

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE D'ALGER



*Département de Génie de l'Environnement*

*Laboratoire : Biotechnologies Environnementales & Génie des Procédés (BIOGEP)*

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Présenté par madame

**DZIRIL Maya épouse OUSLIMANE**

En vue de l'obtention du diplôme de Magister

En Génie de l'Environnement

*Option : Biotechnologie et Environnement*

## **Thème**

***Etude de l'hydrolyse enzymatique de la chitine irradiée  
par des chitinases extraites de la biomasse marine***

Soutenu devant le jury le : 29/ 11 /2010

Président : Pr N. MAMERI (Professeur, ENP)  
Rapporteur : Dr H. GRIB (Maître de Conférences, ENP)  
Examineur : Pr H. LOUNICI (Professeur, ENP)  
Examinatrice : Dr A. DJEFAL (Maître de Recherche, CRNA)  
Examinatrice : Dr N. ABDI (Maître de Conférences, ENP)  
Invitée : H. LARIBI (M.A.A, Université de Blida)

- Novembre 2010 -

## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé au sein du Département des Applications Médicales de la Division des Applications Nucléaires du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA).*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur N. MAMERI qui a bien voulu accepter de présider le jury.*

*Je tiens également à remercier Monsieur H. GRIB, Maître de Conférences à l'ENP, et Directeur de mémoire, pour avoir dirigé ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Je remercie chaleureusement Monsieur H. LOUNICI, Professeur à l'ENP, pour l'honneur qu'il m'a fait en examinant ce mémoire.*

*Mes remerciements vont également à Madame A. DJEFAL, Maître de Recherche au CRNA, qui a accepté de juger ce travail; ses conseils et critiques seront sans aucun doute d'un grand apport scientifique.*

*Mes remerciements s'adressent également à Madame N. ABDI, Maître de Conférences à l'ENP, pour sa gentillesse et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je voudrais également remercier Madame H. Laribi pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et pour m'avoir guidée ainsi que pour ses encouragements.*

*Je tiens également à présenter mes plus vifs remerciements à Monsieur N. Ait Said, pour ses précieux conseils ainsi que pour la mise en forme de ce document. Qu'il soit assuré de mon éternelle et profonde reconnaissance.*

*Je remercie chaleureusement Monsieur M. Mahlous pour ses qualités humaines, son aide précieuse et pour m'avoir permis d'effectuer ce travail en toute sérénité.*

*A Madame A. Nacer-Khodja, j'adresse mes sincères remerciements et je lui exprime ma profonde gratitude pour son aide et ses orientations.*

*Je remercie sincèrement mes collègues, pour l'aide et le soutien dont ils ont fait preuve à mon égard, en particulier, Mesdames S. Gais, L. Ait Said, L. Aberkane, S. Benamer, S. Larbi-Youcef, K. Ouallouche, S. Moussouni, M. Mezaguer, et Messieurs A. Bradeddine, O. Djerad, B. Mansouri, K. Bach-Tobdji, A. Ouafek et D. Tahtat.*

*Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## ***DEDICACES***

*Je dédie ce travail :*

*A mes chers parents*

*A mon mari et à mes adorables filles*

*A toute ma famille*

*A ma belle-famille*

*A mes amies*

## RESUME

L'objectif visé dans ce travail est l'extraction, la purification et la caractérisation de la chitinase en vue de son utilisation pour l'hydrolyse de la chitine préalablement irradiée par les rayons  $\gamma$  du Co-60. La production d'une chitinase brute à partir de la biomasse marine, ainsi que son utilisation dans des conditions opératoires préalablement déterminées, afin d'hydrolyser la matière chitineuse ont été atteintes. L'extrait enzymatique a été purifié par précipitation au sulfate d'ammonium (20%-90%), suivie d'un fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire et enfin par ultrafiltration. Ces techniques de purification ont permis d'atteindre une activité spécifique d'environ 567 U/mg, avec un facteur de purification de 8.34. Le poids moléculaire de la chitinase a été estimé à 21 kDa. Les conditions optimales de température et de pH de la chitinase partiellement purifiée sont respectivement de 50°C et pH 4. L'enzyme reste stable sur une gamme de pH allant de 3 à 6. Pour un temps d'incubation de 1 h, l'enzyme reste stable pour une température inférieure à 50°C. Au-delà, elle perd près de 62% de son activité à 60°C et la totalité à 80°C. L'activité de la chitinase est stimulée par  $\text{CuSO}_4$  et fortement inhibée par  $\text{AgNO}_3$ . L'irradiation à la dose de 210 kGy à un débit de dose de 47 Gy/min a permis une réduction jusqu'à 90% du poids moléculaire de la chitine, atteignant ainsi un PM de 11 kDa. La dépolymérisation partielle de la chitine, grâce au prétraitement par irradiation  $\gamma$ , a donc permis une amélioration de l'activité chitinasique. Ainsi, le couplage d'une action physique (irradiation) à l'action enzymatique nous a permis d'augmenter le taux de production des oligomères et monomères obtenus à partir de la chitine.

**Mots clés :** chitinase, extraction, purification, caractérisation, chitine, irradiation  $\gamma$

## ABSTRACT

The goal of this work is the extraction, purification and characterization of chitinase for its use for hydrolysis of chitin previously irradiated by  $\gamma$  rays from Co-60. The production of crude chitinase from marine biomass, and its use in operating conditions previously determined to hydrolyze chitinous material have been reached. The enzyme extract was purified by precipitation with ammonium sulfate (20% -90%), followed by fractionation by molecular exclusion chromatography and finally by ultra filtration. These purification techniques have achieved a specific activity of about 567 U/mg, with a purification factor of 8.34. The molecular weight of chitinase was estimated at 21 kDa. The optimum temperature and pH of the partially purified chitinase were respectively 50 °C and pH 4. The enzyme remains stable over a pH range from 3 to 6. For an incubation time of 1 h, the enzyme remains stable for a temperature below 50 °C. Beyond this, it loses nearly 62% of its activity at 60 °C, and the totality at 80°C. The activity of chitinase is stimulated by  $\text{CuSO}_4$  and strongly inhibited by  $\text{AgNO}_3$ . The irradiation with a dose of 210 kGy at a dose rate of 47 Gy/min resulted in a reduction to 90% of the molecular weight of chitin, reaching thus a MW of 11 kDa. The partial depolymerization of chitin, thanks to  $\gamma$  irradiation pretreatment, has led to an improvement of the chitinase activity. Thus, the coupling of a physical action (radiation) to the enzymatic action allowed us to increase the production rate of monomers and oligomers derived from chitin.

**Keywords :** chitinase, extraction, purification, characterization, chitine, irradiation  $\gamma$

## الخلاصة

تهدف هذه الدراسة إلى استخراج وتنقية وتوصيف الكيتيناز لاستخدامها في حلقة الكيتين المشع مسبقاً بلشعة  $\gamma$  للكوبالت-60. توصلنا إلى إنتاج الكيتيناز الخام من مادة حيوية بحرية، واستخدمناه في ظروف تشغيل محددة لحلقة المادة الكيتينية. تمت تنقية المستخلص الإنزيمي بالتترسيب بكبريتات الأمونيوم (20% -90%)، تليها التجزئة بواسطة كروماتوغرافيا الإقصاء الجزئي وأخيراً الترشيح الدقيق. وقد حققت هذه التقنيات للتنقية بالحصول على نشاط نوعي يقدر بحوالي 567 U/mg، بمعامل تنقية يبلغ 8.34. قدر الوزن الجزئي للكيتيناز بـ 21 kDa. الشروط العملية المثلى للحرارة وحموضة الكيتيناز المنقى جزئياً هي على التوالي 50 °C و PH=4. يبقى الإنزيم مستقرًا على نطاق PH يمتد من 3 حتى 6. بالنسبة لفترة حضانة لمدة ساعة، يبقى الإنزيم مستقرًا إلى درجة حرارة أقل من 50 °C. بعدها، يفقد الإنزيم ما يقارب 62% من نشاطه في 60 °C و كلياً في درجة 80 °C. تنشيط كبريتات النحاس فعالية الكيتيناز في حين تنقصها وبقوة نترات الفضة. سمح التشعيع بجرعة 210 kGy بمعدل 47 Gy/min، بتخفيض الوزن الجزئي للكيتيناز إلى 90% ليصبح هذا الوزن 11 kDa. سمحت إزالة البلمرة الجزئية للكيتين مع المعالجة المسبقة بشعاع  $\gamma$  بتحسين النشاط الكيتيري. نستنتج إذاً أن اقتران فعل فيزيائي (الشعاع) مع فعل أنزيمي يؤدي إلى زيادة معدل إنتاج الجزيئات الأحادية الأصل والمونومرات الم مشتقة من الكيتين.

**كلمات البحث :** كيتيناز، استخراج، تنقية، توصيف، الكيتين، تشعيع  $\gamma$ .

	<i>Page</i>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	3
2. 1. Effets des rayonnements de grande énergie sur les polymères .....	3
2.1.1. Rayonnements ionisants .....	3
2.1.2. Traitement des polymères par rayonnement Gamma .....	3
2. 2. La chitine et ses produits de dégradation .....	4
2. 2. 1. Historique .....	5
2. 2. 2. Structure de la chitine .....	5
2. 2. 3. Propriétés et application de la chitine .....	7
2. 2. 4. Dépolymérisation de la chitine .....	7
2. 2. 5. Produits de dégradation de la chitine .....	7
2. 2. 5. 1. Glucosamine et <i>N</i> -acetylglucosamine .....	8
2. 2. 5. 2. Chitooligosaccharides .....	8
2. 3. Méthodes de production des chitooligosaccharides (COS) .....	8
2. 3. 1. Les méthodes chimiques .....	8
2. 3. 2. Les méthodes physiques .....	9
2. 3. 3. Les méthodes enzymatiques .....	10
2. 4. Application des produits de dégradation de la chitine .....	11
2. 4. 1. Application des monomères de la chitine .....	12
2. 4. 2. Activités biologiques des chitooligosaccharides .....	12
2. 5. Exploitation biotechnologique de la biomasse marine .....	14
2. 5. 1. Organisation générale du système digestif du poisson .....	14
2. 5. 2. Systématique de la Rascasse .....	15
2. 5. 2. 1. Famille Scorpaenidae .....	15
2. 5. 2. 2. <i>Scorpaena scrofa</i> .....	16
2. 5. 2. 3. Position systématique de <i>Scorpaena scrofa</i> .....	16
2. 6. Les enzymes .....	17
2. 6. 1. Classement et dénomination des enzymes .....	18
2. 6. 2. Paramètres affectant l'activité enzymatique .....	18
2. 6. 3. Cinétique enzymatiques .....	20
2. 6. 4.. Les glycosides hydrolase .....	23

2. 7. Les chitinases .....	24
2.7.1. Introduction .....	24
2. 7. 2. Historique .....	24
2. 7. 3. Classification et mode d'action des chitinases .....	24
2. 7. 4. Production actuelle et demande de chitinases .....	26
2. 7.5. Sources des chitinases .....	26
2. 7. 5. Rôles des chitinases .....	28
2. 7. 6. Application des chitinases .....	28
<b>3. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>30</b>
3.1. Irradiation Gamma de la chitine à différentes dose .....	31
3.2. Caractérisation de la chitine pour différentes doses d'irradiation .....	31
3.2.1. Détermination des différents poids moléculaires.....	31
3.2.2. Détermination du degré de déacétylation par analyse au FTIR.....	33
3.3. Détermination du taux de dégradation radiochimique de la chitine .....	33
3.4. Matière biologique.....	34
3.5. Extraction des chitinases .....	34
3.6. Essais de l'activité chitinasique .....	34
3.7. Dosage des acétylhexosamines .....	36
3.8. Dosage des protéines .....	37
3.9. Effet de l'irradiation du substrat sur l'activité enzymatique .....	37
3.10. Essai de purification de l'extrait enzymatique .....	38
3.10.1. Précipitation au sulfate d'ammonium .....	38
3.10.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire .....	39
3.10.3. Ultrafiltration .....	40
3.11. Etablissement du tableau de purification .....	41
3.12. Caractérisation de l'extrait enzymatique .....	41
3.12.1. Détermination du poids moléculaire de la chitinase .....	42
3.12.2. Optimisation de la température de l'activité enzymatique .....	42
3.12.3. Optimisation du PH de l'activité enzymatique .....	42
3.12.4. Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique .....	42
• <i>Thermo-stabilité de la chitinase en fonction du temps</i> .....	42
• <i>Stabilité de la chitinase vis à vis du PH</i> .....	43
• <i>Stabilité de la chitinase au cours de la conservation</i> .....	43
3.12.5. Influence de certains effecteurs sur l'activité chitinasique .....	43

3.12.6. Influence de la nature du substrat sur l'activité enzymatique.....	43
3.12.7. Etude de la cinétique enzymatique en fonction de la concentration du substrat	43
3.12.8. Mesures des paramètres cinétiques.....	44
<b>4. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
4.1. Caractérisation de la chitine.....	45
4.1.1 Détermination des différents poids moléculaires de la chitine .....	45
4.1.2 Détermination du degré de déacétylation de la chitine.....	47
4.2. Dégradation de la chitine par irradiation Gamma.....	48
4.3. Détermination du taux de dégradation radiochimique.....	49
4.4. Effet de l'irradiation du substrat sur l'activité enzymatique de l'extrait brut.....	51
4.5. Essai de purification de l'extrait enzymatique brut.....	52
4.5.1. Précipitation au sulfate d'ammonium .....	52
4.5.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	54
4.5.3. Ultrafiltration.....	56
4.6. Etude des caractéristiques de la chitinase.....	59
4.6.1. Détermination du poids moléculaire de la chitinase.....	60
4.6.2. Détermination de la température optimale d'activité enzymatique.....	61
4.6.3. Détermination du PH optimum de la chitinase.....	63
4.6.4. Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique.....	64
• <i>Etude de la thermo-stabilité de la chitinase en fonction du temps</i> .....	65
• <i>Stabilité de la chitinase vis à vis du PH</i> .....	67
• <i>Stabilité de la chitinase au cours de la conservation</i> .....	68
4.6.4. Etude de certains effecteurs .....	69
4.6.5. Influence de la nature du substrat sur l'activité enzymatique.....	71
4.6.6. Activité enzymatique à différentes concentrations du substrat.....	73
4.6.7. Influence de la concentration du substrat sur la vitesse initiale.....	74
4.6.8. Détermination des constantes cinétiques.....	75
<b>5. CONCLUSION</b> .....	78
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	80
<b>ANNEXES</b> .....	98

## 1. INTRODUCTION

Les biomasses marines et leur diversité constituent un ensemble de ressources exploitables et valorisables, utiles pour l'homme. Les secteurs de l'alimentation comme ceux de la santé sont concernés. Un vaste champ d'applications biotechnologiques est en cours d'ouverture.

Les océans produisent une biomasse bien supérieure à celle provenant des terres émergées, mais seule une partie minime, issue des activités de pêche, est directement exploitable.

Cela représente, tout de même, près de 85 millions de tonnes de produits divers (poissons, mollusques, crustacés, etc) prélevés par an (FAO, 2007).

Environ 10% des captures globales des produits aquatiques sont des organismes riches en matière chitineuse (10 à 55 % en poids sec). Plus de 80.000 tonnes/an de chitine sont obtenues à partir des rejets marins (Patil *et al.*, 2000).

La chitine est, après la cellulose, le biopolymère le plus répandu dans la nature. C'est un composant majeur de la paroi cellulaire de nombreux champignons et de l'exosquelette des arthropodes (Songsiriritthigul *et al.*, 2010).

La possibilité de dégrader la chitine par voie enzymatique est connue depuis longtemps chez les micro-organismes, avant d'avoir été retrouvée chez de nombreux vertébrés (Brisou, 1971). Les poissons carnassiers, dont la nourriture est riche en proies chitineuses, possèdent un système digestif présentant une forte activité chitinasique ; aussi, l'extraction de la chitinase à partir de ces poissons se révèle d'un grand intérêt.

L'hydrolyse de la chitine peut se faire par plusieurs méthodes: action enzymatique, hydrolyse chimique ou irradiation, chacune d'elle présentant des avantages et des inconvénients. Pour optimiser, on combine la méthode enzymatique à l'irradiation (Dzung *et al.*, 2007).

En Algérie, malgré la faiblesse de l'industrie halieutique, il serait souhaitable d'investir dans le domaine de la valorisation des ressources marines, afin de permettre d'une part de contribuer à la dépollution du littoral et d'autre part de produire des substances actives telles que l'enzyme qui fait l'objet de cette étude.

C'est dans ce cadre que vient s'inscrire le thème de ce travail qui consiste à extraire une chitinase à partir des abats de poissons carnassiers (Rascasse) et à tester sa capacité à dégrader la matière chitineuse issue des carapaces de crustacés.

Ainsi, la valorisation de ces déchets devrait favoriser la création de structures pour le traitement de ces « déchets halieutiques », permettant la sauvegarde de l'environnement sans compter les retombées économiques issues de l'utilisation des chitines dans divers secteurs.

Bien que la chitine possède tous les atouts pour servir de base à une filière de diversification industrielle, ses applications sont limitées à cause de son insolubilité dans l'eau.

En revanche, la dégradation enzymatique de sa chaîne polymérique, combinée à l'action de l'irradiation Gamma, permet d'obtenir des oligomères et des monomères très solubles.

Le potentiel de développement des processus enzymatiques pour la production de chitooligosaccharides et de N-Acetyl-Glucosamine a donc attiré l'attention. Durant plusieurs années, il y a eu augmentation de la demande en chitine ainsi que de ses dérivés. Les chitooligomères produits par l'hydrolyse enzymatique de la chitine ainsi que les monomères sont utilisés pour des applications industrielles, cliniques et pharmaceutiques diverses. En effet, en plus de leur activité antibactérienne et antifongique, ces sous-produits de l'hydrolyse peuvent aussi être utilisés dans différents domaines tels que la médecine, la cosmétologie, l'industrie agroalimentaire, l'agriculture, la microbiologie.

Cependant, actuellement, les progrès dans la production industrielle d'enzymes chitinolytiques reste limité. Le coût de la chitinase représentant une part importante du coût total de la bioconversion de la chitine (vu le prix élevé des chitinases disponibles dans le commerce), il y a nécessité de développer des procédés avec réduction des coûts de production.

Le succès dans l'emploi des chitinases pour différents buts dépendra en grande partie de la disponibilité de préparations actives à un coût raisonnable (Binod *et al.*, 2006).

Les objectifs visés dans ce travail sont l'extraction, la purification et la caractérisation de la chitinase, en vue de son utilisation pour l'hydrolyse de la chitine préalablement irradiée par le rayonnement Gamma.

Cette étude est divisée en trois grandes parties:

La première partie est consacrée à l'irradiation de la chitine qui constitue le substrat d'hydrolyse. Notre travail a porté sur la caractérisation de cette dernière à différentes doses, ainsi que l'étude de l'effet de ce prétraitement sur l'activité enzymatique.

Dans la deuxième partie, nous décrivons le protocole d'extraction de l'enzyme chitino-lytique à partir d'abats de rascasses, ainsi que les différentes méthodes utilisées pour la purification de la chitinase, à savoir la précipitation au sulfate d'ammonium, la chromatographie d'exclusion moléculaire et l'ultrafiltration.

Dans la troisième et dernière partie, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des paramètres physico-chimiques de l'activité enzymatique et à la caractérisation de la chitinase.

## 2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 2.1. Effets des rayonnements ionisants de haute énergie sur les polymères

En vue des applications industrielles, un important effort de connaissance dans le domaine de la chimie sous rayonnement a été réalisé au cours des dernières décennies, notamment en ce qui concerne les polymères. Les rayonnements de haute énergie ont donc été utilisés pour la réduction du poids moléculaire de différents polymères, incluant les polysaccharides naturels (Kume & Takehisa, 1983 ; Ulanski & Rosiak, 1992).

#### 2.1.1. Rayonnement ionisants

Les rayonnements ionisants (électrons accélérés et rayons  $\gamma$  émis par une source de  $^{60}\text{Co}$  ou de  $^{137}\text{Cs}$ ) ont été développés industriellement dès les années 1960 pour la stérilisation de matériel médico-chirurgical et la conservation de produits agroalimentaires. Ils ont parallèlement donné lieu au développement de la chimie sous rayonnement, de type radicalaire, appliquée principalement aux polymères (Rouif, 2008).

Le rayonnement le plus couramment utilisé en chimie sous rayonnement, en radiobiologie ou dans la thérapeutique du cancer est le rayonnement gamma ( $R.\gamma$ ) émis par le radiocobalt  $^{60}\text{Co}$ . C'est un radioélément dont la période T est de 5.3 ans. Lors de sa désintégration bêta, il va émettre deux rayons  $\gamma$  qui ont des énergies respectives de 1.17 MeV et de 1.33 MeV (Ferradini & Pucheault, 1983).

#### 2.1.2. Traitement des polymères par rayonnement gamma

Lorsque le rayonnement pénètre la matière, il interagit avec elle et lui transfère de l'énergie. La dose absorbée caractérise ce transfert d'énergie. L'unité de dose absorbée par la matière est le gray (Gy) et il équivaut à une énergie de 1 Joule absorbée par la masse de 1 kilogramme de matière.

En déclenchant un processus chimique de formation de radicaux libres, les rayonnements ionisants peuvent ensuite amorcer un certain nombre de réactions chimiques telles que des coupures de chaînes, des polyadditions, des polymérisations, etc. Celles-ci peuvent être utilisées pour diverses applications, dont les principales sont la dégradation et la réticulation des plastiques, ainsi que le greffage sur des polymères (Rouif, 2008).

Les rayonnements modifient donc profondément la structure des polymères ainsi que leurs propriétés. Cette interaction entraîne des effets sur les chaînes moléculaires et aboutit :

- soit à une réticulation : le pontage (par liaison covalente) entre les chaînes initialement indépendantes forme un réseau tridimensionnel, correspondant à une amélioration de certaines propriétés mécaniques.

- soit à une dégradation du matériau : elle est due à des coupures, distribuées au hasard, des chaînes macromoléculaires. Elle conduit à une diminution des masses moléculaires et donc à une dégradation des propriétés mécaniques.

Lorsqu'un polymère est soumis à l'action des rayonnements, il y a compétition entre 2 types de réactions qui coexistent avec des vitesses différentes. Selon leur comportement, il est possible de classer les polymères en 2 groupes, suivant que la réticulation ou la dégradation prédomine. En général, les polymères à chaînes carbonées dont chaque carbone de la chaîne principale porte au moins un atome d'hydrogène seront réticulés par les rayonnements. Inversement, les polymères dont les unités constitutives contiennent un atome de carbone tétra-substitué, seront dégradés par le rayonnement (Combette & Ernoult, 2005).

Par sa nature, le traitement par  $R.\gamma$  s'opère dans le respect de l'environnement. Contrairement aux techniques qui utilisent des produits chimiques, aucun résidu n'est laissé dans la matière exposée et dans son environnement, puisque par définition on ne dépose pas de matière sur ou au sein du produit traité (Ferradini & Pucheault, 1983).

### 2.2. La chitine et ses produits de dégradation

La chitine est après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature (Theruvathil, 2007). Elle présente une structure cristalline et constitue un réseau de fibres organisées. Elle confère rigidité et résistance aux corps organiques qui en contiennent. Elle est présente dans les parois cellulaires de champignons, d'insectes et dans les exo-squelettes de crustacés (Hirano, 1996; Ravi Kumar, 2000 ; Merzendorfer & Bairoch, 2003 ; Rinaudo, 2006).

Industriellement, la chitine est le plus souvent extraite des carapaces de crabes ou de crevettes, qui en contiennent un taux important (20-30%) et qui peut même atteindre 40% chez certains insectes (Johnson et Peniston, 1982 ; Kramer et *al.*, 1995). Sa production annuelle par biosynthèse a été estimée à  $10^{10}$ - $10^{12}$  tonnes (Min et *al.*, 2004).

### 2.2.1. Historique

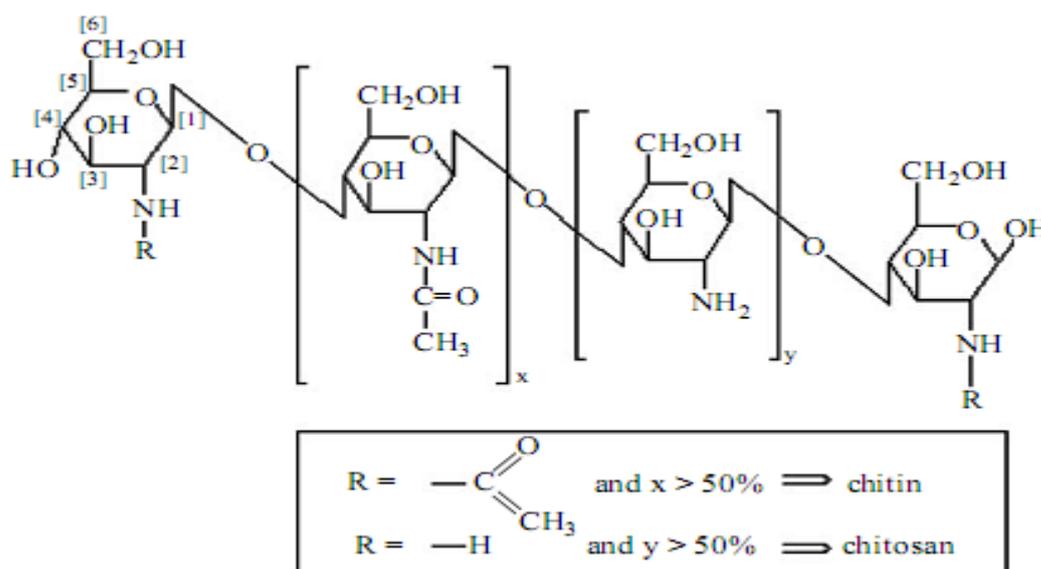
En 1811, le Professeur Braconnot, Directeur du Jardin Botanique de Nancy (France) isole une substance fibreuse, à partir de certains types de champignons, qu'il dénomma « fongine ». Il mène des expériences qui lui permettent de constater que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses d'acides. Un peu plus tard, en 1823, Odier isole la même substance chez certains insectes coléoptères. Il la renomme « chitine », du grec "kheiton" qui signifie enveloppe ou tunique (Beaulieu, 2007).

Ce n'est qu'à partir des années 1960 que ces polymères ont suscité un réel intérêt. En effet, la production industrielle et l'utilisation de ces biopolymères sont en constante augmentation puisqu'on les trouve abondamment dans la nature et que ce sont des ressources renouvelables. (Ravi Kumar, 2000 ; Khor, 2003).

### 2.2.2. Structure de la chitine

La chitine est un co-polymère de structure linéaire et presque entièrement constitué d'unités de répétition de deux sucres aminés : le D-Glucosamine et le N-Acétyl D-Glucosamine, liés par des liaisons  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Khor, 2003) (voir figure.2.1)

A l'état naturel, la chitine est étroitement liée à des protéines, des lipides, des pigments et des minéraux comme le carbonate de calcium. Il en découle que la préparation de la chitine nécessite la déminéralisation et la déprotéinisation des déchets chitineux par l'utilisation d'acides forts et de bases fortes (Percot et *al.*, 2003 ; Sajomsang & Gonil, 2010).



**Fig. 2.1** Représentation schématique de la chitine et du chitosane (d'après Khor, 2001)

Les termes chitine et chitosane sont fréquemment utilisés dans la littérature, mais aucun des deux termes ne représente une structure chimique unique. On définit ainsi chaque copolymère par un degré d'acétylation (DA) qui représente le pourcentage d'unités acétylées dans la chaîne du polymère. La transition chitine - chitosane se produit à un degré d'acétylation de 50% environ (Rinaudo et *al.*, 1999 ; Khor, 2003).

La chitine est polymorphique, présentant trois formes cristallines différentes :  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ . (Hackman & Goldberg, 1965) (Voir tableau 2.1).

Les trois formes se distinguent par le degré d'hydratation, la taille et le nombre de chaînes de chitine (Merzendorfer, 2006). Dans la chitine  $\alpha$ , les chaînes polysaccharidiques sont disposées de façon antiparallèle, ce qui donne naissance à de nombreux ponts hydrogènes et entraîne une rigidité importante ainsi qu'une faible sensibilité aux agents de déacétylation. La chitine  $\alpha$  n'est pas soluble dans les solvants aqueux et elle constitue la forme la plus abondante de polysaccharide, largement distribuée dans les carapaces de crabes et crevettes ainsi que dans les parois cellulaires des champignons (Noishiki et *al.*, 2005). La chitine  $\beta$  est une forme moins abondante, présente chez un nombre limité d'espèces d'animaux et certaines diatomées (Noishiki et *al.*, 2005), dont les chaînes polysaccharidiques sont toutes parallèles entre elles; les ponts hydrogènes  $\gamma$  sont moins nombreux, ce qui confère à la chitine  $\beta$  une plus grande réactivité et hydrophilie. Enfin la troisième forme, la chitine  $\gamma$ , implique deux chaînes parallèles qui alternent avec une chaîne antiparallèle (Tableau 2.1.), est une forme plus rare comparée aux chitines  $\alpha$  et  $\beta$ . La chitine  $\gamma$  est essentiellement retrouvée dans les cocons des insectes (Falini et *al.*, 2003) et la paroi intestinale des calamars (Tan & Lee, 2002).

**Tableau 2.1.** Arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine (Einbu, 2007)

Forme	Arrangement des chaînes	Schématisation
Chitine- $\alpha$	Antiparallèle	$\uparrow\downarrow\uparrow\downarrow$
Chitine- $\beta$	Parallèle	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$
Chitine- $\gamma$	Deux parallèles pour une anti-parallèle	$\uparrow\uparrow\downarrow\uparrow\uparrow$

### 2.2.3. Propriétés et applications de la chitine

La chitine est un biopolymère de poids moléculaire élevé, de couleur blanche, dur et non élastique (Hirano, 1996 ; Muzzarelli *et al.*, 1994).

Les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la chitine et de ses dérivés (le chitosane principalement) leur confèrent un potentiel énorme dans une vaste gamme d'applications (Kurita, 1998 ; Dahiya *et al.*, 2006 ; Theruvathil *et al.*, 2007). La chitine est un produit naturel biodégradable, non toxique, biocompatible, bioactif, possédant une bonne résistance mécanique (Hirano, 1990 ; Sriupayo *et al.*, 2005 ; Hu *et al.*, 2007).

Toutes ces qualités en font évidemment un matériau attrayant pour la commercialisation. Son utilisation dans l'industrie (alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, pâtes et papiers, etc...), bien que répandue, est toutefois encore relativement limitée (Poirier, 2000).

La chitine présente une bonne capacité de mucoadhésion (Zhou et Donovan, 1996) et une innocuité de ses produits de dégradation ; elle est perméable à l'oxygène et stimule l'effet immunologique (Muzzarelli, 1994). Du fait de sa forte cristallinité, la chitine est pratiquement insoluble dans l'eau, ainsi que dans la plupart des solvants organiques, ce qui limite son utilisation et sa valorisation (Sugimoto *et al.*, 1998; Ravi Kumar, 2000). Elle est principalement caractérisée par son degré d'acétylation (DA), son poids moléculaire et sa solubilité (Ravi Kumar, 2000).

### 2.2.4. Dépolymérisation de la chitine

Du côté de la littérature, on trouve quelques méthodes de fragmentation ayant été appliquées à la chitine : l'hydrolyse enzymatique, l'hydrolyse acide, l'hydrolyse par oxydation, l'hydrolyse par radicaux libres, l'hydrolyse par dépressurisation, l'irradiation aux microondes ou aux ultrasons et l'hydrolyse par radiations électromagnétiques. (Poirier, 2000 ; Einbu, 2007, Xing *et al.*, 2005).

Récemment, des chitosanes de faible poids moléculaire (LMWC) ont été préparés par hydrolyse acide assistée de sel sous irradiation micro-ondes (Xing *et al.*, 2005).

### 2.2.5. Produits de dégradation de la chitine

Pour certaines applications spécifiques, plus que la chitine et le chitosane, ce sont les produits de leurs dégradations, tels que les chitooligosaccharides et les monomères qui ont été trouvés beaucoup plus utiles (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007).

### 2.2.5.1. Glucosamine et N-Acetyl-Glucosamine

La glucosamine ou GlcN (2-amino-2-deoxy-D-glucose) et le N-Acetyl-Glucosamine (NAG) ou GlcNAc (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) sont des sucres aminés (osamines).

Ces monomères sont les principaux constituants de la chitine et du chitosane et on les retrouve dans une variété de cellules et de molécules naturelles. Ils composent le ciment cellulaire qui retient les cellules entre elles pour former les tissus et les organes et sont donc présents dans différents tissus du corps humain (tendons, ligaments, cartilage, peau, ...).

Le NAG est produit commercialement par acétylation chimique de la glucosamine en utilisant l'anhydride acétique (He et *al.*, 2001) et par hydrolyse enzymatique de la chitine (Haynes et *al.*, 1999).

### 2.2.5.2. Chitoolisaccharides

Les chitoooligosaccharides sont des homo ou hétéro-oligomères de N-Acetyl-Glucosamine et/ou glucosamine. Ils proviennent de la dégradation du polymère initial suite à son hydrolyse.

Bien qu'il n'existe pas de définition exacte de ce terme, il est d'usage de les considérer comme étant des molécules ayant un degré de polymérisation qui varie entre 2 (dimère de D-glucosamine) jusqu'à 12 unités du monomère de D-glucosamine ou de NAG.

## 2.3. Méthodes de production des chitoooligosaccharides

Il existe plusieurs méthodes de production des chitoooligosaccharides, parmi lesquelles les plus importantes et les plus étudiées sont l'hydrolyse chimique, l'hydrolyse par voie physique et l'hydrolyse enzymatique (Hai et *al.*, 2003 ; Mengibar et *al.*, 2010).

### 2.3.1. Méthodes chimiques

Les méthodes de dégradation acide ne sont pas spécifiques ; l'hydrolyse va aléatoirement générer une grande quantité de monomères mais la récupération plus tard de l'acide pose problème et souvent s'avère onéreux. Le clivage de la liaison osidique, en présence d'acide minéral ou organique et à chaud, dépend essentiellement de la stabilité du lien covalent dans les conditions opératoires imposées.

Le traitement chimique utilisant des acides forts (acide nitrique et acide chlorhydrique) est une méthode très pratique et rapide pour produire des séries d'oligomères, mais présente

certains désavantages tels qu'un coût élevé, un rendement faible et une acidité résiduelle (Harish Prashanth et Tharanathan, 2007).

Plus communément, différentes dépolymérisations acides ont été effectuées à l'aide d'acide chlorhydrique (Einbu et *al.*, 2007 ; Donzelli et *al.*, 2003 ; Zhu et *al.*, 2005), d'acide nitreux (Tommeraaas et *al.*, 2001), d'acide lactique (Il'ina et Varlamov, 2004), ou encore d'acide phosphorique (Hasegawa, 1993 ; Wang et *al.*, 2008) ou encore d'acide acétique (Hsieh et *al.*, 2007). Ces méthodes engendrent généralement des modifications chimiques, ainsi que des changements au niveau de la structure cristalline de la chitine. Ainsi, les chitooligosaccharides préparés de cette manière pourraient être toxiques à cause des modifications chimiques résultant de la conversion. De plus, l'hydrolyse acide utilisée pour la production de ces chitooligosaccharides présente certains défauts, notamment le problème de corrosion acide, la difficulté du contrôle des conditions de réaction, la faible répétabilité et l'exigence de dessaler en raison de la haute concentration de sels formés durant la neutralisation (Wang et *al.*, 2006). En raison des limitations de toutes ces méthodes chimiques, l'hydrolyse chimique a eu peu d'applications industrielles (Bosso et *al.*, 1986).

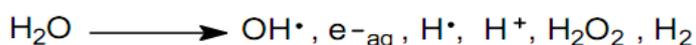
### 2.3.2. Méthodes physiques

Les radiations peuvent fournir un outil utile pour la dégradation de différents polymères et sont souvent considérées comme étant le dernier processus après l'emballage pour contrôler les micro-organismes pathogènes. Le radio-traitement offre un moyen « propre » pour la préparation de nouveaux produits à plus forte valeur ajoutée. Il est basé sur l'utilisation de polymères naturels renouvelables, non-toxiques et biodégradables. Pour ces réactions, aucun additif chimique n'est nécessaire et il n'y a pas de besoin de contrôler la température ou l'environnement (Charlesby, 1981 ; Feng et *al.*, 2008).

Les effets des radiations sur des carbohydrates tels que la chitine, le chitosane, l'alginate de sodium, la cellulose et la pectine ont été étudiés en vue d'améliorer leur bioactivité et réduire la pollution environnementale. Ces travaux ont montré une augmentation de leur utilisation pour le recyclage des ressources biologiques (Hien et *al.*, 2000 ; Chmielewski et *al.*, 2005 ; Haji-Saeid et *al.*, 2010). Pourtant, ces méthodes de dépolymérisation physique n'ont pour l'instant pas fait l'objet de beaucoup d'études comparé aux voies de dépolymérisation chimique, bien qu'elles soient relativement simples et efficaces. Elles paraissent pourtant facilement transposables à grande échelle (Min et *al.*, 2004 ; Migdal et *al.*, 2007). Il est à noter que l'irradiation gamma du polysaccharide peut se faire lorsqu'il est à l'état solide,

liquide ou sous forme de gel. Les doses nécessaires pour dépolymériser un polysaccharide sont beaucoup moins importantes lorsque celui-ci est sous forme liquide ou de gel, plutôt qu'à l'état solide (Mahlous et *al.*, 2007). Cette dépolymérisation plus efficace peut être expliquée par le fait que les radiations ionisantes auxquelles le polymère est soumis voient leur énergie pratiquement uniquement absorbées par l'eau.

Lors de la radiolyse de l'eau, des radicaux hydroxyles  $\text{HO}^\bullet$ , des radicaux  $\text{H}^\bullet$  et des électrons hydratés se forment (Huang et *al.*, 2007a) :



Toutes les entités issues de la radiolyse vont interagir avec de nombreux carbohydrates mais, la plupart du temps, ce sont les radicaux hydroxyles qui jouent le rôle plus important dans la dégradation du polymère (Huang et *al.*, 2007a).

La sensibilité d'un polymère aux  $\text{R}\cdot\gamma$  peut facilement être évaluée à partir du coefficient de dépolymérisation  $G_d$  déterminé par l'équation de Charlesby-Pinner :

$$M_n^{-1} - M_0^{-1} = G_d \times 1,04 \times 10^{-7} \times D$$

où  $M_n$  est le poids moléculaire à la dose absorbée  $D$

$M_0$  le poids moléculaire initial du polysaccharide.

Cette relation permet de contrôler la dépolymérisation en fonction de la dose délivrée.

Des expériences, faisant appel aux radiations seules ou combinées à des méthodes chimiques ont permis de mettre en évidence un effet synergique (Hai et *al.*, 2003 ; Zainol et *al.*, 2009 ; Gryczka et *al.*, 2009 ; El-Sawy et *al.*, 2010). Ainsi, il y a diminution du poids moléculaire moyen du chitosane (augmentation du taux d'oligomères) quand il est irradié en solution dans de l'acide acétique (Choi et *al.*, 2002) ou de l'acide phosphorique (Jia & Shen, 2002).

### 2.3.3. Méthodes enzymatiques

Considérant les limites des méthodes physico-chimiques, l'hydrolyse enzymatique des biopolymères aux fins de production d'oligomères et de monomères est une alternative. L'hydrolyse enzymatique est spécifique et offre plus de possibilités, comparée aux autres voies d'hydrolyse (Hai et *al.*, 2003 ; Kuroiwa et *al.*, 2002 ; Zhang et *al.*, 1999 ; Kim et *al.*, 1998 ; Varum et *al.*, 1996 ; Aiba, 1994 (a et b) ; Muzzarelli et *al.*, 1994).

Dans le cas d'une dégradation enzymatique de la chitine (resp. chitosane), des chitooligosaccharides de solubilité élevée dans l'eau ont été produits par chitinase (resp. chitosanase)

(Fines & Holt, 2010 ; Songsiriritthigul et *al.*, 2010 ; Zamil et *al.*, 2009 ; Uchida et *al.*, 1989).

La méthode enzymatique a pris de l'importance car elle autorise la dépolymérisation régio-sélective dans des conditions douces. Cette méthode spécifique permet d'obtenir des monomères et des fractions de faible masse moléculaire sans modification chimique. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être coûteuse, car si l'enzyme utilisée n'est pas assez spécifique (constituée d'un mélange de protéines), il faut utiliser de plus grandes quantités ou alors procéder à des étapes de purification qui sont également coûteuses.

D'autres enzymes, non spécifiques, peuvent aussi être utilisées pour l'hydrolyse enzymatique de la chitine ou du chitosane.

Parmi celles utilisées, on peut citer la glucanase, la cellulase, la lipase, l'amylase, la papaïne et la pectinase ainsi que certaines protéases qui conduisent à la dépolymérisation du polysaccharide (Pantaleone et *al.*, 1992 ; Vishu Kumar et *al.*, 2004(a et b) ; Li et *al.*, 2007, Muzzarelli, 1994 ; Muzzarelli, 1995 ; Ramirez-Coutino et *al.*, 2006 ; Grigolon et *al.*, 2001 ; Nordtveit et *al.*, 1996). Des enzymes humaines, et spécialement la lysozyme, ont été utilisées pour la dégradation de la chitine (Muzzarelli, 1997 ; Sashiwa et *al.*, 2003).

Pour pallier à l'inconvénient principal de cette méthode qui est le coût élevé des enzymes, plusieurs chercheurs ont essayé ces dernières années d'améliorer les méthodes enzymatiques pour une production efficace et économique des oligomères et monomères.

Des procédés de prétraitement du substrat par voie physique ou chimique ont été mis en œuvre pour augmenter l'action enzymatique. (Ait Si Mamar & Hadjadj, 1990 ; Dzung et *al.*, 2007 ; Donzelli et *al.*, 2003 ; Songsiriritthigul et *al.*, 2010).

### **2.4. Application des produits de dégradation de la chitine**

La production de ces produits présente un intérêt particulier pour les secteurs de l'alimentation, de l'agriculture et de la biotechnologie. Même si la chitine est reconnue comme une source potentielle de biomatériaux actifs, ce biopolymère montre des limitations de par son manque de solubilité à pH neutre. En effet, le poids moléculaire très élevé de la chitine et par conséquent sa viscosité très importante l'a restreinte d'une utilisation dans diverses applications aux secteurs alimentaire et biomédical. L'intérêt de les produire est donc justifié par leurs nombreuses activités biologiques (Mao et *al.*, 2004 ; Chen & Chen, 2000 ; Samain et *al.*, 1997).

### 2.4.1. Applications des monomères de la chitine

Les NAG produits par la voie enzymatique ont un prix de revient relativement élevé comparé aux NAG produits par la voie chimique et qui sont approuvés comme additifs alimentaires au Japon (Einbu, 2007) et aux Etats Unis (Hungerford & Jones, 2003).

La GlcN et le GlcNAc sont utilisés comme agents thérapeutiques pour traiter l'ostéoarthrite (D'Ambrosio et *al.*, 1981) ainsi que les maladies inflammatoires de l'intestin telles que la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn (Klairkhed et *al.*, 2004).

La glucosamine représente une alternative pleine de promesses pour la pharmacopée de l'ostéoarthrite et constitue une des applications majeures des produits dérivés de la chitine (Sandford, 2002), tout comme son utilisation comme supplément diététique est de plus en plus importante (Hungerford & Jones, 2003).

Le N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), un des constituants de base du cartilage chez les mammifères, est aussi connu pour aider à la réparation du cartilage détérioré et soulager la douleur due à l'inflammation chez les patients ostéoarthritiques (Sashiwa et *al.*, 2001 ; Sethakaset et *al.*, 2008). C'est un élément important de la réparation cellulaire lors d'atteintes inflammatoires ou dégénératives, en agissant telle une colle cellulaire utilisée pour réparer ou remplacer la muqueuse tissulaire.

### 2.4.2. Activité biologique des chitoooligosaccharides

Suite à la diminution de leur degré de polymérisation par hydrolyse, les COS peuvent être utilisables dans de nombreux domaines tel que la biotechnologie, la biopharmaceutique, la bioalimentation, ainsi que dans l'industrie émergente des nutraceutiques.

Le potentiel bioactif des COS dépend de leur DP, de leur DA, de leur distribution de charge, mais aussi de leur cible (microbe, cellule, organisme). À la différence de la chitine et du chitosane, les COS sont absorbés au niveau intestinal puis rapidement retrouvés dans la circulation sanguine et peuvent avoir des effets biologiques systémiques sur les micro-organismes ou sur l'organisme (Jeon & Kim, 2002; Jeon et *al.*, 2000).

Les COS présentent un intérêt industriel croissant ; d'abord dans la préservation des aliments comme agent de conservation, mais aussi comme prébiotiques et antioxydants.

Selon leur DP et leur DA, les COS montrent différents niveaux d'activité antimicrobienne. Ainsi, des COS de 2 et 5 kDa montrent une forte activité antimicrobienne (Ueno et *al.*, 1997).

Le mécanisme le plus souvent admis est que les COS peuvent changer les caractéristiques de perméabilité de la membrane microbienne, empêcher l'entrée des nutriments dans la cellule bactérienne ou causer la fuite des constituants cellulaires et ainsi provoquer la mort des bactéries (Choi et *al.*, 2001).

Un autre mécanisme suggéré pour l'activité antibactérienne des oligomères de chitosane serait le blocage de la transcription de l'ARN suite à l'adsorption des COS sur l'ADN bactérien (Kim et *al.*, 2003). Pour avoir cet effet, le poids moléculaire des COS est un paramètre qui joue un rôle important pour permettre la pénétration de ces molécules dans les cellules bactériennes. En plus d'inhiber la croissance bactérienne, les COS montrent aussi de fortes activités fongicides (Klaikherd et *al.*, 2004).

Des études ont rapporté que les COS ont permis la suppression de plusieurs infections virales dans divers systèmes. Même si les mécanismes sont encore mal connus, ils pourraient être dus à l'activation du système immunitaire et de défense des plantes et des animaux.

En effet, le traitement en surface des plantes avec des COS permet de diminuer les nécroses provoquées par diverses infections virales telles que le virus de la mosaïque du tabac (Wang et *al.*, 2008 ; Bacon et *al.*, 2000 ; Pospieszny et *al.*, 1991).

Des études suggèrent que les COS inhibent la croissance des cellules tumorales (Liang et *al.*, 2007). Cette activité anti-tumorale serait due à un renforcement immunitaire qui se traduit par une plus grande production de lymphokines, menant à la manifestation de l'effet anti-tumoral par la prolifération des lymphocytes cytolytiques (Tokoro et *al.*, 1988). Quin et *al.* (2002) ont montré que l'administration par voie orale et intrapéritonéale de COS d'un DP de 4 et 5 inhibe la croissance des cellules tumorales chez la souris.

L'inhibition de la croissance de différentes tumeurs en présence des COS semble prometteuse (Krairak & Duenpen, 2007 ; Tokoro et *al.*, 1988).

On confère aux COS diverses propriétés physiologiques. Ainsi, on a mis en évidence l'activité anti-angiotensine 1-convertase (ACE) des COS, cette enzyme jouant un rôle important dans la régulation de la tension artérielle (Park et *al.*, 2003 ; Hong et *al.*, 1998).

L'activité anti-oxydante ainsi que des propriétés hypocholestérolémiantes des COS ont fait l'objet de nombreuses études (Kim & Rajapakse, 2005; Xie et *al.*, 2001).

Les COS montrent aussi une activité anticoagulante lors de tests in-vitro sur du plasma humain (Park et *al.*, 2004). Leur utilisation est un moyen d'améliorer les biofertilisants qui

peuvent comprendre des microorganismes et des éliciteurs (molécules issues d'agents phytopathogènes) induisant chez une plante la production de phytoalexines (Jung *et al.*, 2007).

## 2.5. Exploitation biotechnologique de la biomasse marine

Le grand domaine de valorisation des sous-produits de la pêche est celui de l'obtention des produits de la dégradation enzymatique des molécules biologiques : les hydrolysats.

La biodiversité marine offre donc un extraordinaire potentiel biotechnologique.

En effet, parmi les organismes marins, certaines formes végétales (algues vertes, rouges ou brunes) ou animales ou encore les microorganismes (bactéries, champignons) retiennent plus particulièrement toute l'attention des pharmaco-chimistes. Ainsi, certains animaux ont, au cours de l'évolution, développé des systèmes de défense basés sur la production de substances chimiques qui s'ajoutent aux molécules servant à la lutte contre, notamment, les infections par les pathogènes. Ces métabolites secondaires présentent un réel intérêt au plan de la pharmacologie mais aussi dans d'autres domaines : pesticides, substances anti-salissures, et sont étudiés pour la recherche de nouvelles structures chimiques à activité biologique. Aujourd'hui, ils constituent un domaine privilégié de recherche et un champ immense d'investigation pour les chimistes des substances naturelles. Ainsi, plus de 6000 nouveaux métabolites marins ont été identifiés à ce jour et beaucoup présentent *in vitro* des activités biologiques: ils sont anti-inflammatoires, antiviraux, antitumoraux, immunomodulateurs, antibiotiques, antifongiques, inhibiteurs enzymatiques (Le Gal, 2004).

Les poissons forment le plus important et le plus diversifié des groupes de vertébrés. On exploite donc de plus en plus fréquemment les propriétés fonctionnelles des enzymes présentes dans les viscères de poissons.

### 2.5.1. Organisation générale du système digestif du poisson

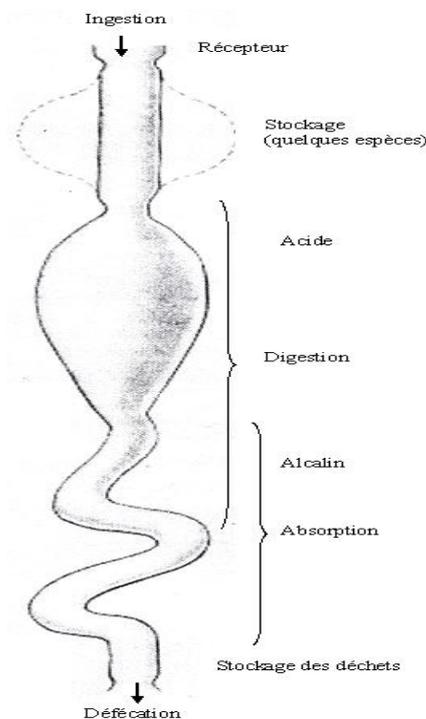
Le tube digestif du poisson comprend les éléments suivant : la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, les caeca pyloriques et l'intestin. Il ya aussi deux glandes digestives, le foie et le pancréas, qui jouent également un rôle dans la digestion.

La longueur du tube digestif dépend du régime alimentaire (Smith; 1980) :

- 2 à 2.5 fois la longueur du poisson pour les carnivores ;
- 0.6 à 8 fois la longueur du poisson pour les omnivores ;
- 0.8 à 15 fois la longueur du poisson pour les herbivores.

Chez les poissons, il n'y a pas de mastication ; la bouche et les dents, quand elles sont présentes, ne servent qu'à la préhension de la nourriture, qui est avalée, traverse l'œsophage, et se retrouve intacte dans l'estomac (Fänge & Grove, 1979). Le broyage des aliments se fait

essentiellement dans l'estomac et, chez de nombreuses espèces, dans des diverticules en forme de doigt, appelés caeca pyloriques. Ces caeca sécrètent des enzymes digestives et commencent l'absorption des nutriments. Des organes comme le foie et le pancréas apportent de nouvelles enzymes digestives au fur et à mesure que la nourriture progresse dans le tube digestif. Les intestins complètent le processus de digestion et d'absorption des nutriments. La figure 2.2 montre le diagramme du tractus digestif général. Dans le mécanisme chitinolytique proposé, la chitinase contribuerait indirectement au rôle de la digestion dans l'estomac en détruisant l'exosquelette de la proie. Les dimères de chitine passeraient après dans l'intestin où la chitobiase les transformerait en monomères absorbables de NAG.



**Fig. 2.2 :** Diagramme du tube digestif du poisson (Gutowska, 2002)

## 2.5.2. Systématique de la Rascasse

### 2.5.2.1. Famille Scorpaenidae

Les Scorpaenidés (Scorpaenidae) forment une famille de poissons comprenant les Poissons scorpions ou Rascasses.

Actuellement les Scorpaenidés de l'Atlantique et de la Méditerranée sont divisés en six genres: *Sebastes*, *Helicolenus*, *Pontinus*, *Setarches-Scorpaenodes* et *Scorpaena*, dont les cinq premiers ne renferment qu'un petit nombre d'espèces. Par contre le genre *Scorpaena*, à lui seul, en regroupe une vingtaine environ.

Les rascasses font partie de l'Ordre des *Scorpeniformes* et sont caractérisées en général par la structure cuirassée de la tête et des autres régions du corps, une bouche large munie de petites dents allongées, un corps comprimé, alourdi par des épines, des verrues et des lambeaux cutanés. Elles sont sédentaires et vivent sur les fonds rocheux, sablonneux ou boueux. Les rascasses se nourrissent de poissons, de crustacés et de mollusques. Elles ont une grande capacité à «se fondre dans le décor», appelée mimétisme, et muent régulièrement (Cadenat, 1943).

#### **2.5.2.2. Scorpaena scrofa**

La rascasse rouge (*Scorpaena scrofa*) est un poisson de taille relativement petite, 15 à 25 cm avec un maximum de 50 cm de long. Elle est de couleur rouge-orangé, avec des marbrures claires et foncées qui lui procurent un excellent camouflage. Son corps est trapu et sa tête massive est couverte de nombreux lambeaux de peau. Ses yeux sont gros et surmontés d'un tentacule court tandis que sa bouche est très large. Le chapon possède une nageoire dorsale échancrée allant de la tête à la queue. Elle a une tache noire et sa partie antérieure est dotée de rayons épineux durs contenant un venin virulent pouvant infliger des piqûres très douloureuses. La partie postérieure quant à elle est dotée de rayons épineux mous.

La période de reproduction de *Scorpaena scrofa* a lieu à la fin du printemps et en début d'été. La rascasse rouge vit généralement posée sur les roches, immobile à l'affût des poissons et des crustacés dont elle se nourrit (Djabali et *al.*, 1993). On la rencontre entre 10 m et 300 m de profondeur en Manche et en Atlantique depuis les Iles Britanniques jusqu'au Sénégal ainsi qu'en Méditerranée. Sa position systématique (Djabali et *al.*, 1993) est donnée ci-dessous.

#### **2.5.2.3. Position systématique de Scorpaena scrofa**

Règne : Animalia

Embranchement : Vertébrés

Sous-embranchement : Gnathostomes

Super-classe : Poissons

Classe : Osteichthyens

Sous-classe : Actinoptérygiens

Super-ordre : Téléostéens

Ordre : Scorpaeniformes

Sous-ordre : Scorpaenoides

Famille : Scorpaenidae

Genre : Scorpaena

Espèce : *Scorpaena scrofa*

Nom FAO : Petite Rascasse

Noms communs en Algérie : Rascasse ; Rascassa

## 2.6. Les enzymes

Les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques très diverses. Ces réactions s'effectuent dans des conditions où, normalement, elles ne pourraient se faire. Si elles ont bien lieu, c'est parce qu'elles sont catalysées par des macromolécules biologiques : les enzymes. Celles-ci sont produites par les cellules quelle que soit leur origine (animales, végétales ou microbiennes).

Les enzymes induisent une augmentation très importante des réactions biochimiques ; de plus, elles sont caractérisées par une très haute spécificité de reconnaissance des molécules sur lesquelles elles agissent (Durand et Monsan, 1982).

D'un point de vue structural, toutes les enzymes sont des protéines spécialisées, de structure tridimensionnelle et dont les masses moléculaires varient entre  $10^3$  et  $10^6$  Da.

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé site actif et qui a la forme d'une cavité ou d'un sillon. Les molécules sur lesquelles agit une enzyme sont définies comme les *substrats* de la réaction enzymatique. Chaque enzyme peut reconnaître spécifiquement une ou plusieurs molécules de substrat, selon un principe de complémentarité de type clé-serrure, grâce à des sites de reconnaissance et de fixation situés à sa surface (Pelmont, 1993 ; Augère, 2001).

Dans tous les cas, la fixation du substrat sur l'enzyme a pour conséquence la formation d'un complexe enzyme-substrat, ou complexe E/S, indispensable à la réaction enzymatique. Cette dernière fait intervenir les acides aminés d'un site catalytique. L'enzyme peut alors accélérer considérablement une des réactions biochimiques intervenant sur ce substrat. À la fin de la réaction, l'enzyme est intacte et peut intervenir sur une autre molécule de substrat. Pendant la réaction, le substrat a pu être transformé en produit de la réaction.

### 2.6.1. Classement et dénomination des enzymes

La classification établie par la Commission des Enzymes (ENC, 1992) de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (sigle anglais "*IUBMB*") a été basée sur des critères de spécificité. Les enzymes sont généralement nommées en additionnant le suffixe -ase au nom de leur substrat. La nomenclature des enzymes s'écrit de manière générale sous la forme : E.C. X.X.X.X (où : E.C. = "*Enzyme Commission*").

Les enzymes sont classées en six principaux groupes, en fonction du type de réaction qu'elles catalysent (Voet, 2005) (voir tableau 2.2).

**Tableau 2.2 : Classification des enzymes selon la réaction catalysée**

1 <sup>er</sup> X (*)	Réaction catalysée
X = 1 : oxydoréductases (E. C.1.X.X.X)	oxydoréduction
X = 2 : transférases (E. C. 2.X.X.X)	transfert de groupes
X = 3 : hydrolases (E. C. 3.X.X.X)	hydrolyse
X = 4 : lyases (E. C. 4.X.X.X)	addition de groupe à des atomes engagés dans des doubles liaisons
X = 5 : isomérases (E. C. 5.X.X.X)	isomérisation (de position de groupe ou de fonction)
X = 6 : ligases (E. C. 6.X.X.X)	condensation de deux molécules

(\*) Le premier "X" correspond aux 6 types de réactions catalysées par les enzymes.

### 2.6.2. Paramètres affectant l'activité enzymatique

De nombreux facteurs peuvent modifier la vitesse de réaction enzymatique :

- Les concentrations en enzyme et en substrat
- Les concentrations en ions métalliques
- Les caractéristiques physico-chimiques du milieu de réaction (température, pH, ...)
- La présence d'inhibiteurs de la réaction enzymatique

➤ *Effet de la température*

Une augmentation de la température:

- augmente la vitesse de la réaction chimique
- augmente la vitesse de dénaturation de l'enzyme, diminuant ainsi son activité catalytique

La somme de ces deux effets donne une courbe caractéristique de l'activité enzymatique en fonction de la température qui passe par un maximum, montrant ainsi l'existence d'une température optimale (voir figure 2.3).

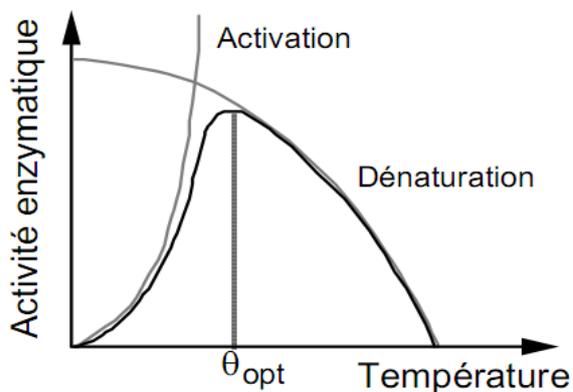


Fig. 2.3 : Effet de la température sur l'activité enzymatique (Holme et Peck, 1998)

➤ *Effet du pH*

Les enzymes sont très sensibles aux variations du pH et fonctionnent bien sur une gamme limitée du pH. Les mesures de nombreuses activités enzymatiques en fonction du pH donnent des courbes qui passent par un maximum, montrant ainsi l'existence d'un pH optimum (fig2.4)

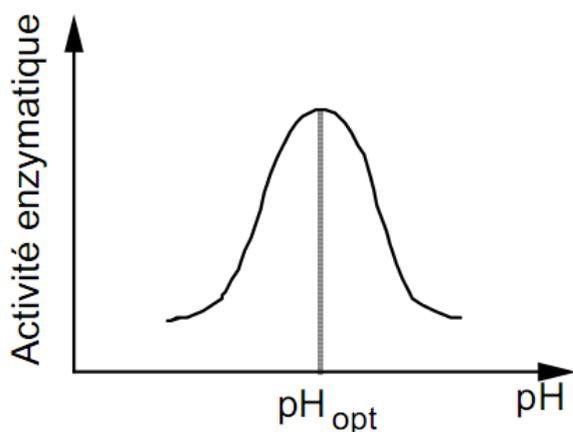


Fig. 2.4 : Effet du pH sur l'activité enzymatique (Holme et Peck, 1998)

Le pH peut agir sur plusieurs facteurs :

- l'ionisation des résidus de l'enzyme et du substrat et/ou du produit
- la structure tertiaire des protéines et donc la stabilité de l'enzyme
- la liaison du substrat à l'enzyme
- l'activité catalytique de l'enzyme

D'autres facteurs chimiques (minéraux ou organiques) peuvent modifier la vitesse de réaction. Ils seront donc activateurs ou inhibiteurs.

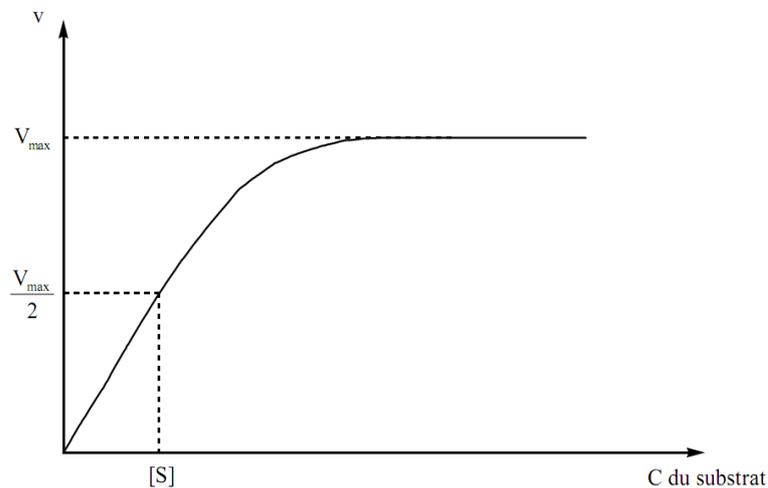
### 2.6.3. Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique étudie la vitesse de la réaction enzymatique. Cette dernière est mesurée à partir de la quantité de produit formé ou de réactif disparu par unité de temps.

Pour agir, l'enzyme doit se fixer au substrat pour former un complexe enzyme-substrat. Ensuite le substrat est transformé en produit qui est libéré et l'enzyme retrouve sa structure fondamentale (Kamoun, 1997).

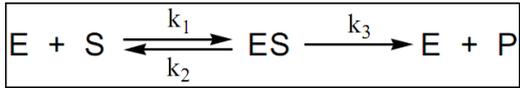
#### ❖ *Modèle cinétique de Michaelis-Menten*

Le tracé de la courbe représenté sur la fig 2.5 reflète le Modèle cinétique de *Michaelis-Menten*



**Fig. 2.5 :** Vitesse initiale d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat

Lorsque la concentration en substrat est petite, la vitesse est proportionnelle à la concentration en substrat, jusqu'à une certaine valeur pour laquelle la vitesse ne varie plus en fonction de la concentration en substrat:  $V_{max}$ .



$k_1$ ,  $k_2$ , et  $k_3$  sont des constantes de vitesse par chaque étape.

L'équation de Michaelis-Menten fut établie pour un système réactionnel pris dans les conditions initiales d'après l'équation-bilan ci-dessous:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{avec} \quad K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$v_{max}$  est la vitesse de la réaction enzymatique à saturation en substrat ;

$K_m$  est la constante de Michaelis qui quantifie l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Chaque couple ( $v_{max}$ ,  $K_m$ ) est caractéristique d'un système enzyme-substrat. A faible concentration en substrat  $[S]$ , la concentration en substrat est inférieure à  $K_m$ .

$$\text{Si } [S] < K_m \quad v = \frac{v_{max} [S]}{K_m}$$

$$\text{Si } K_m = [S] \quad v = \frac{v_{max}}{2}$$

L'affinité de l'enzyme pour son substrat est donnée par son  $K_m$  ou constante de Michaelis dans le cas d'une enzyme simple, à un seul site de fixation (enzyme dite michaelienne). Celle-ci est définie comme la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est la moitié de la vitesse de réaction maximale (Scriban, 1993).

- *Représentation de Lineweaver et Burk*

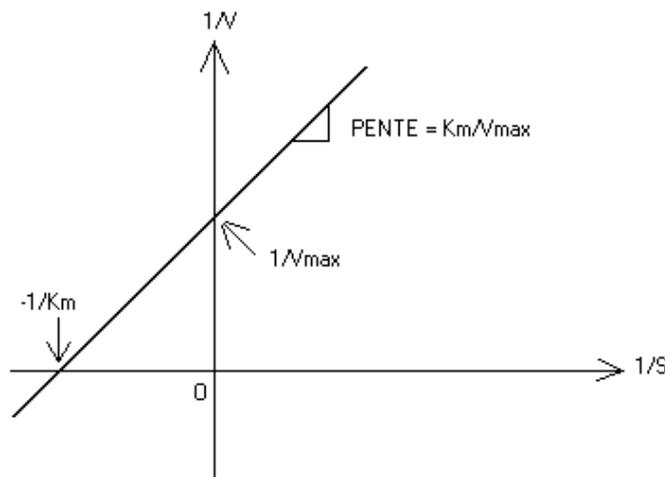
A partir de la représentation de Michaelis-Menten, montrant la variation de la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale en substrat, on détermine la vitesse  $v_{max}$  et la constante de Michaelis qui est la concentration en substrat permettant d'obtenir la moitié de la vitesse maximale, mais cela demande un nombre élevé de mesures.

Il est préférable de faire appel à la représentation de Lineweaver et Burk (1934). Cette représentation de l'activité enzymatique est utilisée pour sa simplicité afin de déterminer graphiquement les paramètres cinétiques d'une réaction enzymatique dans un système enzyme-substrat.

L'équation de Michaelis-Menten est mise sous forme inverse et on peut écrire :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]}$$

L'avantage de cette transformation mathématique est qu'elle permet de tracer un graphique montrant la variation de l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat ( $1/v$  en fonction de  $1/[S]$ ) dont la courbe est en fait une droite ( $y = ax + b$ ) pour les enzymes obéissant à la relation Michaélienne entre la vitesse de réaction et la concentration du substrat. La droite représentée dans la figure 2.6 coupe l'axe des ordonnées en  $1/v_{max}$  et l'axe des abscisses en  $-1/K_m$  (Scriban, 1993).



**Fig. 2.6 :** Représentation graphique d'une cinétique michaélienne selon Lineweaver et Burk

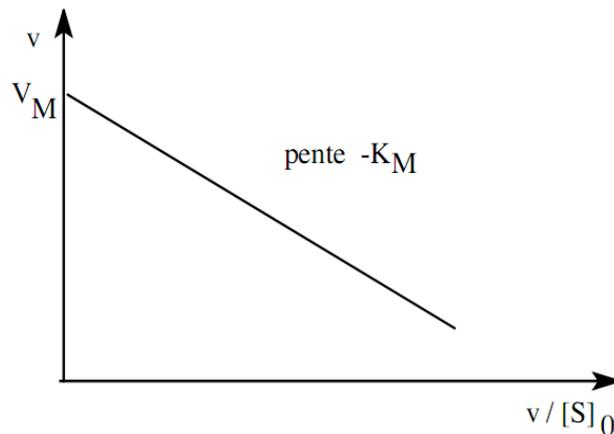
- **Représentation Eadie-Hofstee**

La représentation d'Eadie-Hofstee est une autre représentation graphique de l'équation de Michaelis-Menten qui permet la détermination expérimentale de  $K_m$  et  $v_{max}$  avec plus de précision que la méthode Lineweaver et Burk (Kamoun, 1997). Suite aux travaux publiés par Eadie en 1942 et Hofstee en 1959 (Augère, 2001), la fonction mathématique liant la vitesse de réaction à la concentration en substrat peut être linéarisée pour l'étude de la cinétique en vue d'en déterminer les paramètres. Elle permet d'exprimer la vitesse de réaction sous la forme :

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + v_{max}$$

où  $v$  représente la vitesse de réaction et  $K_m$  est la constante de Michaelis

$v_{max}$  est la vitesse maximale de la réaction et  $[S]$  est la concentration du substrat.



**Fig. 2.7:** Représentation graphique d'une cinétique michaelienne selon *Eadie-Hofstee*

La représentation illustrée sur la figure 2.7 est une droite de pente  $-K_m$  et qui coupe l'axe des vitesses au point  $v_{max}$ .

#### 2.6.4. Les glycosides hydrolases

Les activités d'hydrolyse des liaisons glycosidiques sont regroupées sous le numéro 3.2.1.X dans la nomenclature de l'Enzyme Committee (ENC, 1992), X représentant la spécificité du substrat. Historiquement, les glycosides hydrolases (GH) représentent la classe d'enzymes la plus importante au sein de la base de données [Carbohydrate-Active Enzymes]. Cette base de données est accessible par internet (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) et regroupe les enzymes dégradant par hydrolyse les glycoconjugués, les oligo- et polysaccharides.

Ces enzymes sont retrouvées chez divers microorganismes (virus, bactéries, archéobactéries et eucaryotes) et elles sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques.

Les glycosides hydrolases représentent une classe de protéines très importante pour l'industrie. De nombreuses applications sont rendues possibles grâce à elles, notamment dans le secteur de l'industrie alimentaire (Davies & Henrissat, 1995).

La classification de l'IUBMB permet de nommer précisément la spécificité de substrat d'une enzyme et présente en outre l'avantage de pouvoir classer rapidement une enzyme. Cependant, ce système ne tient pas compte des similarités de séquence protéique et donc de la structure tridimensionnelle. De plus, cette classification n'est pas systématique quant au mécanisme d'action des enzymes. Elle paraît mal adaptée aux glycosides hydrolases qui peuvent agir sur différents substrats et ne reflète pas les aspects structuraux des enzymes.

Pour répondre à ces limites, Henrissat a proposé en complément une nouvelle classification des enzymes agissant sur les glucides, basée sur les homologies de séquences des domaines catalytiques et des structures qui en découlent (Davies & Henrissat, 1995).

Il y a plus de 97 familles GH différentes répertoriées et beaucoup de ces familles, présentent des similarités dans le repliement tridimensionnel des enzymes qu'elles contiennent (Coutinho & Henrissat, 1999).

## **2.7. Les chitinases**

### **2.7.1. Introduction**

Les chitinases sont un groupe d'enzymes hydrolytiques qui catalysent la dépolymérisation de la chitine. La dégradation de la chitine en chaînes d'oligo-NAG peut être amorcée par des chitinases (endochitinases). Les oligomères, le tri-NAG et le di-NAG sont par la suite dégradés en monomères NAG métabolisables grâce à la chitobiase. Le monosaccharide obtenu peut être métabolisé par plusieurs organismes (Jeuniaux, 1966).

La production d'enzymes chitinolytiques peu coûteuses est un élément important pour l'utilisation de déchets chitineux qui résout non seulement des problèmes environnementaux, mais réduit aussi les coûts de production. Durant les deux dernières décennies, il y a eu un intérêt particulier pour la production de NAG par hydrolyse enzymatique de la chitine.

### **2.7.2. Historique**

La chitinase a été d'abord observée par Bernard en 1911, quand il a isolé une fraction chitinolytique thermostable et diffusible à partir de pulpe d'orchidée. Ce travail a été soutenu par Karrer et Hoffman pour la présence de chitinase chez l'escargot (Flach et *al.*, 1992). Ces dernières années, plusieurs recherches ont été menées pour l'amélioration de la production des chitinases à partir de microorganismes. La technologie de l'ADN recombinant a beaucoup contribué à optimiser la production des chitinases d'origine microbienne et des applications commerciales sont apparues sur le marché vers le milieu des années 90 (Binod et *al.*, 2006).

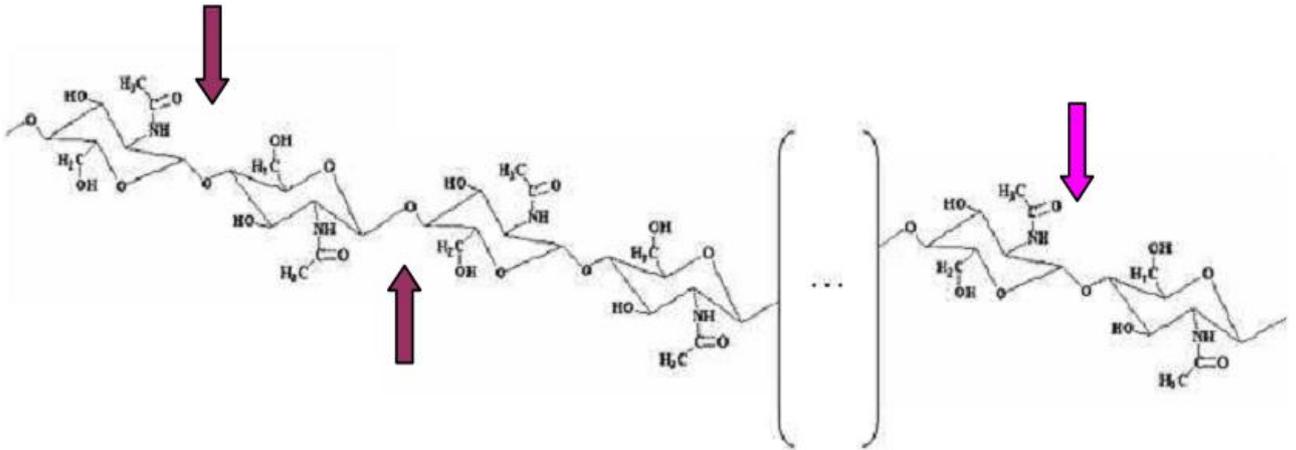
### **2.7.3. Classification et mode d'action des chitinases**

Les chitinases sont classées comme des glycosylhydrolases et ont été isolées de plusieurs organismes différents (Brameld et Goddard, 1998 ; Kasprzewska, 2003).

Bien que le système d'enzyme chitinolytique soit presque identique au complexe d'enzyme cellulolytique, leur classification n'est pas bien définie. Selon les recommandations de

(IUBMB, 1992), les enzymes chitinolytiques peuvent être classés sur la base de leur mode d'action (Patil *et al.*, 2000).

Les chitinases peuvent être divisées en 2 catégories, à savoir les endochitinases et les exochitinases (Figure 2.8).



**Fig.2.8 :** Représentation des sites d'action des endochitinases et des exochitinases

### **Endochitinases (EC 3.2.1.14)**

Les endochitinases clivent de manière aléatoire la chaîne de chitine en hydrolysant les ponts β (1,4)-glycosidiques formant ainsi des molécules de taille variable (Saguez, 2002; Takeshi, 2003).

### **Exochitinases**

Les exochitinases agissent progressivement sur l'extrémité non-réduite de la chaîne de chitine formant ainsi des monomères ou des dimères (Sampson et Gooday, 1998).

Les exochitinases peuvent être divisées en deux catégories :

**Chitobiosidases (EC 3.2.1.29) :** Elles catalysent l'hydrolyse des extrémités de la chitine. Elles libèrent des diacétylchitibioses non réduits (Neetu Dahiya *et al.*, 2006).

**β N-acétyl-glucosaminidases (EC 3.2.1.30) :** Elles catalysent l'hydrolyse des oligomères libérés par les endochitinases et les chitobiosidases en monomères N-Acétyl-Glucosamine (Dahiya *et al.*, 2006). Ainsi, l'hydrolyse complète de la chitine est réalisée par un système enzymatique consistant en trois sortes de chitinases.

En se basant sur les séquences d'acides aminés de glycosyl hydrolases, Henrissat a regroupé les chitinases en cinq classes réparties dans trois familles d'hydrolases (Henrissat, 1991 ; Henrissat et Bairoch, 1993).

- Famille 18 : Les chitinases des virus, bactéries, champignons, invertébrés et vertébrés.
- Famille 19 : Elle comprend essentiellement les chitinases végétales.
- Famille 20 : les chitinases humaines et de quelques animaux.

#### **2.7.4. Production actuelle et demande de chitinases**

Durant plusieurs années, il y a eu une augmentation stable de la demande en chitine et de ses dérivés pour des applications industrielles, cliniques et pharmaceutiques diverses. Le potentiel de développement des processus enzymatiques pour la production de chitoooligosaccharides a attiré l'attention des biotechnologistes. Les chitoooligomères produits par hydrolyse enzymatique de la chitine peuvent être utilisés dans les services médicaux humains. Les enzymes chitinolytiques gagnent de l'importance pour leurs applications biotechnologiques. L'utilisation excessive de pesticides chimiques causant des problèmes environnementaux sérieux, la demande d'agents de contrôle biologique plus sûrs, comme la chitinase, augmente.

Cependant, actuellement, les progrès dans la production industrielle d'enzymes chitinolytiques reste limité. Depuis, le coût de chitinase représentant une part importante du coût total de la bioconversion de la chitine (en raison du prix élevé des chitinases disponibles dans le commerce), il y a la nécessité de développer des processus biologiques avec réduction des coûts de production.

Le succès dans l'emploi des chitinases pour différents buts dépendra en grande partie de la disponibilité de préparations actives à un coût raisonnable (Binod et *al.*, 2006).

#### **2.7.5. Sources des chitinases**

En raison des applications potentielles des chitinases, il est très important d'étudier les organismes qui peuvent produire l'enzyme. Les organismes chitinolytiques sont ces organismes capables de dégrader la chitine seulement par l'hydrolyse des liens glycosidiques. Les chitinases ont été détectées chez les bactéries, les moisissures et les plantes ainsi que dans les systèmes digestifs des nématodes, des mollusques et des arthropodes. Chez les vertébrés, les chitinases sont sécrétées aussi bien par le pancréas et la muqueuse digestive de quelques poissons, d'insectivores, amphibiens et des reptiles que par la muqueuse gastrique de quelques oiseaux et mammifères insectivores (Binod et *al.*, 2006).

Enfin citons le cas des chitinases synthétisées chez les humains et les bovins par les monocytes lors de leur différenciation en macrophages présente dans le sérum. Elle pourrait également jouer un rôle de défense contre certains pathogènes constitués de chitine (Masako et al., 2001 ; Fusetti et al., 2002 ; Boot et al., 2005).

➤ **Les chitinases végétales**

Bien que ne possédant pas de chitine, les plantes produisent des chitinases qui peuvent être constitutives ou induites (Kasprzewska, 2003).

Les chitinases végétales qui sont produites constitutivement, sont réparties différemment dans la plante, selon l'espèce, le stade de développement ou le type d'organe considéré. Ainsi, de nombreux auteurs rapportent que les chitinases végétales sont synthétisées au cours de différentes phases du développement de la plante (Chlan et al., 2001 ; Dinesh et al., 2010).

D'autre part, les chitinases végétales peuvent être induites, elles appartiennent à la famille des PR-(protéines reliées à la pathogénèse). Ce sont des protéines impliquées dans le mécanisme de défense vis à vis des pathogènes et dans des réaction d'hypersensibilité et de résistance systémique des plantes (Goni et al., 2010).

➤ **Les chitinases animales**

Des chitinases ont également été localisées dans le tractus alimentaire de nombreux animaux (Flach et al., 1992). Elles ont été décrites chez des poissons consommateurs de crustacés (Liu et al., 2009; Huang et al., 2010; Proespraiwong et al., 2010).

Ces chitinases, produites par certaines cellules de l'épithélium intestinal localisées dans le tractus digestif, auraient pour fonction de dégrader la chitine constituant la cuticule de leur proie. Ces enzymes, mises en évidence dans le tube digestif chez quelques mammifères insectivores, permettraient de dégrader la cuticule des insectes ingérés (Arakane et al., 2003 ; Marsh et al., 2001). Si la production de chitinases par les cellules épidermiques du tube digestif reste limitée, elle est toutefois compensée par la synthèse de chitinases bactériennes qui sont secrétées dans la lumière du tube digestif (Place, 1996; Itoi et al., 2007).

### **2.7.6. Rôles des chitinases**

Les chitinases jouent plusieurs rôles dans une multitude de systèmes biologiques différents. Les chitinases interviennent ainsi dans une grande variété de fonctions dans la nature incluant la morphogénèse, les défenses, la nutrition et la pathogénicité (Sampson & Gooday, 1998). Chez les plantes comme chez les animaux, les chitinases ont pour rôle principal la défense de l'organisme contre les attaques des pathogènes (Seidl, 2008).

La course aux armements entre les pathogènes et les plantes implique une interaction étroite et coévolutive entre l'hôte et le pathogène (Bishop *et al.*, 2000). En effet, chez les plantes, les chitinases jouent un rôle dans la résistance contre les pathogènes et des recherches ont montré qu'elles sont également impliquées dans un grand nombre d'événements physiologiques, lors du développement ou des processus de croissance. Les chitinases semblent être contrôlées par une variété de conditions de stress et par certaines phytohormones. Les chitinases de plantes, communément appelées protéines liées à la pathogenèse (PR-protéines), paraissent de plus impliquées dans d'autres mécanismes importants à la survie de la plante.

Le rôle des chitinases de la famille 18, a été étudié et se situe dans une large palette de fonctions. Chez les insectes et crustacés, les chitinases sont étroitement liées aux mues et au besoin de dégradation partielle de l'ancienne cuticule. Chez les vertébrés, où de nombreux venins ont pour composante de la chitinase, leur présence est associée au système digestif et elles ont un rôle de défense contre l'attaque pathogène des champignons. Chez les champignons, la chitinase a un rôle autolytique, nutritionnel et morphogénétique tandis que celle des virus est liée à la pathogenèse (Dahiya *et al.*, 2005).

### 2.7.7. Applications des chitinases

Les enzymes chitinolytiques ou chitinases peuvent avoir de larges applications dans plusieurs domaines, notamment dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques.

La production de chitinases à de faibles coûts jouera un rôle important dans le développement du recyclage des déchets riches en chitine, particulièrement dans l'industrie des fruits de mer. Cette pratique peut non seulement résoudre les problèmes environnementaux mais aussi apporter une valeur ajoutée dans certains cas (Wang *et al.*, 1995).

En ce qui concerne les préparations pharmaceutiques, les chitinases sont utilisées pour la production des chitoolosaccharides et des NAG, la préparation de protéines cellulaires simples, l'isolation des protoplastes à partir des champignons et des levures, le contrôle des

champignons pathogènes, et le traitement des déchets chitineux, et le contrôle de la transmission de la malaria (Dahiya *et al.*, 2006).

Dans le domaine de l'agriculture, plusieurs applications peuvent être envisagées. On peut ainsi appliquer des chitinases extracellulaires pour bloquer la division fongique comme constaté par Robertus *et al.* (1995). L'injection de chitinases substantielles dans les graines des céréales fournit à la plante une résistance à l'attaque des agents pathogènes (champignons et parasites) en dégradant leurs parois d'où augmentation de la perméabilité de ces parois

d'une part et inhibition de l'élongation des hyphes d'autre part (Hoster *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2010 ; Neeraja *et al.*, 2010, Ye & Ng, 2005).

Les chitinases appliquées sur les plantes, une fois ingérées par les insectes, vont hydrolyser la membrane intestinale de l'insecte formée de 12% de chitine. L'attaque enzymatique aurait comme conséquence de graves abrasions d'une partie de l'appareil digestif, conduisant à un effet létal (Di Maro *et al.*, 2010 ; Fiandra *et al.*, 2010).

Dans les applications dans le domaine de la santé, l'effet antibactérien des chitinases a été testé sur plusieurs espèces bactériennes et il s'est montré positif (Vellard, 2003). Ces chitinases ont été considérées et classées comme des antibiotiques à activité enzymatique (Renkema *et al.*, 1995). En plus de l'effet antibactérien, des activités hypocholestérolimiques et antihypertensives ont été notées (Bhattacharya *et al.*, 2007). Des applications potentielles pour le traitement de la malaria (Takeo *et al.*, 2009), l'asthme et les maladies inflammatoires (Donnelly et Barnes, 2004 ; Elias *et al.*, 2005) ou encore de l'athérosclérose (Boot *et al.*, 1999 ; Brunner *et al.*, 2008) ont été citées.

### 3. MATERIELS ET METHODES

#### • EQUIPEMENTS

- Agitateur magnétique (Fisher Bioblock Scientific)
- Agitateur Vortex (Heidolph Top-mix)
- Bain marie (Bioblock Scientific)
- Bain thermostaté (Mettler)
- Balance (Scaltec).
- Cellule d'ultrafiltration (Amicon 8400)
- Centrifugeuse (Bioblock Scientific).
- Dégazeur à ultrason (Baudelin sonorex super RK 102 H)
- Etuve (Mettler) ; Etuve sous vide (Heraeus)
- Incubateur (Mettler) ; Incubateur agitateur (Bioblock Scientific)
- pH-mètre (Tacussel)
- Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (NICOLETS 380)
- Spectrophotomètre UV-Visible (T60).
- Système chromatographique (Pharmacia LKB Uvicord SI) composé d'une colonne pour gel filtration, une pompe péristaltique, un collecteur de fractions et un détecteur.
- Viscosimètre (Schott Instruments) à tube capillaire de type UBBELOHDE

#### • PRODUITS CHIMIQUES

Chitine de crabe (Sigma) ; N-AcetylGlucosamine C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub> (Biochemika)

Marqueurs de poids moléculaire (Sigma): la Bovine Serum Albumin (66 kDa), l'Anhydrase Carbonique (31 kDa), la Trypsin Inhibiteur (21 kDa) et le Bleu de Dextran (2000 kDa).

Gel Sephadex G-100 (Sigma), Bleu de Coomassie G250 (Sigma)

Potassium tétraborate tétrahydraté  $K_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$  (Sigma-Aldrich) ;

P-Diméthylaminobenzaldéhyde  $C_9H_{11}NO$  (Prolabo); Sulfate d'ammonium  $(NH_4)_2SO_4$

Cuivre (II) sulfate anhydre  $CuSO_4$  (Sigma) ; Bromure de potassium KBr (Sigma)

Calcium chlorure dihydraté  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ; Potassium sulfate  $K_2SO_4$  (Prolabo) ; Magnésium sulfate heptahydraté  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Sigma) ; Zinc sulfate heptahydraté  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  Fluka

Argent nitrate  $AgNO_3$  (Sigma-Aldrich) ; Aluminium chlorure anhydre  $AlCl_3$  (Sigma)

(Fluka): Baryum chlorure dihydraté  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  ; Sodium carbonate anhydre  $Na_2CO_3$

Cadmium sulfate octahydraté  $CdSO_4 \cdot 8H_2O$ ; Méthanol  $CH_3OH$ ; Ethanol  $C_2H_5OH$

Acide éthylènediamine tétracétique (EDTA)  $C_{10}H_{16}N_2O_8$  ; Acétone  $CH_3COCH_3$

## **METHODES**

Dans le cadre de notre travail, une approche d'un procédé de valorisation des déchets halieutiques marins a été entreprise. Dans la première étape, nous avons extrait des chitinases à partir d'abats de Rascasses suivant un protocole expérimental, et nous avons caractérisé la chitine après son prétraitement à différentes doses de rayons  $\gamma$ .

Dans la seconde étape, nous avons procédé à une purification de cette enzyme par des diverses méthodes de séparation afin d'améliorer son activité spécifique et augmenter ainsi son potentiel, pour une éventuelle application biotechnologique.

Dans la troisième et dernière partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la chitinase.

### **3.1. Irradiation Gamma de la chitine**

Les échantillons de chitine à l'état solide ont été irradiés à température ambiante à l'aide d'une source de Cobalt 60 émettant des rayons  $\gamma$  à un débit de dose de 47 Gy/min.

Les doses d'irradiation délivrées ont été de 15, 30, 90, 150 et 210 kGy.

### **3.2. Caractérisation de la chitine pour différentes doses d'irradiation**

La caractérisation de la chitine a été réalisée en déterminant son degré d'acétylation (DA) à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et sa masse moléculaire à l'aide d'un viscosimètre.

### 3.2.1. Détermination des différents poids moléculaires

La détermination du poids moléculaire a été réalisée en faisant appel à la méthode viscosimétrique dont le principe repose sur la mesure du temps d'écoulement d'un volume connu du solvant à travers un capillaire, sous l'effet de la gravité. Le temps d'écoulement est proportionnel à la viscosité du liquide.

#### *Solubilisation de la chitine*

Afin de pouvoir utiliser la méthode viscosimétrique, il est nécessaire de solubiliser la chitine.

La solubilisation de la chitine a été réalisée selon le protocole suivant (Mahlous et *al.*, 2007):

Les échantillons de chitine en poudre (témoin et irradiés à différentes doses) ont été mis en suspension dans une solution de NaOH à 40% poids pour poids (m/m). Ces suspensions ont été placées sous agitation pendant 72 h à 4 °C.

Tout en agitant, de la glace finement pilée a été ajoutée à chaque solution dans un bain de glace pour maintenir une température basse. Il en résulte une solution visqueuse de chitine à 10% en NaOH (m/m).

Pour chaque solution mère obtenue après solubilisation, une série de dilutions a été réalisée. Les concentrations des solutions mères de chitine irradiée obtenues à différentes doses sont mentionnées dans des tableaux (voir annexe 1).

Les solutions et les solvants servant à effectuer les mesures ont été préalablement filtrés dans un entonnoir en verre fritté de porosité (50µm). Toutes les mesures ont été effectuées dans un temps maximum de 6 h après préparation des échantillons.

Dans le présent travail, nous avons utilisé un viscosimètre à tube capillaire de type UBBELOHDE de diamètre 0.58 mm. Chaque mesure a été répétée 3 à 4 fois, la température du bain thermostaté étant maintenue à  $(20.0 \pm 0.5)$  °C.

La viscosité relative est définie comme suit (Einbu et *al.*, 2004) :

$$\eta = \frac{t - t_0}{t_0}$$

Où :  $\eta$ : viscosité relative.

$t$  : temps d'écoulement de la solution à travers le tube capillaire.

$t_0$  : temps d'écoulement du solvant pur.

La viscosité relative nous permet de déterminer la viscosité réduite  $\eta_r$  qui est définie comme suit :

$$\eta_r = \frac{t - t_0}{t_0 [C]}$$

Où  $\eta_r$ : viscosité réduite.

[C] : la concentration de la solution

Nous avons tracé les graphes de la viscosité réduite en fonction de la concentration du polymère (mg/ml de chitine) pour les échantillons témoin et irradiés. Nous avons obtenu des droites et l'extrapolation de chacune d'entre elles sur l'axe des ordonnées permet de déterminer la viscosité réduite à la concentration zéro. Cette dernière est donc virtuelle et est appelée viscosité intrinsèque, notée  $[\eta]$ .

En calculant la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  des diverses solutions de polymère, nous avons pu déterminer le poids moléculaire de ces dernières en utilisant l'équation de Mark-Houwink-Sakurada qui est définie comme suit (Einbu et al., 2004):

$$[\eta] = k \cdot M^a$$

M : masse moléculaire moyenne en poids du polymère (Da).

a : facteur de forme

K : constante fonction des interactions solvant-polymère et de la température

K et a sont des constantes qui dépendent de la nature du polymère du solvant et de la température.

### 3.2.2. Détermination du degré de déacétylation par analyse au FTIR

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

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

Le degré de déacétylation de la chitine a été calculé à l'aide de l'équation citée dans les travaux de Tahtat et *al.* (2007) :

$$A_{1315} / A_{1420} = 1.5862 - 0.01045 \text{ DD (\%)}$$

Avec :  $A_{1315}$  : bande d'absorbance caractéristique des groupements HN-CO

$A_{1420}$  est choisie comme bande de référence  $\text{CH}_2$

DD: degré de déacétylation

### 3.3. Détermination du taux de dégradation radiochimique

Le rendement radiochimique  $G_d$  représente le nombre d'évènements radiolytiques (molécules altérées ou nouvellement formées) induits par l'absorption d'une radiation d'énergie 100 eV (Huang et *al.*, 2007a).

Le taux de dégradation radiochimique  $G_d$  a été évalué à partir de la droite représentant la différence des rapports de poids moléculaire en fonction de la dose suivant l'équation de Charlesby-Pinner (Charlesby, 1995).

$$M_n^{-1} - M_0^{-1} = G_d \times 1,04 \times 10^{-7} \times D$$

Où  $M_n$  et  $M_0$  sont les poids moléculaires moyens du polymère respectivement après et avant dégradation et D est la dose absorbée.

### 3.4. Matériel biologique

La matière première utilisée pour extraire la chitinase provient des abats des poissons scorpions ou Rascasses du genre *Scorpaena scrofa* qui constituent la source enzymatique.

Aussitôt après le vidage du poisson, les abats récupérés ont été maintenus au frais dans des conteneurs en plastique avant d'être transportés au laboratoire. Les abats ont été lavés avec de l'eau distillée, broyés, conditionnés dans des récipients en plastique et stockés à - 20 °C en vue d'une utilisation ultérieure.

### 3.5. Extraction des enzymes chitinolytiques

La méthode d'extraction des chitinases brutes est inspirée du protocole expérimental développé par Gutowska et *al.*, (2004).

Une quantité de 140 g d'abats décongelés, ont été macérés dans une solution tampon. Cette solution a été préparée à partir d'acide citrique 0.15 M et de phosphate dissodique 0.3 M à pH 5. Le mélange réactionnel a été incubé à 37 °C pendant 3 h, à 120 tr/min. A la fin de l'incubation, l'échantillon macéré a été filtré à travers un tissu de gaze. Le filtrat obtenu a été centrifugé à 12000 tr/min pendant 30 min. Le surnageant récupéré a constitué notre extrait brut enzymatique (Voir Figure 3.1.).

N.B. : Afin d'améliorer le rendement d'extraction de la chitinase, les échantillons ont été préparés en respectant une proportion 1/5 en poids d'abats par volume de solution tampon, selon la méthode utilisée par Laribi (2005) et d'autres auteurs (Santos et *al.*, 2004 ; Matsumiya et *al.*, 2006; Ikida et *al.*, 2009).

### 3.6. Essai de l'activité chitinasique

L'activité chitinasique a été déterminée en se basant sur la procédure standard (Jeuniaux, 1966) avec des paramètres modifiés aux conditions du laboratoire.

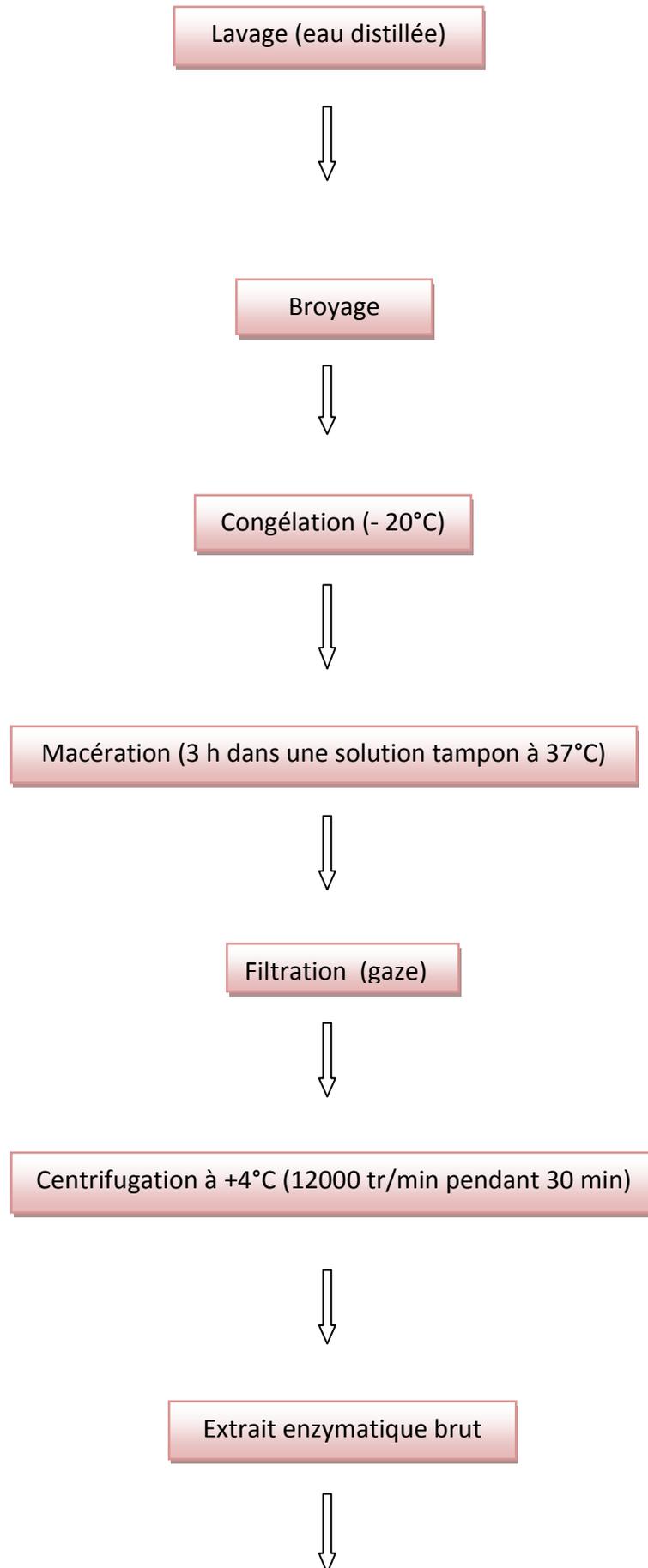
Le mélange réactionnel est composé de 1 ml de l'extrait enzymatique, 0.5 ml de la solution de chitine (5 mg/ml) et 0.5 ml d'eau distillée.

Les solutions enzymatiques, contenues dans des erlenmeyers et isolés de l'air par du parafilm ont été placées dans un incubateur-agitateur pendant 2 h à 37 °C, sous agitation à 120 tr/min. Le volume entier du mélange réactionnel a été centrifugé durant 30 min à 18000 tr/min.

Le dosage du N-Acétyl-Glucosamine libéré par hydrolyse enzymatique de la chitine dans le surnageant nous a permis la mesure directe de l'activité enzymatique.

Abats de rascasse (Estomac + Intestins)





Conservation (+ 4°C)

**Fig. 3.1.** Protocole d'isolement des extraits enzymatiques à partir des tissus gastro-intestinaux issus du poisson (Rascasse).

### 3.7. Dosage des acétylhexosamines

La production totale de N-Acétyl-Glucosamine a été déterminée par la méthode de dosage spécifique des sucres aminés (Reissig *et al.*, 1955).

- **Principe**

Les sucres aminés sont caractérisés par la réaction d'Elson et Morgan. A chaud et en milieu alcalin, ils se cyclisent sous forme furanique, puis par élimination d'une molécule d'eau, acquièrent une double liaison. Le produit formé se condense en milieu acide avec le para-diméthylaminobenzaldéhyde pour donner une coloration rouge violacée (Gunnar, 1948).

- **Mode opératoire**

Le dosage de l'hexosamine acétylée a été réalisé selon la méthode de Reissig *et al.*, (1955) modifiée par Gutowska *et al.*, (2004).

Cette technique de dosage fait appel à un réactif A constitué d'une solution de tétraborate de potassium (0.8 M) dont le pH est ajusté à 9.1 avec KOH (1N) et un réactif B à la P-Diméthylaminobenzaldéhyde constitué de 1.5 g de DMAB dissous dans 100 ml d'acide acétique glacial pur contenant 1.25 % d'une solution HCl (12 N). Les échantillons à doser contenant 0.5 ml de surnageant, ainsi qu'un témoin pour le blanc (0.5 ml d'eau distillée) sont répartis dans une série de tubes, auxquels on a ajouté 0.1 ml du réactif A. Le mélange est chauffé au bain-marie (100°C) pendant 3 min et refroidi ensuite dans un bain d'eau froide afin

de ralentir la vitesse de la réaction. On ajoute 3 ml du réactif B et après homogénéisation, les tubes sont immédiatement incubés dans un bain thermostaté à 37 °C pendant 20 min afin que l'intensité de la couleur soit maximale.

**Les absorbances ont été lues au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 585 nm aussi vite que possible, car l'intensité de la couleur baisse d'environ 0.5 % toutes les 5 min.**

La concentration en NAG a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement établie (Voir annexe 3). L'activité globale du système chitinolytique a été mesurée par la quantité d'Acetyl-Glucosamine libérée lorsque l'on fait incuber de la chitine en présence de solutions enzymatiques. Cette concentration en NAG rend compte de l'importance relative des processus de lyse de la chitine en sucres amines simples (Jeuniaux, 1963).

Une unité d'activité chitinolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1µg de NAG par heure (Sandeep Varma, 2009; Fines & Holt, 2010).

### **3.8. Dosage des protéines**

Le dosage des protéines totales des extraits enzymatiques a été réalisé en suivant la méthode de Bradford.

- **Principe**

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique très sensible qui permet de déterminer la concentration d'une solution protéique (Bradford, 1976). Elle repose sur la propriété du bleu de Coomassie G250 à se lier, en milieu acide, aux protéines et à former ainsi un complexe qui absorbe à 595 nm.

L'intensité de la coloration dosée par spectrophotométrie est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon (Johnstone & Thorpe, 1990).

- **Mode opératoire**

*Préparation de la solution protéique à doser*

Le test consiste à ajouter 5 ml de réactif de Bradford (Voir annexe 4) à 0.1 ml de l'extrait enzymatique. Le mélange est homogénéisé au vortex et laissé au repos à l'obscurité pendant 5 min à température ambiante. L'absorbance (DO) de chaque tube est lue à une longueur d'onde de 595 nm (Johnstone & Thorpe, 1990).

La corrélation de la mesure de l'absorbance du complexe de concentration inconnue avec la gamme d'étalonnage permet de doser les protéines de la solution enzymatique.

#### ***Etablissement de la courbe d'étalonnage***

La courbe a été élaborée en mesurant l'absorbance de plusieurs échantillons de concentration croissantes préparés à partir d'une solution mère à 1% en B.S.A qui est une protéine de référence (Voir annexe 4).

### **3.9. Effet de l'irradiation du substrat sur l'activité enzymatique**

Dans le but d'améliorer le taux d'hydrolyse enzymatique, la chitine a été irradiée en utilisant différentes doses de rayons  $\gamma$  allant de 15 kGy à 210 kGy.

L'activité chitinasique relative de l'extrait brut a été déterminée dans les conditions standards pour chaque dose d'irradiation.

### **3.10. Essai de purification de l'extrait enzymatique**

L'extrait chitinolytique a été purifié par les méthodes suivantes :

- Précipitation au sulfate d'ammonium
- Chromatographie d'exclusion moléculaire
- Ultrafiltration

Le but de la purification est d'isoler une protéine particulière du reste du mélange complexe initial (Hames et al., 2006).

#### **3.10.1. Précipitation au sulfate d'ammonium**

**Le fractionnement de l'extrait enzymatique a été réalisé par précipitation avec le sulfate d'ammonium, permettant d'obtenir une fraction enzymatique enrichie à partir d'un grand volume, tout en éliminant une partie des protéines non désirées (Kamoun, 1997).**

- **Principe**

La précipitation au sulfate d'ammonium ou «salting-out» repose sur les propriétés de surface des protéines. Les protéines n'étant pas uniformément chargées, elles possèdent en surface certaines zones hydrophobes qui régissent l'organisation d'une couche de molécules d'eau. Un sel, tel que le sulfate d'ammonium, piège les molécules d'eau qui sont présentes autour de la protéine et induit ainsi une diminution de sa solubilité. En fonction de leur hydrophobicité, les protéines ne précipitent donc pas à la même concentration en sel.

En dépit des solvants, on utilise préférentiellement le sulfate d'ammonium en raison de son faible coût, de son pouvoir précipitant élevé, de sa grande solubilité et de son faible pouvoir dénaturant vis-à-vis des protéines (Colowick & Kaplan, 1990 ; Scopes, 1994 ; Kamoun, 1997).

- **Protocole de précipitation**

La précipitation fractionnée des protéines de l'extrait a été réalisée par ajout de sulfate d'ammonium. L'extrait est successivement porté à 9 différents pourcentages de saturation (10% à 90%) en sulfate d'ammonium. Une étape de précipitation se déroule de la manière suivante. La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter pour atteindre le pourcentage de saturation souhaité est déterminée à l'aide d'une table de saturation (Voir Annexe 5).

Le sulfate d'ammonium est ajouté progressivement à l'extrait protéique dans un laps de temps suffisant pour permettre la solubilisation du sel. La solution est laissée sous agitation douce pendant 60 min. Les extraits enzymatiques ainsi saturés sont mis à décanter pendant 24 h à

4°C (Molinari *et al.*, 2007). Les protéines qui ont précipité sont récupérées par centrifugation à 13000 tr/min pendant 30 min. Les culots sont lavés deux fois avec du tampon phosphate (50 mM, pH6.0). On centrifuge à nouveau pendant 15 min dans des conditions réfrigérées.

Les culots obtenus sont remis en suspension dans un volume réduit de tampon phosphate. Après chaque précipitation, l'activité enzymatique de la chitinase, ainsi que la concentration en protéines totales sont déterminés dans le surnageant et le culot.

La fraction protéique présentant une activité chitinasique est soumise à une chromatographie d'exclusion moléculaire.

### 3.10.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire

La séparation des protéines de l'extrait enzymatique est réalisée par filtration sur gel.

- **Principe**

Une chromatographie sur gel de filtration sépare des protéines sur la base de leur taille et de leur forme en utilisant une colonne remplie de billes poreuses. Les protéines grosses ou allongées ne peuvent pénétrer dans les pores des billes et sont donc éluées les premières de la colonne. Au contraire, les plus petites protéines peuvent pénétrer dans les billes poreuses et peuvent donc se déplacer dans un volume accessible plus important ; elles migrent donc plus lentement à travers la colonne et leur élution est plus tardive. On peut donc réaliser une chromatographie sur gel de filtration pour éliminer les sels d'un mélange protéique et estimer le poids moléculaire d'une protéine (Hames *et al.*, 2006).

- **Mode opératoire**

**Pour la purification partielle de notre extrait enzymatique brut, notre choix s'est porté sur le gel Sephadex G-100 dont le domaine de fractionnement est compris entre 4 kDa et 150 kDa. Ce gel, formé de dextran modifié, se présente sous forme de perles qui dans l'eau gonflent considérablement. 10 g de gel sont mélangés dans du tampon phosphate (50 mM, pH 6.0) à température ambiante. Après 72 h, le gel est dégazé par de l'azote liquide et des ultrasons afin d'éviter la formation de bulles d'air qui peuvent perturber la régularité du débit.**

Le gel ainsi préparé a été délicatement coulé à l'aide d'une baguette de verre sur les parois de la colonne en verre (100 x 2 cm), jusqu'à une hauteur de 75 cm et équilibré avec le tampon phosphate.

Un étalonnage préalable de la colonne a été réalisé par dépôt à la surface du gel de 3 ml d'un mélange de trois standards (Sigma): la Bovine Serum Albumin (66 kDa), l'Anhydrase

Carbonique (31 kDa), la Trypsin Inhibiteur (21 kDa) et le Bleu de Dextran (2000 kDa) pour la détermination du volume mort  $V_0$ .

Le mélange a été élué à un débit de 18 ml/h (0.3 ml/min) à l'aide d'une pompe péristaltique de type Pharmacia LKB (p-1) et équilibré par le même tampon phosphate.

Après étalonnage de la colonne, un volume de 3 ml de l'extrait enzymatique est déposé délicatement à la surface du gel à l'aide d'une seringue. L'élution a toujours été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales.

Les éluats ont été recueillis dans un collecteur de fraction de type Pharmacia LKB FRAC-100 à raison de 3.6 ml/tube. Sur chaque fraction, l'activité chitinasique et l'absorbance à 280 nm ont été déterminées.

### 3.10.3. Ultrafiltration

L'ultrafiltration sur membrane à perméabilité sélective, permet la séparation de substances, selon leur taille moléculaire, donc approximativement selon leur poids moléculaire (Maurel, 2001).

- **Principe**

La séparation est basée sur la taille des molécules et la perméabilité du milieu à filtrer qui peut être affecté par les propriétés chimiques et électrostatiques de l'échantillon.

L'ultrafiltration est un procédé de séparation des petites molécules et des solutés solubles dans le solvant. Elle permet à la fois de concentrer des solutions de macromolécules et d'éliminer la plupart des contaminants de petite masse moléculaire (Dennison, 2002).

C'est une méthode qui permet la filtration sous pression d'air d'un liquide à travers une membrane avec des pores tellement petits que les macromolécules seront retenues sur la membrane. Les seuils de coupure des membranes d'UF se situent entre 1000 et 100000 Da.

La membrane est une structure poreuse avec des pores de l'ordre de 10 nm à 1 µm pour l'ultrafiltration. Le seuil de coupure est défini par la masse molaire du soluté le plus petit retenu à 90 % (Anselme et Jacobs, 1996)

- **Mode opératoire**

Les fractions actives recueillies par chromatographie sur gel de filtration et dans lesquelles il y a présence d'activité chitinasique, ont été rassemblées et concentrées par ultrafiltration (UF) sur cellule Amicon 8400, à travers une membrane millipore de 10 kDa (63.5 mm), sous pression d'azote (1.5 bar) et avec agitation. Le concentré obtenu est conservé à + 4 °C pour une caractérisation ultérieure.

### 3.11. Etablissement du tableau de purification

L'activité enzymatique est la quantité de la protéine exprimée en termes de capacité catalytique ou biologique. On exprime la pureté d'une préparation de protéines en parlant de son activité spécifique (Augère, 2001).

L'activité spécifique est l'activité par rapport à la quantité totale de l'ensemble des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités par masse de protéine. Plus l'activité spécifique est élevée, plus la protéine est pure.

Le calcul des paramètres suivants a permis l'établissement du tableau de purification.

Activité totale (U) = Activité chitinasique x volume total.

Le facteur de purification est le nombre de fois qu'on a pu concentrer l'activité spécifique (par rapport à la première étape) durant chacune des autres étapes de la procédure. Il a été calculé selon la formule suivante:

FP = Activité spécifique de chaque étape de purification / Activité spécifique de l'étape initiale.

Le rendement de la purification est la proportion, en pourcentage, de la quantité de la protéine purifiée qui reste, par rapport à la quantité initiale. Après chaque étape, il y a perte de matériel et inévitablement, le rendement va diminuer. Il a été calculé selon la formule suivante:

R (%) = Activité totale de chaque étape de purification / Activité totale de l'étape initiale.

Pour établir le tableau de purification, la quantité de protéines totales et l'activité chitinasique ont été évaluées à chaque étape de purification (Colowick & Kaplan, 1990).

### 3.12. Caractérisation de l'extrait enzymatique

La caractérisation des chitinases extraites à partir d'abats de rascasses, a été réalisée en déterminant le poids moléculaire, ainsi que les conditions optimales (température, pH) de l'activité chitinasique. Après détermination et fixation des conditions optimales, nous avons étudié la stabilité de ces extraits enzymatiques vis-à-vis de la température, du pH et de la durée de conservation au cours du temps.

De plus, l'influence de certains effecteurs, tout comme l'influence de la nature du substrat sur l'activité enzymatique, ont été aussi analysés au cours de notre étude.

Une cinétique de la chitinase partiellement purifiée a été effectuée afin de déterminer les paramètres cinétiques  $V_{\max}$  et  $K_m$ .

### 3.12.1. Détermination du poids moléculaire de la chitinase

L'étalonnage de la colonne gel filtration a été réalisé par l'injection d'un mélange de standards et l'élution a été effectuée dans les mêmes conditions expérimentales. L'établissement de la courbe  $V_e/V_0 = F(\log PM)$  par chromatographie gel filtration a permis de déduire le poids moléculaire de notre chitinase.

### 3.12.2. Optimisation de la température de l'activité enzymatique

La détermination de la température optimale de l'activité de l'extrait enzymatique brut et partiellement purifié a été obtenue par la mesure de la quantité des N-Acétyl-Glucosamines, libérés par hydrolyse enzymatique de la chitine à pH 5 pour des températures allant de 20°C à 65 °C. Le dosage de l'activité enzymatique relative a été réalisé dans les conditions standards de mesure. Nous avons exprimé le pourcentage de l'activité relative trouvée aux différentes températures par rapport à la température donnant la meilleure activité.

### 3.12.3. Optimisation du pH de l'activité enzymatique

Le pH optimum de l'activité de l'extrait brut et de l'extrait partiellement purifié a été déterminé par le dosage des N-Acétyl-Glucosamines à des pH variant de 3 à 11. Le pH de chaque mélange réactionnel a été ajusté par addition des systèmes tampons (50 mM) suivants (Nawani et *al.*, 2002):

Pour l'intervalle de pH (3.0 - 7.0) : citrate phosphate

Pour l'intervalle de pH (7.5 - 9.0) : Tris-glycine

Pour l'intervalle de pH (9.5 - 11.0) : glycine-NaOH

Les essais sur l'activité chitinasique ont été réalisés à la température optimale (préalablement déterminée) dans les conditions standards de mesure. Nous avons exprimé le pourcentage de l'activité relative, à différentes valeurs de pH, par rapport au pH donnant la meilleure activité.

#### **3.12.4. Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique**

- ***Thermo-stabilité de la chitinase en fonction du temps***

La thermostabilité est un des critères de sélection des enzymes destinées à la biotechnologie (Scriban, 1999). La stabilité thermique de l'extrait enzymatique a été déterminée après son incubation à des températures variant de 40 à 80 °C et à des intervalles de temps allant de 10 à 80 min. L'activité enzymatique résiduelle a été déterminée par le dosage des N-Acétyl-Glucosamines produits dans le mélange réactionnel dans les conditions optimales.

- ***Stabilité de la chitinase vis-à-vis du pH***

L'influence du pH sur l'activité hydrolasique de notre chitinase a été étudiée dans des solutions tampons pour des pH allant de 3 à 11 (Cf. paragraphe 3.12.3.).

L'activité enzymatique a été déterminée dans les conditions optimales de dosage des NAG, dans le milieu réactionnel. La stabilité de l'enzyme a été mesurée aux différents pH après une pré-incubation à 4 °C pendant 16 heures (Kim *et al.*, 2003).

- ***Stabilité de la chitinase au cours de la conservation***

L'extrait enzymatique partiellement purifié a été conservé à 4 °C et à - 18 °C dans un tampon phosphate (pH 6) pendant 20 jours et 2 mois respectivement. L'activité chitinasique résiduelle a été mesurée périodiquement, selon les conditions optimales de mesure.

#### **3.12.5. Influence de certains effecteurs sur l'activité enzymatique**

Des effecteurs ioniques (CuSO<sub>4</sub> ; CaCl<sub>2</sub> ; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; MgSO<sub>4</sub> ; ZnSO<sub>4</sub> ; AgNO<sub>3</sub> ; AlCl<sub>3</sub> ; BaCl<sub>2</sub> ; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ; CdSO<sub>4</sub> et l'EDTA) ont été additionnés à la concentration de 1 mM. D'autres effecteurs tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone ont aussi été testés. Chacun d'entre eux a été ajouté à l'extrait enzymatique à la concentration de 50 %.

Les mélanges enzyme-effecteur ont été incubés pendant 1 h à température ambiante (Dahiya *et al.*, 2005). L'activité chitinasique résiduelle a été déterminée dans les conditions optimales de mesure et exprimée en pourcentage de l'activité enzymatique dans un milieu réactionnel sans ions.

### 3.12.6. Influence de la nature du substrat sur l'activité enzymatique

Les mélanges réactionnels contenant l'extrait enzymatique partiellement purifié et la chitine (chitine irradiée et chitine témoin) ont été soumis à des essais d'activité chitinasique dans les conditions optimales de mesure après incubation d'une durée maximale de 10 h, les prélèvements ayant lieu à des intervalles fixes.

### 3.12.7. Etude de la cinétique enzymatique en fonction de la concentration du substrat

L'activité chitinasique a été étudiée à cet effet sur une gamme de concentration allant de 0.5 à 2.5 mg/ml en chitine irradiée. La production de NAG a été mesurée périodiquement sur une durée maximale d'incubation de 8 heures.

Les vitesses initiales ont été déterminées dans les conditions optimales de mesure, avec  $V = d[p]/dt$ . L'étude des variations des vitesses de la réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat permet de déduire le type de cinétique caractérisant l'enzyme.

La détermination de l'équation de la vitesse d'hydrolyse enzymatique de la chitine est nécessaire pour prévoir les performances de l'enzyme.

### 3.12.8. Mesures des paramètres cinétiques

Les valeurs théoriques de l'activité sont calculées à partir des vitesses initiales observées en appliquant la transformation de l'équation de Michaelis-Menten.

La détermination expérimentale des constantes cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  a été réalisée par 2 méthodes qui sont celle de la représentation de Lineweaver et Burk et celle d'Eadie-Hofstee.

Dans le cas de la représentation de Lineweaver-Burk, les paramètres cinétiques sont déterminés graphiquement par l'extrapolation de la courbe  $1/v = f(1/s)$ , en utilisant l'équation réciproque suivante :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]}$$

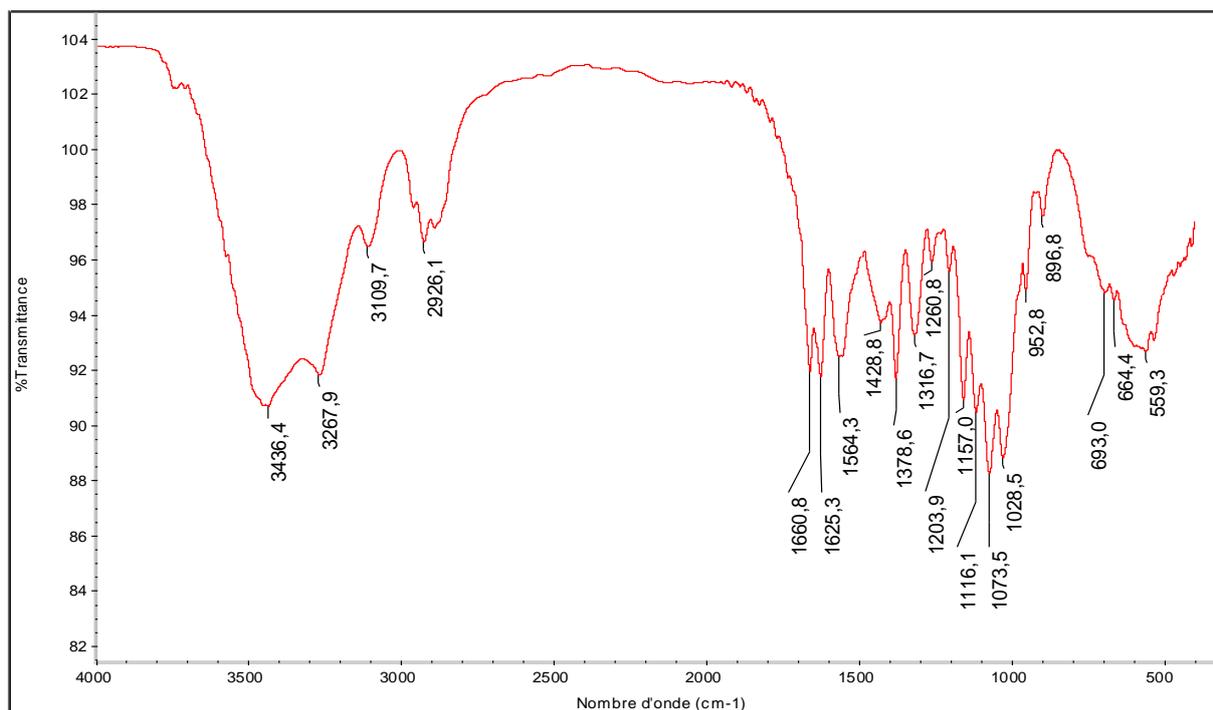
La représentation d'Eadie-Hofstee est illustrée par une courbe exprimant  $v$  en fonction de  $v/[S]$ , les constantes cinétiques sont estimées directement à partir de l'équation :

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + v_{max}$$

## 4. RESULTATS ET DISCUSSION

### 4.1 Caractérisation de la chitine

La chitine est constituée de chaînes linéaires de groupements acétyles glucosamines  $\text{CH}_3\text{-CO}$ . Le spectre infrarouge de la chitine commerciale, représenté dans la figure 4.1, est typique aux polysaccharides (Brugnerotto et *al.*, 2001; Rinaudo, 2006). Les pics correspondants aux bandes d'élongation C=O entre 1600 et 1500 sont caractéristiques de la fraction amide. La bande des amides I est fragmentée à 1661 et 1625  $\text{cm}^{-1}$ , par contre celle des amides II est unique à 1564  $\text{cm}^{-1}$ .



**Fig. 4.1** : Spectre infrarouge de la chitine

Les bandes d'absorption caractéristiques de la chitine ainsi que les vibrations correspondantes sont données dans le tableau 1 (Voir Annexe 2).

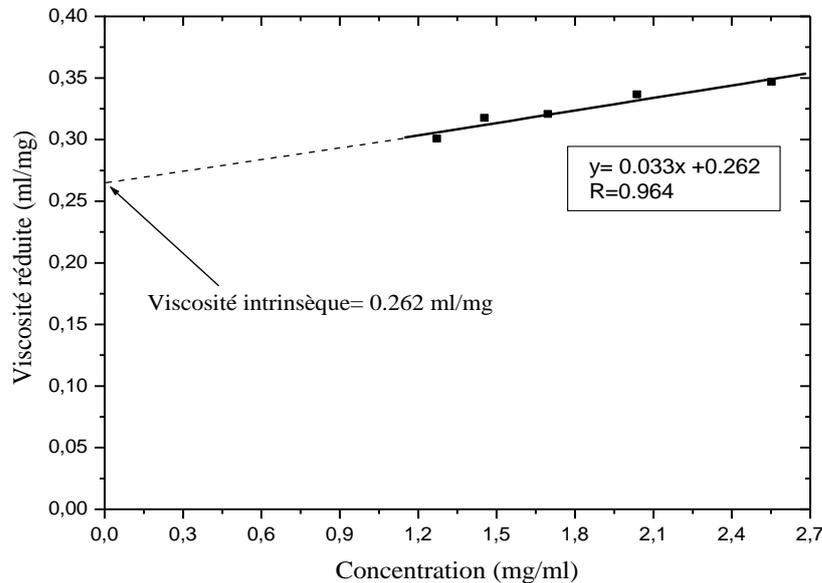
#### 4.1.1 Détermination des différents poids moléculaires de la chitine

Les poids moléculaires respectifs de la chitine non irradiée et irradiée à différentes doses ont été déterminés par viscosimétrie. Les valeurs du poids moléculaire sont calculées à l'aide de l'équation de Mark-Houwink-Sakurada (Einbu et *al.*, 2004).

##### ➤ Chitine non irradiée

La variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration de la chitine non irradiée est représentée dans la figure 4.2. L'intersection de la droite obtenue avec l'axe des ordonnées nous donne la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  qui est de 0.262 ml/mg.

Pour la chitine et le solvant, les valeurs respectives des constantes  $a = 0.68$  et  $k = 0.10$  sont des paramètres caractéristiques d'un système polymère-solvant, à une température donnée (Einbu et al., 2004). Le poids moléculaire calculé de la chitine témoin est de **106659 Da**.



**Fig. 4.2 :** Détermination de la viscosité intrinsèque de la chitine non irradiée

➤ *Chitine irradiée à différentes doses*

Les viscosités intrinsèques sont déterminées de la même manière, que ce soit pour la chitine non irradiée ou pour la chitine irradiée aux doses 15, 30, 90, 150, 210 kGy (Annexe 1).

Les valeurs des viscosités intrinsèques en fonction de la dose d'irradiation et les poids moléculaires respectifs calculés sont représentées dans le tableau 4.1.

**Tableau 4.1:** Variation du poids moléculaire de la chitine en fonction de la dose d'irradiation

Dose (kGy)	Viscosité intrinsèque (ml/mg)	Poids moléculaire (Da)	Réduction du poids moléculaire (%)
0	0.262	106659	0
15	0.211	77446	27.39
30	0.147	45708	57.14
90	0.128	37239	65.08
150	0.86	20941	80.36
210	0.56	11271	89.43

La réduction du poids moléculaire de la chitine à l'état solide a été réalisée par traitement aux R.γ du Co-60. On constate que le poids moléculaire de la chitine décroît continuellement en

fonction de la dose, passant de la valeur de 106659 Da pour un échantillon non-irradié à la valeur de 11271 Da à la dose maximale utilisée (210 kGy). Pour la dose maximale, la réduction du poids moléculaire atteint 90%, alors qu'il n'est que de 27% pour la dose minimale utilisée de 15 kGy. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par divers auteurs pour des composés similaires et des niveaux de dose voisins. Ainsi dans le cas de la chitine, pour une irradiation à la dose de 20 kGy, le taux de réduction de la masse moléculaire est de 33% (Tahtat et *al.*, 2007) tandis qu'à la dose de 200 kGy, il est de 90% (Min et *al.*, 2004). Pour le chitosane, Migdal et *al.* (2007) ont trouvé un taux de réduction de la masse moléculaire de 85% à la dose de 150 kGy.

Cette réduction constatée dans le poids moléculaire est principalement due aux cassures des liaisons glycosidiques induites par l'irradiation. En effet, suite à l'action des rayonnements d'énergie élevée, de nombreux polymères accusent une diminution de masse moléculaire due à des coupures de la chaîne principale. Cet effet est caractérisé par une diminution de la viscosité et de la masse moléculaire moyenne du polymère irradié. La théorie mathématique de la dégradation suppose tout d'abord que chaque rupture de la chaîne polymérique est due à l'intervention d'un seul événement radiochimique, soit l'ionisation, soit l'excitation. Le nombre de ruptures de la chaîne est par conséquent directement proportionnel à la dose absorbée et la répartition des ruptures le long de la chaîne se produit au hasard (Charlesby, 1958).

**Remarque :**

*Les chitines irradiées à l'état sec ont été soumises à des tests en vue d'y déceler la présence de monomères NAG afin d'évaluer si la dégradation est totale. Pour toutes les doses appliquées, la concentration en NAG obtenue est nulle, ce qui montre que la dégradation n'aboutit pas à la production de monomères, même après de nombreuses coupures de chaînes. Cela a déjà été constaté et le seul effet observé est une diminution de la masse moléculaire moyenne qui reste toutefois toujours relativement élevée (Charlesby, 1958).*

#### 4.1.2 Détermination du degré de déacétylation de la chitine

Le degré de déacétylation (DD) de la chitine a été déterminé par la technique IR en se basant sur le rapport des absorbances des deux pics, 1316 cm<sup>-1</sup> correspondant aux groupements HN-CO et le pic de référence à 1428 cm<sup>-1</sup>. Les absorbances obtenues sont:

$$A_{1316} = 0,0158 \quad A_{1428} = 0,0112$$

Le degré de déacétylation moyen calculé est de 17%

DA(%) = 100% - D% N – désacétylation.

Le degré de d'acétylation (DA) calculé est de 83%

#### 4.2 Dégradation de la chitine par irradiation Gamma

La réduction du poids moléculaire de la chitine à l'état solide a été réalisée par traitement aux rayonnements Gamma du Cobalt-60. A l'état solide, la dégradation des polysaccharides est due principalement à l'effet direct des radiations ionisantes.

La diminution du poids moléculaire en fonction de la dose d'irradiation  $\gamma$  est représentée dans la (figure 4.3). L'analyse de la courbe a révélé que la réduction de la masse moléculaire suit une loi de décroissance exponentielle suivant la formule suivante :

$$M = (M_0 - M_{\min}) e^{-\left(\frac{D}{D_{1/2}}\right)} + M_{\min}$$

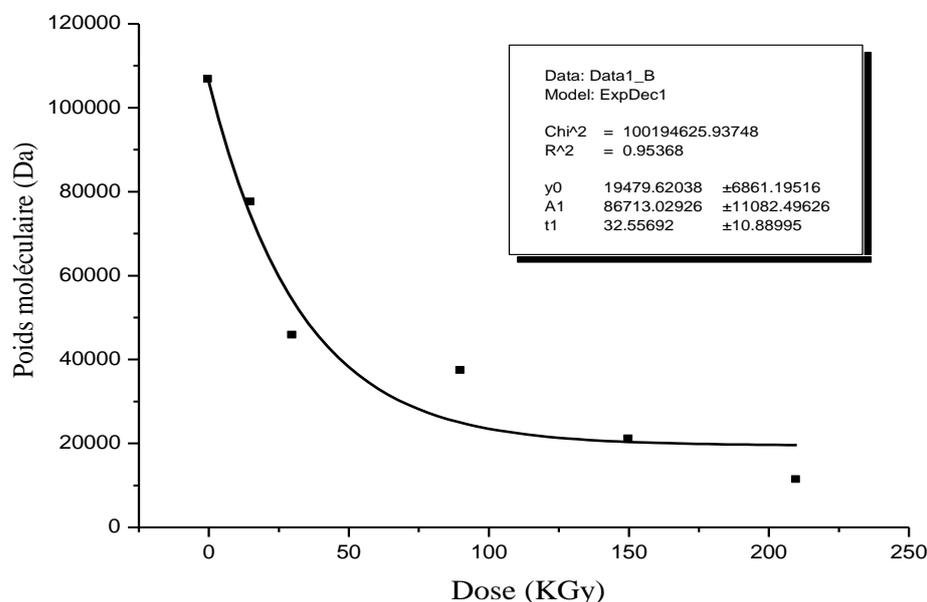
Où : M est la masse moléculaire obtenue à la suite de l'irradiation à la dose D

$M_0$  : masse moléculaire initiale

$M_{\min}$  : masse moléculaire minimale

D : dose d'irradiation

$D_{1/2}$  : Dose qui permet de réduire de 50% la concentration initiale



**Fig. 4.3:** Réduction de la masse moléculaire de la chitine en fonction de la dose d'irradiation

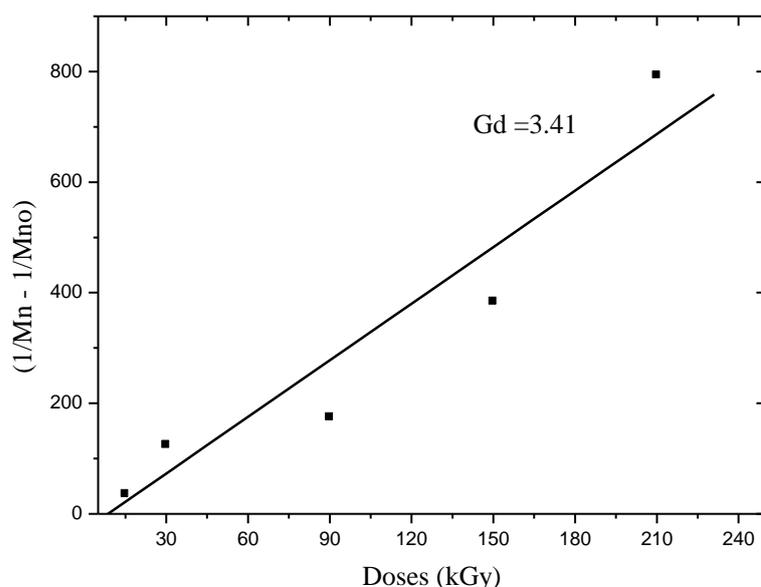
#### 4.3. Détermination du taux de dégradation radiochimique

Le rendement radiochimique  $G_d$  exprime le taux de dégradation et est utilisé pour évaluer la radiosensibilité du polymère (Huang et al., 2007a).

$G_d$  est déterminé par l'équation de Charlesby–Pinner (Charlesby, 1995).

$$M_n^{-1} - M_0^{-1} = G_d \times 1,04 \times 10^{-7} \times D$$

Où  $M_n$  et  $M_0$  sont les poids moléculaires moyens du polymère respectivement après et avant dégradation et  $D$  est la dose absorbée.



**Fig. 4.4 :** Influence des doses absorbées sur le taux de dégradation radiochimique

Dans le cadre de notre étude, nous avons travaillé avec une chitine à l'état sec mais présentant un taux d'humidité de 5%. Le taux de dégradation radiochimique  $G_d$  a été évalué à partir de la droite (figure 4.4) représentant la différence des rapports de poids moléculaire en fonction de la dose suivant l'équation de Charlesby-Pinner. Une valeur de  $G_d = 3.4$  a été obtenue pour une chitine déacétylée à 17%, de poids moléculaire initial de 106 kDa et ce pour une dose de 210 kGy à un débit de dose de 47 Gy/min.

Pour des chitines déacétylées à 70% et à 90% et de poids moléculaires respectifs 471 kDa et 101 kDa, Mahlous et *al.* (2007) ont trouvé des taux de dégradation radiochimique respectifs ( $G_d = 0.43$ ) et ( $G_d = 0.096$ ) pour une dose de 250 kGy à un débit de dose de 59.1 Gy/min.

On peut noter que le degré de déacétylation semble jouer un rôle puisque pour des poids moléculaires voisins (106 kDa vs 101 kDa) à des doses et débits de dose relativement proches (210 vs 250 kGy et 47 vs 59.1 Gy/min). Le taux  $G_d$  varie d'un facteur 35 lorsqu'on passe d'une chitine faiblement déacétylée (17%) à une chitine fortement déacétylée (90%).

On peut donc en déduire que plus le degré de déacétylation est élevé, plus le taux de dégradation radiochimique  $G_d$  est faible.

Hai et *al.* (2003) ont irradié de la chitine déacétylée à 90% (resp. 99%) à la dose de 500 kGy avec un débit de dose 23.33 Gy/min et ont obtenu une valeur de  $G_d = 1.80$  (resp. 0.99).

En ce qui concerne la variation en fonction de la dose, on peut constater que, plus la dose augmente, plus le taux de dégradation radiochimique augmente.

Des expériences menées par Huang et *al.* (2007b) sur du chitosane carboxyméthylé à l'état sec de poids moléculaire initial 31 kDa et irradié à la dose de 160 kGy avec un débit de dose de 55 Gy/min, ont permis de montrer qu'en absence d'oxygène, la valeur du  $G_d$  était de 0.49. Cette valeur, relativement faible, pourrait s'expliquer d'une part par l'absence d'oxygène lors de l'irradiation et d'autre part par un taux d'humidité pratiquement nul (état sec).

En effet, les molécules d'eau présentes dans l'échantillon lors de l'irradiation d'une substance à forte teneur en eau ou sous forme de solution aqueuse, subiront la radiolyse sous l'action des R.I. et donneront naissance à des radicaux libres très instables. Ceux-ci vont inter-réagir avec les molécules de chitine et la vitesse de dégradation sera plus rapide (Huang et *al.*, 2007 b).

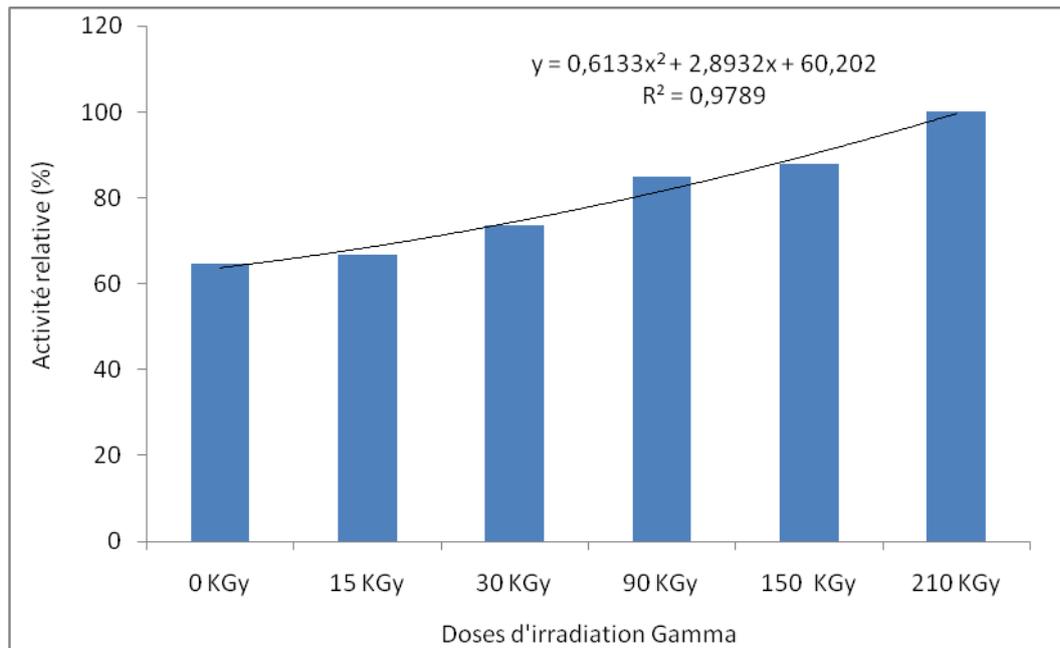
La radiolyse du soluté ou de la substance résulte non pas de l'action directe du rayonnement, mais de l'effet dit indirect. La teneur en eau d'une substance joue donc un rôle déterminant dans la dégradation des polymères par le mécanisme de la radiolyse.

La présence d'oxygène lors de l'irradiation est un facteur important qui a dans plusieurs cas une influence fondamentale sur le résultat final de la radiolyse des polymères (Chapiro, 1962). Il semble de plus que l'oxygène joue un rôle important dans l'amplification de la dégradation radiolytique, comme l'ont montré Yue et *al.* (2009) qui ont constaté que la dépolymérisation du chitosane augmente en fonction du flux d'oxygène.

Il faut cependant noter que la plupart des travaux portent sur le chitosane et que peu d'études ont été effectuées sur la chitine.

#### **4.4. Effet de l'irradiation du substrat sur l'activité enzymatique de l'extrait brut**

Dans le but d'améliorer le taux d'hydrolyse enzymatique, un prétraitement de la chitine a été effectué afin d'obtenir des polymères de faible poids moléculaire. A cet effet, les échantillons ont été soumis à l'action des R. $\gamma$ , à différentes doses allant de 15 kGy à 210 kGy.



**Fig. 4.5 :** Activité chitinasique en fonction de la dose d'irradiation Gamma

La figure 4.5 représente la variation de l'activité chitinasique relative en fonction de la dose d'irradiation délivrée à la chitine. On peut y relever une augmentation continue de l'activité chitinasique qui passe d'une valeur de 64% pour l'échantillon non-irradié ( $D = 0$  kGy), à une valeur de 100% pour la dose maximale ( $D = 210$  kGy). La courbe, de tendance polynomiale, montre que le taux d'hydrolyse enzymatique augmente de manière sensible (près de 35%).

L'étude de l'effet de l'irradiation du substrat sur des enzymes a montré qu'il y a augmentation du taux d'hydrolyse lorsque la dose d'irradiation augmente (Ait Si Mamar & Hadjadj, 1990 ; Dzung *et al.*, 2007 ; Roy & Gupta, 2003). Cette variation à la hausse serait due au fait que l'enzyme devient plus active lorsqu'elle se retrouve en contact avec un substrat dont la chaîne polymérique a été partiellement dégradée. L'irradiation a donc rendu meilleure l'accessibilité de la matière chitineuse à l'enzyme.

Le traitement du substrat d'hydrolyse « chitine » aux rayons  $\gamma$  du Co-60 a permis d'améliorer le taux production de NAG d'une part. D'autre part, il autorise la non-utilisation de réactifs chimiques, au contraire des techniques conventionnelles où on y a recours systématiquement. De plus, la consommation énergétique est moins élevée.

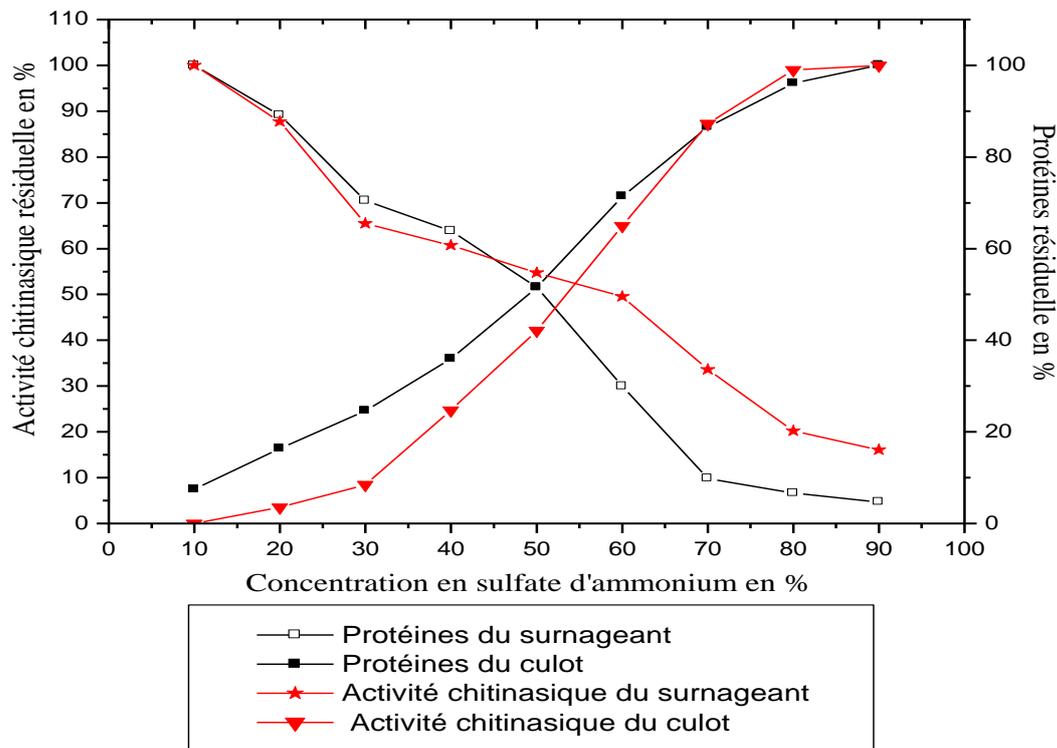
A partir de ces résultats expérimentaux, il apparaît nettement que la dépolymérisation partielle de la chitine par irradiation entraîne l'augmentation de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Ainsi, le couplage d'une action physique (irradiation  $\gamma$ ) à l'action enzymatique nous a permis d'augmenter le taux de production des oligomères et monomères obtenus à partir de la chitine.

#### 4.5. Essai de purification de l'extrait enzymatique brut

L'extrait enzymatique brut issu des abats de rascasses subit plusieurs étapes de purification afin d'obtenir la chitinase la plus pure possible, et dont l'activité spécifique sera de plus en plus élevée au fur et à mesure des étapes. Afin d'évaluer l'efficacité de chaque méthode de fractionnement, l'activité chitinasique et la concentration en protéines ont été déterminées après chaque étape de purification.

##### 4.5.1. Précipitation de l'extrait enzymatique au sulfate d'ammonium

Dans le cas des chitinases, on utilise préférentiellement le sulfate d'ammonium, en raison de son faible coût, de son pouvoir précipitant élevé, de sa grande solubilité et de son faible pouvoir dénaturant vis-à-vis des protéines (Kamoun, 1997).



**Fig. 4.6** : Effet d'une précipitation au sulfate d'ammonium sur l'activité chitinasique

La précipitation par le sulfate d'ammonium permet d'obtenir une fraction enrichie à partir d'un grand volume tout en éliminant une partie des protéines-enzymes associées ou autres impuretés, celles-ci étant insolubilisées avant et après la fraction où se rassemble l'enzyme recherchée.

Les résultats du relargage salin de l'extrait enzymatique brut réalisé dans un intervalle de concentration allant de 10% à 90% sont illustrés dans la figure 4.6.

Après chaque précipitation, l'activité enzymatique de la chitinase, ainsi que la concentration en protéines totales ont été respectivement déterminés dans le surnageant et le culot.

Le test d'activité enzymatique indique qu'une saturation au  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  à 90% permet une précipitation maximale de la chitinase.

Dans une étude similaire, Patel et *al.* (2010) et Sandeep Varma et *al.* (2009) ont obtenu une précipitation totale des chitinases pour une concentration en sulfate d'ammonium comprise entre 80% et 90%.

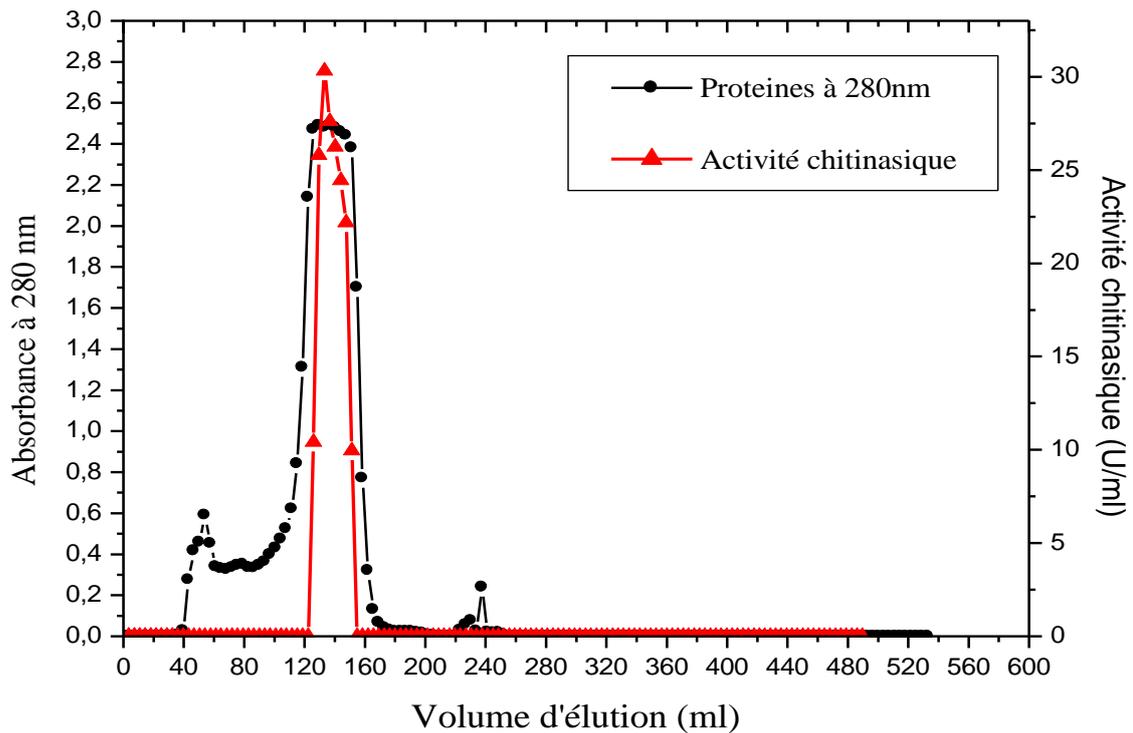
En comparant les résultats obtenus pour les précipitations réalisées sur l'extrait brut, à différents gradients de concentration, il s'est avéré plus intéressant d'éliminer une partie des protéines non désirables, afin d'obtenir une meilleure purification. Pour cela, l'extrait brut a fait l'objet d'une première précipitation au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 20% de saturation ; le culot obtenu après centrifugation réfrigérée a été éliminé et le surnageant, doté d'une importante activité chitinasique a été soumis à une seconde précipitation au  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  à 90% de saturation. Le culot obtenu a été remis en suspension dans un volume réduit de tampon phosphate et a été conservé à 4°C, pour les autres étapes de purification.

Ce fractionnement (20% - 90%) au  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  a permis d'éliminer une partie des protéines non actives représentant 16% de la quantité de protéines totales initiales. Ceci conduit ainsi à une augmentation de l'activité chitinasique spécifique jusqu'à la valeur de 114 U/mg (Voir Tableau 4.2).

Les résultats de Dahiya et *al.* (2005) ont montré qu'un fractionnement de 30% à 75% au  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  a permis d'éliminer environ 22% de la quantité de protéines totales initiales. Il y a donc eu augmentation de près de trois fois du facteur de purification.

#### **4.5.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire**

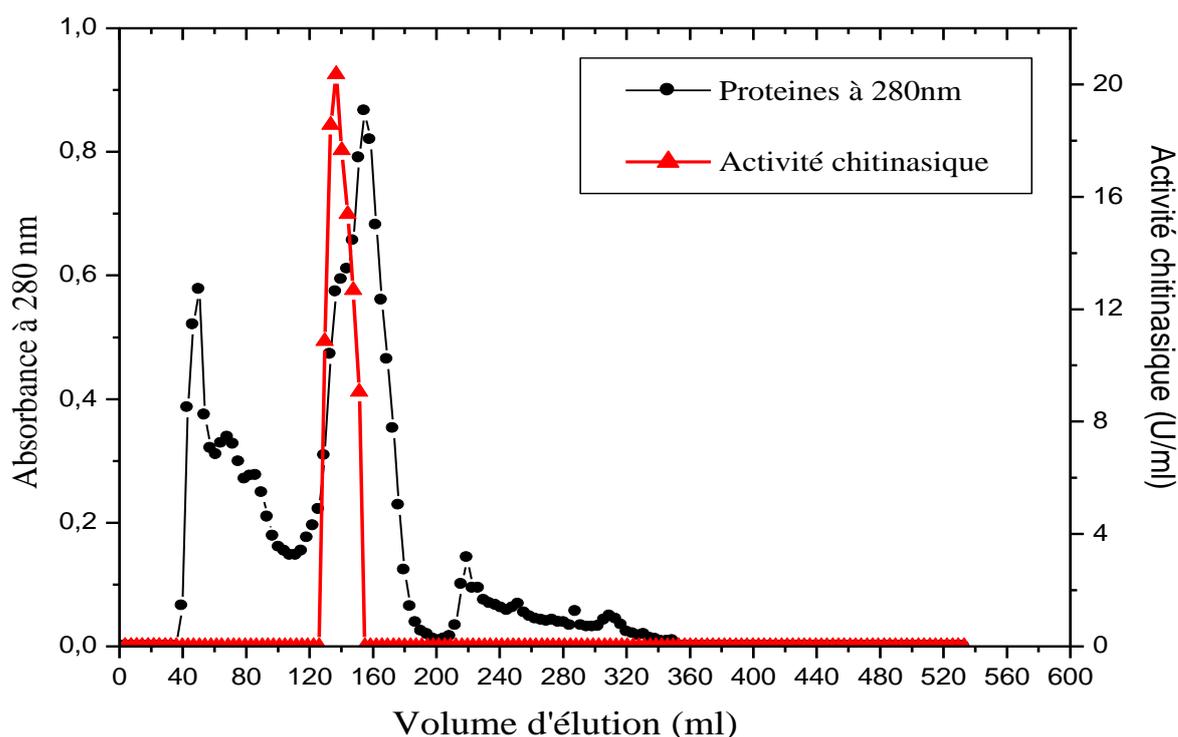
La filtration moléculaire est une technique chromatographique qui permet de séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Les molécules dont la taille est supérieure à celle des pores du gel, sont exclues et sont éluées les premières. Par contre, les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement.



**Fig. 4.7:** Profil chromatographique sur gel Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique brut. Le débit d'élution est de 0.3 ml/min.

Dans une première étape, les protéines de l'extrait enzymatique brut sont séparées selon leurs poids moléculaires à travers le gel Sephadex G-100 dont le domaine de fractionnement est compris entre 4 et 150 kDa. L'élution a été réalisée avec un tampon phosphate (50 mM, pH 6) et un débit d'élution de 0.3 ml/min.

D'après la figure 4.7, le profil chromatographique de l'extrait enzymatique brut montre la présence de deux pics de protéines dont la résolution de séparation est insuffisante. Le premier pic n'est pas doué d'activité chitinasique et correspond aux protéines contaminantes, tandis que le second est lui doué d'une activité chitinasique (absorbance maximale de 2.49). L'activité chitinasique a été retrouvée dans 8 tubes à partir de la 34<sup>ième</sup> fraction jusqu'à la 41<sup>ième</sup> fraction, avec un volume d'élution de 133 ml et une activité chitinasique maximale estimée à 30.31 U/ml à la 36<sup>ième</sup> fraction.



**Fig.4.8:** Profil chromatographique sur gel Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique Précipité de (20-90)% au sulfate d'ammonium, débit d'élué est de 0.3 ml/min

Dans une seconde étape, la fraction protéique obtenue de la pré-purification au  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  (20 - 90) % a été soumise à la filtration moléculaire sur gel Sephadex G100.

Le profil chromatographique obtenu a révélé deux pics d'absorption bien distincts, dont le second est doté d'activité chitinasique (figure 4.8).

L'activité chitinasique a été détectée dans 7 tubes à partir du 35<sup>ème</sup> fraction jusqu'à la 41<sup>ème</sup> fraction, avec un volume d'élué de 136 ml et une activité maximale de 20.36 U/ml à la 37<sup>ème</sup> fraction, correspondant à une DO de 0.52.

En comparant les résultats des deux profils chromatographiques illustrés précédemment, on remarque que le taux en protéines a nettement diminué pour le deuxième pic actif de la figure 4.8 (absorbance maximale à 280 nm de 0.86).

De ces constatations, on peut déduire que l'étape de fractionnement avec une solution de sulfate d'ammonium (20-90)% a permis de purifier partiellement l'extrait enzymatique brut.

On note aussi que la chromatographie d'exclusion moléculaire a permis d'augmenter de près de quatre fois le facteur de purification qui passe de 1.68 à 6.56 (tableau 4.2).

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Rodriguez et *al.* (1995), qui ont obtenu deux pics d'absorption en protéines dont le deuxième est doué d'activité chitinasique.

Les résultats de Vaidya et *al.* (2003), montrent l'existence de deux pics d'élution doués d'activité chitinasique. Ceux-ci ont été obtenus après une chromatographie d'affinité, une ultrafiltration et enfin une chromatographie gel filtration sur Sephadex G75. Le facteur de purification et le rendement en activité ont été de 2.4 et de 7% respectivement.

Ye et Ng (2005) ont obtenus 3 pics d'élution dont le troisième révèle une activité chitinasique. Ces auteurs ont aussi rapportés un rendement en activité de 1.9% et un facteur de purification de 3.9, obtenus à la suite de la purification d'une chitinasés extraites de fèves par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium à (20- 80) % de saturation, suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions et enfin d'une chromatographie sur gel Sephadex G75.

Les résultats de Adrangi et *al.* (2010) ont révélé l'existence de deux pics d'élution doués d'activité chitinasique. Ceux-ci ont été obtenus après une chromatographie échangeuse d'ions, précipitation au sulfate d'ammonium à 80% et enfin une chromatographie gel filtration sur Sephadex G100. Les facteurs de purification et les rendements en activité ont été respectivement de (8.1 et 1.5%) pour la première chitinase Chi-56 et de (18 et 5.4%) pour la seconde chitinase Chi-64.

#### **4.5.3. Ultrafiltration**

L'ultrafiltration est un procédé de séparation des petites molécules et des solutés solubles dans le solvant. Elle permet à la fois de concentrer des solutions de macromolécules et d'en éliminer la plupart des contaminants de petite masse moléculaire.

Les fractions actives récoltées après filtration de l'extrait enzymatique précipité sur gel Sephadex G100, ont été fractionnées et concentrées par ultrafiltration, à travers une membrane de 10 kDa.

Le procédé d'ultrafiltration a permis d'augmenter l'activité chitinasique spécifique d'environ 21% par rapport à celle obtenue par chromatographie d'exclusion moléculaire.

Nous avons noté aussi une amélioration du facteur de purification car en effet ce dernier atteint une valeur de 8.34 (voir tableau 4.2).

**Tableau 4.2** : Bilan de purification de l'extrait enzymatique

Paramètres Étapes de purification	Concentration en protéines (mg/ml)	Protéines totales (mg)	Activité enzymatique (U/ml)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Extrait brut	0.94	338.4	64	23040	68.08	1	100
Précipitation (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (20-90) %	1.17	80.62	134	9233.94	114.53	1.68	40.07
Gel filtration	0.013	6.19	5.8	2764.4	446.6	6.56	12
Ultrafiltration	0.018	1.88	10.2	1067.12	567.62	8.34	4.63

Le tableau de purification (4.2) sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification. Il fait appel à des notions et à des termes précis (Plummer, 1994).

D'après les résultats portés dans le tableau 4.2, nous constatons que la concentration en protéine de l'extrait brut est de 0.94 mg/ml, celle du précipité est de 1.17 mg/ml et enfin pour l'extrait enzymatique partiellement purifié par chromatographie et UF, la concentration en protéine chute jusqu'à une valeur de 0.018 mg/ml.

Notons aussi que les différentes étapes de purification ont permis de purifier l'enzyme 8.34 fois, avec une diminution de l'activité totale à 1067.12 U par rapport à l'activité initiale.

L'activité spécifique pour l'extrait enzymatique brut passe de 68.08 U/mg à 567.62 U/mg pour l'extrait purifié. Des pertes en rendement d'activité ont été constatées après chaque étape jusqu'à atteindre 4.63%. Les résultats obtenus montrent aussi qu'à chaque étape, les protéines totales ont diminué, passant de 338.4 mg initialement, à 1.88 mg à la fin des étapes de purification. En effet, chaque étape supplémentaire, qui permet d'augmenter la pureté, va entraîner des pertes de protéines, et donc une diminution du rendement.

En parallèle, il y a eu augmentation de l'activité spécifique du précipité à 114.53 U/mg, par rapport à l'activité spécifique initiale. Le facteur de purification de la chitinase obtenu suite au fractionnement par précipitation au sulfate d'ammonium (20% - 90%) est de 1.68 avec un rendement en activité de 40%. Ceci montre que l'étape de précipitation a permis de pratiquement doubler l'activité enzymatique spécifique par rapport à la valeur initiale.

On peut expliquer la diminution du rendement par une perte de matériel biologique à chaque étape de purification. Cette perte s'accroît au fur et à mesure des étapes, et le facteur de

purification devient de plus en plus élevé, ce qui reflète que l'on se rapproche de plus en plus d'une enzyme pure.

Fines & Holt (2010) ont purifié une chitinase issue du tractus digestif de juvenile cobia, *Rachycentron canadum* et sont arrivés à un facteur de purification de 8.1 et un rendement en activité à 7.64%. Ces paramètres de purification ont été obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation et chromatographie échangeuse d'ions.

De même, Rodriguez et al. (1995) ont noté au cours de la purification une diminution du rendement en activité à 31.2% et une augmentation du facteur de purification à 33. Ces paramètres de purification ont été obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium à 70% de saturation et chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephacryl S-200.

Notre facteur de purification de 8.34 est supérieur à celui obtenu par Patel et al. (2010), qui est de 3.8 avec rendement en activité de 24%. Ces paramètres de purification ont été obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium à 85% de saturation et chromatographie d'affinité puis chromatographie échangeuse d'ions.

Nos résultats se rapprochent de ceux rapportés par d'autres auteurs (Laribi, 2005 ; Patel et al., 2010) qui ont obtenu un facteur de purification de 1.5 et 1.4 respectivement par précipitation au sulfate d'ammonium à 80% et 85% de saturation.

Il faut cependant noter que le rendement en activité de notre chitinase est proche de celui rapporté par Nawani et al. (2002), qui ont obtenu un facteur de purification de 4 et un rendement en activité de 4.6% pour une chitinase acide de *Microbispora sp. V2*, et ce après précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur gel Sephadex G100. Dans les mêmes conditions, en faisant appel aux mêmes méthodes de purification, Nawani et Kapadnis (2001) ont obtenu un facteur de purification de 5.1 et un rendement en activité de 9.2% pour une chitinase *Serratia marcescens NK1*.

Woo & Park (2003) ont purifié une chitinase extracellulaire de *Bacillus sp* et sont arrivés à un facteur de purification de 9.6 et un rendement en activité de 14%. Ces paramètres ont été obtenus après fractionnement au sulfate d'ammonium à 30% - 80% de saturation suivie d'une chromatographie d'affinité puis d'une chromatographie échangeuse d'ions et enfin d'une chromatographie sur gel Sephadex G200.

Ye & Ng (2005) ont purifié une chitinase végétale et ont trouvé un facteur de purification de 3.9 et un rendement en activité de 1.9%. Ces valeurs ont été déterminées après purification par fractionnement au sulfate d'ammonium (20% - 80%) suivi d'une chromatographie d'affinité puis d'une chromatographie sur gel Sephadex G75.

L'étude menée par Han et al. (2009), portant sur la purification de la chitinase marine de *Streptomyces sp. DA11* a révélé une fraction active avec un facteur de purification de 6.15 et

un rendement en activité de 1.09%, résultats d'une précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation, suivie d'une chromatographie d'affinité et enfin d'une chromatographie échangeuse d'ions.

L'étude réalisée par Murata *et al.* (2005), portant sur la purification de la chitinase de *Amycolatopsis orientalis*, a révélé une fraction active avec un facteur de purification de 11, résultat d'une chromatographie sur gel Sephadex G75, suivie d'une ultrafiltration.

Cheba *et al.* (2009) ont révélés une fraction active avec un facteur de purification de 14.89, et un rendement en activité de 14.68%, résultat d'une précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation, suivie d'une chromatographie d'affinité et enfin d'une chromatographie sur gel Sephadex G100.

Vaidya *et al.* (2003) ont purifié une chitinase extracellulaire de *Alcaligenes xylosoxydans* et sont arrivés à un facteur de purification de 2.4 avec un rendement en activité de 7%. Ces paramètres ont été obtenus par chromatographie d'affinité suivie d'une UF et enfin d'une chromatographie sur gel Sephadex G75.

Waghmare & Ghosh, (2010) ont purifié une chitinase produite de *Bacillus licheniformis* et ont trouvé un facteur de purification de 8.1 et un rendement en activité de 7.64%. Ces valeurs ont été déterminées après purification par précipitation au sulfate d'ammonium suivi d'une chromatographie échangeuse d'ions.

Il est à noter que l'activité spécifique chitinasique est étroitement liée à la nature et à l'origine de la chitine (Woo et Park, 2003 ; Matsumiya *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007; Adrangi *et al.*, 2010 ; Songsiriritthigul *et al.*, 2010 ; Waghmare & Ghosh, 2010).

#### **4.6. Etude des caractéristiques de la chitinase**

La caractérisation des chitinases extraites à partir d'abats de rascasses a été réalisée. Tout d'abord, nous avons estimé le poids moléculaire de l'enzyme et déterminé les conditions physico-chimiques optimales de l'activité chitinasique.

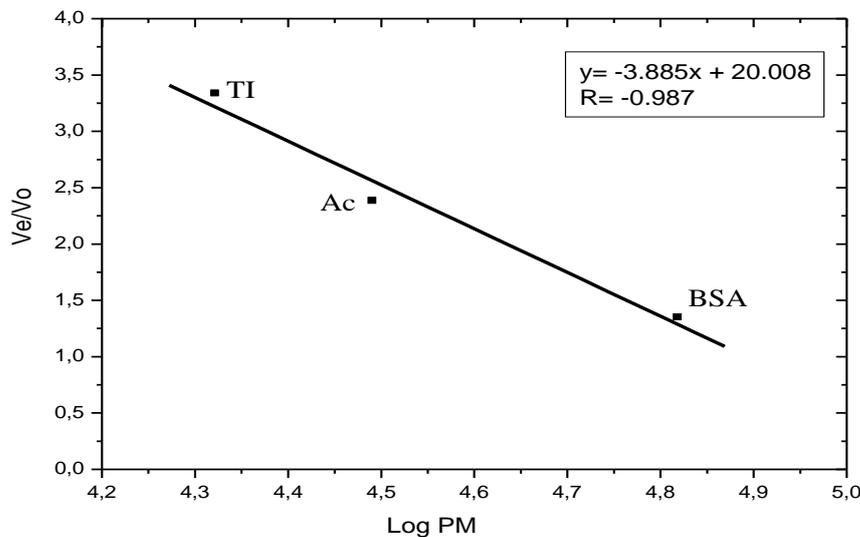
De plus, nous avons étudié la stabilité de l'activité enzymatique en fonction de la température, du pH, de la durée de conservation au cours du temps.

En outre, l'influence de certains effecteurs tout comme la nature du substrat en fonction du temps d'incubation sur l'activité enzymatique, ont été analysés dans notre étude.

En dernier lieu, nous avons déterminé de manière expérimentale les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) de l'enzyme, en faisant appel aux représentations graphiques de Lineweaver-Burk et Eadie-Hofstee.

#### 4.6.1. Détermination du poids moléculaire de la chitinase

Un étalonnage préalable de la colonne a été réalisé par injection d'un mélange de trois standards. L'élution des standards a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales qu'avec les extraits enzymatiques. La séparation des protéines a été réalisée dans l'ordre décroissant des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le rapport du volume d'élution ( $V_e$ ) au volume mort ( $V_0$ ) et le logarithme du poids moléculaire de la protéine (Kamoun, 1997).



**Fig. 4.9:** Courbe d'étalonnage des standards sur gel Sephadex G100

L'établissement de la courbe  $V_e/V_0 = F(\log PM)$ , nous a permis de déduire le poids moléculaire de notre chitinase qui est d'environ 21 kDa (Voir figure 4.9).

Ce poids moléculaire est un peu plus élevé que ceux des chitinases produites par *Bacillus amyloliquefaciens* V656 estimés à 14 kDa et 16 kDa (Wang et al., 2002), mais il se rapproche de ceux obtenus par d'autres auteurs, dont Kim et al. (2003) qui ont trouvé un PM de 20 kDa pour une chitinase de *Streptomyces sp. M-20* ; Zhuravleva et al. (2004) qui ont trouvé un PM de 20 kDa pour une chitinase extraite de *Phoma glomerata* (champignon marin) et Wang et al. (2006) qui ont trouvé un PM de 20.6 kDa pour une chitinase produite par *Bacillus subtilis*. Pour des chitinases d'origine végétale extraites du riz (*Oryza sativa L*) et du latex (*cariya papaya*), Baek et al. (2001) d'une part et Nitsawang & Kanasawud (2006) d'autre part, ont respectivement trouvé un PM de 22.2 kDa et de 26.54 kDa.

Souza et al. (2008) ont estimé à 25 kDa une chitinase d'origine marine (méduse) et Denhart et al. (2009) ont trouvé un PM de 26 kDa pour une chitinase de graines d'orge ; Waghmare &

Ghosh, (2010) ont estimé à 22 kDa une chitinase bactérienne ; Fines et Holt (2010), ont eux déterminé un PM de 22 kDa pour une chitinase issue du tractus digestif de *juvenile cobia*.

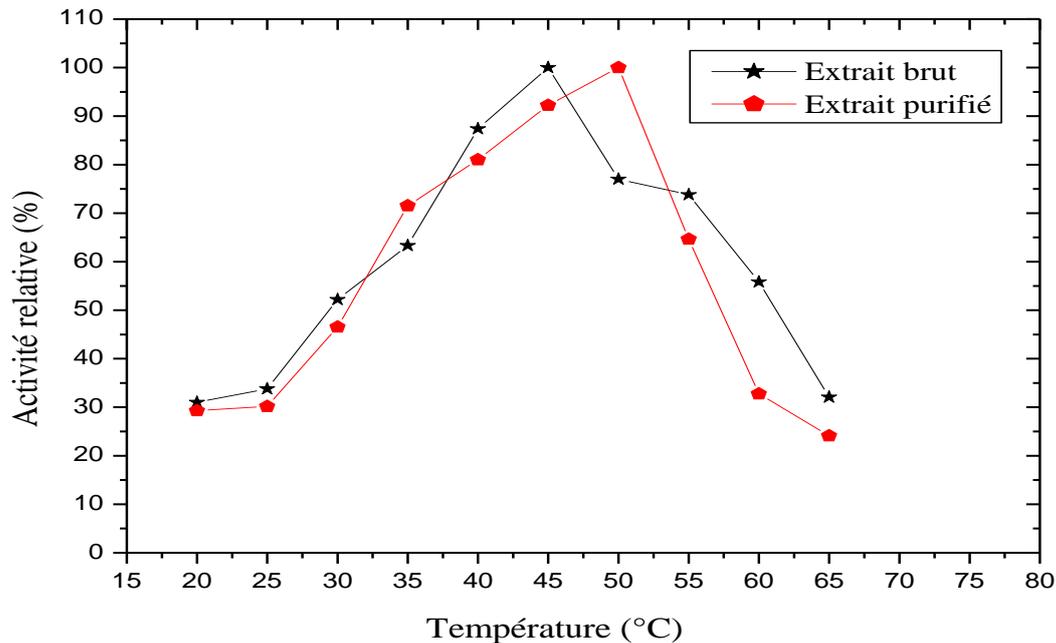
Par contre, nos résultats diffèrent de ceux trouvés par Santos et *al.* (2004), qui à partir de chitinases d'origine végétale, ont trouvé un PM de 30 kDa pour des graines de *Adenantha pavonina*, tandis que pour des chitinases de *Bacillus thuringiensis*, Liu et *al.* (2010) ont trouvé un PM de 36 kDa. Par ailleurs, pour des chitinases extraites du foie, des PM de l'ordre de 37 kDa ont été rapportés par Kono et *al.* (1990) chez la crevette, et de l'ordre de 38 kDa et 42 kDa chez le calamar par Matsumiya et *al.* (2002). Un PM de même valeur (42 kDa) a été mesuré par Ikeda et *al.* (2009) pour une chitinase d'estomac de courbine d'argent *Pennahia argentatus*. Le PM de la chitinase a été évalué à 46 kDa pour la daurade rouge *Pagrus major* par Karasuda et *al.* (2004) et à 75 kDa pour un poisson du Nil *Oreochromis niloticus* par Molinari et *al.* (2007). Pour des chitinases de crevette tigrée, les poids moléculaires étaient de 51.9 kDa et 72.4 kDa (Proespraiwong et *al.*, 2010).

Pour des chitinases de poisson et d'insecte, Matsumiya et *al.* (2006) ont obtenu des PM de (62 kDa, 51 kDa, 47 kDa), tandis que Park et *al.* (2000) ont purifié une chitinase produite à partir d'une bactérie marine, dont le PM a été estimé à 98 kDa.

Dans le même ordre de grandeur, pour une chitinase issue du fluide digestif d'une araignée *Cupiennius salei* des PM de 48 kDa et 108 kDa ont été trouvés par Mommsen (1980). Une valeur de 106 kDa a été obtenue pour une chitinase extraite du papillon du chou (Shi et *al.*, 2007) et une valeur nettement plus élevée (230 kDa) a été rapportée par Zhu et *al.* (2007) pour une chitinase de *Sphingomonas sp. CJ-5*.

#### 4.6.2. Détermination de la température optimale d'activité enzymatique

La température optimale est un compromis entre l'effet de la température sur l'activité catalytique et la stabilité de la protéine enzymatique. L'influence de la température a été étudiée dans l'intervalle de 20 °C à 65 °C. Nous avons observé une augmentation progressive de l'activité enzymatique en fonction de la température entre 25 °C et 45 °C. Cette activité est optimale à 45 °C pour l'extrait enzymatique brut, alors qu'elle est de 50 °C pour l'enzyme purifiée (figure 4.10).



**Fig. 4.10:** Effet de la température sur l'activité chitinasique

Au delà de la température optimale, on note une baisse rapide de l'activité enzymatique à 60 °C avec une perte de 44% et de 67% respectivement pour l'extrait enzymatique brut et l'extrait enzymatique purifié. A 65 °C, la perte d'activité atteint respectivement 68% et 76%.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Kono *et al.* (1990) pour une chitinase extraite du foie de la crevette, par Han *et al.* (2009) et par Liu *et al.* (2010) pour des chitinasés d'origine bactérienne, et par Vishwanatha *et al.* (2009) pour une chitinase produite par un champignon. Pour toutes ces chitinasés purifiées, la température optimale d'activité est de 50°C. Une chitinase d'origine végétale (Santos *et al.*, 2004) et une chitinase d'origine bactérienne (Songsiriththigul *et al.*, 2010) ont présenté une activité chitinolytique optimale à 60°C, tout comme celle extraite de l'estomac de *Pennahia argentatus* (Ikeda *et al.*, 2009).

Nos résultats sont proches de ceux rapportés pour des chitinasés marines par Proespraiwong *et al.* (2010) et Fines & Holt (2010), ainsi que pour une chitinase bactérienne (Waghmare & Ghosh, 2010) qui eux signalent une température optimale de 55°C.

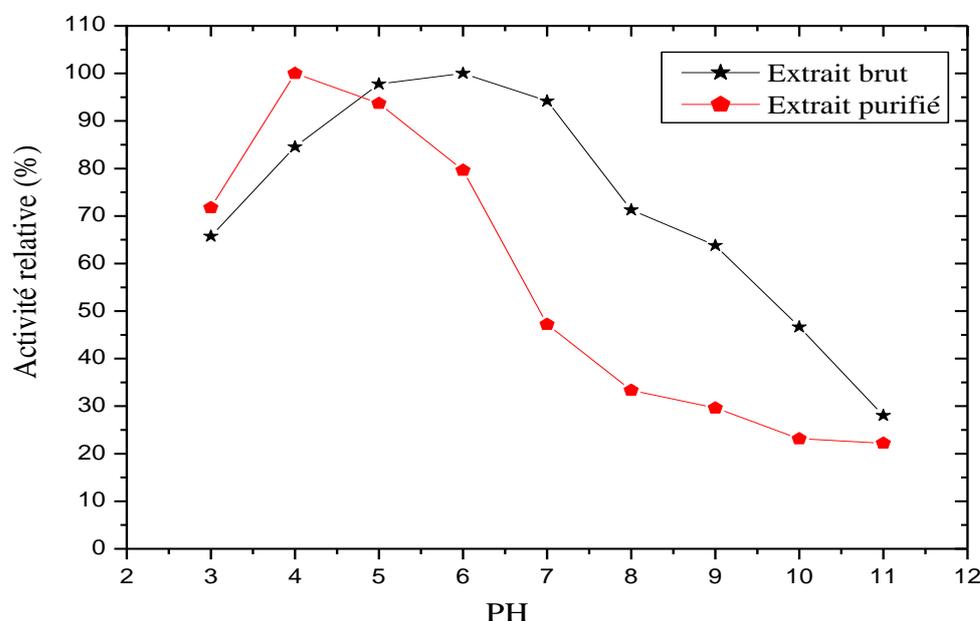
Toujours en ce qui concerne la température optimale, Kim *et al.* (2003) ont trouvé 30°C pour une chitinase de *Streptomyces sp. M-20*, Woo et Park (2003) 37°C pour une chitinase de *Bacillus sp* tandis que Choi *et al.* (2009) ont atteint 65°C à 75°C pour une chitinase de *Thermotoga maritima* et *Thermotoga neapolitana*. Il faut cependant noter qu'une température assez basse (20°C) a été trouvée pour une chitinase chez le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) par Molinari *et al.* (2007).

Ainsi, pour une chitinase donnée, les températures optimales peuvent varier en fonction de la nature du substrat à hydrolyser (Molinari et al., 2007).

#### 4.6.3. Détermination du pH optimum de la chitinase

Les réactions enzymatiques sont sensibles au pH du milieu car ce facteur influence le degré d'ionisation, et du substrat, et de la molécule enzymatique. L'influence du pH sur l'activité enzymatique a été testée sur une gamme de pH allant de 3 à 11.

L'évolution de l'activité des chitinases brutes et des chitinases purifiées en fonction du pH du milieu réactionnel est représentée dans la figure 4.11. Nous relevons un pH optimum de 4 et de 6 respectivement pour l'extrait enzymatique brut et celui purifié.



**Fig. 4.11:** Effet du pH sur l'activité chitinasique de l'extrait enzymatique brut et purifié

On remarque que l'augmentation du pH au-delà de la valeur optimale s'accompagne d'une perte graduelle de l'activité chitinasique pour l'extrait brut et pour l'extrait purifié. En effet, à pH 8, l'extrait brut perd près de 29% en activité et l'extrait purifié près de 67%.

Ces résultats nous permettent de déduire que notre chitinase est une hydrolase très active en milieu acide, tandis qu'elle se dénature aux pH alcalins.

Cette perte d'activité est probablement due à l'effet du pH sur l'ionisation des groupements des chaînes latérales qui maintiennent la structure de l'enzyme ou bien de la dissociation des acides aminés du site actif.

Nos résultats corroborent ceux de Matsumiya (2004) qui a trouvé un pH optimum de 4 et de 4.5 pour un extrait enzymatique brut d'une chitinase issue respectivement de la seiche et du calamar. Hung et al. (2002) ; Baek et al. (2001) ainsi que Santos et al. (2004) sont aussi arrivés à un pH optimum de 4 pour des chitinases d'origine végétale.

Par contre, nos résultats diffèrent de ceux trouvés par Han et al. (2009) et Fines & Holt (2010), qui indiquent un optimum d'activité chitinasique à pH 8 pour des chitinases marines. Pour d'autres chitinases, des pH optimums basiques ont été rapportés : pH 10 pour *Cellulomonas flavigena* NTOU1 (Chen et al., 1997), pH 7- pH 8 pour *Bacillus sp. 13.26* (Yuli et al., 2004) et pH 8 pour *Bacillus licheniformis* (Waghmare & Ghosh, 2010).

Cependant, les différentes études menées en vue de déterminer le pH optimum de l'activité chitinasique ont abouti à des résultats contrastés, les valeurs obtenues variant dans toute la gamme du pH, allant de 2 à 10 en fonction de la nature et de l'origine de l'enzyme.

Ainsi, pour des chitinases acides, des équipes de recherche ont obtenu un optimum de pH 3 pour *Microbispora sp. V2* (Nawani et al., 2002), pH5 pour *Alcaligenes xylosoxydans* (Vaidya et al., 2003) et Nagai et al. (2002) un pH variant de 2 à 5 pour la méduse rhizostome.

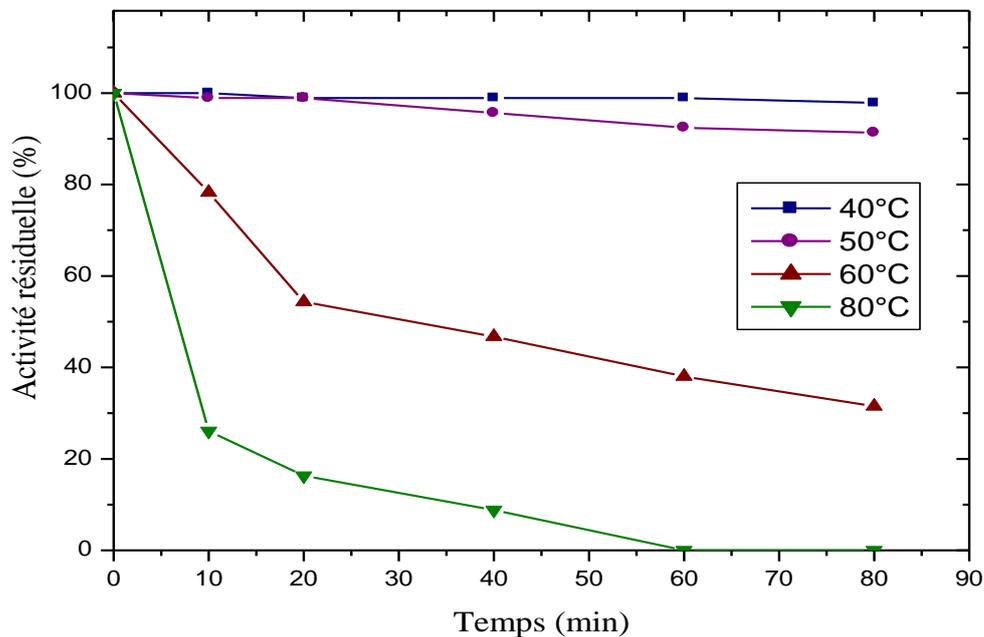
Proespraiwong et al. (2010) ont estimé l'optimum du pH à 5 pour des chitinases issues de crevettes tigrées et Patel et al. (2010) ont eux trouvé un pH optimum de 5.5 pour une chitinase d'origine végétale.

Il faut cependant noter que la nature du substrat joue un rôle dans la réaction d'hydrolyse et modifie significativement la valeur du pH optimum de la chitinase. En effet, l'utilisation d'une chitine colloïdale révèle un pH optimal de 4 pour une chitinase extraite de courbine alors que pour une glycol-chitine, l'activité chitinasique est maximale à pH 8 (Ikeda, 2009).

#### **4.6.4. Etude de la stabilité de l'extrait enzymatique**

Nous avons étudié la stabilité des extraits enzymatiques pour les paramètres relatifs à la température, au pH, et à la conservation à 4°C et à -18 °C. L'activité chitinasique résiduelle exprimée en pourcentage par rapport à l'activité maximale a été déterminée selon les conditions optimales de mesure.

- *Etude de la thermo-stabilité de la chitinase en fonction du temps*



**Fig. 4.12:** Activité chitinasique résiduelle en fonction de la température et du temps

La dénaturation des enzymes par la chaleur s'accompagne le plus souvent d'une perte d'activité qui est d'autant plus grande que la structure tertiaire de la protéine est complexe. L'étude de la dénaturation de l'enzyme a été effectuée en fonction du temps, pour différentes températures (40°C, 50°C, 60°C et 80°C). L'enzyme reste stable pendant 1 h à la température 40°C. Pour la même durée de temps mais à 60°C, elle perd 62% d'activité tandis qu'après un temps de 80 min à 50°C, elle perd 9 % de son activité (Voir figure 4.12).

Cependant à 80°C, on note une perte de 74% au bout de 10 min et après 1 h d'incubation il y a perte totale de l'activité de l'extrait enzymatique. Ceci serait dû à la chaleur qui entraînerait la dénaturation de l'enzyme.

Concernant la thermo-stabilité des enzymes, des résultats relativement proches ont été obtenus dans les mêmes conditions (incubation de 1 h à 40°C) par Ueda & Arai (1992), Nagai *et al.* (2002), Cheba *et al.* (2009), Ikeda *et al.* (2009) et plus récemment par Proespraiwong *et al.* (2010) qui ont tous noté une stabilité thermique des enzymes étudiées.

Les travaux de Liu *et al.*, (2010) ont montré que les chitinases de *Bacillus thuringiensis* sont stables à des températures allant de 20 à 60°C et perdent 55% de leurs activités chitinasiques initiales à 80°C après 1 h d'incubation alors qu'à la même température, la perte atteint 60% au bout de 10 min pour des chitinases produites par *Bacillus cereus* (Chang *et al.*, 2003).

Guo et al. (2008) ont constaté qu'à 55°C la chitinase de *Thermomyces lanuginosus* reste stable alors qu'à 65°C, l'activité diminue de moitié au bout de 25 min. Pour obtenir un même taux de perte d'activité de 50%, Nawani & Kapadnis (2001) ont dû incubé une chitinase de *Serratia marcescens* à 50°C pendant 24 h.

Kim et al. (2007) ont constaté que la chitinase de *Serratia sp.KCK* reste stable pendant 1h à 40°C. Pour la même durée, l'activité diminue de 40% à 50°C et de 50% à 80°C.

Songsiriritthigul et al. (2010) ont montré que les chitinases d'origine bactérienne restent stables après une incubation pendant 30 min à des températures allant de 10°C à 50°C. A cette dernière température, pour une durée d'incubation de 5 jours, il y a une perte d'activité de l'ordre de 30%, qui devient significative au-delà de ce temps.

A des valeurs plus élevées, pour une même durée d'incubation, leurs activités initiales diminuent de 20% à 60°C et sont presque totalement perdues à 70°C.

Pour une chitinase produite par *Bacillus licheniformis*, Waghmare & Ghosh (2010) ont noté, pour une durée d'incubation de 3h, une bonne stabilité de l'activité enzymatique jusqu'à 60°C alors qu'au-delà, l'activité chitinasique diminue, n'atteignant que 50% de l'activité initiale à 70°C. A 90°C, la chitinase est complètement inactivée.

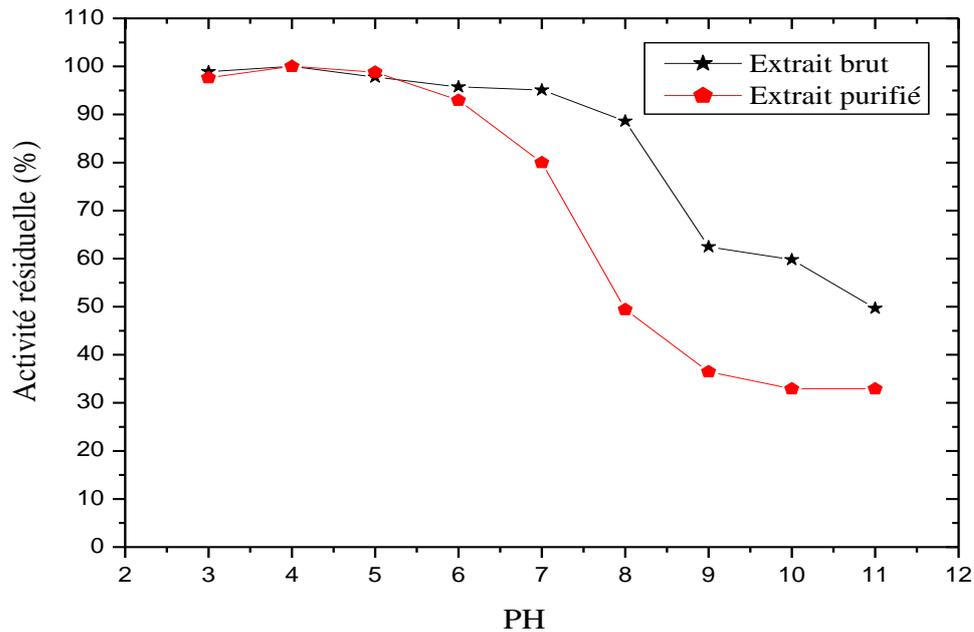
En revanche, Patel et al. (2010) ont constaté une remarquable stabilité thermique à 80°C pour une chitinase issue du latex de *Ipomoea carnea* incubée durant 1 h, tout comme Yuli et al. (2004) qui obtiennent les mêmes résultats dans les mêmes conditions pour une chitinase d'origine bactérienne (*Indonesian Bacillus sp.13.26*).

Cette caractéristique pourrait s'avérer d'une grande importance pour l'industrie de la biotechnologie car les enzymes thermostables pourraient remplacer les catalyseurs chimiques dans différents domaines de l'industrie pharmaceutique, chimique, textile, agroalimentaire, ces industries utilisant des températures hautes dépassant les 60°C (Scriban, 1999).

Généralement, la thermostabilité des enzymes s'explique par la présence de certaines liaisons dans leurs structures secondaires et tertiaires (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, interactions ioniques, et ponts disulfures) déterminées par des séquences particulières en acides aminés situés à des endroits stratégiques pour permettre aux enzymes de résister à la dénaturation thermique (Scriban, 1999).

- **Stabilité de la chitinase vis-à-vis du pH**

La stabilité des extraits enzymatiques en fonction du pH a été étudiée dans une gamme allant de 3 à 11. Selon les résultats rapportés dans la figure 4.13, les extraits enzymatiques sont restés stables après incubation pendant 16 h à + 4°C, conservant leur activité chitinasique initiale pour un intervalle de pH compris entre 3 et 6. A pH 9, on observe respectivement une baisse de l'activité chitinasique de 38% et 64% pour l'extrait enzymatique brut et celui purifié.



**Fig. 4.13:** Activité chitinasique résiduelle en fonction du pH

L'étude de la stabilité en fonction du pH montre que l'enzyme demeure plus stable aux pH acides alors qu'elle subit une dénaturation irréversible aux pH basiques.

Dans une étude similaire portant sur la chitinase de *Bacillus thuringiensis* (Liu et al., 2010), il a été signalé une stabilité de l'enzyme dans l'intervalle de pH 4 à 6 pour une incubation de 1 h à 4°C. En dehors des limites de cette gamme de pH, l'activité diminue rapidement.

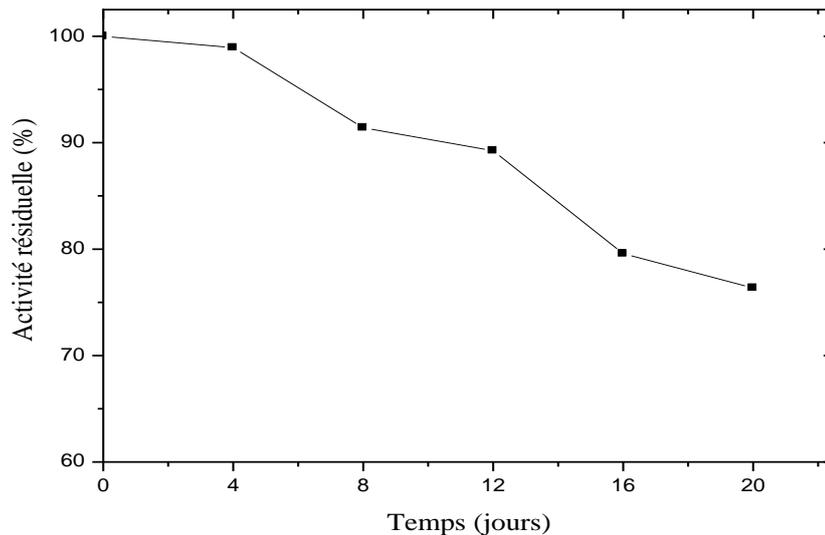
Dans des intervalles de pH plus larges, de nombreux auteurs ont noté une bonne stabilité de l'activité chitinasique, soit (5 - 8) pour Kono et al. (1990) ; (6 - 9) pour Chang et al. (2003) (4 - 8) pour Kim et al. (2003) ; (5 - 10) pour Ueda et al. (2005) ; (5 - 10) pour Kim et al. (2007) ; (5 - 8) pour Zhu et al. (2007) et pour Molinari et al. (2007) ; (4.0 - 9.5) pour Patel et al. (2010).

Cependant, pour des chitinases bactériennes, la stabilité a été constatée sur un intervalle plus large de pH : (3 - 10) pour Nawani & Kapadnis (2001) et (4 - 10) pour Songsiriritthigul et al. (2010).

- **Stabilité de la chitinase au cours de sa conservation à + 4°C et -18 °C**

Cette étude a été réalisée en conservant des extraits enzymatiques partiellement purifiés à la température de + 4 °C pendant 20 jours et de -18 °C pendant 2 mois.

Périodiquement, l'activité chitinasique résiduelle a été déterminée, selon les conditions optimales de mesure (pH = 4 et T =



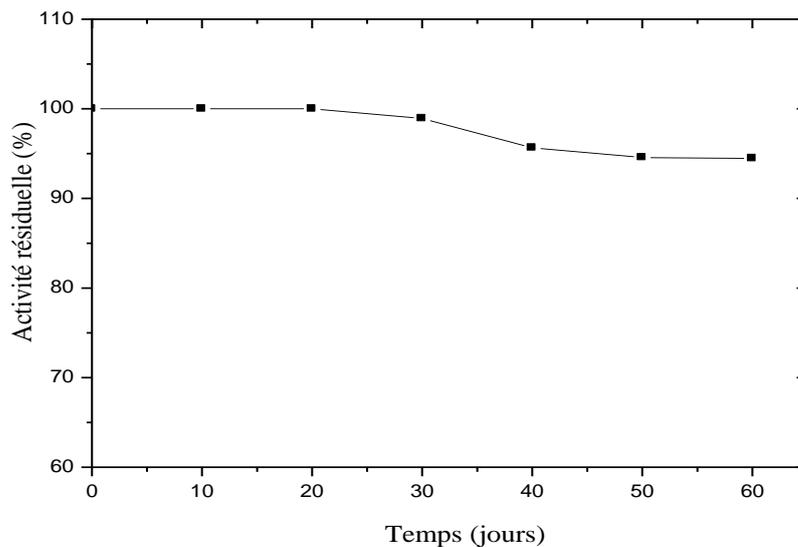
50°C).

**Fig.4.14:** Activité chitinasique résiduelle au cours de la conservation à 4°C

D'après les résultats mentionnés dans la figure 4.14, on constate que l'activité chitinasique de l'extrait enzymatique purifié stocké à 4 °C baisse progressivement au cours du temps.

Lors de cette conservation à 4 °C, au bout de 8 jours nous avons noté une perte de l'activité chitinasique de l'extrait purifié qui atteint 9% de l'activité chitinasique initiale. Après 20 jours, on remarque que l'enzyme perd jusqu'à 24% de son activité initiale. Ainsi, malgré les pertes enregistrées, l'enzyme conserve tout de même 76% de son activité chitinasique initiale.

La figure 4.15 montre l'évolution de l'activité chitinasique de l'extrait enzymatique partiellement purifié, au cours de la conservation à -18 °C. Les résultats illustrés indiquent que la congélation n'a pas altéré l'activité chitinasique sur une durée de 20 jours. Au-delà, on note une faible diminution de l'activité chitinasique (6%). L'enzyme a cependant maintenu jusqu'à 94% de son activité sur une période de 2 mois lors de sa conservation à -18 °C.



**Fig.4.15:** Activité chitinasique résiduelle au cours de la conservation à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$

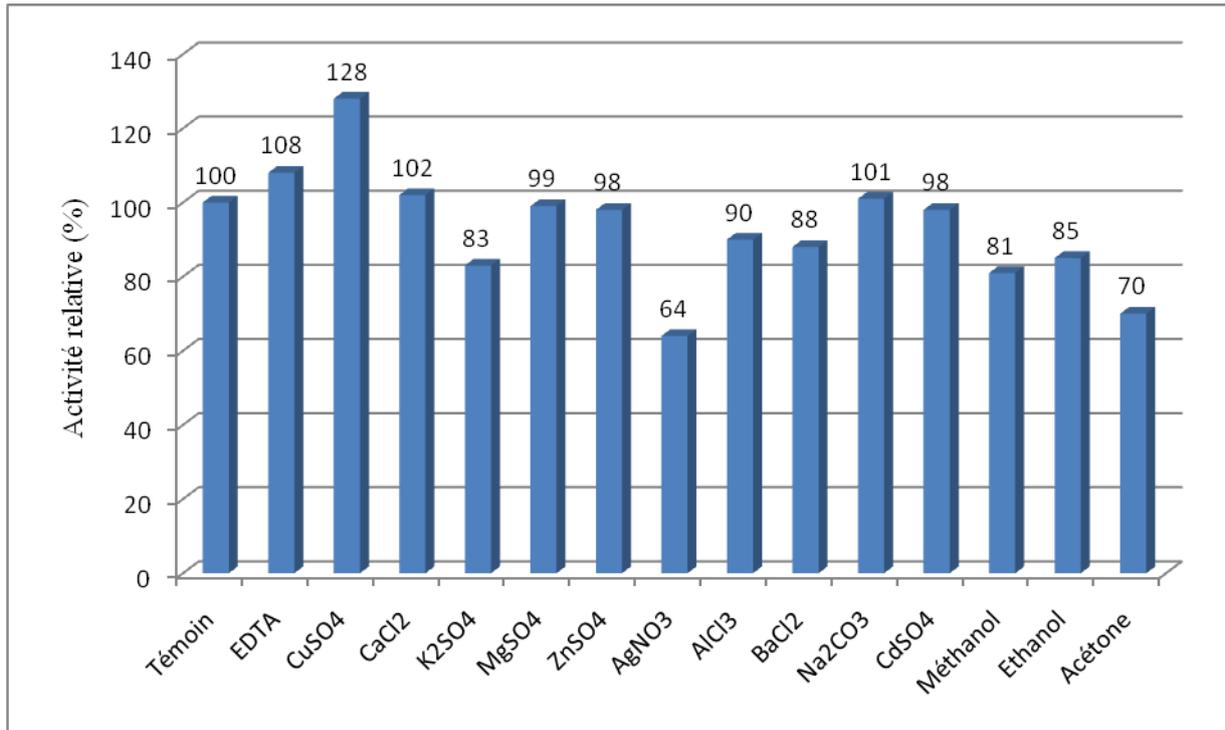
D'autres auteurs ont observé un effet comparable de la baisse de l'activité enzymatique au cours de la conservation. En effet il a été rapporté que la conservation de l'activité coagulante de l'extrait clarifié (pepsine de poulet) est meilleure à l'état congelé qu'à l'état réfrigéré. L'extrait congelé a conservé 72.3% de son activité initiale, après 30 jours contre seulement 4.3% pour l'extrait réfrigéré (Adoui, 2007).

En général, les enzymes conservées à  $4^{\circ}\text{C}$  gardent une activité résiduelle qui dépend de l'origine et de la pureté des extraits utilisés. Elles se conservent encore mieux et sur une plus grande durée à des températures négatives ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.6.4. Etude de certains effecteurs

Les effecteurs sont des composés chimiques qui modifient plus ou moins les réactions enzymatiques. Ils peuvent jouer un rôle important dans la régulation des métabolismes et permettre d'acquérir d'importantes informations sur la structure et le mode d'action des enzymes (Richard, 1984).

L'étude de l'effet des ions métalliques sur l'activité chitinasique a été faite par pré-incubation pendant 1 h des extraits enzymatiques à la concentration de 1 mM pour chacun des effecteurs ( $\text{CuSO}_4$  ;  $\text{CaCl}_2$  ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ;  $\text{MgSO}_4$  ;  $\text{ZnSO}_4$  ;  $\text{AgNO}_3$  ;  $\text{AlCl}_3$  ;  $\text{BaCl}_2$  ;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ;  $\text{CdSO}_4$ ). L'activité résiduelle en présence des différents ions a été exprimée en pourcentage de l'activité en l'absence d'ions (Voir figure 4.16).



**Fig. 4.16:** Influence de certains effecteurs sur l'activité de la chitinase

Nous avons observé que l'activité chitinasique de l'enzyme était plus importante en présence des ions  $\text{Cu}^{2+}$ , avec 28% d'activation par rapport au contrôle sans ion. Cependant, l'activité n'est pas fortement modifiée lorsque le milieu réactionnel contient les cations  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Par contre, les autres cations tels que ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , et  $\text{Ag}^+$ ) exercent un effet inhibiteur avec une perte d'activité chitinasique respective de 10%, 12%, 17% et 36%.

L'inhibition de l'activité enzymatique est partielle avec d'autres effecteurs tels que l'éthanol, le méthanol, et l'acétone. Ceux-ci induisent une perte d'activité respective de 15%, 19% et 30%. En outre, l'EDTA à 1mM présente un léger effet, induisant une activation de l'enzyme de l'ordre de 8%.

L'influence des ions métalliques a donc révélé un important effet activateur de l'ion  $\text{Cu}^{2+}$ , qui pourrait être un cofacteur essentiel pour les chitinases extraites de rascasse.

Les travaux de Liu et *al.* (2010) ont montré que les chitinases de *Bacillus thuringiensis* sont inhibées par  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Ag}^+$ , avec une perte d'activité respective de 64% et 57%, tandis qu'elles sont stimulées par  $\text{Cu}^{2+}$  avec une activité relative de 115% en comparaison avec le témoin.

D'autres auteurs ont rapporté que des chitinases marines de *Bacillus sp. R2* sont inactivées à environ 30% par l'éthanol, l'acétone et l'isopropanol (Cheba et *al.*, 2009). Au contraire, elles sont activées par  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  à des concentrations de 10 mM.

Les résultats de Dahiya *et al.* (2005), ont montré que les chitinases de *Enterobacter sp. NRG4* sont inhibées par  $\text{Cu}^{2+}$ , EDTA,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  et  $\text{Hg}^{2+}$ , avec une perte d'activité respective de 9.7%, 11%, 15%, 22% et 72.2%, tandis qu'elles sont stimulées par  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  qui induisent une activation de l'enzyme de l'ordre de 13%, 16% et 18%, respectivement.

La chitinase de *Alcaligenes xylosoxydans* a été inhibée par  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Na}^{2+}$  à 5 mM avec une perte d'activité de 25%, mais ne l'a pas été avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  (Vaidya *et al.*, 2003). Par ailleurs, avec l'ion  $\text{Ag}^+$  à 1mM, Kim *et al.* (2003) ont noté une perte d'activité chitinasique de 65% tandis que Molinari *et al.* (2007) arrive à un taux de 100%.

Pour des chitinases produites par *Pseudomonas eruginosa* K-187, et mises en contact avec une série d'ions à la concentration 1 mM, Wang & Chang (1997) ont noté une importante activation de l'ordre de 150% avec  $\text{Cu}^{2+}$  et des inhibitions significatives avec  $\text{Mg}^{2+}$  (64%) et  $\text{Zn}^{2+}$  (78%). Dans la même étude, l'inhibition a été aussi constatée avec une concentration de 50% en méthanol (45%), en éthanol (68%) et en acétone (36%) respectivement.

Dans les travaux de Han *et al.* (2009), lors de l'addition à la concentration 5 mM de cations ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , et  $\text{Mg}^{2+}$ ), l'activité chitinasique a été augmentée respectivement de (137%, 113% et 114%) respectivement, tandis qu'avec ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Ba}^{2+}$ ), l'activité a été inhibée respectivement de (24% et 60%).

Les résultats de Park *et al.* (2000), ont montré que les chitinases marines de *Vibrio sp* sont inhibées par  $\text{Cu}^{2+}$  à (1 mM) avec une perte de 7% en activité, alors qu'elles sont stimulées par l'EDTA à (5 mM) avec une augmentation de 6% de l'activité chitinasique.

En présence de  $\text{BaCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$ , Souza *et al.* (2008) ont noté une augmentation de l'activité chitinasique à 140% et 117% respectivement.

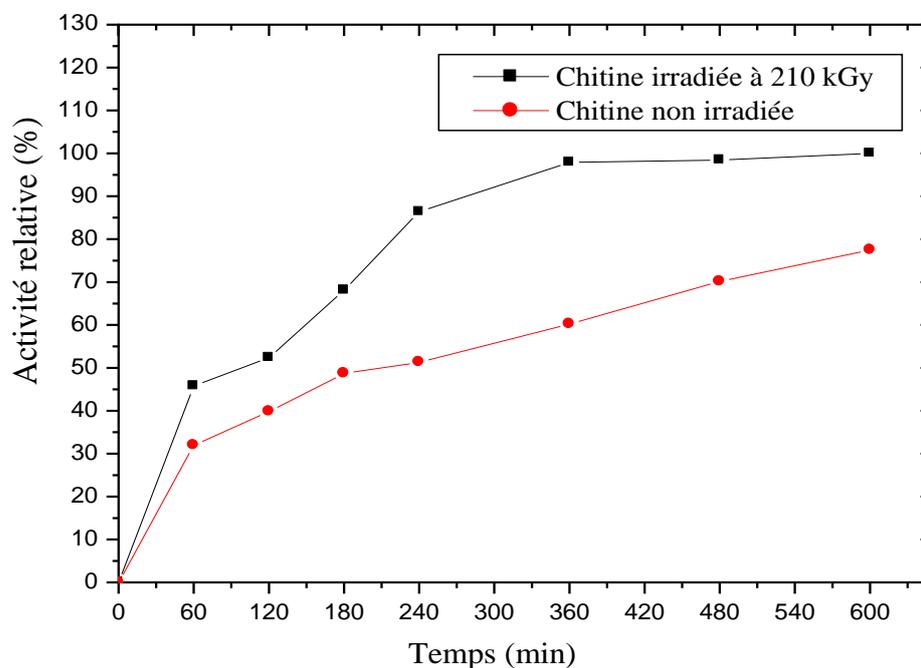
Nawani *et al.* (2002) observent une augmentation de l'activité chitinasique relative à 110% pour l'EDTA à 1 mM, et une perte de 14% en présence d' $\text{Ag}^+$ .

Pour les ions métalliques, ( $\text{Ag}^+$  et  $\text{Hg}^{2+}$ , à 0.25 mM), et ( $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ , à 0.5 mM), Chen *et al.* (2011) notent l'inhibition significative de l'activité de la  $\beta$ -N-acetylhexosaminadase, alors que d'autres ions métalliques ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) ainsi que l'EDTA n'exercent pas d'effet significatif sur l'activité de l'enzyme.

#### 4.6.5. Influence de la nature du substrat sur l'activité enzymatique

Chacun des types de substrat (chitine irradiée à 210 kGy et chitine non irradiée) a été réparti en aliquots qui ont été mis à incuber avec l'extrait enzymatique partiellement purifiée pendant des temps variables, la durée maximale étant de 10 h. A chaque intervalle de temps fixé, des analyses de l'activité chitinasique ont été effectuées, toujours en respectant les conditions optimales de mesure.

L'effet de la durée d'incubation sur l'activité enzymatique a été étudié sur les deux types de substrat et les résultats obtenus ont été rapportés sur la figure 4.17.



**Fig. 4.17:** Influence la nature du substrat sur l'activité de la chitinase

Nous remarquons que la chitine non irradiée a été dégradée plus lentement que la chitine irradiée à 210 kGy. Pour cette dernière, la production de NAG a atteint un palier au bout de 6h d'incubation, tandis qu'elle a continué pour le substrat non irradié. Pour la chitine irradiée, l'activité enzymatique relative a atteint un taux de 52.35% après une durée d'incubation de 120 min, tandis que pour la chitine non irradiée, un taux d'hydrolyse voisin de 51.30% n'a été atteint qu'après un temps d'incubation de 240 min, soit le double.

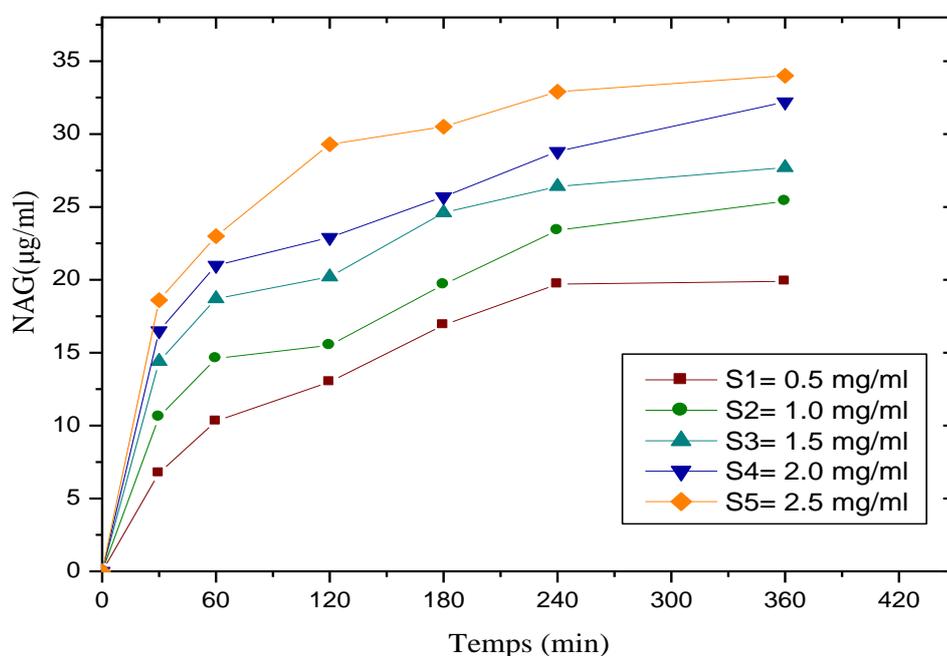
La vitesse de production des NAG est maximale durant la première heure d'incubation, que la chitine soit irradiée ou non et le taux d'activité relative obtenu pour la chitine témoin est inférieur d'environ 30% à celui de la chitine irradiée.

L'activité chitinasique est plus élevée pour la chitine irradiée car celle-ci a été partiellement dégradée par le prétraitement subi (irradiation  $\gamma$ ), ce qui a rendu plus facile le contact de l'enzyme avec le substrat. Cela peut s'expliquer par la réduction du poids moléculaire de la chitine qui est de 11271 Da dans les échantillons irradiés et de 106659 Da dans les échantillons non irradiés. La comparaison des valeurs mesurées montre que la chitine irradiée est mieux dépolymérisée que la chitine témoin, ce qui suppose une plus grande affinité de la chitinase pour le substrat irradié dont la chaîne polymérique a été réduite par le prétraitement.

Nos résultats sont en accord avec ceux cités pour divers prétraitements par plusieurs auteurs, Roy *et al.* (2003) avec les micro-ondes, Dzung *et al.* (2007) et Yang *et al.* (2008) avec les R.γ, Shin & Sung (2008) ainsi que Bak *et al.* (2009) avec des faisceaux d'électrons. Tous ont noté une plus grande efficacité des enzymes sur les polysaccharides prétraités aux radiations.

#### 4.6.6. Activité enzymatique à différentes concentrations du substrat

L'activité de l'enzyme a été testée sur des concentrations variables de chitine irradiée. La figure 4.18 montre l'évolution de la production de NAG en fonction du temps. L'allure générale des courbes obtenues est la même pour les différentes concentrations de substrats.



**Fig. 4.18:** Activité chitinasique en fonction de la concentration en chitine

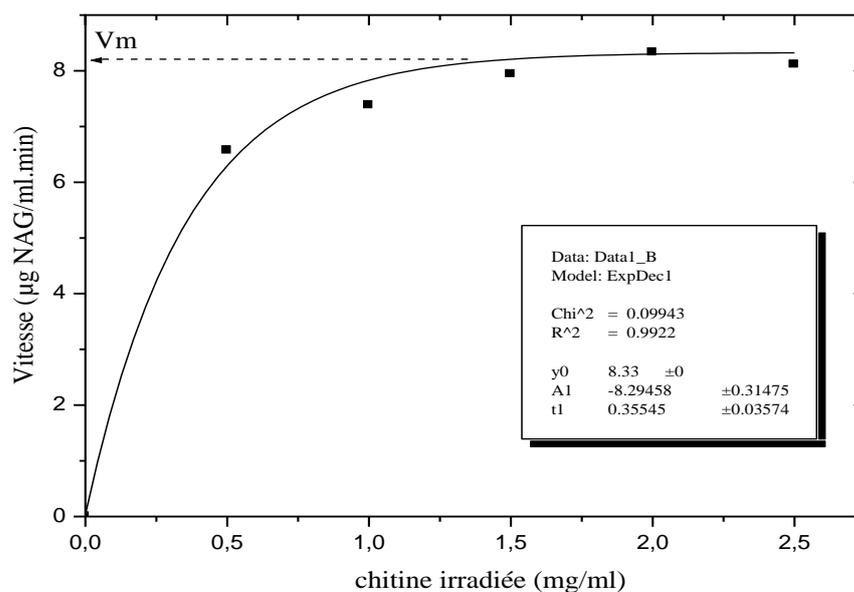
Nous avons constaté que pour des valeurs de substrats = 0.5 mg/ml, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat jusqu'à un temps d'incubation de 4h ; au-delà, il apparaît que le taux de production de NAG est indépendant de la concentration du substrat et qu'il tend vers une valeur constante.

Nous remarquons que les concentrations de NAG augmentent en fonction du temps jusqu'à atteindre un taux maximum d'hydrolyse pour toutes les concentrations de substrats étudiées.

#### 4.6.7. Influence de la concentration du substrat sur la vitesse initiale

La cinétique enzymatique est l'étude des variations des vitesses de la réaction en fonction de la concentration en substrat.

La figure 4.19 représente l'évolution des vitesses initiales des réactions d'hydrolyse en fonction de la concentration de chitine irradiée à 210 kGy. Cette figure fait apparaître une courbe hyperbolique indiquant que la cinétique est de type michaélienne.



**Fig. 4.19:** Influence de la concentration du substrat sur la vitesse initiale

Nous avons constaté aussi que pour des valeurs de substrats inférieures à 2 mg/ml, la vitesse initiale croît progressivement et atteint une valeur maximale. Alors qu'une concentration plus élevée de chitine irradiée (supérieure à 2 mg/ml) induit une légère diminution de la vitesse initiale, ce qui pourrait s'expliquer par un excès de substrat dans le mélange réactionnel.

L'asymptote horizontale de l'hyperbole pour les grandes valeurs de [S] permet d'avoir la valeur de  $V_{\max}$ .

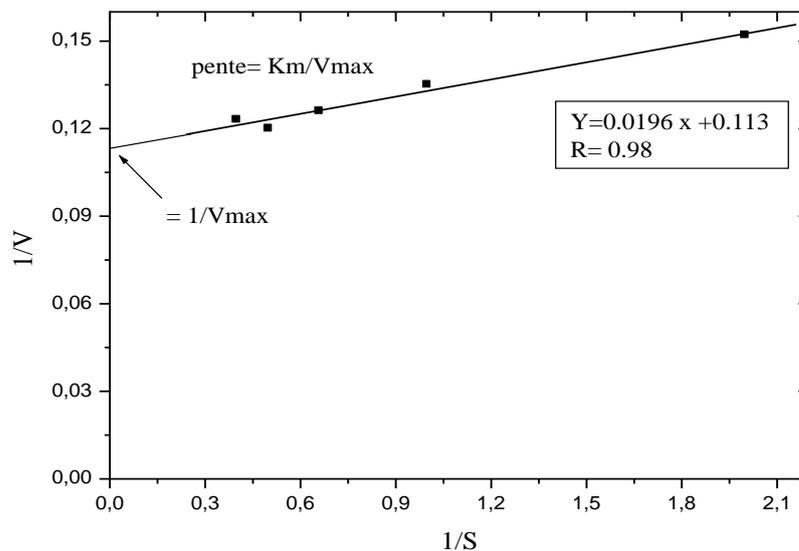
La chitinase extraite d'abats de rascasse semble adopter un comportement michaélien jusqu'à une concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale est maximale. Pour confirmer ce résultat, nous avons fait appel à la représentation de Lineweaver et Burk et d'Eadie-Hofstee.

#### 4.6.8. Détermination des constantes cinétiques

La détermination expérimentale de  $K_m$  et  $V_{\max}$  a été réalisée par deux méthodes qui sont celle de la représentation de Lineweaver et Burk et celle d'Eadie-Hofstee.

- **Représentation de Lineweaver et Burk**

Les paramètres cinétiques sont obtenus selon la méthode des doubles inverses (Lineweaver-Burk) représentant  $1/V = f(1/S)$ . Cette représentation permet l'obtention d'une droite dont l'équation est de forme  $Y = ax + b$  avec  $K_m = a/b$  et  $V_{\max} = 1/b$  (Voir figure 4.20).



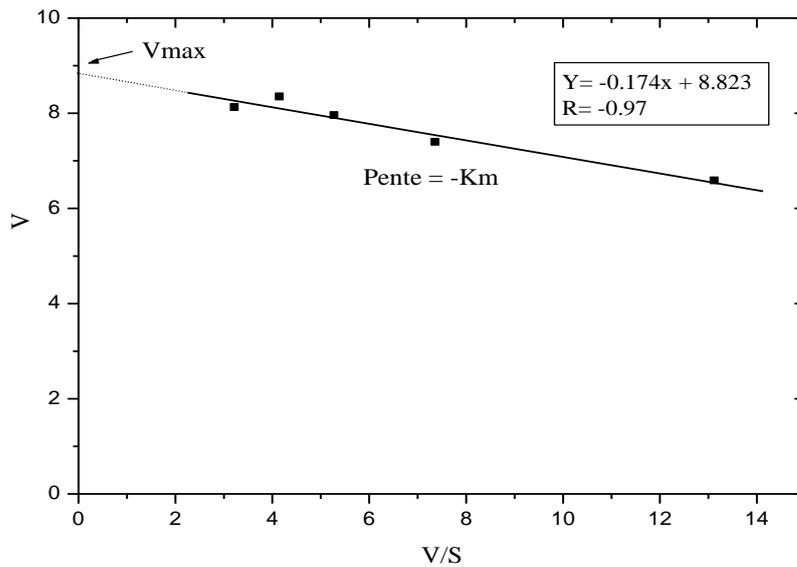
**Fig. 4.20:** Représentation graphique de Lineweaver-Burk

La représentation selon Lineweaver et Burk a permis de calculer la constante cinétique de Michaelis  $K_m = 0,173$  mg/ml et la vitesse maximale  $V_{\max} = 8,849$   $\mu\text{g}/\text{min}\cdot\text{mg}$  de protéine.

La constante de Michaelis reflète l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus  $K_m$  est grand, moins bonne est l'affinité.

- **Représentation Eadie-Hofstee**

Les paramètres cinétiques sont obtenus selon la méthode *Eadie-Hofstee* représentant  $V$  en fonction de  $V/S$ . Cette représentation permet d'obtenir une droite dont l'équation est de forme  $Y = -ax + b$  avec  $a = -K_m$  et  $V_{\max} = b$ . (Voir figure 4.21).



**Fig.4.21:** Représentation graphique selon Eadie-Hofstee

A partir de la représentation d'Eadie-Hofstee, nous avons calculé la constante cinétique de Michaelis ( $K_m = 0.174$  mg/ml) et la vitesse maximale  $V_{max} = 8.823$   $\mu\text{g}/\text{min} \cdot \text{mg}$  de protéine.

Concernant la constante de Michaelis, des résultats relativement proches ont été obtenus par Ikeda et al. (2009) qui ont évalué le  $K_m$  à 0.189 mg/ml pour l'hydrolyse d'un substrat (NAG)<sub>4</sub> par une chitinase de courbine, alors que la valeur de ce paramètre augmente à 0.521 mg/ml quand on utilise un substrat plus complexe (glycol chitine) ; ceci indique une meilleure affinité de la chitinase pour un substrat de courte chaîne polymérique (DP faible). D'autre part, des travaux sur la cinétique enzymatique ont rapporté des valeurs contrastées de  $K_m$  et  $V_{max}$ , en fonction du substrat à hydrolyser et de l'origine de l'enzyme utilisée. Ainsi, Rodriguez et al. (1995) ont obtenu un  $K_m$  de 2.5 mg/ml suite à l'hydrolyse d'une chitine colloïdale par une chitinase produite par *Penicillium oxalicurn*.

Les travaux de Vaidya et al. (2003) sont arrivés à une valeur de  $K_m$  de 3 mg/ml lorsqu'ils ont utilisé une chitinase produite par *Alcaligenes xylosoxydans* sur un substrat d'hydrolyse formé de chitine gonflée.

Dahiya et al. (2005) ont rapporté pour une chitinase produite par *Enterobacter sp. NRG4*, différents  $K_m$  et  $V_{max}$  en fonction de la nature du substrat. Ces valeurs sont respectivement de 1.43 mg/ml et 83.33  $\mu\text{M}/\text{h} \cdot \mu\text{g}$  pour une chitine gonflée, 1.41 mg/ml et 74.07  $\mu\text{M}/\text{h} \cdot \mu\text{g}$  pour une chitine colloïdale, 1.8 mg/ml et 40  $\mu\text{M}/\text{h} \cdot \mu\text{g}$  pour une chitine régénérée, 2.0 mg/ml

et  $33.33 \mu\text{M}/\text{h}.\mu\text{g}$  pour une chitine glycol. De ces résultats, il a été conclu que la plus grande affinité est obtenue pour la chitine colloïdale, pour laquelle l'enzyme présente un faible  $K_m$ . Sur un substrat identique et avec deux endochitinases de même origine bactérienne, Adrangi et al. (2010) ont abouti à des valeurs relativement différentes pour Chi-56 ( $K_m = 1.1 \text{ mg/ml}$  et  $V_{\max} = 0.59 \mu\text{M}/\text{h}.\mu\text{g}$ ) et pour Chi-64 ( $K_m = 1.3 \text{ mg/ml}$  et  $V_{\max} = 1.36 \mu\text{M}/\text{h}.\mu\text{g}$ ).

Pour des chitinases marines, Han et al. (2009) ont obtenus, toujours sur une chitine colloïdale, un  $K_m$  de  $0.019 \text{ mg/ml}$  et une  $V_{\max}$  de  $0.82 \text{ mg/min. mg de protéine}$ , alors que sur une chitine en poudre, ils ont trouvé un  $K_m$  de  $0.078 \text{ mg/ml}$  et une  $V_{\max}$  de  $0.45 \text{ mg/min. mg de protéine}$ ; ceci montre bien qu'il y a une meilleure affinité de ces chitinases pour la chitine colloïdale.

Dans leurs travaux sur une chitinase végétale agissant sur un substrat de chitine, Baek et al. (2001) ont obtenus un  $K_m$  de  $1.36 \text{ mg/ml}$  et une  $V_{\max}$  de  $13.51 \text{ mg/h.mg de protéine}$ .

A l'aide d'une chitinase de *Serratia sp.KCK* utilisée pour hydrolyser une chitine colloïdale, Kim et al. (2007) ont rapporté un  $K_m$  de  $12.62 \text{ mg/ml}$  et une  $V_{\max}$  de  $0.302 \mu\text{mol}/\text{h.mg}$ . Cette valeur élevée du  $K_m$  indique une faible affinité de cette chitinase pour le substrat utilisé.

Waghmare & Ghosh (2010) ont trouvé un  $K_m$  de  $5.6 \text{ mg/ml}$  et un  $V_{\max}$  de  $10.2 \text{ mM/min.mg de protéine}$  lors de l'hydrolyse d'une chitine colloïdale par une chitinase bactérienne.

En comparant les résultats des auteurs cités plus haut avec les nôtres, nous avons noté que la chitinase que nous avons extraite des abats de rascasse présente une bonne affinité vis-à-vis de notre chitine irradiée. En conclusion, il semble que les paramètres de la cinétique enzymatique soient étroitement liés au type d'enzyme utilisée ainsi qu'à la nature et à l'origine du substrat à hydrolyser.

## 5. CONCLUSION

Le thème de notre étude a porté sur la valorisation des déchets halieutiques marins. Le but était d'arriver à extraire une chitinase à partir d'abats de poissons carnassiers (rascasses) et d'optimiser le procédé de dégradation de la chitine. Pour ce faire, nous avons utilisé les rayons  $\gamma$  comme prétraitement afin d'améliorer le rendement de dégradation de la chitine. Ce radio-traitement du substrat d'hydrolyse a permis d'une part, d'augmenter le taux production de N-Acetyl-Glucosamine, et d'autre part d'éviter l'utilisation de réactifs chimiques qui sont le plus souvent utilisés comme prétraitement dans les techniques conventionnelles. Ces dernières sont très polluantes et consomment beaucoup d'énergie.

Le présent travail a consisté en l'extraction, la purification et la caractérisation d'une chitinase en vue de son utilisation pour l'hydrolyse de la chitine préalablement irradiée par les rayonnements  $\gamma$ . La caractérisation de la chitine par spectroscopie FTIR et par viscosimétrie a permis la détermination de son poids moléculaire qui est de 106.659 kDa et de son degré d'acétylation (DA) qui est de 83 %.

Après avoir extrait la chitinase dans une première étape, nous avons testé sa capacité à dégrader la matière chitineuse issue des carapaces de crustacés. La chitinase permet la production de chitino-oligomères et de chitino-monomères grâce à sa propriété d'hydrolyser les ponts glucosidiques reliant les carbones  $\beta$  1-4 de 2 groupements N-Acetyl-Glucosamine.

Dans le but d'améliorer le taux d'hydrolyse enzymatique, un prétraitement de la chitine a été effectué afin d'obtenir des polymères de faible poids moléculaire. A cet effet, les échantillons ont été soumis à l'action des rayons gamma, à différentes doses allant de 15 kGy à 210 kGy. L'irradiation à la dose de 210 kGy et au débit de dose de 47 Gy/min a entraîné une réduction du poids moléculaire de la chitine allant jusqu'à 90 %, atteignant ainsi un PM de 11.271 kDa. L'irradiation a conduit à une meilleure accessibilité de la matière chitineuse à l'enzyme et son couplage à l'action enzymatique nous a donc permis d'augmenter le taux de production des oligomères et des monomères obtenus à partir de la chitine.

La seconde partie a été consacrée aux essais de purification de l'extrait enzymatique brut. La purification partielle de la chitinase a été effectuée par précipitation au sulfate d'ammonium (20%-90%), suivie d'un fractionnement par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Séphadex G100 et enfin par ultrafiltration. Ces techniques de purification ont permis d'arriver à une activité spécifique d'environ 567 U/mg, avec un facteur de purification de 8.34. La masse moléculaire de la chitinase a été estimée à 21 kDa.

Dans la troisième partie, nous nous sommes consacrés à l'étude des paramètres physico-chimiques en vue de la caractérisation de l'extrait enzymatique partiellement purifié. Nos résultats montrent que l'activité chitinolytique est maximale à pH 4 et à une température de 50°C. Par ailleurs, notre enzyme a maintenu son activité sur une gamme de pH allant de 3 à 6. Pour un temps d'incubation de 1 h, l'enzyme est restée stable pour une température inférieure à 50°C. Au-delà, elle a perdu près de 62% de son activité à 60°C, et la totalité à 80°C. L'activité de la chitinase a été stimulée par le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) et fortement inhibée par le nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>).

L'étude de la cinétique enzymatique a permis de constater que la réaction d'hydrolyse de la chitinase obéit à une cinétique michaelienne. La représentation selon Lineweaver et Burk a permis de calculer la constante cinétique de Michaelis  $K_m = 0.173$  mg/ml et la vitesse maximale  $V_{max} = 8.849$  µg/ml.min

A ce stade de l'étude, les résultats ont mis en évidence la possibilité d'obtenir une chitinase à partir des abats de rascasses. Celle-ci présente un grand potentiel pour de nombreuses applications, en particulier dans le traitement des « déchets halieutiques ».

Pour la continuation de ce travail, il serait intéressant de pouvoir introduire d'autres techniques de purification dans le but d'augmenter le degré de pureté de l'enzyme et ainsi, améliorer ses performances chitinolytiques. Il apparaît également souhaitable de faire appel à un procédé membranaire couplé à un réacteur avec des enzymes immobilisées. Un tel dispositif devrait permettre d'optimiser la production, le triage et la séparation des NAG et des COS afin de pouvoir les récupérer sélectivement. Ceci pourrait conduire à des retombées économiques pour tous les secteurs utilisateurs, sans compter la sauvegarde de l'environnement.

## Liste des abréviations

AC : Anhydrase Carbonique

B.S.A : Bovine Sérum Albumin

COS : Chito-Oligo-Saccharides

DA: Degré d'Acétylation

DD: Degré de Déacétylation

DMAB : P-diméthylaminobenzaldéhyde

### **DO: Densité Optique**

DP : Degré de Polymérisation

E.C : Enzyme Commission.

EDTA: Ethylénediaminetétraacétique

ENC: Enzyme Nomenclature Committee

FAO: Food and Agriculture Organization.

FP : Facteur de Purification

FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

G<sub>d</sub> : Rendement Radiochimique

GH: Glycosides Hydrolases

Gy: Gray

IUBMB : Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire

kDa : kilo Daltons

K<sub>m</sub> : Constante de Michaelis

NAG : N-Acétyl-Glucosamine

PM: Poids Moléculaire.

RB : Réactif de Bradford

TI: Trypsin Inhibiteur

TRIS: Tris hydroxyméthylaminoéthane.

U : Unité enzymatique

UF : Ultrafiltration

V : Vitesse

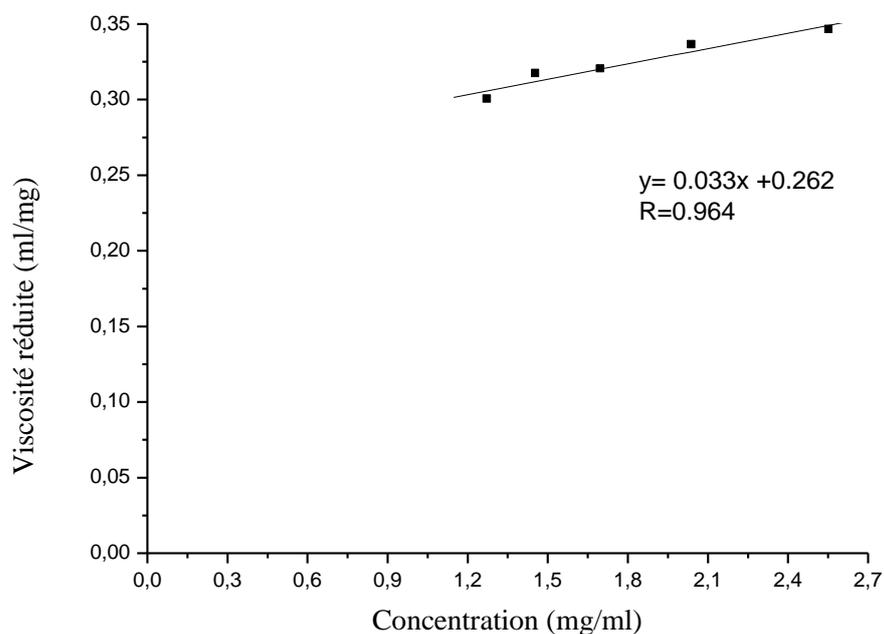
V<sub>max</sub>: Vitesse maximale

V<sub>0</sub>: Volume mort

V<sub>e</sub> : Volume d'éluion

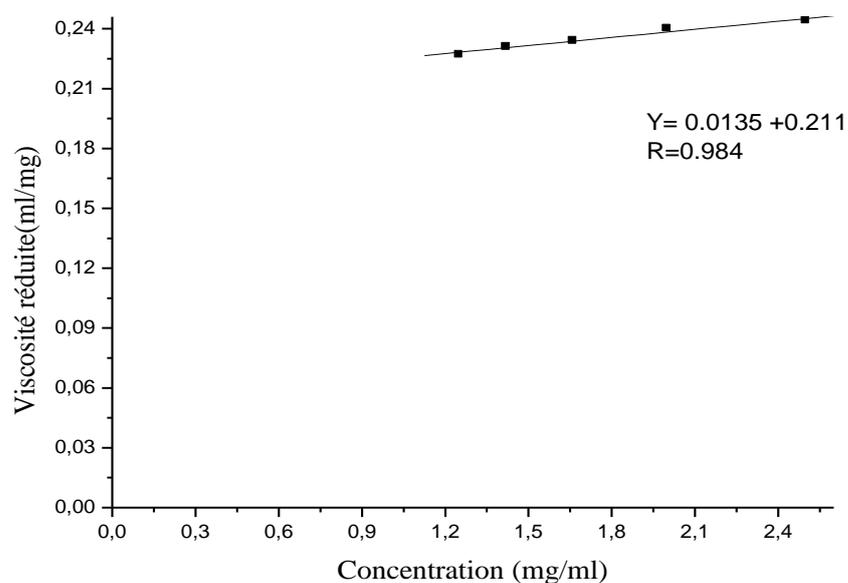
**ANNEXE 1****Tableau 1** : Viscosité relative et viscosité réduite de la chitine témoin en fonction de la concentration

Concentration (mg/ml)	Temps moyen (s)	Viscosité relative	Viscosité réduite (ml/mg)
Solvant	390	-	-
1.275	539.66	0.383	0.30
1.457	570.5	0.462	0.317
1.70	602.66	0.545	0.32
2.04	657.66	0.686	0.336
2.556	735.33	0.885	0.346

**Figure 1** : Détermination de la viscosité intrinsèque de la chitine témoin par extrapolation de la viscosité réduite en fonction de la concentration

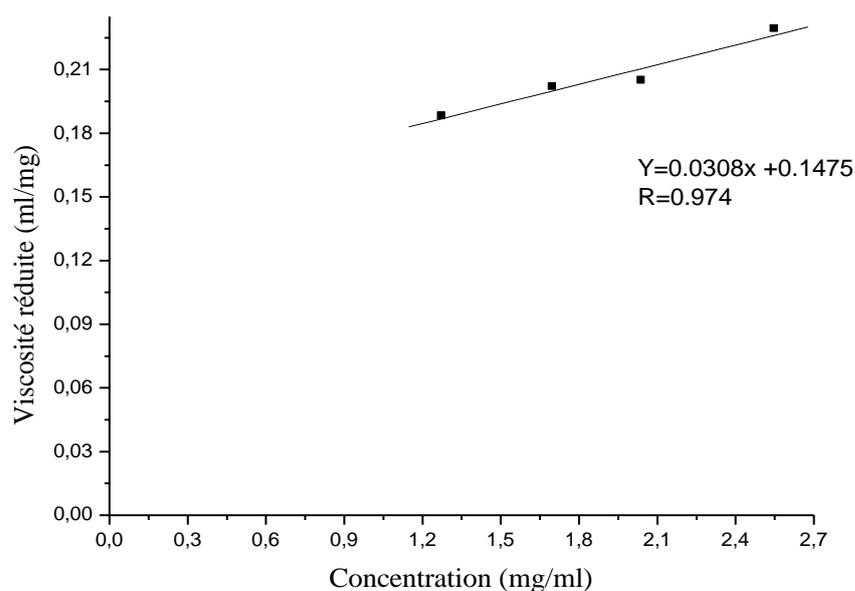
**ANNEXE 1****Tableau 2** : Viscosité relative et viscosité réduite de la chitine irradiée à une dose de 15 kGy en fonction de la concentration

Concentration (mg/ml)	Temps moyen (s)	Viscosité relative	Viscosité réduite (ml/mg)
solvant	390	-	-
1.25	500.66	0.283	0.227
1.428	519	0.330	0.231
1.66	542	0.389	0.234
2.0	577.5	0.480	0.240
2.5	628	0.610	0.244

**Figure 2** : Détermination de la viscosité intrinsèque de la chitine irradiée à 15 kGy par extrapolation de la viscosité réduite en fonction de la concentration

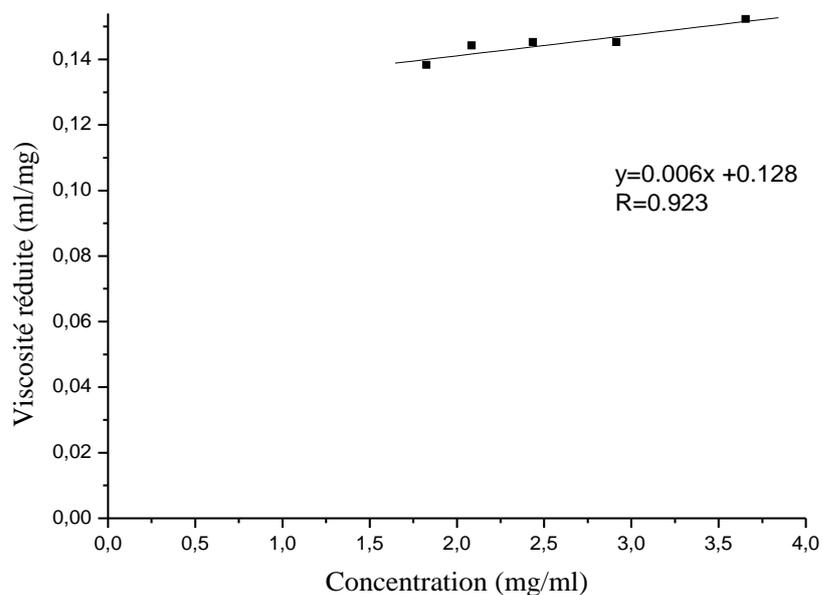
**ANNEXE 1****Tableau 3** : Viscosité relative et viscosité réduite de la chitine irradiée à une dose de 30 kGy en fonction de la concentration

Concentration (mg/ml)	Temps moyen (s)	Viscosité relative	Viscosité réduite (ml/mg)
solvant	380.5	-	-
1.275	472	0.240	0.188
1.70	511	0.342	0.2017
2.04	539.5	0.417	0.2048
2.55	603	0.584	0.229

**Figure 3** : Détermination de la viscosité intrinsèque de la chitine irradiée à 30 kGy par extrapolation de la viscosité réduite en fonction de la concentration

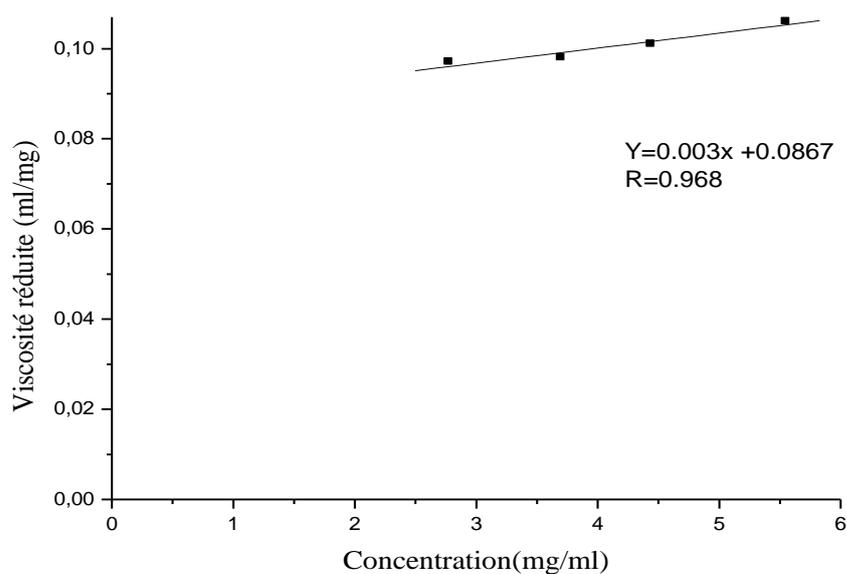
**ANNEXE 1****Tableau 4** : Viscosité relative et viscosité réduite de la chitine irradiée à une dose de 90 kGy en fonction de la concentration

Concentration (mg/ml)	Temps moyen (s)	Viscosité relative	Viscosité réduite (ml/mg)
solvant	390	-	-
1.83	489	0.253	0.138
2.09	508	0.302	0.144
2.44	528.5	0.355	0.145
2.928	555.5	0.424	0.145
3.66	608.33	0.559	0.152

**Figure 4** : Détermination de la viscosité intrinsèque de la chitine irradiée à 90 kGy par extrapolation de la viscosité réduite en fonction de la concentration

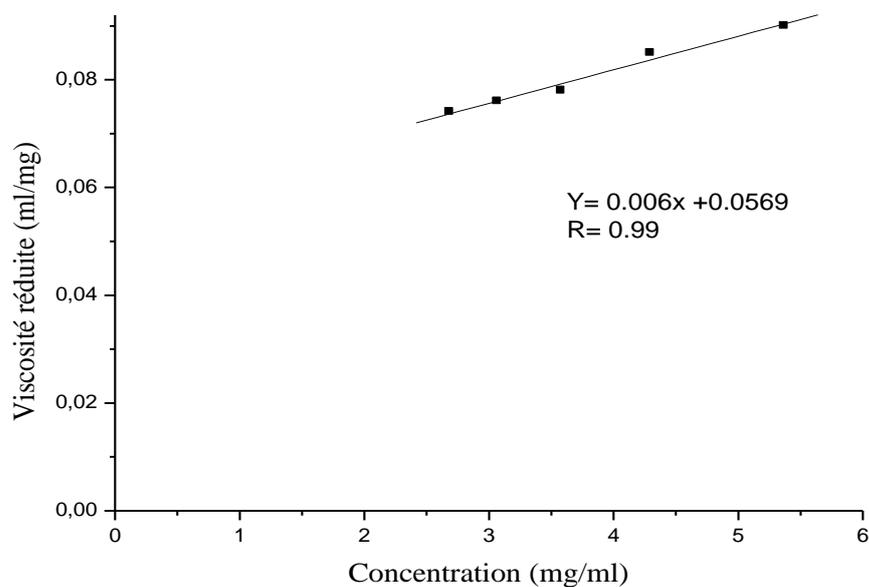
**ANNEXE 1****Tableau 5** : Viscosité relative et viscosité réduite de la chitine irradiée à une dose de 150 kGy en fonction de la concentration

Concentration (mg/ml)	Temps moyen (s)	Viscosité relative	Viscosité réduite (ml/mg)
Solvant	390	-	-
2.775	495.5	0.270	0.097
3.70	531.5	0.362	0.098
4.44	566	0.451	0.101
5.55	620.6	0.591	0.106

**Figure 5** : Détermination de la viscosité intrinsèque de la chitine irradiée à 150 kGy par extrapolation de la viscosité réduite en fonction de la concentration

**ANNEXE 1****Tableau 6** : Viscosité relative et viscosité réduite de la chitine irradiée à une dose de 210 kGy en fonction de la concentration

Concentration (mg/ml)	Temps moyen (s)	Viscosité relative	Viscosité réduite (ml/mg)
Solvant	390	-	-
2.685	468	0.2	0.074
3.068	482	0.235	0.076
3.58	500	0.282	0.078
4.296	533	0.366	0.085
5.37	580	0.487	0.09

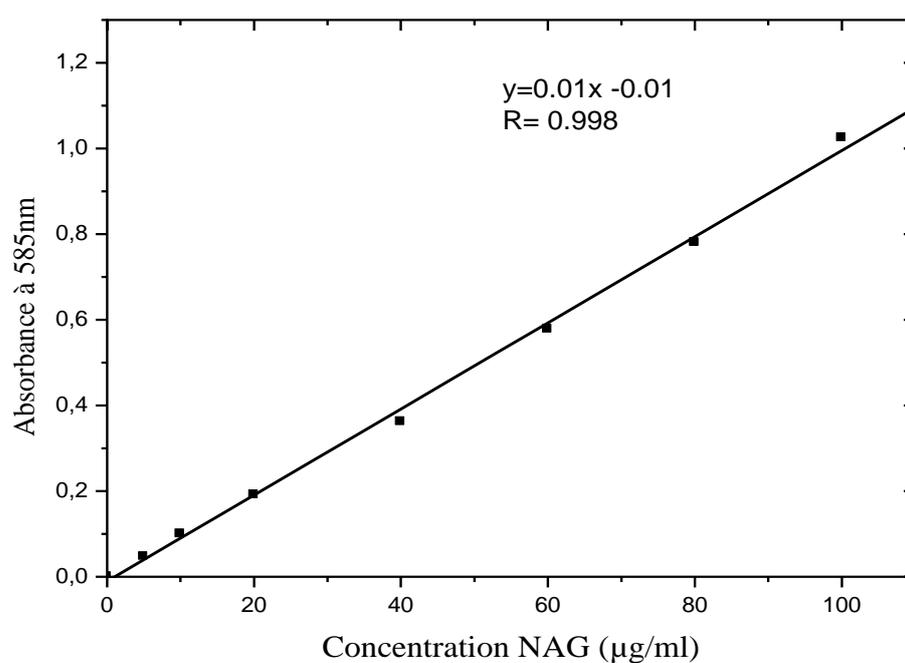
**Figure 6** : Détermination de la viscosité intrinsèque de la chitine irradiée à 210 kGy par extrapolation de la viscosité réduite en fonction de la concentration

**ANNEXE 2****Tableau 1:** Principales bandes d'absorption de la chitine, en spectroscopie FTIR.

Types de vibration	Fréquences (cm <sup>-1</sup> )	
	Chitine (Brugnerotto et al., 2001)	Chitine analysée
Liaison O-H (Vibration d'élongation).	3450	<b>3436</b>
CH <sub>2</sub> asymétrique.	2926	<b>2926</b>
Amide I.	1660	<b>1661</b>
Liaison amine N-H (Vibration de déformation)	1591	<b>1564</b>
Liaison CH <sub>2</sub> (Vibration de déformation) due au réarrangement des liaisons N - H.	1420	<b>1429</b>
Amide III	1382	<b>1377</b>
Liaison O-H (Vibration de déformation).	1260	<b>1261</b>
Liaison C-O-C asymétrique (Vibration d'élongation).	1160	<b>1157</b>
Liaison C-O (Vibration d'élongation).	1090	<b>1073</b>
Liaison C-C.	981	<b>953</b>

**ANNEXE 3****Tableau 1:** Préparation de la courbe d'étalonnage du NAG

N° du tube	1	2	3	4	5	6	7	8
NAG (µg/ml)	0	5	10	20	40	60	80	100
NAG (µl)	0	25	50	100	200	300	400	500
H2O (µl)	500	475	450	400	300	200	100	0
DO à 585 nm	0	0.047	0.1	0.191	0.362	0.578	0.78	1.025

**Figure 1 :** Courbe d'étalonnage du N-Acétyle-Glucosamine

## ANNEXE 4

### Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)

#### 1. Réactif de Bradford

- 100 mg de bleu de Coomassie G 250 ;
- 100 ml d'acide phosphorique à 85% ;
- 50 ml d'éthanol à 95%.

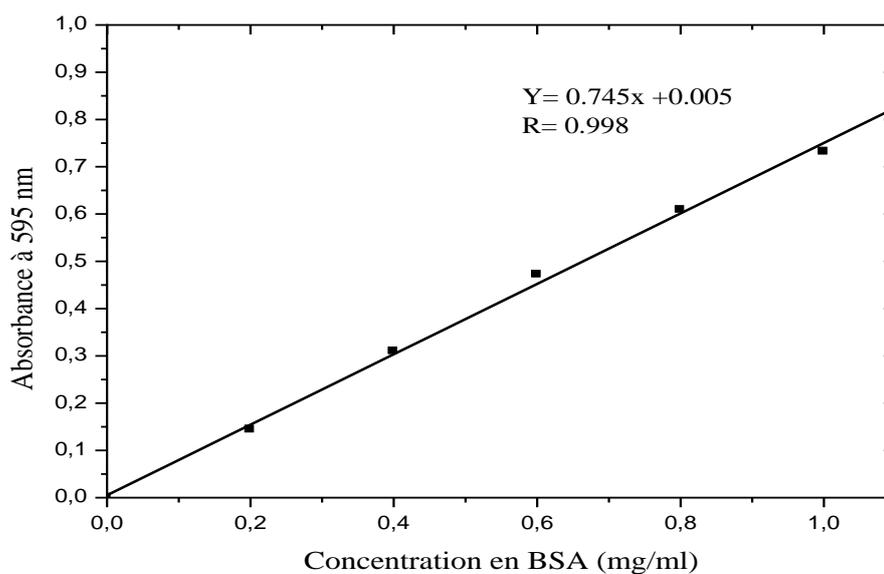
Cette solution est dissoute dans 1L d'eau distillée, ensuite filtrée dans un flacon sombre. Ce réactif peut être conservé pendant 1 mois à 4°C et à l'abri de la lumière.

- Solution-mère de BSA à 1mg/ml.

#### 2. Etablissement de la courbe d'étalonnage

**Tableau 1** : Préparation de la courbe d'étalonnage de la B.S.A

N° du tube	1	2	3	4	5	6
B.S.A (µl)	0	20	40	60	80	100
Tampon (µl)	100	80	60	40	20	0
R.B (ml)	5	5	5	5	5	5
Concentration en B.S.A (mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
DO à 595 nm	0	0.144	0.310	0.472	0.609	0.732



**Figure 1** : Courbe d'étalonnage de la BSA



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adoui F. (2007). Extraction d'enzyme coagulant le lait à partir de proventricules de poulet. Thèse de Magister en Biochimie et Technologies Alimentaires, INATAA, Université de Constantine, 89 p.
- Adrangi S., Faramazi M.A., Shahverdi A.R. & Sepehrizadeh Z. (2010). Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae*, Carbohydrate Research, Vol. 345, n° 3, 402-407.
- Aiba S. (1994a). Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by lysozymic hydrolysates of partially N-acetylated chitosans, Carbohydrate Research, Vol. 261, n° 2, 297-306.
- Aiba S. (1994b). Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation, Carbohydrate Research, Vol. 256, n° 2, 323-328.
- Ait Si Mamar S. & Hadjadj A. (1990). Radiation pretreatments of cellulose materials for the enhancement of enzymatic hydrolysis, International Journal of Radiation Applications and Instrumentation, Part C. Radiation Physics and Chemistry, Vol. 35, n° 1-3, 451-455.
- Anselme C. & Jacobs E.P. (1996). Ultrafiltration, Chapitre 10 in "Water Treatment Membrane Process", McGraw-Hill, 1996, 88 p.
- Arakane Y., Zhu Q., Matsumiya M., Muthukrishnan S. & Kramer K.J. (2003). Proprieties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase, Insect Biochemistry & Molecular Biology, Vol. 33, n° 6, 631-648.
- Augère B. (2001). Les enzymes : biocatalyseurs protéiques, Editions Ellipses, Paris, 224 p.
- Bacon A., Makin J., Sizer P.J., Jabbal-Gill M., Hinchcliffe M., Illum L., Chatfield S. & Roberts M. (2000). Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. Infection & Immunity, Vol.68, n° 10, 5764-5770.
- Baek J.H., Han B.K. & Jo D.H. (2001). Distribution of chitinases in rice (*Oryza Sativa L*) seed and characterization of a hull-specific chitinase, Journal of Biochemistry & Molecular Biology, Vol. 34, n° 4, 310-315.
- Bak J.S., Ko J.K., Han Y.H., Lee B.C., Choi I.G. & Kim K.H. (2009). Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment, Bioresource Technology, Vol. 100, n° 3, 1285-1290.
- Beaulieu C. (2007). Les effets multiples du chitosane, Phytothérapie, Numéro Hors-Série, HS38-HS45.
- Bhattacharya D., Nagpure A. & Gupta R.K. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential, Critical Reviews in Biotechnology, Vol. 27, n° 1, 21-28.
- Binod P., Sandhya C. & Pandey A. (2006). Chitinases, Chapitre 22, in "Enzyme Technology" Pandey A., Webb C., Soccol C.R. & Larroche C. (Eds), Springer, New York, 433-448.
- Bishop J.G., Dean A.M., & Mitchell-Olds T., (2000). Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 97, n° 10, 5322-5327.

- Boot R.G., van Achterberg T.A.E., van Aken B.E., Renkema G.H., Jacobs M.J.H.M., Aerts J.M.F.G. & de Vries C.J.M. (1999). Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vol. 19, n° 3, 687-694.
- Boot R.G., Bussink A.P., Verhoek M., de Boer P.A.J., Moorman A.F.M. & Aerts J.M.F.G. (2005). Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, Vol. 53, n° 10, 1283-1292.
- Bosso C., Defaye J., Domard A., Gabelle A. & Pedersen C. (1986). The behavior of chitin towards anhydrous hydrogen fluoride. Preparation of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-d-glucopyranosyl oligosaccharides, *Carbohydrate Research*, Vol. 156, 57-68.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, n° 1-2, 248-254.
- Brameld K.A. & Goddard W.A. (1998). The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95, n° 8, 4276-4281.
- Brisou J. (1971). *Techniques d'enzymologie bactérienne*, Editions Masson, Paris, 286 p.
- Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Arguelles-Monal W., Desbrières J. & Rinaudo M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, Vol. 42, n° 8, 3569-3580.
- Brunner J.K.H., Sabine Scholl-Bürgi S., Hössinger D., Wondrak P., Prelog M. & Zimmerhackl L.B. (2008). Chitotriosidase activity in juvenile idiopathic arthritis, *Rheumatology International*, Vol. 28, n° 9, 949-950.
- Cadenat J. (1943). Le genre *Scorpaena*, *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes (ISTPM)*, Vol. 13, n° 1-4. <http://archimer.ifremer.fr/doc/1943/publication-3420.pdf>
- Chang W.T., Chen C.S. & Wang S.L. (2003). An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Current Microbiology*, Vol. 47, n° 2, 102-108
- Chapiro A. (1962). General aspects of radiation effects in solid polymers, Chapter VIII, in "Radiation Chemistry of polymeric systems", Interscience Publisher, New York, 339-383.
- Charlesby A. (1958). Effets des rayonnements de grande énergie sur les polymères, in "Actions chimiques et biologiques des radiations", Masson et Cie (Eds), Paris, 141-211.
- Charlesby A. (1981). Crosslinking and degradation of polymers, *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 18, n° 1-2, 59-66.
- Charlesby A. (1995). Present and future prospects for radiation, in "IAEA-Advanced Radiation Chemistry Research: Current Status", IAEA-TECDOC-834, Vienna, 77-104.
- Cheba B.A., El-Mahdy A.R., Zaghoul T.I. & El-Massry M.H. (2009). Chitinase purification and characterization from newly isolated marine *Bacillus spp.* R2, *New Biotechnology*, Volume 25S, S46.

- Chen H.C., Hsu M.F. & Jiang S.T. (1997). Purification and characterization of an exo-N,N-diacetylchitobiohydrolase like enzyme from *Cellulomonas flavigena* NTOU1, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 20, n° 3, 191-197.
- Chen R.H. & Chen J.S. (2000). Changes of polydispersity and limiting molecular weight of ultrasound-treated chitosan. *Advance in Chitin Science*, 4, (Euchis'99), 361-366.
- Chen L.C., Chen Y.C., Chung Y.M. & Chang C.T. (2011). Characterisation of a b-N-acetylhexosaminidase from a commercial papaya latex preparation, *Food Chemistry*, Vol. 124, n° 4, 1404-1410.
- Chlan C.A. & Bourgeois P.B. (2001). Classe I chitinases in cotton (*Gossypium hirsutum*): characterization, expression and purification, *Plant Science*, Vol. 161, n° 1, 143-154.
- Chmielewski A.G., Haji-Saeid M. & Ahmed S. (2005). Progress in radiation processing of polymers, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, Vol. 236, n° 1-4, 44-54.
- Choi B.K., Kim K.Y., Yoo Y.J., Oh S.J., Choi J.H. & Kim C.Y. (2001). In vitro antimicrobial activity of chito oligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 18, n° 6, 553-557.
- Choi W.S., Ahn K.J., Lee D.W., Byun M.W. & Park H.J. (2002). Preparation of chitosan oligomers by irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 78, n° 3, 533-538.
- Choi K.H., Seo J.Y., Park K.M., Park C.S. & Cha J. (2009). Characterization of glycosyl hydrolase family 3  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 108, n° 6, 455-459.
- Colowick S.P. & Kaplan N.O. (1990). Guide to Protein Purification in "Methods in Enzymology", Vol. 182, Abelson J.N. & Simon M.I. (Eds), Academic Press, Connecticut, 853 p.
- Combette P. & Ernoult I. (2005). Assemblage des macromolécules et emploi des polymères, in "Physique des polymères, Tome I : Structure, fabrication, emploi", Presses internationales Polytechniques (Eds), Montréal, 57-96.
- Coutinho P.M. & Henrissat B. (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, in "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", Gilbert H.J., Davies G.J., Henrissat B. & Svensson B., (Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 3-12.
- Dahiya N., Tewari R., Tiwari R.P. & Hoondal G.S. (2005). Chitinase from *Enterobacter sp. NRG4*: its purification, characterization and reaction pattern, *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 8, n° 2, <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue2/>
- Dahiya N., Tewari R. & Hoondal G.S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review, *Applied Microbiology & Biotechnology*, Vol. 71, n° 6, 773-782.
- D'Ambrosio B., Casa R., Bompani G. & Scali M. (1981). Glucosamine sulfate: a controlled clinical investigation in arthrosis, *Pharmacotherapeutica*, 2, 504-508.
- Davies G. & Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases, *Structure*, Vol. 3, n° 9, 853-859.

- Dennhart N., Weigan L.M.M., Fujiwara M., Fukamizo T., Skriver K. & Letzel T., (2009). 26 kDa endochitinase from barley seeds: Real-time monitoring of the enzymatic reaction and substrate binding experiments using electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Biotechnology*, Vol. 143, n° 4, 274-283.
- Dennison C. (2002). *A guide to protein isolation*, Kluwer Academic Publishers, New York, 181 p.
- Djabali F., Brahmi B. & Mamasse M. (1993), *Catalogue des poissons des côtes algériennes*, Pelagos, n° spécial, *Bulletin de l'Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ISMAL)*, 191 p.
- Di Maro A., Terracciano I., Sticco L., Fiandra L., Ruocco M., Corrado G., Parente A. & Rao R. (2010). Purification and characterization of a viral chitinase active against plant pathogens and herbivores from transgenic tobacco, *Journal of Biotechnology*, Vol. 147, n° 1, 1-6.
- Dinesh K.P., SantaRam A. & M.B. Shivanna (2010). Studies on the chitinase activity in coffee (*Coffea Arabica L.*), *Genetic Resources in India*, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, Vol. 6, n° 4, 449-452.
- Donnelly L.E. & Barnes P.J. (2004). Acidic mammalian chitinase - a potential target for asthma therapy, *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 25, n° 10, 509-511.
- Donzelli B.G.G., Ostroff G. & Harman G.E. (2003). Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources, *Carbohydrate Research*, Vol. 338, n° 18, 1823-1833.
- Durand G. & Monsan P. (1982). *Les enzymes, Productions et utilisations industrielles*, Ed. Gauthier-Villars, Bordas, Paris, 352 p.
- Dzung N.A., Khan V.T.P., Anh P.Q. & Hong P.T.A. (2007). Study on hydrolysis of chitosan by cellulose combined with gamma radiation, in "*Advances in Chitin Science*", Vol. X., Senel S., Vårum K.M., Sumnu M.M. & Hincal A.A. (Eds), Ankara, 96-101.
- Einbu A., Naess N.S., Elgsaeter A. & Varum K.M. (2004). Solution properties of chitin in Alkali, *Biomacromolecules*, Vol. 5, n° 5, 2048-2054.
- Einbu A. (2007). *Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis*, Ph.D. thesis in Biotechnology, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, 75 p.
- Einbu A., Grasdalen H. & Varum K.M. (2007). Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid, *Carbohydrate Research*, Vol. 342, n° 8, 1055-1062.
- Elias J.A., Homer R.J., Hamid Q. & Lee C.G. (2005). Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma, *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, Vol. 116, n° 3, 497-500.
- El-Sawy N.M., Abd El-Rehim H.A., Elbarbary A.M. & Hegazy E.A. (2010). Radiation-induced degradation of chitosan for possible use as a growth promoter in agricultural purposes, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 79, n° 3, 555-562.
- Enzyme Nomenclature Committee (1992), *Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*, Academic Press, San Diego, CA, USA.

- Falini G., Weinner S. & Addadi L. (2003). Chitin-silk fibroin interaction relevance to calcium carbonate formation in invertebrates, *Calcified Tissue International*, Vol. 75, n° 5, 548-554.
- Fange R. & Grove D.,(1979). Digestion, in "Fish Physiology", vol. VIII, Hoar W.S., Randall D.J. & Brett J.R. (Eds), Academic Press, London, 162–241.
- FAO Fisheries & Aquaculture Department, (2007). The state of world fisheries and aquaculture: 2006, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 3-4.
- Feng T., Du Y., Li J, Hu Y. & Kennedy J.F. (2008) : Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 73, n° 1, 126-132.
- Ferradini C. & Pucheault J., (1983). Absorption des rayonnements ionisants dans la matière, in "Biologie de l'action des rayonnements ionisants", Editions Masson, Paris, 3-23.
- Fiandra L., Terracciano I., Fanti P., Garonna A., Ferracane L., Fogliano V., Casartelli M., Giordana B., Rao R. & Pennacchio F. (2010). A viral chitinase enhances oral activity of TMOF, *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, Vol. 40, n° 7, 533-540.
- Filho B.P.D., Lemos F.J.A., Secundino N.F.C., Pascoa V., Pereira S.T. & Pimenta P.F.P. (2002), Presence of chitinase and beta-N-acetylglucosaminidase in the *Aedes aegypti*: a chitinolytic system involving peritrophic matrix formation and degradation, *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, Vol. 32, n° 12, 1723-1729.
- Fines B.C. & Holt G.J. (2010). Chitinase and apparent digestibility of chitin in the digestive tract of juvenile coibia, *Rachycentron canadum*, *Aquaculture*, Vol. 303, n° 1-4, 34-39.
- Flach J., Pilet P.E. & Jolles P. (1992). What's new in chitinase research?, *Experientia*, Vol. 48, n° 8, 701-716.
- Fusetti F., von Moeller H., Houston D., Rozeboom H.J., Dijkstra B.W., Boot R.G., Aerts J.M.F.G. & van Aalten D.M.F. (2002). Structure of human chitotriosidase: Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, n° 28, 25537-25544.
- Goni O., Sanchez-Ballesta M.T., Merodio C. & Escribano M.I. (2010). Ripening-related defense proteins in *Annona* fruit, *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 55, n° 3, 169-173.
- Grigolon L. B., Azevedo A., Santos R. R. & Franco T. T. (2001). Enzymatic modification of chitosan by free and immobilized papain, in "Chitin enzymology", R.A.A., Muzzarelli (Ed.), Atec, Italy, 78-87.
- Gryczka U., Dondi D., Chmielewski A.G., Migdal W., Buttafava A. & Faucitano A. (2009). The mechanism of chitosan degradation by gamma and e-beam irradiation, *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 78, n° 7-8, 543-548.
- Gunnar B. (1948). The determination of Hexosamines according to Elson and Morgan, *Acta Chemica Scandinavica*, Vol. 2, 467-473.
- Guo R.F, Shi B.S., Li D.C., Ma W. & Wei Q. (2008).Purification and characterization of a novel thermostable chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 and cloning of its encoding gene, *Agricultural Sciences in China*, Vol. 7, n° 12, 1458-1465.

- Gutowska M. (2002). Chitinase activity of fishes with varying depth distributions, Summer Intern Papers, MBARI publications, 18 p.  
[http://www.mbari.org/education/internship/02interns/2002\\_papers.html](http://www.mbari.org/education/internship/02interns/2002_papers.html)
- Gutowska M.A., Drazen J.C. & Robison B.H. (2004). Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California, Comparative Biochemistry & Physiology, Part A 139, 351-358.
- Hackman R.H. & Goldberg M. (1965). Studies on Chitin, VI, Nature of Alpha- and Beta-Chitins, Australian Journal of Biological Sciences, Vol. 18, n° 4, 935-941.
- Hai L., Diep T.B., Nagasawa N., Yoshii F. & Kume T. (2003). Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, Vol. 208, n° 1-4, 466-470.
- Haji-Saeid M., Safrany A., Sampa M.H. & Ramamoorthy N. (2010). Radiation processing of natural polymers : The IAEA contribution, Radiation Physics and Chemistry, Vol. 79, n° 3, 255-260.
- Hamajima K., Kojima Y., Matsui K., Toda Y., Jounai N., Ozaki T., Xin K.Q., Strong P. & Okuda K. (2003). Chitin micro-particles (CMP): a useful adjuvant for inducing viral specific immunity when delivered intranasally with an HIV-DNA vaccine, Viral Immunology, Vol. 16, n° 4, 541-547.
- Hames B.D., Hooper N.M. & Houghton J.D. (2006). L'essentiel en biochimie, 2<sup>ème</sup> Edition, Editions Berti, Alger, 420 p.
- Han Y., Yang B.J., Zhang F.L., Miao X.L. & Li Z.Y. (2009). Characteristics investigation of Antifungal marine chitinase from *Streptomyces sp. DAI1* associated with South China Sea sponge *Craniella australiensis*, Marine Biotechnology, Vol. 11, n° 1, 132-140.
- Harish Prashanth K.V. & Tharanathan R.N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential: an overview, Trends in Food Science & Technology, Vol. 18, n° 3, 117-131.
- Hasegawa M., Isogai A. & Onabe F. (1993). Preparation of low-molecular-weight of partially N-acetylated chitosans, Carbohydrate Research, Vol. 261, n° 2, 297-306.
- Haynes C.A., Aloise P. & Creagh A.L. (1999). Process for producing N-Acetyl-D-glucosamine, United States Patent No. 5 998 173.
- He X.Y., Yin Q.R. & Yang G.J. (2001). The production of N-acetyl-D-glucosamine, J. Changde Teach. Univ. Nat. Sci., Vol. 13, 63-65.
- Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, Biochemical Journal, Vol. 280, 309-316.
- Henrissat B. & Bairoch A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities, Biochemical Journal, Vol. 293, 781-788.
- Hien N.Q., Nagasawa N., Tham L.X., Yoshi F., Dang V.H., Mitomo H., Makuuchi K. & Kume T. (2000). Growth-promotion of plants with depolymerized alginates by irradiation, Radiation Physics & Chemistry, Vol. 59, n° 1, 97-101.
- Hirano S. (1996). Chitin biotechnology applications, in "Biotechnology Annual Review", Vol.2, El Grevery MR (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 237-258.

- Hirano S., Seino H., Akiyama Y. & Nonaka I. (1990). Chitosan: A biocompatible material for oral and intravenous administrations, in "Progress in biomedical polymers", Gebelein C.G. & Dunn R.L. (Eds), Plenum Press, New York, 283-290.
- Holme D.J. & Peck H. (1998). Analytical Biochemistry, 3<sup>rd</sup> Edition, Prentice Hall, Harlow Essex, U.K., 488 p.
- Hong S.P., Kim M.H., Oh S.W., Han C.H. & Kim Y.H. (1998). ACE inhibitory and anti-hypertensive effect of chitosan oligosaccharides in SHR, Korean Journal of Food Science and Technology, Vol. 30, n° 6, 1476-1579.
- Hoster F., Schmitz J.E. & Daniel R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganism : Isolation and characterization of chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces strain*, Applied Microbial and Cell Physiology, Vol. 66, n° 4, 434-442.
- Hsieh K.H., Lin Y.D. & Tsao C.T. (2007). Study of the kinetics for depolymerization of chitosan using acetic acid, in "Advances in Chitin Science", Vol. X, Senel S., Vårum K.M., Sumnu M.M. & Hincal A.A. (Eds), Ankara, 32-37.
- Hu X., Du Y. , Tang Y. , Wang Q.,Feng T., Yang J. & Kennedy J.F. (2007). Solubility and property of chitin in NaOH/urea aqueous solution, Carbohydrate Polymers, Vol. 70, n° 4, 451-458.
- Hung T.H., Chang Y.M., Sung H.Y. & Chang C.T. (2002). Purification and characterization of hydrolase with chitinase and chitosanase activity from commercial stem bromelain, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 50, n° 16, 4666-4673.
- Huang L., Peng J., Zhai M., Li J. & Wei G. (2007a). Radiation-induced degradation of carboxymethylated chitosan in aqueous solution, Carbohydrate Polymers, Vol. 67, n° 3, 305-312.
- Huang L., Peng J., Zhai M., Li J. & Wei G. (2007b). Radiation-induced changes in carboxymethylated chitosan, Radiation Physics & Chemistry, Vol. 76, n° 11-12, 1679-1683.
- Huang Q.S., Yan J.H., Tang J.Y., Tao Y.M., Xie X.L., Wang Y., Wei X.Q., Yan Q.H. & Chen Q.X. (2010). Cloning and tissue expressions of seven chitinase family genes in *Litopenaeus vannamei*., Fish & Shellfish Immunology, Vol. 29, no 1, 75-81.
- Hungerford D.S. & Jones L.C. (2003), Glucosamine and chondroitin sulfate are effective in the management of osteoarthritis, Journal of Arthroplasty , Vol. 18, n° 3, 5-9.
- Ikeda M., Miyauchi K., Mochizuki A. & Matsumiya M. (2009). Purification and characterization of chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*. Protein Expression & Purification, Vol. 65, n° 2, 214-222.
- Il'ina A.V. & Varlamov V.P. (2004). Hydrolysis of chitosan in lactic acid, Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 40, n° 3, 300-303.
- Itoi S., Kanomata Y., Koyama Y., Kadokura K., Uchida S., Nishio T., Oku T. & Sugita H. (2007). Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus strain No. 442*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Proteins & Proteomics, Vol. 1774, n° 9, 1099-1107.
- Jeon Y.J. & Kim S.K. (2002).Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in an ultrafiltration membrane reactor system, Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 12, n° 3, 503-507.

- Jeon Y.J., Shahidi F. & Kim S.K. (2000). Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods, *Food Review International*, Vol. 16, n° 2, 159-176.
- Jeuniaux C. (1963). Chitine et chitinolyse. Un chapitre de la biologie moléculaire, Editions Masson, Paris, 181p.
- Jeuniaux C. (1966). Chitinases, in "Methods in Enzymology", Vol. 8, Neufeld E.F. & Ginsburg V. (Eds.), Academic Press, New York, 644-650.
- Jia Z. & Shen D. (2002). Effect of reaction temperature and reaction time on the reparation of low molecular weight chitosan using phosphoric acid, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 49, n° 4, 393-396.
- Johnson E.L. & Peniston Q.P. (1982). Utilization of Shellfish Waste for Chitin and Chitosan Production, in "Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products", Chapter 19, Martin R.E., Flick G.J., Hebard C.E., & Ward D.R., (Eds.), AVI Publishing Inc., Westport, 415-422.
- Johnstone A. & Thorpe R. (1987). Radiolabelling techniques, in "Immunochemistry in practice" (second edition), Blackwell Scientific Publications, London, 113-121.
- Jung W.J., Souleimanov A., Park R.D. & Smith D.L. (2007). Enzymatic production of N-acetyl chitooligosaccharides by crude enzyme derived from *Paenibacillus illioisensis* KJA-424, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 67, n° 2, 256-259.
- Kamoun P. (1997). Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, Flammarion Médecine Science, Paris, 411 p.
- Karasuda S., Yamamoto K., Kono M., Sakuda S. & Koga D. (2004). Kinetic analysis of chitinase from red sea bream, *Pagrus major*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 68, n° 6, 1338-1344.
- Kasprzewska A. (2003). Plant chitinases - Regulation and function, *Cellular & Molecular Biology Letters*, Vol. 8, n° 3, 809-824.
- Khor E. (2001). Chitin: fulfilling a biomaterials promise, Elsevier Applied Science, Amsterdam, The Netherlands, 136 p.
- Khor E. & Lim L.Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, Vol. 24, n° 13, 2339-2349.
- Kim S.K. & Rajapakse N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 62, n° 4, 357-368.
- Kim S.Y., Shon D.H. & Lee K.H. (1998). Purification and characteristics of two types of chitosanases from *Aspergillus fumigates* KH-94, *Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol. 8, n° 6, 568-574.
- Kim K.J., Yang Y.J. & Kim J.G., (2003). Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, Vol. 36, n° 2, 185-189.
- Kim H.S., Timmis K.N. & Golyshin P.N. (2007). Characterization of chitinolytic enzyme from *Serratia* sp. KCK isolated from kimchi juice, *Applied Microbiology & Biotechnology*, Vol. 75, n° 6, 1275-1283.

- Klaikherd A., Siripastr Jayanta M.L., Boonjawat J., Aiba S. & Sukwattanasinitta M. (2004). Depolymerization of b-chitin to mono- and disaccharides by the serum fraction from the para rubber tree, *Hevea brasiliensis*, Carbohydrate Research, Vol. 339, n° 17, 2799-2804.
- Kono M., Matsui T., Shimizu C. & Koga D. (1990). Purification and some properties of chitinase from the liver of a prawn, *Penaeus japonicus*., Agricultural & Biological Chemistry, Vol. 54, n° 8, 2145-2147.
- Krairak S. & Duenpen D. (2007). Chitin oligomers from fungal mycelium cultivating on cassava starch medium, KMITL Sci. Tech. J., Vol. 7, n° S2, 147-154.
- Kramer K.J., Hopkins T.L. & Schaefer J. (1995). Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. Insect Biochemistry & Molecular Biology, Vol. 25, n° 10, 1067-1080.
- Kume T. & Takehisa M. (1983). Effects of gamma-irradiation on sodium alginate and carrageenan powder, Agricultural & Biological Chemistry, Vol. 47, n°4, 889-890.
- Kurita K. (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan, Polymer Degradation & Stability, Vol. 59, 117-20.
- Kuroiwa T., Ichikawa S., Hiruta O., Sato S. & Mukataka S. (2002). Factors affecting the composition of oligosaccharides produced in chitosan hydrolysis using immobilized chitosanases, Biotechnology Progress, Vol. 18, n° 5, 969-974.
- Laribi H. (2005). Etude de l'hydrolyse enzymatique de la chitine par des chitinases extraites de la biomasse marine. Thèse de Magistère. Ecole Nationale polytechnique, 86 p.
- Le Gal Y., (2004). Biodiversité marine et exploitation biotechnologique des océans, Vertigo- Revue électronique en sciences de l'environnement, Vol. 5, n° 3, <http://vertigo.revues.org/index3356.html>.
- Li J., Du Y. & Liang H. (2007). Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme, Polymer Degradation & Stability, Vol. 92, n° 3, 515-524.
- Liang T.W., Chen Y.J., Yen Y.H., Wang S.L., (2007). The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656, Process Biochemistry, Vol. 42, n° 4, 527-534.
- Lineweaver H. & Burk D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants, Journal of the American Chemical Society, Vol. 56, n° 3, 658-666.
- Liu X., Li-Ling J., Hou L., Li Q. & Ma F. (2009). Identification and characterization of a chitinase-coding gene from Lamprey (*Lampetra japonica*) with a role in gonadal development and innate immunity, Developmental and Comparative Immunology, Vol. 33, n° 2, 257-263.
- Liu D., Cai J., Xie C., Liu C., & Chen Y., (2010). Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis subsp. colmeri*, and its biocontrol potential. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 46, n° 3-4, 252-256.
- Mahlous M., Benamer S., Tahtat D., Nacer-Khodja A. & Larbi-Youcef S. (2007). Radiation degradation of chitosan in solid state and in solution, in "Advances in chitin science", Vol. X, 49-54.

- Mao S., Shuai X., Unger F., Simon M., Bi D. & Thomas Kissel T. (2004). The depolymerization of chitosan: Effects on physicochemical and biological properties, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 281, n° 1-2, 45-54.
- Marsh R.S., Moe C., Lomneth R.B., Fawcett J.D. & Place A. (2001). Characterization of gastrointestinal chitinase in the lizard *Sceloporus undulatus garmani* (*Reptilia: Phynomatidae*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 128, n° 4, 675-682.
- Masako S., Masami M., Tetsuro Y., Toshihiko I., & Bunei S., (2001). A novel serum chitinase that is expressed in bovine liver, *FEBS Letters*, Vol. 506, n° 2, 127-130.
- Matsumiya M., Miyauchi K. & Mochizuki A. (2002). Characterization of 38 kDa and 42 kDa chitinase isozymes from the liver of Japanese common squid *Todarodes pacificus*, *Fisheries Science*, Vol. 68, n° 3, 603-609.
- Matsumiya M. (2004). Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine using crude enzyme from the liver of squids, *Food Science and Technology Research*, Vol. 10, n° 3, 296-299.
- Matsumiya M., Arakane Y., Haga A., Muthukrishnan S. & Kramer K.J. (2006). Substrate specificity of chitinases from two species of fish, greenling, *Hexagrammos otakii*, and common mackerel, *Scomber japonicus*, and the insect, tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 70, n° 4, 971-979.
- Maurel A. (2001). Dessalement de l'eau de mer et des eaux saumâtres et autres procédés non conventionnels d'approvisionnement en eau douce, Tec & Doc Edition, 232 p.
- Mehmood M.A., Xiao X., Hafeez F.Y., Gai Y. & Wang F. (2009). Purification and characterization of a chitinase from *Serratia proteamaculans*, *World Journal of Microbiology and Biotechnolgy*, Vol. 25, n° 11, 1955-1961.
- Mengibar M., Ganan M., Miralles B., Carrascosa A.V., Martinez-Rodriguez A.J., Peter M.G., & Heras A., (2010). Antibacterial activity of products of depolymerization of chitosans with lysozyme and chitosanase against *Campylobacter jejuni*, *Carbohydrate Polymers*, in Press, Available online 29 April 2010.
- Merzendorfer H. & Zimoch L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases, *Journal of Experimental Biology*, Vol. 206, n° 24, 4393-4412.
- Merzendorfer H. (2006). Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, Vol. 176, n° 1, 1-15.
- Migdal W., Chmielewski A.G., Gryczka U. & Zakrzewska-Trznadel G. (2007). Radiation modified chitosan for agricultural and environmental application, "Radiation Processing of Natural Polymers for Development of Finished Products for Health Care, Agriculture and Environment", Report of the Consultants Meeting, International Atomic Energy Agency, Vienna, 101-112.
- Min B.M., Lee S.W., Lim J.N., You Y., Lee T.S., Kang P.H. & Park W.H. (2004). Chitin and chitosan nanofibers : electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers, *Polymer* Vol. 45, n° 21, 7137-7142.

- Molinari L.M., Bocchi-Pedroso R., de Oliveira Scoaris D., Ueda-Nakamura T., Vataru-Nakamura C. & Prado Dias Filho B. (2007). Identification and partial characterisation of a chitinase from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Comparative Biochemistry & Physiology, Part B*, Vol. 146, n° 1, 81-87.
- Mommsen T.P. (1980). Chitinase and  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from the digestive fluid of the spider, *Cupiennius salei*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, Vol. 612, n° 2, 361-372.
- Murata T., Amarume S., Hattori T., Tokuyama S., Tokuyasu K., Kawagishi H. & Usui T. (2005). Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with N-acetyllactosamine-repeating unit releasing activity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 336, n° 2, 514-520.
- Muzzarelli R.A.A. (1994). In vivo biochemical significance of chitin-based medical items, in "Polymeric biomaterials", Dumitriu S. (Ed.), Marcel Dekker, New York, 179-197.
- Muzzarelli R.A.A., Tomasetti M. & Ilari P. (1994). Depolymerization of chitosan with the aid of papain, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 16, n° 2, 110-114.
- Muzzarelli R.A.A., Xia W., Tomasetti M. & Ilari P. (1995). "Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 17, n° 6, 541-545.
- Muzzarelli R.A.A. (1997). Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 53, n° 1, 113-140.
- Nagai T., Watarai Y. & Suzuki N. (2002). Characterization of  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase from rhizostomous jellyfish, *Rhopilema asamushi*, *Mesogloea*, *Fish Physiology and Biochemistry*, Vol. 25, n° 1, 53-59.
- Nawani N.N. & Kapadnis B.P. (2001). One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 90, n° 5, 803-808.
- Nawani N.N., Kapadnis B.P., Das A.D., Rao A.S. & Mahajan S.K. (2002). Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora sp.V2*, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 93, n° 6, 965-975.
- Neeraja C., Moerschbacher B. & Podile A.R. (2010). Fusion of cellulose binding domain to the catalytic domain improves the activity and conformational stability of chitinase in *Bacillus licheniformis* DSM13, *Bioresource Technology*, Vol. 101, n° 10, 3635-3641.
- Nishiyama A., Tsuji S., Yamashita M., Henriksen R.A., Myrvik Q.N. & Shibata Y. (2006). Phagocytosis of N-acetyl-D-glucosamine particles, a Th1 adjuvant, by RAW 264.7 cells results in MAPK activation and TNF- $\alpha$ , but not IL-10 production, *Cellular Immunology*, Vol. 239, n° 2, 103-112.
- Nitsawang S. & Kanasawud P. (2006). A rapid process for purification of chitinase from the latex of *Carica papaya*, *Chiang Mai Journal of Science*, Vol. 33, n° 2, 237-242.
- Noishiki Y., Nishiyama Y., Wada M. & Kuga S. (2005). Complexation of  $\alpha$ -chitin with aliphatic amines, *Biomacromolecules*, Vol. 6, n° 4, 2362-2364.

- Nordtveit R.J., Varum K.M. & Smidsrod O. (1996). Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 29, n° 2, 163-167.
- Pantaleone D., Yalpani M. & Scollar M. (1992). Unusual susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis, *Carbohydrate Research*, Vol. 237, 325-332.
- Park S.H., Lee J.H. & Lee H.K. (2000). Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio sp. 98CJ11027*, *Journal of Microbiology*, Vol. 38, n° 4, 224-229.
- Park P.J., Je J.Y. & Kim S.K. (2003). Angiotensin I converting (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 51, n° 17, 4930-4934.
- Park P.J., Je J.Y., Jung W.K. & Kim S.K. (2004). Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates, *European Food Research and Technology*, Vol. 219, n° 5, 529-533.
- Patel A.K., Singh V.K., Yadav R.P., Moir A.J.G. & Jagannadham M.V. (2010). Purification and characterization of a new chitinase from latex of *Ipomoea carnea*, *Process Biochemistry*, Vol. 45, n° 5, 675-681.
- Patil R.S., Ghormade V. & Deshpande M.V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 26, n° 7, 473-483.
- Pelmont J. (1993). *Enzymes*, Office des Publications Universitaires, Alger, 605 p.
- Percot A., Viton C. & Domard A. (2003). Characterization of shrimp shell deproteinization, *Biomacromolecules*, Vol. 4, n° 5, 1380-1385.
- Place A.R. (1996). The biochemical basis and ecological significance of chitin digestion, 2<sup>nd</sup> International Symposium in Chitin Enzymology, in Muzarelli R.A.A. (Ed.), 39-54.
- Plummer D.T. (1994). *Introduction aux techniques de biochimie*, 3<sup>ième</sup> Edition, Ediscience International, Paris, 331 p.
- Poirier M. (2000). Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,N-Diméthylacétamide/ chlorure de lithium, Mémoire pour l'obtention du grade de Maître en Sciences (M. Sc.), Faculté des Sciences et de Génie, Université de Laval, 96 p.
- Pospieszny H., Chirkov S. & Atabekov I. (1991). Induction of antiviral resistance in plants by chitosane, *Plant Science*, Vol. 79, n° 1, 63-68.
- Proespraiwong P., Tassanakajon A. & Rimphanitchayakit V. (2010). Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetics, expression and activities, *Comparative Biochemistry & Physiology, Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, Vol. 156, n° 2, 86-96.
- Qin C., Du Y., Xiao L., Li Z. & Gao X. (2002). Enzymatic preparation of water soluble chitosan and their antitumor activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 31, n° 1-3, 111-117.
- Ramirez-Coutino L., Marin-Cervantes M.C., Huerta S., Revah S. & Shirai K. (2006). Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases, *Process Biochemistry*, Vol. 41, n° 5, 1106-1110.

- Ravi Kumar M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, Vol. 46, n° 1, 1-27.
- Reissig J.L., Strominger J.L. & Leloir L.F. (1955). A modified calorimetric method for the estimation of N-acetylamino-sugars, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 217, n° 2, 959-966.
- Renkema G.H., Boot R.G., Muijsers A.O., Donker-Koopman W.E. & Aerts J. M. F. G. (1995). Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, n° 5, 2198-2202.
- Richard H. (1984). Enzymologie et biocatalyse, in " Biotechnologie", Techniques et Documentation, Lavoisier Editeur, Paris, 662 p.
- Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, Vol. 31, n° 7, 603-632.
- Rinaudo M., Pavlov G. & Desbrieres J., (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosane, *Polymer*, Vol. 25, n° 40, 7029-7032.
- Robertus J.D., Hart P.J., Monzingo A.F., Marcotte E. & Hollis T. (1995). The structure of chitinases and prospects for structure-based drug design, *Canadian Journal of Botany*, Vol. 73, n° S1, 1142-1146.
- Rodriguez J., Copa-Patino J.L. & Perez-Leblic M.I. (1995). Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates, *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 20, n° 1, 46-49.
- Rouif S. (2008). Modifications physico-chimiques des polymères par ionisation, in "Techniques de l'ingénieur. Plastiques et composites", vol. AM1, n° AM3039v2 Paris.
- Roy I. & Gupta M.N. (2003). Applications of microwaves in biological sciences, *Current Science*, Vol. 85, n° 12, 1685-1693.
- Roy I., Mondal K. & Gupta M.N. (2003). Accelerating enzymatic hydrolysis of chitin by microwave pre-treatment, *Biotechnology Progress*, Vol. 19, n° 6, 1648-1653.
- Saguez J. (2007). Dérégulation des activités chitinases : vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides. Mémoire pour l'obtention du grade de Docteur. Faculté des Sciences-Ecole Doctorale Sciences et Santé, Université de Picardie Jules Verne, 148 p.
- Sajomsang W. & Gonil P. (2010). Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin from cicada sloughs, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 30, n° 3, 357-363.
- Samain E., Drouillard S., Heyraud A., Driguez H. & Geremia R.A. (1997). Gram-scale synthesis of recombinant chitoooligosaccharides in *Escherichia coli*, *Carbohydrate Research*, Vol. 302, n° 1-2, 35-42.
- Sampson M.N. & Gooday G.W. (1998). Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects, *Microbiology*, Vol. 144, n° 10, 2189-2194.
- Sandeep Varma R., Johnson George K., Balaji S. & Parthasarathy V.A. (2009). Differential induction of chitinase in *Piper colubrinum* in response to inoculation with *Phytophthora capsici*, the cause of foot rot in black pepper, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Vol. 16, n° 1, 11-16.

- Sandford P.A. (2002). Commercial sources of chitin & chitosan and their utilization, in "Advances in Chitin Science", Vol. 6, Vårum K.M. (Ed.), Trondheim, Norway, 35-42.
- Santos S.I., Da Cunha M.D., Machado O.L.T. & Gomes V.M. (2004). A chitinase from *Adenantha pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation, *Plant Science*, Vol. 167, n° 6, 1203-1210.
- Sashiwa H., Yamano N., Fujishima S., Muraki E., Kawasaki N. & Nakayama A. (2001). Production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin by enzymatic hydrolysis, *Chitin and Chitosan Research*, Vol. 7, n° 3, 257-260.
- Sashiwa H., Fujishima S., Yamano N., Kawasaki N., Nakayama A. & Muraki F. (2003). Enzymatic production of N-acetyl-D glucosamin from chitin: Degradation study of N-acetyl-chitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 51, n° 4, 391-395.
- Scopes R.K. (1994). Protein purification - Principles and Practice (Third edition), Cantor C.R. (Ed), Springer Advanced Texts in Chemistry, 380 p.
- Scriban R., (1993). Enzymologie et biocatalyse, Chapitre 1, in "Biotechnologie", 4<sup>ième</sup> édition, Tec & Doc Lavoisier, 324-350.
- Scriban R., (1999). Biotechnologie, 5<sup>ième</sup> édition, Tec & Doc Lavoisier, 1042 p.
- Seidl V., (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions, *Fungal Biology Reviews*, Vol. 22, n°1, 36-42.
- Setthakaset P., Pichyangkura R., Ajavakom A. & Sukwattanasinitt M., (2008). Preparation of N-acetyl-D-Glucosamine using enzyme from *Aspergillus sp.*, *Journal of Metals, Materials and Minerals*, Vol. 18, n° 2, 53-57.
- Shi Y., Jiang Z., Han P., Zheng G.X., Song K.K. & Chen Q.X. (2007). Purification and some properties of beta-N-acetyl-D-glucosaminidase from the cabbage butterfly (*Pieris rapae*), *Biochimie*, Vol. 89, n° 3, 347-354.
- Shin S.J. & Sung Y.J. (2008). Improving enzymatic hydrolysis of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by electron beam irradiation, *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 77, n° 9, 1034- 1038.
- Smith L.S. (1980). Digestion in Teleost fishes, in "Fish Feed Technology", ADCP/REP/80/11, FAO, Rome, 4-18.
- Songsiriritthigul C., Lapboonrueng S., Pechsrichuang P., Pesatcha P. & Yamabhai M. (2010). Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste, *Bioresource Technology*, Vol. 101, n° 11, 4096-4103.
- Souza D.S.L., Grossi-de-Sa M.F., Silva L.P., Franco O.L. , Gomes-Junior J.E., Oliveira R.G. , Rocha T.L., Magalhaes C.P., Marra B.M., Grossi-de-Sa M., Romano E., Martins de Sa C., Kombrink E., Arnubio V. Jiménez A.V. & Abreu L.R.D. (2008). Identification of a novel b-N-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine *Zoanthid Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea), *Protein Expression and Purification*, Vol. 58, n° 1, 61-69.
- Sriupayo J., Supaphol P., Blackwell J. & Rujiravanit R. (2005). Preparation and characterization of a-chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 62, n° 2, 130-136.

- Sugimoto M., Morimoto M., Sashiwa H., Saimoto H. & Shigemasa Y. (1998). Preparation and characterisation of water soluble chitin and chitosan derivatives, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 36, n° 1, 49-59.
- Tahtat D., Uzun C., Mahlous M. & Güven O. (2007). Beneficial effect of gamma irradiation on the N-deacetylation of chitin to form chitosan, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, Vol. 265, n° 1, 425-428.
- Takeshi T., Toshiaki F., Haruyuki A. & Tadayuki I. (2003). Characterization of an Exo- $\beta$ -d-glucosaminidase involved in a novel chitinolytic pathway from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis KOD1*, *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, n° 17, 5175-5181.
- Takeo S., Hisamori D., Matsuda S., Vinetz J., Sattabongkot J. & Tsuboi T. (2009). Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target, *Parasitology International*, Vol. 58, n° 3, 243-248.
- Tan E.W.Y. & Lee V.R. (2002). Enzymatic hydrolysis of prawn shell waste for the purification of chitin, Final year research & development project, Department of Chemical Engineering, Loughborough University.
- Theruvathil K.S., Sethumadhavan S. & Paruthapara T.M. (2007). Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation, *Carbohydrate Research*, Vol. 342, n° 16, 2423-2429.
- Tokoro A., Tatewaki N., Suzuki K., Mikami T., Suzuki S. & Suzuki M. (1988). Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 36, n° 2, 784-790.
- Tommeraas K., Varum K.M., Christensen B.E. & Smidsrod O. (2001). Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans, *Carbohydrate Research*, Vol. 333, n° 2, 137-144.
- Uchida Y., Izume M. & Ohtakara A. (1989). Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application, in *Chitin and chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Skjåk-Bræk G., Anthonsen T. & Sandford P.(Eds.), Elsevier Applied Science, Barking, UK, 372-382.
- Ueda M. & Arai M. (1992). Purification and some properties of chitinases from *Aeromonas sp. No. 10S-24*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 56, n° 3, 460-464.
- Ueda M., Kotani Y., Sutrisno A., Nakazawa M. & Miyatake K. (2005). Purification and characterization of chitinase B from moderately thermophilic bacterium *Ralstonia sp. A-471*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 69, n° 4, 842-844.
- Ueno K., Yamaguchi T., Sakairi N., Nishi N. & Tokura S. (1997). Antimicrobial activity by fractionated chitosan oligomers, in "Advances in chitin science", Domard A., Roberts G.A.F. & Varum K.M. (Eds), Jacques André Publisher, Lyon, 156-161.
- Ulanski P. & Rosiak J.M. (1992). Preliminary study on radiation-induced changes in chitosan, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 39, n° 1, 53-57.
- Vaidya R., Roy S., Macmil S., Gandhi S., Vyas P. & Chhatpar H.S. (2003). Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes xylosoxydans*, *Biotechnology Letters*, Vol. 25, n° 9, 715-717.

- Varum K.M., Holme H.K., Izume M., Stokke B.T. & Smidsrod O. (1996). Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1291, n° 1, 5-15.
- Vellard M. (2003). The Enzyme as drug: Application of enzymes as pharmaceuticals, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 14, n° 4, 444-450.
- Vishu Kumar A. B., Varadaraj M. C., Lalitha R.G. & Tharanathan R.N. (2004a). Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1670, n° 2, 137-146.
- Vishu Kumar A.B., Gowda L.R. & Tharanathan R.N. (2004b). Non-specific depolymerization of chitosan by pronase and characterization of the resultant products, *European Journal of Biochemistry*, Vol. 271, n° 4, 713-723.
- Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G. & Singh S.A. (2009). Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341, *Food Chemistry*, Vol. 114, n° 2, 402-407.
- Voet D. & Voet J.G. (2005). *Biochimie*, 2<sup>ème</sup> édition, De Boeck Université, 457-496.
- Waghmare S.R. & Ghosh J.S. (2010). Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroom bed, *Carbohydrate Research*, in Press, Corrected Proof, Available online 29 April 2010.
- Wang S.L., Chang W.T. & Lu M.C. (1995). Production of chitinase by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Proc. Nat. Sci. Counc. Repub. China B*, Vol. 19, n° 2, 105-112.
- Wang S.L. & Chang W.T. (1997). Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, n° 2, 380-386.
- Wang S.L., Shih I.L., Liang T.W. & Wang C.H. (2002). Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, n° 8, 2241-2248.
- Wang S.L., Lin T.Y., Yen Y.H., Liao H.F. & Chen Y.J. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase, *Carbohydrate Research*, Vol. 341, n° 15, 2507-2515.
- Wang S.L., Lin H.T., Liang T.W., Chen Y.J., Yen Y.H. & Guo S.P. (2008). Reclamation of chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials, *Bioresource Technology*, Vol. 99, n° 10, 4386-4393.
- Wang P., Wang J., Guo T. & Li Y. (2010). Synthesis and cytotoxic activity of the N-acetylglucosamine-bearing triterpenoid saponins, *Carbohydrate Research*, Vol. 345, n° 5, 607-620.
- Woo C.J. & Park H.D. (2003). An extracellular *Bacillus* sp. chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product, *Biotechnology Letters*, Vol. 25, n° 5, 409-412.
- Xie W., Xu P. & Liu Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol 11, n° 13, 1699-1701.

- Xing R., Liu S., Yu H., Guo Z., Wang P., Li C., Li Z. & Li P. (2005). Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation, *Carbohydrate Research*, Vol. 340, n° 13, 2150-2153.
- Yang C., Shen Z., Yu G. & Wang J. (2008). Effect and after effect of  $\gamma$  radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw, *Bioresource Technology*, Vol. 99, n° 14, 6240-6245.
- Ye X. & Ng T.B. (2005). A chitinase with antifungal activity from the mung bean, *Protein Expression and Purification*, Vol. 40, n° 2, 230-236.
- Yue W., Yao P. & Wei Y. (2009). Influence of ultraviolet-irradiated oxygen on depolymerization of chitosan, *Polymer Degradation & Stability*, Vol. 94, n° 5, 851-858.
- Yuli P.E., Suhartono M.T., Rukayadi Y.H. & Pyun Y.R. (2004). Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the Indonesian *Bacillus sp. 13.26*, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 35, n° 2-3, 147-153.
- Zainol I., Akil H. & Mastor A. (2009). Effect of  $\gamma$ -irradiation on the physical and mechanical properties of chitosan powder, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 29, n° 1, 292-297.
- Zamil S.S., Ahmad S., Choi M.H., Park J.Y. & Yoon S.C. (2009). Correlating metal ionic characteristics with biosorption capacity of *Staphylococcus saprophyticus BMSZ711* using QICAR model, *Bioresource Technology*, Vol. 100, n° 6, 1895-1902.
- Zhang H., Du Y., Yu X., Mitsutomi M. & Aiba S. (1999). Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme, *Carbohydrate Research*, Vol. 320, n° 3-4, 257-260.
- Zhou M. & Donovan M.D. (1996). Intranasal mucociliary clearance of putative bioadhesive polymer gels, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 135, n° 1-2, 115-125.
- Zhu X., Cai J., Yang J. & Su Q. (2005). Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography, *Carbohydrate Research*, Vol. 340, n° 10, 1732-1738.
- Zhu X., Zhou Y. & Feng J.L. (2007). Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas sp. CJ-5*, *Journal of Zhejiang University Science*, Vol. 8, n° 11, 831-838.
- Zhuravleva N.V., Luk'yanov P.A. & Pivkin M.V. (2004). N-Acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase secreted by the marine fungus *Phoma glomerata*, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 40, n° 5, 448-453.

	Page
Fig. 2. 1 : Représentation schématique de la chitine et du chitosane.....	5
Fig. 2. 2 : Diagramme du tube digestif du poisson .....	15
Fig. 2. 3 : Effet de la température sur l'activité enzymatique.....	19
Fig. 2. 4 : Effet du pH sur l'activité enzymatique .....	19
Fig. 2. 5 : Vitesse initiale d'une réaction en fonction de la concentration en substrat.....	20
Fig.2.6: Représentation graphique d'une cinétique michaélienne selon Lineweaver et Burk.	22
Fig. 2.7: Représentation graphique d'une cinétique michaélienne selon Eadie-Hofstee .....	23
Fig. 2. 8: Représentation des sites d'action des endo- et des exochitinases sur la chitine.....	25
Fig. 3.1: Protocole d'isolement des extraits enzymatiques .....	35
Fig. 4.1: Spectre infrarouge de la chitine .....	45
Fig. 4.2: Détermination de la viscosité intrinsèque de la chitine non irradiée.....	46
Fig. 4.3: Réduction de la masse moléculaire en fonction de la dose d'irradiation.....	48
Fig. 4.4: Influence des doses absorbées sur le taux de dégradation radiochimique .....	49
Fig. 4.5: Activité chitinasique en fonction de la dose d'irradiation Gamma.....	51
Fig.4.6: Effet de la précipitation au sulfate d'ammonium sur l'activité chitinasique .....	52
Fig.4.7: Profil chromatographique sur Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique brut .....	54
Fig.4.8: Profil chromatographique sur Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique précipité..	55
Fig.4.9: Courbe d'étalonnage des standards sur Sephadex G-100 .....	60
Fig.4.10: Effet de la température sur l'activité chitinasique .....	62
Fig.4.11: Effet du PH sur l'activité chitinasique .....	63
Fig.4.12: Activité chitinasique résiduelle en fonction de la température et du temps.....	65
Fig.4.13: Activité chitinasique résiduelle en fonction du PH.....	67
Fig.4.14. Activité chitinasique résiduelle au cours de la conservation à 4°C .....	68
Fig.4.15. Activité chitinasique résiduelle au cours de la conservation à -18°C.....	69
Fig.4.16: Influence de certains effecteurs sur l'activité de la chitinase.....	70
Fig. 4.17: Influence la nature du substrat sur l'activité de la chitinase.....	72
Fig. 4.18: Activité chitinasique en fonction de la concentration en chitine.....	73
Fig. 4.19: Influence de la concentration du substrat sur la vitesse initiale .....	74
Fig. 4.20: Représentation graphique de Lineweaver-Burk.....	75
Fig.4.21: Représentation graphique selon Eadie-Hofstee .....	76