

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة  
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du  
Littoral



Mémoire pour l'obtention du diplôme de  
Master en sciences de la mer

**Sujet :**

*Les applications biomédicales et pharmaceutiques  
de la chitine et ces dérivées.*

**Présenté par :**

➤ CHEGGA mohamed

**Soutenu le 04/11/2014 devant le jury suivant :**

Mme DJEGHRI.B	ENSSMAL	Présidente
Mme HOUMA.F	ENSSMAL	Examinatrice
Mme BOUBECHICHE.Z	ENSSMAL	Examinatrice
Mr HAMDIL.B	ENSSMAL	Promoteur

**Promotion 2013/ 2014**

*À mes très chers parents.*

*À mes chères sœurs.*

*À tous mes amis.*

*À tous ce qui m'ont soutenu.*

*Je dédie ce modeste travail.*

## Remerciement

*Je remercie ALLAH le tout puissant qui a guidé mes pas vers le savoir et qui m'a donné la force de concevoir ce travail.*

*Je tiens à remercier en premier lieu la présidente Mme DJEGHRI-HOUCINEBAIDA d'avoir accepté de présider le jury de cette soutenance.*

*Mme BACHARI-HOUMA FOUZIA et Mme BOUBECHICHE ZAKIA.L de m'avoir honorés de leurs présences et d'avoir acceptés d'examiner ce travail.*

*Je m'adresse mes sincères remerciements à mon promoteur Mr Hamdi Boualem professeur et directeur de (ENSSMAL) pour avoir dirigé ce travail et pour l'aide scientifique et morale qu'il a su m'apporter tout au long de son élaboration.*

*Un grand merci, à Mlle Asia ben Bouali étudiante en troisième année doctorat à (USTHB), Mr Youcef technicien supérieur (ENSSMAL), Mr Makki technicien supérieur et Mme Nabila ingénieur au laboratoire de chimie marine (ENSSMAL) à SIDI FRADJ, qui n'ont ménagé aucun effort pour m'assister durant la réalisation de ce travail, ainsi que pour leurs conseils et encouragements.*

*A l'ensemble du personnel de l'ENSSMAL, qui m'ont permis de réaliser cette étude dans les meilleures conditions et dans une bonne ambiance.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes parents qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours, à leurs encouragements et leurs nobles sacrifices.*

*Que tous mes amis et ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma réussite, puissent trouver ici, toute ma reconnaissance et mes plus vifs remerciements.*

# Table des matières

Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	

1-introduction.....	10
---------------------	----

## Chapitre I : recherche bibliographique

2- Sources de la chitine.....	13
3- Aspect économique.....	14
4- Intérêts de la chitine et de chitosane.....	15
5- Biosynthèse de la chitine.....	15
6- La chitine.....	15
6-1- Description et propriétés physico-chimiques.....	15
6-2- Structure chimique.....	16
6-3- Les propriétés biologiques.....	17
6-4- Production de la chitine par voie chimique.....	17
6-4-1- Déminéralisation.....	18
6-4-2- Déprotéinisation.....	18
6-4-3- Blanchiment.....	19
6-5- Les dérivés de la chitine.....	20
7- Le chitosane.....	21
7-1- Présentation du chitosane.....	21
7-2- Propriétés physico-chimiques.....	22
7-2-1- Degré de désacétylation.....	22
7-2-2- Solubilité.....	22
7-2-3- Poids moléculaire.....	23
7-2-4- Viscosité.....	23
7-3- Propriétés biologiques.....	23
7-3-1- Biodégradabilité.....	23
7-3-2- Cytocompatibilité.....	24

7-3-3- Hémocompatibilité.....	24
7-3-4- Toxicité systémique.....	24
7-3-5-activité antimicrobienne et antifongique du chitosane.....	25
7-4-Dérivés du chitosane.....	25
7-5-Caractérisation du chitosane.....	26

## **Chapitre II : Résultats et discussions**

1- Caractérisation de la carapace de crevettes broyées.....	28
2- Cinétique de déprotéinisation de la chitine .....	28
3- Caractérisation du chitosane.....	29
3-1- Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage.....	29
3-2- Caractérisation par diffractométrie aux RX.....	30
3-3- Caractérisation par spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier.....	32

## **Chapitre III : LES APPLICATION PHARMACEUTIQUE ET BIOMEDICALE DE LA CHITINE**

1- Ingénierie tissulaire.....	35
1.1- La cicatrisation.....	35
1.2- Les tissus vasculaires.....	36
2- La régénération de cartilage articulaire.....	38
3- L'activation du système immunitaire.....	39
3.1- Effet du chitosane sur les macrophages.....	40
3.2- Le chitosane et les cellules dendritiques.....	40
3.3- La vaccination orale.....	40
4- Les activités anti-tumorales du chitosane.....	41

5- Le chitosane comme antivirale.....	41
6- La micro-encapsulation.....	41
6.1- Les systèmes particuliers.....	42
6.2- L'encapsulation des molécules actives.....	43
7- La vectorisation de si ARN.....	44
8- L'hypercholestérolémie et le surplus de poids.....	45
9- le chitosane en ophtalmologie.....	45
10- L'activité anticoagulante du chitosane.....	45

**Liste des figures**

Figure 1 : Ventes de chitine en fonction des zones géographiques .....14

Figure 2 : La structure chimique idéale de la chitine .....16

Figure 3 : procédé d’obtention de la chitine.....17

Figure 4 : Procédé industriel de fabrication de la chitine et de ses dérivés .....19

Figure 5 : Molécules de la cellulose (a), de la chitine (b) et du chitosane (c).....21

Figure 6 : micrographe des membranes de chitosane par MEB du Chitosane pur ..... 26

Figure 7 : taux d’élimination de l’azote pour une concentration de NaOH 1.5 N à deux puissances 450 Watts et 600 Watts. ....28

Figure 8 : taux d’élimination de l’azote pour deux concentrations de NaOH 7.5 N et 10 N à deux puissances 450 Watts et 600 Watts.....29

Figure 9 : Observation par MEB de l’échantillon du chitosane à différents agrandissements.....30

Figure 10 : diffractogramme des RX des chitosanes préparés .....31

Figure 11 : spectre IR de du chitosane préparé avec du NaOH 10N à une puissance 800Watts.....33

Figure 12 : Evolution du degré de désacétylation en fonction de la durée de contact.....33

Figure 13 : Processus de cicatrisation .....35

Figure 14 : Dépose d’un pansement en non-tissé sur une plaie .....36

Figure 15 : Représentation d’une articulation normale (A), d’une articulation atteinte d’ostéoarthrite (B). Illustration tirée de <http://www.medicinenet.com/osteoarthritis...>38

Figure 16 : représentation schématique des microcapsules (a) et microsphères(b).....42

Figure 17 : préparation de nanoparticules de chitosane/si ARN selon différentes méthodes .....44

## Liste des tableaux

Tableau 1: sources potentielles de chitine .....	13
Tableau 2: tableau représente les différentes valeurs obtenues.....	28
Tableau 3 : Indice de cristallinité des chitosanes préparés.....	31
Tableau 4 : principaux bandes IR caractéristiques du chitosane préparé.....	32

## Liste des abréviations

GAG	Glycosaminglycane.
CEP	Cellules endothéliales progénitrices.
CML	Cellules musculaires lisses.
CH-PC	Chitosane-phosphorylcholine.
AINS	Nti-inflammatoires non stéroïdiens.
Glc	Glucosamine.
GlcNAc	N-acétyl-glucosamine.
PNIPAAm	Poly(Nisopropylacrylamide).
-CD	-cyclodextrine.
TGf-	Transforming Growth factor.
TNf	Tumor Necrosis Factor.
PDGF	Platelet Derived Growth Factor.

# Introduction

## 1-introduction

En l'espace d'un siècle, les polymères sont devenus incontournables dans notre vie quotidienne. Ils sont utilisés dans une multitude d'applications et il serait désormais difficile de s'en passer. La plupart des matériaux polymères sont élaborés à partir du pétrole. Cependant, cette ressource est en diminution progressive et l'on atteindra dans les prochaines décennies un pic pour lequel la demande, tirée à la hausse par le développement des pays émergents, sera supérieure à l'offre. En outre, en ce début de siècle, les enjeux sociétaux et environnementaux liés au changement climatique sont très importants. Dans ce contexte, le concept de développement durable est apparu à la fin du XXème siècle.

C'est pourquoi les polymères naturels reçoivent un intérêt grandissant auprès du monde académique et industriel. Ils sont en abondance, de nature très variée, et présentent souvent des caractéristiques intéressantes. Cependant, pour pouvoir remplacer à l'avenir une part non négligeable des polymères d'origine fossile par des biopolymères, de nombreux défis sont à relever. De très nombreuses études ont été conduites lors de la dernière décennie afin de développer des biopolymères plus performants.

Il existe une très grande diversité de biopolymères, parmi lesquels on trouve la famille des polysaccharides tels que l'alginate de sodium et le chitosane, issus des produits marins. Ces biopolymères constituent une alternative intéressante dans le cadre du remplacement des polymères issus de la pétrochimie, car ils possèdent des propriétés physicochimiques et biologiques importantes. Ces propriétés trouvent des applications ciblées dans des domaines très variés notamment dans les secteurs : biomédical, emballage, textile, l'agriculture, pharmaceutique et l'électronique.

Actuellement, il est connu que la chitine et le chitosane (collectivement appelés les substances chitineuses), sont des sources renouvelables que l'on peut trouver en abondance dans la nature. Ce fait a attiré plus d'intérêt pour le développement durable. Du fait que la chitine et le chitosane sont deux biopolymères produits par certains animaux. Elle est la composante principale d'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamards, ...), des cuticules des insectes. Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries.

La chitine est un poly (N-acétyl-glucosamine), appartenant à la famille des polysaccharides. C'est le deuxième polymère naturel très abondant dans la nature après la cellulose, avec laquelle il présente des ressemblances structurales. Elle est présente dans l'exosquelette des crustacés, des arthropodes marins, dans la paroi cellulaire de nombreuses espèces fongiques et dans des levures. Elle est biodégradable, biocompatible et non toxique, insoluble dans l'eau et dans de nombreux solvants organiques, ce qui réduit son utilisation.

Le chitosane, dérivé de la chitine par un traitement chimique ou biologique (déacétylation), génère des groupements amines (-NH<sub>2</sub>) chargés positivement et confère au chitosane une

nature cationique particulièrement intéressante dans un milieu acide. Le chitosane comporte plus de centres réactifs, grâce à ses fonctions alcool et amine. Ces dernières accordent au chitosane des propriétés primaires pour ses applications dans la médecine, la pharmacologie, la biotechnologie, ....

Le plan du présent travail comporte une partie introductive permettant une mise en contexte, une synthèse bibliographique pour situer la problématique et récapituler l'état d'avancement des connaissances dans ce domaine, une description succincte et une discussion des résultats obtenus lors du travail expérimentales d'ingéniorat, et finalement une récapitulation des principales conclusions issues de ce travail.

# Chapitre I

## Recherche bibliographique

## 2-Les sources de La chitine

La chitine se retrouve dans l'exosquelette et l'endosquelette d'animaux marins, la paroi cellulaire des champignons, certaines algues, des levures et des bactéries [1].

Les crustacés peuvent être définis comme des arthropodes mandibules, antennates à respiration branchiale, la cuticule contient approximativement 30-40% de protéines, 20-30% de chitine, 50% de carbonate de calcium et 5-19% de phosphate de calcium et de magnésium [2-3]. Les carapaces les plus exploitées sont celles des crevettes et des crabes à cause de leur teneur élevée en chitine qui représente 14-2% et 13-15%, respectivement [4].

Les champignons utilisés par l'industrie de la fermentation sont une deuxième source de chitine exploitée commercialement. Ces industries produisent, entre autres, des antibiotiques et de l'acide citrique. Dans ce cas, la chitine est extraite des parois des microorganismes après leur utilisation en fermenteur [5]. Chez les insectes, la chitine constitue 1,4% du poids frais de l'animal, ce qui explique l'absence d'exploitation [6].

Bien que les sources potentielles de chitine soient très nombreuses (Tableau1), elle est essentiellement produite aujourd'hui à partir des carapaces de crevettes. Pendant longtemps, ces déchets n'étaient pas récupérés et étaient simplement rejetés à la mer après décorticage. La production de chitine permet de valoriser les déchets de l'industrie agroalimentaire en évitant qu'ils soient rejetés à la mer, ce qui engendre des problèmes de pollution car les carcasses des arthropodes sont très résistantes à la biodégradation [7].

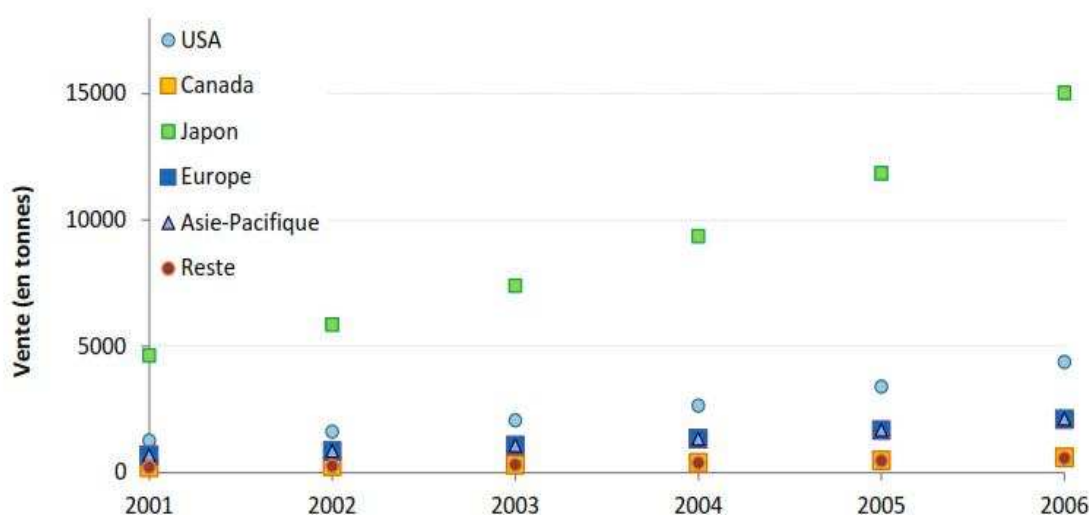
**Tableau 1: sources potentielles de chitine [8].**

Sources	Sites de présence	Teneur en chitine (en % *)
<b>Arthropodes :</b>		2 - 72
- Crustacés	- Exosquelette	
- Insectes	- Cuticule	
- Arachnides		
<b>Mollusques :</b>		6 - 40
- Seiches	- Coquille	
- Pieuvres/calamars		
<b>Pogonophores</b>	- Tubes	33
<b>Cnidaires</b>	- Capsules d'œuf	3 - 30
	- Membranes	
<b>Annélides :</b>		0,2 - 38
- Sangsue	- Soies	
- Lombric		
<b>Brachiopodes</b>	- Cuticules	4 - 30
	- Coquilles	
<b>Champignons</b>		3 - 20
- Levures	- Paroi cellulaire	
- Ascomycètes	- Tige	
- Pénicillium	- Spore	
- Blastocladiacés		
- Chytridiacés		

### 3- Aspect économique

Le degré de pureté de la chitine influence directement son prix de vente. En effet, les prix varient entre 10 et 2000 dollars la livre selon la pureté et les domaines d'applications spécifiques [9]. Dans le contexte actuel, les bénéfices économiques et l'exploitation à grande échelle de la chitine sont limités par les coûts de production [1].

Pour la plupart des applications, la chitine n'est pas utilisée directement. Elle est convertie, principalement en chitosane et chito-oligosaccharides. La production de chitine était de l'ordre de 25 000 tonnes en 2006, dont près de 8 000 tonnes pour sa conversion en chitosane [10]. En 2000, 10 000 tonnes de chitine étaient produites [11], dont près de 6 667 T pour la fabrication de glucosamine, 2 667 T pour le chitosane et 1 000 T pour les oligosaccharides. Le marché de la chitine n'a cessé de croître comme en témoigne la figure 1. Les ventes de chitine ont atteint près de 25 000 tonnes en 2006 [10].



**Figure1 : Ventes de chitine en fonction des zones géographiques [10].**

D'après la figure 1, le Japon domine nettement le marché de la chitine. Il participe à 61 % des ventes mondiales. Les perspectives annoncées à l'horizon 2015 maintiennent globalement ces écarts entre les régions. La production de chitine atteindrait près de 63 000 tonnes [10].

Les applications du chitosane sont largement dominées par le secteur du traitement de l'eau, qui atteint plus de 4 000 tonnes consommées en 2006. Ce secteur est suivi par celui de la cosmétique, de l'agroalimentaire, du médical et de l'agrochimie. Les autres secteurs tels que la biotechnologie, la papèterie, le textile et la photographie représentent de faibles volumes de ventes. Les prévisions évolueraient peu à l'horizon 2015 [10].

## 4- Intérêts de la chitine et de chitosane

La demande mondiale en chitine et chitosane connaît un essor grandissant depuis la dernière décennie avec une production actuelle provenant principalement du Japon, de l'Inde et de la Norvège. La chitine offre l'avantage d'être un polymère naturel, non toxique et inerte dans le système gastro-intestinal des mammifères [12].

Déplus, la chitine et ses dérivés sont biodégradables, si l'on tient compte de la profusion d'organismes qui possèdent des chitinases et chitosanases capables de les dégrader. En fin, 95% de la chitine et du chitosane proviennent des déchets de l'industrie de la pêche et de la culture des mycètes, ce qui permet d'utiliser et de valoriser des sources qui seraient autrement des sous-produits polluants [11].

## 5- La biosynthèse de la chitine

Dans les organismes vivants la chitine forme des microfibrilles qui sont enchâssées dans une matrice protéique (contenant du carbonate de calcium) avec un diamètre variant généralement de 2.5 à 2.8 nm. Chez les crustacés, on observe toutefois des microfibrilles atteignant les 25 nm de diamètre [13].

La biosynthèse de la chitine fait intervenir des enzymes nommées chitine-synthases (CS), de la famille des glycotransférases. Elles catalysent l'association de deux monomères de N-acétyl-glucosamines. La biosynthèse est divisée en trois étapes distinctes. Au cours de la première étape, l'enzyme se place le long de la membrane cytoplasmique et oriente convenablement le polymère vis-à-vis de son site actif. La seconde étape est la translocation du polymère à travers la membrane. Il est alors libéré dans l'espace extracellulaire. La dernière étape permet l'assemblage de plusieurs polymères en microfibrilles cristallines [14].

## 6- La chitine

### 6-1- Description et propriétés physico-chimiques

La chitine est un polysaccharide linéaire composé de sous-unités de N-acétyl-glucosamine reliées par des liens glycosidiques (1-4) (Figure 2) [15]. Certains copolymères de sous-unités de N-acétyl-glucosamine et de sous-unités de glucosamine [16-17]. Elle peut donc varier dans son degré de polymérisation (DP) et d'acétylation (DA), mais aussi dans son degré de liaison avec divers glycanes et protéines [18]. On la retrouve généralement sous une forme cristalline agencée en microfibrilles ordonnées, l'agencement des microfibrilles se fait selon deux patrons ; la chitine avec les chaînes de polymères agencée d'une façon antiparallèle et la chitine dont les chaînes sont placées de façon parallèle [19-20]. C'est cet arrangement des microfibrilles qui procure à la chitine des propriétés de robustesse et d'insolubilité. Après la cellulose la chitine est le bio polymère le plus abondant dans la nature avec une production d'au moins 10 G tonne par année [21].

On parlera de chitine lorsque DA est supérieur à 70% [6]. Cependant, une désacétylation peut avoir lieu au cours de l'extraction de la chitine, on parle alors du degré de désacétylation qui varie en fonction de l'origine et la méthode d'extraction de la chitine [22]. Le degré de désacétylation (DD), défini comme étant le nombre de groupes D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités, est relié au DA ( $DD = 100 - DA$ ). C'est un paramètre structural important qui influence les propriétés physico-chimiques de la chitine (poids moléculaire, viscosité, solubilité, l'activité physiologique, la réactivité chimique et la biodégradabilité,...) [23-24].

Sous sa forme cristalline, la chitine est un robuste bio polymère insoluble dans presque tous les solvants sauf quelques acides très concentrés et certains solvants organiques halogènes [25-26]. La forme  $\beta$  est de loin la plus répandue dans la nature et constitue le principal composant de la paroi cellulaire des mycètes, de la carapace des crustacées et de la cuticule des insectes. La forme  $\alpha$  se retrouve sous forme liée à des protéines pour former la plume des céphalopodes ou des tubes sécrétés par certains vers marins. Les propriétés d'insolubilité et de robustesse de la chitine cristalline sont dues à l'alignement des microfibrilles qui la composent et qui forment des feuillets reliés par des ponts hydrogènes provenant des groupements acétamides (Figure 2). Les feuillets de polymères qui composent les microfibrilles de la chitine ne sont pas retenus entre eux par des ponts hydrogènes ce qui lui permet une certaine perméabilité à certains éléments sans toutefois la rendre soluble [26].

## 6-2-Structure chimique

La chitine est un bio polymère linéaire qui a une structure similaire à la cellulose, mais c'est un polysaccharide ayant des groupements acétamide en position C-2 à la place des hydroxyles (figure 2). Sa structure chimique est un enchaînement d'unités monomères N-acétyl-D-glucosamine reliées par une liaison glycosidique (1 $\rightarrow$ 4). La nomenclature définit cette structure comme celle d'un poly [-(1 $\rightarrow$ 4)-2 acétamido-2déoxy-D-glucopyranose]. En fait, le terme chitine est donné à tout copolymère formé d'unités constitutives N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine dont le degré d'acétylation est supérieur à 50% [8].

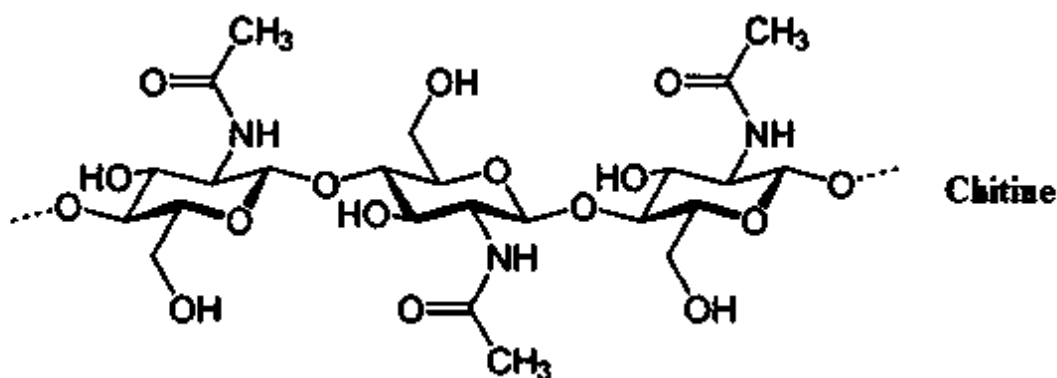


Figure 2. La structure chimique idéale de la chitine [27].

### 6-3- Les propriétés biologiques

La dégradation biologique de la chitine est réalisée par une série d'enzymes : chitinases, lysozyme et glucanases [28-29-30]. Parmi les chitinases, les Endo-chitinases hydrolysent le polymère de façon aléatoire pour produire des dimères et des trimères de N-acétylglucosamine (NAG), tandis que les exo-chitinases [31] hydrolysent la chitine de haut poids moléculaire en produisant uniquement des dimères de NAG. Finalement, les N-acétylglucosaminidases aussi appelées chitobiasés ou N-acétylhexoaminidases hydrolysent les dimères de NAG et parfois le NAG des extrémités non-réductrices des chaînes de chitine pour produire des monomères de NAG [5].

### 6-4- Production de la chitine par voie chimique

L'extraction chimique consiste en un traitement acide pour la déminéralisation et un traitement alcalin pour la déprotéinisation. Les autres composés minoritaires sont supposés être entraînés au cours de ces deux réactions. La déminéralisation précède généralement la déprotéinisation car l'inverse aurait un impact sur le DP et le DA du polymère [32]. Entre chaque étape, le produit est rincé abondamment à l'eau déminéralisée. La figure 3 schématise un exemple de production de chitine et de ses dérivés.

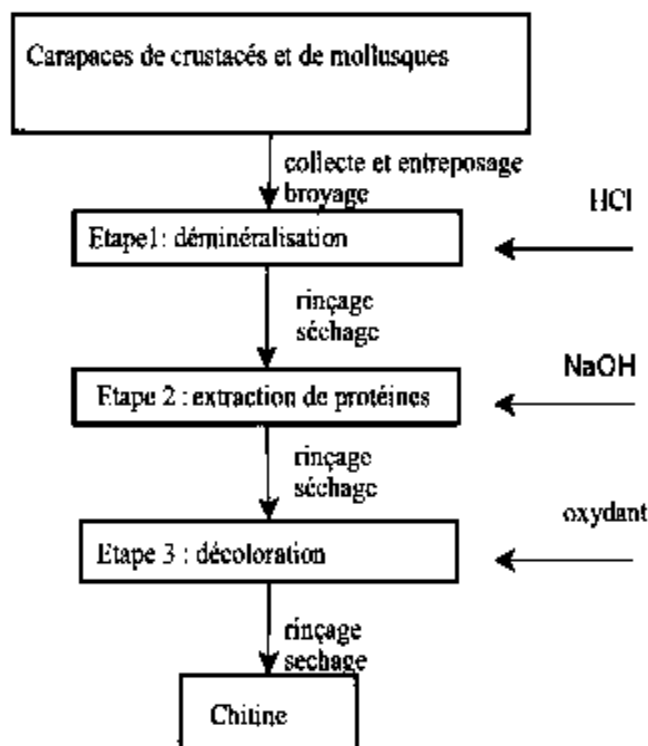


Figure 3 : procédé d'obtention de la chitine

### 6-4-1- Déminéralisation

Le traitement acide élimine les minéraux, qui passent en solution sous forme de sels. Pour des raisons économiques, l'acide hydrochloridrique (HCl) est privilégié. La concentration minimale, pour mener cette étape, est déterminée par l'équation chimique (I) de la réaction entre l'élément minéral majoritaire, le carbonate de calcium, et le HCl. En principe, la déminéralisation est complète dès lors où les proportions sont stoechiométriques, mais dans les faits, les entreprises utilisent des solutions en excès.



Les concentrations en HCl rencontrées sont comprises 0,5 et 11 N et le ratio substrat/solvant entre 1:10 et 1:40. La déminéralisation dure entre 15 min et 48 h, de la température ambiante à 50 °C [33-34].

Il faut prendre garde à la production de mousse, causée par le dégagement de CO<sub>2</sub>. Elle peut être limitée par l'ajout d'un agent anti-moussant [35]. La déminéralisation est suivie par une étape de rinçage car le produit doit atteindre la neutralité avant l'étape suivante.

**Degré de déminéralisation :** est un indicateur de la performance de la déminéralisation, il est défini par la formule suivante [32] :

$$\%DM = \frac{(A_o M_o) - (A_r M_r)}{A_o M_o} * 100$$

-%DM est le degré de déminéralisation.

-M<sub>o</sub> et M<sub>r</sub> sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé.

-A<sub>o</sub> et A<sub>r</sub> sont les pourcentages de cendres dans le produit initial et résiduel respectivement.

### 6-4-2- Ladéprotéinisation

Un traitement basique permet d'éliminer les protéines par solubilisation. Les réactifs employés pour cette étape sont des bases fortes comme l'hydroxyde de potassium (KOH). Le plus courant, pour des raisons d'économie et technique, est l'hydroxyde de sodium (NaOH). Les concentrations utilisées sont comprises entre 0,3 et 2,5 M, selon un ratio compris entre 1:10 et 1:40. La température est comprise entre 50 et 110 °C et la durée peut varier de 1 h à plus de 24 h [33-34]. Ces deux paramètres sont liés, ainsi la durée doit être augmentée si la température est baissée, et réciproquement.

L'augmentation de la concentration, de la durée et de la température de réaction, améliorent la déprotéinisation [36]. Cependant, tout comme la déminéralisation, les conditions drastiques de la déprotéinisation modifient la structure native de la chitine. Par conséquent, le choix du couple temps-température est dicté par les caractéristiques de la chitine à obtenir.

Les modifications que peuvent entraîner des conditions trop drastiques concernent la perte de poids moléculaire ou l'oxydation des extrémités réductrices [37].

**Degré de déprotéinisation :** est un indicateur pour suivre l'efficacité de la réaction, il est défini par la formule suivante [32] :

$$\%D_{Prot} = \frac{(P_0M_0) - (P_rM_r)}{P_0M_0} * 100$$

- $\%D_{Prot}$  est le degré de déprotéinisation.

- $M_0$  et  $M_r$  sont les masses initiale et résiduelle du produit hydrolysé.

- $P_0$  et  $P_r$  sont les pourcentages de protéines dans le produit initial et résiduel respectivement.

Il existe peu d'études sur la nature et l'organisation des protéines dans les cuticules des crustacés [38]. Les compositions en acides aminés sont mesurées dans certains coproduits de crevettes, tels que *Parapenaeopsis stylifera* [38], *Penaeus vannamei* [39] et *Penaeus monodon* [40]. La composition diffère d'un substrat à l'autre. Généralement, le glutamate et la glutamine, dosés ensemble, sont majoritaires. L'acide aspartique/l'asparagine, l'arginine, l'alanine, la leucine, la valine et la proline sont abondants. Tandis que le tryptophane, la tyrosine, la cystéine, l'histidine et la méthionine sont faiblement présents. Mura et al., [41] comparent l'évolution de la composition en acide aminé entre l'étape juvénile et adulte de *Chirocephalus kerkyrensis* et *C. diaphanus*, deux branchiopodes. Ils n'observent pas de modification sauf une augmentation d'arginine.

### 6-4-3- L'étape de blanchiment

Cette étape est optionnelle, elle n'est pas nécessaire si le barème temps-température penche en faveur d'une longue durée. Cependant, il est très difficile d'obtenir un produit pur à cause des fortes interactions entre la chitine, les pigments et les protéines. Une autre cause de coloration des produits peut être la réaction de Maillard qui implique les groupes azotés et les aldéhydes [42].

Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %, il peut également être mélangé avec du HCl. La durée du traitement est souvent très courte, de l'ordre de quelques minutes [33]. En effet, tout comme les deux précédentes étapes, les conditions de décoloration induisent une altération de la structure de la chitine, qui se traduit par une réduction du poids moléculaire. Les autres agents de blanchiment sont l'hypochlorite de sodium (NaClO), le permanganate de potassium ( $KMnO_4$ ), l'acétone, l'éthyle-acétate et l'acide oxalique [43-44-45]. Du et al., [46] utilisent le peroxyde d'hydrogène pour hydrolyser le chitosane, afin d'augmenter sa solubilité, et privilégient l'éthanol pour le blanchiment.

### 6-5- Les dérivés de la chitine

L'hydrophobicité de la chitine limite son utilisation [47-48]. Pour y remédier, des dérivés de chitine ont été mis en évidence par modification de sa structure chimique. Ces modifications peuvent être une désacétylation par élimination du radical acétyle, une substitution du polymère avec un composé chimique ou une réaction d'hydrolyse (Figure 4).

La chitine est modifiée pour obtenir des polysaccharides amphiphiles de structure contrôlée qui peuvent être cationiques (chitosane) ou anioniques (carboxyméthyle chitine) [49].

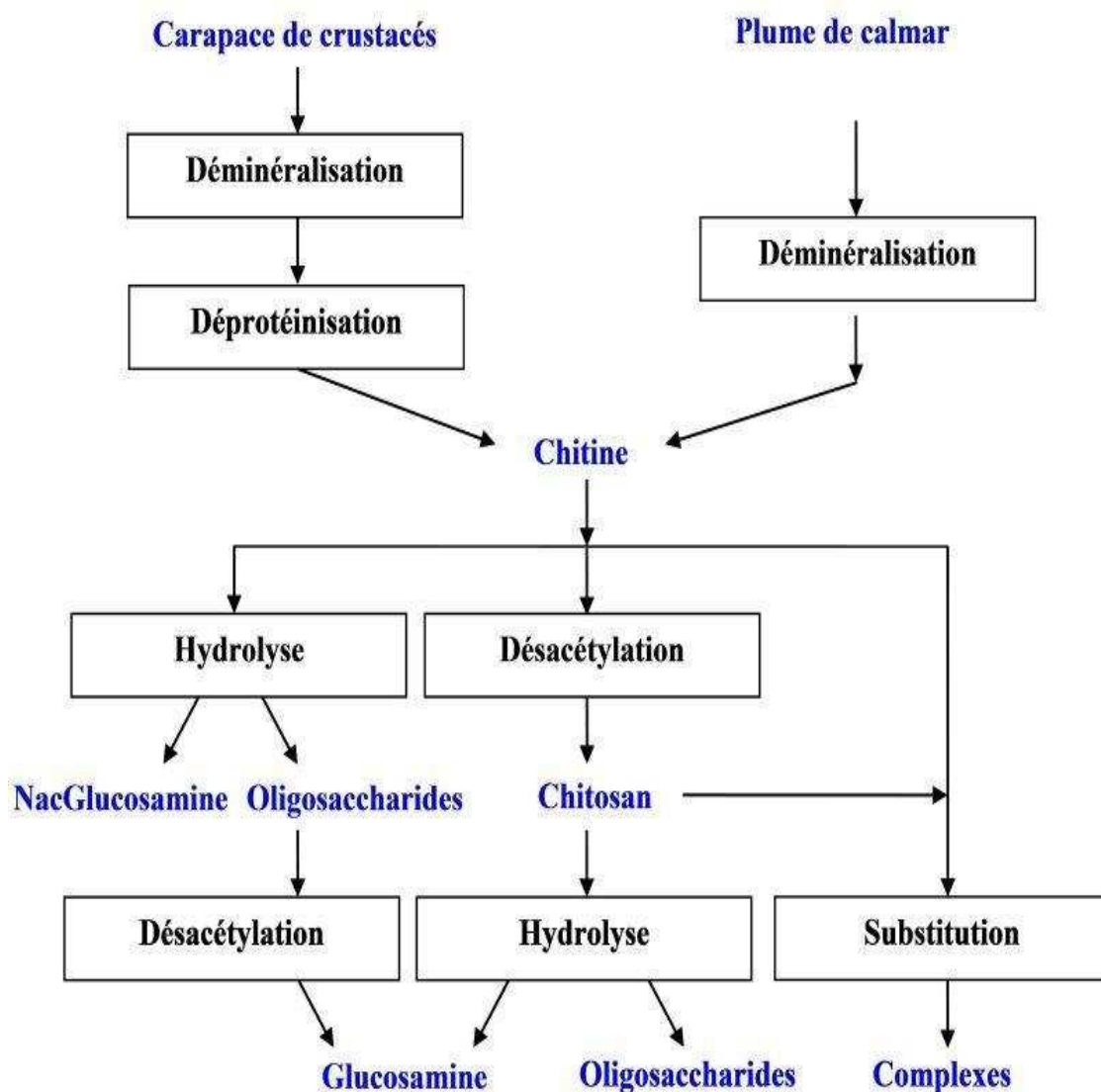
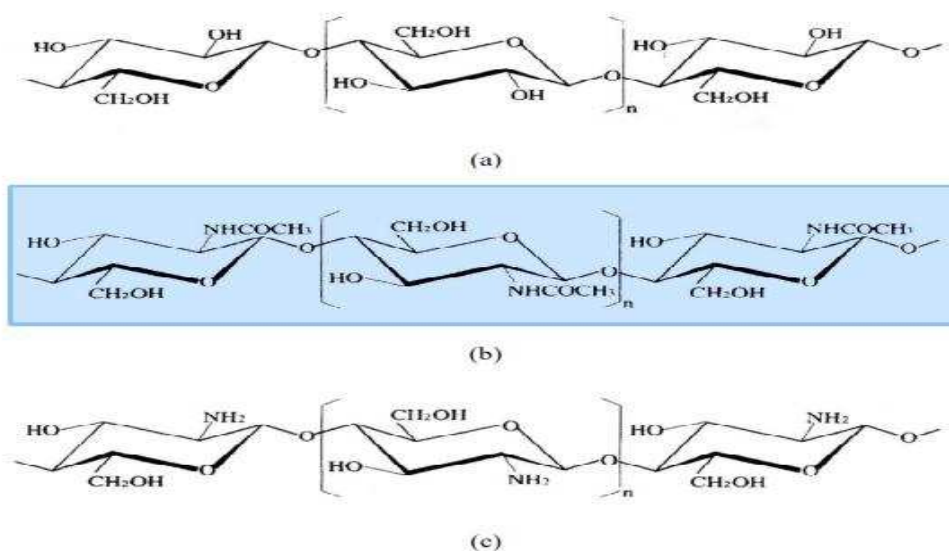


Figure 4 : Procédé industriel de fabrication de la chitine et de ses dérivés [50].(France Chitine)

## 7- le chitosane

### 7-1- Présentation du chitosane

Le chitosane est un polymère naturel de la famille des polysaccharides [51]. De structure linéaire, c'est un bio polymère cationique de glucosamine partiellement acétyle [52]. Le chitosane est un copolymère linéaire à arrangement aléatoires d'unités D-glucosamine et d'unités N-acétyl-D-glucosamine [53-54], reliées par des liaisons (1→4) qui lui confèrent de bonnes caractéristiques filmogènes [55] (figure 5). Le terme chitosane est habituellement utilisé quand les polymères sont solubles dans une solution d'acide dilue [56].



**Figure 5 :** Molécules de la cellulose (a), de la chitine (b) et du chitosane (c) [57].

La figure 5 représente les motifs de la cellulose, de la chitine et du chitosane. Leurs structures diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C<sub>2</sub> ; hydroxyle pour la cellulose, acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane.

Le chitosane a trois types de groupes fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>6</sub> respectivement (Figure 5). Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés intéressantes très différentes de celles de la chitine. Le chitosane, soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement [58].

Le chitosane est un composé naturel, non toxique, biodégradable, possédant des propriétés antibactériennes. Il est disponible sous forme des solutions, granules, poudre et fibre. Il a une grande masse moléculaire qui varie entre 50 à 1000 kDa selon la source et le procédé de préparation. Le chitosane disponible sur le marché a un DDA de 70 à 90%. Le DDA est une des caractéristiques les plus importantes du chitosane puisqu'il peut influencer non seulement

ses propriétés physicochimiques, mais aussi sa biodégradabilité et son activité immunologique [59].

## 7-2- Propriétés physico-chimiques

### 7-2-1- Degré de désacétylation

Le chitosane est défini par son degré de désacétylation. Ce dernier représente la proportion d'unité de glucosamine par rapport au nombre total d'unités qui composent le biopolymère. Lorsque cette valeur est au-dessus de 50%, le biopolymère obtenu est nommé chitosane et en dessous de 50% le biopolymère est toujours considéré comme étant de la chitine. Le degré de désacétylation du chitosane est responsable de sa solubilité dans les acides organiques ( $2 < \text{pH} < 6$ ). La solubilité du chitosane nécessite un passage en solution acide ( $\text{pH} < 6$ ) en raison de la protonation des groupes amines. Le polymère de chitosane peut par la suite être neutralisé afin de permettre une meilleure biocompatibilité avec les tissus [60].

Un haut degré de désacétylation confère à la structure une plus grande proportion de groupes chargés positifs à pH neutre ainsi qu'une surface étendue attribuable à la répulsion des charges. Ces caractéristiques permettent aux cellules d'adhérer plus facilement au biopolymère puisque les cellules s'attachent de façon non spécifique par des interactions électrostatiques se produisant directement entre les groupes amines ( $\text{NH}^{3+}$ ) et certains groupes de la membrane cellulaire chargés négativement [61].

D'ailleurs, des études ont démontré que l'adhésion cellulaire est corrélée avec le degré de désacétylation du chitosane [62]. De plus, puisque le chitosane ne possède pas de sites spécifiques aux intégrines pour lier les cellules, il est possible de retrouver le chitosane modifié par certaines protéines afin de favoriser l'adhésion cellulaire. La structure poreuse des biopolymères de chitosane favorise la migration des cellules à travers les canaux et présente une organisation idéale pour la thérapie vasculaire dirigée [63].

### 7-2-2- La solubilité

Le chitosane est insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées, par contre, soluble dans la plupart des solutions organiques acides [11]. L'acide le plus couramment utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué. En générale, le chitosane est parfaitement soluble à pH 3-4, les groupes aminés du chitosane sont protonés et le polymère chargé positivement devient soluble. En revanche il est relativement stable en milieu acide concentré, même s'il se dégrade après une longue exposition. La solubilité du chitosane est un paramètre très difficile à contrôler [26].

Contrairement à la chitine, le chitosane est soluble en solution acide grâce à la présence des groupements amines libres qui sont exposés et disponibles pour former des liens hydrogènes avec le solvant. Ceci confère au chitosane la propriété rarissime d'être un polymère basique

contrairement à la plupart des autres biopolymères naturels comme la cellulose, le dextrane, l'agar ou la pectine qui sont plutôt de nature acide ou neutre [21].

En raison de sa solubilisation en solution acide, le chitosane se comporte comme un poly-électrolyte cationique de forte densité de charge. Ses propriétés dépendent du pH du milieu. Le chitosane est solubilisé et il devient cationique quand le pH est inférieur au pKa intrinsèque de la fonction amine du chitosane soit 6,3 [64].

### 7-2-3- Poids moléculaire

Le chitosane est un polymères qui peut atteindre des poids moléculaires (PM) élevés ,atteignant jusqu'à 1-3 Mda dans le cas des produits obtenus par des processus contrôlés d'extraction et de désacétylation .dans le cas du chitosane commercial pour des applications dans le domaine du traitement des eaux le poids moléculaire est généralement plus faible (compris entre 100 et 500 KDa) [65].

### 7-2-4- L'viscosité

La viscosité du chitosane dépend du degré de désacétylation (DD) de ce polymère. Plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante. La viscosité dépend également : de la concentration du polymère (elle augmente avec la concentration), de la température (elle chute lorsque la température augmente), du poids moléculaire (la viscosité intrinsèque augmente en fonction de l'augmentation du poids moléculaire) et enfin du pH (plus il est bas plus la viscosité est élevée) [66].

## 7-3-propriétés biologiques

### 7-3-1- Biodégradabilité

La biodégradation et la biorésorption sont assurées par des enzymes hydrolysant le chitosane en oligomères. Cependant le ou les mécanismes d'action ne sont pas encore clairement définis. Chez l'homme et les mammifères, ce rôle est assuré principalement par des lysozymes [67] qui dégradent les liaisons (1 4) glycosidiques des unités N-acétyl glucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Un chitosane de DA 50% est ainsi facilement dégradé *in vivo* dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps [68].

La dégradation dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharide (DA, masse molaire...) [69]. L'influence de la structure cristalline, de l'agrégation des N-acétyl-glucosamines et de leur distribution a été mise en évidence [28]. Une étude plus approfondie a montré d'abord une augmentation de la susceptibilité enzymatique pour les DA supérieurs à

50%, puis une diminution avec le DA, et finalement une absence de dégradation pour un chitosane de DA3% [70]. Cette influence du DA est également constatée, *in vitro* (dégradation par des lysozymes) et *in vivo* (implantation sous cutanée) [71]. Un chitosane de DA 50% semble donc permettre une dégradation optimale.

### 7-3-2- Cytocompatibilité

La cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes, des kératinocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes a été démontrée *in vitro*. Des travaux montrent que, quel que soit le DA (2-50%), la mise au contact prolongée de films de chitosane avec les deux premiers types de cellules n'induit ni la destruction, ni la croissance anarchique de celles-ci, et qu'aucune substance cytotoxique n'est relarguée dans le milieu [61]. Le même comportement est constaté dans le cas de cultures de chondrocytes et de kératinocytes sur un film de chitosane de DA 2,5% [72] et de culture de chondrocytes et d'ostéoblastes sur une surface similaire de DA 10% [73]. Lors de cultures cellulaires sur un film de chitosane, la croissance des cellules dépend des caractéristiques et de la source du chitosane [74-75].

### 7-3-3- Hémocompatibilité

Elle correspond à la mesure du degré et de la durée des altérations de l'hémostase causée par un biomatériau. Tandis que le chitosane montre une activité hémostatique particulièrement sous forme d'un solide de haute masse, les oligomères de chitosane hydrolysé de faible masse molaire soluble dans l'eau ne présentent aucune activité thrombogène [76]. Le chitosane a la capacité d'induire la formation d'un coagulat lorsqu'il est en contact avec des érythrocytes, même dans le cas du sang hépariné [77]. Cet effet hémostatique du chitosane est attribué à un mécanisme indépendant de la cascade de coagulation classique. Il entraîne l'agglutination des érythrocytes de toutes les espèces, certainement en raison de ses propriétés polycationiques qui interfèrent avec la surface chargée négativement des cellules [78]. L'activité du chitosane peut être modulée en modifiant chimiquement le polymère. Un effet anti-thrombogène est ainsi obtenu après N-acétylation avec de longues chaînes carbonées [79].

### 7-3-4- Toxicité du chitosane

Concernant la toxicité du chitosane, les études actuelles démontrent que d'une façon générale le chitosane est un produit biocompatible et n'est relativement pas toxique. De plus, il paraît important de préciser que les écailles de chitosane ne sont naturellement pas des produits exempts de germes, 500 000 germes par gramme de produit brut sont dénombrés ce qui correspond aux composés polysaccharidiques obtenus à partir d'algues par exemple [80]. Les études réalisées avec des doses aiguës et des doses répétées de chitosane et autres composés de la même famille (incluant des copolymères de glucosamine de chitosane et du N-acétyl-glucosamine) montrent que pour des doses de l'ordre du gramme par kilogramme, le chitosane n'est pas toxique (sans effet évident sur un organe cible en particulier) [81].

Le chitosane ne semble pas provoquer de phénomène d'irritation locale ni de réaction immunologique, autre que celle naturellement induite suite à l'introduction d'un élément étranger dans l'organisme. Cependant, il serait intéressant d'effectuer des tests de sensibilisation pour évaluer la potentialité de survenue d'éventuelles réactions allergiques qu'iseraient légitimes compte tenu de son origine (crustacées) [81].

### **7-3-5- Activité antimicrobienne et antifongique du chitosane**

Le mécanisme exact de l'action antimicrobienne du chitosane est encore inconnu mais certains mécanismes ont été proposés. L'activité antibactérienne du chitosane serait due essentiellement à la charge positive du chitosane qui interagit avec les phospholipides membranaires chargés négativement [82]. L'interaction crée une perturbation au niveau de la membrane avec une diminution des échanges de nutriments entre la bactérie et le milieu extérieur qui entraîne la mort cellulaire [58]. Par ailleurs, Helander et al. (2001)[83] ont prouvé que la clé de l'activité antimicrobienne du chitosane provient de la charge positive des groupements amine du carbone C2 (structure polycationique à pH < 6,3). Le même résultat a été montré par Tsai et Su (1999) [84] pour lesquels le mécanisme d'action antimicrobienne de chitosane est dû aux interactions entre les cations du chitosane et les anions à la surface des bactéries qui modifient la perméabilité de la membrane cellulaire. De plus, le chitosane semblerait interférer et perturber la synthèse des ARN messagers en interaction avec l'ADN [58-85].

En ce qui concerne l'activité antifongique, le chitosane peut interagir avec la membrane des cellules pour altérer leur perméabilité. Par exemple, la fermentation avec la levure boulangère est inhibée par certains cations, qui agissent sur la surface des cellules de la levure en empêchant l'entrée du glucose. L'analyse par absorption UV a indiqué que le chitosane provoque considérablement une perte de matériels protéiques de *Pythium aroecandrum*[86].

### **7-4- Dérivés du chitosane**

Il est possible d'agrandir le champ des applications du chitosane par divers types de modifications (fonctionnalisation et/ou réticulation). De façon générale, l'utilisation du chitosane est restreinte par ses propriétés mécaniques insuffisantes à l'état natif pour des applications plus larges dans divers domaines tels que pharmaceutique ou biomédical. On peut ainsi utiliser les propriétés biocompatibles du chitosane tout en le modifiant chimiquement et l'exploiter sous différentes formes tels que des comprimés, des hydrogels, des films, des billes ou encore sous forme de nanoparticules [87].

Différents types de modifications sont possibles dépendamment des propriétés désirées. On peut stabiliser un biomatériau par réticulation, réaction consistant à intercroiser les chaînes polymériques par l'intermédiaire de liens covalents ou ioniques. Ce processus

permet notamment d'améliorer les résistances thermiques, mécaniques et liées à l'hydrolyse (acide, basique ou enzymatique) du polymère [88].

La fonctionnalisation des polymères consiste à introduire des fonctions déterminées par couplage covalent de certains composés chargés positivement ou négativement ou hydrophobiques. Ces modifications amènent fréquemment à un changement conformationnel du polymère, offrant ainsi de nouvelles propriétés biologiques et physiques. Elles permettent notamment d'augmenter la solubilité et la miscibilité du chitosane permettant la stabilisation de divers systèmes [89].

### 7-5- Caractérisation du chitosane

La technique de la spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy). C'est une des techniques les plus utilisées pour l'identification des matériaux. Elle est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau à analyser. Elle permet également via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau [90].

La viscosimétrie capillaire est la technique la plus utilisée pour la détermination du poids moléculaire du chitosane. Par définition, la viscosité est le rapport entre le temps ( $t_{\text{solution}}$ ) que prend une solution de polymère (chitosane) à un volume donné pour passer à travers un capillaire fin et le temps ( $t_{\text{solvant}}$ ) de passage du solvant à travers le même capillaire. Les deux temps de reflux sont proportionnels à la viscosité ( $t_{\text{solution}}$  et  $t_{\text{solvant}}$ ), et inversement proportionnels à la densité [91].

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface, par exemple (figure 6).

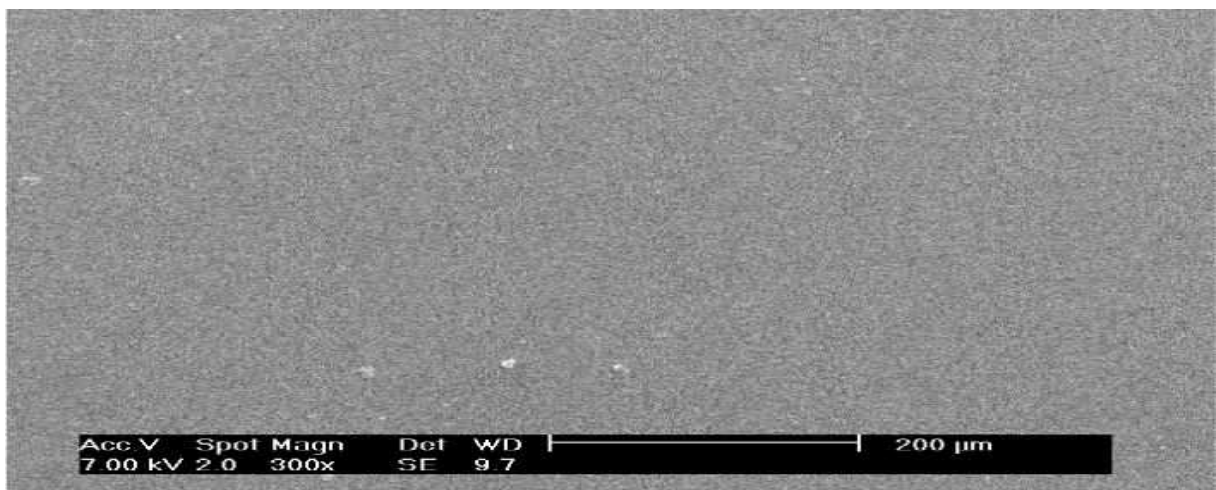


Figure 6 : micrographie des membranes de chitosane par MEB [91].

# Chapitre II

## Matériels et méthodes

# RESULTATS ET DISCUSSION

(De la partie expérimentale de l'ingéniorat)

## I- CARACTERISATION DE LA CARAPACE DE CERVETTES BROYEES

Dans le tableau 2, nous avons rassemblé les valeurs obtenus pour le taux en cendres contenues, l'humidité et le taux en lipide.

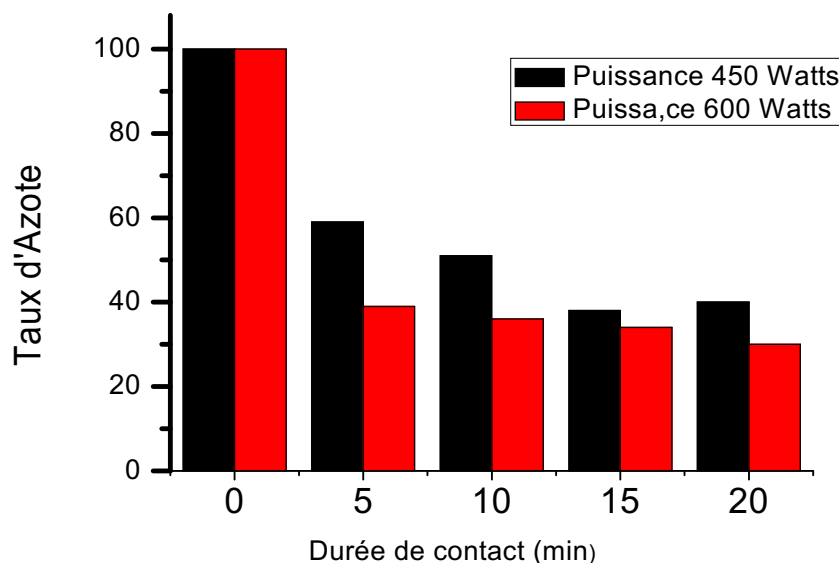
**Tableau 2 : tableau représente les différentes valeurs obtenues**

Paramètre	Matière humide
Taux de cendre (%)	45,54
Humidité (%)	7,12
Taux de lipide	1,6

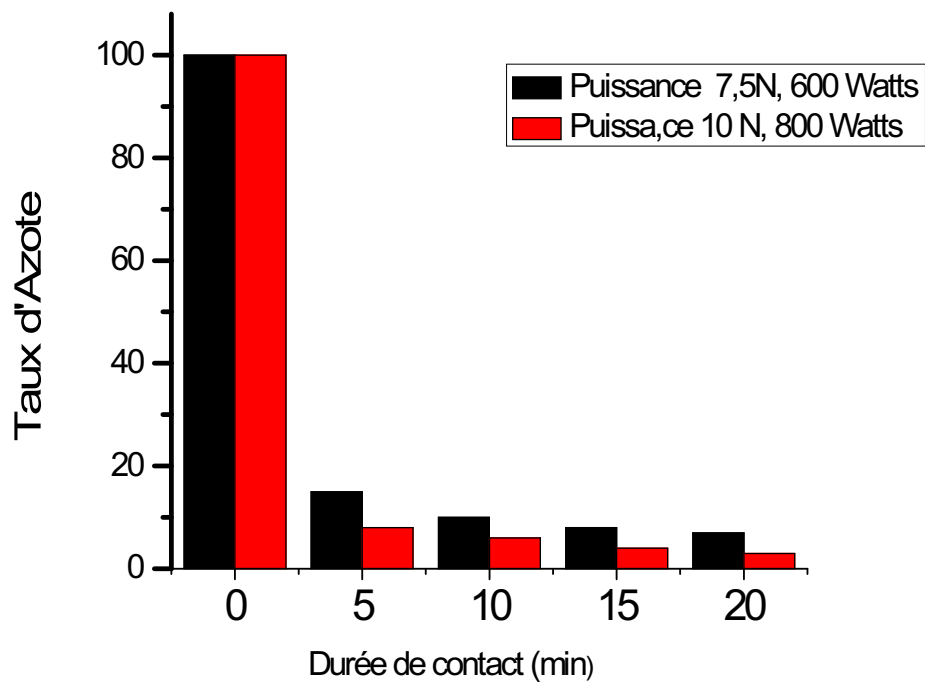
## II – CINETIQUE DE DEPROTENEISATION DE LA CHITINE

La cinétique de déprotéinisation de la chitine a été suivi par l'analyse de l'azote en utilisant la balance analytique. Nous constatons que la déprotéinisation dépend de la concentration de la soude, de la durée de contact et de la puissance des micro-ondes.

Il est à noter que la cinétique est très rapide qui est due à l'effet des micro-ondes.



**Figure 7 : taux d'élimination de l'azote pour une concentration de NaOH 1.5 N à deux puissances 450 Watts et 600 Watts.**

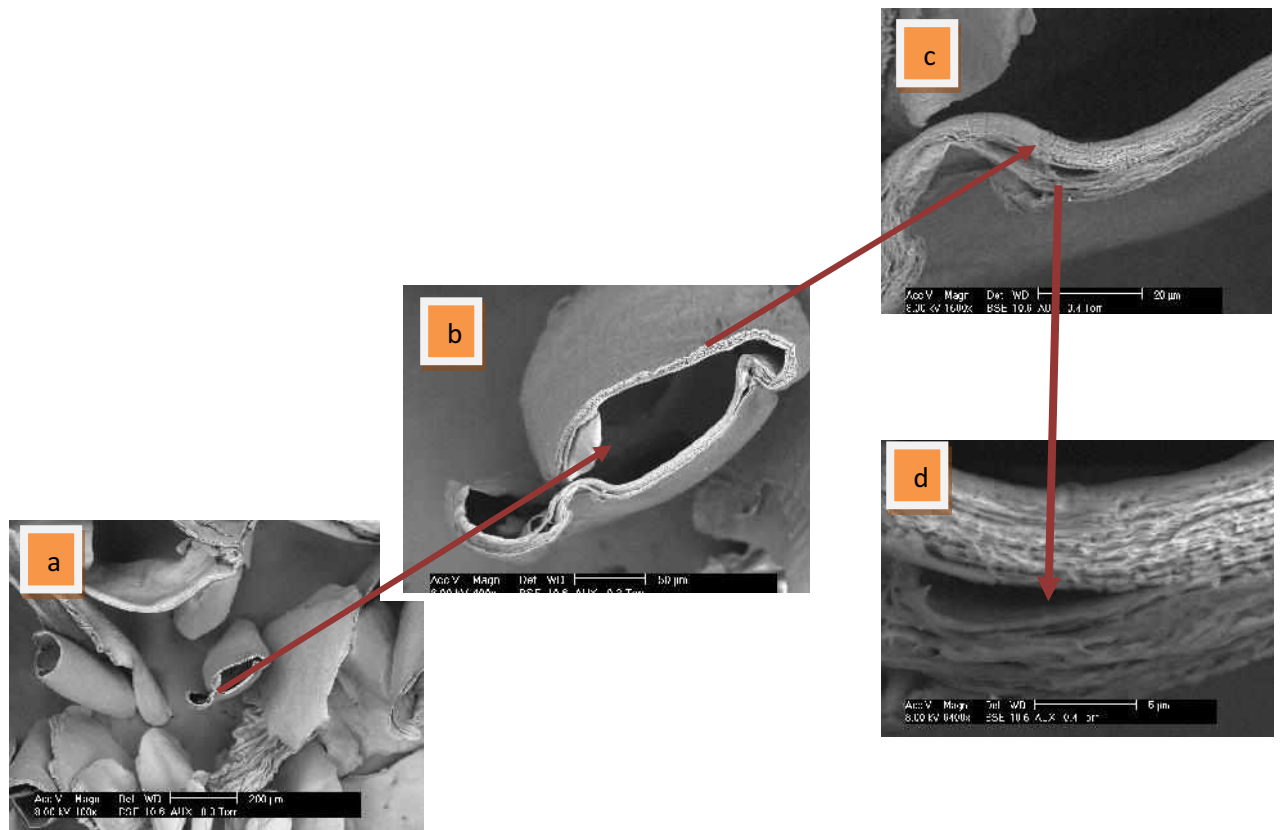


**Figure 8 :** taux d'élimination de l'azote pour deux concentrations de NaOH 7.5 N et 10 N à deux puissances 450 Watts et 600 Watts.

### III- CARACTERISATION DU CHITOSANE

#### III-1 Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage

Les images de la figure montrent la morphologie du chitosane à différents agrandissements. La morphologie du chitosane est formée de feuillets déposés les uns sur les autres.

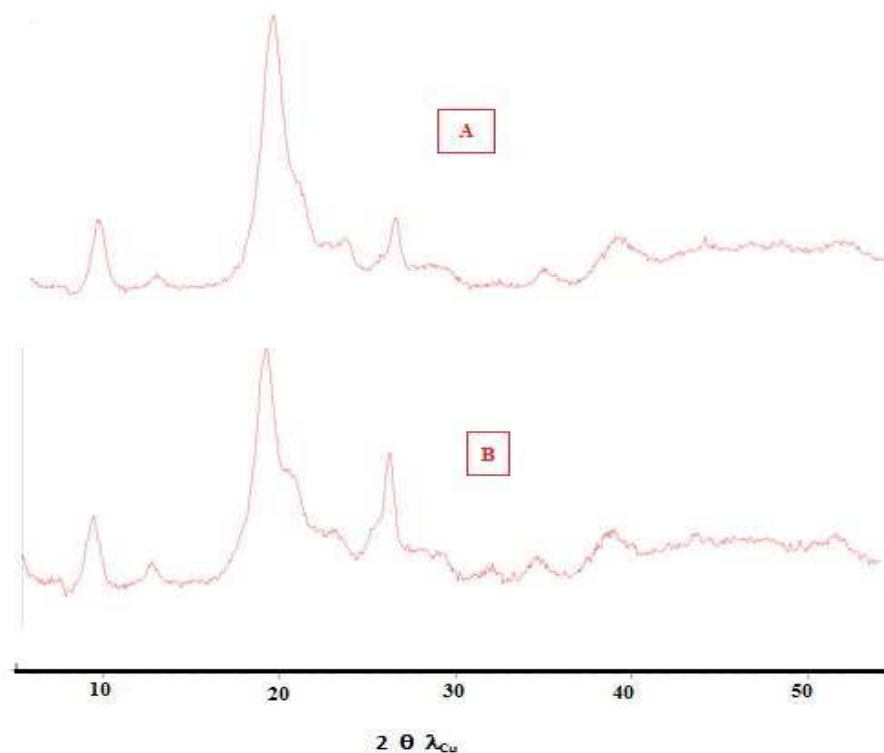


**Figure 9 : Observation par MEB de l'échantillon du chitosane à différents agrandissements.**

L'observation MEB (figure 20) montre que le chitosane est constitué des pores réguliers. Ils sont situés sur des plans superposés et permettent de distinguer des perforations perpendiculaires qui constituent des ouvertures traversées par des canaux. À cause de son aspect, cette structure est appelée « nids d'abeilles »). Les canaux sont formés de fibres composés de biopolymères.

### III-2- Caractérisation par diffractométrie aux RX

La figure représente deux diffractogrammes du chitosane obtenu par extraction assistée par les micro-ondes pour deux puissances.



**Figure 10 : diffractogramme des RX des chitosanes préparés**

Nous constatons que le chitosane diffracte les RX et donne l'objet à plusieurs raies caractéristiques du produit cristalline pures. Globalement, les diffractogrammes sont caractérisés par 05 raies à 9°, 12,5°, 19°, 21° et 26° correspondantes aux distances interitriculaires 20, 110, 120, 101 et 130 . Ces résultats sont conformes aux travaux de Zhang *et al.*, (Zhang *et al.*, 2005).

Selon Gardner et Blackwell (Gardner et Blackwell, 1975), le degré de cristallinité ou indice de cristallinité de la chitine et du biopolymère du chitosane est donné par la relation suivante :

$$(\%) \text{ IC} = \frac{(I_2 - I_1)}{I_2} \times 100 \quad (\text{X})$$

- IC : Indice de cristallinité
- $I_2$  : Intensité de la raie à 19°
- $I_1$  : Intensité de la raie à 9°

**Tableau 3 : Indice de cristallinité des chitosanes préparés.**

	Chitosane A	Chitosane B
Indice de cristallinité (IC)	54,17	47,63

### III-3 Caractérisation par spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier

Cette méthode de caractérisation du chitosane par IR est basée sur la relation entre la valeur de l'absorbance (A) de l'ami de primaire à 1 655 cm<sup>-1</sup> et celle de l'hydroxyle à 3 450 cm<sup>-1</sup>. Le degré de désacetylation (DD) a été calculé par l'équation (BAXTER *et al.*, 1992; KHAN *et al.*, 2002; TOKURA et NISHI, 1994).

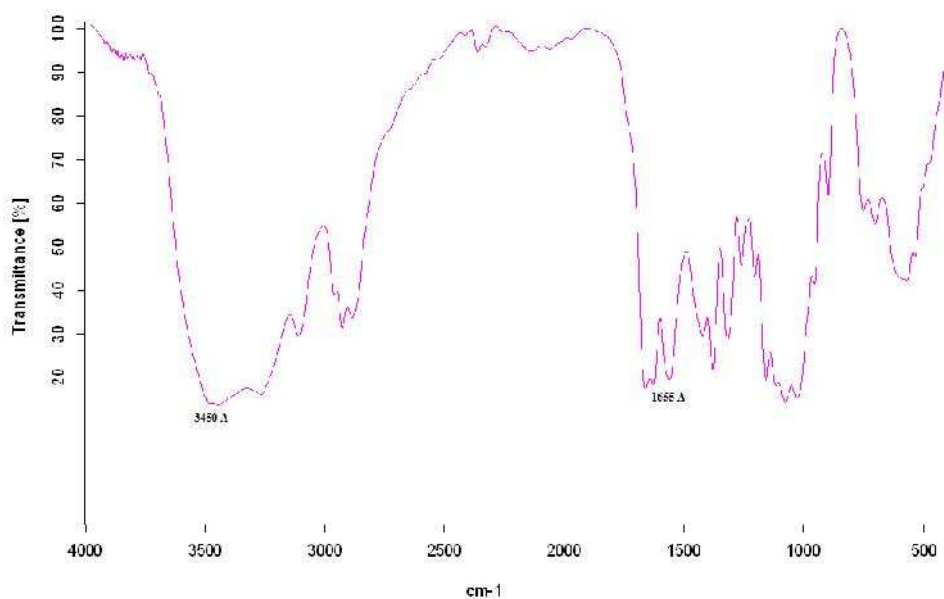
$$DD\% = 100 - \left[ \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) * 115 \right]$$

La figure montre un spectre type d'IR d'un chitosane préparé à la concentration de NaOH 10 N à une puissance de 800 Watts.

L'attribution de principales bandes pour cet échantillon est donnée par le tableau 9.

**Tableau 4 : principaux bandes IR caractéristiques du chitosane préparé.**

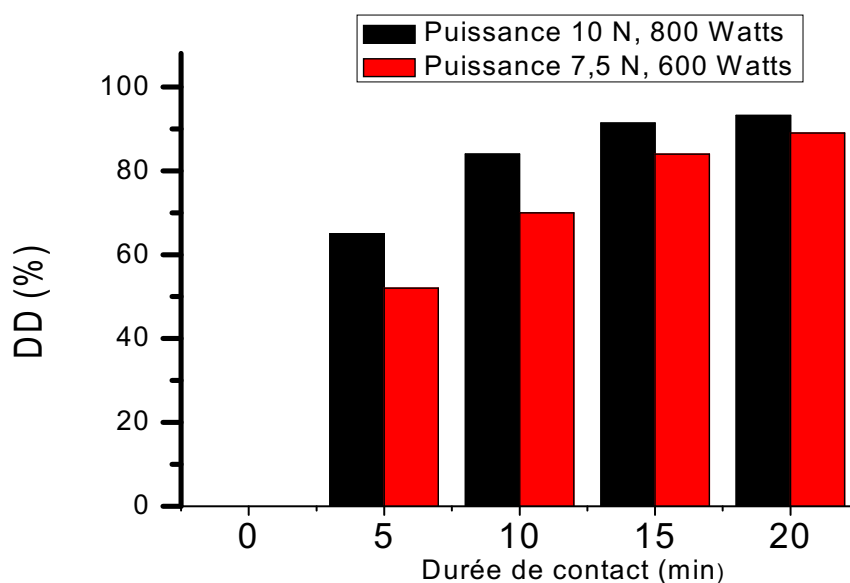
Bandes, cm <sup>-1</sup>	Attribution
3446, 3265	vOH et vNH
2962, 2926, 2885	vC-H
1660	vC=O
1560, 1625	δN-H
1421	vC-H
1378, 1317	v <sub>CH3</sub> et v <sub>CH2</sub>
1259, 1203	Aucune attribution
1115	vC-O-C
1027, 1072	vC-OH



**Figure 11 : spectre IR de du chitosane préparé avec du NaOH 10N à une puissance 800Watts**

Sur la figure (23), nous avons représenté le degré de désacétylation de la chitine en fonction de la durée de contact pour deux concentrations de NaOH différentes (7,5 N et 10N).

Nous constatons que le degré de désacétylation dépend de la concentration de NaOH et de la durée de contact. On peut affirmer que, plus la concentration est élevée, plus le DD est important, atteignant 90 %. De plus, il est important de noter que les micro-ondes ont comme effet d'augmenter la cinétique de désacétylation.



**Figure 12 : Evolution du degré de désacétylation en fonction de la durée de contact.**

# Chapitre III

## Résultats et discussion

## CHAPITRE III : LES APPLICATION PHARMACEUTIQUE ET BIOMEDICALE DE LA CHITINE ET CES DERIVES.

### 1-Ingénierie tissulaire

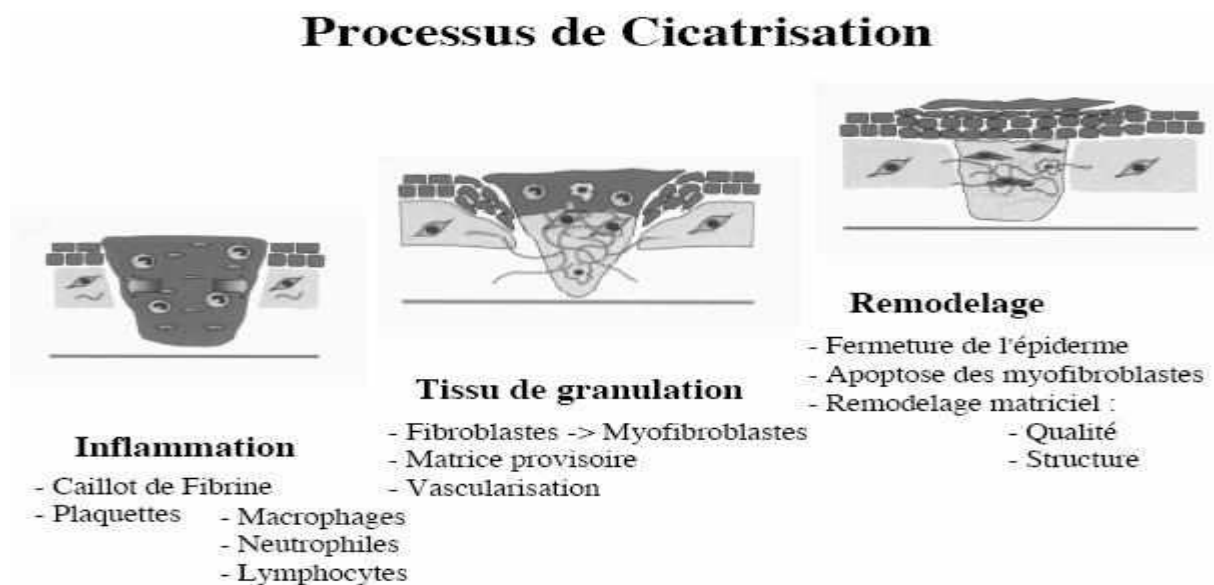
#### 1.1- La cicatrisation

La peau est un organe complexe et sa cicatrisation devient parfois un véritable challenge pour les équipes médicales, tant au niveau de la gestion de la douleur chez le patient. Que dans le choix de la stratégie curative, des lors il devient essentiel lors du développement d'un nouveau dispositif cicatrisant de bien choisir les matériaux. Et d'adapter leur mise en œuvre aux exigences physiologiques.

Pour limiter les problèmes de biocompatibilité. L'utilisation d'un polymère naturel, mieux toléré par l'organisme vivant que les polymères synthétiques. Parmi les polymères naturels, notre choix s'est orienté vers le chitosane qui présente des propriétés bioactives aujourd'hui largement reconnues par la communauté scientifique [93].

Dans le cadre de la cicatrisation des plaies, une question importante est à la réponse du tissu hôte lors de l'implantation de divers dispositifs à base de chitosane. En général ces dispositifs ont été à l'origine de réactions semblables à celles observées en présence de corps étrangers minimes, avec peu ou pas d'encapsulation fibreuse [93].

Les étapes de cicatrisation s'enchaînent normalement, il se forme un tissu de granulation normal, et souvent on observe une angiogénèse accélérée. Il a été décrits que le chitosane et ses oligomères stimulent la prolifération locale de cellules immunitaires et finalement contribuent à l'intégration du tissu implanté dans le tissu hôte [94] (figure 13).



**Figure 13 : Processus de cicatrisation (95).**

Okamoto et coll. ont montré à la suite d'expérimentations menées chez le chien, que le chitosane agit sur toutes les étapes de la cicatrisation. Le premier rôle joué par le chitosane est de favoriser l'hémostase. Les pansements hémostatiques à base de chitosane sont d'ailleurs largement utilisés. Le plus célèbre étant sans doute celui proposé par le laboratoire Hemcon : un composé d'un acétate de chitosane lyophilisé. Le chitosane stimule ensuite la prolifération des fibroblastes et influence le comportement migratoire des neutrophiles et des macrophages, ce qui a pour conséquence de modifier les processus de reconstruction qui sont la fibroplasie et la ré-épithélialisation [96,97].

Ueno et coll. [98] ont étudié l'influence d'un pansement en non-tissé (figure 14) de chitosane sur la cicatrisation de plaies chirurgicales. Là encore, il a été mis en évidence que le chitosane favorise, dès le troisième jour, l'infiltration des macrophages et des cellules inflammatoires, et plus particulièrement des polymorphonucléaires. Ces cellules vont produire un large répertoire de substances pro-inflammatoires et de facteurs de croissance.

Le chitosane favorise l'étape de granulation (entre le 9 et le 15 jour) : en outre la quantité de collagène III dans les tissus reformés est significativement plus importante pour les plaies soignées avec du chitosane [93]



**Figure 14 : Dépose d'un pansement en non-tissé sur une plaie [95].**

## 1.2- Les tissus vasculaires

Dans le domaine cardiovasculaire, les biopolymères sont utilisés dans la reconstruction de vaisseaux sanguins et dans les systèmes de livraison d'agents thérapeutiques afin de réduire la formation de la néo-intima. [99-100]. Les matériaux utilisés doivent empêcher la formation de thrombus et l'activation de la réaction inflammatoire. Pour ce faire, les biopolymères subissent des modifications physico-chimiques et de bio-fonctionnalisation afin d'obtenir une surface favorisant les interactions protéine-cellule. Présentement, il y a deux principales stratégies pour moduler les interactions cellule-matrice. La première tend à créer une surface

inerte pour l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire tout en prévenant l'activation du système immunitaire, la coagulation, la formation de thrombus ainsi que la déposition de matrice extracellulaire. Ce genre de matériel est utilisé dans le remplacement des valves cardiaques [101] ou dans l'injection de vésicules contenant des agents thérapeutiques [102]. La deuxième stratégie vise la création de matériaux qui contribuent à l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation, la viabilité à long terme et la fonctionnalité contrôlée des cellules. Cette stratégie est utilisée généralement dans la reconstruction osseuse et la greffe de peau, mais également dans la ré-endothélialisation et la reconstruction de vaisseaux sanguins [102-103].

L'utilisation de chitosane dans la réparation vasculaire est de plus en plus fréquente puisque ce polymère représente une plateforme intéressante pour les endo-prothèses biodégradables. En effet, les endo-prothèses à base de chitosane sont des structures rigides offrant une alternative aux endo-prothèses courantes. Elles ont démontré, lors de leur utilisation dans les modèles animaux, une grande stabilité ainsi qu'une conservation adéquate de leur propriété élastique lors de leur déploiement dans un vaisseau [104]. Suite à leur implantation, la réponse vasculaire est comparable à celle observée avec les endo-prothèses métalliques nues dans les modèles porcins [105].

La combinaison du chitosane avec divers composés peut entraîner une augmentation de sa biocompatibilité en raison d'effets synergiques des différents composants. En effet, l'incorporation de lipides à la structure du chitosane permet de reproduire les propriétés de la membrane cellulaire. La phosphorylcholine (PC), est un lipide neutre de la double couche lipidique formant la membrane cellulaire permettant l'augmentation de la biocompatibilité des polymères avec lesquels elle est complexée [106].

L'une des approches envisagées en thérapie vasculaire est l'application locale d'une matrice biodégradable qui permettrait de réduire le recrutement des cellules inflammatoires et de plaquettes en surface des lésions athérosclérotiques. En effet, l'application d'une microcouche de polymère comme le CH-PC pourrait limiter l'exposition des molécules d'adhésion et le recrutement des leucocytes à l'endothélium activé et de ce fait, la sécrétion de molécules pro-inflammatoires. L'utilisation de polymères adéquats permettrait ainsi de réduire l'inflammation sans empêcher le recrutement des cellules progénitrices.

Ainsi, les stratégies les plus intéressantes pour favoriser la guérison vasculaire doivent préconiser la réduction de l'inflammation ainsi que la reconstruction d'un endothélium intact offrant une surface anti-thrombogénique. D'ailleurs, la pré-endothélialisation *in vitro* des implants fut suggérée pour créer une barrière anti-thrombogénique afin de prévenir l'obstruction par la formation d'un thrombus [107-108].

#### ➤ **Réendothélialisation**

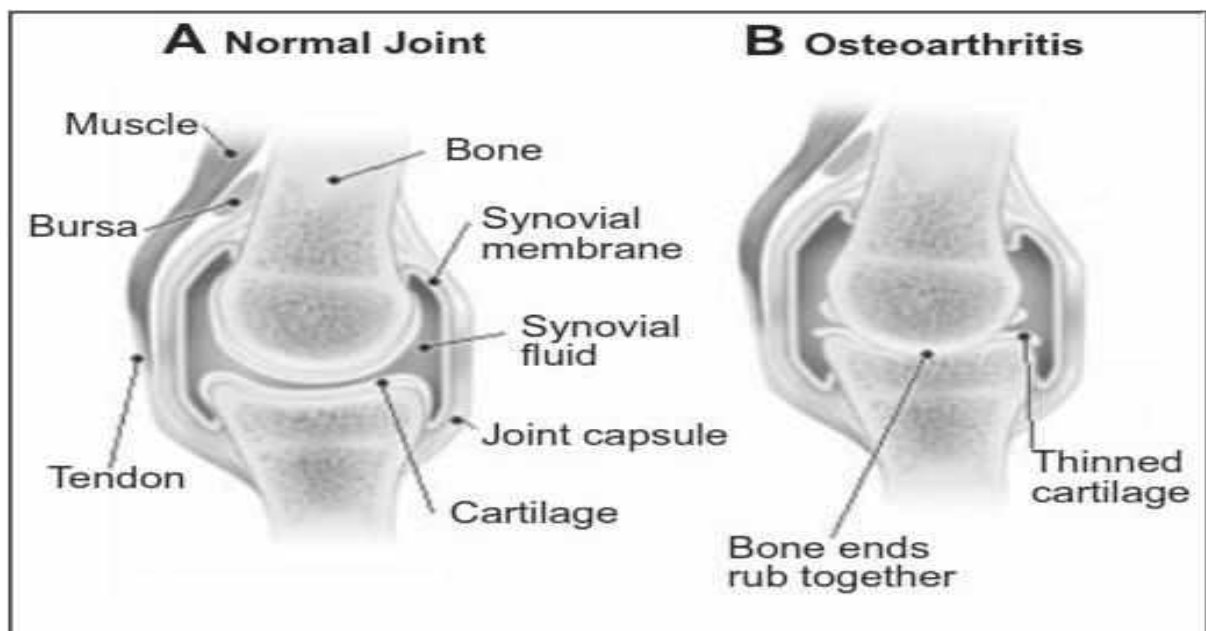
La surface des biopolymères doit présenter une texture idéale afin de promouvoir l'attachement cellulaire sans être thrombogénique. Les biopolymères sont sélectionnés dans le

but de reproduire les propriétés viscoélastiques des vaisseaux naturels autant que pour favoriser la croissance des CEP et des CML afin de générer une greffe biomimétique [109].

L'utilisation des polymères à base de chitosane en particulier de CH-PC comme véhicule cellulaire pour favoriser la ré-endothélialisation est très intéressante. En effet, les biopolymères de CH-PC représentent une matrice idéale afin de soutenir autant la livraison que l'ancrage de cellules comme les CEP. D'ailleurs, ils pourraient faciliter la ré-endothélialisation par les CEP chez les personnes âgées et celles atteintes de maladies cardiovasculaires. En effet, il fut observé que les CEP des patients à risque de développer une maladie cardiovasculaire présentaient une faible capacité à former des colonies et donc un potentiel prolifératif limité [110].

## 2- La régénération de cartilage articulaire

L'ostéoarthrite est la forme la plus commune d'arthrite. Cette maladie dégénérative est communément appelée «arthrose» et se définit par une dégénérescence du cartilage des articulations (Figure 15). La douleur et la raideur articulaire sont les principaux symptômes associés à cette forme d'arthrite. Cette maladie survient habituellement après l'âge de 40 ans, et sa progression est lente, mais constante. A ce jour, plusieurs médicaments (AINS) sont disponibles pour soulager les symptômes, mais aucun d'entre eux ne permet de freiner la dégénérescence des articulations [111].



**Figure 15 :** Représentation d'une articulation normale (A), d'une articulation atteinte d'ostéoarthrite (B). Illustration tirée de <http://www.medicinenet.com/osteoarthritis>

La dégénérescence du cartilage se produit en raison d'anomalies génétiques, les traumatismes ou de maladies qui pourraient nécessiter une intervention chirurgicale, la plupart des chirurgies de remplacement pourrait être atteint des soulagements momentanés. Dans le long terme, diverses complications comme la douleur, la perte de fonctions des extrémités persistent [112]. L'ingénierie tissulaire du cartilage vise à créer un tissu complètement guéri, fonctionnelle et sans cicatrice qui pourrait transcender les modalités de traitement actuellement disponibles pour la dégénérescence du cartilage. Les Cellules d'échafaudage pourraient être un excellent génie tissulaire de construction, seulement si les cellules peuvent interagir, se différencier et rester actifs dans la matrice fournie. Le (GAG) fournit un environnement en stimulant la régénération du cartilage. Le Chitosane ayant une similarité structurale avec les GAG et de l'acide hyaluronique (HA) présent dans les cartilages articulaires qui stimule la chondrogenèse [113]. La croissance des chondrocytes a été augmentée par le facteur de croissance (TGF- $\beta$ ) libérée à partir de microsphères de chitosane qui ont été incorporés dans échafaudage à base de chitosane [114-115].

Iwasaki et al ont rapporté qu'un hybride d'alginate-chitosane à base des fibres de polymère, montre une augmentation de la fixation des cellules et la prolifération in vitro par rapport à l'alginate [116]. Ces fibres de polymère hybrides ont montré une augmentation aussi une résistance à la traction, ce qui implique une utilisation possible dans l'élaboration d'un échafaudage de charge 3D pour la régénération du cartilage [117-118].

Lu et al. Ont étudié l'effet de l'injection intra-articulaire de chitosane sur la régénération de cartilage articulaire. Une augmentation de l'épiphyse du cartilage dans les articulations du tibia et aussi du fémur a été vue avec une activation de prolifération des chondrocytes. De même, un tissu fibreux intra-articulaire a été observé pendant les 6 semaines de l'expérience, ainsi que le chitosane résiduel injecté [119].

### **3- L'activation du système immunitaire**

Les chitosanes peuvent également déclencher la production du TNF $\alpha$  par les monocytes humains via les récepteurs lipopolysaccharidiques [120]. En outre, il a été démontré qu'un chitosane partiellement désacétylé augmente l'activité cytolytique des macrophages péritonéaux. Enfin, il stimule également la production d'IL-1 (interleukine-1) par les macrophages péritonéaux chez la souris [121].

L'efficacité du chitosane comme adjuvant (substance qui, lorsqu'elle est administrée en même temps qu'un antigène, augmente la réponse immunitaire à cet antigène) en vaccination est bien établie actuellement [121]. De plus, le chitosane a la capacité d'activer le complément qui intervient dans la défense immunitaire humorale non spécifique [122].

### 3.1- Effet du chitosane sur les macrophages

Le chitosane est composé d'unités (Glc) et (GlcNAc), or les macrophages expriment des récepteurs pour le mannose et la (GlcNAc). La fixation de la (GlcNAc) sur les récepteurs spécifiques est directe comme une condition préalable indispensable à l'activation des macrophages [123-124]. Les macrophages jouent un rôle important dans le procédé de cicatrisation, leur activation conduit à la libération d'un grand nombre de médiateurs biologiques (tels que des facteurs de croissance) ainsi qu'à la phagocytose des corps étrangers [125].

Nishimura et coli [151] décrivent une stimulation de la production d'interleukine IL-1 par les macrophages en présence de chitosane. La prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène sont affectées par IL-1, IL-6 et TNF [150]. Par ailleurs Ueno et coll [108] ont observé que la production *In vitro* de TGF- $\beta$ 1 et PDGF par des macrophages dérivés de monocytes humains est plus importante en présence de chitosane.

### 3.2- Le chitosane et les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques reconnaissent les pathogènes grâce à des structures spécifiques, par un accrochage à des récepteurs provoquant leur maturation et les rendant efficaces pour la présentation antigénique [126]. Leur rôle principal est d'apprêter l'antigène pour la présentation aux lymphocytes T [127]. Ce processus d'apprêtement fait passer les cellules dendritiques d'un stade immature à un stade mature [128].

Pour observer le phénomène de maturation des cellules un antigène doit être introduit. Les nanoparticules colloïdales à base de chitosane peuvent contenir les molécules d'intérêt thérapeutique [129] soit encapsulées dans la matrice polymère, soit conjuguées à la surface [130]. Différents mécanismes comme la phagocytose, la pinocytose ou l'endocytose médiée par un récepteur peuvent intervenir dans la capture des particules. Après l'internalisation, les nanoparticules sont transportées vers les endosomes primaires.

### 3.3- La vaccination orale

Dans le cas d'un vaccin injectable, l'antigène se retrouve directement dans le sang. Dans le cas d'un vaccin oral, les molécules sont véhiculées via le tube digestif. La barrière stomacale, où le pH est très bas, peut compromettre l'intégrité des molécules du vaccin. C'est dans ce but que les molécules ont subi une nano-encapsulation dans de la chitosane, explique Olga Borges. La chitosane, dérivée de la chitine, est le composé principal de la carapace des crustacés. Cet enrobage est très résistant et libérera donc les composés au moment voulu, c'est-à-dire au niveau des plaques de Peyer, dans l'intestin : c'est un mécanisme d'auto-delivering. A partir de cette étape, les antigènes seront pris en charge par les cellules immunitaires, comme dans le cas d'un vaccin normal [131].

Il a été émis l'hypothèse que les personnes déjà contaminées par le virus de l'hépatite B pourraient bénéficier de ce traitement car les nanoparticules contiennent également des molécules immuno-modulatrices qui engendrent une réponse immunitaire différente de celle des vaccins injectables [131].

#### **4- Les activités anti-tumorales du chitosane**

Des études suggèrent que les COS inhibent la croissance des cellules tumorales [132]. Cette activité anti-tumorale est due à une augmentation de la production de lymphokines dirigée par la prolifération de lymphocytes T cytotolytiques et de lymphocytes NK (Natural Killer). Quin et al., (2002)[133] ont montré que des COS d'un DP de quatre et cinq inhibent la croissance de cellules tumorales S180 sur des souris par administration orale et intrapéritonéale. L'inhibition de la croissance de différentes tumeurs en présence de COS et de chitosane de faible masse moléculaire semble prometteuse.

#### **5- Le chitosane comme antivirale**

Le chitosane, comme les COS, ont permis la suppression de plusieurs infections virales dans divers systèmes biologiques. [134]. Peu d'études ont été faites sur les COS et leurs activités antivirales ; il est néanmoins rapporté que le chitosane et les COS permettent la stimulation du système immunitaire. Ainsi Bacon et al., (2000) [135] ont montré que l'utilisation du chitosane en co-traitement permet d'augmenter de façon locale et systémique la réponse immunitaire face à l'influenza de type A et B. Des dérivés de COS carboxyméthylés ou sulfatés ont montré une inhibition de la réplication du HIV-1 sur des cultures de lymphocytes T et MT-4 humains [136]. Il est donc suggéré que le chitosane comme les COS et ses dérivés peuvent diminuer le processus d'infection virale en interférant entre les glycoprotéines de surface du virus et les protéines-cibles des lymphocytes [137].

#### **6- La micro-encapsulation**

La micro-encapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant un principe actif. Cette encapsulation consiste à créer une membrane qui isole le principe actif du milieu environnant. L'encapsulation de substances actives permet d'atteindre éventuellement les objectifs suivants :

- ❖ Une protection de l'ingrédient encapsulé contre une dégradation due à l'environnement (oxygène, lumière, humidité)
- ❖ Une amélioration de sa biodisponibilité,
- ❖ Un pouvoir de pénétration accru,
- ❖ Une diminution de la toxicité des actifs,

- ❖ Améliorer la présentation du produit pour faciliter le dosage, le transport, l'utilisation.
- ❖ Masquer un goût, une odeur.

L'encapsulation permet également d'avoir une libération contrôlée du principe actif et une orientation spécifique de ce dernier vers la cible à atteindre. Les conséquences sont alors respectivement la possibilité :

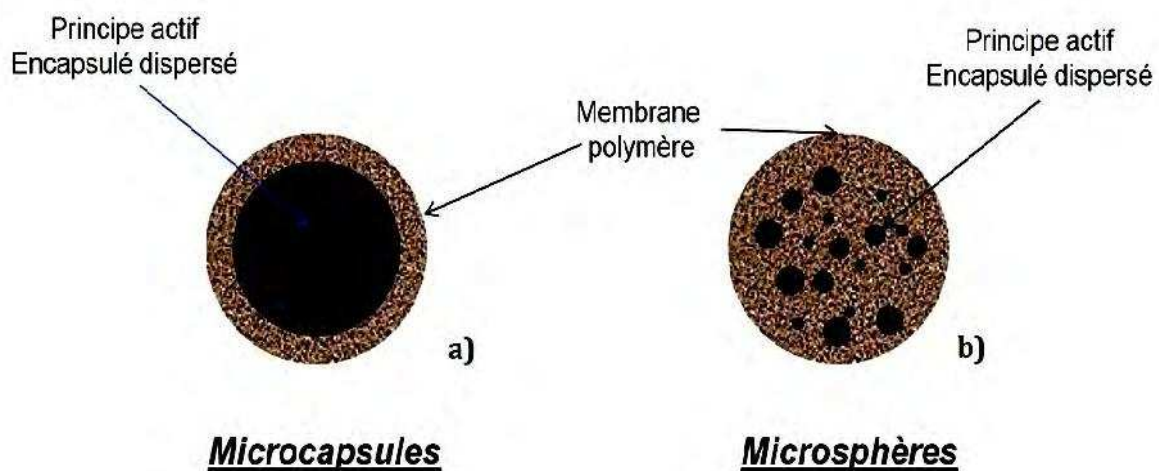
- ❖ De maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir un effet prolongé,
- ❖ D'augmenter l'efficacité du traitement en diminuant les doses nécessaires et par conséquent les risques d'effets secondaires [138].

Les systèmes d'encapsulation présentent une grande variété de structures internes. Les systèmes particuliers sont parmi ces structures.

### 6.1- Les systèmes particuliers

Les microcapsules et les microsphères sont des systèmes réservoirs composés d'une enveloppe polymérique continue entourant un cœur liquide (huileux ou aqueux) (figure 16). Le principe actif des capsules est généralement un solide, un liquide ou parfois un gaz. Il peut être dissous dans la cavité interne ou la constituer, être finement dispersé dans l'enveloppe du polymère ou se trouver à la fois dans la cavité centrale et dans la matrice des polymères [139].

L'avantage principal des microcapsules par rapport aux microsphères est leur grande capacité d'encapsulation permettant ainsi d'atteindre des rapports actif/polymère très élevés. Les microcapsules sont par contre plus fragiles et moins stables [140].



**Figure 16** : représentation schématique des microcapsules (a) et microsphères(b)

Les polymères formant le matériau enrobant peuvent être d'origine naturelle (gélatine, chitosane, alginate de sodium, agarose...), hémisynthétique (dérivés de la cellulose...) ou synthétique comme les copolymères des acides lactique et glycolique couramment utilisés. Selon le domaine d'application des microparticules, des propriétés de biocompatibilité et/ou de biodégradabilité seront requises. Les lipides (acides gras, alcools gras, glycérides, cholestérol...) seront plutôt utilisés sous forme solide, de même que les cires naturelles ou minérales. D'autres matériaux tels que des stabilisants (tensioactifs, dispersants, antimottants...) ou des cryoprotecteurs peuvent être ajoutés à la formulation des microparticules. L'ensemble des composés va intervenir dans le profil de libération de la matière active [141].

## 6.2- L'encapsulation des molécules actives

Le chitosane peut être utilisé pour transporter et libérer des substances médicamenteuses. Dans ce type d'application, il est important que le chitosane soit hydrosoluble et chargé positivement. Ces propriétés lui permettent d'interagir avec des polymères chargés négativement (protéines par exemple) et les poly-anions présents dans des environnements aqueux [142].

Des particules de chitosane greffés par l'acide poly (acrylique) ont été proposées comme transporteurs de médicaments et de protéines. Kumbar et al [143] ont préparé des microsphères réticulées de chitosane avec du GLU greffé de poly (acrylamide) et utilisé pour encapsuler l'indométacine (IM), un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé dans le traitement de l'arthrite. L'antidépresseur nifidine (NFD) peut être encapsulé dans des microsphères de chitosane réticulées par du GLU. Le N-laurylcarboxyméthyl-chitosane possédant des groupes hydrophobes et hydrophiles a été étudié pour le relargage du taxol dans des tissus cancéreux [144].

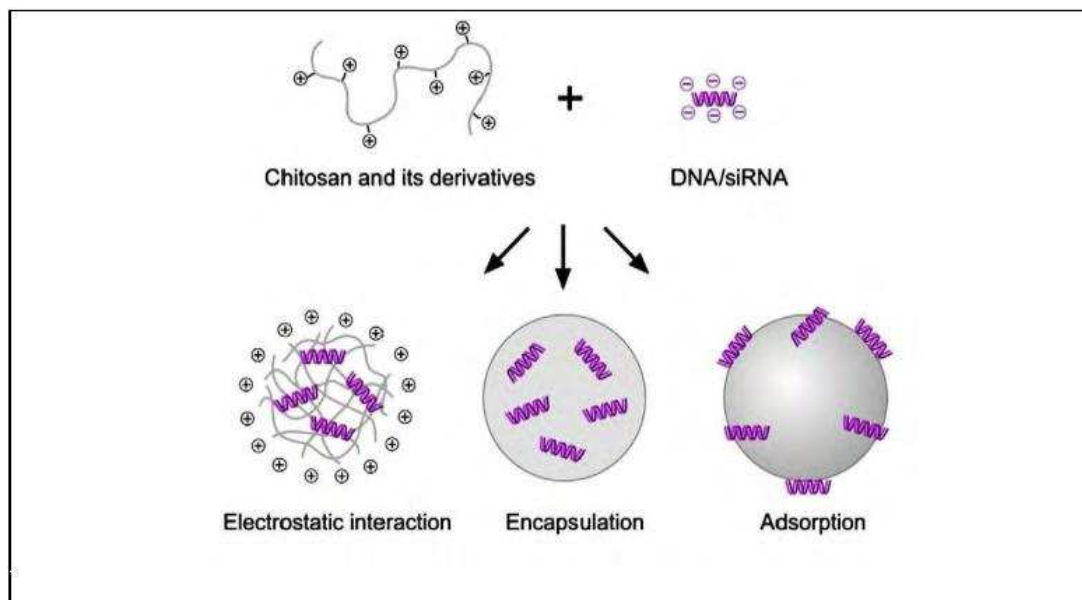
Une abondante littérature porte sur les applications pharmaceutiques du chitosane. Par exemple, on a montré que le chitosane et ses dérivés tels que le N-triméthyl-chitosane ou le N-carboxylméthyl-chitosane, ont la capacité d'adhérer aux muqueuses, ce qui est utile pour le relargage des substances médicamenteuses [145, 142].

Des chitosane greffés par la  $\beta$ -CD ont été proposés pour le relargage de principes actifs. En raison de la présence de motifs de  $\beta$ -CD, ces matériaux permettent un relargage plus lent du principe actif hydrophobe encapsulé. Enfin, les hydrogels de chitosane greffés ont montré une capacité plus grande pour encapsuler le médicament et un meilleur comportement au niveau du relargage [146]. En particulier, les systèmes qui combinent le chitosane et le (PNIPAAm) ont montré des profils particuliers de relargage qui peuvent être contrôlés en jouant sur le pH et la température, ce qui en fait des matériaux très prometteurs [147]

Lors de formulations thérapeutiques orales sous formes de billes ou des comprimés, le chitosane peut créer une couche protectrice hydratée à pH gastrique. Ceci permet la libération de substances thérapeutiques par contrôle de la dissolution de l'alginate à pH élevés (milieu intestinal), pH pour lequel le chitosane devient insoluble. L'association peut également se faire à l'aide d'ions du type cationique, tel que le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), permettant d'obtenir ainsi des complexes stables chitosane-alginate pH dépendants [148-149].

## 7- La vectorisation de si ARN

Les caractéristiques essentielles du chitosane qui font de ce biopolymère, un vecteur potentiel de si ARN sont ses propriétés cationiques. A pH acide, en dessous de la valeur du pKa, les fonctions amine primaire de la molécule deviennent chargées positivement permettant ainsi au chitosane de se lier via des interactions électrostatiques aux charges négatives portées par les fonctions phosphate du si ARN. Ces interactions électrostatiques aboutissent à la formation spontanée de complexes appelés polyplexes, en milieu aqueux. Il existe trois méthodes de formation de complexes Chitosane/si ARN, comme le montre la (figure 17), une méthode de complexation simple, une autre de gélification électrostatique (encapsulation de si ARN) et une d'adsorption des si ARN à la surface de nanoparticules de chitosane. La méthode la plus efficace, en termes d'efficacité de transfection et de force d'interaction entre chitosane et si ARN, selon Katas et Oya Alparétant celle de la gélification électrostatique [150].



**Figure17 : préparation de nanoparticules de chitosane/si ARN selon différentes méthodes [151]**

## **8-L'hypercholestérolémie et le surplus de poids**

Le chitosane a des propriétés hypocholestérolémiantes dans le sérum et le foie [152-153], Le chitosane alimentaire réagit dans l'intestin et se lie avec les acides gras et autres lipides comme les triglycérides, les stérols, le cholestérol et les acides biliaires. Ces nouveaux composés chitosane-lipides sont fortement excrétés et réduisent d'autant la réabsorption intestinale [154-155].

## **9- le chitosane en ophtalmologie**

Les hydrogels sont de formes semi-solides susceptibles d'augmenter le temps de contact avec les tissus oculaires et d'améliorer la biodisponibilité des médicaments administrés localement comparativement aux collyres conventionnels. Le chitosane est utilisé pour la fabrication de nombreuses formes pharmaceutiques (comprimés, injectables, formes nasales), il a été choisi comme véhicule pour la mise au point d'hydrogels ophtalmiques [156-157].

## **10- L'activité anticoagulante du chitosane**

Au niveau sanguin, la chitine, le chitosane et leurs dérivés poly sulfatés ont des propriétés anticoagulantes, grâce à leurs structure proche de l'héparine, ils se comportent comme cette dernière en inhibant directement l'activité de la thrombine [122], et ne produisent ni hémolyse ni altération des lymphocytes et érythrocytes [158].

# Conclusion

## Conclusions

La demande du public en matière de produits renouvelables et biodégradables croît de jour en jour avec la sensibilisation à la protection de l'environnement. Il existe une recherche active visant à produire des matériaux plus respectueux de l'environnement et de la santé. Parmi les matières premières de bon marché, renouvelables et non nocives pour l'environnement, on retrouve les polysaccharides qui suscitent un intérêt croissant pour le développement.

Parmi les polysaccharides qui ont retenu l'attention des chercheurs dans le domaine de la biomédicale, on retrouve la chitine et son principal dérivé, le chitosane. Ses propriétés exceptionnelles que nous avons précédemment énumérées expliquent l'engouement pour ces macromolécules naturelles, extraites de carapaces de crustacés, considérées il y a encore peu comme des déchets. Il s'est en effet avéré que ces coproduits d'origine marine, très bon marché, peuvent participer à l'élaboration de produits commerciaux à haute valeur ajoutée. En pratique, toutes les applications du chitosane sont intimement liées à son caractère polycationique qui est unique parmi les polymères naturels. De nombreux secteurs industriels sont concernés, allant des cosmétiques à l'industrie agroalimentaire, en passant par la pharmacie et l'ingénierie biomédicale. Les perspectives sont variées et nombreuses. De nouveaux marchés prometteurs sont également susceptibles de s'ouvrir, comme par exemple dans le domaine des biotechnologies.

Pour des expérimentations futures, il appert envisageable d'utiliser ces biopolymères afin d'effectuer une livraison cellulaire ainsi que d'agents thérapeutiques tout en évitant l'utilisation d'endoprothèse vasculaire permanente. Cette stratégie de réendothélialisation serait très utile chez les personnes âgées ainsi que chez celles atteintes de maladies cardiovasculaires afin d'augmenter la disponibilité de CEP fonctionnelles. D'ailleurs, la livraison de cellules directement au site de lésion pourrait permettre d'améliorer la réparation vasculaire.

Finalement, à partir des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons affirmer que le chitosane peut être utilisé comme une bonne matière première pour les produits pharmaceutique. Grâce à son faible coût, son abondance dans l'environnement, ses propriétés biologiques, il présente de meilleures caractéristiques comme une molécule d'avenir.

## Références bibliographiques

- [1]MARQUIS-DUVAL F.O. (2008). Isolation et valorisation des constituants de la carapace de crevette nordique. Québec, Université Laval, Faculté des sciences et génie. 98 p.
- [2]BEAUMONT, A. ET CASSIER, P. (2000). Biologie animale : des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens. Dunod. 970 p.
- [3]FERNANDEZ- KIM, S. O. (2004). Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Thesis of the Louisiana State University.
- [4]NO et al. (1989). Isolation and characterization of chitin from crawfish shell waste. Journal of agricultural and food chemistry.37 (3), pp 575- 579.
- [5]PLOUFFE B. (1997). Production de chitosanases modulaires munies d'un site d'attachement à la cellulose et étude de leur activité en bioréacteur. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.
- [6]KIEFER. (1999). Le chitosane (en ligne). (Consulter le 16 septembre 2014).disponible à l'adresse :< <http://www.France.com/kiefer/Es.htm>>.
- [7]SHAHIDI, F. AND ABUZAYTOUN, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects. Adv. Food Nutr. Res., tom 49. pp 93-135.
- [8]KM .VARUM, A. DOMARD, O. SMIDSRØD, EDS.TRONDHEIM, PA. SANDFORD. (2003). Commercial sources of chitin, chitosan, and their utilization. Advances in chitin science. : NTNU6. 35 p.
- [9] STEWART, G. ET NOYES-HULL, G. (2010). Feasibility of producing value added products from snow crab processing waste in Cape Breton, Nova Scotia, The Gulf Aquarium and Marine Station Cooperative, Nova Scotia, submitted to Nova Scotia Department of Fisheries and Aquaculture. 38 p.
- [10]GIA : CHITINE ET CHITOSAN. (2010). Un Rapport De Gestion Stratégique Global. Global Industry Analysts. MCP-2039. 230 p.
- [11]KURITA, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. Marine biotechnology. New York. pp 203-226.
- [12]JEON, YJ. KAMIL, J. SHAHIDI, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. J Agric Food Chem. pp 5167-5178.
- [13]RAVI KUMAR, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. React. Funct. Pol. pp 1-27.
- [14]KARINE LE ROUX. (2012). Purification de la chitine par hydrolyse enzymatique à partir de coproduits de crevette *Penaeus vannamei*. Caractérisations des produits et optimisation du procédé. Université de Nantes. 23 p.
- [15]TSIGOS et al. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. Trends in biotechnology. Tom 18. pp 305-312.
- [16]KHOR, E. ET LIM, L.Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials. Tom 24. pp 2339-2349.

- [17] LAMARQUE, G. VITON, C. ET DOMARD, A. (2004). Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process. *Bio macromolecules*. Tom 5. pp 992-1000.
- [18] KUHN et al. (1990). *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Berlin: Heidelberg.
- [19] GARDNER, K.H. ET BLACKWELL, J. (1975). Refinement of the structure of beta-chitin. *Biopolymers*. Tom 14. pp 1581-1595.
- [20] MINKE, R. ET BLACKWELL, J. (1978). The structure of alpha-chitin. *Journal of molecular biology*. pp 167-181.
- [21] KUMAR et al. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*. pp 6017-6084.
- [22] KURITA, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*. Tom 26. pp 1921-1971.
- [23] SUZUKI et al. (1990). Proceedings of the fifth International Conference on chitin and chitosan, USA. pp 96- 105.
- [24] KITTUR et al (2002). Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry carbohydrate polymers. pp 185-193.
- [25] MAJETI, N.V. ET KUMAR, R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & functional polymers*. pp 1-27.
- [26] RINAUDO, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer sciences*. pp 603-632.
- [27] C.M.IGNAT. (2012). Compatibilité et co-structuration dans des systèmes contenant des scléroprotéines et des polysaccharides. Université de PAU et des Pays de l'Adour UFR Sciences et Techniques, France.
- [28] SHIGEMASA et al. (1994). Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int. J. Biol. Macromol.* pp 43-49.
- [29] CHIH et al. (2002). Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnol. Appl. Biochem.* Tom 35. pp 213-219.
- [30] YANG, Y. P. XU, X- H. CHEN, H. F. (2004). Treatment of chitin-producing wastewater by micro-electrolysis- contact oxidization. *Journal of Zhejiang University Science*. pp 436- 440.
- [31] RAMIREZ et al. (2006). Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. pp 1106-1110.
- [32] RAO et al. (2007). Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*Squilla*). *J Appl Polym Sci*. pp 3694-3700
- [33] TOLAIMATE et al. (2003) Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*. 44 p.
- [34] AL SAGHEER et al. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydr Polym*. 77 p.

- [35]NO, HK. HUR, EY. (1998). Control of foam formation by antifoam during demineralization of crustacean shell in preparation of chitin. *J Agric Food Chem.* 46 p.
- [36]DE HOLANDA HD, NETTO FM. (2006). Recovery of Components from Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis. *J Food Sci.* pp 298-C303
- [37]CRINI, G. BADOT, PM. GUIBALE. (2009) Chitine et Chitosane. Du polymère à l'application : Presses universitaires de Franche-Comté.
- [38]PERCOT, A. VITON, C. DOMARD, A. (2003). Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules.* 4 p.
- [39]ARMENTA, R. GUERRERO-LEGARRETA, I. (2009) Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins. *Food Chem.* 112 p.
- [40]NARAYAN et al. (2010). Yield and chemical composition of fractions from fermented shrimp biowaste. *Waste Management & Research.* pp 64-70.
- [41]MURA et al. (1994). Fatty acid and amino acid composition of two fairy shrimp species (Crustacea, Anostraca) from Italy: *Chirocephalus diaphanus* and *Chirocephalus kerkyrensis*. *Hydrobiologia.* pp 149-154.
- [42]EINBU, A. 2007(A). Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis. Trondheim, Norwegian University of Science and Technology.
- [43]NO, HK. MEYERS, SP. (1989). Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from sea food processing streams. *J Agric Food Chem.* pp 580-583.
- [44]SYNOWIECKI, J. AL-KHATEEB, NA. (2008). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and its Derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr.* pp 145-171.
- [45]ABDOU E, NAGY K, ELSABEE M. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresour Technol.* 99 p.
- [47]FREIER, T. MONTENEGRO, R. KOH, S. AND SHOICHET, M., (2005). Chitin- based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials.* 26 p.
- [48]MANISARA, P. RATANA, R. AND PITT, S. (2003). Characterisation of beta-chitin/ poly (vinyl alcohol) blend films. *Polymer testing.* pp 381- 387.
- [49]DESBRIÈRES, J. (2003). Amphiphilic derivatives of chitin and chitosan: Rheological and tensioactive properties. European symposium: Biopolymers: Health, Cosmetic & food applications. Polymerix, Rennes, France.
- [50]France-chitine. (2013). la chitine (en ligne). (Consulter le 05/07/2014). Disponible à l'adresse ([Www. France-chitine.com/fab.e.htm](http://www.france-chitine.com/fab.e.htm))
- [51]PAYET et al. (2002). caractérisation rhéologique de la gélification de l'alginate et de chitosane : effet de la température. Tom 2. pp 46 -51.
- [52]E.A. BALDWIN, M.O. NISPEROS-CARRIEDO, AND R.A.BAKER. (1995). Use of edible coating to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Food Science and Nutrition.* pp 509-523.

- [53]G.A.F. ROBERTS. (1992). Structure of chitin and chitosan. In: Chitin chemistry, edited by G.A.F.Roberts, Mac Millan Press, Houndmills. pp 1-53.
- [54]F.RAUCH; M.DORNISH. (2006). Chitosan in: An introduction to biomaterials. GuelcherSA; JO .Hollinger; eds. CRC press. 249 p.
- [55]CREUZET, C. AUZELYVELTY, R. ET RINAUDO, M. (2006). Synthèse et étude d'hydrogels thermosensibles obtenus par modification chimique contrôlée du chitosane. L'actualité chimique N° 294.
- [56]JALAL, M. MEHR, Z. (2005). Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization, Iranian Polymer Journal. pp 235-265.
- [57]OKUYAMA et al. (2000). Structural diversity of chitosan and its complexes, Carbohydrate Polymers. pp 237-247.
- [58]SHAHIDI, F. J.K.V. ARACHI AND Y.J. JEON. (1999). Food applications of chitin and chitosans. Trends Food Sci. Tech. pp 37-51.
- [59]TOLAIMATE et al (1999). «On The Influence of Deacetylation Process on the Physicochemical Characteristics of Chitosan from Squid Chitin». Polymer, Tom 41. pp 2463-2469.
- [60]TIERA et al. (2006). Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. Biomacromolecules. 7 p.
- [61]CHATELET, C. DAMOUR, O. DOMARD, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials. pp 261-268.
- [62]HUANG, M. KHOR, E. LIM, L. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. PharmRes. pp 344-353.
- [63]KUMAR et al. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chem Rev. 104 p.
- [64]PETER, M.G. (1995). Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. J.M.S.-Pure Appl. Chem. pp 629-640.
- [65]SCHATZ et al. (2003). Static lights scattering studies on chitosane Solutions: from macromolecular chains to colloidal dispersions, Langmuir. 19 p.
- [66]BERTH, G. H, DAUTZENBERG. ET M. G. PETER. (1998). Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation. Carbohydrate Polymers. pp 205-218.
- [67]VARUM et al. (1997). "In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum." Advanced drug delivery reviews. pp 157-176.
- [68]ONISHI, H. AND MACHIDA, Y. (1999). "Biodegradation and distribution of water soluble chitosan in mice." Biomaterials. pp 157-176.
- [69]RATAJSKA, M. AND BORYNIEC, S. (1998). "Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers." Reactive and fonctionnal polymers. Tom 38. pp 35-49.
- [70]KURITA, K. KAJI, Y. MORI, T. AND NISHIYAMA, Y. (2000). "Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation." Carbohydrate Polymers. Tom 42. pp 19-21.

- [71]TOMIHATA, K. AND IKADA, Y. (1997). "In vitro and in vivo degradation of films of chitins and its partially deacetylated derivatives." *Biomaterials*. Tom 18. pp 567-575.
- [72]DENUZIÈRE et al. (1998). "Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complex: biological properties." *Biomaterials*. 19 p.
- [73]Lahiti et al. (2000). "Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblast and chondrocytes." *Journal of Biomedical Materials Research*. 51 p.
- [74]CID et al. (2000). "Preparation and characterization of chitosan films: application in cell cultures". Tom 4. pp 93-97.
- [75]RAMOS V., GARCIA-CANTELAJO J. M., HERAS A. AND LOPEZ-LACOMBA J. L. (2000). "Chitosan influence on the growth of several cellular lines". Tom 4. pp 194-199.
- [76]MALETTE, W.G. AND QUIGLEY, H. J. (1985). "Method of achieving hemostasis, inhibiting fibroplasia and promoting tissue regeneration in a tissue wound ". Brevet USA n°US4532134
- [77]KLOKKEVOLD et al. (1999). "The effect of chitosan (poly-N-Acetyl-glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits." *J. Oral Maxillofc. Surg.* pp 49-52.
- [78]RAO, S. B. AND SHARMA, C. P. (1997). "Use of the chitosane as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential." *Journal of Biomedical Materials Research*. Tom 34. pp 21-28.
- [79]LEE, K. Y., HA, W. S. AND PARK, W. H. (1995). "Blood compatibility and biodegradability of partially N-acetylated chitosan derivatives." *Biomaterials*. Tom 16. pp 1211-1216.
- [80] DANIEL et al. (1992). *Dictionnaire de dermatologie*. Paris.
- [81]ORTONNE, J.P. (1996). Anomalies de la pigmentation cutanée, in *Traité de médecine*, M.S. Flammarion. Paris. pp 731-737.
- [82]CHEN, C. -S., W.-Y. LIAU AND G. -J. TSAI. (1998). Antimicrobial effects of N-Sulfonated and N-Sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *J. Food Protect.* pp 1124-1128.
- [83]HELANDER et al. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microb.* pp 235-244.
- [84]TSAI, G.-J., SU, W. -H. (1999). Antimicrobial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Protect.* pp 239-243.
- [85]LIU, L. S. LI, H. GARREAU, AND M. VERT. (2000). Selective enzymatic degradations of poly (L-lactide) and poly ( -caprolactone) blend films. *Biomacromol.* pp 350-359.
- [86]RABEA et al. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromol.* pp 1457-1465.
- [87] LE DEVEDEC, F. (2008). Séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés. Université du Québec, Montréal, Canada.
- [88]KO et al. (1997). "Miscibility of chitosans/polyamide 6 blends". *PolymerJournal*. pp 997-1001.
- [89]LE TIEN et al (2003). "N-acylated chitosan: hydrophobie matrices for controlled drug release". *Journal of Controlled Release*. pp 1-13.

- [90]SIL. Et al. (1998). Identification spectrométrique de composés organiques, De Boeck et Larcier, Paris et Bruxelles.
- [91]JAMES, S. P. BURT, P. (1995). Viscosity of Solutions of Macromolecules. Chem. pp 303- 51.
- [92]KEDDOU, M. (2008). Élaboration, caractérisation et application de membranes polymères à base de chitosane. Université M'hamed Bouguera, faculté des sciences, Boumerdès, Algérie.
- [93]DUPASQUIER, F. (2011). Hydrogels physiques de chitosane pour la reéégénération in vivo du tissu cutané après brulures du troisième degré. Université Claude Bernard Lyon 1. pp 52,56, 57.
- [94]YOSHIOKA et al. (1995). Chitosan-derived polymer-surfactant and their micellar properties. Bioscience, biotechnology and biochemistry. pp 1901-1904.
- [95]AURELIE, C. JULIE, L.S. (2007). Les matériaux issus de ressources renouvelables : application aux non-tissés. Ecole Normale Supérieur des Arts et Industries Textiles. 4 p.
- [96]OKAMOTO et al. (1995). Evaluation of Chitin and Chitosan on Open Wound-Healing in Dogs. Journal of Veterinary Medical Science. pp 851-854.
- [97]KOSAKA et al. (1996). Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. Journal of Veterinary Medical Science. pp 963-967.
- [98]UENO et al. (1999). Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. Biomaterials. pp 1407-1414.
- [99]ZHANG et al. (2006). Sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. J Biomed Mater Res. pp 277-284.
- [100]FUJITA et al. (2005). Efficacy of photo cross linkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 in a rabbit model of chronic myocardial infarction. J SurgRes. pp 27-33.
- [101]HAMIDI, M. AZADI, A. RAFIEI, P. (2008). Hydrogel nanoparticles in drug delivery. AdvDrugDeliv Rev. pp 1638-1649.
- [102]BACAKOVA et al. (2004) Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. Physiol Res. 53Suppl 1. pp 35-45.
- [103]CHO, et al. (2005). Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices. Biomaterials. Tom 26. pp 1915-1924.
- [104]LAUTO et al. (2001) Self-expandable chitosan stent: design and preparation. Biomaterials. Tom 22. pp 1869-1874.
- [105]STEENDAM, R. VAN DER, LAANA. HISSINK, D. (2006). Bioresorbable drug-eluting stent coating formulations based on SynBiosys biodegradable multi-block copolymers. J Control Release. pp 94-95.
- [106]WHELAN et al. (2000). Biocompatibility of phosphorylcholine coated stents in normal porcine coronary arteries. Heart. pp 338-345.
- [107]HE et al. (2005). Fabrication and endothelialization of collagen blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. Tissue Eng. Tom 11. pp 1574-1588.

- [108]YUH et al. (2003). Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. *J Vasc Surg.* tom 38. pp 557-563.
- [109]PELLERIN YLHAC. (2008). Characterization of the Stable and Metastable Poly (ethylene oxide)-Urea Complexes in Electrospun Fibers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics.* Tom 46. pp 1903-1913
- [110]HILL et al. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* pp 593-600.
- [111]EMERY P. (2002). Dose-effect relationships of non-steroidal antiinflammatory drugs: a literature review. *ClinTher.* Tom 24. pp 1225-1291
- [112]TULI R, LI WJ, TUAN RS. (2003). Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 5. pp 8–235.
- [113]NETTLES, D. ELDER, S. GILBERT, J. (2002). Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* tom 8. pp 1009–16.
- [114]KIM SE et al. (2003). Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor- $\beta_1$ : implications for cartilage tissue engineering. *J Controlled Release.* pp 365–74.
- [115]LEE et al. (2004). Effects of the controlled-released TGF- $\beta_1$  from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials.* Tom 25. pp 4163–73.
- [116]IWASAKI et al. (2004). Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan. *Biomacromolecules.* Tom 5. pp 33–828.
- [117]LAHIJI et al. (2000). Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res.* pp 586–95.
- [118]RISBUD et al. (2001). In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplant.* Tom 10. pp 755–63.
- [119]LU et al. (1999). Effects of chitosan on rat knee cartilages. *Biomaterials.* Tom 20. pp 1937–44.
- [120]OTTERLEI M et al. (1994). Characterization of binding and TNF- $\alpha$ - inducing ability of chitosans on monocyts: the involvement of CD 14. *Vaccine.* Tom 12. pp 825-832.
- [121]GOGEV, S. VERSALI, M..F.ANDTHIRY, E. (2003). Les chitosanes- nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. *Ann. Méd. Vét.* pp 343-350.
- [122]BENESCH, J. (2001). Null Ellipsometry and protein adsorption to model biomaterials. *Link-ping studies in Science and Technology.*
- [123]SCHLESINGER et al. (1980). The Role of Extra-HepaticTissues in the Receptor-Mediated Plasma- Clearance of Glycoproteins Terminated by Mannose Or N-Acetylgfucosamine, *Biochemical Journal.* pp 597-606.
- [124]PELUSO et al. (1994). Chitosan-Mediated Stimulation of Macrophage Function, *Biomaterials.* Tom 15. pp 1215-1220.

- [125] DIPIETRO, L.A. (1995). Wound-Healing. The Role of the Macrophage and Other Immune Cells, Shock. Tom 4. pp 233-240.
- [126] SATO, A. AND IWASAKI, A. (2004). "Induction of antiviral immunity requires Toll-like receptor signaling in both stroma and dendritic cell compartments." PNAS. 101 p.
- [127] GLUCKMAN, J. C. (2004). "Les cellules présentatrices de l'antigène." Inserm EMI-0013 et Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Immunopathologie de l'EPHE Conférence.
- [128] FISCHER, H. G. AND BLIELINSKY, A. K. (1999). "Antigen presentation function of brain derived dendritic cells depends on astrocyte help." International Immunology. tom 11. pp 1265-1274.
- [129] BIVAS-BENITA et al. (2004). "Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A\*0201-restricted T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis." Vaccine. 22 p.
- [130] BABENSEE, J. E. AND PARANJPE, A. (2005). "Differential levels of dendritic cell maturation on different biomaterials used in combination products." J Biomed Mater Res A 74(4). pp 503-510.
- [131] BE Portugal numéro 56 (10/12/2012) - Ambassade de France au Portugal / ADIT(en ligne). (Consulter le 20/09/2014). Disponible à l'adresse <<http://www.bulletins-electroniques.com/actualites/71665.htm>>.
- [132] Liang et al. (2007). "The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from Bacillus amyloliquefaciens V656". Process Biochemistry. Tom 42. pp 527-534.
- [133] Quin et al. (2002). «Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity". International Journal of Biological Macromolecules. tom 31. pp 111-117.
- [134] Pospieszny, H. Chirkov, S. Atabekov, I. (1991). "Induction of antiviral resistance in plants by chitosane". Plant Science. pp 63-68.
- [135] Bacon et al. (2000). "Carbohydrate Biopolymers Enhance Antibody Responses to Mucosally Delivered Vaccine Antigens". Infection and Immunity. 68 p.
- [136] Gama Sosa et al. (1991). "N-carboxymethylchitosan-N, O-sulfate as an anti-HIV-1 agent". Biochemical and Biophysical Research Communications. pp 489-496.
- [137] Kochkina, Z.M. Chirkov, S.N. (2000). "Effect of chitosan derivatives on the Reproduction of coliphages T2 and TT". Mikrobiologiya. pp 257-260.
- [138] VINCENT, M. (2009). Vectorisation, clé de l'efficacité des actifs. Parfums et cosmétiques actualités. pp 115-126.
- [139] BENITA, S. (2003). Microencapsulation : methods and industrial applications. CRC Press.
- [140] WHERLE, P. (2007). Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique. Paris : Maloine.
- [141] CAMUZAT et al. (2008). Les sphérulites, la vectorisation flexible. Parfums et cosmétiques actualités. pp 81-83.

- [142]THANOU, M. and JUNGINGER, H.E. (2005). Pharmaceutical Applications of Chitosan and Derivatives, in Polysaccharides, structural diversity and functional versatility, S. DUMITRIU. Marcel Dekker: New York. pp 661-677.
- [143]KUMBAR, S.G. KUMARESH, S. and TEJRAJ, M. (2003). Synthesis and characterization of polyacrylamide-grafted chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin. *Journal of Applied Polymer Science*. pp 1525-1536.
- [144]Suh, J. K. and Matthew; H. W. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*. Tom 21. pp 2589-2598.
- [145]CRINI, G. BADOT, P.M. and GUIBAL, G. (2009). Chitine et Chitosan, du biopolymère à l'application. Presses universitaire de Franche Comté.
- [146]PRABAHARAN, M. and MANO, J.F. (2006). Stimuli-responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials. *Macromolecular Bioscience*. pp 991-1008.
- [147]BAHATTARAI et al. (2005). PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *Journal of Controlled Released*. pp 609-624.
- [148]FWU-LONG MI, H. (2002). Drug release from Chitosan Alginate complex beads reinforced by a naturally occurring crossing-linking agent. *Carbohydrate Polymers*. Tom 48 pp 61-72.
- [149]HARI, P.R. (1996). Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin. *Journal of Applied Polymer Science*. Tom 59. pp 1795-1801.
- [150] KATAS, H. and ALPAR, H. (2006). Development and characterization of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Released*. Tom 115 pp 216-225.
- [151]MAO, S. SUN, W. and KISSEL, T. (2010).Chitosan-based formulations for the delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*. pp 12-27.
- [152]Ousamu et al. (1994).Increasing effect of a chitosan and ascorbic acid mixture on fecal dietary fat excretion. *Biotech. Biochem*. Tom 58. pp 1617-1620.
- [153]Kim et al. (1999). Effects of chitoooligisaccharides on Crabon tetrachloride induced liver injury in rats:[http://www.kunpoong.co.kr/PDF/eng/Effect\\_of\\_Carbon\\_Liver\\_injury\\_in\\_rats.PDF](http://www.kunpoong.co.kr/PDF/eng/Effect_of_Carbon_Liver_injury_in_rats.PDF).
- [154]Muzzarelli et al. (1994). Depolymerisation of chitosan with the aid of papain. *Enz. Microb. Technol*. Tom 16. pp 110-114.
- [155]Muzzarelli, R. A. A. (1999). Clinical and biochemical evaluation of chitosan for hypercholesterolemia and overweight control. *Chitin and chitosanases*. Birkhuser Verlag Basel. Switzerland.
- [156]Felt. (1999). Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de doctorat d'état. Université de Genève.
- [157]Morfin et al. (2002). Percolating hydrogels for tissue engineering.*Europ.Cells and Materials*.Tom 4. pp 55- 56.
- [158]Côté, N. (1999). Impact agronomique de l'application de composts à base de résidus chitineux. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.