant l'environnement, a conduit à l'utilisation d'enzymes protéolytiques et de bactéries protéolytiques pour éliminer une grande partie des protéines liées à la chitine. Certains auteurs ont proposé une méthode toute simple d'acidification par des bactéries lactiques. Ce processus fait apparaître deux fractions: la première liquide contenant des protéines, des minéraux et de l'asthaxanthine (pigment des crevettes) et la seconde solide formée de chitine (TAN et LEE, 2002 ; YANG *et al.*, 2000).

Lors de la fermentation des déchets de carapaces en présence de bactéries lactiques dans un milieu de culture adéquat, il y a production d'acide lactique ainsi que différentes protéases (RAO *et al.*, 2000). L'acide lactique, produit par catabolisme de la source de carbone, va créer un milieu à faible pH qui va inhiber la croissance des autres microorganismes du déchet. Le carbonate de calcium, lié à la chitine, est éliminé en réagissant avec l'acide lactique, formant du lactate de calcium qui précipite et qui pourra donc être éliminé par un simple lavage (TAN et LEE, 2002). La déprotéinisation est due à des bactéries présentes dans le système intestinal des crustacés, à des enzymes protéolytiques produites par les bactéries lactiques additionnées aux protéases présentes dans le déchet (RAO *et al.*, 2000).

1.2- Dérivés de la chitine

1.2.1- Chitosane

Le chitosane (Figure 6) est un polymère cationique dérivé de la chitine. Le chitosane et la chitine sont tous les deux des copolymères de même structure chimique globale et ne se distinguent que par la proportion relative des unités glucosamines et N-acétyl glucosamines les constituant, c'est à dire leurs degrés de désacétylation (DD) ou leurs degrés d'acétylation (DA). Le DD étant le pourcentage de groupements amines dans le polysaccharide, comme le montre l'expression (2).

$$DA = 100\% - DD \quad (2)$$

Ainsi, le chitosane possède un $DD > 56\%$ et donc un $DA \leq 44\%$, alors que la chitine a un $DD \leq 44\%$ et un $DA > 56\%$. Ces données dépendent de la source du produit et de sa méthode d'extraction (FERNANDEZ-KIM, 2004).

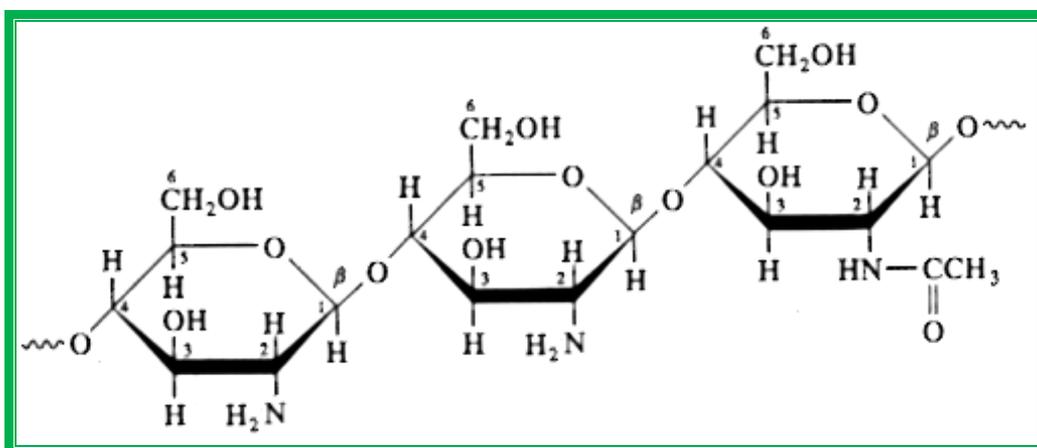


Figure 6 : Structure du chitosane

Il existe plusieurs méthodes pour la détermination du degré de désacétylation du chitosane, dont :

- ◆ Le test à la ninhydrine
- ◆ La titration potentiométrique linéaire

- ◆ La spectroscopie infrarouge
- ◆ La chromatographie en phase gazeuse
- ◆ La gel perméation
- ◆ La spectroscopie ¹H-NMR
- ◆ L'hydrolyse acide
- ◆ La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)
- ◆ La spectroscopie à résonance magnétique
- ◆ La titrimétrie au bromure d'hydrogène
- ◆ La spectroscopie dérivée de l'UV (**NIOLA *et al.*, 1993 ; VARUM *et al.*, 1995 ; MUZZARELLI, 1998 ; PROCHAZKOVA *et al.*, 1999 ; MAJETI *et* KUMAR, 2000 ; LAVERTU *et al.*, 2003 ; FERNANDEZ-KIM, 2004**).

La méthode la plus fréquemment utilisée, pour l'estimation du DD du chitosane, est la spectroscopie IR. Celle-ci fut proposée pour la première fois par MOORE et ROBERTS en 1980. Ses avantages majeurs sont sa rapidité et sa non-exigence vis-à-vis de la pureté de l'échantillon à analyser. Le DD est calculé grâce à l'équation (3) (**KHAN *et al.*, 2002 ; FERNANDEZ-KIM, 2004**).

$$\text{DD} = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33] \quad (3)$$

A₁₆₅₅ et A₃₄₅₀ étant les absorbances aux longueurs d'ondes 1655 et 3450, respectivement.

Les deux avantages majeurs du chitosane par rapport à la chitine sont sa solubilité et l'existence de groupements amines. Ces derniers jouent le rôle de 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**).

1.2.1.1- Historique

Le chitosane est isolé et identifié pour la première fois sous le nom de «chitine modifiée », en 1859 par ROUGET qui, après avoir soumis la chitine à un traitement basique sous reflux avec une solution concentrée d'hydroxyde de potassium, trouve que le produit ainsi obtenu possède des caractéristiques physico-chimiques bien différentes du polymère naturel dont il est issu. Trente-cinq ans plus tard, HOPPE-SEYLER décrit une procédure permettant d'obtenir, par chauffage à 180°C de chitine d'origine animale (carapace de crabes, scorpions et araignées), un produit soluble dans l'acide acétique dilué, qu'il n'identifie pas

comme étant la « chitine modifiée » découverte par ROUGET et crée alors le terme de chitosane. Ce n'est qu'au siècle suivant (1934) qu'une procédure de fabrication de chitosane, à partir de la chitine, est décrite par RIGBY dans un brevet (**HENNEN, 1996 ; FELT, 1999**).

1.2.1.2- Obtention du chitosane

Rare dans la nature, le chitosane est toutefois présent en tant que composant de la paroi cellulaire de champignons (contrairement aux levures qui sont riches en chitine), tels que *Phycomyces blakesleanus* et *Mucor rouxii*, ainsi que chez certains arthropodes et insectes, comme dans la paroi abdominale des reines termites (**AL-BASSAM et al., 1986 ; SENG, 1988 ; FELT, 1999**). La majorité des chitosanes commercialisés proviennent de la désacétylation alcaline de la chitine, abondamment présente dans la nature.

La désacétylation peut se faire par voie chimique en utilisant une base forte concentrée à haute température ou par action de la désacétylase. Les conditions peuvent être homogènes ou hétérogènes. Une autre méthode moins usitée consiste en l'acétylation partielle de chitosanes pour obtenir d'autres chitosanes (**FELT, 1999**).

1.2.1.3- Solubilité du chitosane

La solubilité du chitosane est l'un de ses avantages majeurs par rapport à la chitine (soluble que dans des solvants très toxiques). Bien qu'il soit insoluble dans l'eau et les solvants organiques, ce polyamine est soluble dans les acides aqueux dilués. Il est soluble dans l'acide chlorhydrique et les acides organiques aqueux tels que l'acide formique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide lactique. L'efficacité de la solubilité dépend de l'acide utilisé et de sa concentration. La solubilité diminue avec l'augmentation de la concentration de l'acide, et les solutions aqueuses de quelques acides, tels que l'acide phosphorique, l'acide sulfurique, l'acide citrique et l'acide sébacique, semblent être de piètres solvants pour le chitosane (**KURITA, 2001**).

Il existe plusieurs facteurs agissant sur la solubilité du chitosane, tels que la température et le temps de réaction de la désacétylation, la concentration en base, les traitements antérieurs appliqués à l'isolation de la chitine, le rapport chitine/base et la taille des particules.

A pH 7,0, la stabilité de la solubilité du chitosane est médiocre. A pH élevé, le chitosane tend à précipiter ou à former un gel. Des complexes polyioniques entre le chitosane et les hydrocolloïdes anioniques résultent de la formation du gel (**FELT, 1999**).

Le chitosane solubilisé peut être régénéré ou solidifié grâce à un coagulant. Le choix du coagulant dépend du solvant utilisé pour la solubilisation du chitosane (**MAJETI et KUMAR, 2000**).

1.2.1.4- Poids moléculaire

Le chitosane est un bio-polymère de haut poids moléculaire (10 - 250 kDa) (**MAJETI et KUMAR, 2000**).

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 chitosane induisant la diminution du poids moléculaire (**FELT, 1999**).

Le poids moléculaire du chitosane peut être déterminé par chromatographie ou viscosimétrie (**FELT, 1999 ; MAJETI et KUMAR, 2000**).

1.2.1.5- Viscosité du chitosane

La viscosité est un facteur important dans la détermination du poids moléculaire du chitosane et la détermination de ses applications commerciales dans des environnements biologiques complexes telle que l'alimentation. Les chitosanes de haut poids moléculaires rendent les solutions très visqueuses, ce qui est un inconvénient pour la maintenance industrielle.

Différents facteurs agissant lors de la désacétylation tels que 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 (**FELT, 1999**).

L'effet de la taille des particules a été étudié par plusieurs auteurs. Certains auteurs ont démontré que les petites particules (1 mm) donnent lieu à un chitosane dont la viscosité et le poids moléculaire sont nettement supérieurs à ceux d'un chitosane issu de particules de taille 2 ou 6,4 mm. Ils ont aussi prouvé que les grandes particules exigent un temps de réaction de désacétylation plus long. En revanche, il a été démontré qu'une chitine de dimension 20-80 mesh (0,177-0,841 mm) n'affecte nullement la viscosité des solutions de chitosane (**FELT, 1999**).

Il est possible de calculer le poids moléculaire à partir de la viscosité du chitosane, dans une solution à 0,2M d'acide acétique et 0,3M d'acétate de sodium, en employant l'équation (4) de Mark-Houwink (**MIRZADEH et al., 2002**).

$$[\eta] = KM^a = 1,81 \times 10^{-3} M^{0,93} \quad (4)$$

Avec :

$[\eta]$: viscosité intrinsèque.

M : La masse molaire.

K et α : constantes.

1.2.2- Oligomères de la chitine et du chitosane

L'hydrolyse de la chitine et du chitosane, par voie chimique (acide et haute température) ou enzymatique, génère des oligosaccharides, comme l'illustre la figure 7. Les N-acétyl chitooligosaccharides (oligosaccharides provenant de la dépolymérisation de la chitine) sont constitués de chaînes linéaires contenant 2 à 10 unités de N-acétyl glucosamine et éventuellement de glucosamine. De même, les chitooligosaccharides (oligosaccharides provenant de la dépolymérisation du chitosane) sont constitués de chaînes linéaires contenant 2 à 10 unités de glucosamine et éventuellement N-acétyl glucosamine.

L'avantage des oligosaccharides par rapport à la chitine et le chitosane réside dans le fait qu'ils soient hydrosolubles (SENG, 1988). Les oligomères de la chitine et du chitosane ont suscité beaucoup d'intérêts ces dernières années (CHANG *et al.*, 2000 ; JEON et KIM, 2000 (a) ; JEON et KIM, 2000 (b) ; JEON *et al.*, 2001 ; NAKAKUKI, 2002 ; NO *et al.*, 2002).

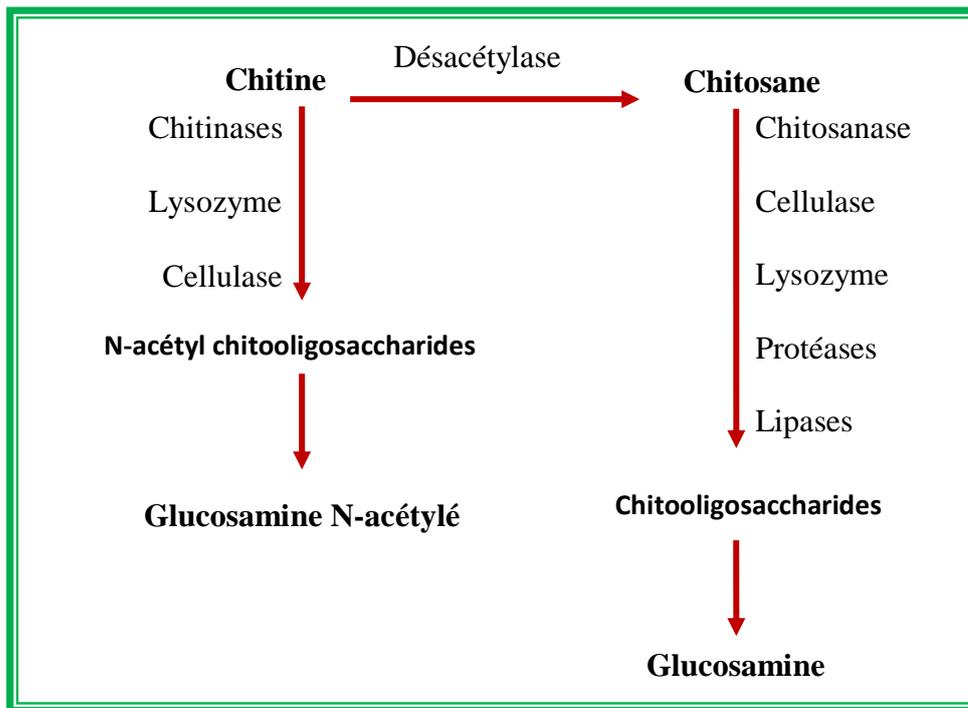


Figure 7 : Hydrolyse enzymatique de la chitine et du chitosane (KERKUT et GILBERT, 1985 ; YAKU *et al.*, 1990 ; COHEN-KUPIEC et CHET, 1998 ; JEON et KIM, 2000 (b); MUZZARELLI *et al.*, 2002)

L'hydrolyse acide de la chitine sous des conditions drastiques produit des D-glucosamines relativement pures (MAJETI et KUMAR, 2000).

Le passage de la forme acétylée à la forme désacétylée des oligomères se fait par voie chimique ou enzymatique (TOKUYASU *et al.*, 2000).

1.2.2.2- 2-phtalimido chitine et 2-phtalimido chitosane

Le 2-phtalimido chitine (Figure 8) et le 2-phtalimido chitosane (Figure 9) sont obtenus après adjonction du groupement phtalimide en position 2 (BAUMANN et FAUST 2001 ; BAUMANN *et al.*, 2003).

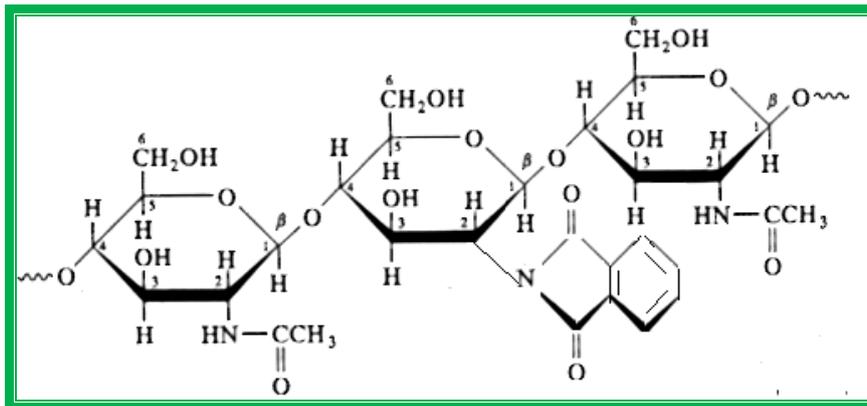


Figure 8 : Structure de la 2-phtalimido chitine

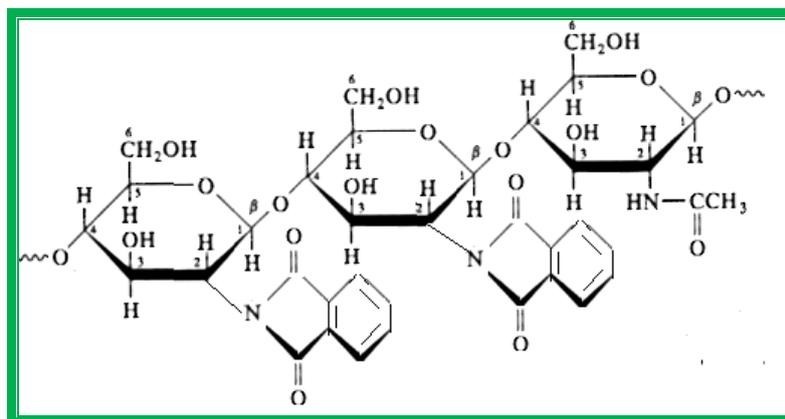


Figure 9: Structure du 2-phtalimido chitosane

1.2.2.3- O-carboxyméthyle chitine et N,O-carboxyméthyle chitosane

Au niveau de la chitine, l'adjonction du groupement carboxyméthyle au niveau de la position 6 génère le O-carboxyméthyle chitine. La structure du O-carboxyméthyle chitine est représentée sur la figure 10 (MUZZARELLI, 1988).

Au niveau du chitosane, l'adjonction du groupement carboxyméthyl au niveau des positions 2 et 6 génère le N,O-carboxyméthyl chitosane (**Figure 11**) (**MUZZARELLI, 1988**).

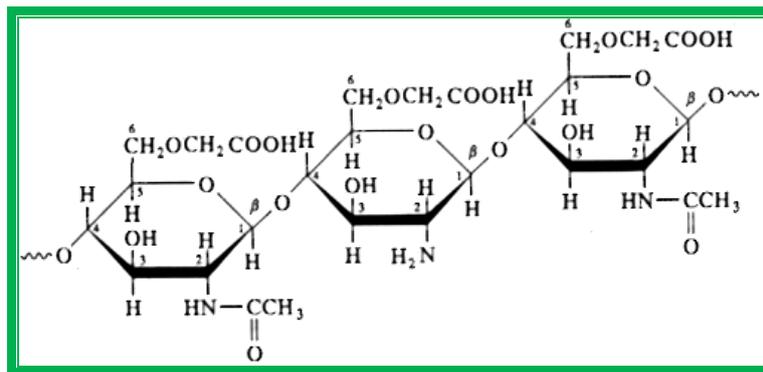


Figure 10 : Structure du O-carboxyméthyle chitine

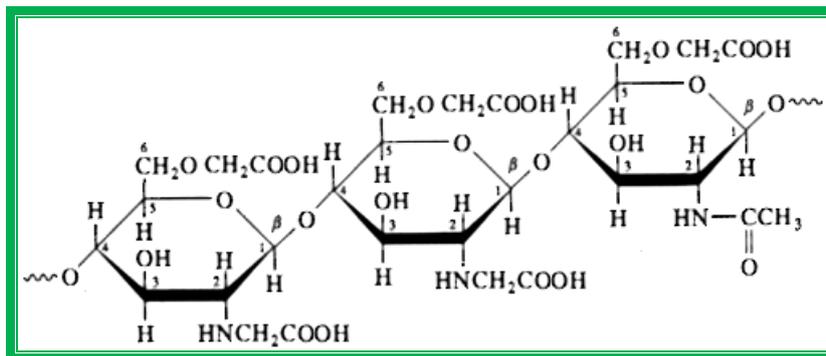


Figure 11 : Structure du N,O-carboxyméthyle chitosane

1.2.2.4- Carboxy N-acétyl-chitoooligosaccharides et carboxy chitoooligosaccharides

La carboxylation des N-acétyl-chitoooligosaccharides et des chitoooligosaccharides en position 2 génère les carboxy N-acétyl-chitoooligosaccharides et carboxy chitoooligosaccharides, respectivement. Les structures des carboxy N-acétyl-chitoooligosaccharides et des carboxy chitoooligosaccharides sont représentées par les figures 12 et 13, respectivement (**RAJAPAKSE et al., 2006**).

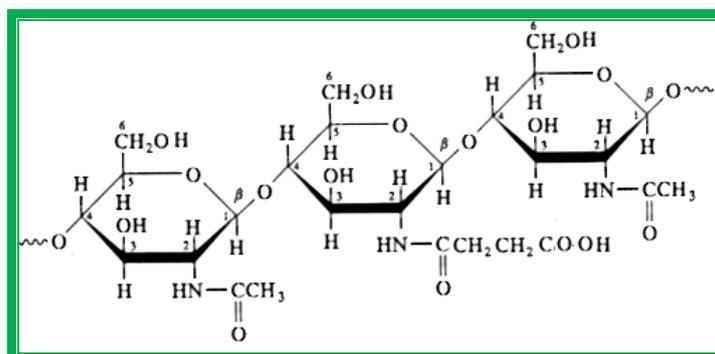


Figure 12 : Structure des carboxy N-acétyl-chitoooligosaccharides

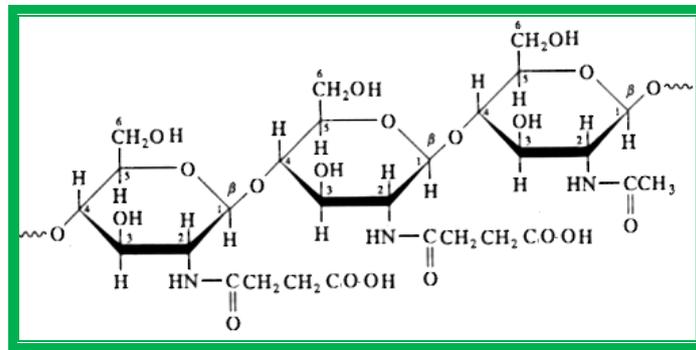


Figure 13 : Structure des carboxy chito-oligosaccharides

1.2.2.5- Chitosane oxydé

L'oxydation du chitosane en position 6 génère le chitosane oxydé (Figure 14) (YOO *et al.*, 2005).

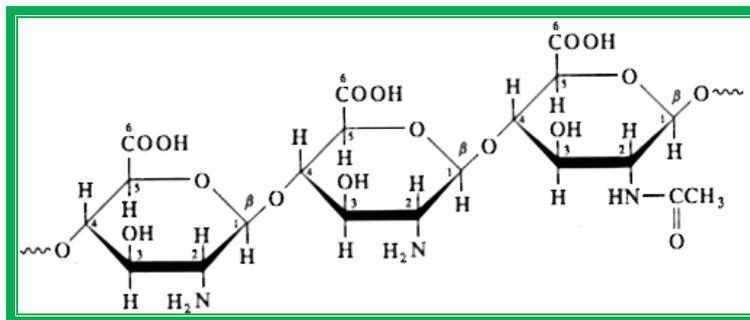


Figure 14 : Structure du chitosane oxydé

1.2.2.6- Oligochitosanes oxydés

L'hydrolyse du chitosane oxydé génère les oligochitosanes oxydés (Figure 15) (YOO *et al.*, 2005).

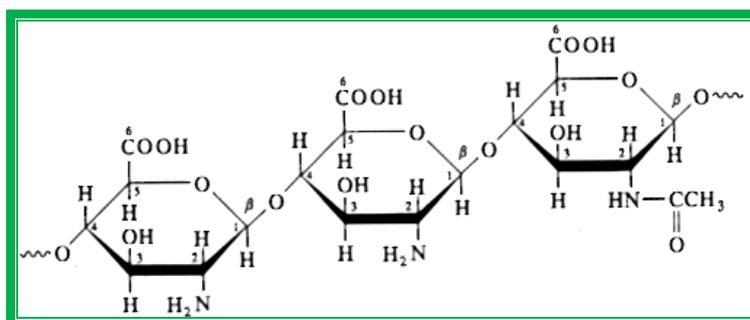


Figure 15 : Structure des oligochitosanes oxydés

1.3- Applications de la chitine et de ses dérivés

La chitine et le chitosane ont la particularité d'être des polysaccharides très basiques contrairement à la plupart des polysaccharides naturels, tels que la cellulose, le dextran, la pectine, l'acide alginique, l'agar, l'agarose et les carragenanes, qui sont neutres ou acides. Cette singularité a été utilisée dans plusieurs applications (**MAJETI et KUMAR, 2000**).

1.3.1- Applications biomédicales

La chitine et le chitosane sont des biopolymères naturels ne possédant aucun caractère antigénique et de ce fait sont parfaitement compatibles avec les tissus vivants. Leur caractère antithrombogène et hémostatique confirme leur possibilité d'emploi dans tous les domaines de la biologie (**CHUNG *et al.*, 2004**). De plus, la chitine et le chitosane sont biodégradables. Des enzymes, la chitinase et la chitosanase, scindent ces biopolymères en oligomères, qui seront pris en charge par le métabolisme (**CHUNG *et al.*, 2004**).

1.3.1.1- Traitement du cancer

La chitine et le chitosane conjugués au 5-fluoro-uracyl ont pu démontrer une grande activité antitumorale. La chitine et le chitosane conjugués sont beaucoup plus efficaces et diminuent les effets secondaires du 5-fluoro-uracyl seul (**FELSE et PANDA, 1999**). Le chitosane « soluble dans l'eau » est connu comme étant un agent anticancéreux (**TAN et LEE, 2002**).

L'hexa-N-acétyl chitohexaose ((GlcNAc)₆) et l'hexachitohexaose ((GlcN)₆) possèdent des propriétés antitumorales et immuno-activatrices (**CHANG *et al.*, 2000 ; CHUNG *et al.*, 2004 ; JEON *et al.*, 2000 ; SHAHIDI *et al.*, 1999**).

1.3.1.2- Rétention du calcium et diminution du cholestérol

Le chitosane est capable de piéger les lipides à leur pH d'insolubilisation dans le tube digestif. Administré à des rats, le chitosane diminue de façon significative le taux de cholestérol dans le sang (**JEON *et al.*, 2000**).

Les oligomères du chitosane (de 3 à 7 monomères) augmentent la rétention du calcium dans l'organisme contrairement au chitosane qui diminue l'absorption du calcium et autres minéraux (**JEON *et al.*, 2000**). Le chitosane a démontré qu'il est capable de diminuer le taux de cholestérol sanguin (**ANDRADE *et al.*, 2003**).

1.3.1.3- Distribution de médicaments dans l'organisme et élimination des effets secondaires des médicaments

La carboxyméthylation de la chitine sur le groupement hydroxyl du C-6 des résidus N-acétyl glucosamine augmente considérablement la biodégradabilité et la solubilité de la chitine dans l'eau. Ceci va permettre à la chitine d'être utilisée comme transporteur de médicaments dans l'organisme. Les systèmes d'acheminement de médicaments utilisant la chitine sont utilisés pour contrôler la libération des médicaments au moment et à l'endroit spécifique. Le carboxyméthyle chitine est utilisé, entre autre, comme transporteur de la méthaphétamine dans les injections sous-cutanées (**FELSE et PANDA, 1999 ; QAQICH et AMIJI, 1999 ; CHENITE *et al.*, 2001 ; ROLLAND et MUMPER, 2001 ; ILLUM et CHATFIELD, 2002 ; PAYET *et al.*, 2002 ; GOGEV *et al.*, 2003 ; SÄKKINEN, 2003**). Lors de la prise de certains médicaments, il y a perturbation des propriétés des mucines. Ces molécules, protectrices des voies respiratoires, reproductives et gastro-intestinales, maintiennent leurs propriétés en interagissant avec le chitosane (**DEACON *et al.*, 1999**).

1.3.1.4- Activation immunologique

La chitine, le chitosane et leurs oligomères ont des propriétés immunologiques. Ils n'ont aucun comportement antigénique. Ils se comportent comme un activateur typique de cellules B polyclonales (**SENG, 1988 ; BENESCH et TENGVALL, 2002 ; KONNO *et al.*, 2002 ; RUEL-GARIEPY *et al.*, 2002**).

1.3.1.5- Traitement des brûlures, des ulcères et cicatrisation des plaies

Le chitosane forme des films perméables à l'air. Il favorise la régénération cellulaire tout en protégeant les tissus des agressions microbiennes. On a reconnu, de plus, au chitosane une activité biostimulante de la reconstitution de tissus. Cette propriété a permis la fabrication d'une peau artificielle utilisée pour les greffes des grands brûlés et des applications en chirurgie comme les fils de suture en chitine (**FELSE et PANDA, 1999**).

La chitine et ses dérivés ont un effet accélérateur de la cicatrisation des plaies car ils possèdent des propriétés d'activateurs cellulaires et d'attachement aux cellules (**TAN et LEE, 2002**). Le chitosane possède aussi la capacité de traiter les brûlures. Il forme des films résistants, biocompatibles qui absorbent l'eau. Ces films peuvent être formés directement sur la brûlure par application d'une solution aqueuse d'acétate de chitosane, qui procure un effet rafraîchissant apaisant lors de son application. La chitine et le chitosane possède aussi un effet analgésique. Ces films ont pour avantage, aussi, d'être très perméables à l'oxygène, ce qui évite l'étouffement des tissus blessés. Ces films sont naturellement dégradés par les enzymes du corps d'où l'élimination de la contrainte de décoller le film appliqué à une brûlure

(AUSTIN *et al.*, 1981 ; COLLOMBEL *et al.*, 1992 ; DROHAN *et al.*, 2000 ; OESTER *et al.*, 2002 ; OKAMOTO *et al.*, 2002).

Le chitosane est aussi connu pour son efficacité contre les ulcères (XIE *et al.*, 2001).

1.3.2- Applications environnementales et contrôle de la pollution

1.3.2.1- Elimination des métaux lourds, teintures, nitrates et déchets radioactifs et la récupération des métaux précieux

Grâce à leurs grands pourcentages en azote (6,89 %), la chitine et ses dérivés sont des agents remarquables de chélation (MAJETI et KUMAR, 2000). Le chitosane est utilisé pour le piégeage des métaux lourds et l'épuration des eaux usées (JEON *et al.*, 2000).

Des bio-adsorbants naturels et abondants tels que la chitine et ses dérivés sont appliqués avec un grand succès pour l'élimination des traces de métaux lourds, teintures, nitrates et déchets radioactifs. L'efficacité de l'utilisation du chitosane pour éliminer le plomb et le cadmium dans l'eau potable a été démontrée. Le chitosane issu des carapaces de crabe est efficace pour le traitement des effluents des industries métalliques. A titre d'exemple, sa capacité d'adsorption du chromium hexavalent est de 90% (ANNADURAI *et al.*, 1999 ; HARDINGE-LYME, 2001 ; JAAFARI *et al.*, 2001 ; DIVAKARAN et PILLAI, 2002 ; PLANAS, 2002 ; TAN et LEE, 2002 ; SKORIK *et al.*, 2010).

La chitine et le chitosane sont utilisés pour l'élimination des teintures des effluents de la peinture domestique. Le processus d'élimination de la teinture opère en adsorbant les teintures à travers un mécanisme d'échange d'ions. Les particules de chitine sont très efficaces pour l'élimination des teintures phénoliques. Des études ont démontré que les particules de chitine adsorbent 2,45 fois plus de teintures que les sols minéraux habituellement utilisés (ANNADURAI *et al.*, 1999 ; TAN et LEE, 2002).

Le chitosane peut être utilisé pour l'adsorption de l'uranium des effluents nucléaires. Les sites carboxyliques agissent directement dans l'échange d'ions avec les ions uranyl alors que les sites amines du chitosane les adsorbent (FELSE et PANDA, 1999).

Le chitosane est aussi utilisé pour récupérer des métaux précieux (PLANAS, 2002).

1.3.2.2-Traitement de l'eau de rejet

Le chitosane est bien connu comme flocculant pour les particules en suspension, ce qui le rend idéal pour le traitement de l'eau de rejet. Il n'est pas surprenant de voir que l'une des principales utilisations du chitosane est « agent de floculation » pour la clarification des

effluents industriels, incluant les boues des brasseries, les eaux usées et beaucoup d'autres. Environ 85 % du chitosane produit au Japon est utilisé pour le traitement des eaux de rejets d'industries agroalimentaires (TAN et LEE, 2002).

1.3.3- Applications à l'industrie alimentaire

Dans les industries alimentaires, les polysaccharides sont communément utilisés pour modifier ou contrôler les propriétés fonctionnelles des aliments. Ils sont incorporés dans les aliments en tant qu'agents gélifiants, agents de texture, agents de conservation ou comme agents déshydratants (ROLLER et COVILL, 1999 ; TAN et LEE, 2002). Les chitooligosaccharides et le chitosane sont utilisés comme agents de floculation et de clarification des aliments (FERNANDEZ et FOX, 1997 ; ANDRADE *et al.*, 2003). Le chitosane possède un autre rôle dans l'aliment qui est d'inhiber la croissance des microorganismes (DALY et MANUSZAC-GUERRINI, 2001). Les recherches tentent aujourd'hui d'introduire la chitine et/ou ses dérivés dans les applications à la préservation de la viande (JEON *et al.*, 2000).

Le N-acétyl glucosamine peut être utilisé comme « Single Cell Protein ». Il est une source de carbone pour la levure *Pichia kudriadezii*. La biomasse qui en résulte constitue une source de protéines pour l'alimentation animale (COSIO *et al.*, 1982 ; SENG, 1988).

La chitine est, elle aussi, utilisée dans l'alimentation des crevettes pour augmenter leurs croissances (SHIAU et YU, 1998).

1.3.4- Applications à l'agriculture

La chitine et le chitosane ont trois applications potentielles dans l'agriculture : comme agent antimicrobien, comme nématocide ou comme engrais (HALLMANN *et al.*, 1998). Le chitosane peut augmenter le pourcentage des récoltes de 50% (TAN et LEE, 2002 ; ANDRADE *et al.*, 2003). Il sert de conservateur, en formant un film protecteurs, pour les fruits (FARBER *et al.*, 2003). Les chitooligosaccharides et les N-acétyl chitooligosaccharides inhibent la croissance des champignons et des bactéries phytopathogènes (CHANG, *et al.*, 2000).

Les chitooligosaccharides et les N-acétyl chitooligosaccharides ont aussi le potentiel d'activer le mécanisme de défense chez les plantes : Ils activent la production de pisatine, de chitinases et de phytoaléxine. Ils interviennent dans la réponse mitotique et les activités chimiotactiques des cellules animales. Ils influencent l'organogenèse des plantes à des concentrations nanomolaires (BAKKER, *et al.*, 1997 ; CHANG *et al.*, 2000 ; TAKESHI *et al.*, 2000).

1.3.5- Autres applications

Dans l'industrie cosmétique, la chitine et le chitosane peuvent être utilisés comme agents hydratants dans différents produits tels que les vernis à ongles, les lotions pour le corps ou les crèmes pour les mains (**FELSE et PANDA, 1999 ; ROLLER et COVILL, 1999**). Les dérivés de la chitine sont utilisés pour assouplir les cheveux (**RINAUDO, 2006**).

La chitine est employée comme un additif dans l'industrie papetière (**FELSE et PANDA, 1999**).

La chitine et le chitosane ont, aussi, servi à la fabrication de membranes semi-perméables et de résines pour colonnes chromatographiques (**SHEPERD *et al.*, 1997; TAN et LEE, 2002**).

Le chitosane est utilisé comme support de chromatographie (**JEON *et al.*, 2000**).

La chitine et ses dérivés peuvent être employés pour séparer les protéines par adsorption grâce à la capacité de la chitine à adsorber des protéines par des liaisons non covalentes, des forces de Van Der Waals ou des liaisons hydrogène. Les protéines peuvent être ensuite relarguées par des produits chimiques (**TAN et LEE, 2002**).

La chitine et le chitosane peuvent être utilisés pour immobiliser des cellules ou des enzymes (**TSUKADA *et al.*, 2000 ; JUANG *et al.*, 2002 ; LU *et al.*, 2010**).

La chitine et ses dérivés peuvent être utilisés pour produire des lentilles de contact jetables (**GREGORY *et al.*, 2008**).

La chitine peut être utilisée pour encapsuler des acides aminés et servir ainsi de suppléments nutritifs pour les crevettes (**BAIN, 1998**).

Les films de poly(vinyl-alcool) chitosane présentent de bonnes résistance mécanique, stabilité et capacité d'élongation (**NAKANO, 2007**).

Les dérivés de la chitine sont reconnus pour être des composés anti-hypertenseurs et antidiabétiques (**KIM, 2010**).

1.4- Limites et risques d'allergies

Le risque d'allergie reste un sujet de polémique. Certains auteurs, dont MUZZARELI, revendiquent l'innocuité des compléments à base de dérivés de la chitine (**MUZZARELI, 2010**). D'autres décrivent le rôle du chitosane contre les inflammations liées aux réactions allergiques et à l'asthme (**BRINCHMANN *et al.*, 2011**). Il y a aussi ceux qui accusent les

procédés de fabrication et le degré de purification de la chitine. En effet, les allergènes incriminés seraient des agents chimiques tels que les métabisulfites, des amines biogènes ou des résidus protéiques tels que la trompomyosine (**LOPATA, 2010**). Quelques auteurs maintiennent que la chitine déclenche également des réactions immunitaires qui peuvent aboutir à des réactions allergiques (**REESE *et al.*, 2007**).

2. Cancer

Le mot cancer dérive du grec karkinos qui signifie crabe ou pincés. Le mot latin cancer désigne le crabe ou l'écrevisse. C'est HIPPOCRATE (460-377 avant J-C) qui, le premier, compare le cancer à un crabe par analogie à l'aspect des tumeurs du sein. Le mot cancer prend à la fin du XV^{ème} siècle en français le sens de tumeur maligne (on trouve aussi cancre ou chancre). Ce rapprochement est justifié, par GALIEN (131-201) puis par AMBROISE PARE (1509-1590), par l'aspect d'une tumeur qui présente une masse centrale d'où rayonnent des veines gonflées ou des ramifications, comme des pattes, et par l'adhérence de la tumeur qui s'accroche aux tissus voisins comme avec des pincés.

Le cancer est un processus cellulaire provoquant l'apparition, à partir d'une cellule normale, de cellules de morphologie et de comportement généralement anormaux. Il est dû à des mutations cellulaires induisant la perte de certains caractères normaux et acquisition de nouveaux caractères qui se transmettent aux cellules filles (**COSTES et CHATELET, 2005**).

Les cancers correspondent à la prolifération non contrôlée de cellules dites malignes, en raison de certains caractères anormaux (**Figure 16**). La prolifération peut rester localisée (tumeur) ou se propager dans d'autres sites, soit par voie lymphatique (envahissement ganglionnaire), soit par voie sanguine (métastases) (**SEIGNALET et JOYEUX, 2004**).

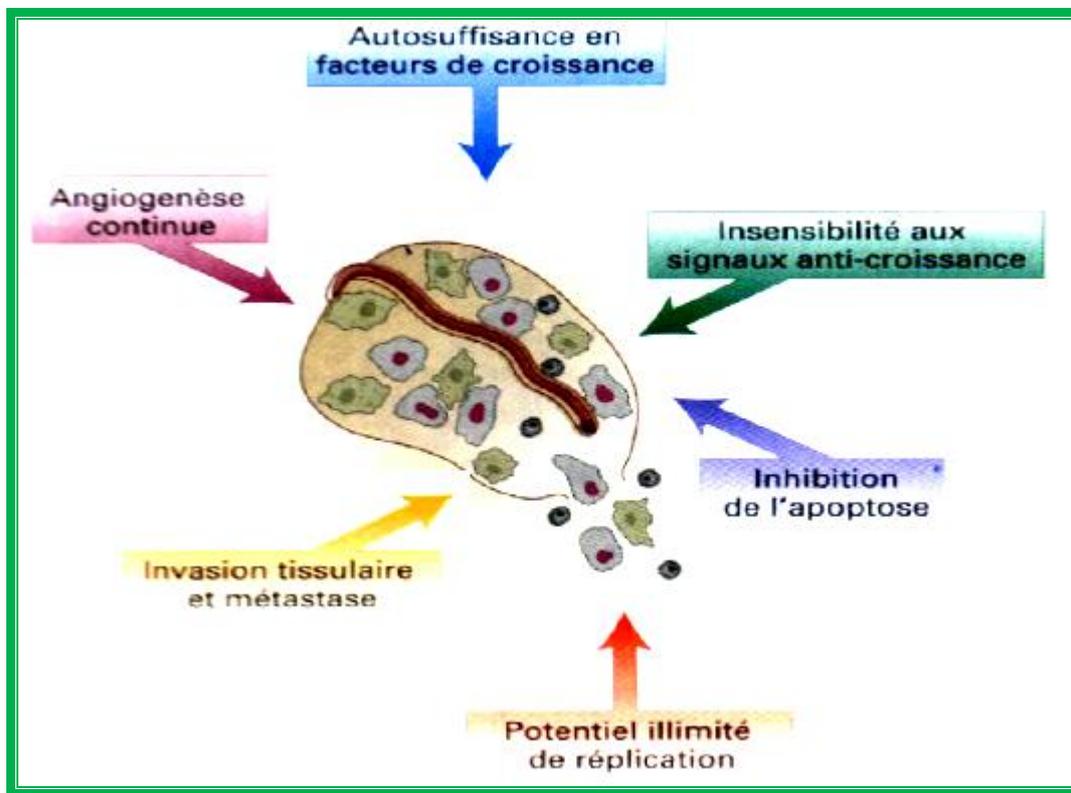


Figure 16 : Vue générale des changements cellulaires qui causent le cancer (HANAHAN et WEINBERG, 2000)

Il existe plus d'une centaine de formes de cancers. Ils sont dus à des mécanismes génétiques communs. En effet, une tumeur se développe toujours selon un nombre d'étapes bien déterminées, 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.

La cellule cancéreuse possède les caractéristiques phénotypiques suivantes :

- ◆ La perte de l'inhibition de contact ;
- ◆ La perte de la dépendance vis à vis de l'ancrage ;
- ◆ L'indépendance par rapport aux facteurs de croissance ;
- ◆ L'immortalité ;
- ◆ La tumorigénicité.

Les caractères morphologiques acquis d'une cellule cancéreuse 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).

Le tissu cancéreux est constitué des cellules cancéreuses proprement dites, disposées en formations plus ou moins architecturées et du stroma, c'est-à-dire d'un tissu conjonctif assurant le soutien et la nutrition de la tumeur (**COSTES et CHATELET, 2005**).

Selon les estimations de l'organisation mondiale de la santé, plus de 20 millions de personnes de par le monde sont atteintes de cette maladie et la plupart d'entre elles vivent dans les pays en voie de développement. La pathologie oncologique a fait irruption dans les pays en voie de développement, au point qu'elle pèse lourdement sur le fonctionnement des systèmes de santé de ces pays. Environ 30000 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués chaque année en Algérie avec une augmentation de plus de 50% du nombre de cas depuis une décennie. Le nombre total de décès par cancer étant annuellement de l'ordre de 20 000 personnes en Algérie (**Registre des tumeurs d'Alger, 2003**).

Le cancer du poumon occupe la première place chez l'homme avec 248 cas. Il représente 15% de l'ensemble des cancers masculins. Le cancer du colorectum représente 12% de l'ensemble des cancers de l'homme, il se situe par sa fréquence au deuxième rang de tous les cancers (masculin et féminin). Alors que le cancer de la vessie vient en troisième position avec une incidence de 11,6% des cancers masculins.

La localisation la plus fréquente chez la femme est le cancer du sein qui occupe la première place. Il représente 29,7% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers chez la femme. Le nombre de cas de cancers du colorectum est en augmentation ces dernières années et devance ainsi le cancer du col utérin avec une fréquence de 9,4% des cancers féminins. Le cancer du col utérin se situe au troisième rang avec une fréquence de 7,5% de l'ensemble des cancers de la femme.

Concernant les enfants, la tranche d'âge de 0 à 4 ans est la plus touchée chez les deux sexes. Les leucémies occupent la première place suivies des tumeurs de l'os, de l'articulation et du cartilage articulaire et les tumeurs de l'encéphale chez les deux sexes (**Registre des tumeurs d'Alger, 2003**).

2.1- Mécanismes moléculaires de l'oncogénèse

2.1.1- Proto-oncogènes

Les proto-oncogènes (du grec «protos» : premier, précurseur ; et «onkos» : masse) sont des gènes qui 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 et 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 qui reste non élucidé. Le virus pourra transmettre ultérieurement cet oncogène à un hôte animal (**ETIENNE *et al.*, 2006**).

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

- ◆ Les facteurs de croissance.
- ◆ Les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance.
- ◆ Les G-protéines ou protéines membranaires liant le GTP.
- ◆ Les tyrosines protéine-kinases membranaires.
- ◆ Les protéine-kinases cytosoliques.
- ◆ Les protéines à activité nucléaire : contrôlent la transcription de gènes cibles en interagissant avec l'ADN (**KAPLAN et DELPECH, 1992**).

2.1.2- 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 :

2.1.2.1- Mitochondries

Les mitochondries sont impliquées dans les cancers à de nombreux titres. Depuis les travaux d'OTTO WARBURG (années 1930), il paraît clair 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 nombre de cancers coliques. Depuis, des anomalies somatiques dans l'ADN mitochondrial de nombreux autres tissus cancéreux ont été identifiées. 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 DELPECH, 2001**).

2.1.2.2- 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. 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. 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.

2.2- Défenses naturelles contre le cancer

Au cours du développement des cancers, un rôle du système immunitaire a été postulé dans le cadre de la théorie de la « surveillance immunitaire ». Cette théorie postule qu'une cellule cancéreuse porte à sa surface des structures particulières, différentes de celles trouvées sur des cellules normales provenant du même tissu, pouvant être reconnues comme « antigènes » par le système immunitaire. Dans la majorité des cas, une réaction immunitaire serait induite afin de détruire les cellules malignes. Dans des circonstances particulières (tumeurs peu antigéniques, sanctuaires protégés, déficits immunitaires), les cellules transformées échapperaient à l'attaque immune et un cancer se développerait (**ANDRIEU *et al.*, 1991**). En outre, il existe des cellules du système immunitaire spécialisées dans la reconnaissance des cellules cancéreuses ; il s'agit des cellules NK (Natural Killer). L'activité cytotoxique des cellules NK s'exerce sur une grande variété de cibles, dont les cellules tumorales, et n'exige ni activation spécifique par l'antigène (tel que les lymphocytes CD8) ni de présentation par les molécules du CMH.

Les cellules NK utilisent plusieurs mécanismes pour détruire une cible : soit un contact direct par des interactions membranaires de type récepteur-ligand définissant la lyse NK ; soit une action indirecte par l'intermédiaire d'anticorps fixés sur la cellule cible et responsables du phénomène d'ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity). Les anticorps reconnaissent spécifiquement un antigène fixé sur la membrane de la cellule cible et se lient à un récepteur présent sur la cellule NK par le domaine constant (partie Fc) de la chaîne lourde de l'immunoglobuline des IgG. L'activation de ce récepteur (Fc γ R) déclenche la machinerie lytique et entraîne la destruction de la cible (**GENETET, 1997**).

2.3- Définition de la culture cellulaire

Dans des conditions appropriées, la plupart des espèces de cellules végétales et animales vivront, se multiplieront, et exprimeront même des propriétés différenciées dans une boîte de culture tissulaire. Les cellules peuvent être observées au microscope, ou analysées

par des techniques biochimiques, et les effets de l'addition ou de la suppression de molécules spécifiques comme les hormones ou les facteurs de croissance peuvent être étudiés. De plus, on peut étudier les interactions entre un type cellulaire et un autre dans une culture mixte. Les expériences effectuées sur des cellules en culture sont des expériences réalisées *in vitro* (littéralement « dans le verre ») ; par opposition, celles réalisées sur des organismes intacts sont des expériences *in vivo*. Ces deux termes sont utilisés dans un sens très différent par la plupart des biochimistes et des biologistes cellulaires – pour lesquels *in vitro* se rapporte aux réactions biochimiques qui ont lieu en dehors des cellules vivantes, alors que *in vivo* se rapporte à toute réaction qui a lieu à l'intérieur d'une cellule vivante (ALBERTS *et al.*, 1992).

2.3- Historique

La culture cellulaire commença en 1907 avec une expérience destinée à trancher une controverse en neurobiologie. L'hypothèse à vérifier, connue sous le nom de *doctrine neurale*, soutenait que chaque fibre nerveuse était une excroissance d'une cellule nerveuse unique et non le produit de la fusion de nombreuses cellules. Afin de tester cette affirmation, de petits fragments de moelle épinière étaient placés sur du liquide tissulaire coagulé dans une chambre chaude et humide et observés à intervalles réguliers au microscope. Après environ une journée, on pouvait observer de longs et minces prolongements émis par chaque cellule nerveuse individuelle dans le coagulum. La justesse de la doctrine neurale était ainsi prouvée, et les graines de la révolution de la culture cellulaire étaient semées (ALBERTS *et al.*, 1992).

3. Leishmaniose

3.1- Définition

La leishmaniose est une maladie due à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania*. Ces parasites affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'être humain. La transmission de ces parasites se fait par la piqûre d'un insecte vecteur, le phlébotome (DEDET, 2001 ; MacMORRIS-ADIX, 2008). Cet insecte est présent toute l'année sous les tropiques et en été dans les régions tempérées (dont l'Algérie).

En Algérie, de nombreux cas de leishmanioses cutanées et viscérales ont été rapportés (HARRAT *et al.*, 1996). La Grande Kabylie étant la région la plus touchée aussi bien en Algérie, que dans toute la région méditerranéenne (DEDET *et al.*, 1977).

En Algérie, deux formes de leishmanioses cutanées sont endémiques. *Leishmania major* étant responsable de leishmanioses cutanées dans les régions steppiques du Nord du Sahara et *Leishmania infantum* étant responsable de leishmanioses cutanées dans toute la région côtière (BENIKHLEF *et al.*, 2004).

Les manifestations cliniques de la leishmaniose sont :

- ◆ Des lésions ulcératives de la peau se développant au site de pique du phlébotome (leishmaniose cutanée localisée) ;
- ◆ Des nodules non-ulcératifs de la peau (leishmaniose cutanée diffuse) ;
- ◆ Une inflammation destructive des muqueuses associée aux lésions de la peau (leishmaniose cutanéomuqueuse);
- ◆ Une dissémination de l'infection aux viscères (leishmaniose viscérale).

La co-infection Leishmaniose/VIH est une complication grave due à la synergie fatale sur le système immunitaire (**KIMUTAI *et al.*, 2009**).

Le parasite *Leishmania* présente au cours de son cycle de développement (**Figure 17**) deux stades évolutifs distincts que sont le stade promastigote et le stade amastigote (**BAUDRY, 2012**) :

- ◆ Le stade promastigote est un organisme allongé, d'environ 10 à 25 µm de longueur. Le noyau est approximativement central. Le Kinétoplaste est situé en position antérieure et le flagelle libre s'échappe à l'extrémité antérieure. C'est le stade que présente le parasite dans le tube digestif du phlébotome et en culture (**BELAZZOUG, 1986**).
- ◆ Le stade amastigote est un petit corpuscule ovalaire ou arrondi de 2 à 6 µm de diamètre, présentant un noyau, un Kinétoplaste, et une ébauche de flagelle ne faisant pas saillie à l'extérieur. C'est le stade du parasite, intracellulaire, à l'intérieur des cellules du système des phagocytes mononucléés des mammifères.

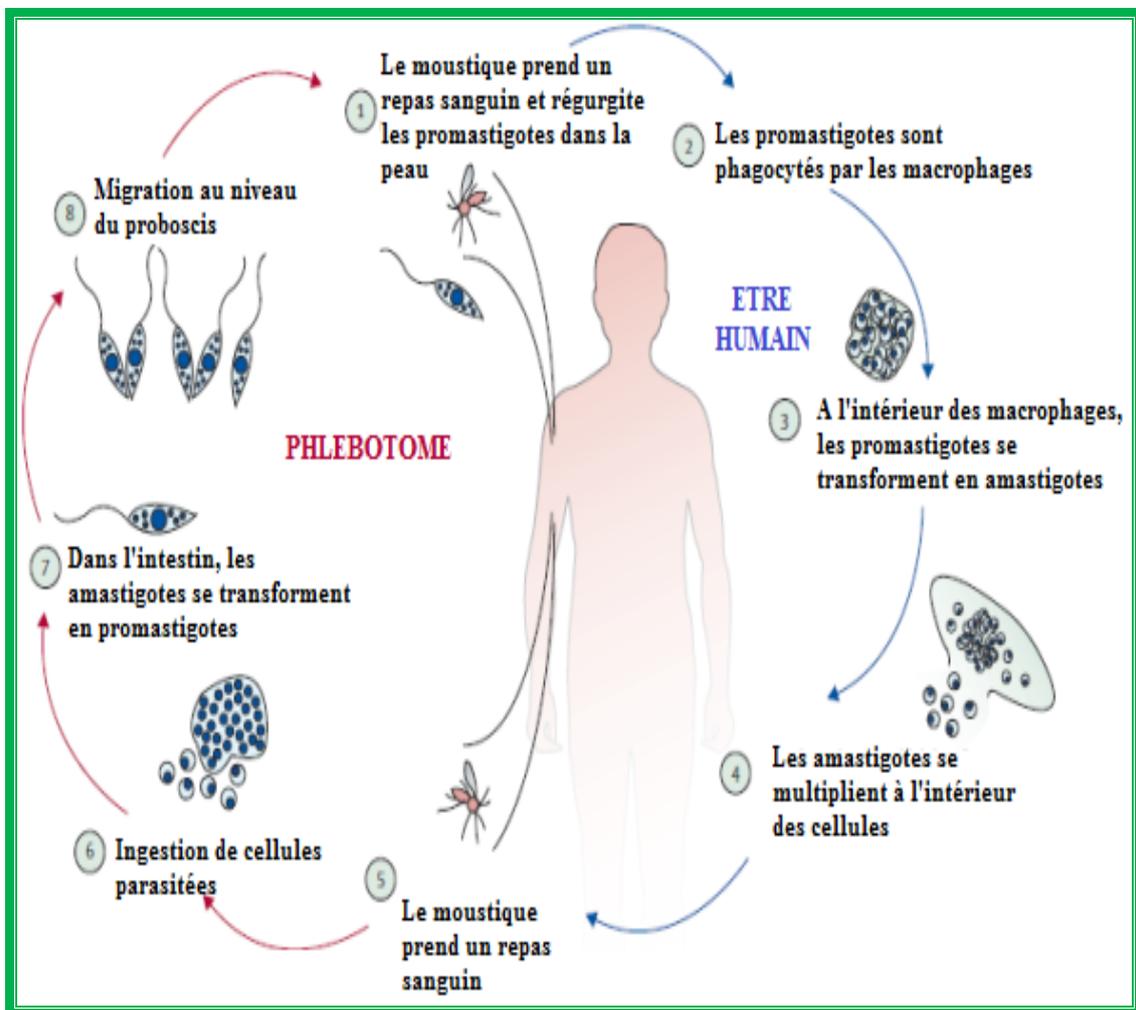


Figure 17 : Cycle de développement du parasite *Leishmania* (REITHINGER *et al.*, 2007)

Dans le monde, il y a, globalement, 1,5 à 2 millions de nouveaux cas de leishmaniose et 70 000 morts chaque année (WHO, 2004).

La leishmaniose cutanée est endémique dans plus de 70 pays. 90 % des cas ont lieu en Afghanistan, Algérie, Arabie Saoudite, Brésil, Pakistan, Pérou et Syrie (DESJEUX, 2004). Le nombre global de cas a augmenté à cause de l'émergence de résistance aux médicaments antileishmaniens (CROFT *et al.*, 2006).

3.2- Historique et classification

La leishmaniose est connue des médecins indiens depuis l'antiquité en raison de sa fréquence et de sa gravité dans certaines provinces de l'Inde. Elle a attiré pour la première fois l'attention des médecins occidentaux en 1824 à Jessore (Inde). Ces derniers ont cru, au départ, avoir à faire à une forme de malaria. En Inde, la leishmaniose fut nommée Kala azar, qui signifie en Hindi « La fièvre noire » ainsi nommée à cause de la coloration noire de la peau qui apparaît sur les extrémités et l'abdomen et qui est l'un des symptômes de la forme indienne de la maladie. L'agent responsable de la maladie a également été isolé pour la première fois en Inde par le médecin écossais William LEISHMAN et le médecin irlandais Charles DONOVAN. L'espèce découverte fut nommée *Leishmania donovani*.

Le parasite *leishmania* peut être classé comme suit :

Règne : Protista

Sous-règne : Protozoa

Phylum : Sarcomastigophora

Sous-phylum : Mastigophora

Classe : Zoomastigophora

Ordre : Promastigida

Famille : Trypanosomatide

Genre : *Leishmania*

(**RIOUX et al., 1984**).

4- Bactériologie

4.1- *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie pathogène causant un certain nombre de maladies, allant de la gastroentérite aux infections extra-intestinales des voies urinaires, du système sanguin et du système nerveux central. Des centaines de millions de personnes sont affectés par cette bactérie annuellement de par le monde. Cette bactérie utilise un large arsenal de facteurs de virulence pour altérer les fonctions de la cellule hôte (**DE SOUSA, 2006 ; CENNIMO et al., 2007 ; CROXEN et FINLAY, 2010**).

4.2- *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste qui infecte les patients immunodéprimés ou dans certaines conditions particulières telles que la rupture de la barrière épithéliale (exemple: en cas de brûlure), le manque en neutrophiles (exemple : en cas de chimiothérapie chez un patient atteint de cancer), la présence d'un corps étranger (exemple : un patient avec un cathéter) et la clairance muco-ciliaire altérée (exemple : fibrose cystique).

Pseudomonas aeruginosa est résistant à un grand nombre d'antibiotiques, ce qui rend le traitement difficile. De plus, sa capacité à former des biofilms le protège des attaques du système immunitaire et des antibiotiques. Il est aussi capable de sécréter plusieurs toxines (**MESAROS et al., 2007 ; VEESENMEYER et al., 2009**).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1- Matériel biologique

Pour cette étude, la chitine était extraite des carapaces 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. Tout d'abord, ce crustacé est très répandu sur les côtes algériennes et de ce fait très consommé. De plus, sa pigmentation permet d'obtenir aisément des produits incolores.

Parapenaeus longirostris (Lucas, 1846) est classé comme ci-dessous (**JESSOP, 1973 ; TYRRA, 1999**).

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*

Pour l'application, nous avons étudié l'effet cytotoxique, l'effet anticancéreux, l'effet antiparasitaire et l'effet antibactérien de la chitine et de ses dérivés.

Pour l'étude de l'effet cytotoxique, la lignée cellulaire humaine normale, MRC-5, a été sélectionnée. C'est une lignée cellulaire humaine obtenue à partir des cellules fibroblastiques fœtales de poumon. Son milieu de culture est le MEM (**Annexe 1**) supplémenté de 10% de SVF, 2mM de glutamine, 100UI/cm³ de pénicilline et 100µg/cm³ de streptomycine. Les cultures sont maintenues en atmosphère humide avec 5,5% de CO₂ à 37°C (**YAMASAKI et al., 2001**).

Pour l'étude de l'effet antitumoral, les lignées cellulaires humaines cancéreuses THP-1, Hep-2 et RD ont été sélectionnées.

La lignée THP-1 est une lignée cellulaire humaine dérivée de monocytes atteints de leucémie. Ces cellules sont maintenues en milieu RPMI 1640 (**Annexe 1**) supplémenté avec 10 % de SVF, 2 mM de glutamine, 1,5 mg/ml de glucose et 100 UI/cm³ de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (**JING *et al.*, 1999**).

La lignée RD est une lignée cellulaire humaine dérivée des cellules musculaires striées atteintes d'un rhabdomyosarcome. Ces cellules sont maintenues en milieu DMEM (**Annexe 1**) supplémenté avec 10 % de SVF, 2 mM de glutamine, 1,5 mg/ml de glucose et 100 UI/cm³ de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

La lignée Hep-2 est une lignée cellulaire humaine dérivée des cellules épithéliales du larynx atteintes d'un carcinome. Ces cellules sont maintenues en milieu DMEM (**Annexe 1**) supplémenté avec 10 % de SVF, 2 mM de glutamine, 1,5 mg/ml de glucose et 100 UI/cm³ de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (**CORBIERE, 2003**).

Le SVF a comme caractéristique de contenir peu ou pas d'IgG (ce qui empêche les perturbations au cours de la purification des anticorps (**HARLOW et LANE, 1991**)). La pénicilline est efficace contre les bactéries à Gram positif. La streptomycine est efficace contre les bactéries à Gram négatif (**HARLOW et LANE, 1991 ; ZENG *et al.*, 1998**).

L'étude de l'effet antibactérien a été réalisée avec les souches *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Escherichia coli ATCC 25922 est un bacille à Gram négatif non sporulé aéro-anaérobie facultatif. Elle est l'agent causal de gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou Sepsis.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 est un bacille à Gram négatif non sporulé aérobie stricte. Il est l'agent causal de méningites et de septicémies.

L'étude de l'effet antiparasitaire a été réalisée avec les souches *Leishmania infantum* LIPA 137 et *Leishmania infantum* LIPA 155/10. Ces deux souches sont l'agent causal de la leishmaniose.

Leishmania infantum LIPA 137 est une souche sensible au glucantime®.

Leishmania infantum LIPA 155/10 est une souche résistante au glucantime®.

Le glucantime® étant un antiparasitaire à base d'antimoine.

2- Méthodes

Cette étude a été effectuée en deux grandes étapes, que sont l'extraction de la chitine et la préparation de ses dérivés, ainsi que l'étude de leurs activités biologiques :

2.1- Extraction de la chitine et préparation de ses dérivés

2.1.1- Extraction de la chitine

Pour la préparation de la chitine, le protocole peut être résumé 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. L'étape « quenching » est réalisée par chauffage de la carapace à 80 °C pendant 48 heures, puis, refroidissement immédiat dans l'acétone glacé (**MUKHERJEE, 2001**).
3. La carapace est broyée, à l'aide d'un moulin à café, en fine poudre.
4. La carapace est déminéralisée avec 15 ml d'HCl à 1,5 N pour 1 g de carapace à température ambiante sous agitation pendant une heure. La carapace, ainsi déminéralisée, est lavée à l'eau de robinet jusqu'à pH neutre, puis relavée à l'eau distillée et, enfin, séchée à l'étuve à 90 °C.

La déminéralisation peut être observée grâce à l'effervescence produite. Cette réaction est appréciée, par détermination du taux de cendres (plus le taux de cendre est faible et plus efficace aura été la réaction de déminéralisation).

5. La carapace est déprotéinisée avec 20 ml de NaOH à 2 N pour 1 g de carapace à 45 °C sous agitation pendant deux heures. Cette étape est suivie par un lavage à l'eau de robinet jusqu'à pH neutre, puis un autre lavage à l'eau distillée et séchage à l'étuve à 90 °C.

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) (**NO et al., 1989**).

2.1.2- Préparation du chitosane

Pour la préparation du chitosane, la chitine est désacétylée avec 10 ml de NaOH à 50 % pour 1 g de carapace à 95 °C sous agitation pendant 3 heures. Cette étape est suivie d'un premier lavage à l'eau du robinet jusqu'à pH neutre, puis, d'un second lavage à l'eau distillée. A la fin, le chitosane est séché à l'étuve à 90 °C (**KURITA, 2001**).

2.1.3- Préparation des N-acétyl chitoooligosaccharides et des chitoooligosaccharides

L'obtention des N-acétyl chitoooligosaccharides se fait par hydrolyse de la chitine avec 50 ml d'HCl 7 N pour 1 g de carapace à 70 °C sous agitation pendant 3 heures.

Les chitoooligosaccharides sont obtenus par hydrolyse du chitosane avec 50 ml d'HCl 6,27 N pour 1 g de carapace à 56 °C sous agitation pendant trois heures.

Les réactions d'hydrolyse sont stoppées 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 dissoutes à nouveau dans 100 ml 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 1 N et filtrée (0,22 µm) 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 $DP \geq 8$. Le méthanol est ensuite évaporé (CHANG *et al.*, 2000).

2.1.4- Préparation du O-carboxyméthyle chitine

Pour cela, 10 g de chitine sont mis en présence de 40 ml d'une solution préparée, avec du NaOH à 60 % et du SDS à 2 %, et maintenue à 4 °C. Ce mélange devra réagir pendant 12 heures à -20 °C. Le mélange est ensuite mis en suspension dans 200 ml d'isopropanol à 25 °C et de l'acide monochloroacétique est rajouté sous agitation jusqu'à la neutralité. Le produit, ainsi obtenu, est filtré et lavé avec de l'éthanol (MUZZARELLI, 1988).

2.1.5- Préparation du N,O-carboxyméthyle chitosane

10 g de chitosane sont plongés sous agitation dans 100 ml d'isopropanol. 25,2 ml de NaOH à 10 M sont rajoutés en 6 fois pendant 20 minutes. Ce mélange est agité pendant 45 minutes supplémentaires. 12 g d'acide monochloroacétique sont rajoutés en 5 fois pendant 5 minutes. Ce nouveau mélange est chauffé à 60 °C et agité pendant 3 heures supplémentaires. Après ce laps de temps, 8,5 ml d'eau distillée sont rajoutés et le pH est ajusté à 7,0 avec de l'acide acétique glacial. La solution est filtrée. Le filtrat obtenu est lavé avec 150 ml du mélange 70 % de méthanol et 30 % d'eau, puis avec du méthanol anhydre. Le N,O-carboxyméthyle chitosane, ainsi obtenu, est séché à 60 °C (MUZZARELLI, 1988).

2.1.6- Préparation de carboxychitooligosaccharides et de carboxy-N-acétylchitooligosaccharides

10 g d'oligomères de chitine ou de chitosane sont dissous dans 77 ml d'acide acétique aqueux à 10 % et 23 ml de méthanol sont rajoutés pendant l'agitation. 10 g de succinate anhydre dissous dans de l'acétone sont rajoutés au fur et à mesure durant 1 heure. Ce mélange est agité pendant 4 heures supplémentaires et le pH est maintenu durant ce temps entre 9,0 et 10,0 avec du carbonate de sodium (**RAJAPAKSE *et al.*, 2006**).

2.1.7- Préparation de la 2-phtalimido chitine et du 2-phtalimido chitosane

10 g de chitine ou de chitosane sont dissous dans 1 litre d'acétone à 1 %. Après adjonction de 1 litre de méthanol, la chitine ou le chitosane sont précipités à nouveau dans 1 litre de NaHCO₃ à 4 % et agités pendant 2 heures. Le précipité est filtré et lavé avec du méthanol. Après séchage, le produit est mis en suspension dans 400 ml de DMF anhydre et agité pendant 16 heures à température ambiante. Il est filtré et mis en suspension à nouveau dans du DMF anhydre et agité pendant 1 heure. Cette dernière étape est répétée une troisième fois. La solution est versée dans 250 ml de DMF anhydre. Après adjonction de 18,4 g de d'acide phtalique anhydre et de 6,9 ml d'éthylène glycol, la mixture est mise à l'abri de l'air et agitée pendant 2 heures à 130 °C. Après refroidissement, la solution est versée dans 2 litres d'eau glacée. Le précipité est filtré, lavé avec de l'eau, mis en suspension à nouveau dans de l'éthanol, filtré à nouveau, lavé avec de l'éthanol et séché (**BAUMANN et FAUST, 2001**).

2.1.8- Préparation du chitosane oxydé

2,5 g de chitosane sont mis en suspension dans 130 ml d'eau distillée et la solution est refroidie en dessous de 5 °C en utilisant un bain glacé.

1,01 g de NaBr et 0,077 g de TEMPO sont dissouts dans 100 ml d'eau distillée à 5 °C et 50 ml de cette solution sont rajoutés à la suspension du chitosane. Le pH est ajusté à 10,75 avec du NaOH 0,5 M.

135 ml d'une solution d'hypochlorite de sodium (6,5 °chl) (**Annexe 2**) sont rajoutés à la solution avec un débit de 10 ml/min. Le pH est maintenu à 10,75 par ajout de NaOH jusqu'à stabilisation. 30 ml d'éthanol à 96 % sont rajoutés à la solution pour arrêter la réaction.

La solution est neutralisée avec de l'HCl dilué. Le produit est précipité dans 1,15 litre d'éthanol à 96 %, récupéré par centrifugation à 10000 g pendant 18 minutes à température ambiante, puis, lavé trois fois avec une solution eau/acétone 5/1 (v/v).

Après évaporation, l'échantillon est dialysé (seuil de coupure 3,5 kDa) contre de l'eau ultra-pure à 4 °C durant 48 heures et lyophilisé.

2.1.9- Préparation des oligochitosanes oxydés

Pour préparer des oligochitosanes oxydés, deux tentatives de dépolymérisation du chitosane oxydé ont été réalisées en présence de l'une des deux enzymes que sont la glucuronane lyase et la cellulase.

2.1.9.1- Dépolymérisation du chitosane oxydé à l'aide de la glucuronane lyase

La glucuronane lyase a la capacité de produire des oligomères avec un degré de polymérisation de 3. Ces derniers sont identifiés par spectrophotométrie.

Pour ce faire, une solution à 0,2 % (p/v) de chitosane oxydé dans du tampon acétate de potassium (50 mM, pH 5,5) (annexe 1) est préparée. 1 µl d'enzyme pure est injectée. La cinétique de libération des produits est suivie à 235 nm en utilisant comme témoin la solution à 0,2 % de chitosane oxydé.

2.1.9.2- Dépolymérisation du chitosane oxyde à l'aide de la cellulase

Pour les essais, une solution de 20 ml à 1 mg/ml de chitosane oxydé est préparée dans du tampon citrate-phosphate (50 mM, pH 4,6). 10 µl d'enzyme sont rajoutés et les produits de dégradation obtenus sont dosés, par la méthode de dosage des sucres réducteurs par l'acide bichinoninique (**Annexe 3**), à différents intervalles de temps.

2.2- Caractérisation des différentes substances

2.2.1- Mesure du taux de cendre

L'efficacité de la déminéralisation a été observée en mesurant le taux de cendre. Elle est réalisée comme suit :

Dans un creuset, 2 g de carapace, de chitine ou de chitosane, préalablement chauffés pendant 15 minutes dans un four à moufles et refroidis, sont pesés.

Le creuset, avec la substance à analyser, est introduit dans un four à moufle, chauffé à 600 °C, pendant 6 heures. la constance du poids est contrôlée (**NO et al., 1989**). Le pourcentage en minéraux est calculé par la formule (5) ci-contre :

$$\text{Le pourcentage en minéraux (\%)} = \frac{\text{Poids de cendre final}}{\text{Poids initial de l'échantillon}} \times 100 \quad (5)$$

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 1 N dont le volume rajouté est soigneusement noté. Nous effectuons par la suite le dosage des protéines par la méthode colorimétrique de Biuret (**Annexe 4**).

2.2.3- Mesure du degré de désacétylation

La mesure du degré de désacétylation a été réalisée grâce à la spectroscopie FT-IR.

Les différents degrés d'acétylation des polysaccharides ont été calculés selon la formule (6).

$$DA = (A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33 \quad (6)$$

Avec A_{1655} et A_{3450} 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 (7) (**FERNANDEZ-KIM, 2004; KHAN et al., 2002**).

$$DD = 100 - DA \quad (7)$$

2.2.4- Mesure du poids moléculaire

Le poids moléculaire de la chitine et du chitosane ont été déterminés par la méthode viscosimétrique (**Annexe 5**). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un viscosimètre de type **Ubbelohde** (Technico, ASTM D. 445) de constante $k = 0,01 \text{ cS/s}$.

2.2.5- Mesure de la densité apparente

La densité apparente est mesurée en remplissant un pycnomètre avec l'échantillon sec à partir de la formule (8).

$$\text{Densité apparente} = \frac{\text{Poids sec de l'échantillon (g)}}{\text{Volume apparent de l'échantillon (ml)}} \quad (8)$$

2.2.6- Mesure de la densité réelle

La densité réelle (d_r) est mesurée en plaçant 15 g d'échantillon dans un pycnomètre de 50 ml, selon l'équation (9).

$$d_r = \frac{B-A}{(B+D) - (A+C)} \quad (9)$$

Avec :

A : Poids du pycnomètre vide (g).

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

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

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

2.2.7- Mesure du taux de chitine dans la carapace

La teneur des carapaces de crevettes en chitine est déduite par le dosage des résidus hexosamines libérés par l'hydrolyse acide complète de la chitine. Cette hydrolyse est effectuée avec de l'acide chlorhydrique 6 N pendant 6 heures à température ambiante. Le dosage des hexosamines est effectué par la méthode d'ELSON et MORGAN (Annexe 6). La quantité d'hexosamines libérées correspond à la quantité de chitine (BLIX, 1948).

La teneur des carapaces en chitine est calculée à partir de la formule (10).

$$\text{La teneur en chitine (\%)} = \frac{\text{Poids d'acétyl glucosamines}}{\text{Poids d'échantillon}} \times 100 \quad (10)$$

La fraction d'azote contenue dans la chitine est déterminée en utilisant la formule (11).

$$\text{Teneur en azote de la chitine} = P \times 6,9 \% \quad (\text{g / 100 g de carapaces}) \quad (11)$$

Avec :

P : étant le poids de la chitine, exprimé en gramme contenu dans 100 g de carapaces.

6,9 % : étant le pourcentage en azote au niveau de la chitine.

2.2.8- 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 protocole utilisé pour estimer l'azote total par la méthode de KJELDAHL est cité en annexe 7.

2.2.9- Estimation du degré d'oxydation par conductimétrie

La conductivité a été mesurée grâce à un conductimètre, calibré avec du NaCl à 0,05 %. La mesure du pH se fait en parallèle pour indiquer la fin de l'expérience. Le degré d'oxydation (D_o) a été déterminé par titration acide/base. 15 ml d'HCl dilué (0,01 M) ont été mélangés à 30 mg de chitosane oxydé pour atteindre un pH de 2,5-3,0. Du NaOH 0,01 M a été utilisé pour réaliser la titration et deux points d'équivalence (V_1 et V_2) ont été obtenus. Le D_o était déterminé grâce à l'équation (12).

$$D_o = \frac{161 \times (V_2 - V_1) \times M_{NaOH}}{m - (36 \times (V_2 - V_1) \times M_{NaOH})} \quad (12)$$

Avec :

D_o : degré d'oxydation.

V_1 : volume (litres) de NaOH nécessaire pour neutraliser l'HCl (acide fort).

V_2 : volume (litres) de NaOH nécessaire pour neutraliser le chitosane oxydé (acide faible).

m : masse du chitosane oxydé (g).

M_{NaOH} : masse molaire du NaOH.

2.2.10- Caractérisation des oligosaccharides par HPAEC

La chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions (HPAEC) est une technique qualitative et quantitative très performante pour l'analyse directe (sans étape de dérivation) des mono-, di- et oligosaccharides. Cette technique prend avantage des propriétés faiblement acides des sucres, permettant une séparation sélective de ces molécules sur une phase stationnaire échangeuse d'anions, et ce, à un pH élevé.

La séparation des oligosaccharides se réalise avec un éluant fortement alcalin ($[OH^-] > 0,1$ M) car ces composés donnent lieu à des interactions fortes avec la phase stationnaire.

A la sortie de la colonne chromatographique, le système de la détection ampérométrique pulsée (PAD) oxyde les analytes à la surface de l'électrode en or par

l'application d'un potentiel positif. Le courant généré par la molécule est proportionnel à sa concentration, ce qui rend l'analyse quantitative.

2.2.11- Caractérisation des produits par SEC-MALLS

Il s'agit d'une méthode permettant de déterminer la masse moléculaire d'une particule ainsi que son rayon hydrodynamique grâce à la combinaison de plusieurs techniques : la chromatographie d'exclusion de taille (SEC), la diffusion de lumière à plusieurs angles (MALLS) ainsi que la réfractométrie (RI). L'homogénéité et la polydispersité des échantillons peuvent aussi être évaluées par cette technique. L'avantage réside également en l'utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille qui permet d'éliminer d'éventuels agrégats, et la possibilité de déterminer la masse molaire.

Un système HPLC avec une pompe permet d'injecter l'échantillon dans le système et assurer un flux de tampon. L'échantillon passe par une colonne d'exclusion de taille et à la sortie de la colonne, un détecteur mesure la diffusion de la lumière à 18 angles et l'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre différentiel. La concentration du composé analysé est calculée par le changement de l'indice de réfraction, l'intensité du signal diffusé correspond au produit de la concentration multiplié par la masse molaire.

2.2.12- Caractérisation des produits par ¹³CRMN et ¹HRMN

La RMN aide à comprendre comment les structures moléculaires sont organisées. Lorsque les noyaux sont soumis à un champ magnétique, produit par un aimant, les interactions entre eux provoquent des résonances. Elles sont liées au spin, « S » (13), qui est une grandeur intrinsèque des noyaux atomiques. Les noyaux retrouvent leur stabilité au bout d'une durée appelée temps de relaxation. La RMN mesure l'intensité des fréquences émises pendant le temps de relaxation. Or, ces fréquences sont caractéristiques de l'environnement du noyau. Les atomes voisins causent un déplacement chimique spécifique, noté « δ ».

$$\mu = \gamma S \quad (13)$$

Avec :

S : spin

μ : moment magnétique nucléaire

γ : rapport gyromagnétique

Les valeurs de S peuvent être prévues empiriquement à partir du nombre p de protons et du nombre n de neutrons constituant le noyau.

Seuls les noyaux tels que $S = \frac{1}{2}$ sont étudiés puisqu'ils sont essentiellement utilisés dans la technique d'analyse puissante que constitue la RMN (RMN du proton et RMN du carbone 13 très utilisés en analyse organique).

2.2.13- Caractérisation des produits par FT-IR

Un spectromètre FT-IR est un instrument qui acquiert un spectre large bande du proche IR au IR lointain et collecte simultanément toutes les longueurs d'ondes. Cette caractéristique est appelée l'avantage Multiplex ou de Fellgett. Cette technique permet, tout d'abord, de collecter l'interférogramme d'un signal échantillon à l'aide d'un interféromètre, puis d'exécuter une transformation Fourier de cet interférogramme afin d'obtenir le spectre.

Pour cela, 1 mg d'échantillon est mélangé à 100 mg de KBr anhydre et pressé. Le spectre FT-IR est réalisé à température ambiante pour des longueurs d'ondes variant de 400 à 4000 cm^{-1} . Un total de 32 scans était réalisé pour chaque échantillon pour une résolution de 4 cm^{-1} .

2.2.14- Caractérisation des produits par FPLC

La FPLC permet la réalisation d'un tri entre les différentes espèces moléculaires d'un mélange et d'estimer, ainsi, leurs poids moléculaires. Les molécules sont ainsi forcées à effectuer un parcours commun parsemé d'obstacles : certaines espèces les franchiront aisément d'autres auront plus de difficultés. A l'arrivée, il y aura échelonnement.

Pour entraîner les molécules il faut les véhiculer dans un fluide : la phase mobile est un liquide. L'obstacle à franchir, qui ne doit pas être entraîné par la phase mobile, doit être fixe et produire des effets reproductibles : il constitue la phase stationnaire. Cette phase stationnaire est emprisonnée dans une colonne.

2.3- Applications

Une fois les molécules préparées et caractérisées, elles ont été testées pour leurs activités anticancéreuses, antibactériennes et antiparasitaires.

2.3.1- Etude de l'effet anticancéreux

La validation de la capacité d'une molécule à pouvoir inhiber la prolifération cancéreuse, passe par plusieurs étapes de tests commençant par la mise en évidence d'une activité au niveau cellulaire. Différentes techniques organisées selon une méthodologie très précise, permettent ensuite de définir les mécanismes d'action et de déterminer les cibles génétiques. Une des stratégies utilisées pour la découverte de nouveaux composés antiprolifératifs, passe par une investigation du potentiel bioactif d'un grand nombre de

composés chimiques (le screening) sur lignées cellulaires cancéreuses. Ces composés peuvent avoir des origines diverses allant du milieu naturel à la chimie de synthèse ou aux biotechnologies.

2.3.1.1. Pré-culture des cellules

Avant de démarrer les expérimentations, les cellules sont mises en culture dans leurs milieux appropriés (MEM pour la lignée MRC-5, RPMI 1640 pour la lignée THP-1, DMEM pour les lignées Hep-2 et RD) dans des plaques de culture en plastique de 24 puits. Ce milieu de culture est changé tous les 3 jours jusqu'à obtention de monocouches cellulaires confluentes.

2.3.1.2- Etude de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité

Les tests *in vitro* revêtent à l'heure actuelle une grande importance pour déterminer la biocompatibilité d'une substance. Ils permettent d'éliminer rapidement les substances les plus toxiques et évitent ainsi le sacrifice inutile de bon nombre d'animaux ce qui n'est pas négligeable, tant du point de vue éthique qu'économique. Les tests *in vitro* n'excluent pas l'expérimentation animale, mais doivent être considérés comme une première étape de discrimination avant les tests d'évaluation de la biocompatibilité *in vivo*.

La lignée humaine normale, MRC-5, a été utilisée pour évaluer l'innocuité de la chitine et de ses dérivés. Les concentrations de produits testées étaient de 0, 1, 50, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 et 3000 µg/ml. Après 24 heures d'exposition, la cytotoxicité était évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan (YAMASAKI *et al.*, 2001) ou au MTT (JE et KIM, 2006). Toutes les expériences ont été effectuées en triplicata.

Les concentrations des produits n'ayant aucun effet sur la lignée MRC-5, ont été testées sur les lignées cancéreuses THP-1, RD et Hep-2. De même, après 24 heures d'exposition, la cytotoxicité a été évaluée par le test d'exclusion au bleu de Trypan (YAMASAKI *et al.*, 2001) ou au MTT (SARAVANAN *et al.*, 2003). Toutes les expériences ont été effectuées en triplicata.

2.3.1.2.1- Méthodes colorimétriques (test au bleu de Trypan et test au MTT)

10⁶ cellules/ml sont cultivées dans leur milieu approprié contenant des échantillons de 0, 1, 500, 1000 et 1500 µg/ml dans du tampon PBS (Annexe 8) sous atmosphère contenant 5 % de dioxyde de carbone à 37 °C pendant 72 heures. Le taux de cellules survivantes est estimé par numération des cellules vivantes en utilisant une cellule Mallassez.

Les cellules vivantes sont reconnues pour exclure le colorant bleu de Trypan et être colorées par le MTT (LEE *et al.*, 2002 ; ZHANG *et al.*, 2004). Le principe et la méthode du test au bleu de Trypan sont cités en annexe 9. Le principe et la méthode du test au MTT sont présentés en annexe 10.

L'activité cytotoxique, qui est un paramètre décrivant le pourcentage de cellules cibles non-viables, est calculée par la formule (14) (SU *et al.*, 1999 ; CUESTA *et al.*, 2003).

$$\text{Activité cytotoxique (\%)} = 100 \times (\% \text{ échantillon} - \% \text{ contrôle}) / (100 - \% \text{ contrôle}) \quad (14)$$

La viabilité est déduite de la formule (15).

$$\text{Viabilité (\%)} = 100 - \text{activité cytotoxique (\%)} \quad (15)$$

L'CI₅₀ est aussi déterminée ; c'est la concentration qui inhibe la croissance de 50 % des cellules.

2.3.1.2.2- Détermination de la fragmentation de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

◆ Principe

Le fractionnement de l'ADN génomique est considéré comme le trait le plus caractéristique de la mort cellulaire par apoptose. Les endonucléases qui ont été activées durant l'apoptose clivent tout d'abord l'ADN en larges fragments de 50 à 300 kb qui sont ensuite clivés en de multiples petits fragments d'environ 180 à 200 pb. La méthode de détection des bandes de 50 à 300 kb nécessite un équipement spécial. C'est pour cette raison que la méthode la plus communément utilisée est la détection des multiples petits fragments à l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose ou d'acrylamide.

La méthode de migration d'extraction et d'électrophorèse est indiquée en annexe 8.

2.3.2- Etude de l'effet antiparasitaire

L'étude de l'activité antiproliférative de la chitine et de ses dérivés sur le parasite *Leishmania infantum* peut être réalisée sur la forme amastigote du parasite (forme intracellulaire) ou sur la forme promastigote du parasite (forme extracellulaire). L'étude de l'activité cytotoxique de la chitine et de ses dérivés sur la forme amastigote exige l'utilisation de la lignée humaine cancéreuse THP-1 en tant que hôte pour le parasite. De crainte que l'activité antitumorale de la chitine et de ses dérivés sur la lignée humaine cancéreuse THP-1 n'interfère avec l'activité antiparasitaire de la chitine et de ses dérivés

sur *Leishmania infantum*, causant des résultats erronés, nous avons opté pour l'étude l'activité antileishmanienne de la chitine et de ses dérivés sur la forme promastigote.

L'étude de l'activité antileishmanienne des produits synthétisés par voie chimique a été réalisée sur des microplaques de 96 puits. Pour cela, 2×10^6 cellules/ml de promastigotes sont incubés dans 100 μ l de milieu RPMI 1640 additionné de 10 % de SVF, 2 mM glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine. L'effet antiparasitaire de nos composés a été testé à différentes concentrations (0, 250, 500, 1000, 2500 et 5000 μ g/ml). La microplaque est incubée à 26 °C pendant 44 heures. Après cela, 10 μ l de MTT (10 mg/ml dans de l'eau distillée) sont rajoutés dans chaque puits et la microplaque est incubée pendant 4 heures à 26 °C à l'abri de la lumière. Après ce laps de temps, 100 μ l de DMSO sont rajoutés dans chaque puits et la microplaque est incubée pendant 30 minutes à 26 °C dans le noir. A la fin du traitement, la densité optique est lue à 492 nm sur un lecteur ELISA (GOSLAND *et al.*, 1989). Tous les essais sont réalisés en triplicatas.

L'activité cytotoxique, qui est un paramètre décrivant le pourcentage de cellules cibles non-viables, est calculée par la formule (14). La viabilité est déduite de la formule (15). L' CI_{50} est aussi déterminée ; c'est la concentration qui inhibe la croissance de 50 % des cellules (JE et KIM, 2006). Toutes les expériences ont été effectuées en triplicata.

2.3.3- Etude de l'effet antibactérien

L'étude de l'activité antibactérienne n'a été effectuée qu'avec l'un de ses dérivés : le chitosane oxydé ; les autres dérivés ayant déjà fait l'objet d'une étude similaire effectuée par BENHABILES et ses collaborateurs (BENHABILES *et al.*, 2012).

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée selon la méthode des disques indiquée en annexe 11 (OMS, 2010).

3- Calcul de l'ETR

Pour tous les tests, l'écart type relatif (ETR) a été calculé et les expérimentations ont été répétées afin de déterminer l'erreur expérimentale. L'ETR a été calculé selon la formule (16).

$$\text{ETR} = 100 \left(\frac{S_r}{\bar{X}} \right) \quad (16)$$

Avec :

\bar{X} : moyenne.

Sr : écart-type.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1- Analyse des carapaces de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)

L'analyse des carapaces de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) a donné les résultats présentés dans le tableau II.

Tableau II : Résultats de l'analyse des carapaces de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)

Taux de cendre (%)	Densité apparente	Densité réelle	Protéines (libres et liées) (%)	Corps gras, pigments et autres (%)	Chitine (%)
20,2	0,46	1,34	40,6	15,6	23,7

L'analyse des carapaces de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) a démontré qu'elles sont constituées d'environ 40% de protéines, 24% de chitine et 20% de minéraux. Le reste (16%) correspond aux corps gras, pigments et autres. Nos résultats sont en accord avec ceux de **No et al. (1989)**. Ces derniers ont travaillé sur l'écrevisse. **LE ROUX (2012)** a travaillé sur la crevette *Penaeus vannamei* et a trouvé que ces carapaces sont composées de 28,2% de chitine, 40% de protéines et 24,7% de minéraux. Toutefois, il faut avoir à l'esprit, 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 observées (**SENG, 1988 ; FERNANDEZ-KIM, 2004**).

2- Préparation de la chitine et de ses dérivés

2.1- Extraction et caractérisation de la chitine

Les résultats de l'analyse de la chitine extraite de la carapace de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Résultats de l'analyse de la chitine

Taux de cendre (%)	0,2
Densité apparente	0,21
Densité réelle	0,97
Protéines (%)	3,1
Viscosité (ml/g)	1568,7
Poids moléculaire (kDa)	388
DD	35

Les résultats du tableau III montrent que la densité apparente de la chitine est de 0,21. Elle est supérieure aux densités de chitines issues de crevettes (espèces non précisées) (0,06) et de crabes (0,17) (**FERNANDEZ-KIM, 2004**). Cette différence indique que la chitine issue des carapaces de crevettes *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) est moins poreuse que celles issues des carapaces d'autres espèces de crevettes. Elle est donc plus proche des chitines issues de carapaces de crabes.

La viscosité de la chitine (1568,7 ml/g) a été déterminée à partir de la figure 18, en. Celle-ci correspond à la moyenne entre la valeur de l'ordonnée à l'origine de la droite tracée de la viscosité réduite (η_r) en fonction de la concentration, et la valeur de l'ordonnée à l'origine de la droite tracée de la viscosité inhérente (η_i) en fonction de la concentration. Le poids moléculaire (388 kDa) (**Tableau III**) est retrouvé en appliquant la formule de MARK-HOUWINK (26) (**Annexe 5**). Cette valeur est plutôt faible par rapport à celle citée dans la littérature. En effet, la chitine est définie comme un bio-polymère de haut poids moléculaire. Son poids moléculaire doit varier entre 1033 et 2530 kDa (**JEON et KIM, 2000 (a) ; MAJETI et KUMAR, 2000**). La valeur retrouvée lors de la présente étude reste approximative car la chitine native peut avoir subi une dépolymérisation durant les différentes étapes de son extraction. En effet, il n'est pas exclu que durant la déminéralisation, il y ait eu dépolymérisation de la chitine, vu que les deux procédés sont réalisés avec de l'acide chlorhydrique. **CRINI et al. (2009)** précisent que le choix du couple temps-température est dicté par les caractéristiques de la chitine à obtenir. Les modifications que peuvent entraîner des conditions trop drastiques concernent la perte de poids moléculaire ou l'oxydation des extrémités réductrices.

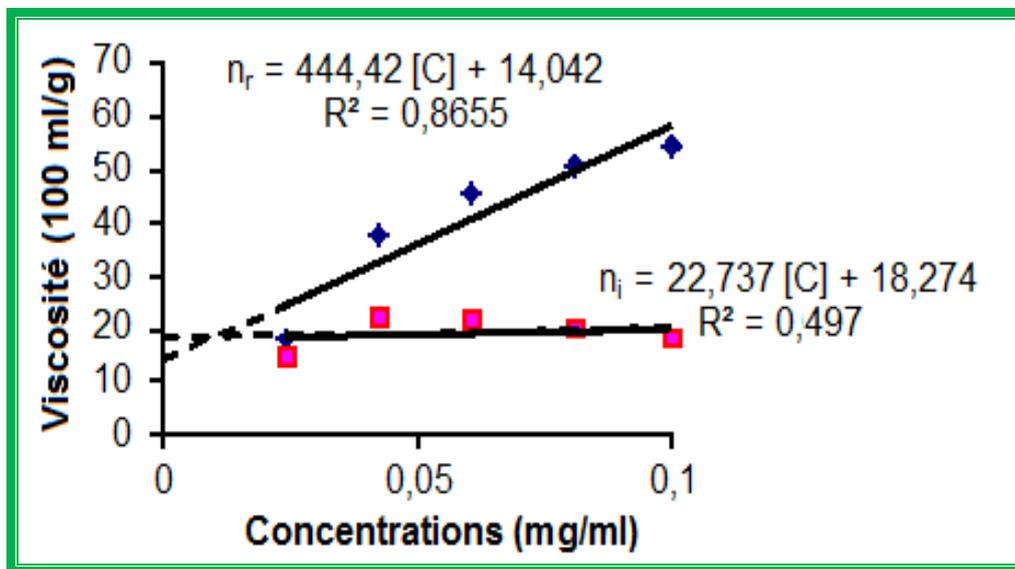


Figure 18 : Variation de la viscosité de la chitine en fonction de la concentration

L'étape « quenching », négligée par la plupart des auteurs, a augmenté l'efficacité de la déminéralisation (le taux de cendre de la chitine est passé de 0,46 % à 0,2 %) en rendant la structure cristalline de la chitine amorphe. Ce « quenching », 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. **ROY et al. (2003)** utilisent les microondes pour obtenir un relâchement de la structure.

Les coproduits de crevettes sont caractérisés par un réseau dense de protéines et de chitine qui interagissent avec les minéraux pour former l'exosquelette. Par ailleurs, les composés impliqués sont généralement des complexes caroténo-protéiques et gluco-protéiques. Les liaisons covalentes mises en jeu s'opposent alors à la séparation de ces composés. Elle s'avère délicate et généralement incomplète. Pour ce travail, l'extraction de la chitine s'est faite par voie chimique.

Pour la déminéralisation des carapaces de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), les conditions optimisées dans une précédente étude ont été utilisées. Il s'agit d'un volume d'acide chlorhydrique de 15 ml à 1,5 N par gramme de carapace à la température ambiante sous agitation constante pendant une heure (**SALAH, 2005**). Cette étude a ainsi permis de déminéraliser 99% de la carapace des crevettes. Ces conditions diffèrent d'une espèce à l'autre, et d'un organisme à l'autre, à cause des différences des structures, des conformations et des propriétés de la chitine. A titre d'exemples, **CHANG et TSAI (1997)** ont employé la crevette rose *Solenocera melanthero* et sont parvenus à des conditions optimales de déminéralisation de la carapace à la température ambiante avec une concentration en HCl de 1,7 N et un rapport acide/carapace de 9/1 ml/g. **MIRZADEH et al. (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'acide chlorhydrique à 10 %.

Dans le cadre de cette étude, la déprotéinisation a été réalisée par voie chimique. Ce traitement basique permet d'éliminer les protéines par solubilisation. L'extraction des protéines par les enzymes protéolytiques peut se révéler incomplète et coûteuse, et ce, en fonction de l'enzyme utilisée.

Pour déprotéinisation des carapaces de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), les résultats de notre précédente étude portant sur l'optimisation de l'extraction de la chitine, à partir des carapaces de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), ont été appliqués. Il s'agit d'utiliser 20 ml de NaOH 2 N à 45 °C sous agitation pendant 2 heures et un rapport soude/carapace déminéralisée de 20/1 g/ml (SALAH, 2005). Ainsi, lors de la présente étude, la carapace de crevette a pu être déprotéinée à 92,4%. D'autres chercheurs ont optimisé l'extraction de la chitine à partir des carapaces de crevette, sans toutefois utiliser celle de *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846). C'est le cas des travaux de CHANG et TSAI (1997) qui ont déterminé que les conditions optimales de déprotéinisation sont une température de 75 °C, une concentration en NaOH de 2,5 N et un rapport soude/carapace déminéralisée de 5/1 ml/g. D'autres auteurs ont mis en évidence que l'optimum de la déprotéinisation est situé à la température de 65 °C pendant 2 heures avec du NaOH à 3,5 % et un rapport soude/carapace déminéralisée de 10/1 g/ml (NO *et al.*, 1989 ; MUKHERJEE, 2001). Il faut en effet à avoir en idée que les composés protéiques résiduels sont plus difficiles d'accès ou protégés par des conformations chimiques. Par exemple, il peut s'agir de lipoprotéines dont les liaisons hydrophobes les protégeraient de l'hydrolyse (PERCOT *et al.*, 2003). Toutefois, les conditions drastiques de la déprotéinisation modifient la structure native de la chitine. SYNOWIECKI et AL-KHATEB (2000) récupèrent et valorisent les protéines ainsi extraites.

MIRZADEH *et al.* (2002) ont travaillé sur l'extraction de la chitine à partir de la crevette et ont dépigmenté leur chitine avec de l'acétone pendant 2 heures. Nous avons préféré utiliser la méthode de No *et al.* (1989) qui associent une étape de blanchiment pour garantir une chitine la plus blanche possible. Cette étape reste facultative. Les pigments libérés peuvent être valorisés. Ils peuvent notamment être incorporés dans l'alimentation des salmonidés, afin que ceux-ci acquièrent une plus forte pigmentation, car les poissons sont incapables de synthétiser eux-mêmes ces molécules (CHEN et MEYERS, 1982 ; ARMANTA *et al.*, 2002 ; TAN *et al.*, 2002).

Le spectre FT-IR de la chitine (**Figure 21**) a confirmé la bonne extraction de celle-ci. En effet, les pics caractéristiques de la chitine sont présents (**Annexe 12**). Il s'agit de :

- ◆ Pic à 3500 cm^{-1} : bande O-H.
- ◆ Pic à $2798,8\text{ cm}^{-1}$: bande C-H.
- ◆ Pics à $1661,7\text{ cm}^{-1}$, 1401 cm^{-1} et $1187,5\text{ cm}^{-1}$: bandes C=O.
- ◆ Pic à $1376,5\text{ cm}^{-1}$: bande CH_3 .
- ◆ Pic $896,3\text{ cm}^{-1}$: bande N-H.

Le degré de désacétylation de la chitine a été déterminé en utilisant la formule (6) à partir de la figure 19. Il correspond à 35 % (**Tableau III**). Ceci indique que la chitine obtenue lors de la présente étude est chargée positivement sur un tiers de ses monomères. Ces charges positives lui permettent d'interagir avec un grand nombre de ligands chargés négativement. Ceci confère à la chitine obtenue un grand nombre d'applications potentielles.

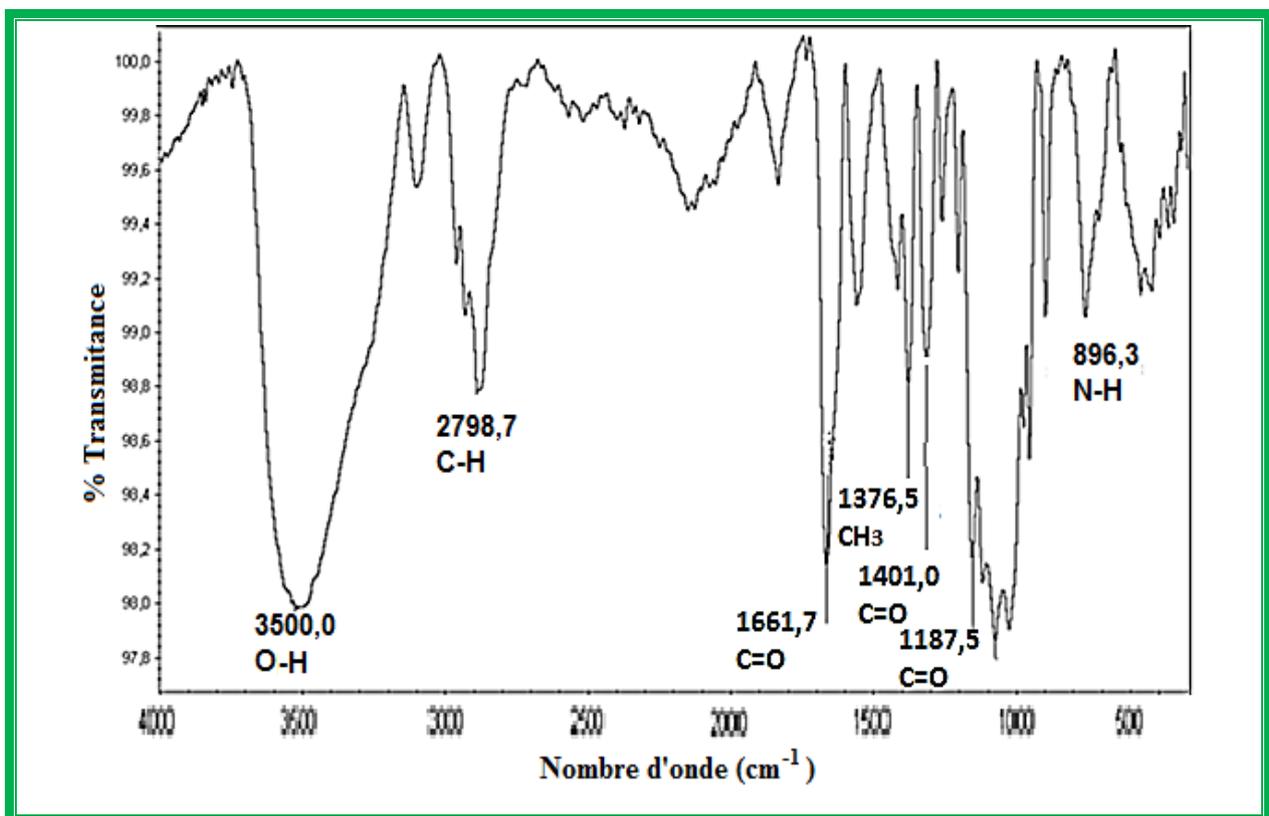


Figure 19 : Spectre FT-IR de la chitine

2.2- Préparation et caractérisation du chitosane

Le chitosane a été obtenu par la désacétylation de la chitine. Les résultats de l'analyse du chitosane sont présentés sur le tableau IV.

Tableau IV : Résultats de l'analyse du chitosane

Taux de cendre (%)	0,18
Densité apparente	0,19
Densité réelle	0,99
Protéines (libres et liées) (%)	1,1
Viscosité (ml/g)	98,84
Poids moléculaire (kDa)	12
D.D.	78

La désacétylation a induit, en parallèle, une dépolymérisation. En effet, nous remarquons que l'étape de désacétylation fait chuter le poids moléculaire à 12 kDa (la chitine ayant un poids moléculaire de 388 kDa). Ceci est dû aux hautes températures utilisées associées à la présence d'une base forte (NaOH).

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. 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**). Le degré de désacétylation peut être augmenté en répétant plusieurs fois la réaction (**KIM *et al.*, 2000**).

La désacétylation de la chitine (degré de désacétylation de 35 %) a permis l'augmentation de son degré de désacétylation jusqu'à la transformer en chitosane (degré de désacétylation de 78 %).

La viscosité du chitosane (98,84 ml/g) a été déterminée à partir de de la figure 20. Pour cela, l'ordonnée à l'origine de la droite tracée viscosité réduite (η_r) en fonction de la concentration est déterminée. De même, l'ordonnée à l'origine de la droite tracée viscosité inhérente (η_i) en fonction de la concentration est déterminée. La moyenne des deux valeurs est la viscosité intrinsèque du chitosane (98,84 ml/g).

Plusieurs auteurs ont proposé des optimums de désacétylation (sans mentionner la source de la chitine) 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, 2001). D'autres auteurs ont proposé :

- ◆ du NaOH à 50 % avec un rapport base/chitine (chitine du krill *Euphasia superba*) de 1/10 g/ml à la température de 140 °C pendant 1 heure (KOLODZIEJSKA *et al.*, 2000).
- ◆ du NaOH à 50 % et un rapport base/chitine (chitine de la langouste) de 1/25 g/ml à la température de 80 °C pendant 96 heures (MUKHERJEE, 2001).
- ◆ du NaOH à 50 % avec un rapport base/chitine (sans mentionner la source de la chitine) de 1/50 g/ml à la température de 95 °C pendant 3 heures (MIRZADEH *et al.*, 2002).

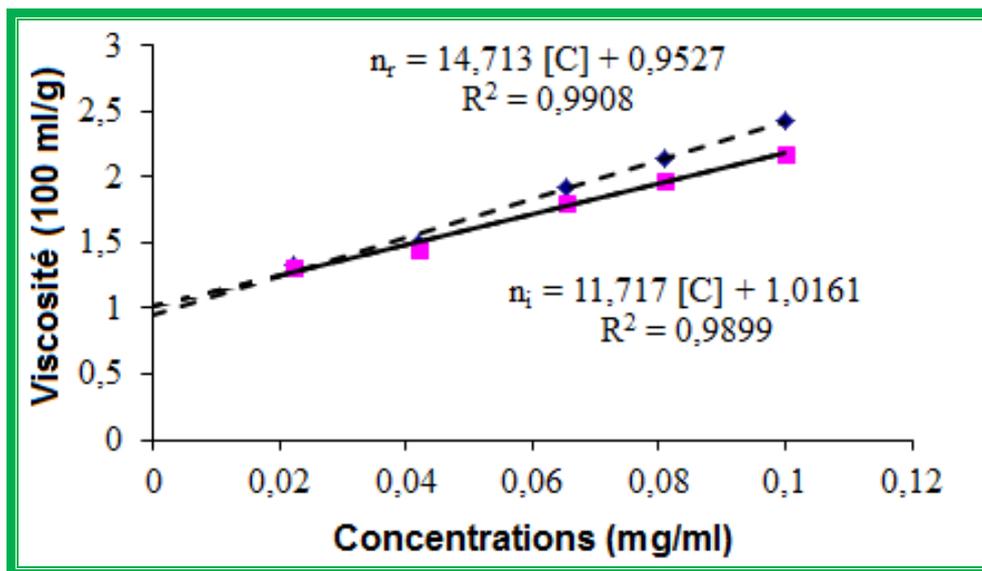


Figure 20 : Variation de la viscosité du chitosane en fonction de la concentration

Lors de cette étude, nous avons désacétylé la chitine selon la méthode de **KURITA *et al.* (2003)**. En effet, cette dernière semble moins drastique, permettant de limiter la dépolymérisation du chitosane. Cette méthode préconise la préparation du chitosane avec 10 ml de NaOH à 50 % pour 1 g de carapace à 95 °C sous agitation constante pendant 3 heures. Cependant, les résultats montrent qu'il y a eu, en parallèle, une dépolymérisation du chitosane (poids moléculaire 12kDa) (**Tableau IV**).

Il est à noter aussi que la désacétylation a induit un blanchiment de la chitine. En effet, la chitine obtenue est de couleur de blanc cassé. Par contre, le chitosane obtenu a une couleur plus claire. Certainement que les pigments sont liés, du moins partiellement, aux groupements acétylés de la chitine. De ce fait, la désacétylation de la chitine a permis sa dépigmentation en parallèle.

Le spectre FT-IR du chitosane (**Figure 21**) a confirmé la bonne désacétylation de la chitine. Celle-ci est montrée par :

- ◆ L'augmentation du nombre de groupements NH_2 représentée par l'augmentation des pics à $708,7 \text{ cm}^{-1}$, $1572,4 \text{ cm}^{-1}$ et $3111,7 \text{ cm}^{-1}$.
- ◆ La diminution du nombre de groupements $\text{C}=\text{O}$ représentée par la diminution du pic à $1661,7 \text{ cm}^{-1}$ présent au niveau de la chitine (**Figure 19**).

Ceci confirme la disparition d'un certain nombre de groupements acétyle ($-\text{CO}-\text{CH}_3$) au profit de la libération du même nombre de groupements amines (NH_2) grâce au processus de désacétylation employé, indiquant la transformation de la chitine en chitosane.

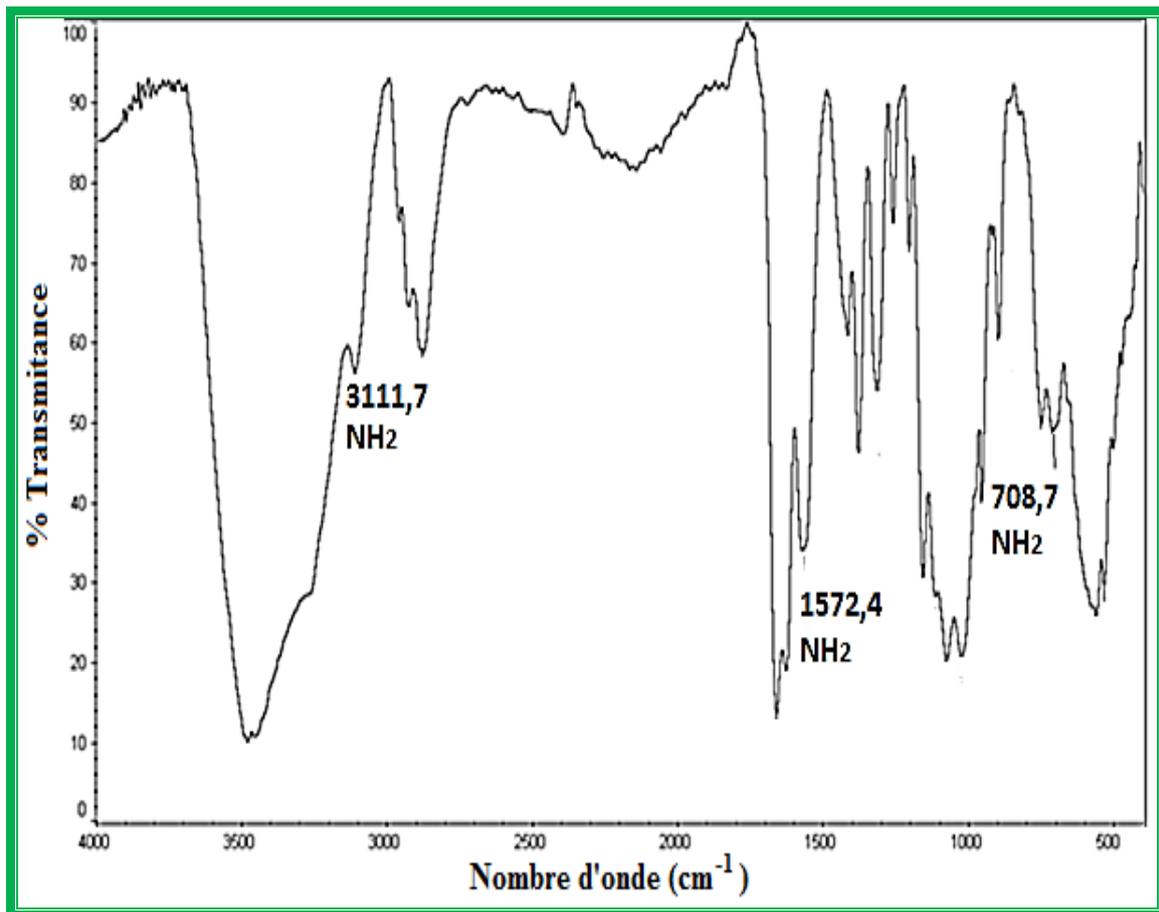


Figure 21 : Spectre FT-IR du chitosane

2.3- Dépolymérisation de la chitine et du chitosane et caractérisation des produits

La dépolymérisation de la chitine et du chitosane a été effectuée en utilisant de l'acide chlorhydrique comme préconisé par **CHANG *et al.* (2000)**. D'autres auteurs utilisent d'autres acides mais ils obtiennent des hydrolysats d'assez hauts poids moléculaires. C'est le cas de **JIA et SHEN (2002)** qui ont hydrolysé le chitosane avec de l'acide phosphorique et ont obtenu des chitosanes de poids moléculaires assez élevés (71 à 214 kDa). D'autres utilisent de l'acide fluorhydrique pour la dépolymérisation (**MURAKI *et al.*, 1993**). Cette hydrolyse peut être effectuée, aussi, avec des bases mais le degré d'hydrolyse est faible (**ANONYMOUS,**

2003). D'autres auteurs utilisent les rayons γ pour dépolymériser le chitosane (LIU *et al.*, 2000). Il est à noter aussi que les chitoooligosaccharides peuvent aussi être obtenus par synthèse (PERNET-POIL-CHEVRIER, 2009).

Dans la présente étude, l'hydrolyse de la chitine n'a pas permis la production de N acétyl chitoooligosaccharides (2 à 10 monomères) mais d'une chitine de faible poids moléculaire (11 monomères). Le poids moléculaire de cette dernière (estimé par FPLC) étant de 2480 Da. Cette observation a été confirmée par l'absence de pics caractéristiques d'oligosaccharides au niveau des spectres $^{13}\text{CRMN}$ (Figure 22), $^1\text{HRMN}$ (Figure 23) et HPAEC (Figure 24).

En effet, dans la figure 24, le spectre $^{13}\text{CRMN}$ ne présente aucun pic correspondant à un C6. Ce dernier devrait se situer à des concentrations variant entre 59,6 et 60,8 ppm (Annexe 12). Ceci indique l'absence d'oligosaccharides contenant des hexoses.

D'autre part, dans la figure 25, le spectre $^1\text{HRMN}$ ne présente aucun pic correspondant à une N acétyl glucosamine ou à une glucosamine. Celui-ci devrait se situer à des concentrations variant entre 3,18 et 4,97 ppm, tel le profil indiqué en annexe 12. Ceci indique l'absence d'oligosaccharides contenant des N acétyl glucosamines ou des glucosamines.

En ce qui concerne la figure 26, le spectre HPAEC ne présente aucun pic. En effet, la technique HPAEC permet d'obtenir un chromatogramme composé d'un premier plateau, contenant les pics des monosaccharides présents, et un second plateau surélevé (haut plateau) contenant les pics des et monosaccharides acides et oligosaccharides. A titre d'exemple, le chromatogramme de la glucosamine a été présenté en annexe 12.

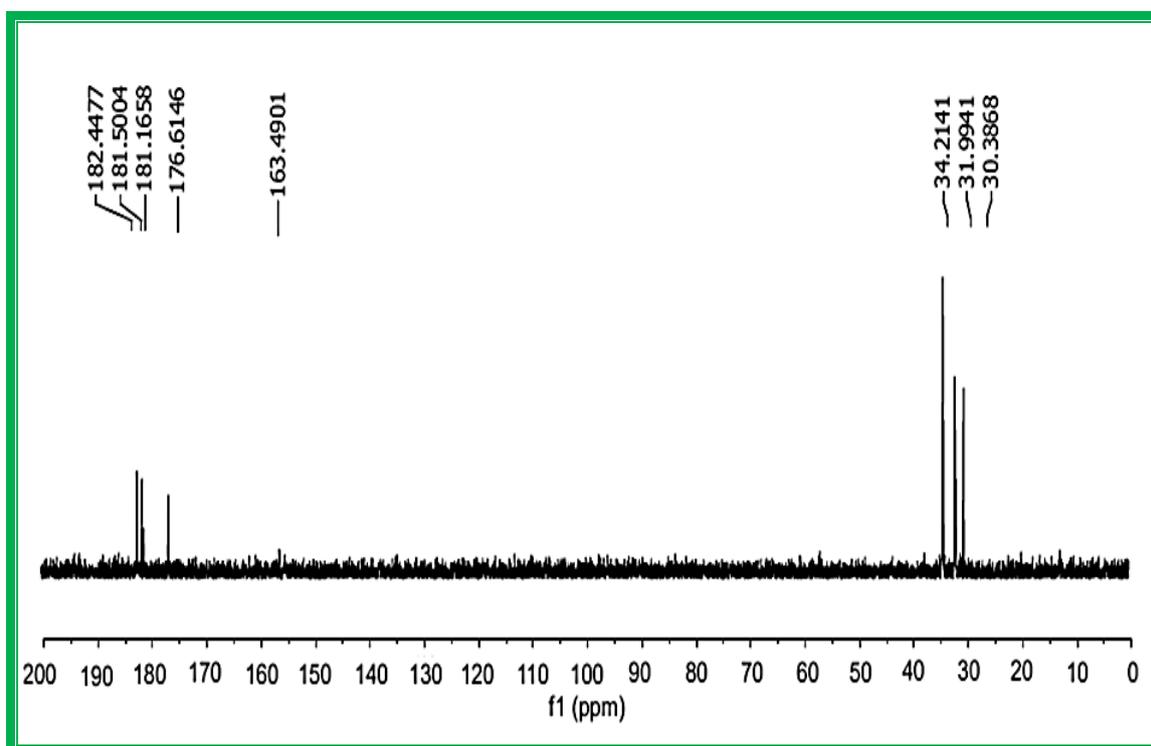


Figure 22 : Spectre $^{13}\text{CRMN}$ de la chitine de faible poids moléculaire

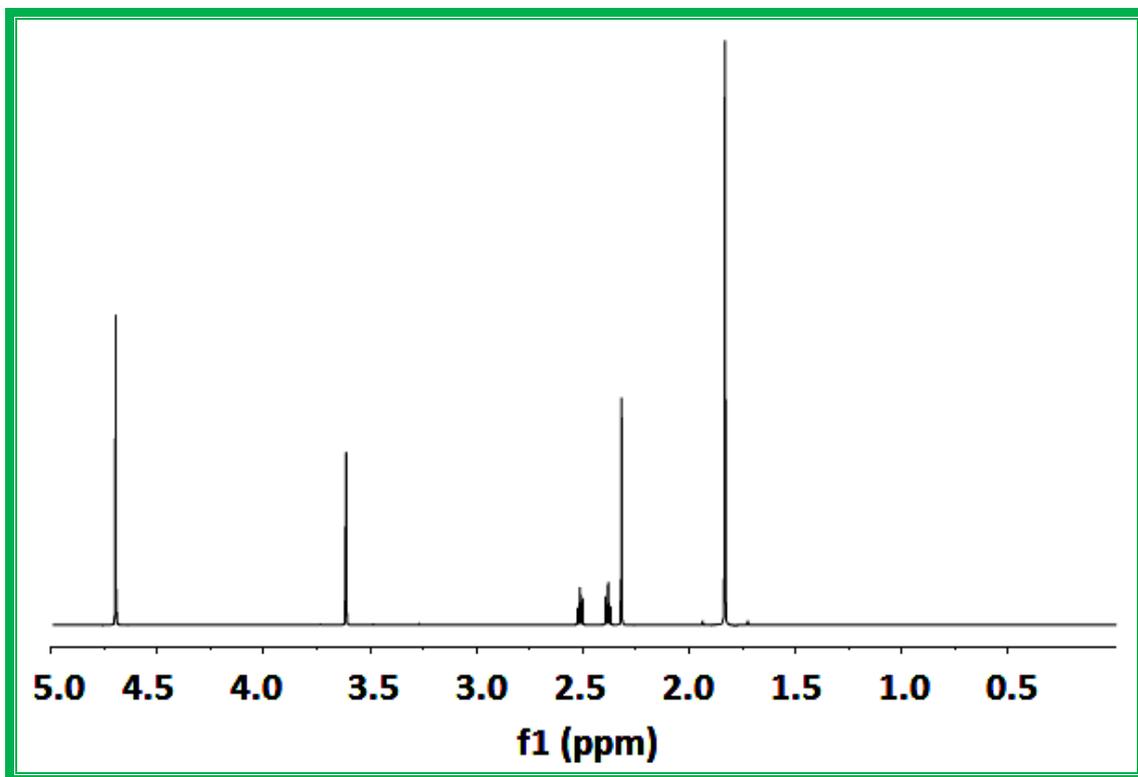


Figure 23 : Spectre $^1\text{HRMN}$ de la chitine de faible poids moléculaire

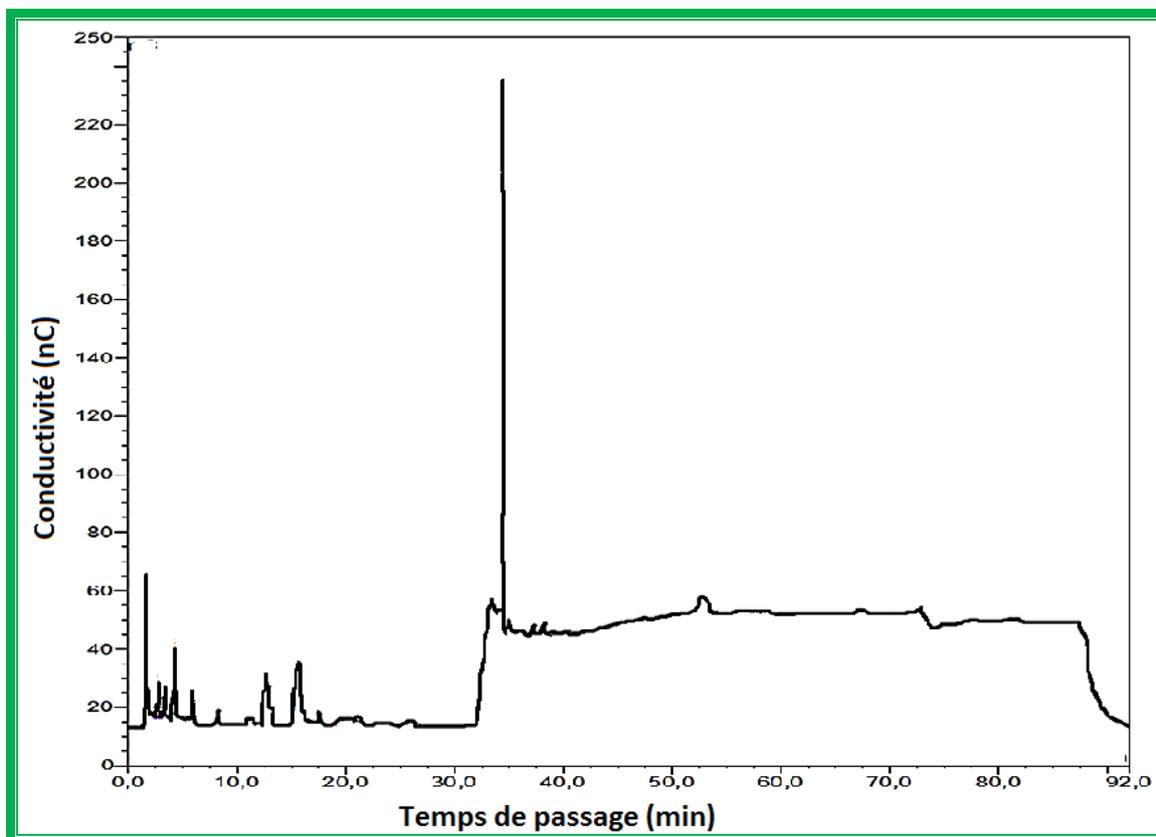


Figure 24 : Spectre HPAEC de la chitine de faible poids moléculaire

Le spectre FT-IR de la chitine de faible poids moléculaire (**Figure 25**) a démontré qu'il y a eu, pendant l'hydrolyse de la chitine, la désacétylation de cette dernière, causée par

les fortes concentrations en acide chlorhydrique. Ce phénomène a été décrit dans la littérature en ce qui concerne le chitosane et non la chitine par **VARUM *et al.* (2001)**.

Ces observations sont confirmées par :

- ◆ La diminution du nombre de groupements CH_3 représentée par le pic à $1376,5 \text{ cm}^{-1}$ présent au niveau du spectre de la chitine (**Figure 19**).
- ◆ La diminution du nombre de groupements $\text{C}=\text{O}$ représentée par le pic à $1187,5 \text{ cm}^{-1}$ et le pic à $1401,0 \text{ cm}^{-1}$, tous deux présents au niveau du spectre de la chitine (**Figure 19**)
- ◆ L'augmentation du nombre de groupements NH représentée par le pic à $563,0 \text{ cm}^{-1}$ (**Figure 25**).

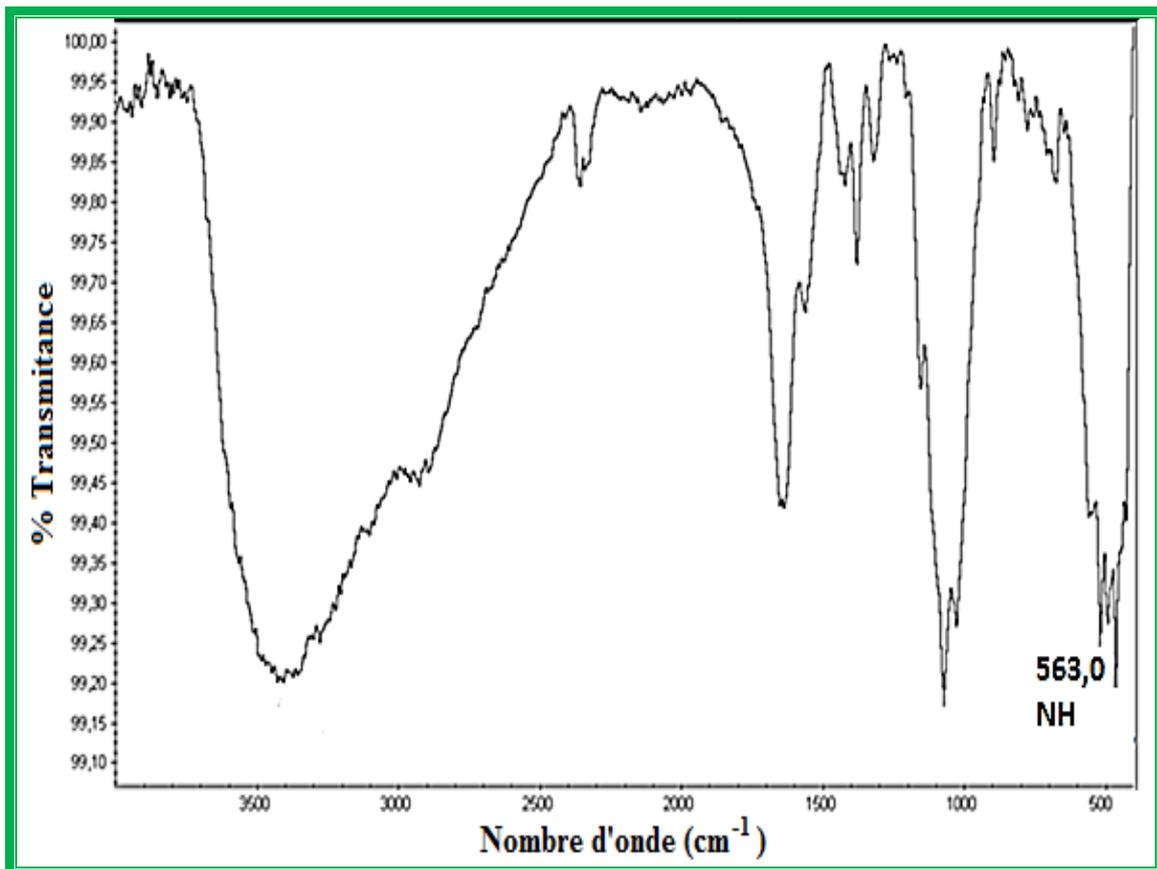


Figure 25 : Spectre FT-IR de la chitine de faible poids moléculaire

Le spectre FT-IR du produit d'hydrolyse du chitosane (**Figure 26**) montre diminution de certains pics qui auraient dû rester constants. En effet, la figure 28 montre une diminution du nombre de groupements NH_2 (pics à $708,7 \text{ cm}^{-1}$, $1572,4 \text{ cm}^{-1}$ et $3111,7 \text{ cm}^{-1}$) (**Figure 21**). Ce produit ne peut donc pas correspondre aux chitooligosaccharides car la réaction de dépolymérisation du chitosane ne devrait pas toucher les groupements amines (NH_2) du chitosane. Il ne devrait donc y avoir ni augmentation ni diminution du nombre de ces groupements. Toutefois, le produit en question n'a pas été identifié et de ce fait, il a été nommé « chitooligosaccharides ».

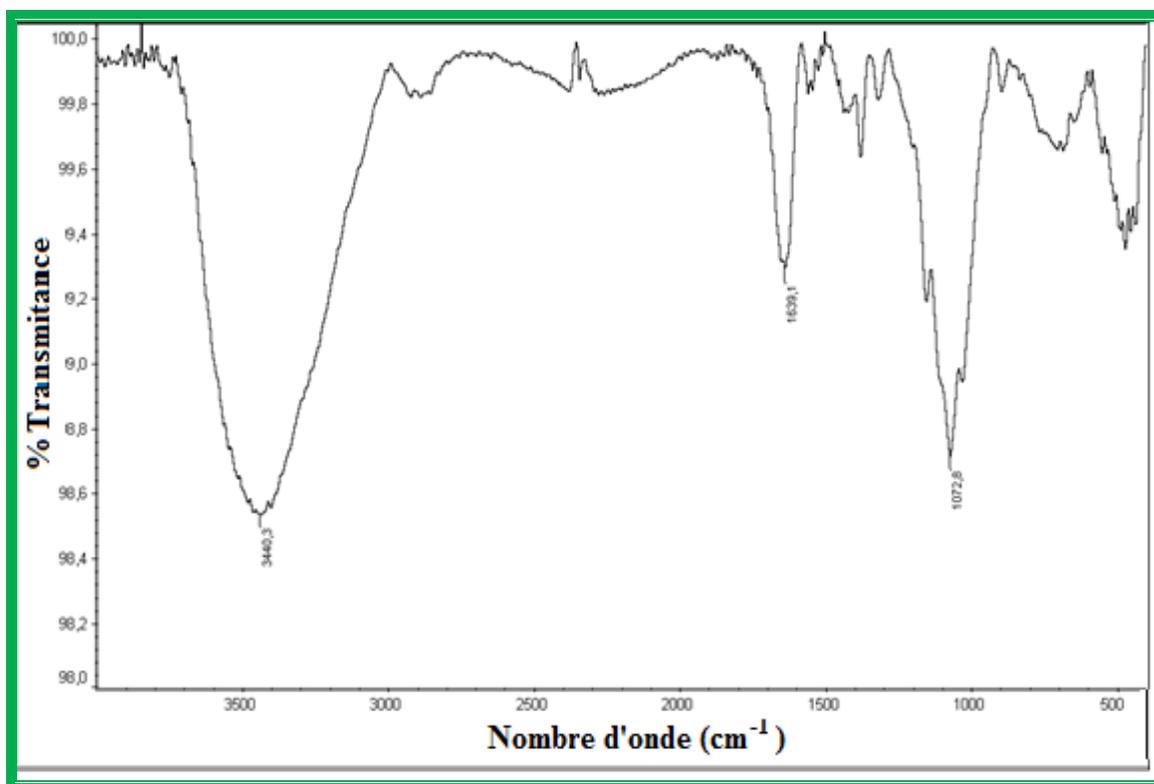


Figure 26 : Spectre FT-IR des « chitoooligosaccharides »

2.4- Carboxyméthylation de la chitine et du chitosane et caractérisation des produits

La carboxyméthylation de la chitine a donné un spectre FT-IR (**Figure 27**) avec des pics qui ne correspondent pas à ceux du O-carboxyméthyle chitine. En effet, il y a apparition d'un à pic à $771,5 \text{ cm}^{-1}$ correspondant aux groupements CH_2 dues à la méthylation de la chitine. Il y a eu, aussi, disparation du pic à $896,3 \text{ cm}^{-1}$ (**Figure 19**) correspondant à la disparition des groupements amine ce qui donnerait un N-carboxyméthyle chitine et non un O-carboxyméthyle chitine. Dans le doute, nous préférons nommer ce produit carboxyméthyle chitine.

Le spectre FT-IR du N,O-carboxyméthyle chitosane (**Figure 28**) est très semblable à celui du chitosane (**Figure 21**). A l'évidence, la réaction de carboxyméthylation du chitosane n'a pas abouti au produit attendu car on ne retrouve pas de pic caractéristique du N,O-carboxyméthyle chitosane. Dans le doute, nous nommerons ce produit « N,O-carboxyméthyle chitosane ».

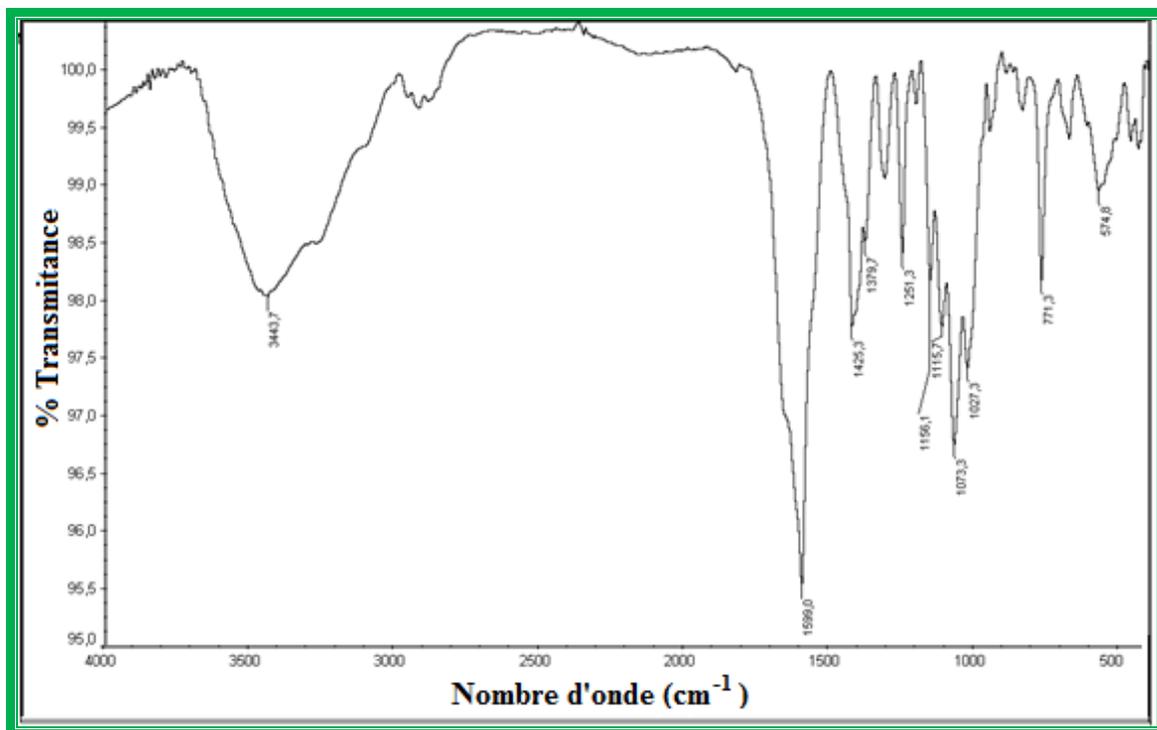


Figure 27 : Spectre FT-IR du carboxyméthyle chitine

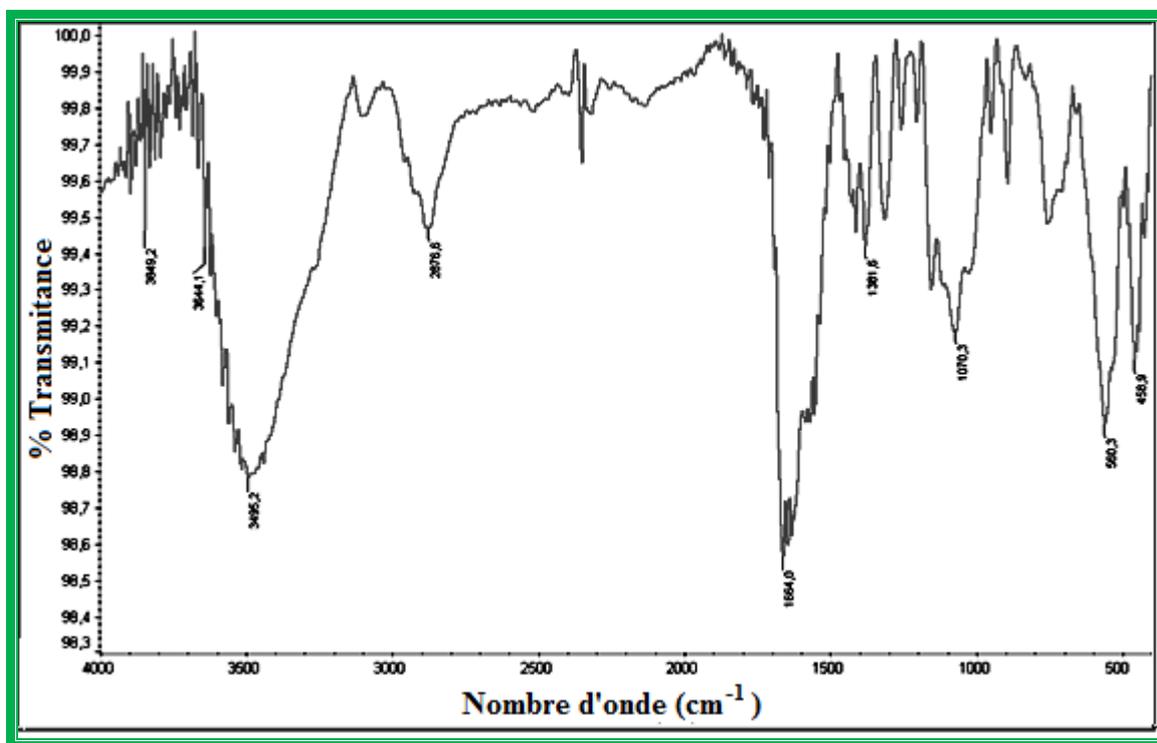


Figure 28 : Spectre FT-IR du « N,O-carboxyméthyle chitosane »

2.5- Carboxylation des produits de dépolymérisation de la chitine et du chitosane et leur caractérisation

Le spectre FT-IR de la carboxylation des produits de dépolymérisation de la chitine est illustré sur la figure 29. En comparant cette dernière à la figure 25, on remarque que :

- ◆ Le pic à $744,1\text{ cm}^{-1}$ a disparu, ce qui correspond à la disparition des groupements C-H.
- ◆ Il y a eu apparition d'un pic à 1896 cm^{-1} qui correspond à l'augmentation du nombre de groupements C=O.
- ◆ Il y a eu apparition d'un pic à 2542 cm^{-1} , correspondant à l'augmentation du nombre de groupements H-C=O.
- ◆ Il y a eu apparition d'un pic à 2896 cm^{-1} qui indique à l'augmentation du nombre de groupements C-H.
- ◆ Il y a eu diminution du pic à $1669,7\text{ cm}^{-1}$ indiquant une carboxylation des groupements NH_2 .

Dans le doute, ce produit a été nommé « carboxychitine de faible poids moléculaire ».

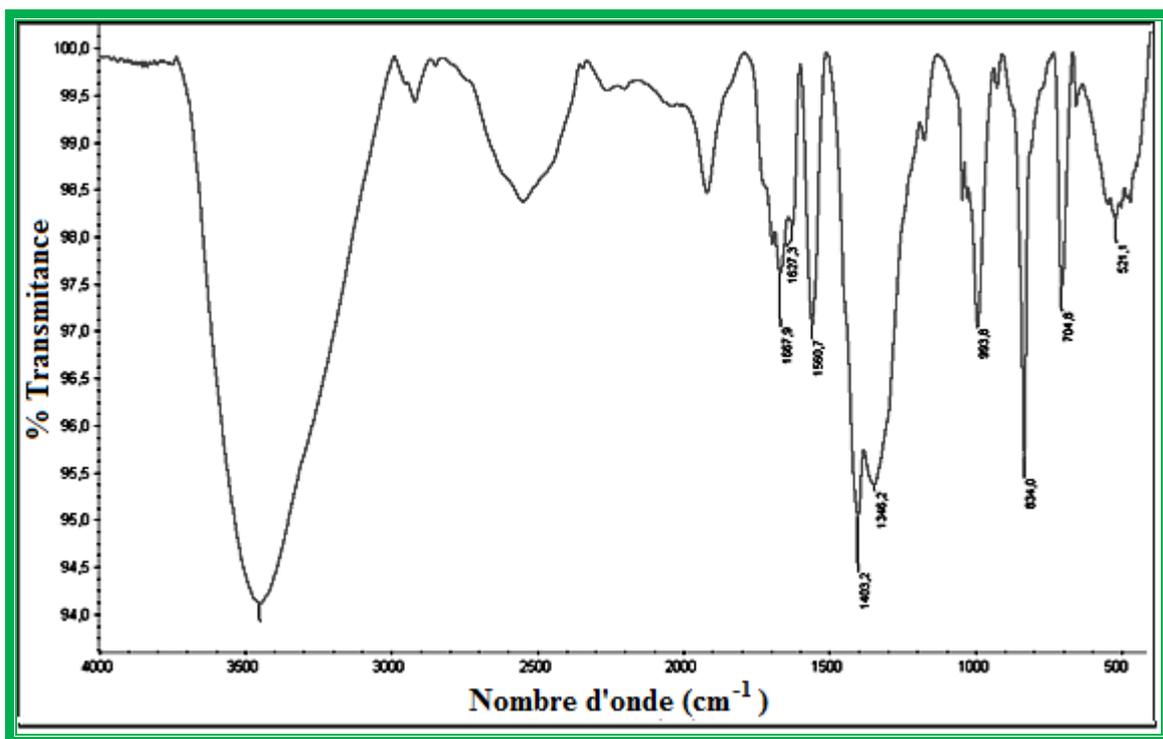


Figure 29 : Spectre FT-IR de la « carboxychitine de faible poids moléculaire »

Le spectre FT-IR de la carboxylation du produit de dépolymérisation du chitosane (**Figure 30**) ne montre aucun pic caractéristique correspondant à cette réaction. Il y a eu apparition de nouveaux pics ne pouvant être interprétés (**Figure 26**). Ce produit sera nommé « carboxychitooligosaccharides ».

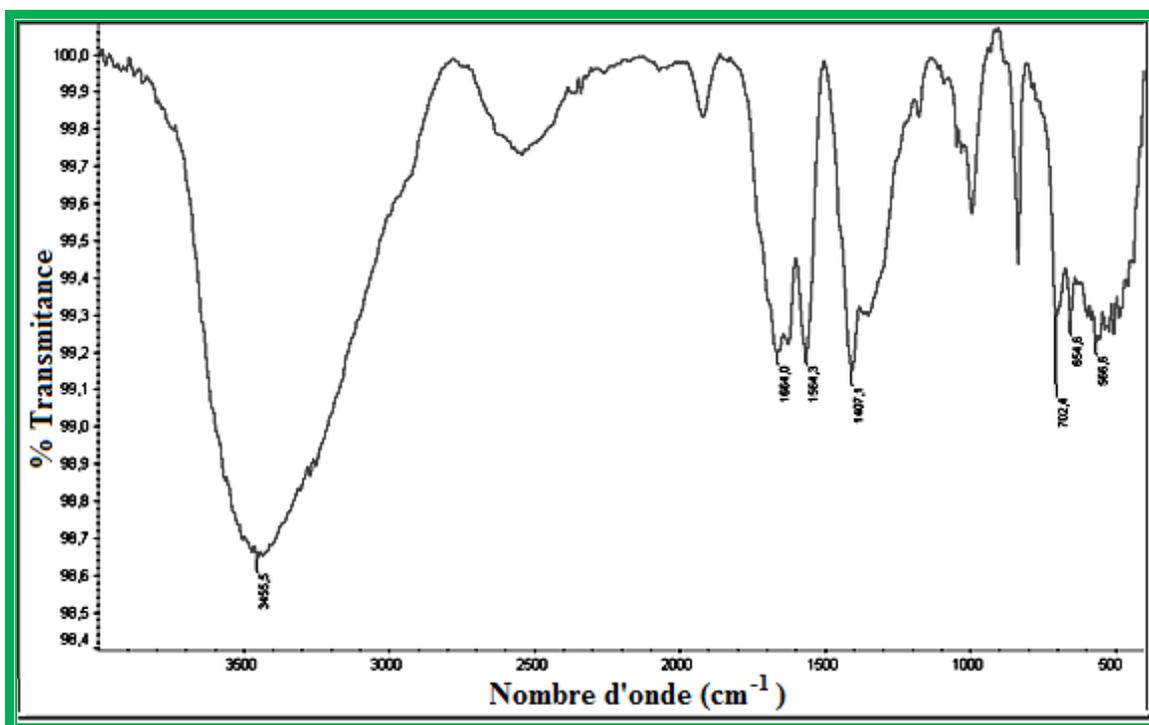


Figure 30 : Spectre FT-IR des « carboxy chitoooligosaccharides »

2.6- Préparations de la 2-phtalimido chitine et du 2-phtalimido chitosane et caractérisation des produits

Le produit de l'adjonction du groupement phtalimide à la chitine a donné le spectre FT-IR illustré sur la figure 31. Ce spectre ne montre pas le pic caractéristique correspondant à cette synthèse. Ce dernier devrait se situer entre 1700 cm^{-1} et 1850 cm^{-1} et correspondre au groupement C=O cycliques. Dans le doute, ce produit a été nommé « 2-phtalimido chitine ». De même, le produit de l'adjonction du groupement phtalimide au chitosane a donné le spectre FT-IR illustré sur la figure 32. Ce spectre ne montre pas le pic caractéristique correspondant à cette synthèse. Ce dernier devrait se situer entre 1700 cm^{-1} et 1850 cm^{-1} et correspondre au groupement C=O cycliques. Dans le doute, ce produit a été nommé « 2-phtalimido chitosane ».

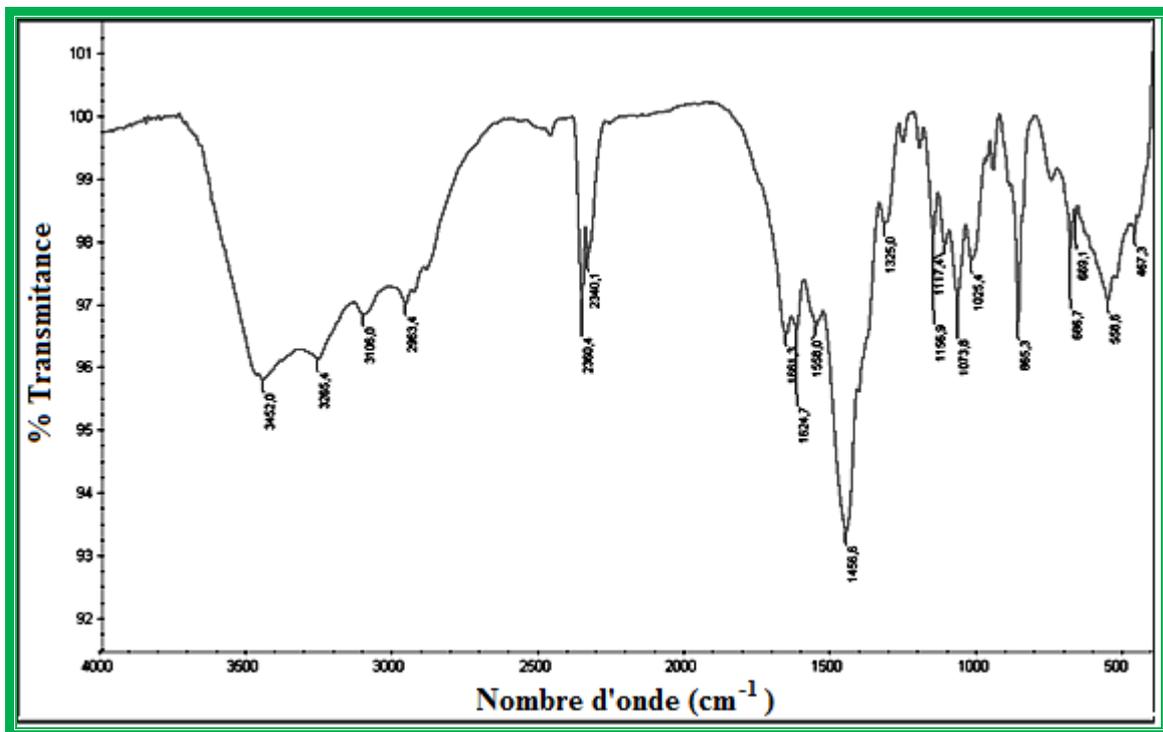


Figure 31 : Spectre FT-IR de la « 2-phthalimido chitine »

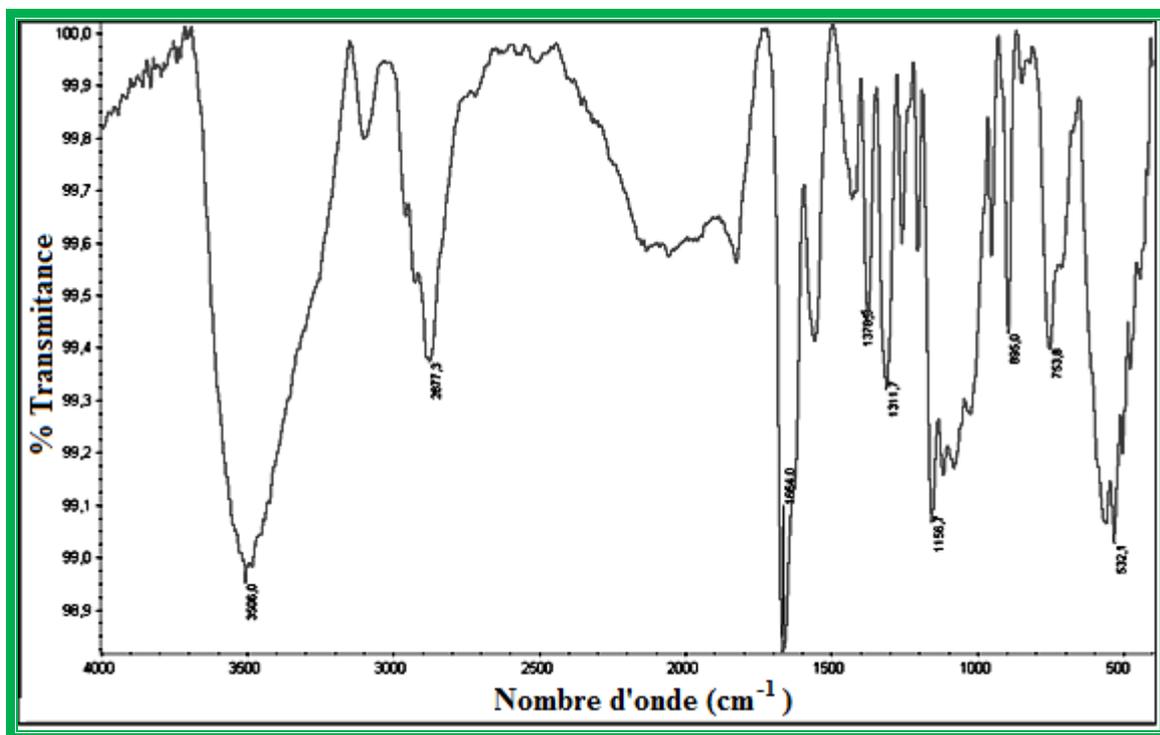


Figure 32 : Spectre FT-IR du « 2-phthalimido chitosane »

2.7- Préparation et caractérisation du chitosane oxydé

Le degré d'oxydation du chitosane oxydé a été estimé, par conductimétrie (**Figure 33**), à approximativement 94 %. Ce degré d'oxydation est cohérent avec la valeur de la solubilité apparente. Le poids moléculaire estimé par SEC-MALLS est de $2,1 \times 10^3$ g/mol, ce qui

correspond approximativement à un degré de polymérisation (DP) de 13. Ceci suggère qu'il y a eu dépolymérisation du chitosane lors de son oxydation.

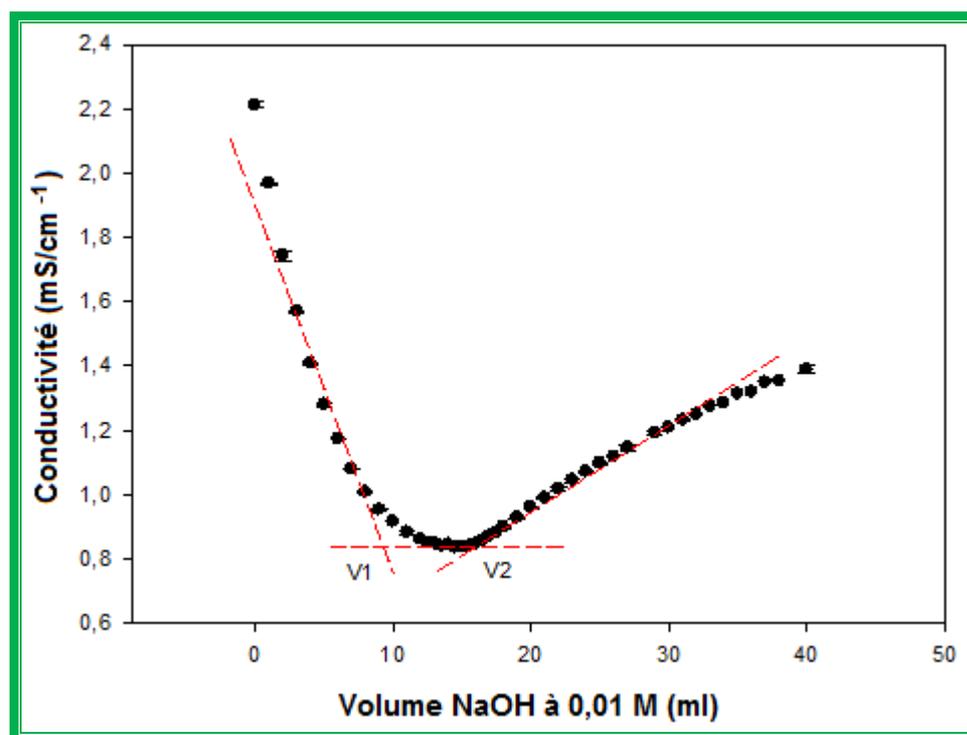


Figure 33 : Courbe de détermination du degré d'oxydation du chitosane oxydé par conductimétrie

2.8- Préparation des oligochitosanes oxydés

Pour préparer des oligochitosanes oxydés, des essais de dépolymérisation du chitosane oxydé avec deux enzymes, que sont la glucuronane lyase et la cellulase, ont été entrepris.

2.8.1- Dépolymérisation du chitosane oxydé à l'aide de la glucuronane lyase

La glucuronane lyase produite par la souche mutante *rhizobium meliloti* m5n1 cs (ncimb 40 472) a été testée vis-à-vis du chitosane oxyde produit. En effet, cette enzyme est reconnue capable de cliver les liaisons β (1-4) des polysaccharides (DELATTRE *et al.*, 2006). L'action de la glucuronane lyase sur le chitosane oxyde a été mise en évidence par spectrophotométrie. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 34.

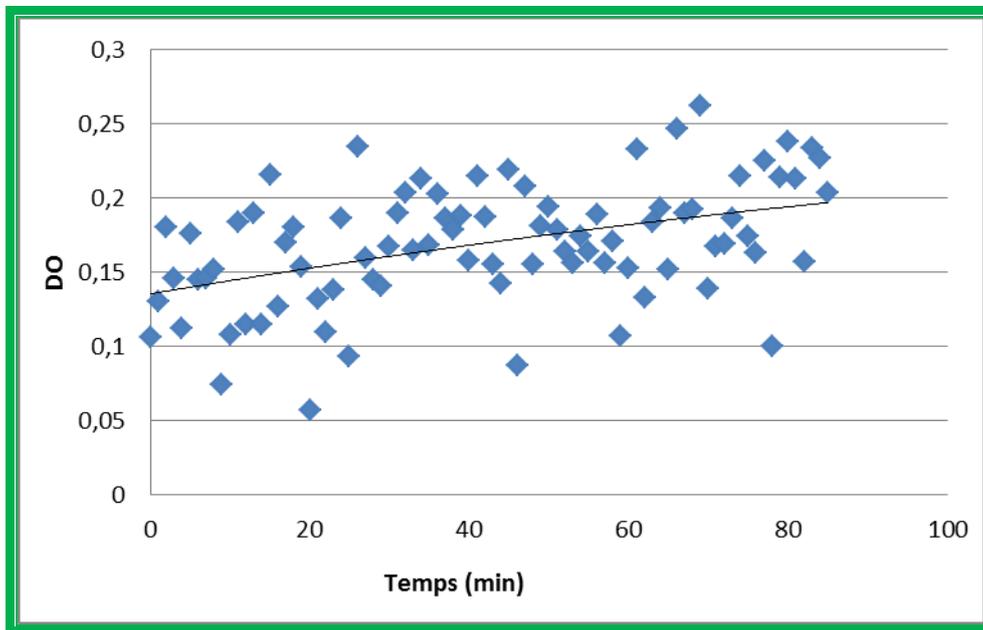


Figure 34 : Cinétique de dégradation du chitosane oxydé par la glucuronane lyase

Les résultats obtenus montrent que la glucuronane lyase est incapable de dégrader le chitosane oxydé. Ceci est probablement dû à la spécificité accrue de cette enzyme pour son substrat (le glucuronane) (annexe 13). Il est clair que d'après les résultats obtenus la glucuronane lyase est capable de couper la liaison β (1-4) séparant les monomères mais elle est incapable de reconnaître le chitosane oxyde en tant que substrat.

2.8.2- Dépolymérisation du chitosane oxydé à l'aide de la cellulase

La cellulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 a été testée. Cette enzyme est capable de cliver les liaisons β (1-4) des polysaccharides (NIDETZKY *et al.*, 1994). L'action de la cellulase sur le chitosane oxydé a été mise en évidence par le dosage des sucres réducteurs. Les résultats obtenus sont illustrés sur la figure 35.

Les résultats obtenus montrent que la cellulase a pu dégrader le chitosane oxydé. Selon la courbe étalon (annexe 13), il y a libération de 9,7 mg de sucres réducteurs glucose équivalent au bout d'une heure par millilitre de volume réactionnel. Ce qui représente un faible taux de dégradation. De plus, l'erreur semble très grande. De ce fait, il semblerait que la cellulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 soit incapable de dégrader efficacement le chitosane oxydé.

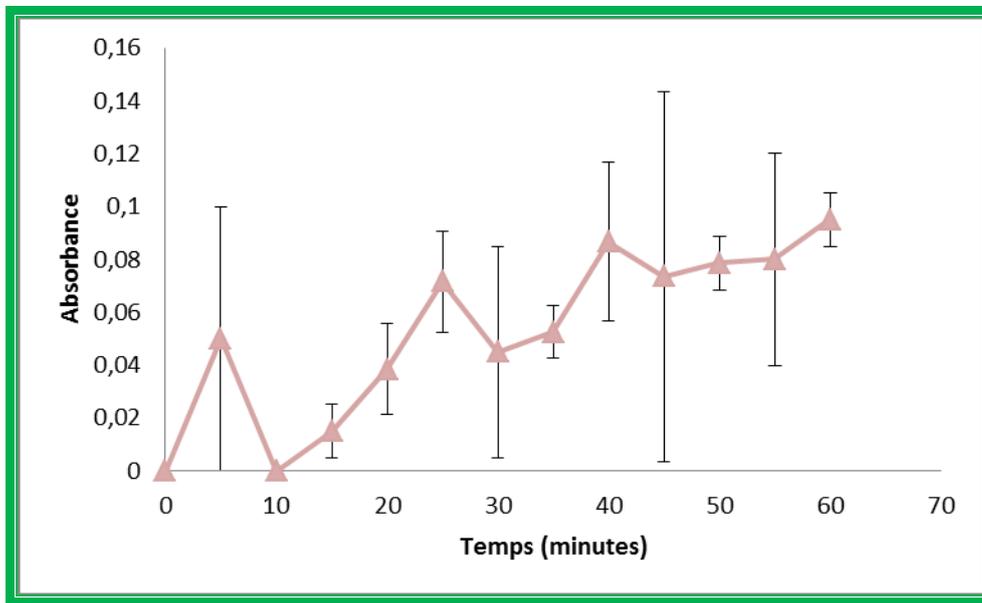


Figure 35 : Cinétique de dégradation du chitosane oxydé par la cellulase

Ainsi, les deux essais de dépolymérisation du chitosane oxydé n'ont pas permis de produire des oligochitosanes oxydés.

3- Applications de la chitine et de ses dérivés

L'ETR est une détermination statistique basée sur la propagation des résultats par rapport à la moyenne. Le résultat est exprimé en pourcentage - Un pourcentage faible (< 2,5 %) signifie que la propagation des résultats est faible tandis qu'une valeur plus élevée indique une grande dispersion des résultats. L'ETR du test au bleu de Trypan est de 2,7 % et celle du test au MTT est de 1,41 %. Ceci prouve que les deux tests sont de bonnes méthodes pour estimer la viabilité cellulaire avec des répétabilités intéressantes mais la meilleure est celle du MTT. Cette dernière ayant un ETR < 2,5 %.

3.1- Etude de l'activité antitumorale

Le cancer étant la deuxième cause de mortalité chez l'être humain, la recherche de nouveaux principes actifs de plus en plus efficaces reste un problème d'actualité. De ce fait, nous nous sommes intéressés à la synthèse de nouvelles molécules potentiellement actives en vue de leur application au traitement d'un certain nombre de cancers et ne présentant pas tous les inconvénients des autres traitements.

3.1.1- Etude de l'innocuité sur les cellules saines

Afin de prouver l'innocuité de la chitine et de ses dérivés, il a été envisagé d'étudier l'effet de ces derniers sur une lignée humaine saine, MRC-5. Les concentrations testées étaient 0, 1, 50, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 et 3000 µg/ml. Après 24 heures d'exposition, il a été démontré une absence totale (100 % de viabilité) d'effet cytotoxique, de

la chitine et de ses dérivés sur la croissance de la lignée humaine normale MRC-5, à des concentrations égales ou inférieures à 2000 µg/ml. Par ailleurs, la chitine et la « 2 phtalimido chitine » n'ont aucun effet cytotoxique (100 % de viabilité) même à 2500 µg/ml (**Figures 36, 37, 38 et 39**).

Malheureusement, faute de moyens, il n'a pas été possible de tester l'activité cytotoxique du chitosane oxydé vis-à-vis de la lignée MRC-5.

Nos résultats démontrent l'innocuité de la chitine et de ses dérivés. D'autres auteurs ont travaillé sur d'autres dérivés de la chitine et ont trouvé des résultats similaires. L'aminoethyl-chitine, l'aminoethyl-chitosane, le diméthylaminoethyl-chitosane et le diéthylaminoethyl-chitosane ont un effet faiblement cytotoxique sur la lignée MRC-5 (**JE et KIM, 2006 ; JE et al., 2006**).

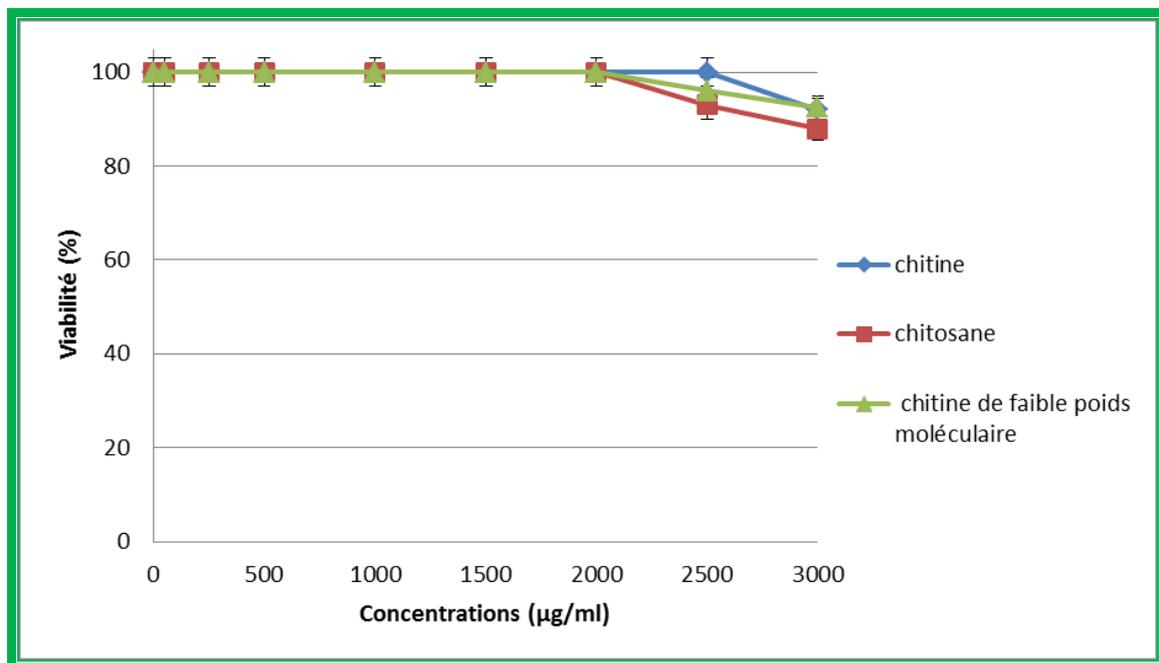


Figure 36: Activités cytotoxiques de la chitine, du chitosane et de la chitine de faible poids moléculaire sur la lignée MRC-5

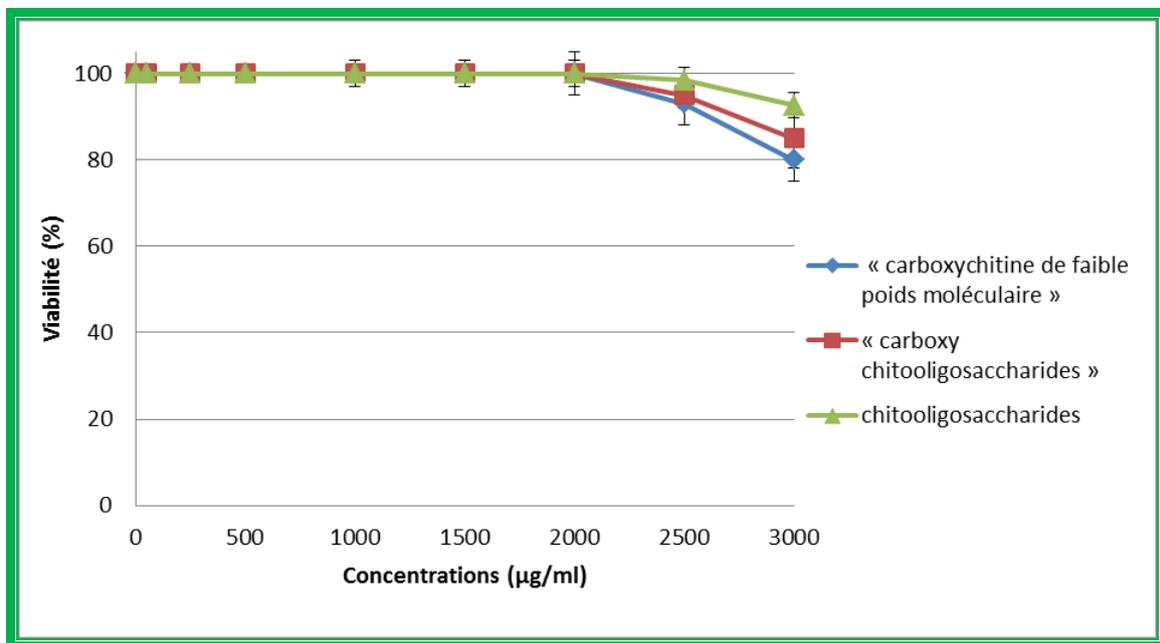


Figure 37 : Activités cytotoxiques de la « carboxychitine de faible poids moléculaire », des « carboxy chitoooligosaccharides » et des « chitoooligosaccharides » sur la lignée MRC-5

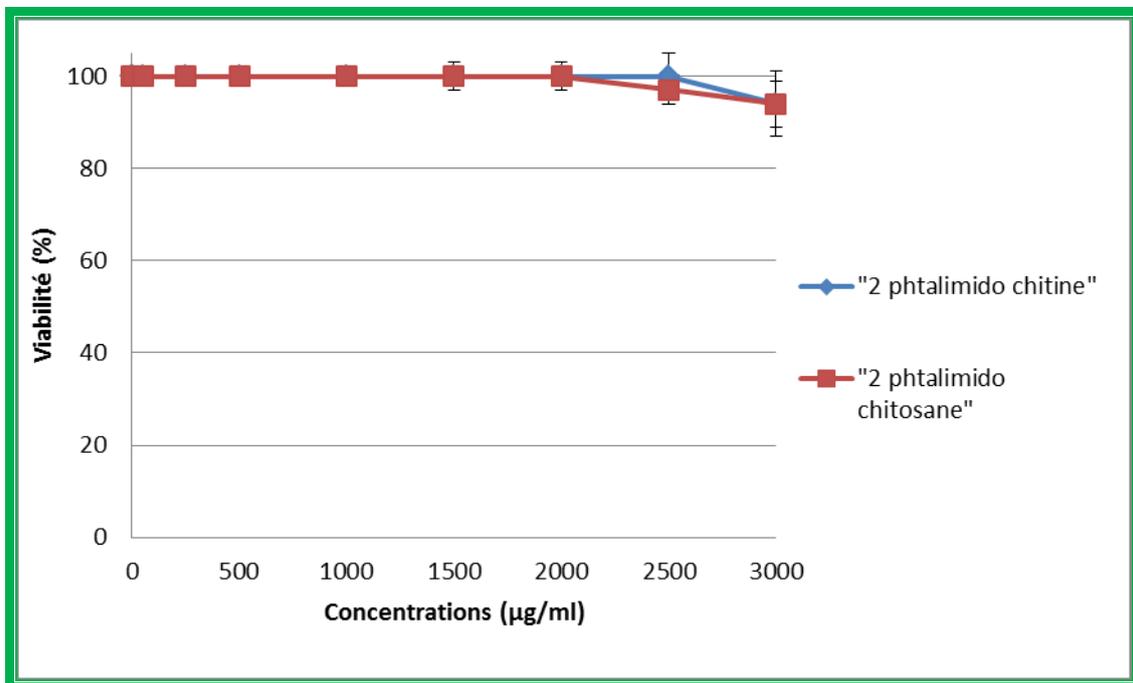


Figure 38 : Activités cytotoxiques de la « 2 phthalimido chitine » et du « 2 phthalimido chitosane » sur la lignée MRC-5

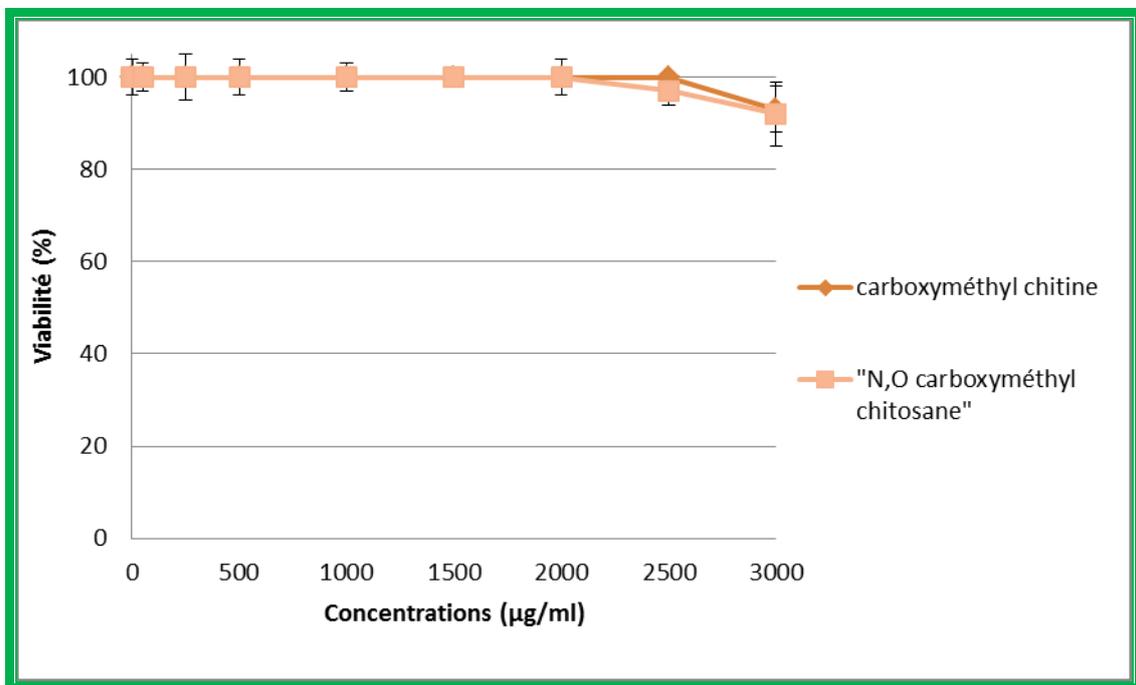


Figure 39 : Activités cytotoxiques de la carboxyméthyle chitine et du « N,O carboxyméthyle chitosane » sur la lignée MRC-5

3.1.2- Etude de l'activité antitumorale sur la lignée Hep-2

L'étude de l'activité antitumorale de la chitine et de ses dérivés a porté, dans un premier temps, sur la lignée humaine dérivée des cellules épithéliales du larynx atteintes d'un carcinome, Hep-2.

L'étude de l'activité anticancéreuse de la chitine et du chitosane sur la lignée Hep-2 a été effectuée en utilisant les concentrations non-cytotoxiques ($\leq 2000 \mu\text{g/ml}$).

La figure 40 indique que la chitine a un effet inhibiteur sur la lignée Hep-2 dose-dépendant. Elle peut inhiber la croissance des cellules Hep-2 à 100 % à des concentrations supérieures ou égales à $1500 \mu\text{g/ml}$. Le chitosane, quant à lui, n'inhibe la croissance des cellules Hep-2 à 100 % avec les concentrations testées. Il parvient, tout de même à diminuer la croissance des cellules Hep-2 à 80 % à partir de $1000 \mu\text{g/ml}$.

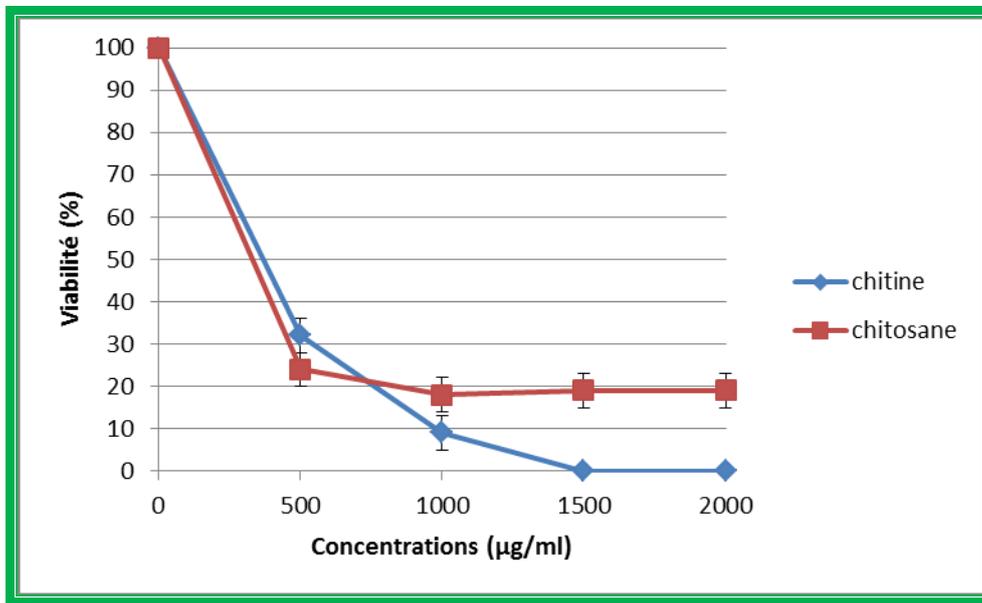


Figure 40 : Activités anticancéreuses de la chitine et du chitosane sur la croissance de la lignée Hep-2.

La figure 41 indique que la chitine de faible poids moléculaire inhibe la croissance des cellules Hep-2 à 100 % avec des concentrations égales ou supérieures à 500 µg/ml. Par contre, le chitosane oxydé n'inhibe pas la croissance des cellules Hep-2 à 100 % avec les concentrations testées. Les résultats obtenus indiquent que cette forme soluble du chitosane est de loin moins efficace que le chitosane.

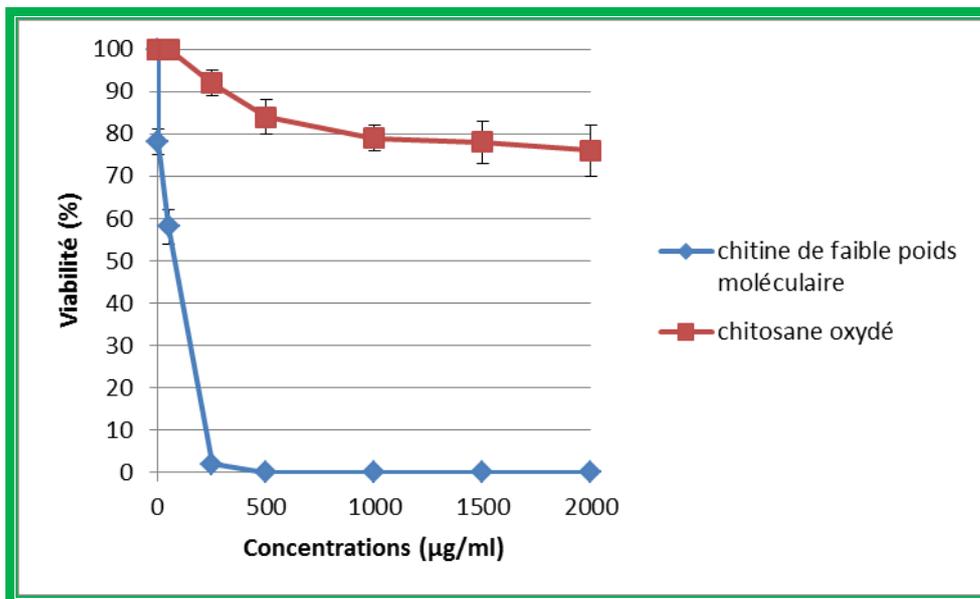


Figure 41 : Activités anticancéreuses de la chitine de faible poids moléculaire et du chitosane oxydé sur la croissance de la lignée Hep-2

La figure 42 démontre que le « N,O carboxyméthyle chitosane » et la « 2 phtalimido chitine » n'inhibent pas la croissance des cellules Hep-2 à 100 % avec les concentrations testées.

La figure 43 montre que les « chitoooligosaccharides » inhibent la croissance des cellules Hep-2 à 100 % avec des concentrations égales ou supérieures à 1000 µg/ml. Par contre, le « 2 phtalimido chitosane » n'inhibe pas la croissance des cellules Hep-2 à 100 % avec les concentrations testées.

La figure 44 montre que la « carboxychitine de faible poids moléculaire » inhibe la croissance des cellules Hep-2 à 100 % avec des concentrations égales ou supérieures à 250 µg/ml. De même, les « carboxy chitoooligosaccharides » inhibent la croissance des cellules Hep-2 à 100 % avec des concentrations égales ou supérieures à 500 µg/ml.

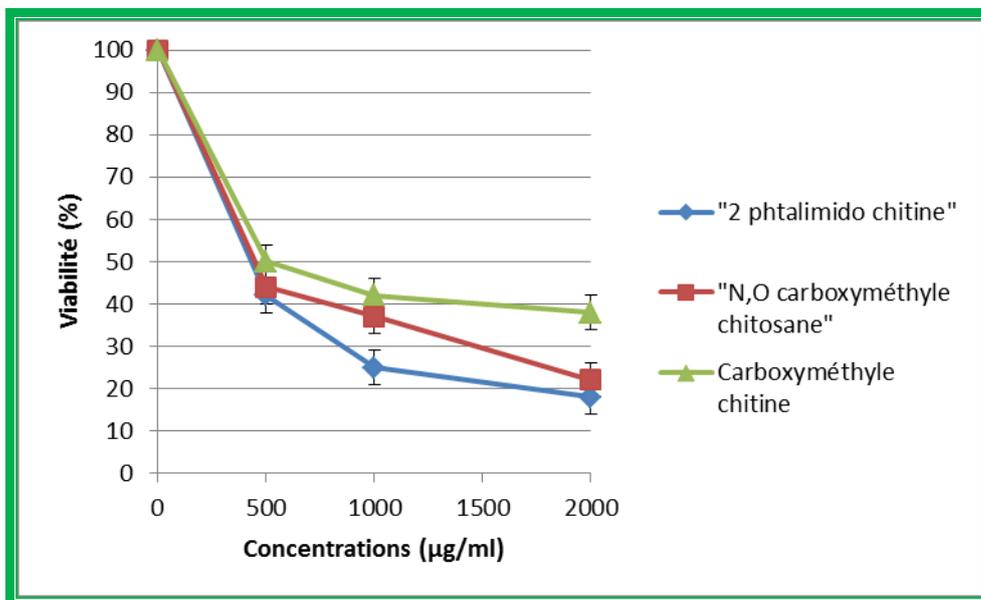


Figure 42 : Activités anticancéreuses de la « 2 phtalimido chitine », du « N,O carboxyméthyl chitosane » et du carboxyméthyle chitine sur la croissance de la lignée Hep-2

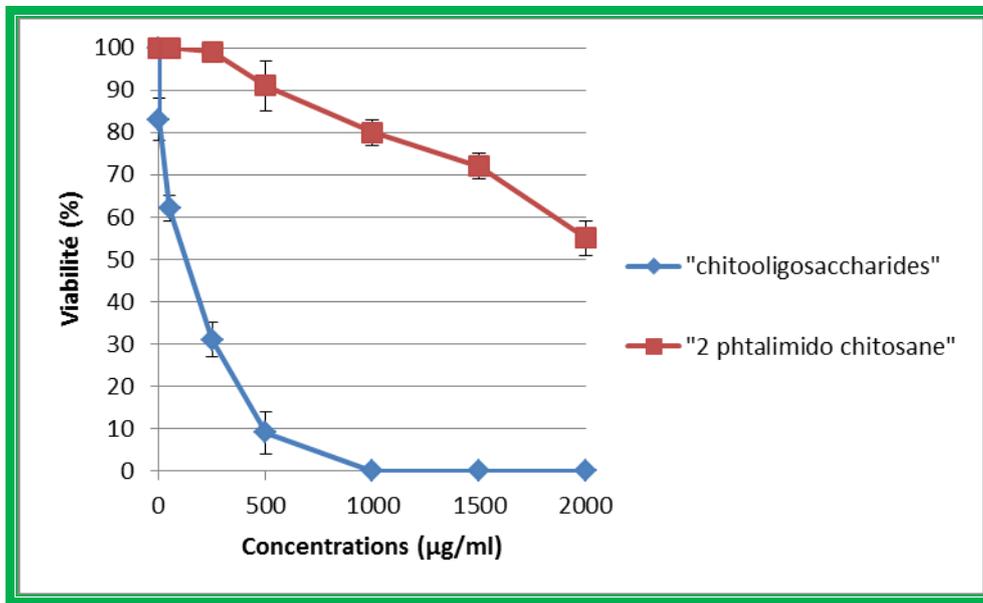


Figure 43 : Activités anticancéreuses des « chitoooligosaccharides » et du « 2 phtalimido chitosane » sur la croissance de la lignée Hep-2

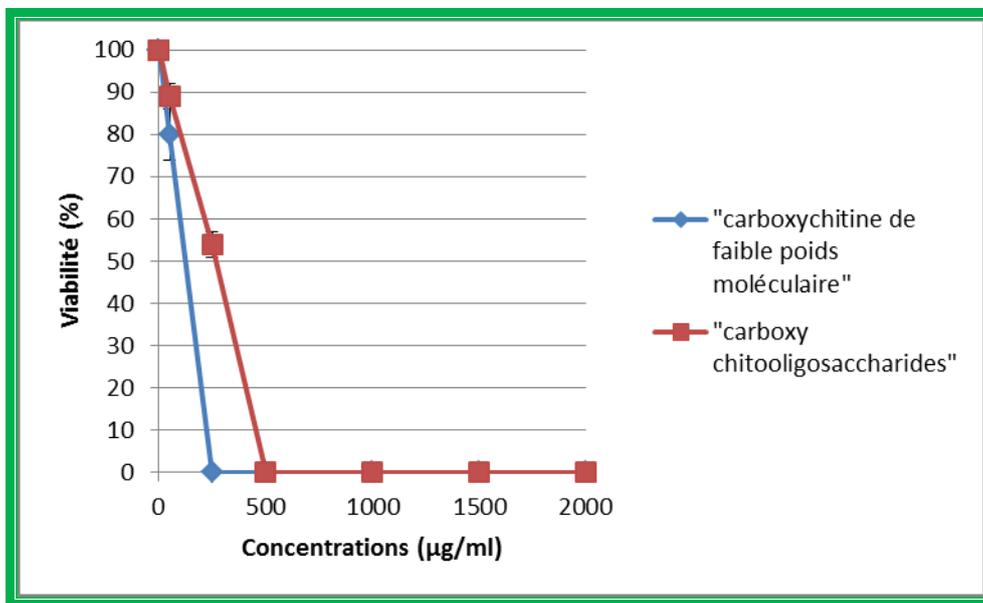


Figure 44 : Activité anticancéreuse de la « carboxychitine de faible poids moléculaire » et des « carboxy chitoooligosaccharides » sur la croissance de la lignée Hep-2

L'CI₅₀ la plus faible (45 µg/ml) correspond à la chitine de faible poids moléculaire (Tableau V).

Tableau V : Valeurs des CI_{50} de la chitine et de ses dérivés sur la lignée Hep-2

Molécules testées	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Chitine de faible poids moléculaire	45
« Carboxychitine de faible poids moléculaire »	125
Chitooligosaccharides	157
« Carboxy chitooligosaccharides »	270,5
Chitosane	300
Chitine	400
« N,O carboxyméthyle chitosane »	450
« 2 phtalimido chitine »	450
Carboxyméthyle chitine	500
Chitosane oxydé	-
« 2 phtalimido chitosane »	-

3.1.3- Etude de l'activité antitumorale sur la lignée RD

L'étude de l'activité antitumorale de la chitine et de ses dérivés a porté, aussi, sur la lignée humaine dérivée des cellules musculaires striées atteintes d'un rhabdomyosarcome, RD.

L'étude de l'activité anticancéreuse de la chitine et du chitosane sur la lignée RD a été effectuée en utilisant les concentrations non-cytotoxiques ($\leq 2000 \mu\text{g/ml}$).

La figure 45 indique que la chitine et le chitosane n'ont pas le potentiel à supprimer la croissance des cellules RD à 100% aux concentrations non cytotoxiques ($\leq 2000 \mu\text{g/ml}$). En effet, à une concentration de $2000 \mu\text{g/ml}$ de chitine ou de chitosane, nous arrivons à réduire la croissance des cellules RD à 90 %.

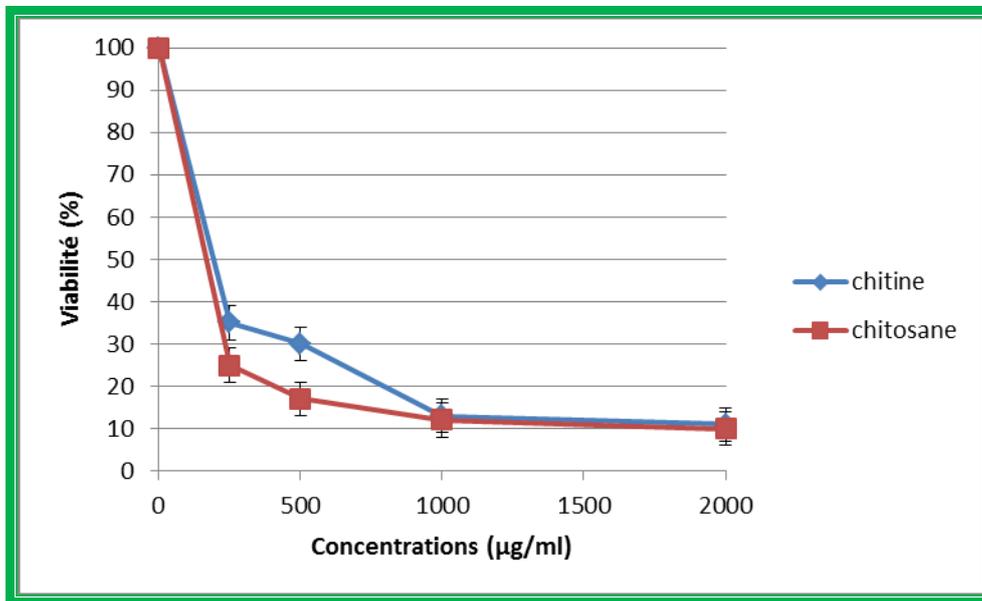


Figure 45 : Activités anticancéreuses de la chitine et du chitosane sur la lignée RD

En ce qui concerne la chitine de faible poids moléculaire, une inhibition de la croissance des cellules RD à 100 % avec des concentrations égales ou supérieures à 250 µg/ml est obtenue (Figure 46). Ce résultat confirme que la chitine de faible poids moléculaire est très efficace en termes d'activité anticancéreuse sur la lignée RD. Par ailleurs, le chitosane oxydé n'a pas le potentiel à supprimer la croissance des cellules RD à 100 % avec les concentrations testées (Figure 46). Toutefois, nous constatons que le chitosane oxydé n'a pratiquement pas d'effet jusqu'à une concentration de 1000 µg/ml. Par contre, à une concentration de 2000 µg/ml, le chitosane oxydé réduit considérablement la croissance des cellules RD mais sans toutefois éliminer totalement cette croissance.

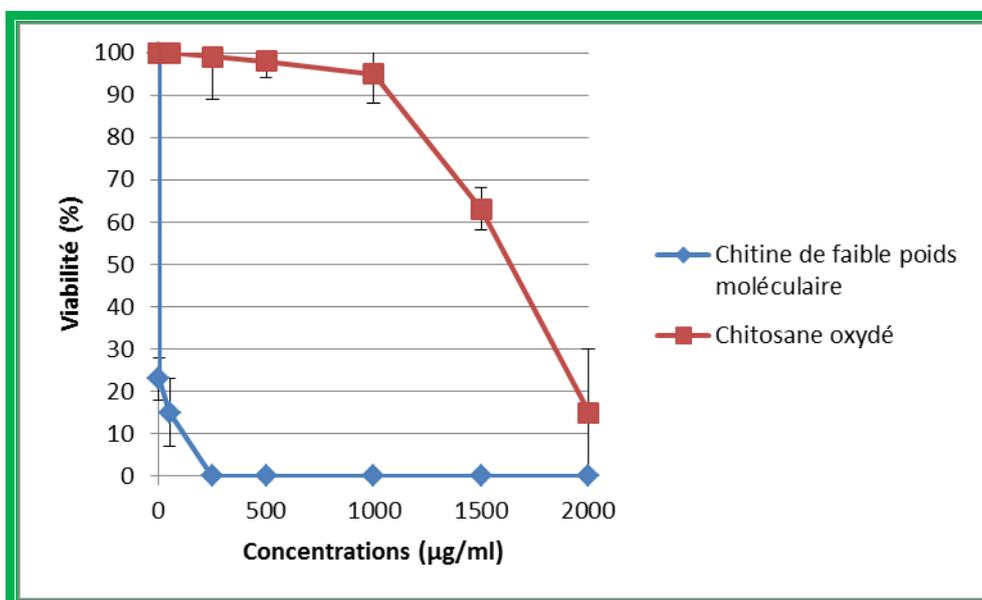


Figure 46 : Activités anticancéreuses de la chitine de faible poids moléculaire et du chitosane oxydé sur la lignée RD

En ce qui concerne le carboxyméthyle chitine, le « N,O carboxyméthyle chitosane » et la « 2 phtalimido chitine », il n'y a pas d'inhibition de la croissance des cellules RD à 100 % avec les concentrations testées (**Figure 47**).

Les « chitooligosaccharides » inhibent la croissance des cellules RD à 100 % à des concentrations égales ou supérieures à 1500 µg/ml (**Figure 48**). Le « 2 phtalimido chitosane » n'inhibe pas la croissance des cellules RD à 100 % avec les concentrations testées (**Figure 48**).

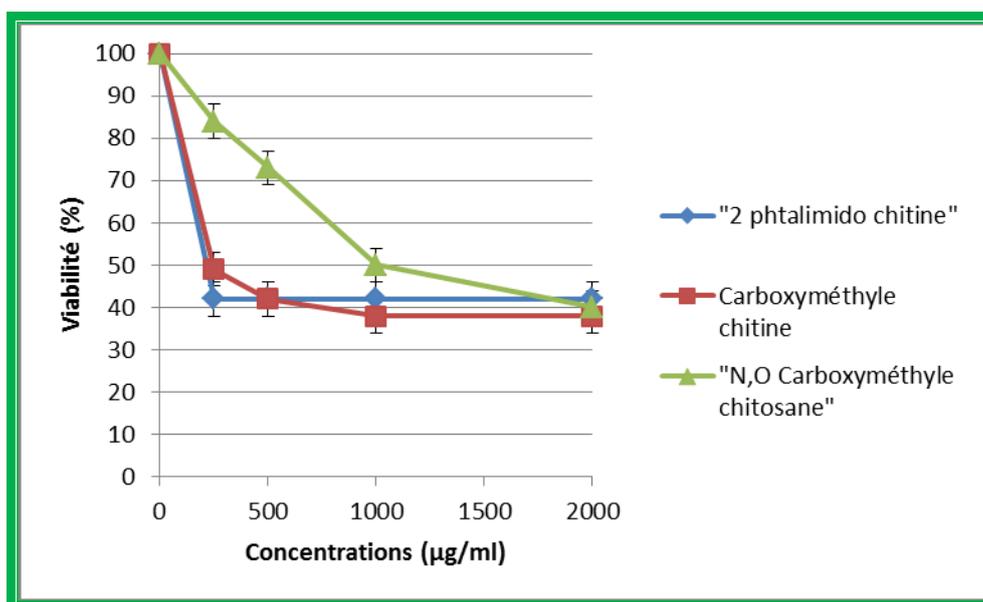


Figure 47 : Activités anticancéreuses du carboxyméthyle chitine, du « N,O carboxyméthyle chitosane » et de la « 2 phtalimido chitine » sur la lignée RD

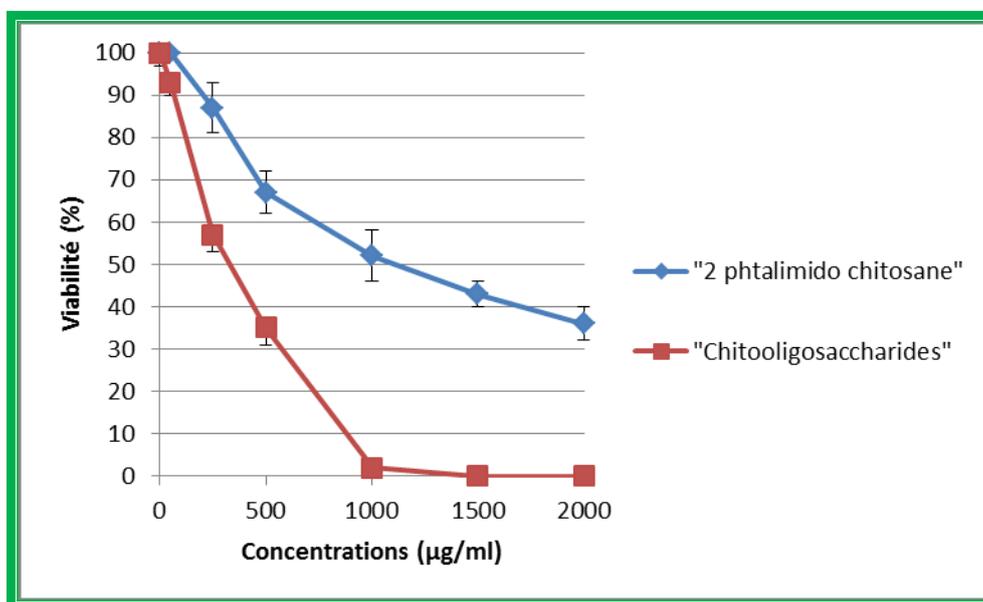


Figure 48 : Activités anticancéreuses du « 2 phtalimido chitosane » et des « chitooligosaccharides » sur la lignée RD

Les « carboxy chitooligosaccharides » inhibent la croissance des cellules RD à 100 % à des concentrations égales ou supérieures à 2000 µg/ml (**Figure 49**). D'autre part, la « carboxychitine de faible poids moléculaire » inhibe la croissance des cellules RD à 100 % à des concentrations égales ou supérieures à 500 µg/ml (**Figure 49**).

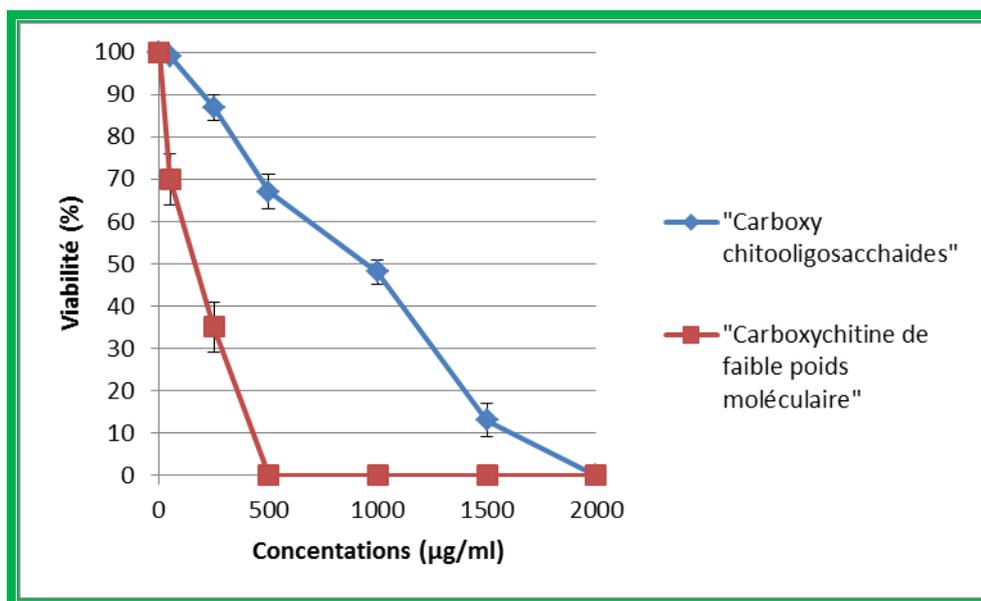


Figure 49 : Activités anticancéreuses de la « carboxychitine de faible poids moléculaire » et des « carboxy chitooligosaccharides » sur la croissance de la lignée RD

L'CI₅₀ la plus faible (1,67µg/ml) correspond à la chitine de faible poids moléculaire (**Tableau VI**).

Tableau VI : Valeurs des CI₅₀ de la chitine et de ses dérivés sur la lignée RD

Molécules testées	CI ₅₀ (µg/ml)
Chitine de faible poids moléculaire	1,67
Chitosane	190
« 2 phtalimido chitine »	210
« Carboxy N-acétyl-chitooligosaccharides »	216
Carboxyméthyle chitine	240
Chitine	300
« Chitooligosaccharides »	843
« Carboxy chitooligosaccharides »	934
« N,O carboxyméthyle chitosane »	990
« 2-phtalimido chitosane »	1330
Chitosane oxydé	1563

3.1.4- Etude de l'activité antitumorale sur la lignée THP-1

La troisième lignée humaine cancéreuse utilisée, pour l'étude de l'activité antitumorale de la chitine et de ses dérivés, est la lignée humaine dérivée de monocytes atteints de leucémie, THP-1.

L'étude de l'activité anticancéreuse de la chitine et de ses dérivés sur la lignée THP-1 a été effectuée en utilisant les concentrations non-cytotoxiques ($\leq 2000\mu\text{g/ml}$).

La figure 50 indique que la chitine et le chitosane ont le potentiel de supprimer la croissance des cellules THP-1 à 100 % à des concentrations supérieures ou égales à 1500 $\mu\text{g/ml}$. Par contre, pour la chitine de faible poids moléculaire (**Figure 50**), il y a inhibition totale de la croissance des cellules THP-1 à des concentrations beaucoup plus faibles (≥ 250 $\mu\text{g/ml}$).

La figure 51 indique que le chitosane oxydé n'a pas le potentiel de supprimer la croissance des cellules THP-1 à 100 % avec les concentrations testées mais son CI_{50} est de l'ordre de 152 $\mu\text{g/ml}$. Les « chitooligosaccharides » inhibent la croissance des cellules THP-1 à 100 % à des concentrations égales ou supérieures à 250 $\mu\text{g/ml}$.

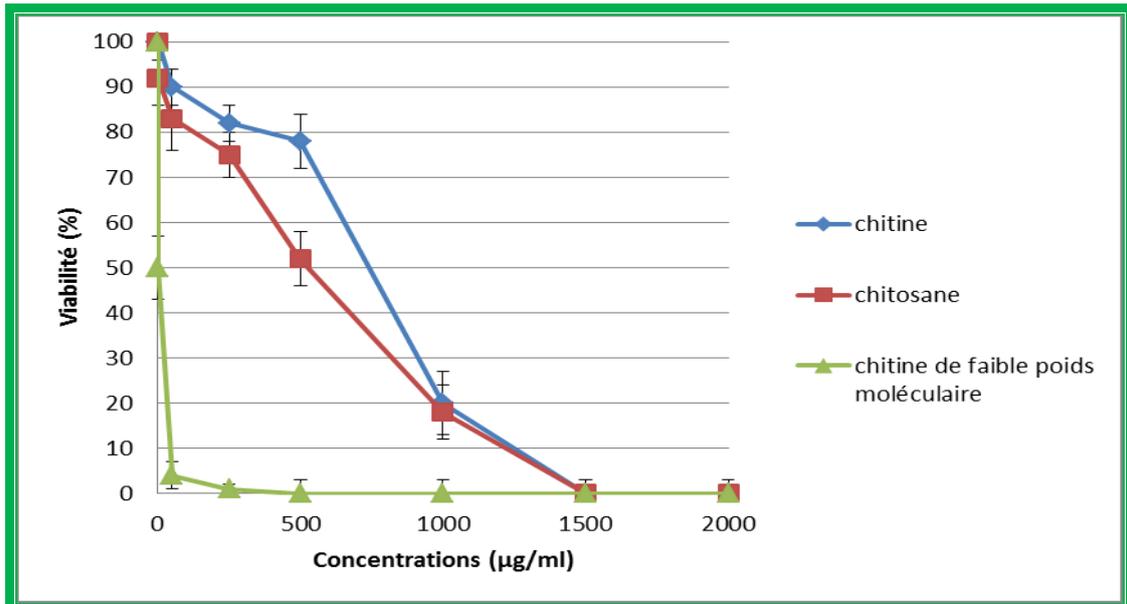


Figure 50 : Activités anticancéreuses de la chitine, du chitosane et de la chitine de faible poids moléculaire sur la lignée THP-1.

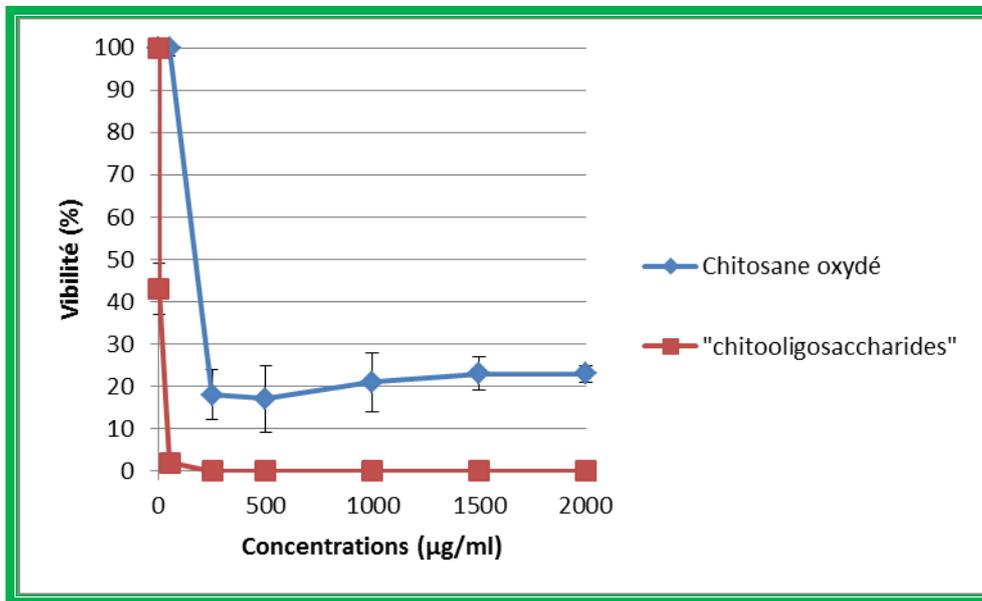


Figure 51 : Activités anticancéreuses du chitosane oxydé et des « chitooligosaccharides » sur la lignée THP-1

La figure 52 montre que le carboxyméthyle chitine et le « N,O carboxyméthyle chitosane » inhibent la croissance des cellules THP-1 à 100 % à des concentrations égales ou supérieures à 1500 µg/ml.

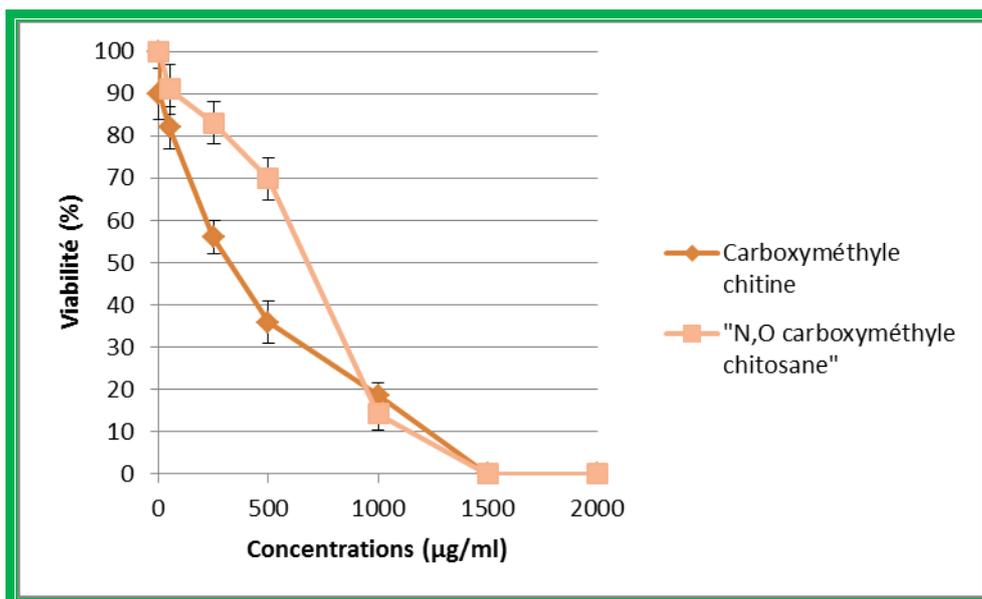


Figure 52 : Activités anticancéreuses du carboxyméthyle chitine et du « N,O carboxyméthyle chitosane » sur la lignée THP-1

La figure 53 montre que le « 2 phtalimido chitosane » et la « 2 phtalimido chitine » inhibent la croissance des cellules THP-1 à 100 % à des concentrations égales ou supérieures à 1500 µg/ml.

La figure 54 démontre que la « carboxychitine de faible poids moléculaire » inhibe la croissance des cellules THP-1 à 100 % à des concentrations égales ou supérieures à 500 µg/ml. Les « carboxy chitooligosaccharides » inhibent la croissance des cellules THP-1 à 100 % à des concentrations égales ou supérieures à 1000 µg/ml.

L'CI₅₀ la plus faible (1 µg/ml) correspond à la chitine de faible poids moléculaire (Tableau VII).

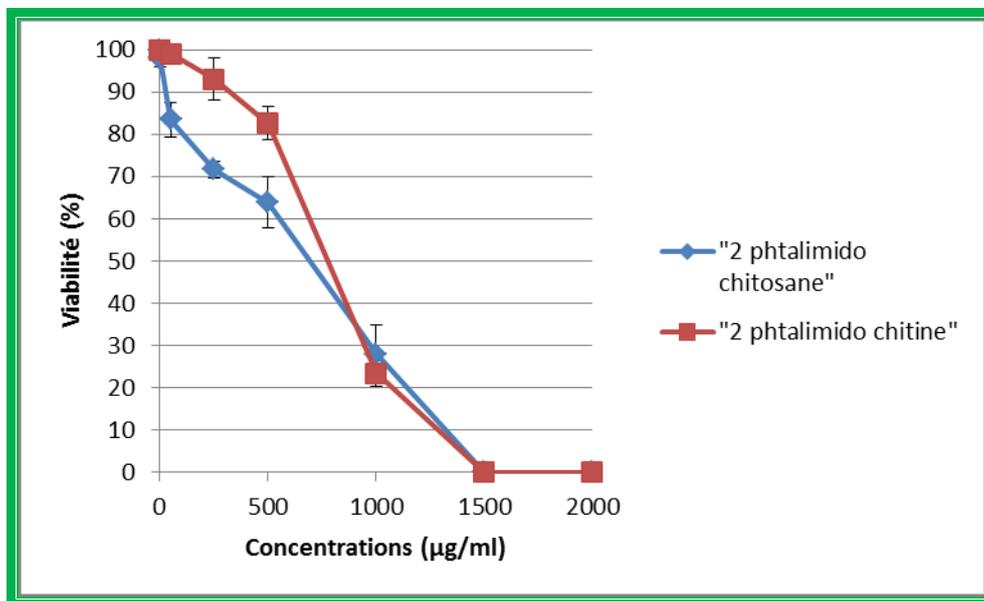


Figure 53 : Activités anticancéreuses du « 2 phtalimido chitosane » et de la « 2 phtalimido chitine » sur la lignée THP-1

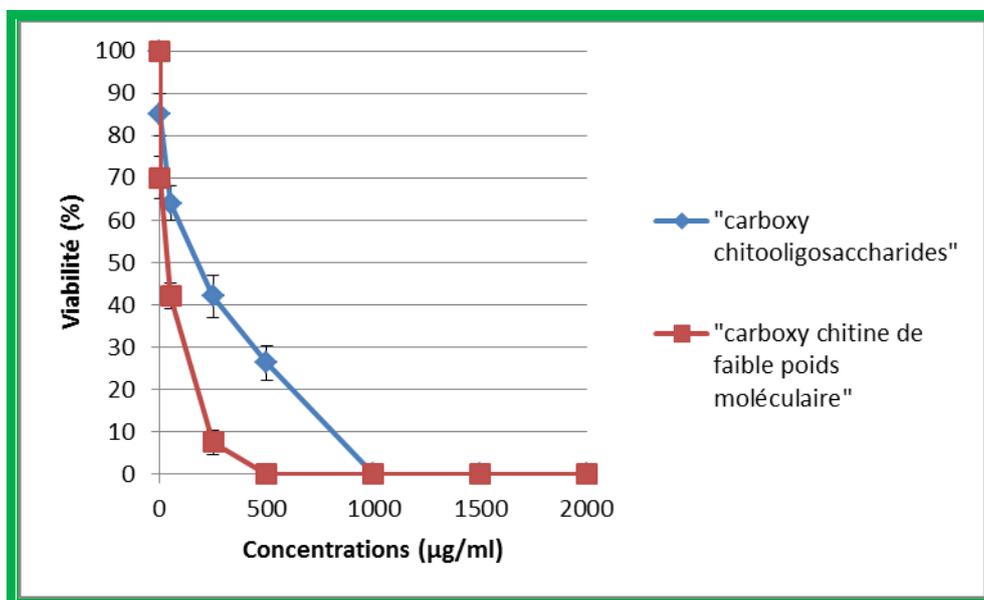


Figure 54 : Activités anticancéreuses des « carboxy chitooligosaccharides » et de la « carboxy chitine de faible poids moléculaire » sur la lignée THP-1

Tableau VII: Valeurs des CI_{50} de la chitine et de ses dérivés sur la lignée THP-1

Molécules testées	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Chitine de faible poids moléculaire	1
« Chitooligosaccharides »	15
« Carboxychitine de faible poids moléculaire »	124
Chitosane oxydé	152
« Carboxy chitooligosaccharides »	333
Chitosane	531
Carboxyméthyle chitine	545
« 2 phtalimido chitosane »	685
« N,O carboxyméthyle chitosane »	689
Chitine	739
« 2 phtalimido chitine »	777

Le dérivé de la chitine qui a l'effet antitumoral le plus marqué est la chitine de faible poids moléculaire. Cette activité peut être expliquée par l'interaction électrostatique entre les groupements chargés de la chitine de faible poids moléculaire et les résidus fonctionnels existants sur les organites et la surface des cellules tumorales. Elle peut être due aussi au faible nombre de monomères présents (**Tableau VIII**). Aussi, la chitine de faible poids moléculaire peut pénétrer à l'intérieur même de la cellule tumorale. En effet, la chitine de faible poids moléculaire (11 unités) peut interagir sélectivement avec les mitochondries des cellules cancéreuses grâce aux charges négatives que l'on ne retrouve qu'à la surface des mitochondries de cellules cancéreuses. Ces charges négatives ont été mises en évidence par **FANTIN *et al.* (2002)**. Le tableau VII résume les valeurs obtenues relatives au poids moléculaire et au degré de polymérisation des différentes molécules testées.

L'activité antitumorale de la chitine et de ses dérivés a été citée à plusieurs reprises dans la littérature. Une cytotoxicité spécifique de la chitine et de ses dérivés a été suggérée. En effet, le diethylaminoethyl-chitosane quaternaire a démontré sa sélectivité envers les cellules tumorales aneuploïdes (**LEE *et al.*, 2002**). La carboxyméthyle chitine est capable d'inhiber les métastases du poumon et du foie chez la souris (**ISHIKAWA *et al.*, 2009**). La chitine et le chitosane sont de bons candidats pour la prévention du cancer colorectal (**KOMAZAWA *et al.*, 1993**). La chitine sulfatée augmente l'inhibition de l'inflammation et les métastases (**BASAPPA *et al.*, 2010**).

Tableau VIII: Poids moléculaires de la chitine et de ses dérivés identifiés

Molécules testées	Poids moléculaire (Da)	Degré de polymérisation
Chitine de faible poids moléculaire	2480	11
Chitosane oxydé	2100	13
Chitosane	12000	69
Chitine	338000	1572

Les chitooligosaccharides ont un effet antitumoral sur les lignées cellulaires HEP-G2 (carcinome hépatique), HCT-116 (carcinome du colon) et MCF7 (carcinome du sein) (WANG *et al.*, 2007 ; EL-SAYED *et al.*, 2012).

La glucosamine phosphorylée inhibe la réponse inflammatoire au niveau des cellules THP-1 avec différenciation du PMA et stimulation des LPS (KIM *et al.*, 2010). Les oligomères de chitosane peuvent inhiber la prolifération des cellules humaines leucémiques HL-60 (PAE *et al.*, 2001). De plus, la chitine et le chitosane ont le pouvoir d'augmenter l'effet antitumoral des médicaments anticancéreux (MATSUOKA *et al.*, 1998 ; KWAK *et al.*, 2005 ; LITTLE et LANGER 2005 ; SPRINGATE *et al.*, 2005 ; LIU *et al.*, 2007 ; SEO *et al.*, 2009). En effet, le chitosane possède des propriétés bioadhésives (TOKUMITSU *et al.*, 2000). Il est capable de se lier aux cellules des mammifères en interagissant avec les glycoprotéines de surface (MAC LAUGHLIN *et al.*, 1998). Certaines propriétés du chitosane mènent à émettre l'hypothèse d'une possible interaction, entre les charges positives du chitosane et la surface cellulaire, donnant lieu à un changement de l'environnement ionique de la membrane cellulaire pour maintenir l'intégrité cellulaire ainsi que de nombreuses fonctions nécessaires à la croissance cellulaire (SANTINI *et al.*, 1997). De même, une relation structure-activité suggère l'existence de systèmes biologiques qui peuvent reconnaître la configuration des structures des composés.

L'hypothèse proposée dans le cadre de cette étude est qu'il existe une protéine, capable de se lier à la chitine, exprimée par les cellules cancéreuses et pas par les cellules MRC-5. Cette protéine pourrait interagir avec la chitine et ses dérivés pour inhiber la croissance des cellules tumorales. Cette protéine pourrait être la protéine YKL-40.

YKL-40, appelée aussi CHI3L1 ou HC gp-39, est une glycoprotéine de 40kDa retrouvée chez les mammifères. Elle est sécrétée par les cellules cancéreuses (JOHANSEN *et al.*, 2003).

L'hypothèse proposée dans le cadre de cette étude est que l'effet antiapoptotique d'YKL-40 est inhibé lorsque la protéine YKL-40 se lie à la chitine ou à l'un de ses dérivés. De ce fait, les cellules cancéreuses meurent alors que les cellules MRC-5 (n'exprimant pas de protéine YKL-40) continuent de proliférer. La protéine YKL-40 a des affinités variables avec la chitine et ses dérivés, ce qui expliquerait les résultats obtenus. Cette différence au niveau de l'affinité est probablement due à une gêne stérique causée par le haut poids moléculaire de la chitine et de certains de ses dérivés.

Par conséquent, toutes les glycoprotéines YKL-40 secrétées par les cellules cancéreuses peuvent se lier aux dérivés de la chitine de bas poids moléculaire et le complexe YKL-40 - dérivés de la chitine de bas poids moléculaire peut pénétrer à l'intérieur des cellules cancéreuses pour les perturber et les détruire ; c'est le cas de la chitine de faible poids moléculaire.

Aussi, les glycoprotéines YKL-40 secrétées par les cellules cancéreuses peuvent se lier à la chitine et ses dérivés de haut poids moléculaire mais le complexe YKL-40- dérivés de la chitine de haut poids moléculaire ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur des cellules cancéreuses ; ils vont juste diminuer la concentration de glycoprotéines YKL-40 libres dans l'environnement.

Les cellules MRC-5 n'expriment pas la glycoprotéine YKL-40. En effet, cette dernière n'est pas détectable au niveau des fibroblastes des poumons et de la peau, ainsi qu'au niveau des tissus musculaires, du poumon et du pancréas, et des cellules mononuclées (**REGISTER *et al.*, 2001; JUNKERA *et al.*, 2005**).

Les cellules THP-1 expriment la glycoprotéine YKL-40. Contrairement à de nombreux autres marqueurs des monocytes/macrophages, l'expression de la glycoprotéine YKL-40 est absente chez les monocytes et est fortement induite durant les dernières étapes de la différenciation des macrophages humains (**REHLI *et al.*, 2003; SOHN *et al.*, 2009**).

Néanmoins, il n'existe aucune donnée sur l'existence de la glycoprotéine YKL-40 au niveau des lignées cellulaires Hep-2 et RD. Ceci reste à démontrer.

L'expression anormale de la glycoprotéine YKL-40 est associée à de nombreuses maladies humaines tels que l'arthrite rhumatoïde, maladie inflammatoire de l'intestin, le diabète de type 2, l'asthme et la schizophrénie (**SOHN *et al.*, 2009**). Cette protéine lectine fixatrice d'héparine et de chitine, sans activité chitinasique, est sécrétée par les cellules cancéreuses. Un taux élevé de glycoprotéine YKL-40, dans le sérum des patients, est associé

à un intervalle sans récurrence (ou rechute) court et un faible taux de patients qui survivent (JOHANSEN *et al.*, 2003). Les taux les plus élevés de YKL-40 au niveau du plasma sont retrouvés chez les patients avec métastases (VOLCK *et al.*, 1998).

Rares sont les cellules normales qui sécrètent la glycoprotéine YKL-40 ; il s'agit des macrophages, des neutrophiles, des chondrocytes arthritiques et des cellules étoilées du foie (JOHANSEN *et al.*, 2003 ; REHLI *et al.*, 2003). La fonction de la glycoprotéine YKL-40 reste méconnue, mais son mode d'expression en états normal et malade suggèrent qu'elle doit jouer un rôle dans le remodelage ou la dégradation de la matrice extracellulaire (VOLCK *et al.*, 1998).

Le gène de la glycoprotéine YKL-40, localisé sur le chromosome 1q32.1, a été séquencé. Il est exprimé par bon nombre de tissus cancéreux (sein, colon, rein, poumon, ovaire, prostate, utérus, cerveau et cellules germinales) (JOHANSEN *et al.*, 2003 ; SOHN *et al.*, 2009).

Cette glycoprotéine doit avoir un rôle dans le mécanisme de l'inflammation, dans le remodelage des tissus et dans les métastases. Elle peut probablement stimuler la prolifération des cellules du tissu conjonctif humain. Elle doit avoir aussi un rôle en tant que facteur de croissance (REHLI *et al.*, 2003).

Les études immuno-histochimiques ont démontré une forte expression cellulaire de la glycoprotéine YKL-40 dans tous les tissus des embryons et fœtus humains, y compris l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. L'expression de cette glycoprotéine est particulièrement élevée dans les tissus caractérisés par une prolifération rapide et ceux marqués par une différenciation. Les tissus néoplasiques expriment la glycoprotéine YKL-40 de manière plus accentuée par rapport aux tissus normaux (HØGDALL *et al.*, 2009).

La fonction biologique de la glycoprotéine YKL-40 au niveau du cancer n'est pas encore connue. Certaines études suggèrent que la glycoprotéine YKL-40 joue un rôle de protecteur des cellules tumorales vis-à-vis de l'apoptose, un rôle de stimulateur de l'angiogenèse et un rôle de régulateur du remodelage de la matrice extracellulaire. Un taux de la glycoprotéine YKL-40 plasmatique élevé, après diagnostic d'un cancer, peut prédire une augmentation du risque de cancer gastro-intestinal (ZHANG *et al.*, 2010). Les études portant sur la régulation de la glycoprotéine YKL-40 sont rares et aucune analyse des récepteurs n'a été décrite (JOHANSEN *et al.*, 2003).

L'hypothèse proposée, dans le cadre de cette étude, est que l'effet anti-apoptotique de la glycoprotéine YKL-40 est inhibé lorsque la glycoprotéine YKL-40 se lie à la chitine et ses dérivés de hauts poids moléculaires. De ce fait, les cellules cancéreuses meurent alors que les cellules humaines normales MRC-5 (qui n'expriment pas la glycoprotéine YKL-40) parviennent à proliférer. L'efficacité avérée de la chitine de faible poids moléculaire par rapport à la chitine et ses autres dérivés peut être justifiée par la grande affinité de la glycoprotéine YKL-40 envers la chitine de faible poids moléculaire par rapport à la chitine et ses autres dérivés. Cette différence au niveau de l'affinité est probablement due à la gêne stérique occasionnée par la chitine et ses dérivés de hauts poids moléculaires ainsi que par les charges portées par ses molécules. Par conséquent, toutes les molécules de glycoprotéines YKL-40 sécrétée par les cellules cancéreuses sont capturées par la chitine de faible poids moléculaire et le complexe glycoprotéine YKL-40 - chitine de faible poids moléculaire peut pénétrer à l'intérieur de la cellule cancéreuse pour la perturber et la détruire. Par contre, les molécules de glycoprotéines YKL-40 sécrétée par les cellules cancéreuses sont capturées par la chitine et ses autres dérivés mais le complexe glycoprotéine YKL-40 - chitine et/ou ses autres dérivés ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur de la cellule cancéreuse. Aussi, il y aura diminution de la concentration de glycoprotéines YKL-40 libres dans le milieu causant une diminution de la croissance de la cellule cancéreuse. La chitine et ses dérivés diminuent, probablement, ainsi l'activité anti-apoptotique de la glycoprotéine YKL-40, ce qui aura pour effet la mort de la cellule cancéreuse.

Afin d'identifier le type de mort cellulaire, les ADN, extraits des cellules de la lignée cellulaire THP-1 traitées ou non avec 1 mg/ml de chitine ou de l'un de ses dérivés, ont été soumis à une électrophorèse (**Figure 55 et 57**). En effet, les cellules ayant subi une mort cellulaire de type apoptotique, présentent un ADN fragmenté « ladder-like », avec une bande plus marquée autour de 200pb typique de l'apoptose, alors que dans le cas d'une nécrose, il y a apparition d'une traînée « smear-like » (**HUANG *et al.*, 2006 ; MOREAU, 2006**).

Dans la figure 55, l'ADN (b) correspond à l'ADN extrait des cellules n'ayant pas été mises en contact ni avec la chitine ni avec aucun de ses dérivés. Cet ADN correspond à l'ADN total d'une cellule de la lignée THP-1 n'ayant subi aucune lyse. Son poids moléculaire est d'environ 23130 pb.

Les ADNs (c), (d) et (f) correspondent aux ADNs extraits des cellules de la lignée THP-1 ayant été mises en contact avec de la chitine, du chitosane et du chitosane oxydé, respectivement. Ces trois ADNs ont exprimé un profil sous forme d'une traînée, caractéristique d'une mort cellulaire par nécrose. La bande à 23130 pb correspondant à l'ADN total des cellules qui sont restées indemnes après 24 heures en présence de chitine, de chitosane ou de chitosane oxydé.

L'ADN (e) correspond à l'ADN extrait des cellules de la lignée THP-1 ayant été mises en contact avec de la chitine de faible poids moléculaire. Cet ADN n'a donné aucun profil suggérant une absence d'ADN due probablement au fait que les cellules de cet échantillon soient restées intactes en présence du tampon de lyse ou à une dégradation complète de l'ADN. A cette fin, les cellules mises en contact avec le tampon de lyse ont été observées au microscope optique. Les résultats sont résumés dans le tableau IX.

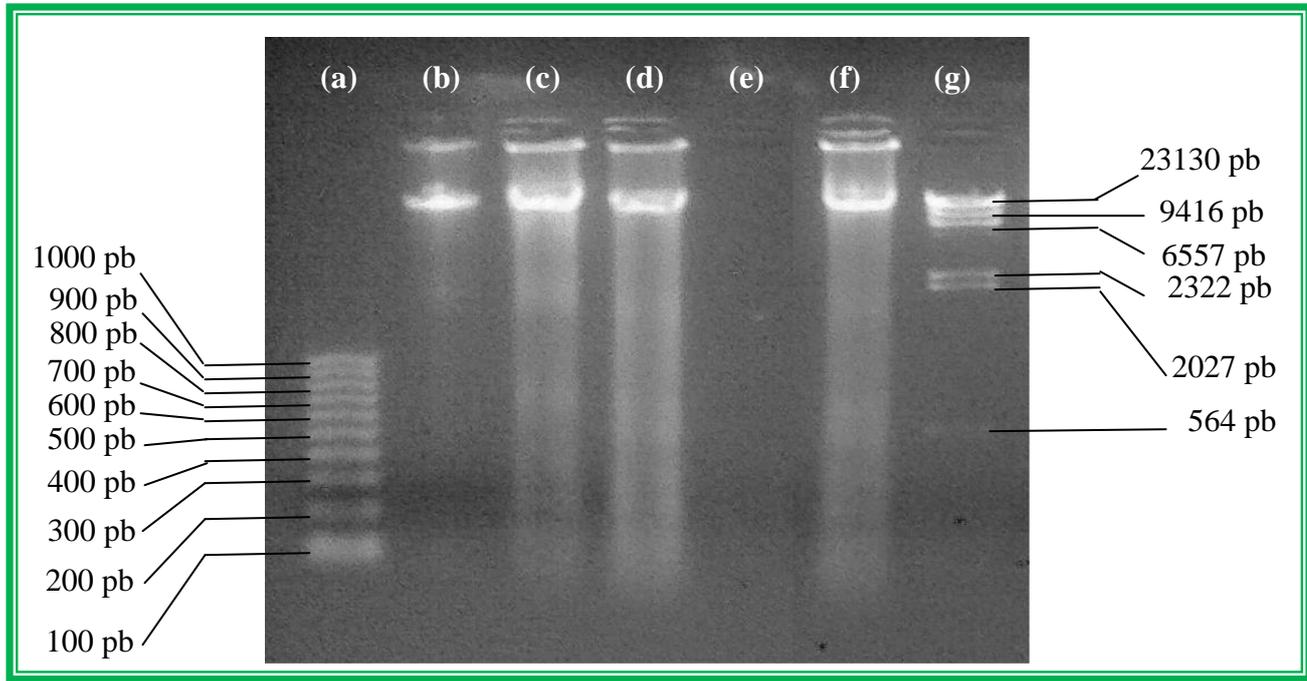


Figure 55 : Résultats de l'électrophorèse des ADN extraits des cellules de la lignée cellulaire THP-1 traitées ou non avec de la chitine ou l'un de ses dérivés : (a) marqueur de poids moléculaire 100pb LADDER ; (b) témoin ; (c) cellules traitées avec la chitine ; (d) cellules traitées avec le chitosane ; (e) cellules traitées avec la chitine de faible poids moléculaire ; (f) cellules traitées avec le chitosane oxydé ; (g) marqueur de poids moléculaire lambda DNA/Hind III.

Les résultats du tableau IX montrent que le tampon de lyse a effectivement détruit la membrane plasmique des cellules THP-1.

Tableau IX : Résultats de l'expérience de la lyse cellulaire en présence de chitine de faible poids moléculaire

Expérience	Intégrité des cellules
Cellules THP-1 + eau distillée	+
Cellules THP-1 + tampon de lyse + eau distillée	-
Cellules THP-1 + chitine de faible poids moléculaire	+
Cellules THP-1 + chitine de faible poids moléculaire + eau distillée	+
Cellules THP-1 + chitine de faible poids moléculaire + tampon de lyse + eau distillée	-

Pour les cellules THP-1 ayant été mises en contact avec de la chitine de faible poids moléculaire, nous remarquons une absence d'ADN, malgré qu'il y ait eu lyse de la membrane cytoplasmique, suggérant une fragmentation complète de l'ADN. Pour confirmer ce résultat, des expérimentations supplémentaires testant l'effet des conditions opératoires pour extraire l'ADN sur ce dernier. La figure 58 illustre les résultats obtenus.

Les résultats représentés dans la figure 56 démontrent que la présence de la chitine de faible poids moléculaire provoque la disparition de l'ADN des cellules THP-1, probablement par fragmentation complète de ce dernier jusqu'à l'état nucléotidique.

La figure 57 montre le profil électrophorétique des dérivés de la chitine non identifiés ainsi que ceux de la chitine, du chitosane et de la chitine de faible poids moléculaire.

La figure 57 montre que les « chitoooligosaccharides », tout comme la chitine de faible poids moléculaire fragmente complètement l'ADN. Pour le prouver les mêmes essais indiqués dans le tableau IX ont été entrepris et les résultats étaient similaires. Les profils des ADNs extraits des cellules ayant été mises en contact avec le carboxyméthyle chitine, le « N,O-carboxyméthyle chitosane », le « 2 phtalimido chitosane » et le « 2 phtalimido chitine » ont un profil indiquant une nécrose cellulaire. Par contre, les profils des ADNs extraits des cellules ayant été mises en contact avec les « carboxy chitoooligosaccharides » et la « carboxychitine de faible poids moléculaire » ont un profil d'un ADN resté intact tel que

celui du témoin. Il est clair qu'il y a eu mort cellulaire sans fragmentation de l'ADN. L'ADN semble avoir été protégé, il n'y a eu ni nécrose ni apoptose.

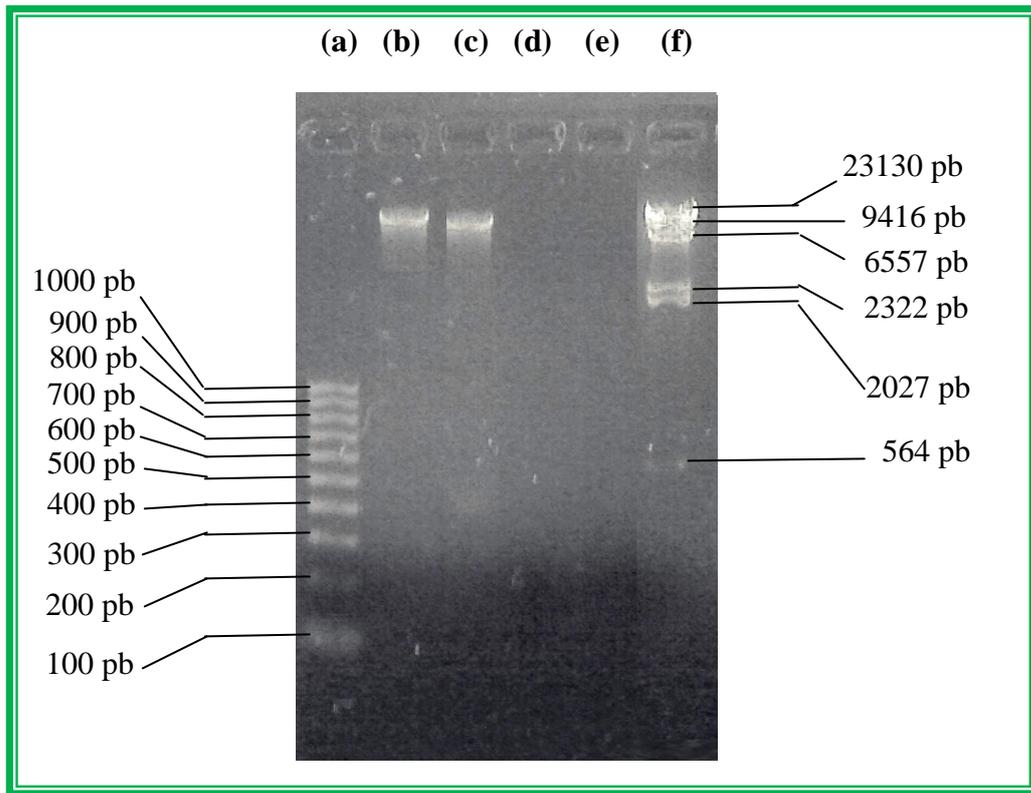


Figure 56 : Résultats de l'électrophorèse des ADNs extraits des cellules de la lignée cellulaire THP-1 traitées ou non avec du tampon de lyse, de la protéinase K, de la chitine de faible poids moléculaire et incubés à 56°C pendant 1 heure : (a) marqueur de poids moléculaire 100pb LADDER ; (b) ADN témoin ; (c) ADN traité avec du tampon de lyse et de la protéinase K ; (d) ADN traité avec du tampon de lyse, de la protéinase K et de la chitine de faible poids moléculaire ; (e) ADN traité avec de la chitine de faible poids moléculaire ; (f) marqueur de poids moléculaire lamda DNA/Hind III.

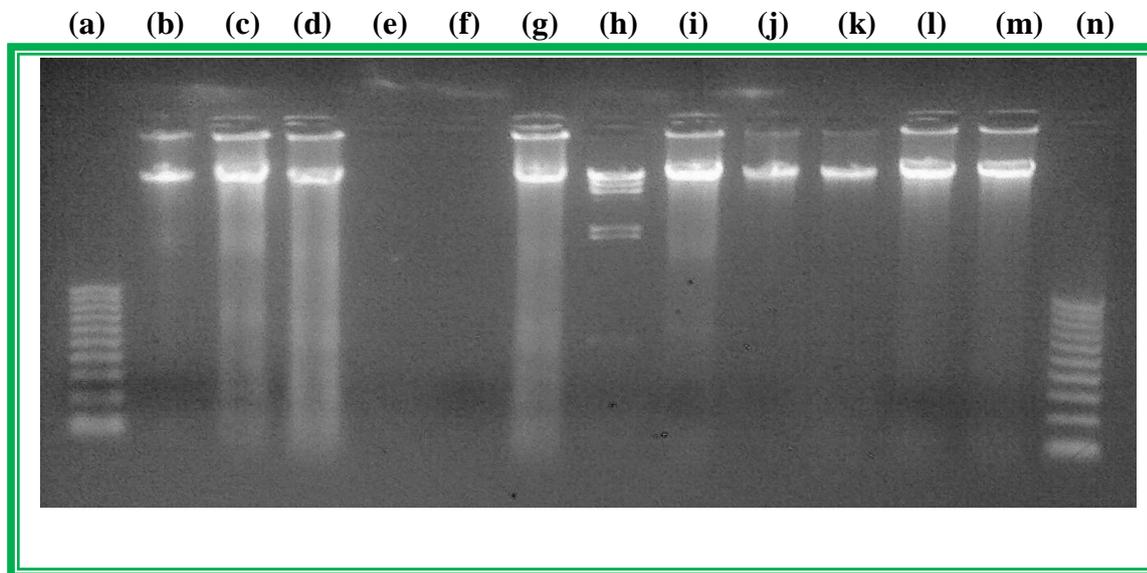


Figure 57 : Résultats de l'électrophorèse des ADN extraits des cellules de la lignée cellulaire THP-1 traitées ou non avec de la chitine ou l'un de ses dérivés : (a) et (n) marqueur de poids moléculaire 100 pb LADDER ; (b) témoin ; (c) cellules traitées avec la chitine ; (d) cellules traitées avec le chitosane ; (e) cellules traitées avec la chitine de faible poids moléculaire ; (f) cellules traitées avec les « chitooligosaccharides » ; (g) cellules traitées avec le carboxyméthyle chitine ; (h) marqueur de poids moléculaire lambda DNA/Hind III; (i) cellules traitées avec le « N,O-carboxyméthyle chitosane » ; (j) cellules traitées avec les « carboxy chitooligosaccharides » ; (k) cellules traitées avec la « carboxy chitine de faible poids moléculaire » ; (l) cellules traitées avec le « 2 phthalimido chitosane » ; (m) cellules traitées avec le « 2 phthalimido chitine ».

3.2- Etude de l'activité antiparasitaire

L'étude de l'effet antiparasitaire de la chitine et de ses dérivés sur la souche *Leishmania infantum* LIPA 155/10 (**Figure 58**) a démontré l'innocuité de ces produits vis-à-vis de cette souche résistante au glucantime.

L'étude de l'effet antiparasitaire de la chitine (**Figure 59**) a démontré que la chitine a un effet inhibiteur sur la souche *Leishmania infantum* LIPA 137 (sensible au glucantime). Elle élimine 100 % des promastigotes à des concentrations égales ou supérieures à 5000 µg/ml. L'CI₅₀ est de l'ordre de 600 µg/ml. De même, le chitosane (**Figure 59**) a un effet inhibiteur sur la souche *Leishmania infantum* LIPA 137. Il élimine 100 % des promastigotes à des concentrations égales ou supérieures à 1000 µg/ml. L'CI₅₀ est de l'ordre de 240 µg/ml.

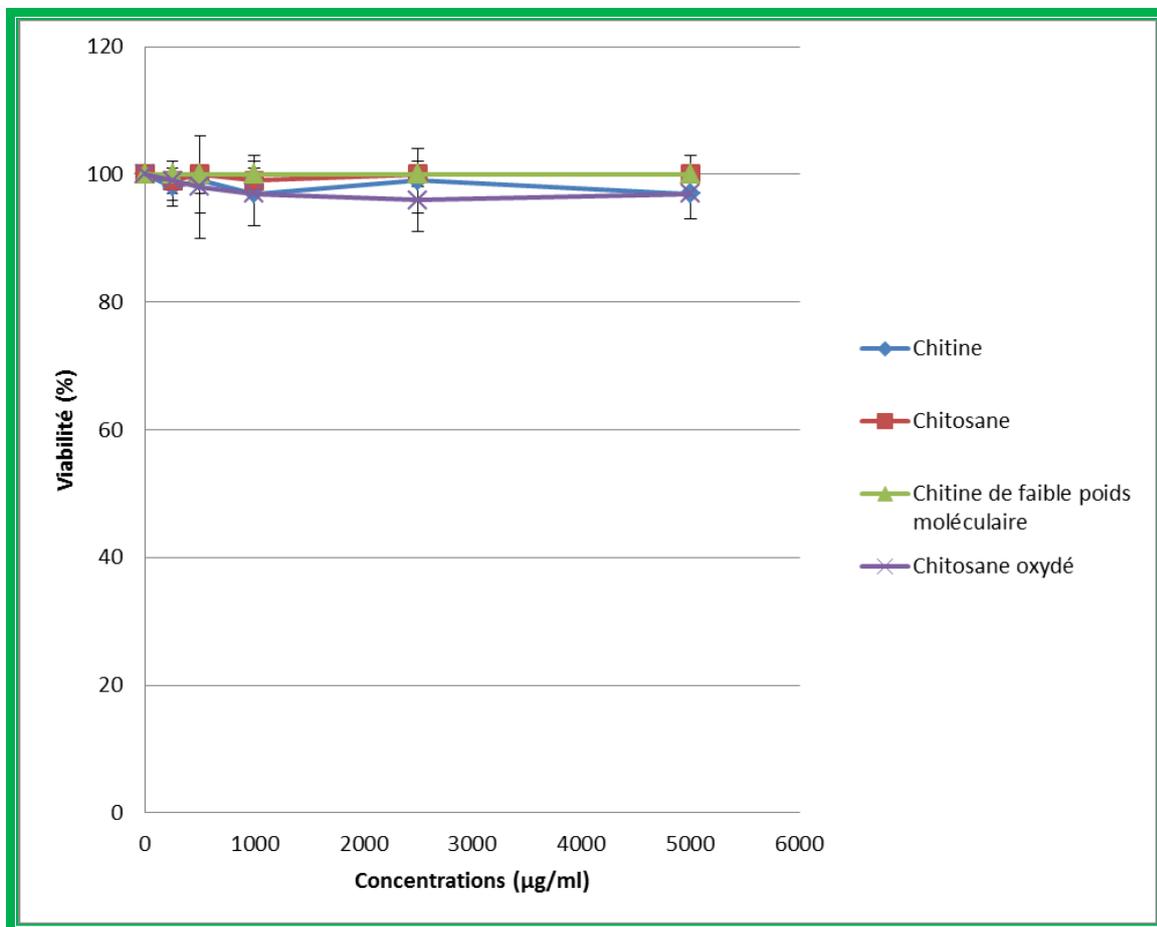


Figure 58 : Effet de la chitine et de ses dérivés sur la croissance de *Leishmania infantum* LIPA 155/10

D'autres études ont montré que le chitosane a un effet antiparasitaire contre *Leishmania infantum* avec une CI_{50} de $112,6 \pm 0,5$ mg/ml pour les promastigotes. Aucune de ces études ne donne d'hypothèses sur le mécanisme d'action du chitosane (PUJALS *et al.*, 2008 ; KEAN et THANOU 2010).

L'étude de l'effet antiparasitaire de la chitine de faible poids moléculaire (Figure 60) a démontré que la chitine de faible poids moléculaire a un effet inhibiteur sur la souche *Leishmania infantum* LIPA 137 (sensible au glucantime). Elle élimine 100 % des promastigotes à des concentrations égales ou supérieures à 1000 µg/ml. L' CI_{50} est de l'ordre de 202 µg/ml. De même, le chitosane oxydé (Figures 60) élimine 100 % des promastigotes lorsqu'il est utilisé à une concentration égale ou supérieure à 1000 µg/ml sur la souche *Leishmania infantum* LIPA 137. Dans ce cas, l' CI_{50} est de l'ordre de 300 µg/ml. Aucune étude similaire traitant du sujet n'est disponible dans la bibliographie. Nos résultats montrent bien que l'efficacité de l'activité antileishmanienne du chitosane oxydé dépend de la souche étudiée.

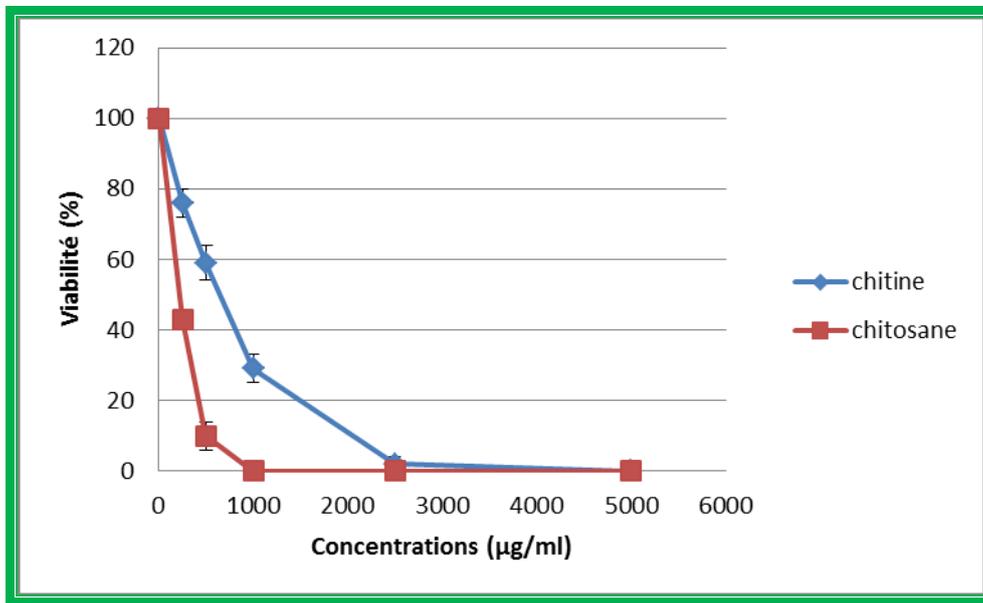


Figure 59 : Effet de la chitine et du chitosane sur la croissance de *Leishmania infantum* LIPA 137

Cette étude a permis de démontrer le grand effet antileishmanien de la chitine de faible poids moléculaire sur la souche *Leishmania infantum* LIPA 137.

La pénétration de la chitine et de ses dérivés peut se faire grâce aux membres de la superfamille des ABC (ATP binding cassette). Ces derniers peuvent transporter un grand nombre de composés très divers (LAUTHIER *et al.*, 1994 ; BOSEDASGUPTA *et al.*, 2008).

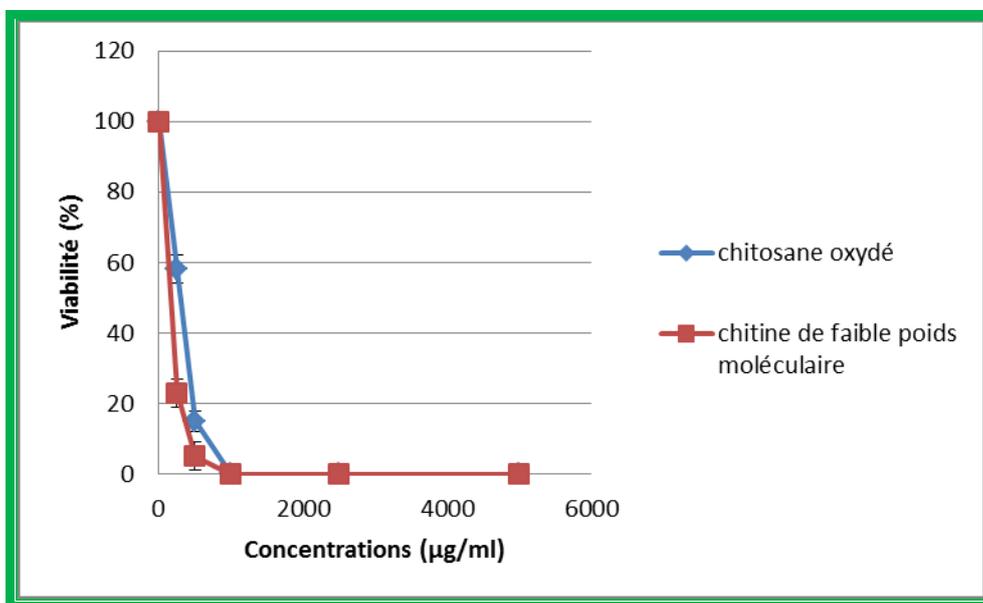


Figure 60 : Effet de la chitine de faible poids moléculaire et du chitosane oxydé sur la croissance de *Leishmania infantum* LIPA 137

Les mécanismes de résistance chez *Leishmania* restent non élucidés (**CAUCHETIER et al., 2002**). La résistance aux médicaments de *Leishmania* peut être due à une altération de la perméabilité de la membrane plasmique aux médicaments (**CHIQUERO et al., 1998 ; MAAROUF et al., 1998 ; MBONGO et al., 1998**). Ce changement est dû à une modification de la composition de la membrane plasmique en stérols et acides gras. En effet, les stérols libres interagissent avec les acides gras des phospholipides de la membrane pour contrôler sa fluidité (**DEMEL et De KRUYFF, 1976 ; BLOCH, 1983**).

La résistance peut être le résultat de la diminution de l'expression des systèmes enzymatiques gouvernant la biosynthèse des stérols chez *Leishmania*, tels que la 24-sterolmethyltransferase (**CAUCHETIER et al., 2002**).

La résistance peut être expliquée par des changements génétiques qui se produisent pendant le développement des promastigotes. Cette hypothèse repose sur le rôle des gènes MDR (multi-drug resistance) (**OUELLETTE et BORST, 1991 ; OUELLETTE et PAPADOPOULOU, 1993 ; CHOW et VOLKMAN, 1998**). L'amplification des gènes MDR (chromosomiques et extra-chromosomiques) et la surexpression de leurs produits (composants P-glycoprotein-like) chez *Leishmania* ont été démontrées en utilisant plusieurs médicaments et différentes espèces de *Leishmania* (**GARVEY et SANTI, 1986 ; GROGL et al., 1989 ; SANCHEZ et al., 1994**). Le phénotype MDR est réversible grâce au verapamil (**LAUTHIER et al., 1994**).

3.3- Etude de l'activité antibactérienne

L'étude de l'effet antibactérien a été restreinte au chitosane oxydé. Les résultats n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pour toutes les concentrations testées (**Figures 61 et 62**).



Figure 61 : Effet du chitosane oxydé (300 μ g/ml) sur la croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922. T+ : correspond au témoin positif (gentamicine à 10 μ g/ml). T- : correspond au témoin négatif, il démontre l'absence d'effet inhibiteur du solvant utilisé (eau distillée)

Les précédentes études sur l'activité antibactérienne de la chitine, la chitine de faible poids moléculaire et le chitosane sur *Escherichia coli* ATCC 25922, ont démontré un même profil d'inhibition pour la chitine et le chitosane qui correspond à un effet bactériostatique. Les CMI du chitosane et de la chitine étaient de l'ordre de 0,01 %. Quant à la chitine de faible poids moléculaire, nos précédentes études ont démontré qu'elle avait un effet bactéricide sur la croissance *Escherichia coli* ATCC 25922 avec une CMI de 0,003 % (SALAH, 2005).

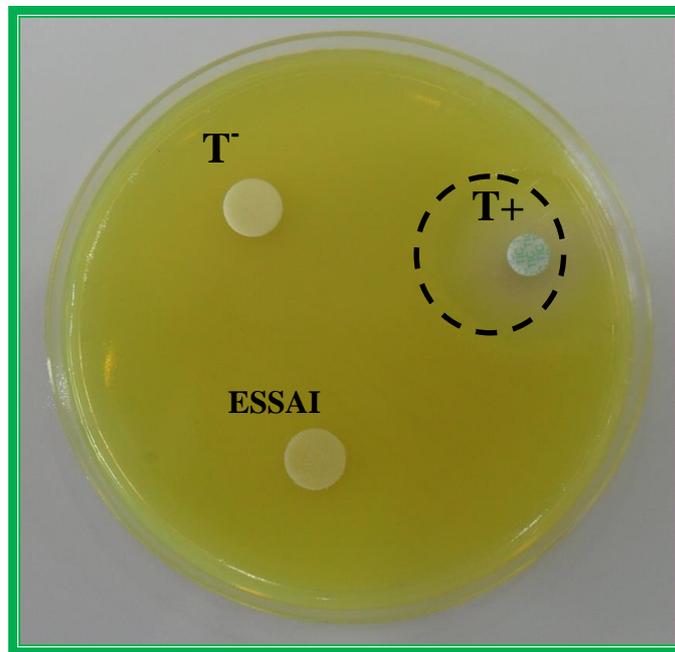


Figure 62 : Effet du chitosane oxydé (300 μ g/ml) sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. T+ : correspond au témoin positif (ticarcilline à 75 μ g/ml). T- : correspond au témoin négatif, il démontre l'absence d'effet inhibiteur du solvant utilisé (eau distillée)

En ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, les précédentes études ont démontré que la chitine n'avait aucun effet. Par contre, que le chitosane avait un effet bactériostatique avec une CMI de 0,05 % et que la chitine de faible poids moléculaire avait un effet bactéricide avec une CMI de 0,003 % (SALAH, 2005). JEON *et al.* (2001) ont abouti aux mêmes conclusions. Ils ont affirmé qu'avec les bactéries à Gram négatif, le chitosane exhibe un meilleur effet antibactérien avec *Escherichia coli* que *Pseudomonas aeruginosa* et leurs croissances sont complètement inhibées dans un milieu contenant 0,06 % de chitosane. L'hypothèse pouvant expliquer le fait que la chitine n'ait eu aucun effet sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* est l'existence d'un mucus excrété par la bactérie, la protégeant en l'enveloppant (GERASIMENKO *et al.*, 2004). Nous pourrions penser que ce mucus a pu altérer le pouvoir inhibiteur du chitosane sans l'éliminer complètement. Par contre, l'effet antibactérien de la chitine et du chitosane oxydé a été complètement supprimé.

Plusieurs mécanismes expliquant le mode d'action du chitosane sur les bactéries ont été proposés. ROLLER et COVILL (1999) ont suggéré que le chitosane pouvait inhiber la croissance des bactéries en agissant comme un agent chélateur sur les métaux, les oligo-éléments ou les nutriments essentiels à la croissance de l'organisme. Cette hypothèse paraît peu probable car le chitosane oxydé possède des charges positives et négatives à sa surface et, de ce fait, peut chélater les métaux, les oligo-éléments et les nutriments essentiels de la même manière que le chitosane.

JUNG *et al.* (1999). suggèrent que l'origine de l'activité antimicrobienne du chitosane est sa nature polycationique et peut donc se lier avec les sites anioniques des protéines. Ceci pourrait expliquer une moindre affinité du chitosane oxydé pour les protéines anioniques.

GERASIMENKO *et al.* (2004) ont, quant à eux, émis l'hypothèse que le chitosane est fortement fixé à l'enveloppe externe par des forces électrostatiques et que le mécanisme d'action du chitosane sur les microorganismes est probablement dû à la perturbation de l'intégrité de l'enveloppe externe. Le chitosane augmenterait la perméabilité de la membrane cellulaire jusqu'à la destruction complète de cette dernière (**GERASIMENKO *et al.*, 2004**). De même, **CHUNG *et al.* (2004)** ont prouvé l'existence d'une bonne corrélation (le coefficient de corrélation 0,988) entre la quantité de chitosane adsorbé et l'efficacité de son inhibition. Ils ont affirmé que le chitosane réagit avec la surface cellulaire, altère la perméabilité cellulaire et, en plus, empêche l'entrée du matériel ou cause la fuite du matériel. Ils ont pu démontrer aussi que la densité de charge négative sur la surface cellulaire détermine la capacité de la bactérie à être inhibée par le chitosane. Ceci est probable vu la différence de charge qui existe entre le chitosane et le chitosane oxydé.

En effet, l'effet inhibiteur du chitosane vis-à-vis des bactéries à Gram négatif est dû à ses propriétés chimiques et structurales. Le chitosane, étant une macromolécule, est incapable de traverser l'enveloppe externe des bactéries à Gram négatif, ainsi l'accès direct du chitosane à l'intérieur de la cellule est improbable. Grâce à ses charges positives, le chitosane crée une structure polycationique qui peut interagir avec les composants poly-anioniques de la surface des bactéries à Gram négatif, tels que les protéines et les lipopolysaccharides. La liaison avec des molécules polycationiques perturbe l'intégrité de l'enveloppe externe induisant la perte de la fonction protectrice sans qu'il y ait d'activité bactéricide directe.

HELANDER *et al.* (2001) ont démontré, au microscope électronique, qu'il y a apparition de grandes altérations de la surface des cellules mises en contact avec le chitosane. La structure de l'enveloppe externe semble être recouverte de vésicules. Le chitosane se lie à l'enveloppe externe des bactéries et diminue ainsi la fonction de barrière protectrice de la paroi. Le chitosane perturbe la perméabilité de la paroi cellulaire causant la perte des constituants cellulaires tels que les enzymes et le glucose. L'accumulation de ce matériel donne l'impression, au microscope électronique, que la paroi a épaissi. De plus, la perméabilité causée par le chitosane est réversible.

Il est clair, au vu des résultats, que plus une molécule a de charges positives plus grande sera son activité antibactérienne.

Les oligomères du chitosane, quant à eux, pénètrent dans la cellule et empêchent la croissance des microorganismes en prohibant la transcription de l'ADN (**JUNG *et al.*, 1999**). Au vu des résultats obtenu dans la présente étude, ceci n'est pas le cas pour le chitosane oxydé.

Conclusion

Il est difficile à l'heure actuelle d'évaluer l'importance dans le monde du marché de la chitine et de ses dérivés. En effet, si les débouchés sont nombreux, les applications potentielles ne se trouvent qu'au stade de la recherche de la pré-industrialisation.

Le développement de cette nouvelle technologie est lié à la capacité de couvrir une proportion significative des coûts de production par la récupération et la vente des autres composants des carapaces. C'est le cas des protéines qui possèdent d'excellentes qualités nutritives et d'un pigment, l'asthaxanthine, qui présente un intérêt croissant.

Cette étude a permis l'extraction de la chitine à partir de la carapace de la crevette blanche *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), par voie chimique, ainsi que la préparation de la chitine de faible poids moléculaire, du chitosane et du chitosane oxydé. La préparation des chitooligosaccharides, du O carboxyméthyle chitine, du N,O carboxyméthyle chitosane, de la 2 phtalimido chitine, du 2 phtalimido chitosane, des carboxy chitooligosaccharides, des carboxy N acétyl chitooligosaccharides et des oligochitosanes oxydés n'a pas abouti aux produits attendus.

L'étude de l'activité antibactérienne du chitosane oxydé sur 2 souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) a démontré une innocuité de celui-ci pour des concentrations atteignant 300 µg/ml.

L'étude de l'activité antiparasitaire sur *Leishmania infantum* LIPA 137 a démontré le grand pouvoir antileishmanien de la chitine, le chitosane, la chitine de faible poids moléculaire et le chitosane oxydé. Toutefois, une inefficacité de la chitine et de ses dérivés a été observée vis-à-vis de la souche parasitaire *Leishmania infantum* LIPA 155/10.

L'étude de l'activité anticancéreuse de la chitine et de ses dérivés a porté sur 3 lignées cellulaires cancéreuses humaines (THP-1, Hep-2 et RD) et 1 lignée cellulaire normale humaine (MRC-5). Elle nous a permis de démontrer le grand pouvoir antiprolifératif de la chitine et de ses dérivés sur les lignées tumorales (THP-1, Hep-2 et RD). De même, l'absence de cytotoxicité vis-à-vis de la lignée cellulaire humaine normale étudiée (MRC-5) a été prouvée. Cette étude a notamment démontré le grand pouvoir biologique de la chitine de faible poids moléculaire.

Cette étude est au stade primaire. Il est nécessaire de caractériser tous les produits élaborés, d'élargir la gamme de souches et de lignées à tester et de poursuivre des recherches sur le mécanisme exact de fonctionnement de la chitine et de ses dérivés. Il faudrait étudier, par la suite, l'éventuel mécanisme de résistance des souches à l'effet inhibiteur de ces substances.

Références bibliographiques

- ◆ Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1992). Les méthodes d'étude des cellules. *Biologie Moléculaire de la Cellule*, chapitre 4. 2^{ème} Edition Médecine - Sciences Flammarion.
- ◆ Al-Bassam R., Al-Jumaily W., Rawi A.A., Suffi F.A. (1986). Evaluation of methods of extraction and partial characterization of cell wall carbohydrates of brewer's yeast strain, *Sacharomyces cerevisiae*. *MIRCEN Journal*, **2** : 383-388.
- ◆ Al-Khatib R. (2010). Étude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss. (Apiacées). Thèse de Doctorat de l'université de Lille, France.
- ◆ Allan C.R., Hadwidger L.A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental mycology*, **3** : 285-287.
- ◆ Andrade, V.S., Neto, B.d.B., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M. (2003). Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570)—A factorial study. *Review of Iberoam Micology*, **20** : 149–153.
- ◆ Andrieu J.-M. (1991). Biologie des cancers. Edition ellipses.
- ◆ Annadurai G., Chellapandian M., Krishnan M.R.V. (1999). Adsorption of reactive dye on chitin. *Environmental Monitoring and Assessment*, **59** : 111-119.
- ◆ Anonymous (2003). Overview of chitin/chitosan. *Agrofood industry hi-tech*, September/October: 30-31.
- ◆ Armanta R.E., Guerrero-Legarreta I., Huerta S. (2002). Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentados. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, **1** : 49-55.
- ◆ Austin P.R. (1977). Solvents for and purification of chitin. *United States Patent*, 4,062,921.
- ◆ Austin P.R., Brine C.J., Castle J.E., Zikakis J.P. (1981). Chitin: New facets of research. *Science*, **212** : 749-753.
- ◆ Bain R. (1998). Microencapsulation of prawn feed using chitin. Thèse de doctorat de l'université de Queensland, Australie.
- ◆ Basappa, Murugan S., Kavitha C.V., Purushothaman A., Nevin K.G., Sugahara K., Rangappa K.S. (2010). A small oxazine compound as an anti-tumor agent: A novel pyranoside mimetic that binds to VEGF, HB-EGF, and TNF- α . *Cancer. Letters*, **297** : 231–243.

- ◆ Baumann H., 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.
- ◆ Baumann H., Liu C., Faust V. (2003). Regioselectively modified cellulose and chitosan derivatives for mono- and multilayer surface coatings of hemocompatible biomaterials. *Cellulose*, **10** : 65–74.
- ◆ Belazzoug S. (1986). Les leishmanioses en Algérie; à propos de l'identification enzymatique de 32 souches d'origine humaine et animale. *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse*. In: Application éco-épidémiologique (Coll. Int. CNRS. INSERM, 1984), IMEEE, Montpellier, pp. 397–400.
- ◆ Benesch J., Tengvall P. (2002). Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*, **23** : 2561-2568.
- ◆ Benhabiles M.S., Salah R., Lounici H., Drouiche N., Goosen M.F.A., Mameri N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, **29** : 48-56.
- ◆ Benikhlef R., Harrat Z., Toudjine M., Djerbouh A., Bendali-Braham S., Belkaid M. (2004). Detection of *Leishmania infantum* MON-24 in the dog. *Médecine Tropicale*, **64** : 381-383.
- ◆ Blix, G. (1948). The determination of hexosamines according to Elson and Morgan. *Acta Chemica Scandinavica* 2 : 467-473.
- ◆ Bloch K.E. (1983). Sterol structure and membrane function. *Critical Reviews in Biochemistry*, **14** : 47–92.
- ◆ BoseDasgupta S., Ganguly A., Roy A., Mukherjee T., Majumder H.K. (2008). A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, **158** : 176–188.
- ◆ Brinchmann B.C., Bayat M., Brogger T., Muttuvelu D.V., Tjonneland A., Sigsgaard T. (2011). A possible role of chitin in the pathogenesis of asthma and allergy. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **18**(1) : 7-12.
- ◆ Brison J. (1971). Techniques d'enzymologie bactérienne. Ed. Masson et C^{ie}.
- ◆ Campana S.P., Signini R. (2001). Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Polimeros: Ciência Tecnologia*, 11 (4) : 169-173.
- ◆ Cauchetier E., Loiseau P.M., Lehman J., Rivollet D., Fleury J., Astier A., Deniau M., Paul M. (2002). Characterisation of atovaquone resistance in *Leishmania infantum* Promastigotes. *International Journal for Parasitology*, **32** : 1043–1051.
- ◆ Cennimo D.J., Koo H., Mohamed J.A., Huang D.B., Chiang T. (2007). Enteroaggregative *Escherichia coli* : A Review of Trends, Diagnosis, and Treatment. *Infections in medicine*, 100-110.

- ◆ Chang K.L., Tsai G. (1997). Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **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.
- ◆ Chapeville F., Clauser H. (1974). Les glucides, structure et métabolisme. Biochimie. Ed. Herman.
- ◆ Chen H.-M., Meyers S.P. (1982). Extraction of asthaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *Journal of Food Science*, **47**:892-896.
- ◆ Chen M.-H., Chan H.-Y., Wu C.L., Chen Y.-L., Yuan G.-F. (2002) (a). Production of chitosan and chitin. *United States Patent*, 6,399,338.
- ◆ Chen M.-H., Chan H.-Y., Wu C.L., Chuang S.-H., Hwang I;-E., Chen Y.-L., Yuan G.-F. (2002) (b). Production of chitosan and chitin. *United States Patent*, 6,485,946.
- ◆ Chen M.-H., Chan H.-Y., Wu C.L., Chuang S.-H., Hwang I;-E., Chen Y.-L., Yuan G.-F. (2001) (c). Production of chitosan and chitin. *United States Patent*, 6,255,085.
- ◆ Chenite A., Buschmann M., Wang D., Chaput C., Kandani N. (2001). Rheological characterization of thermogelling chitosan/ glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, **46**: 39-47.
- ◆ Chiquero M.J., Pe´rez-Victoria J.M., O’Valle F., Gonzalez-Ros J.M., Del Moral R.G., Ferragut J.A., Castanys S., Gamarro F. (1998). Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochemical Pharmacology*, **55** : 131–139.
- ◆ Chow L.M.C., Volkman S.K. (1998). *Plasmodium* and *Leishmania* : the role of mdr genes in mediating drug resistance. *Experimental Parasitology*, **90** : 135-41.
- ◆ Chung Y.-C., Su Y.-P., Chen C.-C., Jia G., Wang H.-L., Wu J.C.G., Lin J.-G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, **25** (7): 932-936.
- ◆ Cohen-Kupiec R., Chet I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology*, **9**: 270-277.
- ◆ Collombel C., Damour O., Gagnieu C., Poinsignon F., Echinard C., Marichy J. (1992). Biomaterials with a base of mixtures of collagen, chitosan and glycosaminoglycans, process for preparing them and their application in human medicine. *United States Patent*, 5,166,187.
- ◆ Cosio I.G., Fischer R.A., Carroad P.A. (1982). Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pre-treatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *Journal of Food Science*, **47** : 901-905.

- ◆ Costes V. , Chatelet F.P. (2005). La cellule cancéreuse et le tissu cancéreux (Chapitre 8). Cours de l'université de Marseille, France. <http://medidacte.timone.univ-mrs.fr>.
- ◆ Crini G., Badot P.M., Guibal E. (2009). Chitine et Chitosane. Du polymère à l'application: Presses universitaires de Franche-Comté.
- ◆ Croft S.L., Sundar S., Fairlamb A.H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Review*, **19** : 111–26.
- ◆ Croxen M.A., Finlay B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 26-38.
- ◆ Cuesta A., Esteban M. A., Meseguer J. (2003). Tumouricidal activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) natural cytotoxic cells: the role played *in vitro* and *in vivo* by retinol acetate. *Fish & Shellfish Immunology*, **14** : 133–144.
- ◆ Delattre C., Michaud P., Keller C., Elboutachfaiti R., Beven L., Courtois B., Courtois J. (2006). Purification and characterization of a novel glucuronan lyase from *Trichoderma* sp. GL2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **70** (4) : 437-443.
- ◆ 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.
- ◆ Daly W.H., Manuszac-Guerrini M.A. (2001). Biocidal chitosan derivatives. *United States Patents*, 6,306,835.
- ◆ De Sousa C.P. (2006). *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. *Revista de biologia e ciências da terra*, **6** (2) : 341-352.
- ◆ Deacon M.P., Davis S.S., White R.J., Nordman H., Carlsted, I., Errington N., Rowe A.J., Harding S.E. (1999). Are chitosan-mucin interactions specific to different regions of the stomach? Velocity ultracentrifugation offers a clue. *Carbohydrate Polymers*, **38** : 235-238.
- ◆ Dedet J.P., Addadi K., Lannuzel B. (1977). Epidemiology of leishmaniasis in Algeria 7. Visceral leishmaniasis in the Grande Kabylie focus. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, **70** : 250- 265.
- ◆ Dehghani F., Hoseini M.H.M., Memarnejadian A., Yeganeh F., Rezaie A.M., Khaze V., Sattari M., Tamijani H.D., Labibi F., Mossaffa N. (2011). Immunomodulatory Activities of Chitin Microparticles on Leishmania major-infected Murine Macrophages. *Archives of Medical Research*, **42** : 572-576.
- ◆ Demel R.A., De Kruffyff B. (1976). The function of sterols in membranes. *Biochimica Biophysica Acta*, **457** : 109–132.
- ◆ Desjeux P. (2004). Leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology*, **2** : 692.
- ◆ Divakaran R., Pillai V.N.S. (2002). Flocculation of river silt using chitosan. *Water Research*, **36** : 2414-2418.

- ◆ Drohan W.N., MacPhee M.J., Miekka S.I., Singh M.S., Elson C., Taylor J.R. (2000). Chitin hydrogels, methods of their production and use. *United States Patent*, 6,124,273.
- ◆ El-Sayed S.T., EL-Sayed, El-Sayed M., Wafaa, Shousha G., Abeer, Shehata N., Nagwa, Omar I. (2012). Production of Novel Antitumor Chitooligosaccharides by using Purified Chitosanases from *Capsicum annuum* Leaves. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **6** (4) : 1-15.
- ◆ Etienne J., Clauser E., Housset C., Roingeard P. (2006). Biochimie, Génétique, Biologie moléculaire, 9ème Ed. Edition Masson.
- ◆ Falini G., Weiner S., Addadi L. (2003). Chitin-silk fibroin interactions: relevance to calcium carbonate formation in invertebrates. *Calcified Tissue International*.
- ◆ Fantin V.R., Berardi M.J., Scorrano L., Korsmeyer S.J., Leder P. (2002). A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer cell*, **2** : 29-42.
- ◆ FAOSTAT, FAO Statistical Databases, Food and Agricultural Organisation of the United Nations. (2012). <http://apps.fao.org>
- ◆ Farber J.N., Harris L.J., Parish M.E., Beuchat L.R., Suslow T.V., Gorney J.R., Garret E.H., Busta F.F. (2003). Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2** : 142-160.
- ◆ Felse P.A., Panda T. (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*, **20** : 505-512.
- ◆ Felt O. (1999). Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de doctorat. Université de Genève, Suisse.
- ◆ 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. These de doctoat. Université Nationale de Seoul.
- ◆ Gao X.-A., Zhang Y.-F., Park R.-D., Huang X., Zhao X.Y., Xie J., Jin R.-D. (2012). Preparation of Chitooligosaccharides from Chitosan using Crude Enzyme of *Bacillus cereus* D-11. *Journal of Applied Biological Chemistry*, **55** (1) : 13–17.
- ◆ Garvey E.P., Santi D.V. (1986). Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles. *Science*, **233** : 535–540.
- ◆ Genetet N. (1997). Immunologie. 3^e Editions Médicales Internationales.
- ◆ Gerasimenko D.V., Avdienko I.D., Bannikova G.E., Zueva O.Y., Varlamov V.P. (2004). Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40** (3): 253-257.

- ◆ Gogev S., Versali M.-F., Thiry E. (2003). Les chitosanes - nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. *Annales Médicales Vétérinaires*, **147** : 343-350.
- ◆ Gosland M.P., Lum B.L., Sikic B.I. (1989). Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells. *Cancer Research*, **49** : 6901-6905.
- ◆ Grogl M., Oduola A.M., Cordero L.D., Kyle D.E. (1989). *Leishmania* spp: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Experimental Parasitology*, **69** : 78–90.
- ◆ Gutowska M. (2002). Chitinase activity of fishies with varying depth distributions. Thèse de doctorat. The Evergreen State College, Washington, USA.
- ◆ Haki G.D., Rakshit S.K. (2003). Developments in industrially important enzymes: a review. *Bioresource Technology*, **89** : 17-34.
- ◆ 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.
- ◆ Hamodrakas S.J., Willis J.H., Iconomidou V.A. (2002). A structural model of the chitin binding domain cuticule proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32** : 1577-1583.
- ◆ Hanahan D., Weinberg R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*. **100** : 57-70.
- ◆ Hardinge-Lyme N. (2001). Chitosan-containing liquid compositions and methods for their preparation and use. *United States Patents*, 6,323,189.
- ◆ Harlow E., Lane D. (1991). Les Anticorps : un manuel de laboratoire. vol 1. Edition Pradel, Paris.
- ◆ Harrat Z., Pralong F., Belazzoug S., Dereure J., Deniau M., Rioux J.A., Belkaid M., Dedet J.P. (1996). *Leishmania infantum* and *L. major* in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **90** : 625- 629.
- ◆ Helander I.M., Nurmiäho-Lassila E.-L., Ahvenainen R., Rhoades J., Rolller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **71** : 235-244.
- ◆ Hennen W.J. (1996). Chitosan. Woodland Publishing Inc: 1-31.
- ◆ Høgdall E.V.S., Ringsholt M., Høgdall C.K., Christensen I.J., Johansen J.S., Kjaer S.K., Blaakaer J., Ostenfeld-Møller L., Price P.A, Christensen L.H. (2009). YKL-40 tissue expression and plasma levels in patients with ovarian cancer. *BMC Cancer*, **9** (8) : 1-10.
- ◆ Huang R., Mendis E., Rajapakse N., Kim S.-K. (2006). Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sciences*, **78** : 2399 – 2408.

- ◆ Illum L., Chatfield S.N. (2002). Vaccine compositions including chitosan for intranasal administration and use thereof. *United States Patents*, 6,391,318.
- ◆ Imai T., Watanabe T., Yui T., Sugiyama J. (2003). The directionality of chitin biosynthesis : a revisit. *Biochemical Journal*, **374** : 755-760.
- ◆ Ishikawa H., Nakamura T., Kawano A., Gondo N., Sakai T. (2009). Chemoprevention of colorectal cancer in Japan: a brief introduction to current clinical trials. *Journal of Gastroenterology*, **44** : 77–81.
- ◆ Jaafari K., Elmaleh S., Coma J., Benkhoudja K. (2001). Equilibrium and kinetics of nitrate removal by protonated cross-linked chitosan. *Water SA*, **27** (1) : 9-13.
- ◆ Je J.-Y., Cho Y.-S., Kim S.-K. (2006). Cytotoxic activities of water soluble chitosan derivatives with different degree of deacetylation. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, **16** : 2122-2126.
- ◆ Je J.Y., Kim S.-K. (2006). Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1760** : 104-109.
- ◆ Jeon Y.-J., Kim S.-K. (2000) (a). Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochemistry*, **35** : 623-632.
- ◆ Jeon Y.-J., Kim S.-K. (2000) (b). Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, **41** : 133-141.
- ◆ Jeon Y.-J., Shahidi F., Kim S.-K. (2000). Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Reviews International*, **16** (2) : 159-176.
- ◆ Jeon Y.-J., Park P.-J., Kim S.-K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, **44** : 71–76.
- ◆ Jessop N.M. (1973). Biosphère. Ecologie mécanisme de l'adaptation. Tome1. Ed. Recherche et Marketing. Troisième trimestre : 71-125.
- ◆ Jia Z., Shen D. (2002). Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid. *Carbohydrate Polymers*, **49** : 393-396.
- ◆ Jing Y., Nakajo S., Xia L., Nakaya K., Fang Q., Waxman S., Han R. (1999). Boswellic acidacetate induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Leukemia Research*, **23** : 43–50.
- ◆ Johansen J.S., Christensen I.J., Riisbro R., Greenall M., Han C., Price P.A., Smith K., Brüner N., Harris A.L. (2003). High serum YKL-40 levels in patients with primary breast cancer is related to short recurrence free survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, **80** : 15–21.
- ◆ Seignalet J., Joyeux H. (2004). L'alimentation ou la troisième médecine. Editions du Rocher.

- ◆ Juang R.-S., Wu F.-C., Tseng R.-L. (2002). Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilisation. *Advanced in Environmental Research*, **6** : 171-177.
- ◆ Jung B.-O., Kim C.-H., Choi K.-S., Lee Y.M., Kim J.-J. (1999). Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. *Journal of Applied Polymer Science*, **72** : 1713-1719.
- ◆ Junkera N., Johansenb J.S., Andersenc C.B., Kristjansena P.E.G. (2005). Expression of YKL-40 by peritumoral macrophages in human small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **48** : 223-231.
- ◆ Gregory K.-W. (2008). *PCT International Applications*. WO 200842891.
- ◆ Kaplan J.-C., Delpech M. (2001). *Biologie moléculaire et médecine*. Médecine-Sciences Flammarion.
- ◆ Kaplan J.-C., Delpech M. (1992). *Biologie moléculaire et médecine*. Médecine-Sciences Flammarion.
- ◆ Kean T., Thanou M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62** : 3–11.
- ◆ Kerkut J.A., Gilbert L.I (1985). *Comprehensive insect physiology. Biochemistry and pharmacology*, **3**. Ed Pergamon Press.
- ◆ Khan T.A., Peh K.K., Chang H.S. (2002). Reporting degree of deacetylation of chitosan : the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5** (3) : 205-212.
- ◆ Kim J.-A., Kong C.-S., Pyun S.Y., Kim S.-K. (2010). Phosphorylated glucosamine inhibits the inflammatory response in LPS-stimulated PMA-differentiated THP-1 cells. *Carbohydrate Research*, **345** : 1851–1855.
- ◆ Kim S.-K. (2010) *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*. CRC Press.
- ◆ Kim S.O., Cho S.M., Lee Y.M., Kim S.J. (2000). Thermo- and pH-responsive behaviour of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide. *Journal of Applied Polymer Science*, **78** : 1381-1391.
- ◆ Kimutai A., Ngure P.K., Tonui W.K., Gicheru M.M., Nyamwamu L.B. (2009). Leishmaniasis in northern and western Africa: A review. *African Journal Infectious Diseases*, **3** (1) : 14-25.
- ◆ Kolodziejek 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.
- ◆ Komazawa H., Saiki I., Nishikawa N., Yoneda J., Yoo Y.C., Kojima M., Ono M., Itoh I., Nishi N., Tokura S., Azuma I. (1993). Inhibition of tumor metastasis by Arg-Gly-

Asp-Ser (RGDS) peptide conjugated with sulfated chitin derivative, SCM-chitin-RGDS. *Clinical and Experimental Metastasis*, **11** : 482-491.

- ◆ Konno A.L., Gauthier J.H., Matahira Y. (2002). Chitin oligosaccharides and/or chitosan oligosaccharides for preventing or treating common cold or treating pain. *United States Patent*, 6,492,350.
- ◆ Kurita K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer science*, 26: 1921-1971.
- ◆ Kwak C., Hong S. K., Seong S. K., Ryu J. M., Park M. S., Lee S.E. (2005). Effective local control of prostate cancer by intratumoral injection of ¹⁶⁶Ho-chitosan complex (DW-166HC) in rats. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **32** : 1400–1405.
- ◆ Lauthier D., Canitrot Y., Salmon J.M. (1994). Effects of vinblastine, colchicines, and verapamil on rhodamine 123 accumulation in human P-glycoprotein-positive leukemia cells. *Anticancer Research*, **14** (6B) : 2589–2595.
- ◆ Lavertu M., Xia Z., Serreqi A.N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M.D., Gupta A. (2003). A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **32** : 1149-11458.
- ◆ Le Roux K. (2012). Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé. Thèse de doctorat, université de Nantes, France.
- ◆ Lee J.-K., Lim H.-S., Kim J.-H. (2002). Cytotoxic activity of aminoderivatized cationic chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **12** : 2949–2951.
- ◆ Little S.R., Langer R. (2005). Nonviral Delivery of Cancer Genetic Vaccines. *Advances in Biochemical Engineering./Biotechnology*, **99** : 93–118.
- ◆ Liu C., Tan Y., Liu C., Chen X., Yu L. (2007). Preparations, Characterizations and Applications of Chitosan-based Nanoparticles. *Journal of Ocean University of China*, **6** : 237-243.
- ◆ Liu H., Du Y., Wang X., Hu Y., Kennedy J.F. (2004). Interaction between chitosan and alkyl β-D-glucopyranoside and its effect on their antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, **56** : 243-250.
- ◆ Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z., Yao K.D. (2000). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science*, **79** : 1324-1335.
- ◆ Loiseleur J. (1963). Techniques de laboratoire. Tome 1, fascicule 21: 1355-1356. Ed. Masson.

- ◆ Lopata A.L., O'Hehir R.E., Lehrer S.B. (2010). Shellfish allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, **40** (6) : 850-858.
- ◆ Lu L.M., Zhang L., Zhang X.B., Wu Z.S., Huan S.Y., Shen G.L., Yu R.Q. (2010). A MgO Nanoparticles Composite Matrix-Based Electrochemical Biosensor for Hydrogen Peroxide with High Sensitivity. *Electroanalysis*, **22** (4) : 471-477.
- ◆ Maarouf M., Adeline M.T., Solignac M., Vautrin D., Robert-Gero M. (1998). Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite*, **5** : 167–173.
- ◆ Mac Laughlin F.C., Mumper R.J., Wang J., Tagliaferri J.M., Gill J., Hinchcliffe M., Rolland A.P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release*, **56** : 259–272.
- ◆ MacMorris-Adix M. (2008). Leishmaniasis: A review of the disease and the debate over the origin and dispersal of the causative parasite *Leishmania*. *Macalester Reviews in Biogeography*, **1** : 1-19.
- ◆ Majeti N.V., Kumar R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, **46** : 1–27.
- ◆ Mansencal R. (1999). Chitin. *Polymer Data Handbook*, Ed. Oxford University Press.
- ◆ Matsuoka T., Chung K.H.-Y., Yashiro M., Nishimura S., Sawada T., Saiki I., Sowa M. (1998). Adhesion polypeptides are useful for the prevention of peritoneal dissemination of gastric cancer. *Clinical and Experimental Metastasis*, **16** : 381–388.
- ◆ Mbongo N., Loiseau P.M., Billion M.A., Robert-Gero M. (1998). Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42** : 352–357.
- ◆ Merzendorfer H., Zimoch L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, **206** : 4393-4412.
- ◆ Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J., Glupczynski Y., Van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P.M., Van Bambeke F. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection.*, **13** : 560–578.
- ◆ Mincea M., Negrulescu A., Ostafe V. (2012). Preparation, modification, and applications of chitin nanowhiskers : a review. *Reviews on Advanced Materials Science*, **30** : 225-242.
- ◆ 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.

- ◆ Moreau D. (2006). Etude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse de doctorat Université de Nantes, France.
- ◆ Mukherjee D.P. (2001). Method for producing chitin or chitosan. *United States Patents*, 6,310,188.
- ◆ Muraki E., Yaku F., Kojima H. (1993). Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. *Carbohydrate Research*, **2396** : 227-237.
- ◆ Muzzarelli R.A.A. (1988). Carboxymethyl chitins and chitosans. *Carbohydrate polymers*, **8** : 1-21.
- ◆ Muzzarelli R.A.A. (2010). Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers. *Marine Drugs*, **8**(2) : 292-312.
- ◆ Muzzarelli C., Francescangeli O., Tosi G., Muzzarelli R.A.A. (2004). Susceptibility of dibutyl chitin and regenerated chitin fibres to deacylation and depolymerization by lipases. *Carbohydrate Polymers*, **56** : 137-146.
- ◆ Muzzarelli R.A.A. (1998). Colorimetric determination of chitosan. *Analytical Biochemistry*, **260** : 255-257.
- ◆ 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.
- ◆ Nakakuki T. (2002). Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure and Applied Chemistry*, **74** (7): 1245-1251.
- ◆ Nakano Y., Bin Y., Bando M., Nakashima T., Okuno T., Kurosu H., Matsuo M. (2007). Structure and mechanical properties of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films. *Macromolecular symposia*, **258** : 63-81.
- ◆ Nidetzky B., Steiner W., Hayn M., Claeysens M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochemical Journal*, **298** : 705-710.
- ◆ Niola F., Basora N., Chornet E., Vidal P.F. (1993). A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. *Carbohydrate Research*, **238** : 1-9.
- ◆ No H.K., Meyers S.P., 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.

- ◆ Oester D.A., Wachter R., Gates J. (2002). Chitosan formulation with azelaic acid and other actives for treatment of acne. *United States Patent*, 6,451,773.
- ◆ Okamoto, Y.; Kawakami, K.; Miyatake, K.; Morimoto, M.; Shigemasa, Y.; Minami, S. (2002). Analgesic effects of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 49: 249-252.
- ◆ OMS (2010). Susceptibility testing of Enterobacteriaceae using disk diffusion. Protocole de laboratoire.
- ◆ Ouellette L.L.M., Borst P. (1991). Drug resistance and P-glycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Research in Microbiology*, **142** : 737–46.
- ◆ Ouellette M., Papadopoulou B. (1993). Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. *Parasitology Today*, **9** : 150–3.
- ◆ Pae H.-O., Seo W.-G., Kim N.-Y., Oh G.-S., Kim G.-E., Kim Y.-H., Kwak H.-J., Yun Y.-G., Jun C.-D., Chung H.-T. (2001). Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leukemia Research*, **25** : 339-346.
- ◆ Park O., Miyoshi H., Watanabe J., Chiba T., Endo I. (1993). Method for preparing chitosan. *United States Patents*, 5,232,842.
- ◆ Payet L., Ponton A., Agnely F., Colinart P., Grosiord J.L. (2002). Caractérisation rhéologique de la gélification d'alginate et de chitosane : effet de la température. *Rhéologie*, **2** : 46-51.
- ◆ Percheron F., Perlès R., Foglietti M.-J. (1981). Glucides, structure et propriétés. Abrégé de biochimie générale. Tome2. Ed Masson : 32-131.
- ◆ Percot A., Viton C., Domard A. (2003). Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules*, **4** (5) : 1380-1385.
- ◆ Pernet-Poil-Chevrier A. (2009). Nouvelle méthode de préparation de chitooligosaccharides possédant une structure et une architecture contrôlées. Thèse de Doctorat, Université de Lyon, France.
- ◆ Planas R.M. (2002). Development of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals. Thèse de doctorat. Université Polytechnique de Catalogne, Espagne.
- ◆ Prochazkova S., Varum K.M., Ostgaard K. (1999). Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. *Carbohydrate Polymers*, **38** : 115-122.
- ◆ Pujals G., Sune-Negre J.M., Perez P., Garcia E., Portus M., Tico J.R., Minarro M., Carrio J. (2008). *In vitro* evaluation of the effectiveness and cytotoxicity of meglumine antimoniate microspheres produced by spray drying against *Leishmania infantum*. *Parasitology Research*, **102** : 1243–1247.

- ◆ Qaqich R.B., Amiji M.M. (1999). Synthesis of a fluorescent chitosan derivative and its application for the study of chitosan-mucin interaction. *Carbohydrate Polymers*, **38** : 99-107.
- ◆ Rajapakse N., Kim M.-M., Mendis E., Huang R., Kim S.-K. (2006). Carboxylated chitooligosaccharides (CCOS) inhibit MMP-9 expression in human fibrosarcoma cells via down-regulation of AP-1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760 : 1780–1788.
- ◆ Rao M.S., Munoz J., Stevens W.F. (2000). Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology Biotechnology*, **54** : 808-813.
- ◆ Reese T.A., Liang H.E., Tager A.M., Luster A.D., Van Rooijen N., Voehringer D., Locksley R.M. (2007). Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*, **447** (7140) : 92-96.
- ◆ Register T.C., Carlson C.S., Adams M.R. (2001). Serum YKL-40 Is Associated with Osteoarthritis and Atherosclerosis in Nonhuman Primates. *Clinical Chemistry*, **47** : 2159-2161.
- ◆ Registre des tumeurs d'Alger (2003).
- ◆ Rehli M., Niller H.-H., Ammon C., Langmann S., Schwarzfischer L., Andreesen R., Krause S. W. (2003). Transcriptional Regulation of CHI3L1, a Marker Gene for Late Stages of Macrophage Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, **278** : 44058–44067.
- ◆ Reithinger R., Dujardin J.-C., Louzir H., Pirmez C., Alexander B., Brooker S. (2007). *The Lancet Infectious Diseases*, 7 : 581-596.
- ◆ Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, **31** (7) : 603-632.
- ◆ Rioux J.A., Jarry D.M., Lanotte G., Maazoun R., Killick-Kendrick R. (1984). Ecology of leishmaniasis in Southern France. 18. Enzymatic identification of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, isolated from *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, spontaneously infected in the Cévennes. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, **59** (4) : 331-333.
- ◆ 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.
- ◆ Roller S., Covill N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, **47** : 67-77.
- ◆ Roy I., Mondal K., Munishar N.G. (2003). Accelerating enzymatic hydrolysis of chitin by microwave pre-treatment. *Biotechnology Progress*, **19** : 1648-1653.
- ◆ Ruel-Gariepy E., Leclair G., Hildgen P., Gupta A., Leroux J.-C. (2002). Thermosensitive chitosan-based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules. *Journal of Controlled Release*, **82** : 373–383.

- ◆ Sabnis S., Block L.H. (2000). Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems: I. Molecular modifications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **27** : 181-186.
- ◆ Sagoo S., Board R., Roller S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiology*, **19** : 175-182.
- ◆ Saguez J., Vincent C., Laberche J.-C., Giordanengo P. (2007). Pourquoi les inhibiteurs de chitinases peuvent être considérés comme de nouveaux moyens de lutte contre les aphides ? *Revue de Cytologie et Biologie végétale- Le Botaniste*, **27** (3/4) : 23-31.
- ◆ Saguez J. (2002). Les chitinases et leur implication dans la pénétration de la membrane péritrophique des moustiques par les oocinètes de *Plasmodium*. *Mémoire de Maîtrise en Biologie*. Université de Picardie Jules Verne, France.
- ◆ Säkkinen M. (2003). Biopharmaceutical Evaluation of Microcrystalline Chitosan as Release-Rate-Controlling Hydrophilic Polymer in Granules for Gastro-Retentive Drug Delivery. Thèse de doctorat. Université d'Helsinki, Finlande.
- ◆ Salah R. (2005). Préparation d'oligosaccharides à partir d'une biomasse marine : la chitine. Mémoire de Magister, Ecole Nationale Polytechnique, Algérie.
- ◆ Sanchez A., Castanys S., Gamarro F. (1994). Increased P-type ATPase activity in *Leishmania tropica* resistant to methotrexate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **199** : 855-61.
- ◆ Santini M.T., Cametti C., Indoniva P.L., Morelli G., Donelli G. (1997). Polylysine induces changes in membrane electrical properties of K562 cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, **35** : 165-174.
- ◆ Saravanan B.C., Sreekumar C., Bansal G.C., Ray D., Rao J.R., Mishra A.K. (2003). A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Veterinary Parasitology*, **113** : 211-216.
- ◆ Seng J.-M. (1988). Chitine, chitosane et dérivés : de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*, Septembre : 40-44.
- ◆ Seo S.H., Han H.D., Noh K.H., Kim T.W., Son S.W. (2009). Chitosan hydrogel containing GMCSF and a cancer drug exerts synergistic anti-tumor effects via the induction of CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Clinical and Experimental Metastasis*, **26** : 179-187.
- ◆ Sergio P., Campana F., Signini R. (2001). Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. *Plimeros: Ciência Tecnologia*, **11** (4) : 169-173.
- ◆ Shahidi F., Arachchi J.K.V., Jeon Y.-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, **10** : 379-51.
- ◆ Sheperd R., Reader S., Falshaw A. (1997). Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, **14** : 535-542.

- ◆ Shiau S.-Y., Yu Y.-P. (1998). Chitin but not chitosan supplementation enhances growth of grass shrimp, *Penaeus monodon*. *American Society for Nutritional Sciences*, **128** (5) : 908-12.
- ◆ Skorik Y.A., Pestov A.V., Yatluk Y.G. (2010). Evaluation of various chitin-glucan derivatives from *Aspergillus niger* as transition metal adsorbents. *Bioresource Technology*, **101** (6) : 1769-1775.
- ◆ Sohn M.H., Lee J.H., Kim K.W., Kim S.W., Lee S.H., Kim K.-E., Kim K.H., Lee C.G., Elias J.A., Lee M.G. (2009). Genetic Variation in the Promoter Region of Chitinase 3-Like 1 Is Associated with Atopy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **179** : 449-456.
- ◆ Springate C.M.K., Jackson J.K., Gleave M.E., Burt H.M. (2005). Efficacy of an intratumoral controlled release formulation of clusterin antisense oligonucleotide complexed with chitosan containing paclitaxel or docetaxel in prostate cancer xenograft models. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **56** : 239–247.
- ◆ Su C.-H., Sun C.-S., Juan S.-W., Ho H.-O., Hu C.-H., Sheu M.-T. (1999). Development of fungal mycelia as skin substitutes: Effects on wound healing and fibroblast. *Biomaterials*, **20** : 61-68.
- ◆ Sun L.P., Du Y.M., Yang J.H., Shi X.W., Li J., Wang X.H., Kennedy J.F. (2006). Conversion of crystal structure of the chitin to facilitate preparation of a 6-carboxychitin with moisture absorption-retention abilities. *Carbohydrate Polymers*, **66** (2) : 168-175.
- ◆ 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.
- ◆ Taboada E., Cabrera G., Cárdenas G. (2003). Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. *Journal of the Chilean Chemical Society*, **48** (1) : 7 – 12.
- ◆ Takeshi Y., Yuki I., Naoto S. (2000). Oligosaccharide elicitors and their receptors for plant defense responses. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **12** (64) : 113-120.
- ◆ Tan M., Fang H.B., Tian G.L., Houghton P.J. (2002). Small-sample inference for incomplete longitudinal data with truncation and censoring in tumor xenograft models. *Biometrics*, **58** : 612–620.
- ◆ Tan E.W.Y., Lee V.R. (2002). Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin. Projet de fin d'études. Université de Loughborough, Angleterre.
- ◆ Tokumitsu H., Hiratsuka J., Sakurai Y., Kobayashi T., Ichikawa H., Fukumori Y. (2000). Gadolinium neutron-capture therapy using novel gadopentetic acid±chitosan complex nanoparticles: in vivo growth suppression of experimental melanoma solid tumor. *Cancer Letters*, **150** : 177-182.

- ◆ Tokuyasu K., Ono H., Mitsutomi M., Hayashi K., Mori Y. (2000). Synthesis of a chitosan tetramer derivative, β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-Glc N through a partial N-acetylation reaction by chitin deacetylase. *Carbohydrate Research*, **325** : 211-215.
- ◆ 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.
- ◆ Tsukada M., Shirata A., Hayasaka S.J. (2000). Chitin beads, process for preparing these beads, carrier comprising said beads, and process for preparing microsporidian spore. *United States Patent*, 6,156,330.
- ◆ Tyrra S. (1999). Crustacea. Projet de fin d'études. Université d'Humboldt, Berlin, Allemagne.
- ◆ Varum K.M., Egelandsdal B., Ellekjaer M.R. (1995). Characterization of partially N-acetylated chitosans by near infra-red spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, **28** : 187-193.
- ◆ Varum K.M., Ottoy M.H., Smidsrod O. (2001). Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydrate Polymers*, **46** : 89-98.
- ◆ Veessenmeyer J.L., Hauser A.R., Lisboa T., Rello J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. *Critical Care Medicine*, **37** (5) : 1777–1786.
- ◆ Volck B., Price P.A., Johansen J.S., Sørensen O., Benfield T.L., Nielsen H.J., Calafat J., Borregaard N. (1998). YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proceeding of the Association of American Physicians*, **110** : 351-360.
- ◆ Wang S.-L., Liang T.-W., Yen Y.-H. (2011). Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydrates Polymers*, **84** (2) : 732-742.
- ◆ Wang Y., Zhou P., Yu J., Pan X., Wang P., Lan W., Tao S. (2007). Antimicrobial effect of Chitoooligosaccharides Produced by Chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **16** (Suppl 1) : 174-177.
- ◆ Warren R.A.J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, **50** : 183-212.
- ◆ WHO (2004). The world health report. Changing history. Geneva. <http://www.who.int/whr/2004/en/index.html>.
- ◆ Xie W., Xu P., Wang W., Liu Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **11** : 1699-1701.
- ◆ Xie W., Xu P., Wang W., Liu Q. (2002). Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohydrate Polymers*, **50** : 35-40.

- ◆ Yaku F., Tanaka R., Muraki E., Fujishima S., Miya M. (1990). Process for preparing chitosan oligosaccharides. *United States Patents*, 4,970, 150.
- ◆ Yamasaki M., Arai H., Ashida N., Ishii K., Kita T. (2001). Monocyte chemoattractant protein 1 causes differential signalling mediated by proline-rich tyrosine kinase 2 in THP-1 cells. *Biochemical Journal*, **355** : 751-756.
- ◆ Yang J.-K., Shih I.-L., Tzeng Y.-M., Wang S.-L. (2000). Production and purification of proteases from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, **26** : 406-413.
- ◆ Yoo S.-H., Lee J.-S., Park S.Y., Kim Y.-S., Chang P.-S., Lee H.G. (2005). Effects of selective oxidation of chitosan on physical and biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, **35** : 27–31.
- ◆ Zeng Q., Hong W., Tan Y.H. (1998). Mouse PRL-2 and PRL-3, two potentially prenylated protein tyrosine phosphatases homologous to PRL-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **244** : 421-427.
- ◆ Zhang H., Du Y., Yu X., Mitsutomi M., Aiba S.-I. (1999). Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. *Carbohydrate Research*, **320** : 257–260.
- ◆ Zhang W., Murao K., Zhang X., Matsumoto K., Diah S., Okada M., Miyake K., Kawai N., Fei Z., Tamiya T. (2010). Resveratrol represses YKL-40 expression in human glioma U87 cells. *BMC Cancer*, **10** : 593.
- ◆ 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 B.H., Yang B.H., Tang Z.Y. (2004). Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **130** : 417–422.

ANNEXE 1 : LES MILIEUX DE CULTURE ET TAMPONS

Tableau X : Milieux de culture des tissus standards utilisés (mg/1000 ml)

Constituants	DMEM	RPMI-1640	MEM
CaCl₂	200	-	200
Ca(NO₃)₂ 4H₂O	-	100	-
Fe(NO₃)₃ 9H₂O	0,1	-	-
KCl	400	400	400
MgSO₄ 7H₂O	200	100	97,67
NaCl	6400	6000	6800
NaHCO₃	3700	2000	2200
NaH₂PO₄ H₂O	125	-	-
Na₂HPO₄	-	800	122
Glucose	4500	2000	1000
Glutathion	-	1	-
Acide ascorbique Na	-	-	50
Acide pyruvique	-	-	11
Rouge phénol, Na	15	5	11
Pyruvate de sodium	110	-	-
Thymidine	-	-	10
L-Alanine	-	-	25
L-Arginine HCl	-	200	126
L-Asparagine H₂O	-	57	50
Acide aspartique H₂O	-	20	-

Acide L-Aspartique	-	20	30
L-Cystine	48	50	-
L-Cystéine HCl H₂O	-	-	100
L-Cystéine 2HCl	-	-	31,3
Acide L-Glutamique	-	20	75
L-Glutamine	580	300	292
Glycine	30	10	50
L-Histidine	-	15	42
L-Histidine HCl H₂O	42	-	21
L-Hydroxyproline	-	20	-
L-Isoleucine	105	50	52
L-Leucine	105	50	52
L-Lysine H₂O	150	40	-
L-Lysine HCl	-	-	72,5
L-Méthionine	30	15	15
L-Phénylalanine	66	15	32
L-Proline	-	20	40
L-Sérine	42	30	25
L-Thréonine	95	20	48
L-Tryptophane	16	5	10
L-Tyrosine	72	20	-
L-Tyrosine 2Na 2H₂O	-	-	51,9
L-Valine	94	20	46
Biotine	-	0,25	0,1

D-Panthenate de calcium	4	0,25	1
Chlorure de Choline	4	3	1
Acide Folique	4	1	1
Acide thioctique	-	-	0,2
Adénosine	-	-	10
Cytidine	-	-	10
2'-déoxyadénosine	-	-	10
2'-déoxycytidine HCl	-	-	11
2'-déoxyguanosine	-	-	10
Guanosine	-	-	10
Uridine	-	-	10
i-Inositol	7	35	2
Nicotinamide	4	1	1
Acide Para-amino-benzoïque	-	1	-
Pyridoxal HCl	4	-	1
Pyridoxine HCl	-	1	-
Riboflavine	0,4	0,2	0,1
Thiamine HCl	4	1	1
Vitamine B₁₂	-	0,005	1,36

Tableau XI: Milieu de culture Mueller-Hinton

Composé	Quantité
Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine	17,5 g
Amidon de maïs	1,5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1 l

◆ Tampon acétate de potassium (50 mM, pH 5,5) :

Pour la préparation de 100 ml de tampon acide acétique-acétate de potassium 50 mM, de pH 5,5, il faut prendre 60 ml d'eau distillée et y verser 0,29 ml d'acide acétique pur et 27,93 g d'acétate de potassium. Il faut bien agiter jusqu'à dissolution complète, puis compléter la solution à 100 ml avec de l'eau distillée.

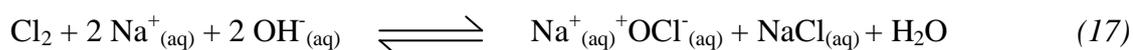
◆ Tampon citrate-phosphate (50 mM, pH 4,6) :

Pour la préparation de 200 ml de tampon citrate-phosphate 50 mM, de pH 4,6, il faut prendre 150 ml d'eau distillée et y verser 3,93 g d'acide citrique et 1,51 g d'acétate de potassium. Il faut bien agiter jusqu'à dissolution complète, puis compléter la solution à 200 ml avec de l'eau distillée.

ANNEXE 2 : ESTIMATION DU DEGRÉ CHLOROMETRIQUE

Le degré chlorométrique de Gay-Lussac correspond au nombre de litres de chlore gazeux qu'un litre de solution ou d'extrait est capable de dégager en présence d'un acide dans des conditions normales de température et de pression.

L'agent actif de l'eau de Javel est l'anion hypochlorite (ClO^-). La réaction de production de l'eau de Javel est illustrée par l'équation (17) :

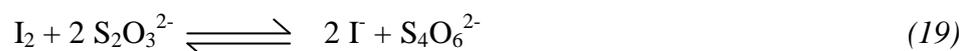
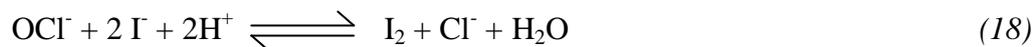


L'équation (17) montre que pour produire 1 mole de NaOCl , il faut 1 mole de Cl_2 . Ainsi, une solution d'eau de Javel de n M a un degré chlorométrique de n (moles de Cl_2 /litre).

Pour estimer le degré chlorométrique d'une solution d'eau de Javel, il faut :

- ◆ Mettre dans un Erlenmeyer sec de 250 ml : 10 ml d'une solution d'eau de Javel, 50 ml d'eau distillée, 50 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4 (1M)) et 20 ml de d'une solution d'iodure de potassium (KI (0,2 M)).
- ◆ Remplir une burette par une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1 N)), doser goutte à goutte jusqu'à apparition de la couleur brun-rouge et noter le volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
- ◆ Ajouter 2 à 3 gouttes d'amidon, poursuivre le dosage goutte à goutte jusqu'à la disparition de la couleur (la solution devient transparente) rouge et noter le volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (volume total consommé).

Les réactions (18 et 19) mises en jeu sont :



De la réaction (18), on conclut qu'il faut 1 mole de OCl^- pour obtenir 1 mole d' I_2 . De la réaction (19), on conclut qu'il faut 1 mole d' I_2 pour titrer 2 moles de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.

Ainsi nous pouvons déduire la formule (20) :

$$n(\text{OCl}^-) = \frac{1}{2} n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \quad (20)$$

D'où la formule (21) :

$$[\text{OCI}^-] \times V_{\text{javel}} = \frac{1}{2} [\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] \times V_{\text{agent titrant}} \quad (21)$$

Pour avoir le degré chlorométrique, il suffit de multiplier la $[\text{OCI}^-]$ par 22,4 (volume en litres qu'occupe 1 mole de gaz).

ANNEXE 3 : DOSAGE DES SUCRES REDUCTEURS PAR L'ACIDE BICHINCHONINIQUE

◆ **Principe**

Le couple l-sérine/cu²⁺, en présence d'une extrémité réductrice, est réduit en l-sérine/cu⁺. Ce nouveau couple forme avec le 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline un complexe pourpre qui absorbe à 540nm. L'absorbance à cette longueur d'onde est proportionnelle au taux de sucres réducteurs dans la solution.

◆ **Méthode**

Pour le dosage, deux solutions A et B sont préparées et mélangées volume à volume.

Pour la solution A, il faut dissoudre 2,42g de Na₂CO₃, 6,35g de NaHCO₃ et 194,2mg de 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline dans 100ml d'eau distillée.

Pour la solution B, il faut dissoudre 126,2mg de L-sérine et 124,8mg de CuSO₄, 5H₂O dans 100ml d'eau distillée.

A 250µl du mélange A/B sont rajoutés 500µl de chaque échantillon. Le mélange réactionnel est incubé à 90°C pendant 15min puis refroidi 10min dans un bain d'eau à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 540nm.

◆ **Préparation de la courbe étalon**

La courbe étalon a été établie comme il suit :

Différentes concentrations de glucose sont préparées dans du tampon citrate-phosphate (50mm, ph 4,6) (annexe 1). Les solutions sont plongées dans la glace. Le glucose libéré par la cellulase est mesuré par la méthode de dosage des sucres réducteurs par l'acide bichinchoninique.

ANNEXE 4 : DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BIURET

◆ PRINCIPE

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 10 mg/l.

◆ Méthode

La gamme d'étalonnage se fait comme suit :

A partir d'une solution de peptone à 5 g/l (étalon mère), la gamme ci-contre est préparée :

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

Dans chaque tube, les volumes sont complétés à 2 ml, avec de l'eau physiologique. Puis, 8 ml de réactif de Biuret sont rajoutés. Ce dernier est préparé comme suit :

Sulfate de cuivre (CuSO ₄).....	1,5 g
Ethyldiméthyltétracétique (EDTA).....	6 g
KI.....	1 g
NaCl.....	0,9 g
Dans 300 ml d'eau distillée.	

300 ml de NaOH à 2,5 M sont rajoutés en une fois et la solution est complétée à 1 litre.

Les tubes sont placés pendant 30 minutes à l'obscurité pour développer la coloration.

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

Pour le dosage des protéines, c'est la même procédure avec 0,5 ml de la solution à doser (surnageant), éventuellement diluée pour se situer dans la gamme.

La courbe étalon obtenue est donnée en annexe 13.

ANNEXE 5 : MESURE DU POIDS MOLECULAIRE

◆ Description

Le viscosimètre est constitué de trois parties tubulaires principales **1**, **2** et **3** (**Figure 63**). 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 **M1** et **M2** 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.

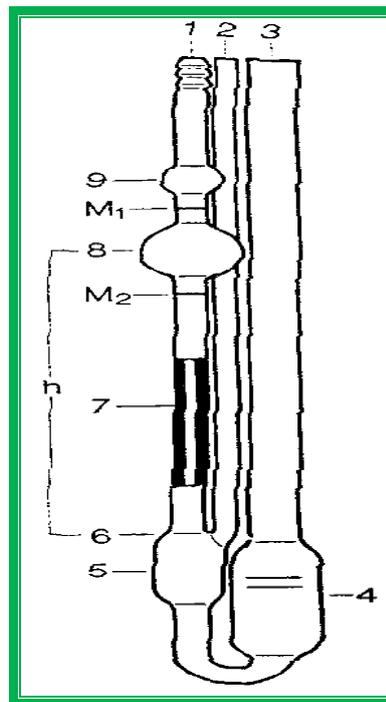


Figure 63: Viscosimètre de type Ubbelohde

◆ Mode de remplissage

Pour remplir le viscosimètre, celui-ci est incliné d'environ 30° sur la verticale, le réservoir **4** se trouvant en dessous du capillaire **7**; ensuite, le liquide est introduit 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, un doigt est placé sur le tube **2** et le liquide est aspiré par le tube **1** jusqu'à ce qu'il atteigne le centre du réservoir **9**, et le doigt est retiré du tube.

Le temps d'écoulement du liquide est mesuré entre les repères **M1** et **M2**, à l'aide d'un chronomètre.

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

◆ Calcul de la viscosité et du poids moléculaire

La viscosité réduite, η_r , et la viscosité inhérente, η_i , sont obtenues à partir des relations suivantes (22, 23 et 24) :

$$\eta_r = \eta_{sp} / [C] \quad (22)$$

Avec :

$$\eta_{sp} = (\eta / \eta_s) - 1 \quad (23)$$

$$\eta_i = 1/[C] \times \ln (\eta / \eta_s) \quad (24)$$

Avec :

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 (25) ci-dessous :

$$\eta = k.t \quad (25)$$

Avec :

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

t : temps d'écoulement en secondes.

Les poids moléculaires moyens des polymères préparés ont été déterminés à partir de l'équation de **MARK-HOUWINK** (26) :

$$[\eta] = k M^{\alpha} \quad (26)$$

Avec :

$[\eta]$: viscosité intrinsèque.

k et α : constantes. Sachant que pour la chitine: $k = 0,24 \text{ cm}^3/\text{g}$ et $\alpha = 0,69$ et pour le chitosane : $k = 0,078 \text{ cm}^3/\text{g}$ 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

Cinq solutions de concentrations croissantes de chaque polymère dans son solvant approprié (0,0223 ; 0,042 ; 0,065 ; 0,081 ; 0,1 (g / 100 ml)) et une solution à 0 g de polymère (η_s) sont préparées. Le passage de chaque solution est chronométré. Les mesures sont réalisées en introduisant le viscosimètre dans un bain thermostaté réglé à 25 °C.

A partir des η (25) et du η_s , les η_{sp} (23) sont déduits afin de pouvoir retrouver les η_r (22) et les η_i (24) pour tracer les droites $\eta_r = f([C])$ et $\eta_i = f([C])$.

Les ordonnées à l'origine des deux droites tracées sont déterminées. La moyenne des deux valeurs est la viscosité intrinsèque.

Il suffit par la suite d'appliquer l'équation MARK-HOUWINK (26) pour retrouver le poids moléculaire (M) de chaque polymère (ZHANG et NEAU, 2001).

Annexe 6 : Dosage d'hexosamines par la méthode d'Elson et Morgan

◆ **Principe**

En milieu alcalin et à chaud, les N-acétyl hexosamines conduisent à des chromogènes (dérivés du furane) qui, en milieu acide, se condensent en p-diméthyl aminobenzaldéhyde (réactif d'EHRlich) conduisant à une coloration rouge violacée. Les osamines non acylées ne donnent pas directement la coloration. Le chauffage en milieu alcalin nécessite l'addition d'acétylacétone et conduit à la formation de dérivés pyrroliques (réaction d'ELSON et MORGAN) (PERCHERON *et al.*, 1981).

Cette méthode utilise deux réactifs :

- ⊙ Le tetraborate de potassium (réactif A) en solution de 0,8 M dans le borate. Le pH est ajusté à 9,1 avec du KOH.

- ⊙ Réactif à la p-diméthyl aminobenzaldéhyde (réactif B) : pour le préparer, il suffit de dissoudre 10 mg de p-diméthyl aminobenzaldéhyde dans 100 ml d'acide acétique glacial très pur, qui contient 12,5 % en volume de HCl 10 N. Le réactif se conserve bien pendant un mois à +2 °C. Au moment de l'usage, il est dilué avec 9 volumes d'acide acétique glacial très pur.

◆ **Préparation de la gamme étalon**

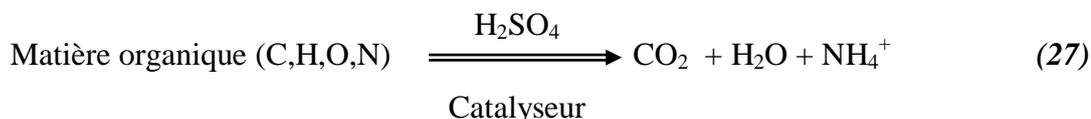
Une gamme comprise entre 0 et 8 mg d'acétyl glucosamines dans un volume de 1 litre d'eau distillée est choisie. 0,5 ml de chaque solution préparée, de concentration connue, sont réparties dans une série de tubes à essai. 0,1 ml de réactif A sont rajoutés et chauffés dans un bain-marie bouillant pendant exactement 3 minutes. La solution est refroidie dans un bain d'eau froide, puis 3 ml de réactif B sont rajoutés. Le tout est mélangé et porté immédiatement dans un bain à 36 °C. La solution est refroidie dans un bain d'eau froide (20 °C) et l'absorbance est lue à 530 nm au spectrophotomètre après 20 minutes, aussi vite que possible, l'intensité de la couleur baissant d'environ 0,5 % toutes les 5 minutes après avoir atteint son maximum en 20 minutes (LOISELEUR, 1963).

Annexe 7 : Dosage de l'azote total par la méthode Kjeldahl

◆ Méthode

⊙ Minéralisation

La minéralisation a lieu à chaud, en milieu sulfurique concentré et en présence de catalyseur selon la réaction ci-dessous (27) :



Dans cette étude, la minéralisation a été réalisée de la manière suivante :

➡ **L'essai** : dans un tube matras, sont introduits :

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

➡ **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 complété à 200 ml avec de l'eau distillée.

⊙ Déplacement de l'ammonium

Il se fait de la manière suivante (28) :



⊙ Séparation de l'ammoniac

La séparation de l'ammoniac se fait par distillation simple et entraînement à la vapeur.

Dans cette étude la distillation se fait comme suit :

Dans un ballon de distillation, sont introduits, successivement :

- 20 ml de minéralisât dilué ;
- 100 ml d'eau distillée ;

- quelques gouttes de phénophtaléine ;
- 10 ml de lessive de soude ;

Le ballon est immédiatement adapté au réfrigérant et chauffé. Le distillat est recueilli dans 20 ml d'acide sulfurique de concentration connue voisine de 0,01 M. La distillation dure 30 minutes.

Ⓢ Dosage de l'ammoniac

Il 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, le reste est dosé par une base étalonnée.

Dans cette étude, le dosage de l'ammoniac distillé se fait à la manière suivante :

L'excès d'acide sulfurique contenu dans le distillat est dosé à l'aide de la solution de NaOH 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 et NH_3) est égal au nombre de moles d'ions H^+ cédés par l'acide (H_2SO_4) (29) :

$$C(NH_3) \text{ (en moles/l)} = \frac{[2 \times C(H_2SO_4) \times V(H_2SO_4)] - [C(NaOH) \times V(NaOH)]}{V(NH_3) \text{ (minéralisat)}} \quad (29)$$

Dans 200 ml (donc dans 2 g de carapaces), il y a (30) :

$$N = [C(NH_3) \times M(N) \times 0,1] \text{ g / g de carapaces} \quad (30)$$

Et dans 100 g de carapaces, il y a (31) :

$$N = [C(NH_3) \times M(N) \times 10] \text{ g / 100 g de carapaces} \quad (31)$$

Avec :

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

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

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

C (NaOH) : concentration molaire de la solution de NaOH (moles/l).

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

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

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

L'azote protéique est déterminé comme suit **(32)** :

$$\mathbf{N(\text{protéines}) = N - N(\text{chitine})} \quad \mathbf{(32)}$$

La teneur des protéines en grammes dans 100 g de carapaces est déterminée comme suit **(33)** :

$$\mathbf{\text{Teneur en protéines en g dans 100 g de carapaces} = (N(\text{protéines}) / 0,16)} \quad \mathbf{(33)}$$

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

Annexe 8 : Extraction et l'électrophorèse de l'ADN

◆ **Méthode d'extraction et électrophorèse de l'ADN**

Ⓢ Extraction de l'ADN :

L'extraction d'ADN est effectuée de la façon suivante :

Le premier jour, les cellules sont mises en phase exponentielle de croissance, par repiquage, à une concentration $7,5 \times 10^4$ cellules/ml.

Le deuxième jour, les cellules sont mises en culture avec le produit à tester dans des boîtes Falcon de 75 cm³. Par la suite, les boîtes Falcon sont ensuite incubées pendant 48 heures à 37 °C et 5 % de CO₂.

Le quatrième jour, l'extraction est réalisée selon le protocole classique phénol/chloroforme ou par kit Qiagen[®]. Les cellules sont rincées au PBS (**Annexe 8**) froid deux fois, trypsinées (pour les cellules en monocouche avec une solution à 0,025 % de trypsine et 0,01 % d'EDTA), remises en suspension dans 0,5 ml de tampon de digestion (**Annexe 8**) et incubées, sous agitation, à 50 °C pendant 12 heures. Après la lyse cellulaire, l'ADN est extrait après ajout d'un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1, vvv). Les tubes sont agités au vortex pendant 1 minute puis centrifugés 10 minutes à 10000 rpm. Après récupération de la phase aqueuse, un demi-volume d'acétate d'ammonium (7,5 M) et de 2 volumes d'éthanol à 100 % sont rajoutés. L'ADN précipite immédiatement formant une volute blanchâtre. Une centrifugation à 5000 rpm pendant 2 minutes permet de culoter l'ADN. Le culot est rincé une fois avec de l'éthanol à 70 %, séché et dissout dans du TE (**Annexe 8**). L'échantillon est alors stocké à 4 °C à la concentration de 1 mg/ml.

Ⓢ Migration de l'ADN par électrophorèse :

L'électrophorèse de l'ADN est une technique de biologie moléculaire qui permet de séparer des fragments d'ADN de différentes tailles en les faisant migrer dans un gel d'agarose en les soumettant à un courant électrique. Cette technique exige :

➔ La préparation du gel d'agarose :

Le gel est constitué d'un tampon TBE (**Annexe 8**) et d'agarose à 0,8 % (soit 8 g d'agarose pour 1 litre de tampon TBE). En fonction des cuves à électrophorèse, il faut environ 50 ml de solution par gel à constituer.

Il faut porter à ébullition la solution au micro-onde à 1000 W jusqu'à ce que celle-ci soit transparente et sans grumeaux, puis, mettre en place le moule et le peigne (qui permet de constituer les puits du gel) et y couler l'agarose fondu pour obtenir un gel d'environ 5 mm d'épaisseur. Laisser ensuite refroidir jusqu'à solidification et enlever le peigne. En fin, il faut placer le gel dans la cuve à électrophorèse avec son support en veillant à ce que les puits du gel soient orientés du côté de l'électrode négative de la cuve.

➡ Le dépôt de l'ADN dans les puits du gel :

Il faut, tout d'abord, remplir la cuve de tampon TBE 1X jusqu'à recouvrir légèrement le gel (environ 2 à 5 mm au-dessus de la surface du gel).

Une migration de 2 µg d'ADN (Les fragments d'ADN sont mélangés avec du bleu de dépôt qui permet d'alourdir l'ADN pour qu'il tombe bien au fond des puits lors des dépôts et de suivre l'avancée de la migration car un de ses constituants (le bleu de bromophénol) marque le front de migration des plus petits morceaux d'ADN) de chaque échantillon. La migration est ensuite effectuée sur gel d'agarose à 2 % contenant du bromure d'éthidium dans du TBE 1X.

A l'aide d'une micropipette, il faut déposer 20 µl d'ADN au fond de chaque puits.

➡ La migration :

Ce gel est migré à 75 V (plus la tension est élevée et plus la migration est rapide mais elle devient moins précise). La durée de migration est proportionnelle à l'épaisseur du gel et à la quantité de tampon dans la cuve. La migration est arrêtée lorsque le bleu arrive à 1 cm de l'extrémité du gel.

➡ L'observation :

Après observation sous UV, les profils des différents échantillons sont comparés. Les cellules ayant subi une mort cellulaire de type apoptotique présentent une trainée révélant la fragmentation de l'ADN, ainsi qu'une bande plus marquée autour de 200 pb typique de l'apoptose (**HUANG *et al.*, 2006 ; MOREAU, 2006**).

◆ PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)

⊙ NaCl : 1,38M

- ⊙ KCl: 27mM
- ⊙ Na₂HPO₄: 31mM
- ⊙ KH₂PO₄: 14,7mM
- ⊙ pH : 7,4

◆ Tampon de digestion

- ⊙ NaCl : 100mM
- ⊙ Tris Cl : 10mM
- ⊙ EDTA: 25mM
- ⊙ SDS : 0,5%
- ⊙ Protéinase K : 0,1 mg/ml
- ⊙ pH : 8,0

◆ TE (Tris EDTA) :

- ⊙ Tris-Cl, pH 7,5 : 10 mM

- 1M Tris (Tris(hydroxymethyl) aminomethane) : 60,57 g (PM : 121,4 g/mol)
- Eau distillée: 0,5 l
- pH : 7,5 (ajusté avec de l'HCl)

- ⊙ EDTA, pH 8,0 : 1 mM

- 0,5M EDTA (Diaminoethane tetraacetic acid) : 18,6 g (PM : 372,2 g/mol)
- Eau distillée: 100 ml
- pH : 8,0 (ajusté avec du NaOH)

◆ TBE (Tris Borate EDTA) :

- ⊙ Tris : 89 mM
- ⊙ Acide borique : 89 mM
- ⊙ EDTA : 20 mM
- ⊙ pH : 8,0

ANNEXE 9 : TEST AU BLEU DE TRYPAN

◆ Principe

Le bleu de Trypan fait partie des différents colorants d'exclusion utilisés pour la numération des cellules viables, selon leur propriété à ne pas internaliser certains colorants par l'action de leur barrière cytoplasmique active contrairement aux cellules mortes. Ce principe appliqué à ce colorant permet la différenciation des cellules viables, qui restent incolores, et des cellules non viables, qui se colorent en bleu, lors de la numération cellulaire.

Le bleu de Trypan a une plus grande affinité pour les protéines sériques que pour les protéines cellulaires : si la coloration du milieu est trop importante, les cellules devront être culottées et mises en suspension dans un milieu sans protéine (type solution saline) avant leur comptage.

◆ Méthode

1. Préparer une solution de 0,1 % de bleu de Trypan dans de l'eau physiologique.
2. Placer la lamelle sur la cellule Mallassez.
3. Mélanger 0,5ml de la suspension cellulaire avec 0,5 ml de la solution de bleu Trypan.
4. Laisser incuber 5 minutes.
5. Remplir par capillarité, avec la solution finale, les chambres de la cellule Mallassez.
6. A l'aide d'un microscope avec un objectif à 10X et un oculaire 10X, compter les cellules viables (réfringentes).
7. Si plus de 5% des cellules sont sous forme d'agrégats, réaliser une nouvelle suspension et refaire un nouveau comptage.
8. Effectuer le calcul de la numération avec une cellule Malassez (**Figure 64**) ou une cellule de Thoma (**Figure 65**).

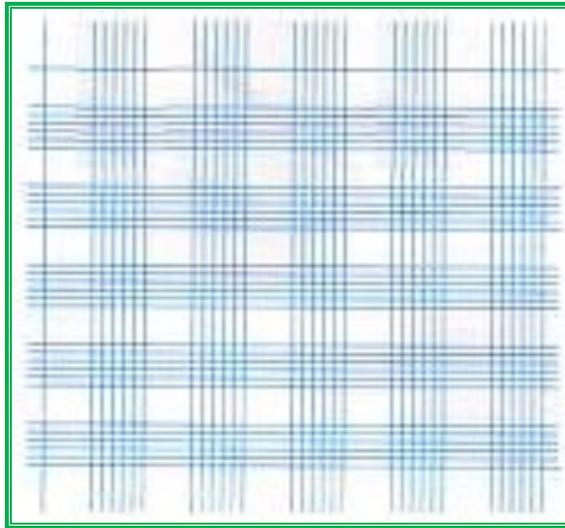


Figure 64 : Quadrillage de la cellule Malassez

Pour la cellule Malassez, il faut utiliser la formule ci-dessous (34) :

$$\text{Nombre total de cellules} = M \times 2 \times 10^4 \text{ (cellules/ml)} \quad (34)$$

Avec :

M: moyenne des nombres de cellules comptées sur 5 carrés de la cellule de Mallassez.

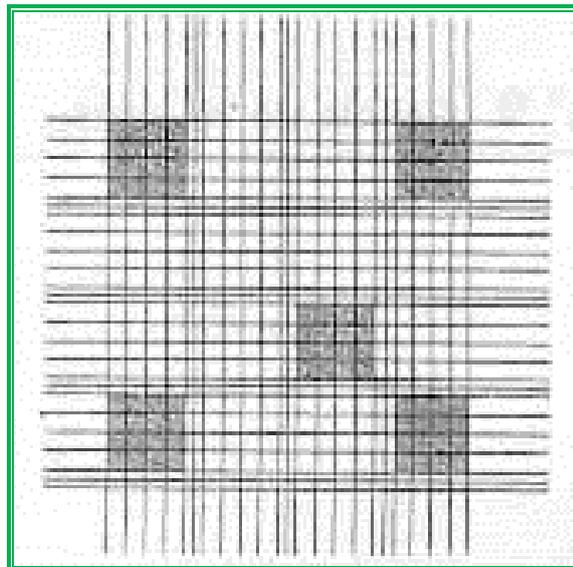


Figure 65 : Quadrillage de la cellule de Thoma

Pour la cellule de Thoma, il faut employer la formule suivante (35) :

$$\text{Nombre total de cellules} = M \times 16 \times 10^4 \text{ (cellules/ml)} \quad (35)$$

Avec :

M: moyenne des nombres de cellules comptées sur 6 carrés de la cellule de Thoma.

ANNEXE 10 : TEST AU MTT

◆ Principe du test MTT

Le test est basé sur la transformation d'un sel de tétrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)] (MTT) en formazan par réduction enzymatique.

En bref, le cycle tétrazolique du MTT est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

◆ Méthode

Dans une microplaque de 96 puits, on dépose 100 µl de cellules à la concentration de 10^6 /ml de milieu adéquat et on rajoute 10 µl de produit à tester à des concentrations variables. On teste aussi des puits avec milieu seul pour éliminer le bruit de fond, et des puits avec le solvant à la place du produit à tester (témoin négatif). La microplaque est incubée à 37 °C pendant 44 heures avec 5 % de CO₂.

Au bout de 44 heures, on dépose 10 µl d'une solution de MTT à 10 mg/ml dans chaque puits et on remet la microplaque pendant 4 heures à 37 °C dans le noir.

Au bout de 4 heures, on rajoute 100 µl de DMSO pur et on incube 30 minutes à 37 °C dans le noir. La microplaque est lue à 492 nm (**AL-KHATIB, 2010**).

L'absorbance obtenue est convertie en nombre de cellules grâce à une courbe étalon préétablie.

L'activité cytotoxique, la viabilité et l'CI₅₀ sont déterminées comme cité en annexe 9.

ANNEXE 11 : METHODE DES DISQUES

Pour chaque souche testée, la suspension microbienne est préparée dans une solution saline (0,85 %) pour obtenir une turbidité de 0,5 Mc Farland (environ 10^8 UFC/ml). Un écouvillon en coton stérile est plongé dans la suspension bactérienne pour prélever l'inoculum. Cet écouvillon est essoré, par pression sur les bords du tube, afin d'éliminer l'excès d'inoculum. Toute la surface de la boîte de Pétri, contenant du milieu Mueller-Hinton (**Annexe 1**), estensemencée par un mouvement de va-et-vient. La boîte de Pétri est retournée à approximativement 60° et le mouvement de va-et-vient est répété. La boîte de Pétri est retournée à approximativement 60° , une deuxième fois, et le mouvement de va-et-vient est répété pour la troisième fois. La dernière étape consiste en la rotation de l'écouvillon pour ensemenecer les bords de la boîte de Pétri. L'inoculum est séché à l'air libre pendant 3 à 5 minutes pour éliminer l'excès d'humidité qui pourrait être absorbée par les disques après leur application. Après cela, les disques stériles sont déposés, sur la surface de la boîte de Pétri, puis inoculés avec 10 μ l de produit à tester à des concentrations variables (10, 20, 50, 100, 200 et 300 μ g/ml). La gentamicine (10 μ g/ml) est utilisée en tant que témoin positif pour la souche *Escherichia coli* ATCC 25922. La ticarcilline (75 μ g/ml) est utilisée en tant que témoin positif pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Le solvant (eau distillée) est utilisé en tant que témoin négatif. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C et les zones d'inhibition sont observées après 24 heures (**OMS, 2010**).

Annexe 12 : Déplacements chimiques

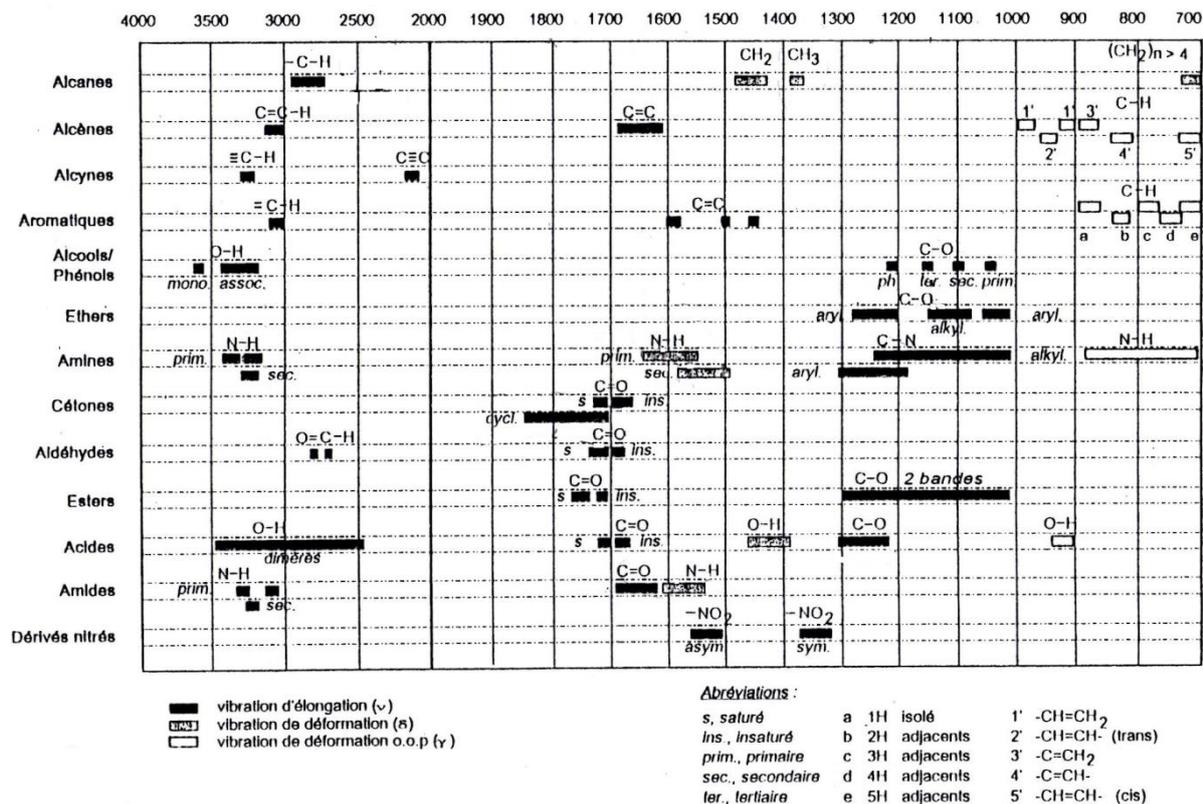


Figure 66 : Corrélation dans le moyen infrarouge entre structure et ν de vibration (cm^{-1})

Tableau XII : Déplacements chimiques des protons et carbones en RMN

Type de proton ou de carbone	Position (δ , ppm)
H1 (GluNAc)	4,62 - 4,85
H1 (GluNH ₂)	4,85 - 4,97
H2 (GluNH ₂)	3,18 - 3,24
H2 (GluAc)	3,38 - 3,65
H3 (GluNH ₂)	3,52 - 3,87
H3 (GluNAc)	3,52 - 3,65
H3, H4, H5, H6, H6'	3,74 - 4,34
HN-COCH ₃	1,95 - 2,09
CH ₃ COOH (AcOH)	2,09 - 2,11
C1	102,7 - 105,7
C2	55,2 - 57,6
C3	73,1 - 75,7
C4	80,9 - 85,7
C5	73,1 - 75,7
C6	59,6 - 60,8
N-CH ₃ (C7)	22,8 - 23,3
N-C=O (C8)	173,6 - 173,8

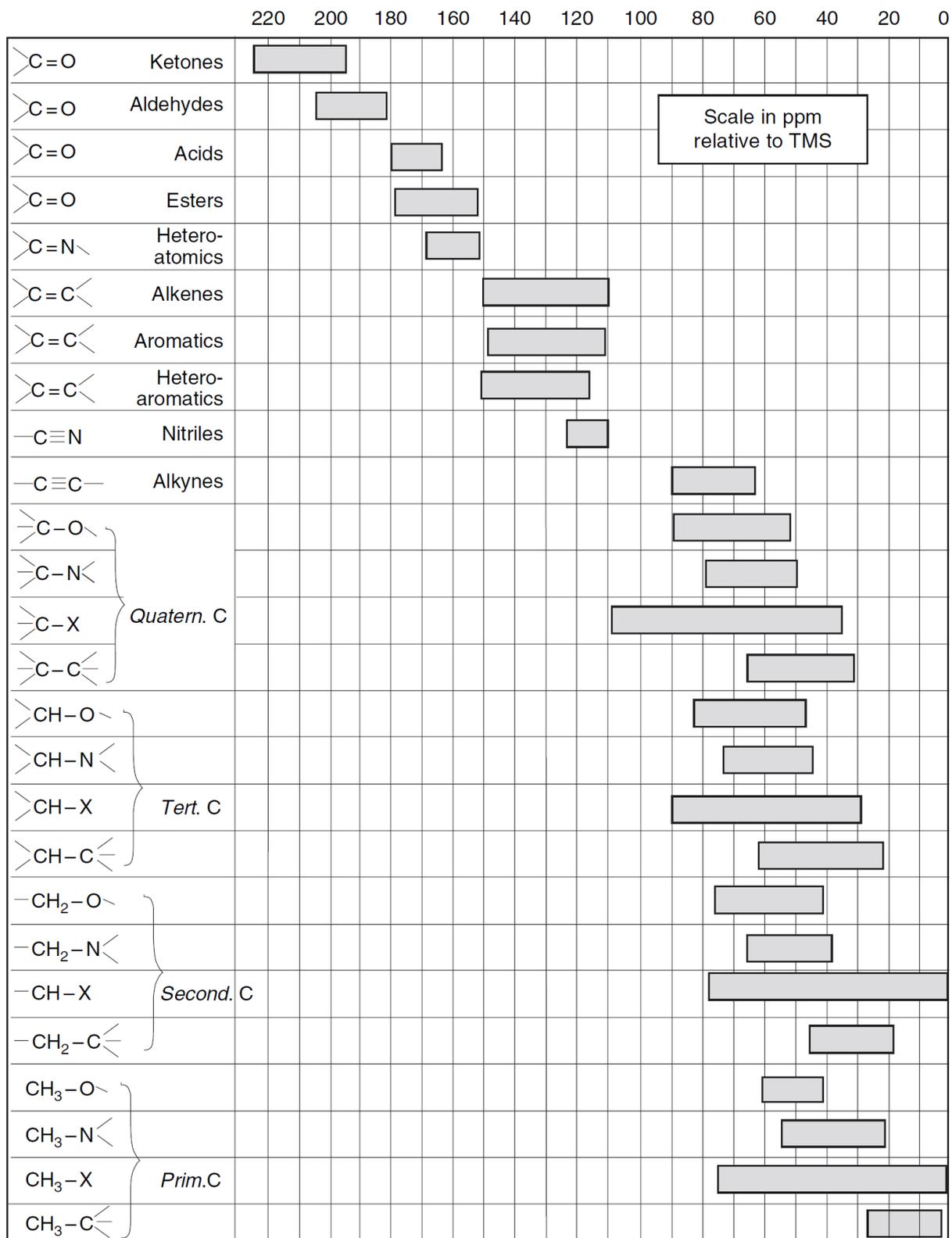


Figure 68 : Principaux déplacements chimiques en ^{13}C RMN

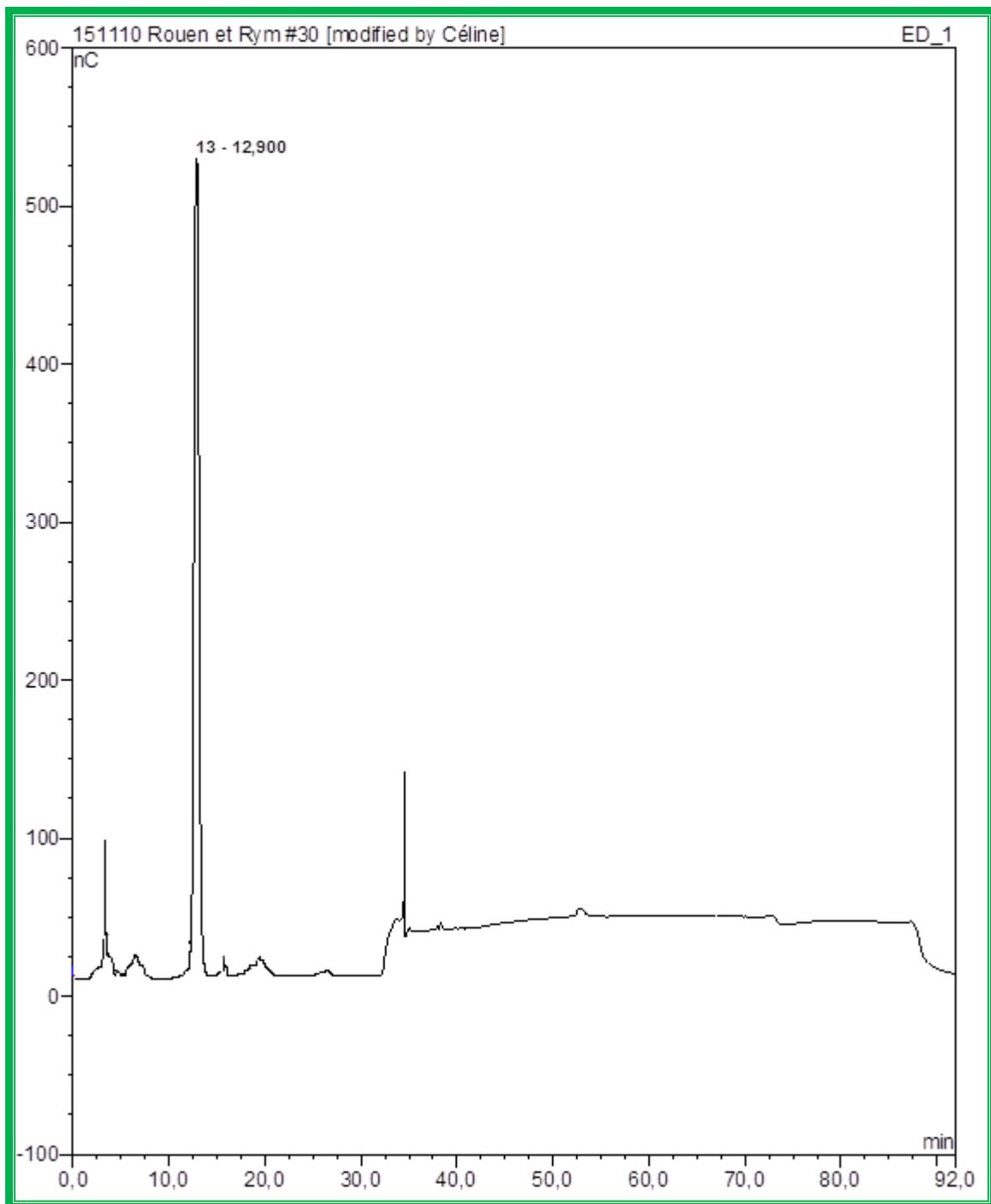


Figure 69 : Chromatogramme HPAEC de la glucosamine

Annexe 13 : Courbes étalon

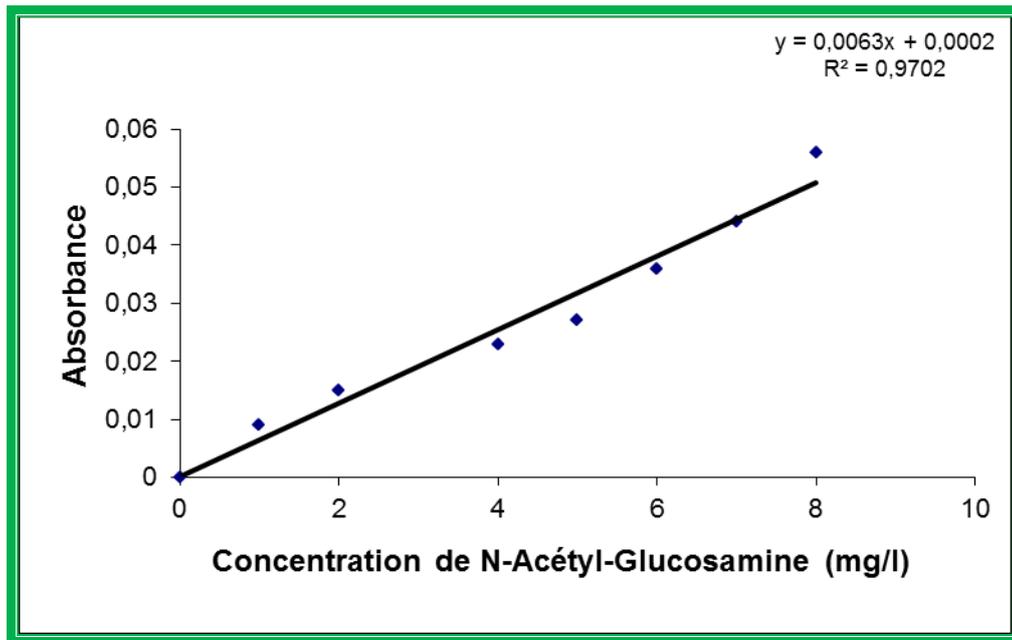


Figure 70 : Courbe d'étalonnage pour le dosage de la N-acétylglucosamine par la méthode d'Elson et Morgan

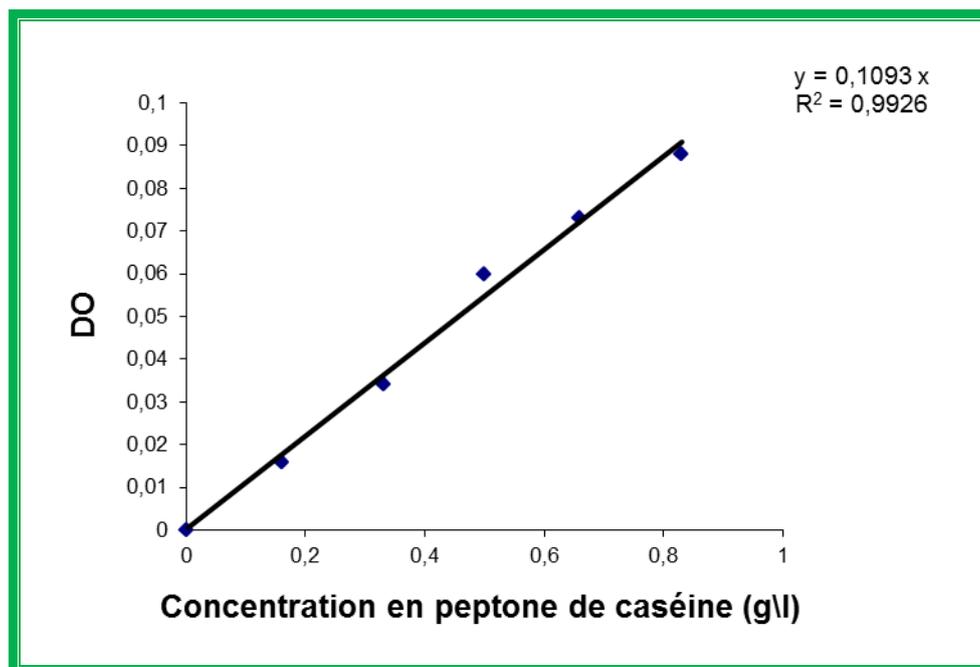


Figure 71 : Courbe d'étalonnage de la coloration de Biuret effectuée avec de la peptone de caséine

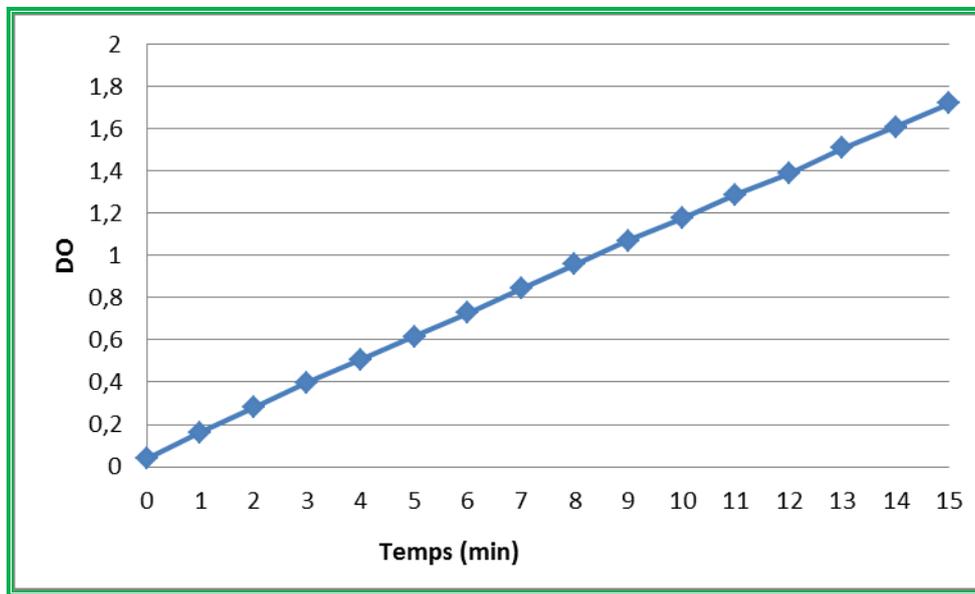


Figure 72 : Cinétique de dégradation du glucuronane par la glucuronane lyase

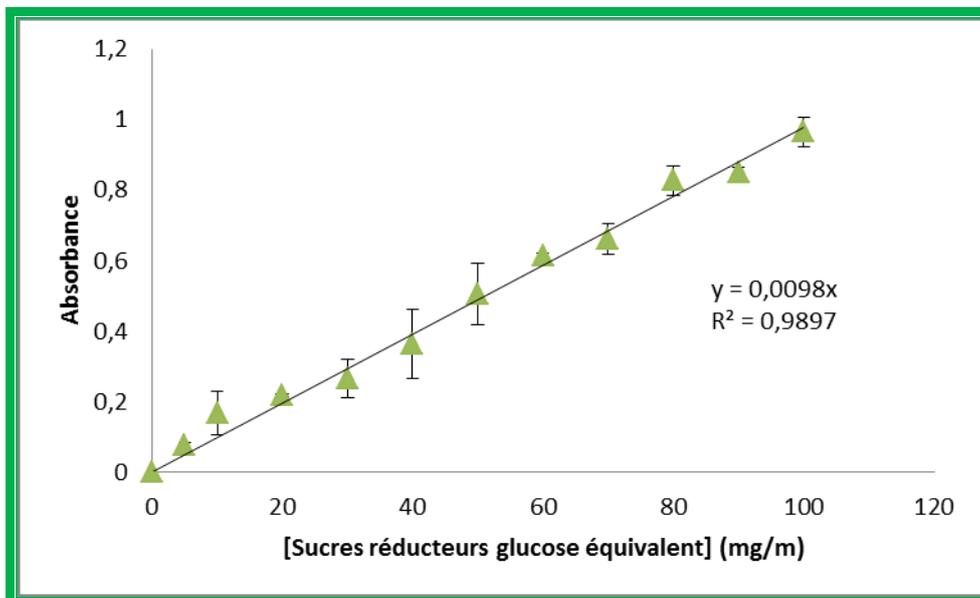


Figure 73 : Courbe étalon de la dégradation par la cellulase