HAL
open science

Fonctionnalisation enzymatique de chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères

Abdulhadi Aljawish

To cite this version:

Abdulhadi Aljawish. Fonctionnalisation enzymatique de chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0089 . tel-01749864

HAL Id: tel-01749864

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749864v1

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE (UL)

École **N**ationale **S**upérieure d'**A**gronomie et des **I**ndustries **A**limentaires **(ENSAIA)**

École doctorale **R**essources **P**rocédés **P**roduits **E**nvironnement **(RP2E)**

Laboratoire d'**I**ngénierie des Biomolécules **(LIBio)**

THÈSE

Présentée à l'Université de Lorraine par

Abdulhadi ALJAWISH

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères

---

Soutenue publiquement le 08 juillet 2013 devant la commission d'examen

Membres du jury

Rapporteurs	Fabienne GUERARD	Professeur à l'IUEM de Brest Iroise
	Sylvain GUYOT	Chargé de Recherche-HDR à l'INRA de Rennes
Examinateurs	Thierry TRON	Docteur-HDR à l'Aix-Marseille Université
	Joël SCHER	Professeur à l'Université de lorraine
	Isabelle CHEVALOT	Professeur à l'Université de lorraine
	Lionel MUNIGLIA	Maître de conférences à l'Université de lorraine
Invités	Jordane JASNIEWSKI	Maître de conférences à l'Université de lorraine

Table des matières

Liste des figures hors publications ..... **IV**

Liste des tableaux hors publications ..... **VII**

Liste des abréviations ..... **VIII**

Liste des publications et communications ..... **X**

Introduction générale **1**

Chapitre I : Etude bibliographique **7**

I. Laccases (*p*-diphénols : oxygène oxydoréductases; E.C.1.10.3.2) 7
- I.1. Introduction générale 7
- I.2. Définition 8
- I.3. Distribution des laccases 8
- I.4. Caractéristiques biologiques et fonctions physiologiques 9
- I.5. Structure des laccases 9
- I.6. Mécanisme réactionnel 11
- I.7. Spécificité de substrat 16
- I.8. Inhibiteurs 18
- I.9. Caractérisation des produits d'oxydation (quinones) 18
- I.10. Facteurs influençant l'activité des laccases 24
- I.11. Applications biotechnologiques des laccases 27

II. Le chitosane 31
- II.1. Sources du chitosane 32
- II.2. Préparation du chitosane 33
- II.3. Structure chimique 36
- II.4. Propriétés physico-chimiques du chitosane 37
- II.5. Propriétés de biocompatibilité du chitosane 41
- II.6. Propriétés biologiques 43
- II.7. Principales applications du chitosane 50

III. Fonctionnalisation enzymatique du chitosane 57
- III.1. Avantages de la voie enzymatique 57
- III.2. Mécanisme de fonctionnalisation enzymatique du chitosane 58
- III.3. Méthodes pour fonctionnaliser le chitosane par voie enzymatique 59
- III.4. Enzymes utilisées en fonctionnalisation enzymatique 61
- III.5. Application des chitosanes dérivés par voie enzymatique 67

Objectifs du travail **75**

Chapitre II. Matériel et méthodes **81**

I. Biocatalyseur et produits chimiques 81
- I.1. Laccase de *Myceliophtora thermophila* (E.C. 1.10.3.2) 81
- I.2. Produits chimiques 82

II. Oxydation enzymatique de composés phénoliques 84
- II.1. Purification partielle de la laccase de *Myceliophtora thermophila* 84
- II.2. Caractérisation de la laccase purifiée 84
- II.3. Oxydation enzymatique de composés phénoliques par la laccase 89
- II.4. Méthodes analytiques 89
- II.5. Paramètres Michaelis-Menton et spécificité du substrat 92
- II.6. Extraction des produits d'oxydation 92
- II.7. Mesure de la couleur des produits et du milieu réactionnel 93

III. Fonctionnalisation enzymatique du chitosane 94
III.1. Purification du chitosane natif 94
III.2. Greffage enzymatique des produits d'oxydation sur le chitosane solide 95
III.3. Caractérisation structurale des chitosanes natif et fonctionnalisés 95
III.4. Caractérisation des produits d'oxydation greffés sur les chitosanes fonctionnalisés 96
III.5. Propriétés physico-chimiques des chitosanes natif et fonctionnalisés 98
IV. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires 102
IV.1. Propriété antiradicalaire 103
IV.2. Propriété antioxydante 107
V. Propriétés antibactériennes 107
V.1. Préparation des solutions de chitosane 107
V.2. Micro-organismes et conditions de culture 108
V.3. Inhibition de la croissance bactérienne 108
V.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) 110
VI. Propriétés biologiques 110
VI.1. Lignées cellulaires 110
VI.2. Conservation des cellules 111
VI.3. Culture cellulaire 112
VI.4. Activité cytotoxique des produits d'oxydation 114
VI.5. Adhésion cellulaire des films de chitosane 119

Chapitre III. Résultats et discussion 125

Partie I : Oxydation enzymatique des composés phénoliques en milieu aqueux 125
I.1. Introduction 125
I.2. Laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: a green procedure for the synthesis of new compounds 127
I.3. Contribution de l'article 151
I.4. Complément de résultats 154
I.5. Conclusion 168
Partie II : Fonctionnalisation enzymatique du chitosane 169
II.1. Fonctionnalisation des particules de chitosane par la laccase de *Myceliophtora thermophila* dans des conditions douces et en milieu aqueux 169
II.2. Caractérisation des chitosanes natif et fonctionnalisés : propriétés antibactériennes et physico-chimiques 206
II.3. Propriétés biologiques : adhérence et croissance des cellules HUVEC et Caco2 sur les films de chitosanes 233

Conclusions et perspectives 269

Références Bibliographiques 279

Liste des figures hors publications

Figure 1 : schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases ---------- 7

Figure 2 : réactions catalysées par les laccases (E.C.1.10.3.2) ---------- 8

Figure 3 : représentation de la structure 3D de la laccase de *Trametes versicolor* obtenue par cristallographie aux rayons X (Piontek *et al.*, 2002) (Les atomes de cuivre sont représentés par les quatre sphères bleues) ---------- 10

Figure 4 : environnement des 4 atomes du cuivre du site actif de la laccase de *Bacillus subtilis* (Witayakran et Ragauskas, 2009) ---------- 11

Figure 5 : cycle catalytique de laccase (Polak et Jarosz-Wilkolazka, 2012) ---------- 12

Figure 6 : produits d'oxydation formés par les laccases ---------- 13

Figure 7 : schéma simple de formation des dimères homogènes et hétérogènes. R : plusieurs substituants ou des systèmes cycliques. A : Type de réaction = couplage oxydatif, condensation oxydative ou par couplage oxydatif phénolique. B : Type de réaction : couplage oxydatif avec une amination nucléaire (Mikolasch et Schauer, 2009) ---------- 14

Figure 8 : couplages homogènes C-O et C-C pouvant avoir lieu lors d'une oxydation du 2,6-diméthylphénol catalysée par les laccases (Kobayashi et Higashimura, 2003) ---------- 15

Figure 9 : couplage hétérogène C-N pouvant avoir lieu lors de l'oxydation du catéchol par la laccase de *Trametes villosa* avec l'acide 2,5-diamino-benzène sulfurique (Tzanov *et al.*, 2003) - 16

Figure 10 : cycle catalytique de système (médiateur / laccase) ---------- 18

Figure 11 : réaction entre une quinone et l'acide ascorbique ---------- 19

Figure 12 : réaction entre une quinone et un sulfite ---------- 20

Figure 13 : deux réactions quinone-amine donnant des bases de Schiff et des adduits de type michaélien (Kumar *et al.*, 1999) ---------- 21

Figure 14 : mécanisme simplifié de la réaction des intermédiaires de la polymérisation des phénols avec des groupements amine (Strauss et Gibson, 2004) ---------- 22

Figure 15 : différents radicaux (semiquinones) formés par oxydation de l'acide férulique par les laccases (Rawel *et al.*, 2001) ---------- 23

Figure 16 : biopolymères biodégradables d'origine naturelle (Tharanathan, 2003) ---------- 32

Figure 17 : procédé de la fabrication de chitine et chitosane (Onsoyen et Skaugrud, 1990) ---------- 34

Figure 18 : structure chimique de la chitine (a), du chitosane (b) (Olteanu et Enescu, 2007) ---------- 36

Figure 19 : structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) d'après (Vazquez-Duhalt *et al.*, 2001) ---------- 38

Figure 20 : structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries $Gram^+$/$Gram^-$ d'après (Bisognano, 2000) ---------- 45

Figure 21 : mécanisme réactionnel d'oxydation des composés phénoliques par la tyrosinase en présence de chitosane (Jayakumar *et al.*, 2005) ---------- 58

Figure 22 : mécanisme proposé pour la fonctionnalisation du chitosane (méthode hétérogène) avec la quercétine par la laccase de *Trametes versicolor* (Bozic Mojca *et al.*, 2012a) ---------- 60

Figure 23 : mécanisme proposée de la fonctionnalisation du chitosane (méthode homogène) avec l'acide gallique par la laccase de *Trametes versicolor* (Bozic M. *et al.*, 2012b) ---------- 61

Figure 24 : schéma de la formation d'hydrogel du (chitosane-polyéthylène glycol-tyramine) conjugués en utilisant la peroxydase *horseradis*h en présence de H_2O_2 (Lih *et al.*, 2012) ---------- 63

Figure 25 : mécanisme réactionnel d'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase en présence de chitosane (Anghileri *et al.*, 2007)---------- 64

Figure 26 : synthèse du chitosane-amylase dérivé à partir du chitosane-maltoheptaose dérivé par une méthode chemo-enzymatique (Matsuda *et al.*, 2007) ---------- 66

Figure 27 : structures chimiques des substrats phénoliques utilisés au cours de l'étude ---------- 83

Figure 28 : système d'ultrafiltration Amicon-8200 pour éliminer les phénols, les peptides et les protéines de taille inférieure à 10 kDa présents dans la solution brute de la laccase ------- 84

Figure 29 : structure de l'ABC (a) et formation du complexe ABC – Cu^+ (b) ---------- 85

Figure 30 : oxydation de la syringaldazine par la laccase ---------- 86

Figure 31 : évaporateur rotatif (Büchi R-205) ---------- 92

Figure 32 : datacolor International Microflash 2078S ---------- 93

Figure 33 : structure chimique du $DPPH^{\bullet}$ ---------- 103

Figure 34 : formation et piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ par un antioxydant donneur de H• (Lien *et al.*, 1999) ---------- 105

Figure 35 : système automatisé d'analyse de la croissance cellulaire : Cellscreen® (Innovatis , Allemagne)---------- 115

Figure 36 : structure chimique du Rouge Neutre ---------- 116

Figure 37 : système (Guava Easycyte®) ---------- 118

Figure 38 : schéma de la distribution des cellules par cytométrie (Guava Easycyte®) ---------- 118

Figure 39 : micromètre manuel (Messmer, Londres, Angleterre) ---------- 120

Figure 40 : réduction du MTT en formazan---------- 122

Figure 41 : analyse d'image par le Cellscreen® des cellules HUVEC cultivées dans du milieu de culture et après 48 h d'ajout de 200 µg de molécule/mL de milieu : A. sans ajout de molécule (témoin), B. ajout de l'acide férulique, C. ajout des produits de l'acide férulique, D. ajout du férulate d'éthyle, E. ajout des produits du férulate d'éthyle (grossissement x 40) ---------- 157

Figure 42 : vitesses spécifiques de croissance (µ, h^{-1}) de cellules HUVEC à 36 h d'incubation en présence d'acide férulique et ses produits et de férulate d'éthyle et ses produits à différentes concentrations ---------- 158

Figure 43 : analyse d'image par le Cellscreen® des cellules caco2 cultivées dans du milieu de culture et après 48 h d'ajout de 200 µg de molécule/mL de milieu : A. sans ajout de molécule (témoin), B. ajout de l'acide férulique, C. ajout des produits de l'acide férulique, D. ajout du férulate d'éthyle, E. ajout des produits du férulate d'éthyle (grossissement x 40)---- 160

Figure 44 : vitesses spécifiques de croissance (μ, h^{-1}) de cellules Caco2 à 36 h d'incubation en présence d'acide férulique et ses produits d'oxydation et de férulate d'éthyle et ses produits d'oxydation à différentes concentrations---------- 161

Figure 45 : pourcentage des cellules mortes et vivantes (Caco2 et HUVEC) par cytométrie : sans produits-AF (Caco2-A et HUVEC-B) et avec produits-AF (Caco2-C et HUVEC-D). -- 164

Figure 46 : inhibition de la croissance bactérienne (%) des produits de l'acide férulique (A) et des produits du férulate d'éthyle (B) vis-à-vis des souches bactériennes testées.---------- 166

Figure 47 : couleurs du chitosane natif (A), du chitosane- AF (B) et du chitosane-FE (C) ---------- 196

Figure 48 : couleur des extraits des trois types de chitosanes en voie chimique : (A) chitosane natif, (B) chitosane fonctionnalisé par l'acide férulique et (C) chitosane fonctionnalisé par le férulate d'éthyle---------- 199

Figure 49 : chromatogrammes CL-SM à 322 nm des extraits des chitosanes fonctionnalisés par l'acide férulique (A) et par le férulate d'éthyle (B)---------- 200

Figure 50 : spectres ESI-SM des hydrolysats du chitosane natif (A), du chitosane fonctionnalisé par l'acide férulique (B) et du chitosane fonctionnalisé par le férulate d'éthyle (C). Les pics attribués aux oligomères correspondant au chitosane natif sont surlignés en jaune et ceux attribués aux oligomères du chitosane fonctionnalisé sont surlignés en bleu---------- 203

Figure 51 : adsorption de protéines (%) des films de chitosane natif, chitosane-AF, chitosane-FE et contrôle (sans films) en comparaison de la quantité des protéines totales du milieu culture initial (DMEM)---------- 260

Figure 52 : photos prises de cellules Caco2 cultivées pendant 3 jours sur les films de chitosane natif (A2, B2), chitosane-AF (A3, A3) et chitosane-FE (A4, B4) par rapport au témoin (sans film) (A1, B1) par microscope optique (Olympus, Tokyo, Japon) à 10x (A) et 32x (B) agrandissement---------- 262

Figure 53 : effet de l'épaisseur de film et les phénols oxydés greffés des films de chitosane natif et ses dérives sur la viabilité des cellules Caco2. Le contrôle (100%) correspond à la viabilité des cellules Caco2 dans les puits en absence de film. ---------- 263

Figure 54 : comparaison entre la croissance des cellules HUVEC et Caco2 en fonction de l'épaisseur du film et des phénols oxydés greffés sur les films. Le contrôle (100%) correspond à la viabilité des cellules Caco2 ou HUVEC sur le polystyrène traité---------- 264

Liste des tableaux hors publications

Tableau 1 : corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à pH 6 (Thanou et Junginger, 2005) ---------- 39

Tableau 2 : concentrations minimales inhibitrices de quelques bactéries par le chitosane (Liu X. F. *et al.*, 2001) ---------- 44

Tableau 3 : concentrations minimales inhibitrices de quelques moisissures par le chitosane ---------- 46

Tableau 4 : taux d'inhibition de quelques souches fongiques en fonction de la concentration du chitosane (Laflamme *et al.*, 1999) ---------- 47

Tableau 5 : applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire (Crini, 2006) ---------- 50

Tableau 6 : applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique (Crini, 2006) 52

Tableau 7 : applications du chitosane dans le domaine de la cosmétique (Crini, 2006) ---------- 53

Tableau 8 : applications du chitosane dans le domaine agricole (Ravi Kumar, 2000) ---------- 54

Tableau 9 : applications du chitosane dans le domaine de l'environnement (Gerente *et al.*, 2007) ---- 55

Tableau 10 : autres domaines d'applications du chitosane (Crini, 2006) ---------- 56

Tableau 11: produits chimiques utilisés ---------- 82

Tableau 12 : solvants utilisés ---------- 83

Tableau 13 : substrats phénoliques utilisés ---------- 83

Tableau 14 : gradients d'élution pour l'analyse CLHP des substrats phénoliques ---------- 90

Tableau 15 : récapitulatif des étalonnages effectués au cours de cette étude ---------- 90

Tableau 16 : gradient d'élution pour l'analyse CL-SM des produits d'oxydation ---------- 91

Tableau 17 : pourcentage de viabilité des cellules Caco2 en fonction de différentes concentrations d'acide férulique, de férulate d'éthyle et de leurs produits d'oxydation ---------- 162

Tableau 18 : valeurs de CMI et de CMB (mg/mL) des composés phénoliques testés contre les souches bactériennes testées ---------- 167

Tableau 19 : valeurs m/z mesurées sur les extraits après hydrolyse chimique des chitosanes fonctionnalisés ---------- 201

Tableau 20 : valeurs m/z théoriques et observées pour l'hydrolysat du chitosane natif*en mode positif ESI ---------- 204

Tableau 21 : valeurs m/z observées pour l'hydrolysat de l'AF-chitosane, du FE-chitosane et du chitosane natif ---------- 205

Liste des abréviations

ABC : Acide bicinchoninique

ABTS : 2,2´-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate

AF : Acide férulique

AH_2 : Acide ascorbique

BPS : Tampon phosphate dulbecco

Caco2 : Cellules cancéreuses du colon humain

CI_{50} : Concentration inhibitrice

CIE : Commission International de l'Eclairage

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

CL/SM : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentrations minimales inhibitrices

CO : Catécholoxydases

DA : Degré d'acétylation

DD : Degré de désacétylation

DDG : Dodécyl gallate

DHA : Acide déhydroascorbique

DL_{50} : Dose létale

DMEM : Milieu d'eagle modifié par dulbecco

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DPPH : 1,1-diphényl -2-picril hydrazil

ECACC : European Collection of Animal Cell Cultures

ECGM : Milieu de croissance cellulaire endothéliale

ET : Equivalent trolox

FE : Férulate d'éthyle

GlcN : Glucosamine

GlcNAc : Acétylglucosamine

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

INT : P-iodonitrotétrazolium violet

IR : Infra-rouge

Laccase M : Laccase de *Myceliophtora thermophila*

MH : Mueller-Hinton

MM : Masse molaire

MTT : Méthylthiazolyldiphényl-tétrazolium bromide, Thiazolyl blue

NRU : Neutral Red Uptak

PLA : Acide polylactique

POD : Peroxydases

PPO : Polyphénoloxydases

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SDS : Dodécyl sulfate de sodium

SEC-MALLS : Chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser à multiples angles

SVF : Sérum de veau fœtal

TEAC : Trolox equivalent antioxidant cpacity

TFA : Acide trifluoroacétique

UI : Unité enzymatique

V_{max} : Vitesse maximale d'activité

ΔE° : Potentiels redox

Liste des publications et communications

Communications par affiche

■ **Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Jasniewski, J., Scher, J. and Muniglia, L**. Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate. Congress Biotrans (2011) Sicilia-ITALY

■ **Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Jasniewski, J., Scher, J. and Muniglia, L**. Control of enzymatic oxidation of phenolic Compounds by chitosan particles in aqueous medium. Congress Biocat (2012) Germany

■ **Aljawish, A., Muniglia, L., Jasniewski, J., Scher, J., and Chevalot, I**. Enhanced cell adhesion and viability on chitosan films enzymatically modified with phenolic compounds. Congress ESACT (2013) Lille-France

Publications

■ **Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Jasniewski, J., Scher, J. and Muniglia, L**. (2011). Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par la laccase de *myceliophtora thermophila*. Doctorale RP2E « Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement ». ISBN 2-9518564-9-0

■ **Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Girardin, M., Jasniewski, J., Scher, J. and Muniglia, L**. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. Carbohydrate Polymers 87, 537-544.

■ **Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., and Muniglia, L**. Laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: a green procedure for the synthesis of new compounds : Accepté au Food Chemistry

■ **Aljawish, A., Chevalot, I., Jasniewski, J., Scher, J., and Muniglia, L**. Physicochemical and antibacterial properties of chitosan enzymatically functionalized with phenolic compounds. Article soumis au “Carbohydrate Polymers”

■ **Aljawish, A., Muniglia, L., Jasniewski, J., Scher, J., and Chevalot, I**. Endothelial cell adhesion and viability evaluation of enzymatically functionalized chitosan films with phenolic compounds. Article soumis au “Process Biochemistry”

Introduction générale

Introduction générale

Au cours du vingtième siècle, l'industrie chimique s'est considérablement développée, au point de devenir de nos jours incontournable dans la fabrication de la majorité des produits utilisés quotidiennement par l'homme. Depuis quelques décennies, les molécules synthétisées d'usage ou modifiées par voie chimique sont présentes aussi bien dans notre nourriture que dans notre environnement domestique, en passant par tous les produits cosmétiques et pharmaceutiques. Cependant, il existe une demande forte et croissante des consommateurs pour des produits à caractère naturel issus de ressources renouvelables. En effet, à l'heure actuelle, les consommateurs, soucieux de sécurité et de leur santé, ont de plus en plus tendance à rejeter les produits comprenant des éléments artificiels tels que la tartrazine employée comme colorant jaune (Dutau *et al.*, 1996)

Ces dernières années, une partie des procédés chimiques historiques a été convertise vers ce que l'on appelle aujourd'hui la chimie verte. Cette dernière propose des solutions alternatives adossées à des procédés plus « doux » visant à réduire l'impact environnemental pour catalyser les réactions. Dans ce cadre, afin de réduire le niveau de pollution de l'environnement par les polluants chimiques (des sols, des eaux et de l'air, dus, notamment, à l'agriculture intensive et aux industries), l'utilisation d'enzymes comme biocatalyseurs est une voie prometteuse et reconnue pour produire de nouvelles molécules ou apporter de nouvelles fonctionnalités à des molécules d'intérêt. Industriellement, nous sommes alors dans ce qu'on appelle les biotechnologies blanches.

Les enzymes sont naturellement produites par des microorganismes. Elles sont biodégradables et sont capables de catalyser un nombre important de réactions à la façon des catalyseurs chimiques. Les réactions enzymatiques peuvent être utilisées pour produire de nouvelles molécules (Adelakun *et al.*, 2012). De plus, elles sont actives en milieu aqueux et dans des conditions expérimentales douces. Récemment, parmi ces enzymes, les enzymes oxydatives ont montré leur intérêt pour la synthèse de molécules bioactives présentant des propriétés intéressantes telles que l'activité antioxydante. Ces enzymes, les oxydases, se trouvent dans la nature, particulièrement dans les plantes, et sont responsables de la bioconversion naturelle de composés phénoliques en pigments colorés.

Ces oxydases, le plus souvent des catéchol oxydases ou des laccases, catalysent, en présence de l'oxygène de l'air, co-substrat indispensable à la réaction, l'oxydation de mono ou d'*ortho*-diphénols respectivement en semiquinones ou quinones. Ces composés très réactifs peuvent oxyder d'autres phénols ou réagir très rapidement avec eux-mêmes ou avec des composés nucléophiles présents dans leur environnement comme des amines, des thiols, etc.… Au cours de ces réactions de condensation spontanée, il se forme temporairement des intermédiaires présentant des couleurs pouvant aller du jaune au bleu noir en passant par le rose, le rouge ou le vert selon les substrats mis en jeu. En contrôlant cette bioconversion et en stabilisant les intermédiaires colorés, on peut préparer une large gamme de colorants avec un label naturel qui peuvent trouver des applications dans les domaines agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Ainsi, cette bioconversion enzymatique s'est largement développée en milieu organique ou hydro-organique afin de produire de nouvelles molécules aux propriétés variées. L'oxydation de substrats phénoliques sélectionnés conduit à la synthèse de molécules bioactives aux propriétés colorantes (Mustafa *et al.*, 2005) ou antioxydantes (Adelakun *et al.*, 2012).

Dans les dernières années, plusieurs travaux ont été décrits sur le greffage de molécules provenant de l'oxydation enzymatique de substrats phénoliques sur des macromolécules telles que la pectine, la cellulose, l'hémicellulose et le chitosane (Craven *et al.*, 1981 ; Kim S. Y. *et al.*, 2007 ; Norsker *et al.*, 2000 ; Taylor et Clydesdale, 1987 ; Wu *et al.*, 2002). Ce procédé permet d'accroitre ou d'améliorer les propriétés de ces biopolymères par l'apport des activités des produits d'oxydation des phénols greffés sur les biopolymères telles que les propriétés antioxydantes ou optique...

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail est, d'une part, la maîtrise du greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle par la laccase de *Myceliophtora thermophila* sur le chitosane en milieu aqueux et dans des conditions réactionnelles douces, et, d'autre part, l'étude des propriétés des biopolymères fonctionnalisés. Ainsi, l'attention portera sur les mécanismes du greffage (type de liaison, position du greffage et structure chimique des produits greffés) et les propriétés des chitosanes fonctionnalisés telles que les propriétés antioxydantes, physico-chimiques et biologiques qui seront évaluées.

A cette fin et pour débuter, une étude bibliographique va permettre de montrer l'intérêt des laccases, leur mécanisme et leurs conditions réactionnelles. Le potentiel du chitosane comme biopolymère et ses propriétés fonctionnelles seront décrits. Enfin, le mécanisme du greffage des produits d'oxydation des phénols sur le chitosane, les méthodes du greffage et les enzymes utilisées dans ce greffage seront discutés.

Etude bibliographique

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Laccases (*p*-diphénols : oxygène oxydoréductases; E.C.1.10.3.2)

I.1. Introduction générale

Les oxydases ou oxydoréductases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'électrons d'une molécule (un oxydant, un accepteur d'hydrogène ou accepteur d'électron) à une autre (un réducteur, un donneur d'hydrogène ou donneur d'électron) (Burton, 2003 b). Les principales enzymes qui appartiennent aux enzymes oxydatives, sont les polyphénoloxydases (PPO) (EC 1.10.3.1) qui utilisent de l'oxygène moléculaire comme co-substrat et les peroxydases (POD) (EC 1.11.1.7) qui utilisent de l'eau oxygénée.

Les polyphénoloxydases (PPO) (1,2- benzenediol : oxygène oxydoréductase) font partie des métalloprotéines parce qu'elles contiennent des métaux dans leur site actif ; dans le cas des PPO, c'est le cuivre. Elles sont capables de catalyser l'oxydation de certains composés phénoliques en polymères bruns avec la réduction d'O_2 en eau (Xu, 2001). Les PPO peuvent être divisées en monophénoloxydase ou crésolase (E.C.1.14.18.1) lorsqu'il s'agit d'une hydroxylation en position *ortho* d'un substrat monophénolique et en diphénoloxydase lorsque il s'agit d'une oxydation d'un diphénol en benzoquinone (Walker et Ferrar, 1998) (Figure 1). La classe de diphénoloxydase est divisée, d'après la nomenclature internationale, en deux sous-groupes : les catécholoxydases (CO) (E.C.1.10.3.1) et les laccases (E.C. 1.10.3.2) (Nicolas *et al.*, 1994 ; Walker et Ferrar, 1998) .

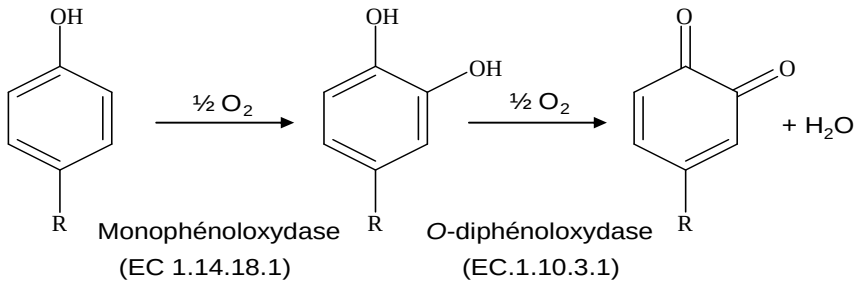


Figure 1 : schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases

I.2. Définition

Ces enzymes appartiennent à un groupe d'enzymes nommé « oxydases bleues » car elles possèdent quatre atomes de cuivre dans leur site actif (Hoegger *et al.*, 2006). Elles sont capables d'oxyder des *o*- ou *p*- diphénols en quinones correspondantes et oxydent les monophénols en semiquinones, sans hydroxylation préalable. En plus, elles sont capables d'oxyder les aminophénols, les méthoxyphénols et des monomères de lignine. Le schéma (Figure 2) résume les différentes réactions catalysées par les laccases.

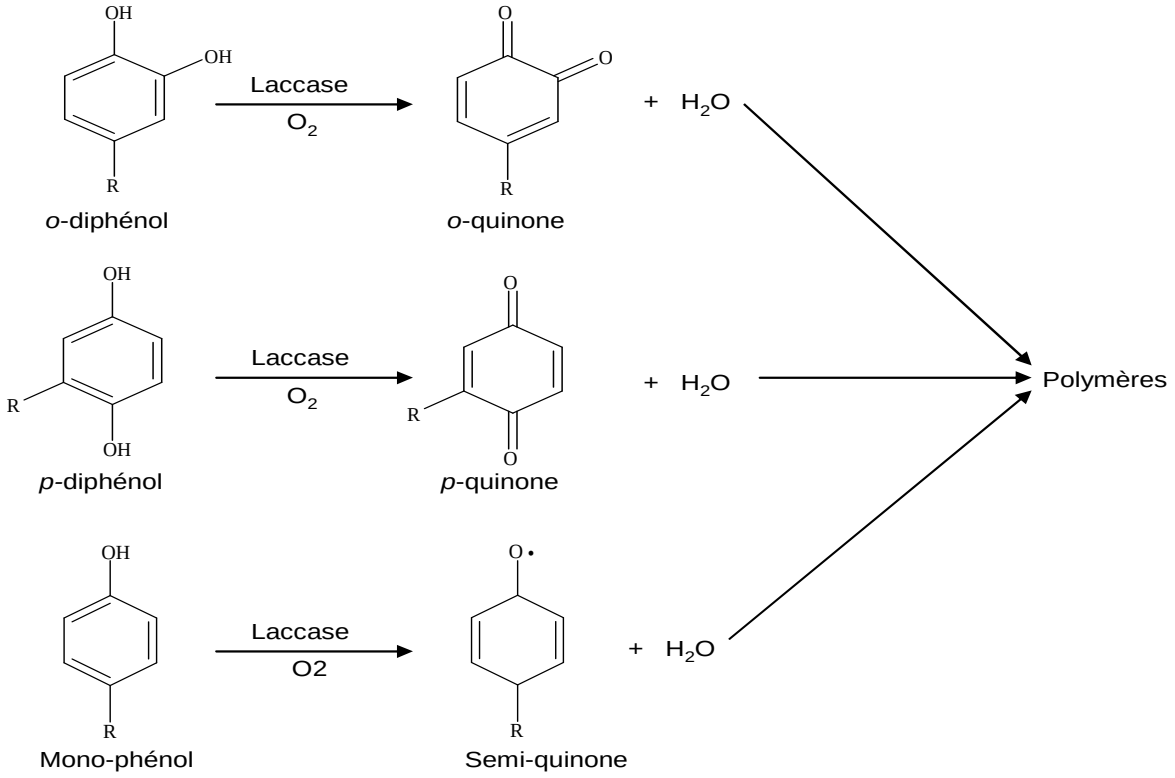


Figure 2 : réactions catalysées par les laccases (E.C.1.10.3.2)

I.3. Distribution des laccases

Les laccases sont normalement distribuées dans la famille des eucaryotes tels que les plantes supérieures et les champignons ainsi que dans la famille des procaryotes tels que les bactéries (Mayer et Staples, 2002). Chez les eucaryotes, les laccases se trouvent dans le cytoplasme des cellules (Harvey et Walker, 1999). Chez les procaryotes, ces enzymes se

trouvent en évidence chez quelques bactéries comme *Alteromonas sp*. et *Azospirillum lipoferum* (Alexandre *et al.*, 1996). De plus, ces enzymes ont été identifiées chez quelques insectes comme *Drosophila melanogaster* (Kramer *et al.*, 2001) et aussi dans le sol (Gianfreda *et al.*, 1999).

La présence de laccases dans les plantes supérieures apparaît moins importante que chez les champignons. D'une part, l'extraction des laccases est compliquée parce qu'elles sont fortement liées à la paroi cellulaire. D'autre part, la caractérisation de l'activité laccasique est rendue délicate dans l'extrait brut par la présence fréquente d'autres activités oxydasiques comme la catéchol oxydase et la peroxydase (Mayer et Staples, 2002).

I.4. Caractéristiques biologiques et fonctions physiologiques

Les laccases sont des glycoprotéines avec un taux d'oses variant de 10 à 45 %. Le poids moléculaire varie de 50 à 100 kDa (Solomon *et al.*, 1996). Le poids moléculaire des laccases fongiques est moins élevé que celui des laccases de plantes (Burton, 2003 a). Le pH optimal des laccases fongiques varie de 3 à 8 comme la laccase de *Myceliophthora thermophila* dont l'activité optimale est à pH 7,5 (Mustafa *et al.*, 2005) bien que, certaines laccases de plantes peuvent être actives à pH 9 (Gianfreda *et al.*, 1999).

Les laccases peuvent participer à la biosynthèse des mélanines (chez les bactéries). De plus, les laccases des champignons pouvent participer à la dégradation des lignines (Kim Y. *et al.*, 2002). Par contre, les laccases de plantes sont impliquées dans la synthèse des lignines dans les parois de certaines cellules végétales (Bao *et al.*, 1993).

I.5. Structure des laccases

La structure de laccases comme celles de *Bacillus subtilis* (Enguita *et al.*, 2004), ou *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002) ont été étudiées par différentes techniques comme la différence des rayons X, la spectroscopie UV / visible ou la RPE (résonance paramagnétique électronique).

Dans la Figure 3, la structure tridimensionnelle de la laccase de *Trametes versicolor* est représentée. Les détails de la position des atomes du cuivre du site actif de l'enzyme, la position du substrat, l'ABTS (2,2´-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) liées aux protéines sont aussi représentés sur cette figure.

Figure 3 : représentation de la structure 3D de la laccase de *Trametes versicolor* obtenue par cristallographie aux rayons X (Piontek *et al.*, 2002)
(Les atomes de cuivre sont représentés par les quatre sphères bleues)

En général, elles sont des glycoprotéines monomériques, dimériques ou tétramériques contenant au niveau de leur site actif quatre atomes de cuivre qui sont différents par la nature de leurs ligands (Riva, 2006). On distingue trois sites appelés T1, T2 et T3 (Figure 4) d'après leurs propriétés spectroscopiques (Witayakran et Ragauskas, 2009) :

- Le site T1 contient un atome de cuivre (Cu1) et absorbe à 610 nm. Il est coordinné à une cystéine et c'est celui qui est responsable de la couleur bleue de l'enzyme (Claus, 2004 ; Witayakran et Ragauskas, 2009).

- Le site T2 contient le cuivre qui n'a pas de bande d'absorption dans le visible (non bleu) (Cu2) et il forme avec l'azote des histidines et avec l'oxygène un complexe tétraédrique.

- Le site T3 absorbe à 330 nm. Chaque ion cuivre est lié à trois histidines. Le cuivre de type2 forme avec les autres ions cuivre de type 3 un « cluster » trinucleaire ou les atomes de cuivre sont au sommet d'un triangle (Riva, 2006).

Dans le site actif, un groupe de 3 atomes de cuivre (Cu2 de T2 et Cu3a et Cu3b de T3) est responsable de l'activation de l'oxygène, alors que un atome de cuivre (Cu1 de T1) est responsable de l'oxydation des phénols (Claus, 2004 ; Minussi *et al.*, 2002).

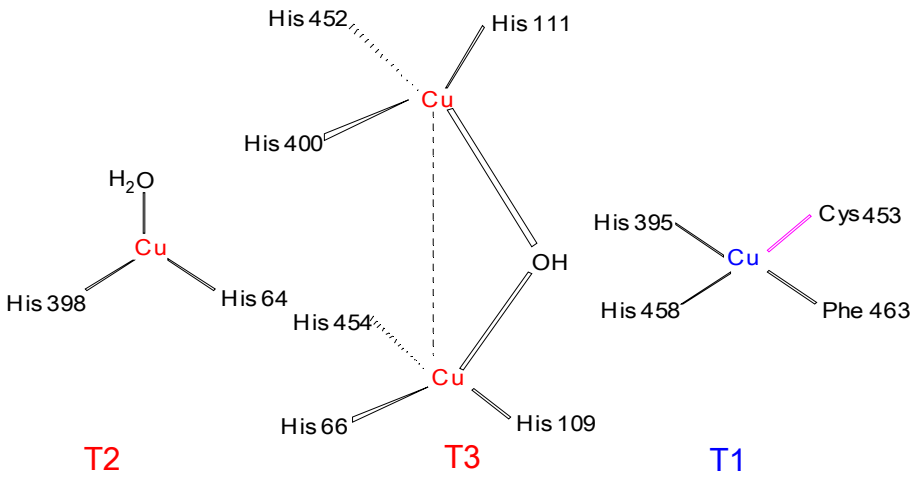


Figure 4 : environnement des 4 atomes du cuivre du site actif de la laccase de *Bacillus subtilis* (Witayakran et Ragauskas, 2009)

I.6. Mécanisme réactionnel

Plusieurs études réalisées sur différentes laccases ont permis d'expliquer le cycle catalytique des laccases (Baldrian, 2006 ; Claus, 2004). Il met en jeu la réduction d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau et l'oxydation concomitante de quatre molécules de substrats produisant quatre radicaux libres. Ces radicaux instables et très réactifs peuvent réagir pour produire ensuite des dimères, des oligomères et des polymères. Le mécanisme catalytique de la laccase est de type «donneur-accepteur» (Messerschmidt, 1997 ; Mougin *et al.*, 2003), comprenant 3 étapes (Figure 5) :

1) l'oxydation du substrat par la laccase : le substrat perd un électron (donneur), et la laccase gagne un électron (accepteur) au niveau du site contenant le cuivre (Cu1) de type T1. Donc,

l'oxydation du substrat et la réduction du cuivre (Cu1) de type T1 de Cu^{+2} à Cu^{+1} ont lieu lors de cette étape.

2) le transfert interne d'électrons du Cu1 de T1 au «cluster tri nucléaire » qui contient trois atomes de cuivre (Cu2 de T2 et Cu3a et Cu3b de T3). Ainsi, l'oxydation de l'atome Cu1 (Cu^{+1} à Cu^{+2}) de T1 et la réduction des atomes Cu2 et Cu3a et Cu3b (Cu^{+2} à Cu^{+1}) de T2 et T3 se passent lors de cette étape**.**

3) Après la réduction complète du centre tri nucléaire, pour activer l'oxygène moléculaire, les atomes du cuivre de type (2 et 3) réduisent l'oxygène. C'est–à–dire, les atomes du cuivre perdent des électrons (donneur) et l'oxygène moléculaire gagne des électrons (accepteur). Donc, l'oxydation des atomes Cu2 et Cu3a et Cu3b (Cu^{+1} à Cu^{+2}) de T2 et T3 et la réduction d'O_2 à H_2O se déroulent en cette étape.

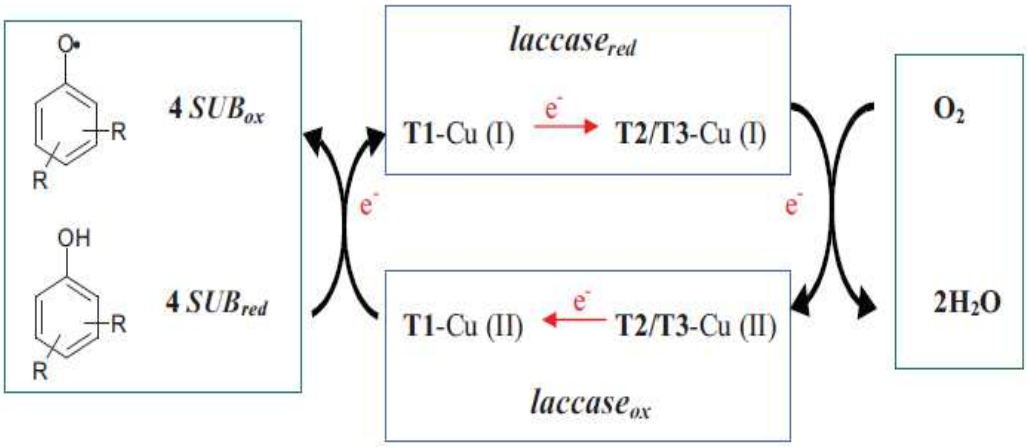


Figure 5 : cycle catalytique de laccase (Polak et Jarosz-Wilkolazka, 2012)

L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase commence par la formation de radicaux phénoxy « semiquinones » (Figure 6).

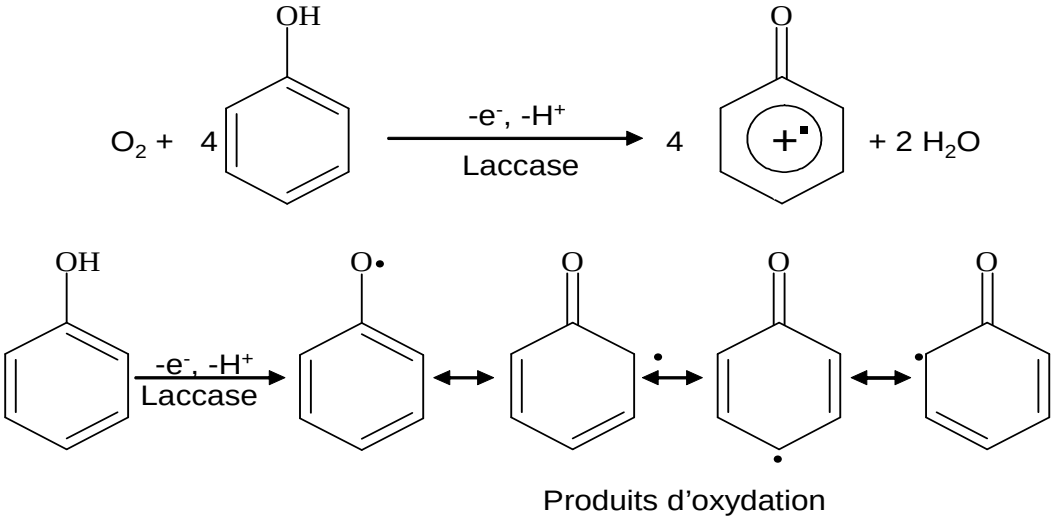


Figure 6 : produits d'oxydation formés par les laccases

Ces radicaux, de natures instables et très réactifs, subissent soit un deuxième arrachement d'électrons pour donner les quinones correspondantes, soit subissent des réactions non enzymatiques comme des réactions de couplage pour donner des dimères (Intra *et al.*, 2005) puis, des oligomères ou des polymères peuvent être générés par combinaison des dimères précédents (Aktas *et al.*, 2003).

Dans la littérature, il n'apparaît que deux types de couplage qui peuvent avoir lieu au cours de l'oxydation par des laccases (Polak et Jarosz-Wilkolazka, 2012). Les deux types de couplage sont expliqués dans le schéma suivant (Figure 7).

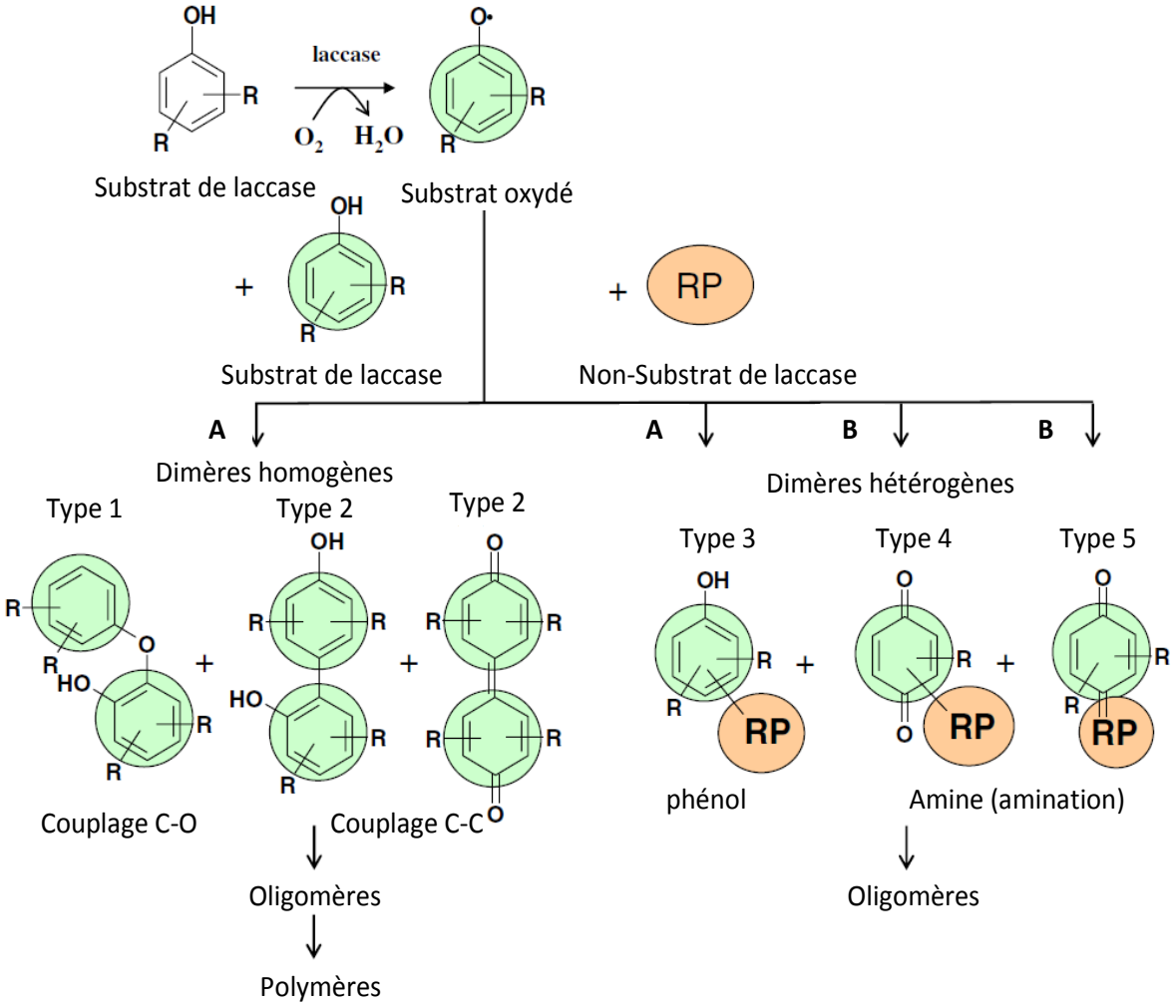


Figure 7 : schéma simple de formation des dimères homogènes et hétérogènes. R : plusieurs substituants ou des systèmes cycliques. A : Type de réaction = couplage oxydatif, condensation oxydative ou par couplage oxydatif phénolique. B : Type de réaction : couplage oxydatif avec une amination nucléaire (Mikolasch et Schauer, 2009)

1- Couplage pour produire de nouvelles molécules homogènes : ces dimères homogènes sont des produits de la dimérisation de radicaux phénoxy qui sont formés lors de l'oxydation d'un substrat unique par une laccase. Ces dimères découlent de la formation de nouvelles liaisons entre un carbone et un oxygène (C-O) ou entre deux atomes de carbone (C-C).

- Le couplage carbone-carbone (C-C) : ce couplage se passe préférentiellement en milieu acide et l'élévation de la température de réaction favorise ce couplage.

- Le couplage carbone-oxygène (C-O) : ce couplage se passe en milieu basique et l'augmentation de la quantité de substrat favorise ce couplage (Kobayashi et Higashimura, 2003). Par exemple, la polymérisation du 2,6-diméthylphénol (2,6-Me_2P) à la suite de l'oxydation par les laccases conduit soit au polymère poly (2,6-diméthyle-1,4-phénylène oxyde) (P- 2,6-Me_2P) soit au 3,3',5,5'-tetra-méthyl-diphénoxy quinone (DPQ) (Figure 8) (Kobayashi et Higashimura, 2003). Dans ce cas, le couplage de type C-C à faible pH est favorisé.

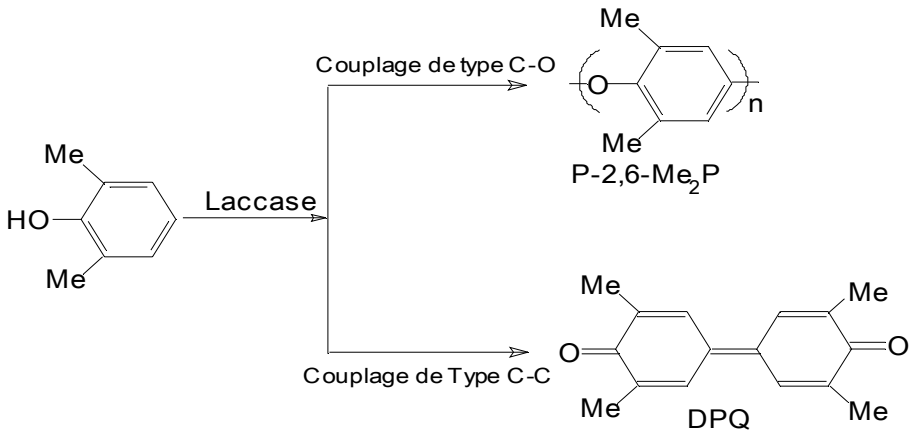


Figure 8 : couplages homogènes C-O et C-C pouvant avoir lieu lors d'une oxydation du 2,6-diméthylphénol catalysée par les laccases (Kobayashi et Higashimura, 2003)

2- Couplage pour produire de nouvelles molécules hétérogènes : les laccases sont également capables de coupler un substrat spécifique de la laccase avec un autre substrat non-spécifique afin de produire de nouvelles molécules hétérogènes (Polak et Jarosz-Wilkolazka, 2012). Mikolasch et Schauer ont distingué six types de dimères synthétisés par des laccases à partir de substrats avec des structures différentes, trois dimères homogènes et trois dimères hétérogènes (Mikolasch et Schauer, 2009). Dans ce cas, une molécule acceptrice réagit avec le radical synthétisé par la laccase et forme de nouveaux produits avec des liaisons C-C, C-O, C-N et C-S dans une étape non-enzymatique (Mikolasch et Schauer, 2009). Par exemple, la réaction du couplage entre le catéchol et l'acide 2,5-diamino-benzène sulfurique (précurseur de colorant) peut générer l'obtention d'un produit coloré (Figure 9) (Tzanov *et al.*, 2003).

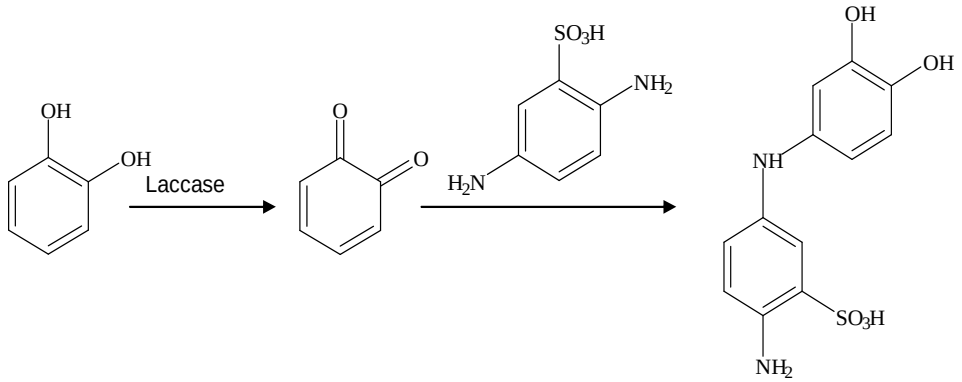


Figure 9 : couplage hétérogène C-N pouvant avoir lieu lors de l'oxydation du catéchol par la laccase de *Trametes villosa* avec l'acide 2,5-diamino-benzène sulfurique (Tzanov *et al.*, 2003)

Concernant l'oxydation de l'acide férulique (AF), un couplage C-O est suggéré avec la formation de deux radicaux phénoxy au niveau de l'oxygène, et au niveau du groupement carboxyle, avec la formation de dimères comme produits finaux issus de la catalyse enzymatique (Ralph *et al.*, 1994). Donc, au cours de l'oxydation enzymatique, les molécules d'AF subissent une oxydation catalysée par la laccase pour former probablement des dimères *via* des couplages C-O. Cependant, le couplage C-C se forme entre deux radicaux phénoxy de l'AF, ce type de couplage pouvant avoir lieu en milieu acide et à température élevée.

I.7. Spécificité de substrat

I.7.1. Composés phénoliques

Les laccases sont capables d'oxyder directement les composés phénoliques notamment des monomères, *o*-, *p*- diphénols et leurs dérivés substitués sur différentes positions par –OCH_3, -CH_3, - SO_3, NH_2 ou –COOH (Polak et Jarosz-Wilkolazka, 2012). De plus, elles sont capables de polymériser ou dépolymériser des polyphénols comme la lignine (Kim Y. *et al.*, 2002).

L'activité des laccases envers les substrats phénoliques dépend de l'origine de l'enzyme, de la nature, et /ou de la position des substituants par rapport à la fonction phénol (Gianfreda *et al.*, 1998). Les substrats dont les substituants ou un des substituants se trouvent en position

para sur le phénol sont les meilleurs substrats tels que le substituant de -OCH_3 en position *para* dans le substrat *p*-méthoxylphénol, et ce quelle que soit l'enzyme utilisée (Toscano *et al.*, 2003). Par ailleurs, la présence d'un groupement méthyle ou méthoxyle en position *para* sur le cycle aromatique augmente la vitesse de la réaction et l'affinité enzymatique qui s'accroît avec le nombre de substituant méthoxyle sur le noyau aromatique (D'Annibale *et al.*, 1996).

Plusieurs études sur l'oxydation des phénols ont montré qu'il existe une corrélation entre la réactivité enzymatique et la différence des potentiels redox (ΔE°) entre le cuivre T1 du site actif de l'enzyme et les phénols (Xu *et al.*, 2000).

$$\Delta E° = E°Cu \text{ de type1 (T1) des laccases} - E° \text{ substrat} \qquad \textbf{Équation 1}$$

La force de transfert d'un électron entre l'enzyme et le substrat est proportionnelle à la différence des potentiels redox (ΔE°). Ainsi, la vitesse de transfert d'électrons diminue pour les substrats ayant un potentiel redox élevé et donc la réactivité enzymatique diminue.

L'effet électronique des substituants joue également un rôle important. Généralement, l'affinité et l'efficacité catalytique (V_{max}/K_m) s'accélèrent lorsque le substituant du cycle aromatique cède facilement un électron comme -OCH_3 et -CH_3 (Dec *et al.*, 2003). Par contre, les phénols substitués en *ortho* ou *para* par des groupements attracteurs d'électrons tels que NO_2 et $COCH_3$ sont plus difficiles à oxyder. Il est montré que l'effet électronique des substituants est plus important que l'effet stérique lorsque les phénols sont substitués par des groupements de petite taille (H, OH, OCH_3, CH_3, C_2H_5) (Xu, 1996).

I.7.2. Composés non phénoliques

En ce cas, les laccases peuvent oxyder ces substrats indirectement en présence d'un substrat intermédiaire appelé « médiateur chimique ». Les médiateurs les plus fréquemment utilisés sont le (HBT) 1-hydroxy benzotriazole, l'acide violurique (VIO), (2,2,6,6-tétra méthyl pipéridine-1-oxyl) (TEMPO), 2,2´-azino bis-(3-ethyl benzo thiazoline-6-sulfonate (ABTS), hydroxy-acétanilide (NHA) et hydroxy-phtalimide (HPI) (Polak et Jarosz-Wilkolazka, 2012).

De plus, les médiateurs chimiques sont utilisés quand les substrats ne peuvent pas pénétrer jusqu'au site actif de l'enzyme (encombrement stérique du substrat) ou possèdent un potentiel redox trop élevé (Kudanga *et al.*, 2011). En effet, le médiateur transporte les électrons entre le substrat et l'enzyme. Ainsi, la laccase oxyde le médiateur en radical, qui à son tour, oxyde le substrat (Figure 10) (Burton, 2003 a;, 2003 b).

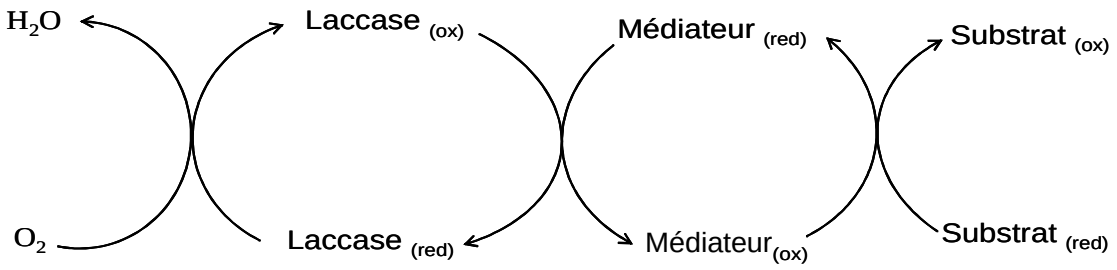


Figure 10 : cycle catalytique de système (médiateur / laccase)

L'activité du système médiateur/laccase envers les substrats dépend du potentiel d'oxydoréduction de l'enzyme, de la stabilité, de la réactivité du radical formé au cours de l'oxydation du médiateur et de la taille moléculaire du substrat (Polak et Jarosz-Wilkolazka, 2012).

I.8. Inhibiteurs

Ces molécules peuvent se lier aux cuivres de type 2 et 3 du site actif de la laccase. Par conséquent, ces liaisons bloquent le transfert interne de l'électron entre les différents types du cuivre comme les thiocyanates, l'azoture, Hg^{+2}, le fluorure (Johannes et Majcherczyk, 2000). D'autres molécules comme les détergents cationiques inhibent l'activité enzymatique en modifiant les acides aminés ou la conformation active de l'enzyme (Gianfreda *et al.*, 1999).

I.9. Caractérisation des produits d'oxydation (quinones)

Les *o*- / *p*- quinones sont les produits primaires de l'oxydation enzymatique des phénols. Ces produits se caractérisent par leur réactivité qui dépend de la structure des quinones, du pH du milieu et la nature du solvant.

Au vu des propriétés physiques, les quinones sont capables d'absorber dans le visible avec des teintes allant du jaune brillant (catéchine) ou rose (acide caféique) en passant par le jaune orangé (acide chlorogénique) jusqu'au brun (Kermasha *et al.*, 2002). Cette propriété dépend du pH et de la nature du solvant utilisé (Rompel *et al.*, 1999).

Au vu des propriétés chimiques, les *o-/p-* quinones formées par voie enzymatique ou non enzymatique sont des espèces très instables, fortement électrophiles et très réactives. C'est pour cette raison qu'elles sont rapidement impliquées dans d'autres réactions, qui conduisent à la formation des nouveaux composés dont certains sont colorés.

I.9.1. Réactions d'oxydoréduction couplées et additions nucléophiles

I.9.1.1. Réactivité avec l'acide ascorbique

L'acide ascorbique et ses dérivés sont bien connus pour réduire les *o*-quinones et les ramener à l'*o*-diphénol dont elles sont issues d'origine (Nicolas *et al.*, 1994). Il en résulte que la formation des produits colorés sera bloquée. Le faible coût de l'acide ascorbique et ses propriétés antioxydantes et antiradicalaires en font un traitement alternatif de choix aux sulfites. Le couplage entre la réduction des quinones et l'oxydation de l'acide ascorbique (AH_2) (un agent réducteur) se traduit en fait par la dégradation de ce dernier en acide déhydroascorbique (DHA) et la reconstitution de l'*o*-diphénol d'origine (Figure 11) (Rouet-Mayer *et al.*, 1993).

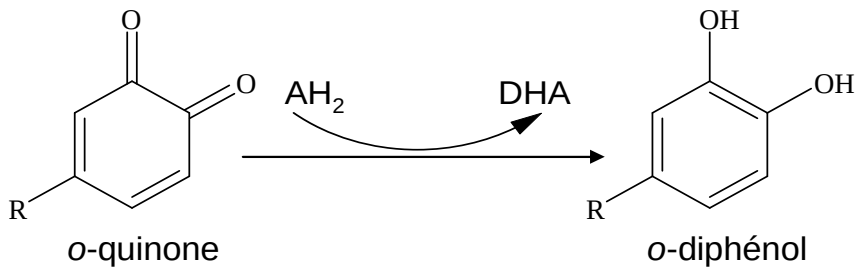


Figure 11 : réaction entre une quinone et l'acide ascorbique

I.9.1.2. Réactivité avec les sulfites et leurs dérivés

Les sulfites sont capables d'agir simultanément sur les PPOs et sur les produits de la réaction d'oxydation catalysée par ces enzymes (Walker et Ferrar, 1998). Les formes solubles des sulfites, à savoir les ions sulfite (SO_3^{-2}) et bisulfites (HSO_3^{-2}), sont capables d'inactiver de manière irréversible les PPO de végétaux supérieurs ou d'origine fongique (Golan-Goldhirsh et Whitaker, 1984). Par contre, les laccases sont plus résistantes et moins sensibles à l'inhibition par les sulfites que les autres PPO. Le second effet des sulfites est leur complexation avec les *o*-quinones conduisant à la formation de produits d'addition stables et incolores avec la régénération du phénol initial (Figure 12) (Nicolas *et al.*, 1994 ; Walker et Ferrar, 1998).

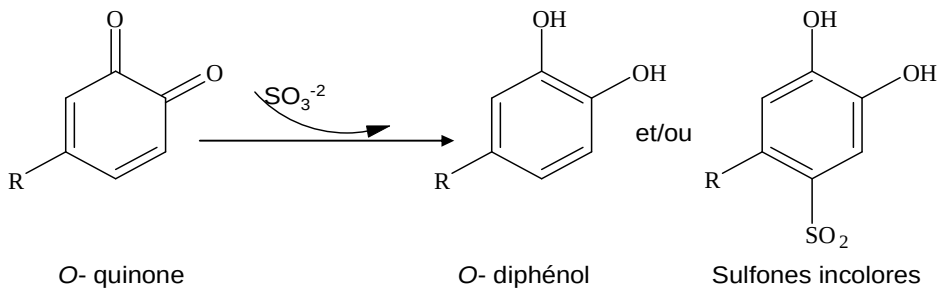


Figure 12 : réaction entre une quinone et un sulfite

I.9.1.3. Réactivité avec l'eau

En milieu aqueux, les quinones sont instables et conduisent à la formation de polymères colorés. Par contre, les réactions de polymérisation des quinones diminuent quand on passe d'un milieu aqueux à un milieu organique (Mustafa *et al.*, 2005). En effet, les quinones réagissent avec l'eau en donnant des trihydroxybenzènes ; ceux-ci réagissent ensuite avec d'autres quinones pour former des hydroxyquinones, qui sont enfin le siège d'une condensation oxydative pour donner des polymères.

I.9.1.4. Réactivité avec les amines et leurs dérivés (amination)

En présence de nucléophiles (les amines et leurs dérivés) dans le milieu réactionnel, les quinones peuvent réagir par des liaisons covalentes stables (C-N) avec les groupements

amines terminaux pour donner de nouveaux produits (aminoquinines). Ces réactions sont favorables lorsque les quinones sont en excès. Il est connu que les quinones peuvent subir au moins deux types différents de réactions avec les groupements amines donnant soit des bases de Schiff soit des adduits de type michaélien (Figure 13).

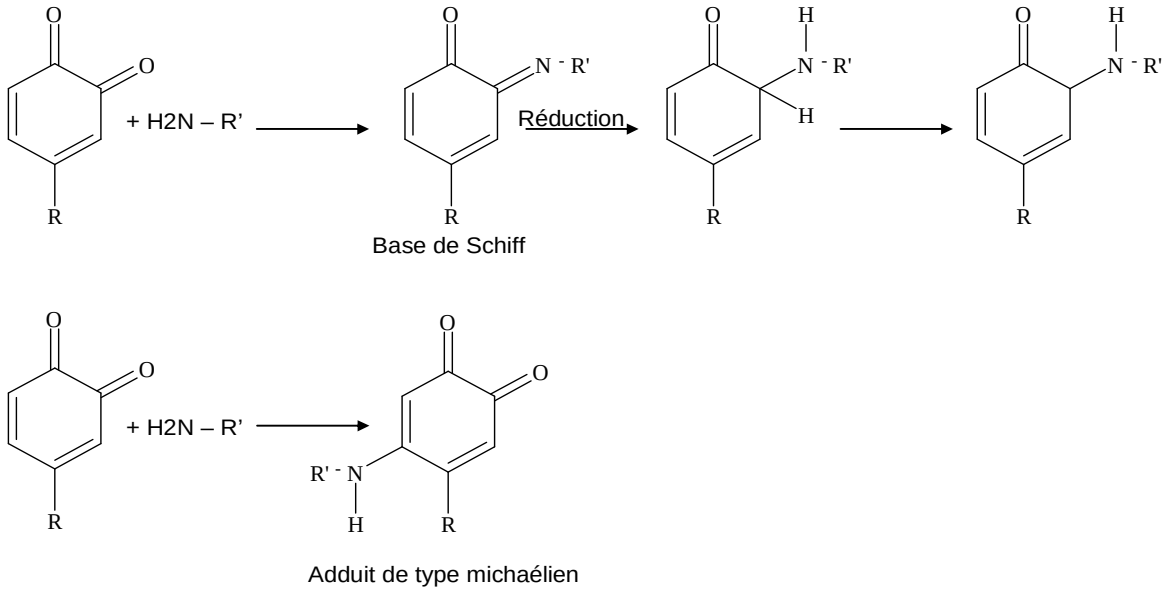


Figure 13 : deux réactions quinone-amine donnant des bases de Schiff et des adduits de type michaélien (Kumar *et al.*, 1999)

Les quinones peuvent réagir avec les groupements amines d'acides aminés libres comme la lysine, la tyrosine (Mikolasch *et al.*, 2010), la phénylalanine, le tryptophane (Hahn *et al.*, 2009a;, 2009b ; Manda *et al.*, 2006), la méthionine, l'histidine, la cystéine (Romero *et al.*, 1998) conduisant à des produits colorés. Les quinones peuvent aussi réagir avec les acides aminés liés soit dans les peptides comme le peptide (Tyrosine-Lysine) (Mikolasch *et al.*, 2010) ou dans les protéines comme l'α-lactalbumine et la β-lactoglobuline (Thalmann et Lotzbeyer, 2002). De plus, les quinones peuvent réagir avec les groupements amines des polymères comme le chitosane (Bozic Mojca *et al.*, 2012a ; Bozic M. *et al.*, 2012b) ou le polyamide/ n-Butylamine (Acero *et al.*, 2012).

Les quinones peuvent réagir avec les acides aminés soufrés sous forme libre ou sous forme liée dans les peptides ou les protéines avec régénération du précurseur phénolique

(Negishi et Ozawa, 2000). Les produits qui se forment sont incolores et peuvent, de part leur structure, être ultérieurement oxydés, par une réaction d'oxydoréduction couplée en présence d'un excès de quinone conduisant à la formation de produits fortement colorés.

De plus, les quinones sont capables de réagir avec des amines donnant des produits complexes (Strauss et Gibson, 2004). Un mécanisme simplifié d'associations entre les produits d'oxydation des polyphénols et les groupements amine libres des chaînes latérales de certains acides aminés, comme la lysine, est présenté dans la Figure 14.

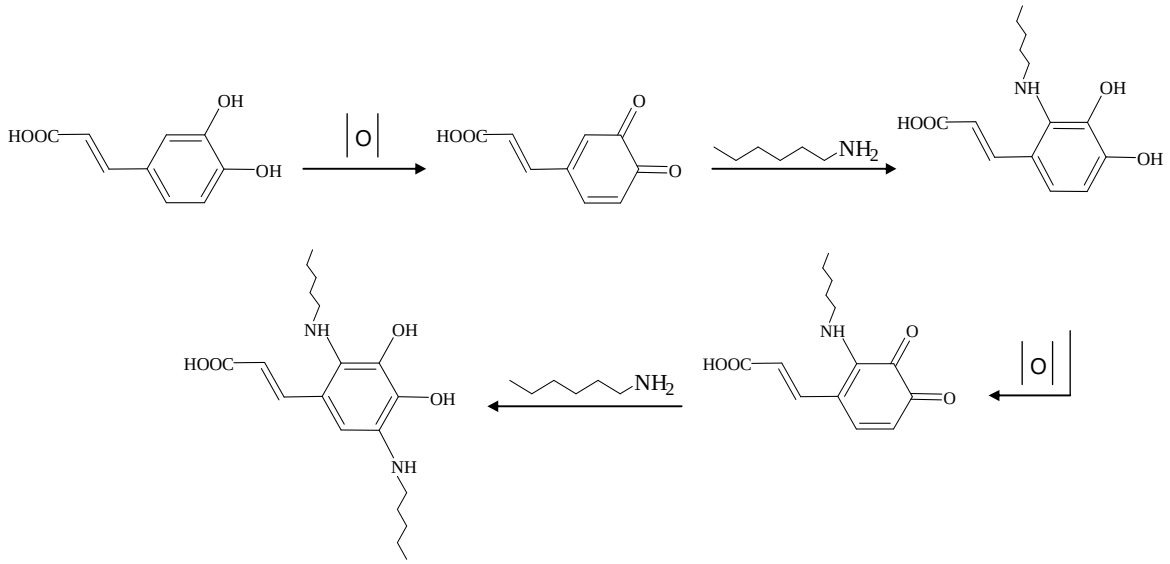


Figure 14 : mécanisme simplifié de la réaction des intermédiaires de la polymérisation des phénols avec des groupements amine (Strauss et Gibson, 2004)

Les quinones peuvent réagir avec la protéine enzymatique en formant des liaisons covalentes avec le cuivre du site actif. Cela conduit au blocage du cuivre et à l'inactivation de l'enzyme (Toscano *et al.*, 2003).

I.9.1.5. Réactivité avec les autres phénols

1- Les quinones (*o*- ou *p*-) peuvent réagir avec une molécule de phénol (son précurseur) pour former un dimère homogène (Oszmianski et Lee, 1990).

2- Elles peuvent réagir avec une molécule de phénol de nature différente pour conduire à un dimère hétérogène avec régénération du phénol d'origine et formation d'une nouvelle quinone (Sarni-Manchado *et al.*, 1997).

En général, les quinones sont impliquées dans des réactions de couplage de type biphényle (C-C) mais aussi biphényle-éther (C-O) pour former dimères, oligomères ou polymères.

I.9.2. Additions radicalaires

Les semiquinones formées par oxydation peuvent intervenir dans plusieurs types de mécanismes radicalaires qui sont susceptibles de fournir un grand nombre de produits d'additions. En effet, la structure conjuguée des polyphénols et la délocalisation possible des électrons permet d'avoir plusieurs isomères et donc de multiplier et compliquer les réactions de couplage (Trabelsi *et al.*, 2004). Par exemple, l'acide férulique cède un proton pendant l'auto-oxydation ou l'oxydation par les laccases. L'électron libre sur le radical formé peut se délocaliser sur toute la molécule (Figure 15) formant ainsi plusieurs isomères radicalaires. Les substituants alkyles en *ortho* et en *para* changent la densité électronique et donc la stabilité du radical et des produits (Rawel *et al.*, 2001).

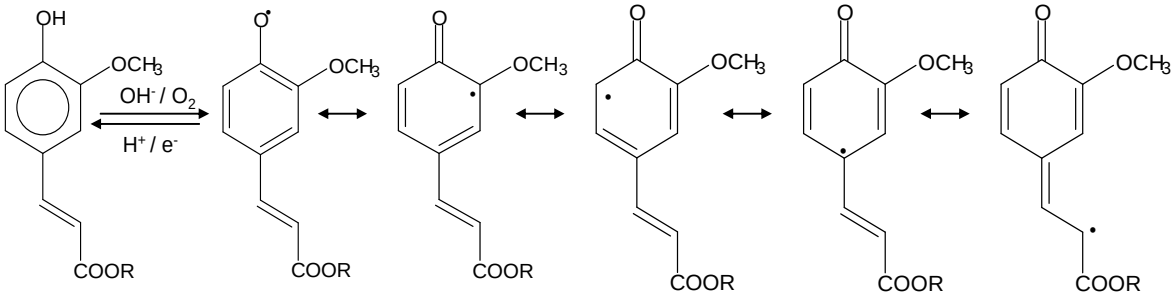


Figure 15 : différents radicaux (semiquinones) formés par oxydation de l'acide férulique par les laccases (Rawel *et al.*, 2001)

I.10. Facteurs influençant l'activité des laccases

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques spécifiques dont l'activité optimale varie selon plusieurs paramètres comme la source de l'enzyme, la nature et la quantité de produits formés, la nature des substrats, la qualité d'eau libre présente dans le milieu (ou activité de l'eau), le pH du milieu, la température et l'oxygène…

I.10.1. Influence du milieu réactionnel

L'influence du solvant est multiple sur la réaction enzymatique. En effet, le solvant affecte le catalyseur (les enzymes), les substrats et les produits de la réaction.

Les réactions catalysées par des laccases en milieu aqueux sont limitées à cause de la forte réactivité des quinones. En conséquence, cette activité provoque une polymérisation rapide et spontanée des intermédiaires (quinones, semiquinones) conduisant à la formation de polymères insolubles. Par ailleurs, le rendement de conversion des phénols diminue car l'activité élevée des quinones dans ce milieu cause l'inactivation de l'enzyme (Colombo et Carrea, 2002). Pour éviter cela, des agents réducteurs peuvent être utilisés comme l'acide ascorbique afin de réduire les *o*-quinones en *o*-dihydroxy phénols (Burton, 1994).

Par ailleurs, en milieu organique, le solvant permet d'augmenter la solubilité des substrats. Il permet également de faciliter la séparation (enzyme /produits) grâce à l'insolubilisation des enzymes en phase organique, ce qui diminue l'inhibition des enzymes par les produits (Burton *et al.*, 1998). Par contre, ce milieu peut provoquer la dénaturation et/ou l'inhibition des enzymes par certains solvants organiques comme le méthanol (Bogdanovskaya *et al.*, 2002) ou la diminution de l'activité enzymatique par un milieu diphasique (Mustafa *et al.*, 2005).

Cependant, une faible quantité d'eau en milieu organique est nécessaire pour conserver l'activité enzymatique. En effet, l'eau permet de conserver la conformation tridimensionnelle de l'enzyme sous sa forme active car l'eau participe à toutes les liaisons non covalentes et aux liaisons hydrogène dans la structure de la protéine. De plus, l'eau entoure les zones chargées et polaires à la surface de l'enzyme (Diaz-Garcia et Valencia-Gonzalez, 1995). La quantité

minimale d'eau nécessaire en milieu organique pour la biocatalyse enzymatique varie selon l'enzyme et les conditions de la réaction (Vermuë et Tramper, 1995). Généralement, l'augmentation de la quantité d'eau dans le milieu organique accroît l'activité enzymatique (Burton, 2003 a)

Le solvant influence également le nombre des produits d'oxydation. Par exemple, Mustafa et ses collèges (2005) ont utilisé la laccase de *Myceliophthora thermophila* pour oxyder l'acide férulique dans un milieu aqueux et un milieu diphasique (acétate d'éthyle 80% - tampon phosphate 20%). Ils ont identifié dix produits d'oxydation dans le milieu aqueux et trois produits d'oxydations dans le milieu diphasique (Mustafa *et al.*, 2005).

I.10.2. Influence du pH

L'activité enzymatique dépend du pH en milieu aqueux. De même, en milieu organique, l'activité dépendrait du pH de la solution aqueuse initiale dans laquelle l'enzyme a été préparée (Mustafa *et al.*, 2005). Le pH d'activité enzymatique optimal dépend généralement du type d'enzyme (Xu, 1997). Dans la réaction catalysée par les laccases, le potentiel redox des partenaires de la réaction devrait être dans l'ordre suivant (2) (Xu, 1997):

$$E° \text{ (Substrat)} \leq E° \text{ (Enzyme)} \leq E° \text{ } (O_2/H_2O) \qquad \textbf{Équation 2}$$

L'affinité des laccases envers leurs substrats varie généralement selon de pH du milieu, et le changement de pH influence le potentiel redox des trois partenaires :

1- Enzyme : le potentiel redox des laccases change avec le pH. Par exemple, le potentiel redox de la laccase de *Myceliophthora thermophila* diminue quand la valeur de pH augmente de 2,5 à 5. En ce cas, son activité diminue parce que le potentiel du substrat est plus important que celui de l'enzyme. Au contraire, le potentiel redox de cette enzyme augmente quand la valeur de pH augmente de 7 à 11 et donc son activité s'élève (Xu, 1997).

2- Substrat : à pH élevé, les phénols s'ionisent et perdent un proton ce qui conduit à la diminution de leur potentiel redox. Par contre, la fixation des ions hydroxyles OH^- sur le cuivre du site actif (type 2 ou 3) des laccases à pH élevé, pourrait inhiber l'activité

enzymatique car il empêche le transfert interne d'électrons du cuivre T1 au cuivre T2/T3 de l'enzyme (Xu, 1997).

3- Oxygène : quand la valeur de pH augmente jusqu'à 11, le potentiel (O_2/H_2O) diminue. Donc, le $\Delta E°$ entre le couple (O_2/H_2O) et Cu (T2/T3) diminue. Cela conduit à la diminution de la vitesse de transfert des électrons du cuivre dans le site actif de l'enzyme à l'oxygène et donc, à une diminution de la vitesse de réaction enzymatique (Xu, 1997).

I.10.3. Influence de la température

La température est un paramètre essentiel pour les réactions enzymatiques. En général, l'augmentation de la température devrait activer l'enzyme, cependant des températures élevées (plus de 50°C) peuvent provoquer une dénaturation de la protéine enzymatique et aussi diminuer la solubilité de l'oxygène dans le milieu réactionnel (Weiss, 1970). De plus, l'augmentation de la température peut entraîner la dégradation de certains produits d'oxydation ou la formation de produits secondaires. En général, la thermostabilité de l'enzyme dépend de plusieurs facteurs :

1- *la structure de l'enzyme :* la thermostabilité dépend de la structure quaternaire et elle augmente avec le nombre de ponts disulfures dans la protéine enzymatique. Par exemple, les laccases provenant de champignons thermophiles (comme la laccase de *Myceliophthora thermophila*) sont plus stables que celles de champignons mésophiles (Xu, 1996).
2- *La nature du milieu :* en milieu organique, la thermostabilité de l'enzyme est plus élevée que celle en milieu aqueux parce que les molécules d'eau libre participent à la dénaturation thermique de l'enzyme (Xu, 1996).
3- *La formulation de l'enzyme :* les enzymes immobilisées sont plus thermorésistantes que les enzymes libres (Duran *et al.*, 2002).
4- *Le pH du milieu :* par exemple, la thermostabilité de la laccase de *Myceliophthora thermophila* est plus importante en milieu alcalin ou neutre qu'en milieu acide Ce résultats n'a pas été observé pour la laccase de *Trametes villosa* qui est stable à pH compris entre 4,5 et 6,5 (Xu, 1996).

I.10.4. Influence de l'oxygène

Généralement, l'oxygène est consommé à la fois par l'enzyme et par les produits d'oxydation durant les réactions non-enzymatiques. L'oxygène joue le rôle d'accepteur d'électrons de cuivre (T_2/T_3). Donc, l'oxygène est nécessaire pour l'oxydation du cuivre (Cu^{+1} à Cu^{+2}), l'activation et la régénération du site actif de l'enzyme (Burton *et al.*, 1993). La vitesse de l'oxydation dépend de la teneur initiale d'oxygène dans le milieu (Lacki et Duvnjak, 1996). De plus, la méthode utilisée pour l'introduction de l'O_2 dans le milieu réactionnel peut causer une désactivation de l'enzyme. En effet, les forces interfaciales (gaz-liquide) perturbent l'activité enzymatique. Pour cette raison, l'ajout d'O_2 en limitant les bulles de gaz dans le milieu réactionnel est préférable à l'activité enzymatique (Rissom *et al.*, 1997).

I.11. Applications biotechnologiques des laccases

Grâce à leur large spectre de réactivité, les laccases ont pu être utilisées dans diverses applications biotechnologiques (Rodraguez Couto et Toca Herrera, 2006 ; Wang *et al.*, 2010). En effet, en vue de développer des procédés écologiques, les industriels s'intéressent à l'utilisation d'enzymes capables de catalyser des réactions chimiques difficiles ou « coûteuses » d'un point de vue environnemental.

I.11.1. Industrie agro-alimentaire

Les laccases sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, en grande partie en raison de leur capacité à améliorer les produits alimentaires et les procédés de manière spécifique avec des effets secondaires minimes.

Plusieurs auteurs ont cherché à exploiter l'oxydation des composés phénoliques par les laccases comme la laccase de *Myceliophtora thermophila* pour produire des colorants alimentaires et remplacer les colorants chimiques comme la tartrazine, le rouge carmin, ou encore l'amarante (Mustafa *et al.*, 2005). Les laccases ont été également utilisées pour éliminer des polyphénols à l'origine d'une turbidité indésirable dans le jus de fruit ainsi que ceux responsables du trouble de la bière et du vin (Duran *et al.*, 2002 ; Jackson, 2008). Grâce aux laccases, en particulier la laccase de *Myceliophtora thermophila*, il est possible de fixer

de façon covalente les phénols au liège du bouchon du vin en leur faisant subir une polycondensation spontanée qui neutralise le mauvais goût (Burton, 2003 b).

De plus, les laccases pourraient être utilisées pour catalyser la gélification oxydative des arabinoxylanes de la farine et donc améliorer ses propriétés rhéologiques (Figueroa-Espinoza *et al.*, 1998 ; Selinheimo *et al.*, 2006). La laccase de *Myceliophtora thermophila* a pu conduire à la formation d'un gel sans addition d'agents chimiques par l'oxydation enzymatique de l'acide férulique dans la pectine de betterave (Micard et Thibault, 1999).

I.11.2. Industrie pharmaceutique

Les laccases offrent une opportunité pour la synthèse de nouvelles molécules bioactives pharmaceutique, ou la modification de celles existantes, dans des conditions douces.

Les laccases ont été utilisées pour catalyser les réactions du couplage oxydatif pour la synthèse d'antibiotiques dimèriques par exemple, comme la dimérisation de l'ester méthylique de la pénicilline X par la laccase de *Coriolus versicolor* (Agematu *et al.*, 1993) ou encore le couplage oxydatif de l'hydroquinone et la mithramicine (Anyanwutaku *et al.*, 1994).

Plus récemment, Mikolasch et ses collègues ont réussi à synthétiser de nouveaux antibiotiques dimères actifs par l'amination du catéchol avec l'amino-bêta lactame en présence de la laccase de *Trametes sp.* pour améliorer l'inhibition de bactéries comme *Staphylococcus aureus* (Mikolasch *et al.*, 2008). En couplant l'acide 2,5-dihydroxy benzoïque à l'ampicilline ou l'amoxicilline, ils ont synthétisé huit nouvelles pénicillines avec des activités comparables à l'ampicilline et l'amoxicilline (Mikolasch *et al.*, 2006). De même, seize nouvelles céphalosporines ont été synthétisées par amination de l'acide 2,5-dihydroxy benzoïque avec le céfadroxil amino-céphalosporine, la céfalèxine, et le céfaclor en utilisant les laccases (Mikolasch *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les laccases pourraient être utilisées pour synthétiser des acides aminés avec des propriétés biologiques très importantes (Hahn *et al.*, 2009b). Les acides aminés L-tryptophane, L-tyrosine, L-lysine, la glycine et la L-cystéine ont été produits en utilisant les différents formes de p-hydroquinone comme le 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxy éthyle)-

benzamide, le 2,5-dihydroxy benzoïque méthyle ester ou l'acide 3,4-dihydroxy phényle propionique (Manda *et al.*, 2006).

I.11.3. Industrie cosmétique

Plusieurs brevets relatent l'utilisation des laccases dans le monde cosmétique, surtout pour la synthèse de nouveaux pigments dits "naturels" pour colorer les cheveux (Lang et Cotteret, 1999) qui sont moins irritants et plus simples d'utilisation que les produits courants, car les laccases remplacent des produits chimiques tels que H_2O_2 en milieu alcalin. Ainsi, des auteurs ont breveté leur procédé de synthèse des mélanines pour teindre les cheveux (Aaslyng *et al.*, 1999). Ils ont mis au point un mélange basé essentiellement sur l'association de deux composés : le premier est une laccase (comme la laccase de *Myceliophtora thermophila* ou de *Trametes villosa*) et le deuxième est un précurseur phénolique (comme la *p*-phénylène-diamine, le *para* et *ortho* amino phénol ou l'acide *p*-amino benzoïque). Ces deux composés sont conservés séparément et le mélange des deux ne se fait qu'au moment de l'utilisation.

Plus récemment, des préparations cosmétiques et dermatologiques contenant des protéines laccasiques pour le blanchiment de la peau ont aussi été développées (Golz-Berner *et al.*, 2005).

I.11.4. Industrie textile

Les laccases sont apparues dans l'industrie textile comme des outils intéressants pour enlever les teintures (Couto *et al.*, 2005 ; Enayatzamir *et al.*, 2009 ; Hou *et al.*, 2004) ou blanchir du coton (Betcheva *et al.*, 2003) en raison de leur potentiel pour dégrader différents colorants.

Les laccases pourraient être utilisées pour fixer des molécules fonctionnelles sur les fibres textiles. Par exemple, le greffage enzymatique catalysé par la laccase de *Trametes sp.* de gallate de lauryle sur la laine a produit un textile multifonctionnel avec des propriétés antioxydantes, antibactériennes et hydrofuges (Hossain *et al.*, 2009). De plus, les laccases peuvent teinter les fibres textiles comme le coton en mélangeant de l'acide 2,5-di amino

benzène sulfonique, du catéchol et une laccase commerciale de *Trametes versicolor* (Hadzhiyska *et al.*, 2006).

I.11.5. Industrie papetière

Dans l'industrie du papier, il est nécessaire d'extraire la cellulose qui est protégée par l'hémicellulose et la lignine. L'extraction de la cellulose est normalement réalisée par mécanique ou chimique. Après l'extraction, il reste dans la pâte à papier environ 10 % de lignine ce qui lui confère une couleur brune. La décoloration de cette pâte se fait habituellement en utilisant de l'eau de Javel (méthode chimique), ce qui est préjudiciable pour l'environnement, et/ou du peroxyde d'hydrogène, composé coûteux.

Les laccases sont apparues comme des outils alternatifs de la méthode chimique pour réaliser la délignification et le blanchiment de la pâte à papiers (Widsten et Kandelbauer, 2008). Le bio-blanchiment de pâte à papier en utilisant la laccase permet de fournir une stratégie plus douce et plus propre de délignification (Gamelas *et al.*, 2005). Le traitement des laccases ne modifie pas la luminosité de la pâte, il améliore l'auto-adhérence des fibres et augmente la résistance mécanique des feuilles dérivées de pâte (Wong et Mansfield, 1999). Plus récemment, la laccase de *Trametes sp.* a été utilisée avec plusieurs médiateurs pour décolorer la pâte à papier provenant de l'eucalyptus (Moldes *et al.*, 2008).

I.11.6. Nanotechnologies

Les nanotechnologies sont l'ensemble des technologies se déroulant à l'échelle du nanomètre. Elles consistent à mettre en œuvre des procédés miniaturisés permettant la production ou l'analyse de divers produits.

Plusieurs auteurs ont utilisé les laccases comme biocapteurs afin de détecter du glucose, des amines aromatiques et des composés phénoliques (Gomes *et al.*, 2004), de l'oxygène (Barton *et al.*, 2002 ; Szamocki *et al.*, 2009) ou des flavonoïdes de plantes (Jarosz-Wilkoa,azka *et al.*, 2004). Une des utilisations intéressantes des laccases en nano-biotechnologie est le développement de cellules électrochimiques (mini cellule) pour la production d'énergie (Chen H. T. *et al.*, 2001).

I.11.7. Applications environnementales

- Bioremédiation des sols : à cause de l'utilisation intensive de pesticides et d'insecticides en agriculture, une grande partie des molécules répandues sur les cultures se retrouve dans les sols. Pour cette raison, les laccases sont apparues comme des outils écologiques pour dégrader les molécules d'isoxaflutole toxiques dans le sol comme des chlorophénols qui sont utilisés en tant que pesticides (Bollag *et al.*, 2003).

- Traitement des eaux polluées : les laccases de *Coriolopsis gallica* dégradent plusieurs polyphénols responsables de la couleur brune des eaux résiduelles des brasseries (Mayer et Staples, 2002). Ainsi, la laccase de *Trametes sp*. peut décolorer et dépolluer l'eau de distillerie obtenue pendant la production d'éthanol par fermentation de la mélasse (Gonzalez *et al.*, 2000).

Des études ont montré la capacité de la laccase de *Trametes versicolor* à décolorer et à dégrader les tanins contenus dans les eaux usées de fabrication de bière ou d'huile (Yague *et al.*, 2000). De plus, les laccases ont aussi un rôle dans la bioremédiation des effluents des huileries produisant de l'huile d'olive dont certains de ces composants sont des dérivés de phénols et sont phytotoxiques. Or, il apparaît que ces effluents d'huilerie peuvent être utilisés en tant qu'agent fertilisant pour des cultures, ce qui constituerait une manière écologique de traiter ces résidus (Quaratino *et al.*, 2007).

Enfin, cette liste d'applications n'est pas exhaustive. De multiples autres emplois scientifiques et technologiques pour les laccases peuvent être envisagés et leur assurant un bel avenir en biotechnologies blanches.

II. Le chitosane

Le chitosane est un biopolymère de source principalement marine. En général, les biopolymères sont une classe de polymères produits par les organismes vivants : végétaux, animaux et microorganismes. Ce sont des macromolécules biologiques biodégradables renouvelables qui sont formées par la polymérisation de molécules plus simples ou monomères reliés entre eux par des liaisons dites « covalentes ». Les polysaccharides

(celluloses et dérivés, amidons et dérivés, chitine et chitosane, etc.), les protéines (gélatine, gluten, etc.), les composés lipidiques (cires, acides gras et dérivés, etc.), l'ADN et l'ARN sont tous des exemples de biopolymères, dans lesquels les unités monomères, respectivement, sont des sucres, des acides aminés, des acides gras ou des acides nucléiques.

Les biopolymères d'origine naturelle peuvent être classés en quatre classes comme le montre la Figure 16 (Tharanathan, 2003).

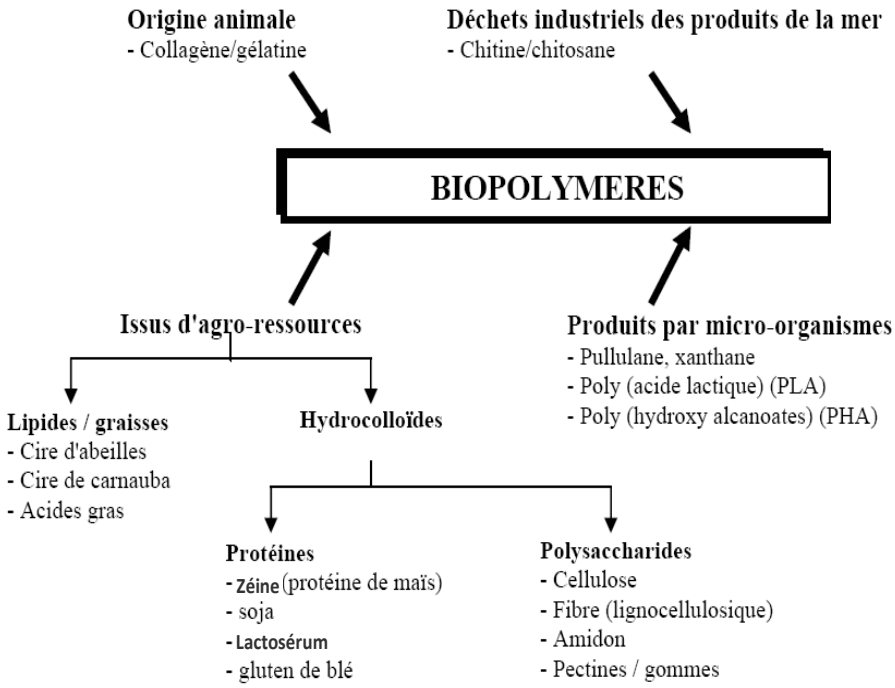


Figure 16 : biopolymères biodégradables d'origine naturelle (Tharanathan, 2003)

II.1. Sources du chitosane

En 1811, le Pr. Henri Braconnot, Directeur du jardin biologique à Nancy (France) a isolé une substance fibreuse d'un certain type de champignon, qu'il a appelée "fongine". De plus, il a observé que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides. Une décennie plus tard, en 1823, la même substance a été trouvée dans certains insectes (coléoptère) et a été ensuite nommée chitine (provient du mot grec "kitos" qui signifie « enveloppe ». En 1859, le Pr. C. Rouget a soumis la chitine à un traitement alcalin et a

observé les différentes solubilités de la chitine. La substance, résultat du traitement alcalin, a pu être dissoute dans les acides. Cependant, c'est seulement en 1894 que cette substance a été nommée chitosane par Hoppe-Seyler. La production du chitosane a débuté en 1920, mais sa structure chimique n'a été identifiée que 50 ans plus tard grâce à la cristallographie et la spectroscopie infrarouge (Muzzarelli R.A.A *et al.*, 1986).

Depuis quelques années, les biotechnologies marines ont suscité un intérêt croissant qui s'est notamment centré sur la chitine et ses dérivés, le chitosane étant le principal. Il s'agit donc d'une source renouvelable de matériau biodégradable. Les récents progrès réalisés dans l'étude de la fabrication du chitosane et de ses propriétés ainsi que la découverte d'un grand nombre d'applications potentielles ont favorisé cet engouement.

Le chitosane est une substance très peu répandue dans la nature (Desbrières, 2002). Il est rare et n'est présent que dans les parois cellulaires d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes (*Rhizopus, Mucor*…) de bactéries et de levures et chez certains insectes comme dans la paroi abdominale des reines termites, Il n'y a donc pas de source primaire de chitosane exploitable. La source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de crustacés. La production de la chitine (et du chitosane) provient, en effet, des crevettes et des crabes qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes. Ce sont donc des produits d'origine animale. Néanmoins, de nouvelles voies alternatives sont apparues par exemple, la production du chitosane à partir du champignon de *Mucor rouxii* (Tayel et al., 2010), en raison notamment des inquiétudes sanitaires liées aux maladies animales.

II.2. Préparation du chitosane

Les déchets de l'industrie des crustacés sont une source très importante de chitine et de chitosane. De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, ces méthodes consistent à éliminer les protéines (déprotéinisation), les éléments minéraux (déminéralisation), la couleur (blanchiment) et les groupements d'acétamides (désacétylation). La méthode standard pour préparer la chitine et le chitosane est expliquée dans la Figure 17 (Onsoyen et Skaugrud, 1990).

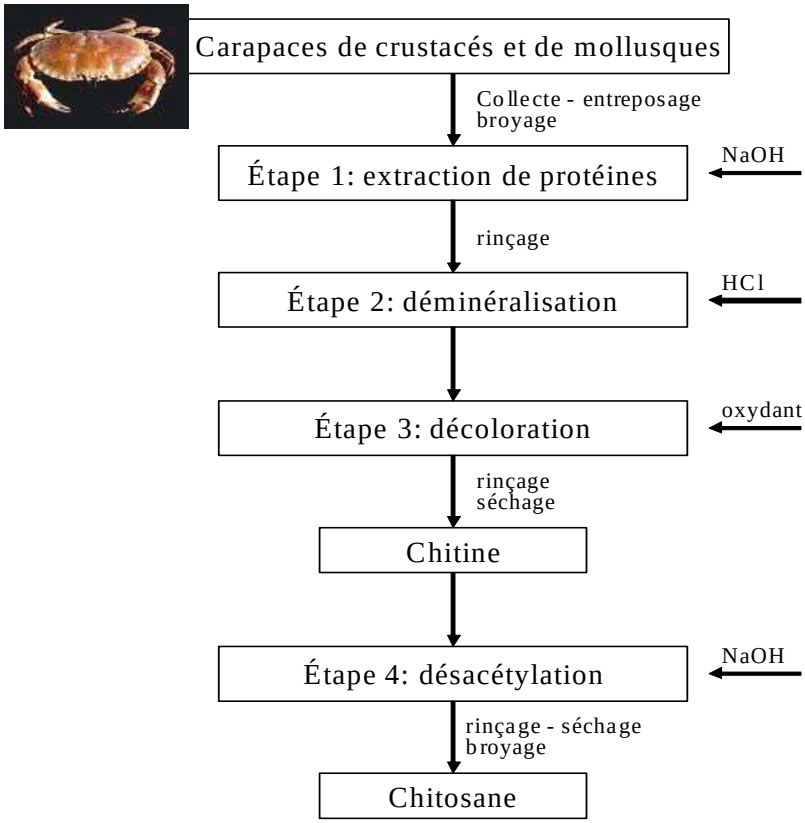


Figure 17 : procédé de la fabrication de chitine et chitosane (Onsoyen et Skaugrud, 1990)

i- Préparation des carapaces

La matière première est constituée de carapaces de crevettes. La langouste ou le crabe peuvent aussi être utilisés. Dès leur récupération, les carapaces sont lavées et conservées sur de la glace (3 °C). Elles sont ensuite séchées dans un flux d'air à 103 °C pendant 20 heures puis broyées de façon à obtenir des particules dont la taille est de l'ordre du millimètre. Plus les carapaces sont finement broyées, plus les réactions ultérieures seront complètes.

ii- Déprotéinisation

Les protéines, associées à la chitine, sont extraits par des solutions alcalines diluées à chaud. Cette procédure consiste à faire bouillir les copeaux de carapaces dans une solution alcaline (NaOH à 3 %) sous agitation pendant une heure. Cette déprotéinisation peut également être accomplie par voie enzymatique au moyen d'une protéase pendant 6 heures à 60 °C sous agitation et dans un milieu maintenu à pH 7.

iii- Déminéralisation

Les matières minérales, surtout composées de carbonate de calcium, sont éliminées par une solution d'acide chlorhydrique 1 N à température ambiante. La décalcification des carapaces se produit selon la réaction suivante (3) :

$$CaCO_3 + 2\ HCl \rightarrow CaCl_2 + CO_2 + H_2O \qquad \textbf{Équation 3}$$

Le résidu est collecté par filtration et rincé à l'eau déminéralisée. Il peut être effectué un traitement supplémentaire à l'éthanol afin d'éliminer les composés lipidiques. Il est ensuite séchée à l'étuve à 65 °C pendant 16 heures. Une telle décalcification de la chitine permet d'obtenir un produit final avec un pourcentage de matières minérales compris entre 0,6 et 0,7 %. Si cette étape de déminéralisation n'était pas réalisée, le chitosane renfermerait entre 31 et 34 % de matières minérales.

iv- Blanchiment

A la fin des deux traitements (déprotéinisation et déminéralisation), il peut subsister une coloration due à des pigments résiduels (Rinaudo, 2006). Ainsi, une étape de décoloration est effectuée par un agent oxydant ($KMnO_4$, NaOCl ou H_2O_2) avec un risque de dépolymérisation et/ou d'oxydation des unités situées aux extrémités de la chaîne polymérique.

v- Désacétylation

La désacétylation consiste en l'hydrolyse des groupements acétyles de la chitine. Le produit est introduit dans un réacteur avec une solution de NaOH à 50 % et chauffé à 145 °C-150 °C pendant 5 à 15 minutes. La réaction est la suivante (4) :

$$\underset{\textbf{Chitine}}{R\text{-}NH\text{-}CO\text{-}CH_3} + NaOH \rightarrow \underset{\textbf{Chitosane}}{R\text{-}NH_2} + CH_3COONa \qquad \textbf{Equation 4}$$

La réaction a lieu sous atmosphère inerte (N_2) et sous agitation. La quantité de soude à 50 % doit être cinq fois supérieure en poids à la quantité de chitine déterminée par mesure de la matière sèche. Le mélange bouillant est ensuite refroidi à l'eau froide. Le chitosane est collecté par filtration, lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité du mélange. Il est finalement

séché dans un flux d'air chaud à 65 °C pendant 16 heures. Le chitosane obtenu présente un degré de désacétylation d'environ 90 % (No et Meyers, 2000).

L'agressivité et le peu de maîtrise de la désacétylation de la chitine par voie chimique ont motivé l'intérêt d'explorer et de développer d'autres alternatives telle que l'utilisation d'enzymes. Il a été possible d'atteindre des degrés de désacétylation (DD) par voies enzymatiques (en utilisant la chitine désacétylase ou l'acétyle xylane estérase) comparables aux traitements basiques, soit prés de 75 % de désacétylation en 28 heures (Aye *et al.*, 2006). Cette technique est intéressante mais ne permet pas pour l'instant de développements au niveau industriel. En effet, l'utilisation d'enzymes n'est pas viable car elle représente des quantités et des coûts trop élevés.

II.3. Structure chimique

Le chitosane (Figure 18) est un copolymère composé de 2-acétamido-2-désoxy-β-D-glucose et de 2-amino-2-désoxy-β-D-glucose en proportions variables. En fonction du degré de désacétylation, la molécule est appelée chitine ou chitosane. La chitine, à l'état naturel, est elle-même désacétylée à 5 ou 15 % (Muzzarelli R.A.A *et al.*, 1986). Il est généralement admis qu'une quantité d'amine supérieure à 7 % permet de distinguer le chitosane de la chitine.

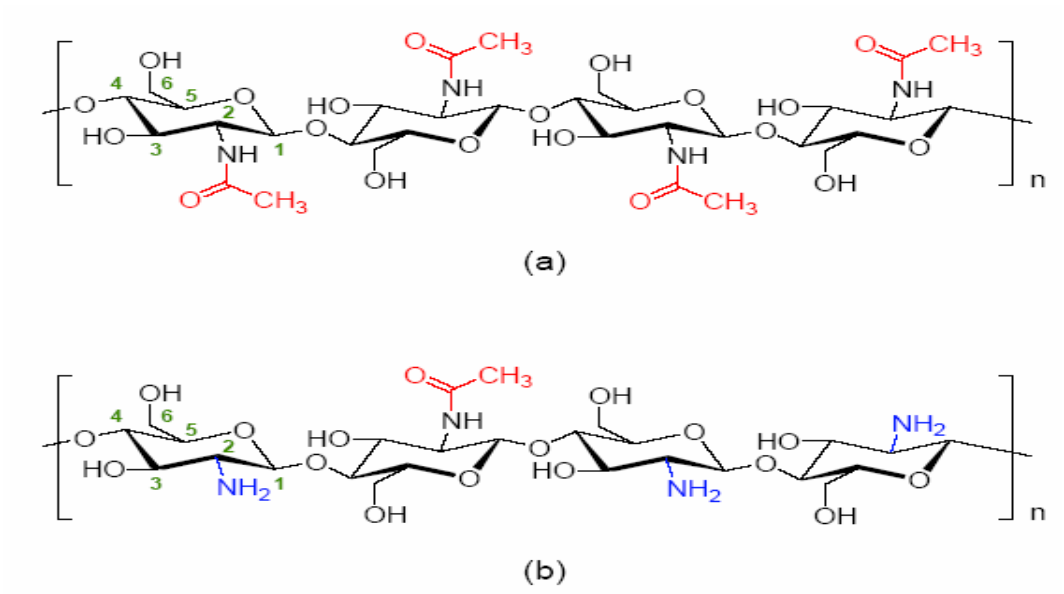


Figure 18 : structure chimique de la chitine (a), du chitosane (b) (Olteanu et Enescu, 2007)

II.4. Propriétés physico-chimiques du chitosane

II.4.1. Degré de désacétylation

Le traitement alcalin de la chitine conduit généralement à une désacétylation partielle. Le degré de désacétylation (DD) du chitosane est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution (Pa et Yu, 2001) comme la solubilité du chitosane, la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère et par conséquent la viscosité des solutions. De nombreuses méthodes ont été proposées pour déterminer le DD sur des échantillons solides : la spectroscopie IR (Brugnerotto *et al.*, 2001a), l'analyse élémentaire (Kasaai *et al.*, 1999), la RMN du solide (Heux *et al.*, 2000), ou sur des échantillons en solution : dosage UV (Lou *et al.*, 2011), RMN du liquide (Yun Yang et Montgomery, 1999).

II.4.2. Masse moléculaire

Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire (MM) de l'ordre de 100-500 kDa. La détermination de la MM peut se faire par des mesures viscosimétriques, par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à différentes techniques de détection (MALLS) (réfractométrie, microviscosimétrie, diffusion statique de la lumière multi-angle) (Nystrom *et al.*, 1999). Les masses de chitosanes dépendent, en fait, du type d'application désirée.

II.4.3. Cristallinité

La cristallinité est un paramètre important car elle contrôle un certain nombre de propriétés comme l'accessibilité des sites internes dans les chaînes macromoléculaires, les propriétés de gonflement dans l'eau ou encore les propriétés diffusionnelles (Rinaudo, 2006). La cristallinité est, en général, déterminée par des mesures de diffraction de rayons X (Roberts, 1992). En fait, le chitosane est généralement une substance semi-cristalline. Il cristallise dans le système orthorhombique et deux types de produits sont connus : le chitosane I (faible DD, sous forme de sel) est plus désordonné que le chitosane II (fort DD, forme amine libre) (Kurita, 2006).

II.4.4. Comportement du chitosane en milieu acide

Le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques et il est une base faible présentant un pKa voisin de 6,3. Il se dissout en milieu acide par protonation des fonctions amine présentes sur la macromolécule (Sorlier *et al.*, 2001). En dessous de ce pK_a, les groupements amines sont protonés et font du chitosane un polyélectrolyte cationique, soluble dans l'eau acidifiée (Shepherd *et al.*, 1997). Au dessus du pK_a, les groupements amines sont déprotonés et le chitosane est insoluble dans l'eau (Figure 19). Le pKa du chitosane dépend du degré de neutralisation des groupes NH_3^+ et du DD. En général, la valeur du pKa augmente quand le DD diminue (Sorlier *et al.*, 2001).

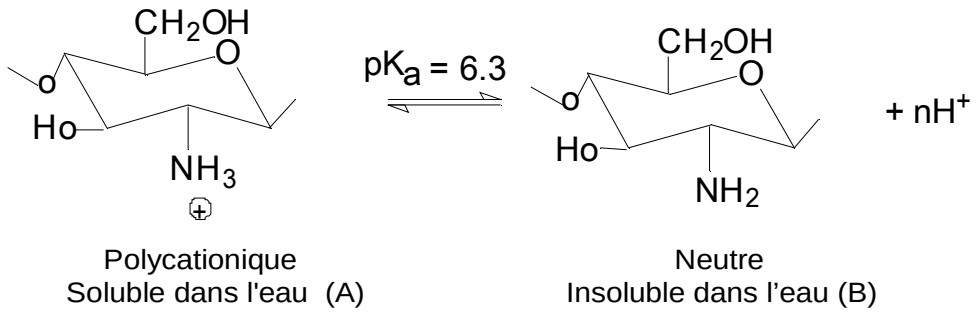


Figure 19 : structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) d'après (Vazquez-Duhalt *et al.*, 2001)

II.4.5. Solubilité

En général, la solubilité du chitosane dépend de la valeur de DD, de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire (Rinaudo, 2006). En général, un chitosane avec un DD supérieur à 70 % est utilisé pour augmenter sa solubilité. Le

Tableau 1 présente la corrélation entre les valeurs de DD et la solubilité du chitosane (Thanou et Junginger, 2005). De plus, la solubilité du chitosane augmente lorsque la masse molaire diminue (Grabovac *et al.*, 2005).

Tableau 1 : corrélation entre les valeurs DD et la solubilité du chitosane à pH 6 (Thanou et Junginger, 2005)

DD (%)	Solubilité du chitosane
> 75	parfaite
= 50	moyen
< 40	faible

Le chitosane est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses fonctions amines suivant l'équilibre (5) :

$$-NH_3^+ + H_2O \leftrightarrow -NH_2 + H_3O^+ \qquad \textbf{Équation 5}$$

$$Ka = [-NH_2] \,.\, [H_3O^+] \,/\, [-NH_3^+]$$

Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, donc cela favorise la solubilité de chitosane. Le chitosane est, en effet, insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées. Il est également insoluble dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau (Kurita, 2006). L'acide le plus utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué (0,1-1 %).

II.4.6. Viscosité

La viscosité est une caractéristique importante du chitosane concernant son comportement en solution. Cette caractéristique est liée à la conformation des chaînes macromoléculaires en solution. La viscosité dépend, non seulement du DD, du MM, mais aussi du pH car ces deux paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère (Pa et Yu, 2001). Plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte. La viscosité augmente également avec le DD car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion de groupements amine libres est importante et plus il est soluble. La viscosité augmente également avec la concentration et elle est fonction de la MM des chaînes macromoléculaires. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente.

II.4.7. Flexibilité

Une caractéristique générale des polysaccharides est la flexibilité limitée de la chaîne macromoléculaire due à l'empêchement stérique imposée par les liaisons glycosidiques (Rinaudo, 2006). De plus, pour les polysaccharides ioniques, l'apparition d'interactions électrostatiques répulsives peut augmenter leur rigidité. Le chitosane est souvent considéré comme un copolymère cationique, linéaire et flexible. La flexibilité diminue avec le DD. En effet, les chaînes de chitosane dont le DD est égale à 85 % sont flexibles seulement pour des pH supérieurs à 3 (Pa et Yu, 2001).

II.4.8. Autres propriétés physico-chimiques

Le chitosane est un matériau non-poreux, très stable en phase solide (sèche) et il a une conservation quasi infinie. En solution, il est relativement fragile et dégradable. Il possède un degré élevé de réactivité chimique dû à son groupe amine primaire libre qui lui confère une forte densité de charges positives (transformation de NH_2 en NH_3^+ en milieu acide). De plus, la présence de la fonction amine permet de réaliser des réactions chimiques spécifiques telles que la N-alkylation ou la N-carboxylation (Rinaudo, 2006).

Une autre propriété intéressante du chitosane concerne son aptitude à interagir avec d'autres substances chimiques (ions, molécules, macromolécules). Ce comportement est essentiellement attribué :

- Aux propriétés hydrophiles des chaînes macromoléculaires dues à la présence de nombreux groupes hydroxyles des unités glucoses ;

- A la présence de groupes fonctionnels (hydroxyle, acétamide et amine) et à leur grande réactivité ;

- A la structure flexible des chaînes de polymères (fonction du pH et de la température).

Le chitosane possède ainsi des propriétés de rétention d'eau, de chélation d'ions, de complexation et d'adsorption de molécules ou de polymères. Le chitosane montre de plus des propriétés d'adhésion à des surfaces chargées négativement (Kurita, 2006). Son caractère

cationique en milieu acide permet la fixation d'anions comme les colorants anioniques ou les anions métalliques.

Comme la plupart des polysaccharides, le chitosane, en raison de la liaison glycosidique β-(1~4), est un polymère semi-rigide et alors il augmente fortement la viscosité de la solution. En particulier, la possibilité de formation de ponts hydrogène inter-chaînes augmente encore ses performances. En plus de ces interactions, la nature des liaisons glycosidiques confère au chitosane d'excellentes propriétés filmogènes (Tual *et al.*, 2000).

II.5. Propriétés de biocompatibilité du chitosane

La biocompatibilité d'un polymère est d'une importance fondamentale pour une utilisation thérapeutique (Ueno *et al.*, 2001). Le chitosane est biocompatible c'est-à-dire que sa présence dans un organisme entraîne des réactions inflammatoires et des réactions de rejet très limitées (propriétés immunologiques). Il est bio-résorbable avec des cinétiques faibles et contrôlées (Shi *et al.*, 2006). La biocompatibilité du chitosane est caractérisée principalement par trois propriétés : sa non toxicité, sa cytocompatibilité et son hémocompatibilité.

II.5.1. Biodégradabilité

La biodégradation et la biorésorption du chitosane sont assurées par des enzymes qui l'hydrolysent en oligomères. Chez l'Homme et les mammifères, ce rôle est assumé principalement par des lysozymes (Varum *et al.*, 1997) qui dégradent les liaisons β(1-4) glycosidiques des unités N-acétylglucosamine en des résidus N-acétylglucosamine et D-glucosamine, métabolisés ensuite dans l'organisme. Un chitosane de DD 50 % est ainsi facilement dégradé *in vivo* dans le sang et les tissus, sans accumulation dans le corps (Onishi et Machida, 1999).

La dégradation dépend de l'origine et des propriétés du polysaccharide (DD, masse molaire…) (Ratajska et Boryniec, 1998). Une étude plus approfondie a montré d'abord une augmentation de la susceptibilité enzymatique pour les DD inférieure à 50 %, puis une augmentation avec le DD, et finalement une absence de dégradation pour un chitosane de DD 97 % (Kurita *et al.*, 2000). Cette influence du DD est également constatée, *in vitro*

(dégradation par des lysozymes) et *in vivo* (implantation sous cutanée) (Tomihata et Ikada, 1997). Un chitosane de DD 50 % semble donc permettre une dégradation optimale.

II.5.2. Toxicité systémique

L'innocuité du chitosane a été démontrée chez la souris, le rat et l'Homme pour des applications diététiques et cosmétiques. Dans le cas d'administration orale, la dose létale DL_{50} dépasse les 16 g/kg/jour chez la souris, soit une dose supérieure à celle du saccharose (12 g/kg/jour). L'administration sous-cutanée de chitosane conduit à une valeur de DL_{50} supérieure à 10 g/kg/jour chez la souris. La DL_{50} d'applications intrapéritonéales de chitosane est de 5,2 g/kg/jour pour la souris. Globalement, pour des doses administrées adéquates, la non-toxicité du chitosane est admise (Rao et Sharma, 1997).

II.5.3. Hémocompatibilité (Compatibilité sanguine)

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 et le chitosane hydrolysé de faible masse molaire soluble dans l'eau ne présentent aucune activité thrombogène (Malette et Quigley, 1985). 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 (Klokkevold *et al.*, 1999). 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 (Rao et Sharma, 1997). 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 (Lee K. Y. *et al.*, 1995).

II.5.4. Cytocompatibilité (adhésion, viabilité, prolifération...)

La cytocompatibilité du chitosane vis-à-vis des fibroblastes, des kératinocytes, des chondrocytes et des ostéoblastes a été démontrée *in vitro*. Lors de cultures cellulaires sur un

film de chitosane, la croissance des cellules dépend des caractéristiques et de la source du chitosane. Des travaux montrent que, quel que soit le DA (2-50 %), la mise en contact prolongée de films de chitosane avec les fibroblastes et les kératinocytes n'induit ni la destruction, ni la croissance anarchique de celles-ci, et qu'aucune substance cytotoxique n'est relarguée dans le milieu (Chatelet *et al.*, 2001). Le même comportement est constaté dans le cas de cultures de chondrocytes et de kératinocytes sur un film de chitosane de DA 2,5 % (Denuziere *et al.*, 1998) et de culture de chondrocytes et d'ostéoblastes sur une surface similaire de DA 10 % (Lahiji *et al.*, 2000).

II.6. Propriétés biologiques

Le chitosane présente l'avantage de réunir des propriétés très intéressantes. En effet, il inhibe la croissance de nombreux parasites et il réduit le développement des infections : c'est un bon agent antibactérien et antifongique (Shi *et al.*, 2006). De plus, le chitosane a des propriétés antitumorales, antivirales, ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables (Bacon *et al.*, 2000). Il augmente la vitesse de cicatrisation des plaies ouvertes et la reconstruction des tissus tout en prévenant les infections microbiennes. Enfin, le chitosane non seulement stimule la croissance cellulaire, mais il peut également être utilisé comme substrat pour la culture cellulaire (les cellules adhèrent au matériau et le colonisent) (Muzzarelli R. A. A. et Muzzarelli, 2005).

II.6.1. Propriétés antibactériennes

Le mécanisme d'action du chitosane contre les bactéries est jusqu'à aujourd'hui mal connu. Cependant, il existe plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette action :

• La formation de liaisons électrostatiques entre les charges positives du chitosane et les phospholipides de la membrane cellulaire qui ont une charge négative, perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur (Devlieghere *et al.*, 2004 ; Liu X. F. *et al.*, 2001 ; Peng Y. *et al.*, 2005c)

• La présence du chitosane peut aussi entraîner des déformations morphologiques au niveau de la paroi cellulaire (Helander *et al.*, 2001 ; Laflamme *et al.*, 1999 ; Roller et Covill, 1999).

• L'inhibition peut aussi être due à l'enrobage des cellules microbiennes par le chitosane, éliminant ainsi tout échange avec le milieu extérieur (Muzzarelli R. A. A. *et al.*, 2001).

• L'action du chitosane peut aussi se faire par formation de liaison avec les protéines et les électrolytes présents dans le cytoplasme (Choi *et al.*, 2001 ; Laflamme *et al.*, 1999).

• Formation des liaisons entre le chitosane et l'ADN des bactéries et l'inhibition de la synthèse des ARN messager (Devlieghere *et al.*, 2004 ; Liu X. F. *et al.*, 2001).

• Le chitosane peut aussi agir de façon indirecte sur les bactéries et les moisissures, et cela par complexation des métaux nécessaires pour leur croissance (Roller et Covill, 1999).

Le chitosane a été étudié en termes de composés bactériostatique/bactéricide pour contrôler la croissance d'un large spectre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif par exemple : le Tableau 2 montre les concentrations minimales inhibitrices de quelques bactéries par le chitosane (Liu X. F. *et al.*, 2001).

Tableau 2 : concentrations minimales inhibitrices de quelques bactéries par le chitosane (Liu X. F. *et al.*, 2001)

Bactéries	CMI (ppm)
Bacillus cereus	1000
Agrobacterium tumefaciens	100
Pseudomanas	500
Escherchia coli	20
Micrococcus luteus	20
Staphylococcus aureus	20

En générale, l'action du chitosane sur les bactéries à Gram négatif est moins importante que celle sur les bactéries à Gram positif. Ce résultat est probablement dû à des différences dans la structure de l'enveloppe cellulaire (Li Y. *et al.*, 2007 ; Zhong *et al.*, 2008). La paroi cellulaire des bactéries Gram-négatif est constituée d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe composée de lipopolysaccharides, de lipoprotéines et de

phospholipides. Cependant, la paroi cellulaire des bactéries Gram-positif est seulement composée d'une épaisse couche de peptidoglycane sans membrane externe (Figure 20). En raison de cette structure, la membrane externe fonctionne comme une barrière imperméable contre les macromolécules et les substances hydrophobes. Elle pourrait être responsable de la prévention de la pénétration du chitosane dans la cellule, expliquant ainsi l'activité antibactérienne plus faible sur les bactéries Gram-négatif que sur les bactéries Gram-positif (Coma *et al.*, 2003).

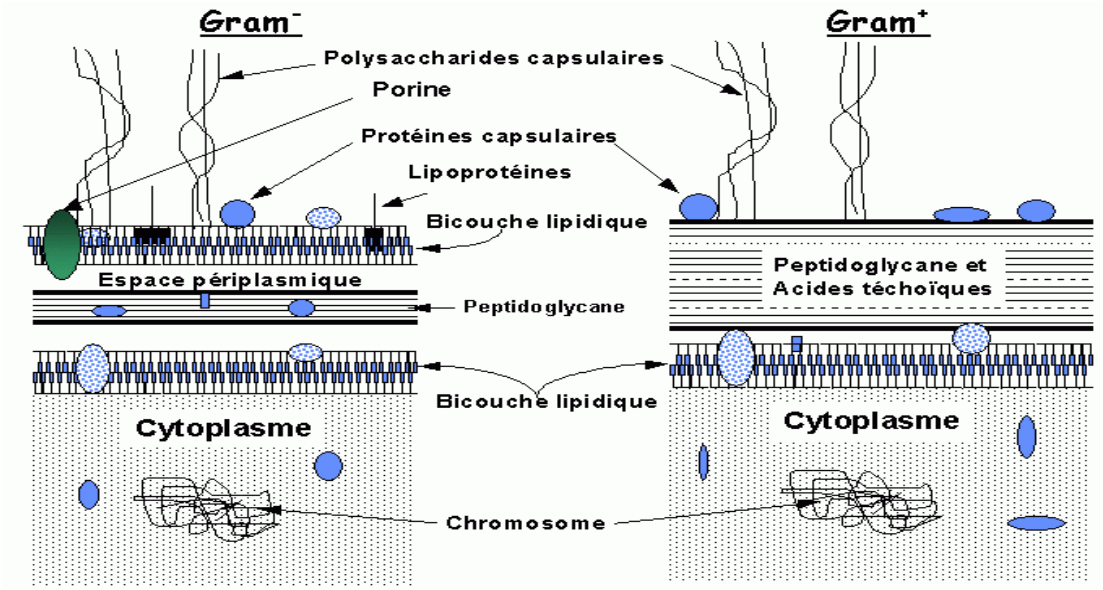


Figure 20 : structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram^{+}/Gram^{-} d'après (Bisognano, 2000)

D'après la littérature, l'activité antibactérienne est influencée par quelques facteurs (Kong *et al.*, 2010) :

- Des facteurs liés aux bactéries tels que la souche bactérienne, la phase de croissance bactérienne…

- Des facteurs liés au chitosane tels que la concentration en chitosane, son état (liquide ou solide) le pH des solutions, le solvant, la MM, le DA…

- Des facteurs liés à l'environnement tels que la température d'incubation, le temps de contact, le milieu de culture…

L'influence du DA et de la masse molaire du chitosane sur la floculation de suspension d'*Escherichia coli* a été étudié (Strand *et al.*, 2001). Dans toutes les conditions utilisées, une diminution du DA conduit à une meilleure efficacité antibactérienne (Strand *et al.*, 2001). De plus, l'efficacité antibactérienne du chitosane augmente avec l'augmentation de sa masse molaire, de son degré de désacétylation et de sa concentration (Liu L. *et al.*, 2000).

En ce qui concerne l'influence du pH, l'activité antibactérienne du chitosane est plus efficace à pH faible. En effet, le chitosane et ses dérivés n'ont pas d'effet bactéricide à pH 7, dû à la présence d'une proportion importante de groupements amine non chargés et à la faible solubilité du chitosane (Sudarshan *et al.*, 1992). L'activité antibactérienne du chitosane est normalement évaluée en incorporant les cultures bactériennes à des solutions de chitosane à pH 5,5.

II.6.2. Propriétés antifongiques

Le chitosane a été étudié pour contrôler la croissance d'un large spectre de souches fongiques. Le Tableau 3 présente des concentrations minimales inhibitrices de quelques souches fongiques par le chitosane (Liu X. F. *et al.*, 2001).

Tableau 3 : concentrations minimales inhibitrices de quelques moisissures par le chitosane

Moisissures	CMI (ppm)
Botrytis cinerca	10
Fusarium oxysporm	100
Piricularia oryzae	5000
Tichoplryton equinum	2500

Le mécanisme d'action du chitosane contre les souches fongiques est jusqu'à aujourd'hui mal connu. Cependant, il existe plusieurs éléments qui peuvent expliquer cette action :

- 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 (Rabea *et al.*, 2003).

- Le chitosane agit aussi comme un agent chélatant qui forme des complexes avec les traces de métaux et inhibant ainsi la croissance des champignons et la production des toxines (Cuero *et al.*, 1991). Il assure aussi certains processus de la défense à l'extérieur de la cellule par exemple, il agit comme un agent absorbant d'eau et inhibe l'activité des différents enzymes (El Ghaouth *et al.*, 1992). Il est trouvé que l'utilisation du chitosane à partir d'une concentration de 1 g/L réduit considérablement la croissance des souches fongiques suivante : *Cylindrocladium floridanum*, *Cylindrocarpon destructans* et *Fusarium oxysporum* (Laflamme *et al.*, 1999). Les résultats obtenus dans cette étude sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : taux d'inhibition de quelques souches fongiques en fonction de la concentration du chitosane (Laflamme *et al.*, 1999)

Souches fongiques	chitosane à 0,5 g/L	chitosane à 1 g/L	chitosane à 2 g/L
Cylindrocladium floridanum	20	41	56
Cylinodrocarpon destructans	23	43	71
Fusarium oxysporum	25	53	55

D'après la littérature, le chitosane est utilisé pour empêcher la croissance de quelques souches fongiques dans les aliments par exemple :

- L'effet antifongique du chitosane sur la croissance *in vitro* des champignons pathogènes dans les cerises a été examiné par (El Ghaouth *et al.*, 1992). D'après cette étude, le chitosane (avec DA $\leq$ 7,2 %) peut diminuer la croissance radiale de *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonifer*.

- L'effet de conservation du chitosane pour les produits à base du sucre, comme le kumquat confit a été étudié (Fang *et al.*, 1994). La croissance d'*Aspergillus niger* est inhibée par l'addition de chitosane (0,1 mg/mL) à une valeur de pH 5,4. Alors que pour inhiber la

croissance de *Aspergillus parasiticus* et sa production d'aflatoxine, un minimum de 2 mg/mL de chitosane sont nécessaires.

- La concentration du chitosane de 1 g/L permet de diminuer la vitesse de croissance de *Mucor racemosus* et une solution 5 g/L empêche totalement le développement de trois souches de *Byssochlamys* sp., dans un milieu gélosé à 25 °C pendant 3 semaines.

- La présence du chitosane dans un jus de pomme (pH 3,4) à des concentrations allant de 0,1 à 5 g/L inhibe la croissance de huit souches de levures à 25 °C (Roller et Covill, 1999).

II.6.3. Propriétés antivirales

Le chitosane peut inhiber les infections virales dans différents systèmes biologiques. Il est également capable d'induire une résistance à certaines infections virales chez les cellules végétales et animales. De plus, il permet de prévenir le développement de l'infection par des bactériophages dans des cultures microbiennes infectées (Chirkov, 2002). Cette activité dépend du degré de polymérisation, le degré de N-désacétylation, la valeur de charge positive, et le caractère des modifications chimiques de la molécule (Liu W. G. et De Yao, 2002).

Le mécanisme de cette activité est mal compris. En générale, le chitosane peut inhiber la réplication des bactériophages par plusieurs mécanismes: (a) diminuer la viabilité des cultures de cellules bactériennes, (b) neutraliser le pouvoir infectieux de particules de phage matures dans l'inoculum et / ou des particules de phage fille, et (c) bloquer la réplication du phage virulent (Kochkina et Chirkov, 2000).

II.6.4. Propriétés antitumorales

L'activité antitumorale du chitosane est issue de sa structure chimique qui contient deux groupements actifs (groupements amine au niveau du C2 et groupements hydroxyles au niveau du C3 et du C6). En fait, les interactions entre les charges positives du chitosane (NH_3^+) et des charges négatives sur les membranes des cellules cancéreuses et les jonctions serrées augmentent la perméabilité et permettent aux médicaments adsorbés sur le chitosane de pénétrer dans les cellules cancéreuses (Schipper *et al.*, 1997). Pour l'activité antitumorale,

le chitosane doit être soluble dans l'eau au pH physiologique avec des groupements amines protonés. Pour cela, des études récentes se sont focalisées sur amélioration de la solubilité du chitosane dans l'eau aux pH physiologiques pour être utilisé comme support pour l'administration de médicaments par voie orale tel que le 4-N,N-diméthyl aminobenzyle (Sajomsang *et al.*, 2008).

L'activité antitumorale du chitosane augmente avec la diminution du poids moléculaire, du degré désacétylation, de la viscosité et donc avec l'augmentation de la solubilité dans l'eau (Qin *et al.*, 2002 ; Vinsova et Vavrikova, 2011). De plus, les oligomères de chitosane ont également un effet antitumorale en empêchant la croissance des cellules tumorales par stimulation du système immunitaire (Tokoro A *et al.*, 1988).

II.6.5. Propriétés antioxydantes

En raison des atomes d'hydrogène protique des groupements amines au niveau de carbone C2 ou hydroxyles au niveau des carbones C3 et C6 du chitosane, ce biopolymère a une activité antioxydante formant des radicaux macromoléculaires (Vinsova et Vavrikova, 2011).

Les degrés de polymérisation et de désacétylation (DD) sont les éléments clés de l'activité antioxydante du chitosane. En effet, le chitosane à faible poids moléculaire a une activité antioxydante très importante en comparaison avec le chitosane à poids moléculaire élevé dans lequel les atomes d'hydrogène protique sont bloqués (Pasanphan *et al.*, 2010). Par exemple, un poids moléculaire allant de 1 à 3 kDa et un degré de désacétylation de 90 % ont été corrélés avec une haute capacité antioxydante (Kim S. K. et Rajapakse, 2005).

De plus, le chitosane peut être utilisé pour retarder ou prévenir l'oxydation d'autres composés, principalement les graisses (lipides), ce qui évite le rancissment de certain aliment (Kaminski *et al.*, 2008 ; Wydro *et al.*, 2007). Des exemples peuvent être trouvés dans la littérature sur la capacité du chitosane à réduire l'oxydation lipidique dans la chair de poisson; des produits de la pêche (Kim K. W. et Thomas, 2007), et dans les viandes (Kanatt *et al.*, 2008).

II.7. Principales applications du chitosane

Le chitosane est un biopolymère d'une importance croissante pour l'industrie et qui a des impacts significatifs sur la recherche et le développement dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, la santé ou encore la protection de l'environnement. Ses propriétés exceptionnelles expliquent l'engouement pour cette macromolécule naturelle, extraite de carapaces de crustacés, considérée il y a encore peu comme des déchets. Il s'est avéré que ce coproduit d'origine marine, très bon marché, peut participer à l'élaboration de nombreux produits commerciaux à haute valeur ajoutée. Pratiquement, tous les domaines d'applications industrielles, de la pharmacie à l'agroalimentaire, en passant par l'environnement, l'agriculture, le textile, la papeterie et les cosmétiques, sont concernés. Parmi ces domaines, la diététique et le biomédical sont en plein essor (Muzzarelli R. A. A. et Muzzarelli, 2005). Nous présentons ici les plus prometteuses.

II.7.1. Domaine agroalimentaire

Dans les industries alimentaires, l'utilisation du chitosane n'est pas encore généralisée, à l'exception des pays asiatiques comme le Japon où de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane (nouilles, pâte de soja) sont trouvés. Aux Etats-Unis, le chitosane est utilisé comme ingrédient fonctionnel et comme film comestible pour protéger les aliments. En Europe, la réglementation sur l'utilisation du chitosane dans le domaine alimentaire est encore restrictive, il est utilisé comme un complément alimentaire. Les applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire sont décrites dans le Tableau 5 (Crini, 2006).

Tableau 5 : applications du chitosane dans le domaine agroalimentaire (Crini, 2006)

Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant, de conservation)
Clarification, désacidification et détoxification on des boissons et des liquides alimentaires
Activité antibactérienne (préservation des aliments) enrobage alimentaire
Effet antioxydant (prévention de l'oxydation)
Ingrédient fonctionnel (agent fixateur, capacité prebiotique)
Formation de films (emballage)

De nos jours, l'utilisation du chitosane comme un additif alimentaire la plus connue est « Fat blocker » : le chitosane inhibe la métabolisation des graisses grâce aux interactions entre ses fonctions amines et les groupements carboxyliques des lipides (Muzzareli R. A. A., 1996). De plus, le chitosane est utilisée comme un agent de conservation de fruits ou de légumes (Tripathi et Dubey, 2004). Le chitosane est également utilisé comme agent antimicrobien pour éviter la détérioration des aliments et la prolifération bactérienne, et pour éviter la mélanose des crustacés et des mollusques (Rabea *et al.*, 2003).

Dans l'industrie des boissons, grâce aux propriétés coagulantes du chitosane, il sert à clarifier les jus de fruits ou à diminuer les composés phénoliques dans les vins (Agullo *et al.*, 2003). Le chitosane est également utilisé pour désacidifier des boissons comme les bières, les jus de fruits et les vins (Oszmianski et Wojdylo, 2007), ou tout simplement pour purifier et clarifier des eaux et des liquides alimentaires (Konovalova *et al.*, 2004).

Le chitosane peut être utilisé pour la stabilisation d'émulsions dans la préparation de sauces. Il augmente la viscosité, la stabilité à l'écrémage, tout en diminuant la taille des gouttelettes formées lors de l'émulsion (Speiciene *et al.*, 2007). Le chitosane peut être utilisé comme gélifiant dans des produits restructurés de viande et de poisson (Mao et Wu, 2007).

Enfin, ce biopolymère est une alternative aux emballages d'origine pétrochimique (polymères plastiques) en raison notamment de ses propriétés filmogènes (Agullo *et al.*, 2003). Les emballages à base de chitosane sont appelés « emballages verts ». Même si, ces emballages verts ont un certain nombre d'avantages comme la « comestibilité », (non-toxique, non métabolisé, pas de goût et pas d'odeur), ils ont quelques inconvénients tels que l'adsorption d'eau (gonflement) et des propriétés plastiques insuffisantes. Pour ces raisons, plusieurs études se sont intéressées à la modification du chitosane par voie chimique ou enzymatique (Chen H. T. *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 2002).

II.7.2. Domaines biomédical et pharmaceutique

Les nombreuses propriétés biologiques du chitosane (biocompatibilité, bioactivité…) en font un candidat de choix pour les applications pharmaceutiques, biomédicales et cliniques (Tableau 6) : agent antimicrobien, hémostatique, pansement cicatrisant… Il est également

utilisé comme système de libération contrôlée d'agents thérapeutiques par voie orale, transdermique, oculaire et nasale (Chaussard G., 2002). Il présente en effet de bonnes propriétés muco-adhésives et une absence de toxicité qui le prédisposent à des utilisations en thérapie génique et pour la vaccination. Le chitosane possède un caractère hémostatique ainsi que des propriétés cicatrisantes remarquables (Bacon A. *et al.*, 2000).

Le chitosane est un agent important en médecine classique, notamment comme « véhicule » de médicaments et d'autres substances thérapeutiques, et en médecine régénérative (chirurgie reconstructrice par exemple) (Muzzarelli R. A. A. et Muzzarelli, 2005). Il faut noter que le chitosane utilisé dans ces domaines est ultra pur et présente par conséquent un coût très élevé.

Des études récentes tendent à montrer que le chitosane exerce un effet bénéfique sur le renforcement du système immunitaire, le contrôle du niveau de cholestérol et de sucre dans le sang, et prévient le phénomène de vieillissement (Ravi Kumar, 2000). Dans de nombreuses applications, le chitosane est utilisé sous forme d'hydrogels chargés pour immobiliser des médicaments, des enzymes ou encore des substances thérapeutiques comme les vaccins, les antigènes ou gènes (Prabaharan et Mano, 2005).

Tableau 6 : applications du chitosane dans les domaines biomédical et pharmaceutique (Crini, 2006)

Champs d'application	Applications
Médecine	accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures.
Chirurgie plastique	stimulation de la régénération des tissus (prolifération des cellules).
Biologie cellulaire	agent hémostatique, agent anti-infectieux, agent anti-tumeur, encapsulation de cellules et de facteur de croissance…
Pharmacie	relargage de médicaments
Ophtalmologie	crèmes de soin, lentilles de contacts
Alicaments	complément alimentaire (produits amaigrissants).
Dentisterie	gel dentaire.
Chirurgie dentaire	implants dentaires.

II.7.3. Domaine cosmétique

Dans l'industrie des cosmétiques, les évolutions des réglementations françaises et européenne vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement et la pression des consommateurs ont entraîné l'intégration de substances d'origine naturelle à la fois au niveau des produits, des formulations et des procédés. Ces tendances ont poussé au développement des recherches sur les macromolécules renouvelables, d'origine végétale ou marine, dont les polysaccharides. L'industrie cosmétique s'est également intéressée au chitosane car il présente diverses fonctions jouant ainsi plusieurs rôles lui permettant d'être utilisés dans des formulations cosmétiques contemporaines (Tableau 7) (Crini, 2006). En effet, le chitosane peut être utilisé à la fois comme agent hydratant, mouillant, tensioactif, épaississant, microencapsulant et/ou antimicrobien dans une même formulation cosmétique.

Tableau 7 : applications du chitosane dans le domaine de la cosmétique (Crini, 2006)

Rétention (humidité), agent hydratant (humidifiant)
Agent anti-électrostatique (propriétés de gainage)
Agent épaississant (gélifiant), agent stabilisant (émulsion), agent de liaison
Agent antiallergique
Agent fongicide et bactéricide (propriétés antimicrobienne)
Relargage d'ingrédients, surfactant
Crèmes de soins, hydratantes, cicatrisantes, anti-âge (crèmes antirides)
Filtres solaires

Compte tenu de la structure chimique du chitosane, il présente l'avantage, contrairement à la majorité des produits classiques, de posséder un caractère polycationique. De ce fait, les molécules chargées négativement peuvent interagir avec la macromolécule de chitosane. C'est le cas des protéines de la peau, des lipides, des tensioactifs, des détergents et des graisses du cheveu (Rinaudo, 2006). De plus, comme la plupart des polysaccharides, le chitosane, en raison de la liaison glycosidique, est un polymère semi-rigide et donc un bon épaississant. En particulier, la possibilité de formation de ponts hydrogène inter-macromoléculaires augmente encore ses performances allant jusqu'à un comportement de type gel physique (Desbrières, 2002).

Le caractère cationique et l'aptitude à former un film sur les cheveux expliquent ainsi son incorporation à de nombreuses préparations (shampoings, gel, fixant. lotions er produits de rinçage). De plus, l'adhérence au revêtement cutané du chitosane serait supérieure à l'acide hyaluronique. Le chitosane **i)** se fixe sur les cheveux par un mécanisme électrostatique, **ii)** forme un film élastique protecteur à la surface du cheveu, **iii)** donne à la chevelure de la souplesse tout en augmentant ses propriétés mécaniques, **iv)** permet le maintien de l'humidité des cheveux à une faible valeur et **v)** et assure le maintien de la coiffure à forte humidité (Ravi Kumar, 2000).

II.7.4. Domaine agricultural

Le chitosane peut également trouver des applications dans le domaine agricole. Les matériaux encapsulés à base de chitosane se retrouvent également dans des produits agricoles (Bautista-Banos *et al.*, 2006 ; Ravi Kumar, 2000) (Tableau 8).

Tableau 8 : applications du chitosane dans le domaine agricole (Ravi Kumar, 2000)

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

La présence de chitosane comme fertilisant accélère la croissance des plantes et améliore le rendement des cultures (Ravi Kumar, 2000). Le chitosane pourrait devenir l'engrais naturel et le pesticide du futur en tant que «bio-pesticide». En effet, l'enrobage de semences des céréales avec le chitosane leur permettent de résister aux attaques de champignons et de bactéries pathogènes (Rabea *et al.*, 2003).

De plus, le chitosane permet de conserver les aliments pour bétail et protège les animaux contre des problèmes bactériologiques ou viraux. Il permet également de lutter contre les infections respiratoires qui affectent les troupeaux bovins. Il peut être aussi appliqué sous forme de spray oculaire (Rabea *et al.*, 2003).

II.7.5. Traitement des eaux

Les propriétés polyélectrolytes, chélatantes et complexantes du chitosane en font un bon candidat pour des applications environnementales dans le domaine du traitement des eaux usées (Gerente *et al.*, 2007) (Tableau 9).

Tableau 9 : applications du chitosane dans le domaine de l'environnement (Gerente *et al.*, 2007)

Champ d'application	Application
Traitement de l'eau potable	ingénierie de l'eau (coagulation /floculation, filtration, adsorption)
Traitement des eaux usées	agent coagulant
Traitement des eaux de piscines	agent chélatant de cations
Chélation de métaux lourds	réduction des métaux toxiques et radio-isotopes
Récupération de métaux précieux	récupération de métaux réutilisables
Décoloration des eaux	enlèvement du fer et du manganèse des piscines
Filtration membranaire	agent décolorant
Traitement des boues	agent déshydratation des boues

Ces applications sont basées sur le caractère polycationique du chitosane en milieu acide et sur sa solubilité qui ouvre la porte à de nombreuses applications dans le domaine de la coagulation-floculation, de la chélation, de l'adsorption ou de l'ultrafiltration. En effet, ses groupements amines protonés en milieu acide sont capables de fixer tous les métaux de transition et les radionucléides (Domard A. et Piron E., 2000 ; Piron E. *et al.*, 1997). Le chitosane peut être utilisé comme agent coagulant, chélatant ou adsorbant pour complexer une large gamme de polluants comme les molécules aromatiques et phénoliques, les colorants et

organiques (effluents agroalimentaires, papetiers et textiles) (Crini, 2006 ; No et Meyers, 2000).

Une autre application récente consiste à immobiliser des microorganismes ou des boues dans des matrices polymères à base de chitosane pour traiter les eaux usées, toujours sur le même principe de l'encapsulation (Krajewska, 2005).

II.7.6. Autres domaines d'applications

Le chitosane a trouvé des applications dans d'autres domaines. En chimie, il est utilisé en tant que super-absorbants (Dutkiewicz, 2002), phases stationnaires pour la chromatographie (Li P. *et al.*, 2006) et l'osmose inverse (Struszczyk, 2002) ou encore supports pour la catalyse (Guibal, 2005) (

Tableau 10) .

Tableau 10 : autres domaines d'applications du chitosane (Crini, 2006)

Champ d'application	Exemples d'application
Chimie	Capteurs chimiques, films biodégradable (emballage), super absorbants
Biotechnologie	Immobilisation des cellules et des enzymes, matrice pour culture et régénération cellulaire, membranes
Papeterie	Rétention d'eau (filières papetière et textile)
Textile	Additifs pour pates à papiers, agent antibactérien
Œnologie	Clarification, désacidification et stabilisation des vins
Photographie	Films photographiques, extraction de l'argent

Le chitosane est utilisé dans les nouvelles formulations de peintures non toxiques pour protéger la coque des bateaux (Ravi Kumar, 2000). Le pouvoir cationique du chitosane est utilisé dans l'industrie papetière pour produire des papiers possédant une surface plus lisse et résistant mieux à l'humidité (Struszczyk, 2002), ce qui est très apprécié dans le domaine de la photographie.

III. Fonctionnalisation enzymatique du chitosane

Le chitosane est connu pour être un biopolymère à la fois naturel, non-toxique, biodégradable et biocompatible. C'est aussi un biopolymère très réactif dont les modifications au niveau des groupements fonctionnels sont d'un grand intérêt car elles permettent d'élargir ses domaines d'applications.

Parmi les méthodes de modification, le greffage enzymatique apparaît comme le plus intéressant dans une démarche de chimie verte. Ce greffage permet de lier, de façon covalente, des dérivés fonctionnels, appelés greffons, sur les chaînes macromoléculaires du chitosane. La plupart des études concernant la modification enzymatique du chitosane implique l'utilisation de composés phénoliques. Le chitosane possède, en effet, deux types de groupements réactifs pouvant être greffés: d'une part, les fonctions amines libres des unités désacétylées, et d'autre part, les groupements hydroxyles présents sur les carbones C-3, 6 des unités acétylées et/ou désacétylées.

III.1. Avantages de la voie enzymatique

L'utilisation des enzymes en synthèse et pour la modification de polymères possède de nombreux avantages (Dordick, 1992). Etant non toxiques, les enzymes ne présentent aucun danger contrairement aux catalyseurs chimiques. De plus, le fait qu'elles soient sélectives limite la nécessité de recourir à des étapes supplémentaires de protection ou de déprotection. Enfin, la spécificité des enzymes permet de modifier avec précision la structure macromoléculaire afin d'aboutir à la fonction désirée (Kumar *et al.*, 1999 ; Yamada *et al.*, 2000).

De plus, les procédés enzymatiques jouent un rôle capital dans les procédés de synthèses propres, tendance actuelle forte de la biotechnologie. En effet, les procédés enzymatiques, comparés aux procédés chimiques, (i) sont menés dans des conditions beaucoup plus douces de température et de pression, (ii) sont très sélectifs, évitant les réactions secondaires indésirables et (iii) permettent d'éviter l'utilisation de catalyseurs très polluants, comme les composés organométalliques (Dordick, 1992).

Finalement, de nombreuses études ont clairement montré que la modification enzymatique des polymères est une méthode alternative écologique aux méthodes chimiques.

III.2. Mécanisme de fonctionnalisation enzymatique du chitosane

Les modifications enzymatiques du chitosane consistent à oxyder par voie enzymatique des composés phénoliques en des produits intermédiaires (quinones, semiquinones) (radicaux libres) catalysés par des enzymes oxydatives comme les tyrosinases, les laccases (poly phénol oxydases PPO) ou les peroxydases (POD). Les produits intermédiaires sont électrophiles et capables de réagir de façon non-enzymatique avec les groupements nucléophiles (groupements amines NH_2 libres du chitosane). Ainsi, ces produits peuvent subir au moins deux types de réaction avec les groupements amines non-protonés en synthétisant soit des bases de Schiff, soit des adduits de type michaélien (Kumar *et al.*, 1999) (Figure 21). Ces réactions de couplage conduisent à un mélange complexe de monomères ou oligomères greffés sur le chitosane. Par cette méthode, le chitosane peut être modifié par voie enzymatique afin de créer des dérivés de chitosane possédant des propriétés fonctionnelles différentes de celles du chitosane initial.

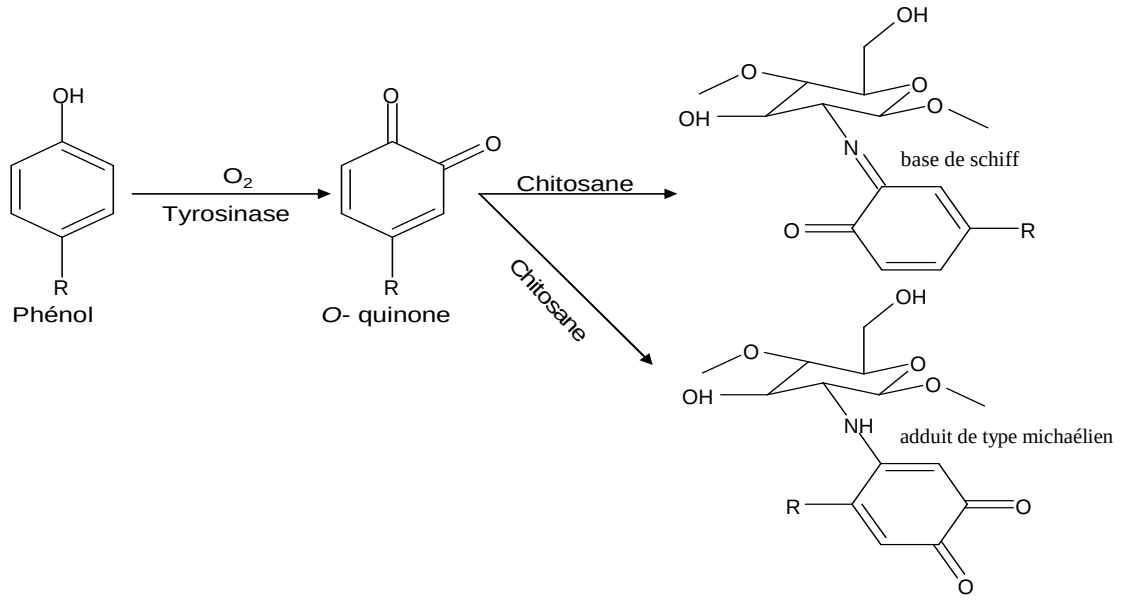


Figure 21 : mécanisme réactionnel d'oxydation des composés phénoliques par la tyrosinase en présence de chitosane (Jayakumar *et al.*, 2005)

Par ailleurs, il existe deux autres possibilités de réaction entre des groupements actifs du chitosane et les produits d'oxydation. En effet, les produits intermédiaires peuvent réagir soit avec les groupements hydroxyles (OH) au niveau de carbone (C3, 6) de façon covalente pour former des liaisons ester soit avec les groupements amines protonés (NH_3^+) du chitosane de façon non-covalente pour former des forces électrostatiques (Bozic M. *et al.*, 2012b).

III.3. Méthodes pour fonctionnaliser le chitosane par voie enzymatique

En général, dans la littérature, deux méthodes sont rapportées pour la fonctionnalisation enzymatique du chitosane:

- Méthode hétérogène (chitosane sous forme solide)

La fonctionnalisation du chitosane par la méthode hétérogène se déroule à pH supérieur à 6,3 (pKa du chitosane ~6,3). En effet, quand le chitosane n'est pas soluble dans le milieu réactionnel, les groupements amines ne sont pas protonés (sous forme NH_2). Dans ce cas, ces groupements jouent un rôle nucléophile qui est favorable pour réagir avec les molécules électrophiles (les produits d'oxydation - quinones) afin de former des liaisons covalentes de type bases de Schiff, ou adduits de type michaélien (Figure 22). Grâce à cette méthode, le chitosane peut être fonctionnalisé sous forme de fibre (particules) ou sous forme de film.

Par exemple, des études récentes ont montré que la fonctionnalisation enzymatique du chitosane (sous forme de film) par la laccase de *Trametes versicolor* à pH 6,5 a conduit à former des liaisons covalentes entre les groupements amines (NH_2) libres (nucléophiles) et les produits d'oxydation de l'acide gallique et de l'acide caféique (électrophiles) (figure 23) (Bozic M. *et al.*, 2012b) ou de l'acide tannique et de la quercétine par la même enzyme (Bozic Mojca *et al.*, 2012a). Par ailleurs, un film de chitosane a été fonctionnalisé avec l'octyl gallate et le dodecyl gallate (esters d'acide gallique) (Vartiainen *et al.*, 2008) ou avec l'hexyloxyphénol en présence d'une tyrosinase à pH 6,5. De plus, cette tyrosinase a été utilisée pour la fonctionnalisation de films de chitosane en présence du 4-tetra-butylcatéchol à pH 7,2 (Payne *et al.*, 1996).

De même, d'autres études ont confirmé que la fonctionnalisation du chitosane (sous forme de fibre ou de particule) avec certains flavonoïdes (la quercétine et la fisétine) (Fras-Zemljic *et al.*, 2011) ou avec la catéchine, la rutine,… (Sousa *et al.*, 2009) par la tyrosinase à pH 6,5 conduisait à former des liaisons covalentes entre les groupements amines (NH_2) libres du chitosane et les produits d'oxydation des flavonoïdes.

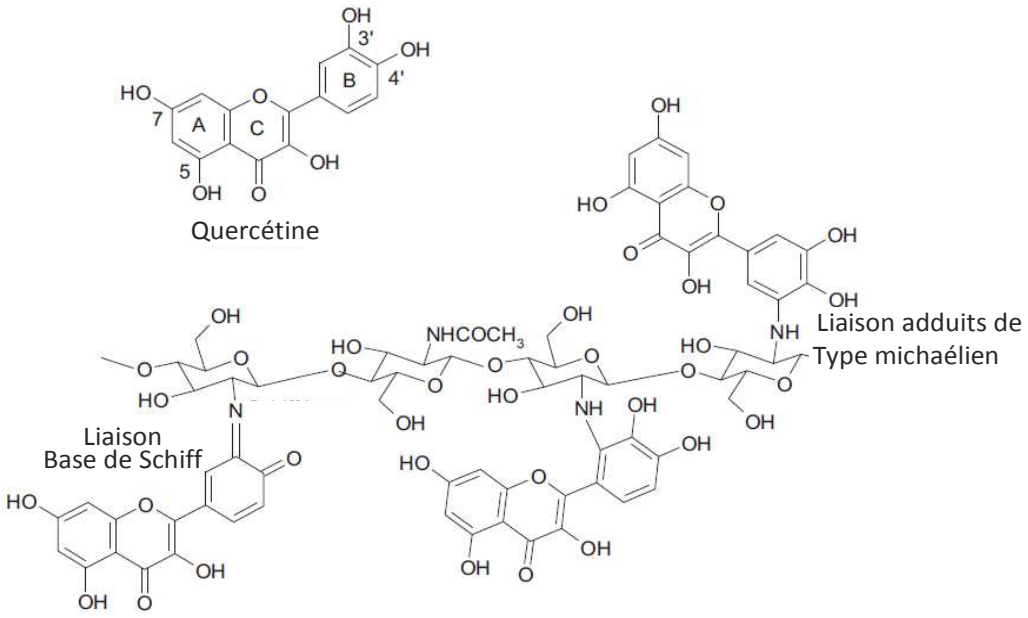


Figure 22 : mécanisme proposé pour la fonctionnalisation du chitosane (méthode hétérogène) avec la quercétine par la laccase de *Trametes versicolor* (Bozic Mojca *et al.*, 2012a)

- Méthode homogène (chitosane sous forme liquide)

La fonctionnalisation du chitosane par la méthode homogène se déroule à pH inférieur à 6,3 (le chitosane est alors soluble). En effet, quand le chitosane est soluble dans le milieu réactionnel, les groupements amines sont protonés (en forme NH_3^+). Dans ce cas, ces groupements ne peuvent pas jouer un rôle nucléophile et réagir avec les molécules électrophiles (quinones) (Osman et Arof, 2003). Ainsi, cette forme avec des groupements amines protonés du chitosane est favorable pour interagir avec des substrats phénoliques ou leurs produits d'oxydation par le biais d'interactions électrostatiques. De plus, la forme soluble du chitosane conduit à former des liaisons covalentes de type ester entre les

groupements hydroxyles au niveau C3, 6 du chitosane et les substrats phénoliques initiaux ou leurs produits d'oxydation (Bozic M. *et al.*, 2012b).

Par exemple, des études récentes ont montré que la fonctionnalisation enzymatique du chitosane (sous forme soluble) par la laccase de *Trametes versicolor* à pH 4,5 permettait la réaction de l'acide gallique ou de ses produits d'oxydation avec les groupements hydroxyles (OH^-) du chitosane par des liaisons covalentes de type ester. Par ailleurs, les groupements amines protonés (NH_3^+) du chitosane ont pu former des interactions électrostatiques avec l'acide gallique ou ses produits d'oxydation (Figure 23) (Bozic M. *et al.*, 2012b).

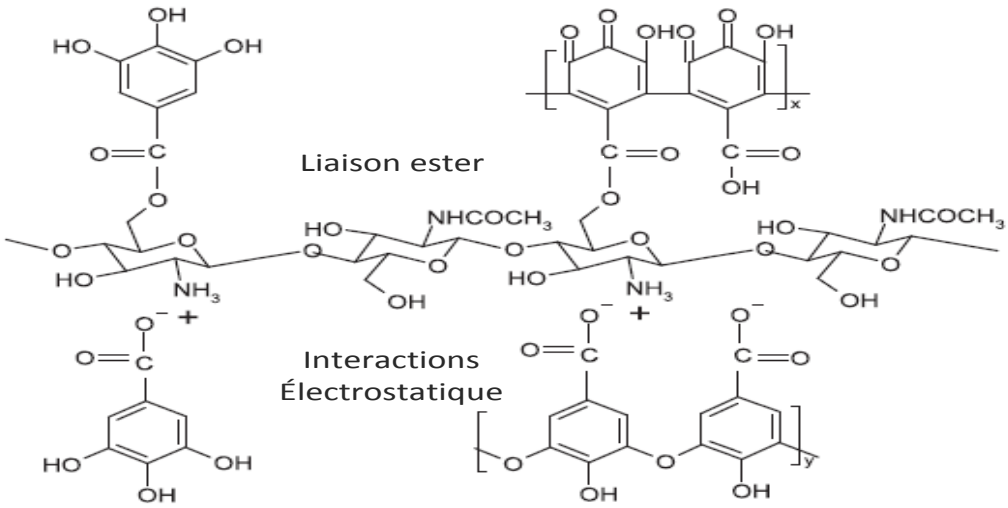


Figure 23 : mécanisme proposée de la fonctionnalisation du chitosane (méthode homogène) avec l'acide gallique par la laccase de *Trametes versicolor* (Bozic M. *et al.*, 2012b)

III.4. Enzymes utilisées en fonctionnalisation enzymatique

Les enzymes pour la fonctionnalisation du chitosane sont sélectionnées sur la base de la structure chimique du chitosane (groupements fonctionnels). Ces enzymes sont principalement des enzymes oxydatives comme des peroxydases, des tyrosinases et des laccases. De façon secondaire, d'autres enzymes comme des transglutaminases, des phosphorylases et des lipases peuvent être utilisées.

- Peroxydases (POD) (E.C. 1.11.1.7)

Les peroxydases peuvent oxyder des composés phénoliques en présence de donneurs d'hydrogène en réduisant des peroxydes, notamment l'eau oxygénée; ils acceptent de nombreux donneurs d'hydrogène parmi lesquels les polyphénols qui sont liés au cycle aromatique par le couplage C-C et C-O des fragments phénoliques. Ces enzymes ont été exploitées en tant que nouvelle voie efficace pour la fonctionnalisation de polymères industriels.

Une peroxydase a été directement utilisée pour greffer un substrat phénolique comme le dodécyle gallate (DDG) (ester de l'acide gallique) (Vachoud *et al.*, 2001) ou des flavonoïdes tels que la quercétine, la rutine… (Torres *et al.*, 2012) sur du chitosane soluble dans le milieu réactionnel. La peroxydase a oxydé le dodécyle gallate en quinones à pH 4 qui ont été greffés sur le chitosane. Récemment, une peroxydase a été utilisée pour former un hydrogel soluble à pH neutre, biodégradable et injectable à base de chitosane modifié par voie chimique. En effet, dans un premier temps, le chitosane a été modifié par voie chimique par conjugaison avec des molécules par exemple, l'acide glycolique et phlorétique (Jin *et al.*, 2009), l'acide 3-(*p*-hydroxyphényl) propionique (Sakai *et al.*, 2009) et le polyéthylène glycol et la tyramine (Lih *et al.*, 2012) pour améliorer la solubilisation du chitosane au pH physiologique de 7,4. Dans un deuxième temps, des peroxydases en présence de H_2O_2 ont été utilisées afin de former des hydrogels par polymérisation du chitosane modifié comme présenté dans la Figure 24.

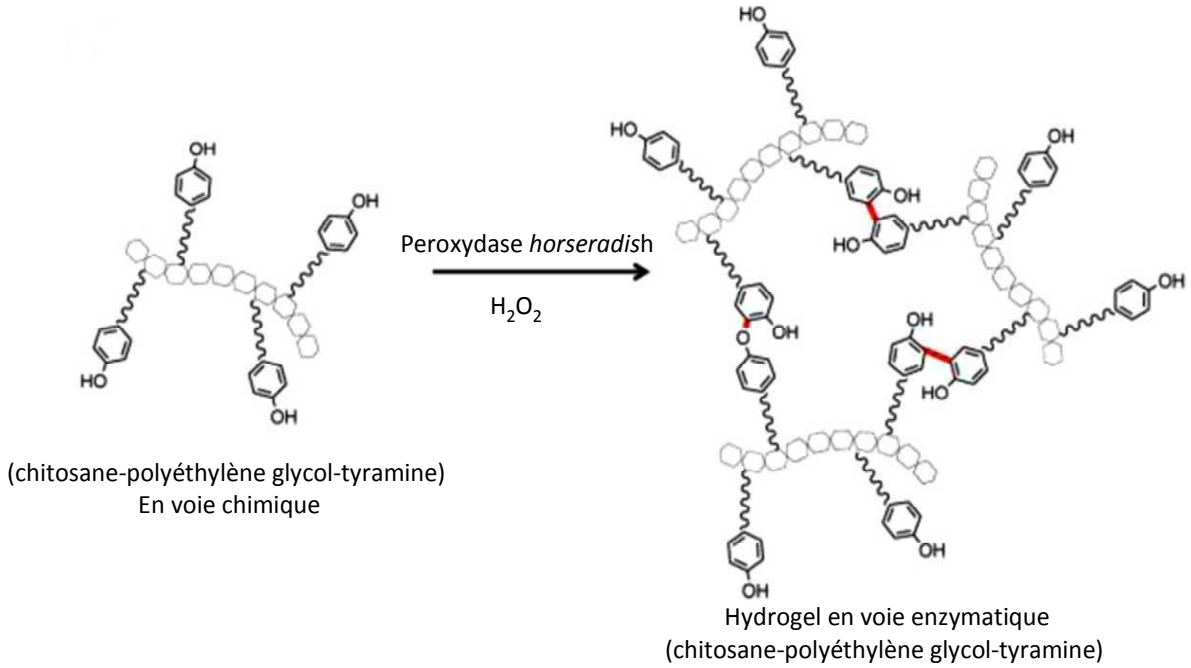


Figure 24 : schéma de la formation d'hydrogel du (chitosane-polyéthylène glycol-tyramine) conjugués en utilisant la peroxydase *horseradis*h en présence de H_2O_2 (Lih *et al.*, 2012)

- Tyrosinases (EC 1.14.18.1)

Le greffage de composés phénoliques sur le chitosane par une tyrosinase a été rapporté par plusieurs auteurs. La tyrosinase peut catalyser l'hydroxylation des mono-phénols en *o*-diphénols et des *o*-diphénols en *o*-quinones correspondantes. Les produits issus des réactions catalysées sont électrophiles et capables de réagir avec les groupements nucléophiles. Ces quinones peuvent subir au moins deux types de réactions avec les groupements amines en donnant soit des bases de Schiff, soit des adduits de type michaélien comme présenté dans la figure 22. Ces composés phénoliques peuvent être des acides phénoliques tels que l'acide chlorogénique (Kumar *et al.*, 1999), des esters phénoliques tels que l'octyle gallate et le dodécyle galate (Vartiainen *et al.*, 2008), et des flavonoïdes tels que l'hespéridine, la quercétine, la catéchine, l'épicatéchine, la rutine, la fisétine, … (Fras-Zemljic *et al.*, 2011 ; Sousa *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2002).

De plus, ces enzymes peuvent catalyser le greffage de composés d'origine protéique sur le chitosane. En effet, la tyrosinase peut catalyser l'oxydation de la tyrosine présente dans le

peptide ou la protéine en radicaux correspondants. Ces radicaux subissent un couplage avec les groupements amines du chitosane par voie non-enzymatique par des liaisons covalentes comme présenté dans la Figure 25.

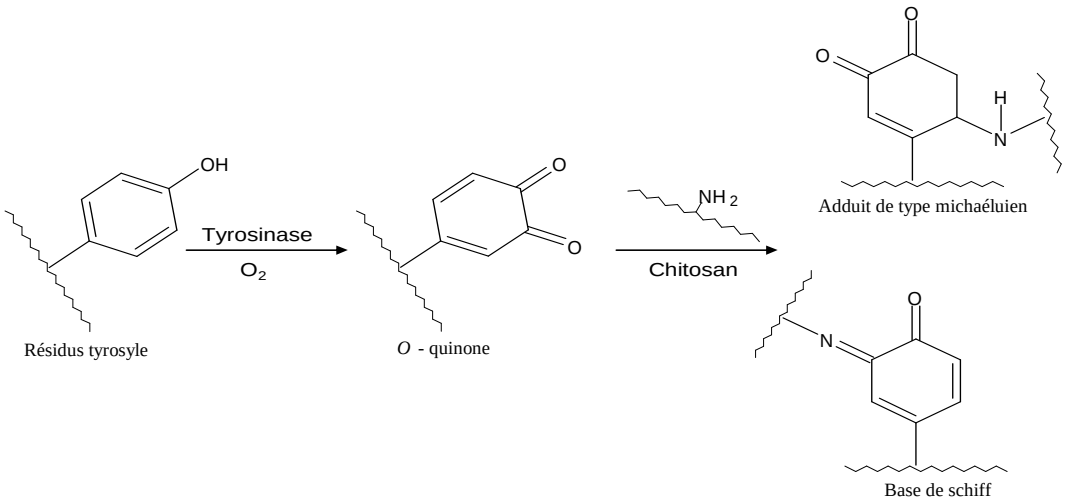


Figure 25 : mécanisme réactionnel d'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase en présence de chitosane (Anghileri *et al.*, 2007)

Des auteurs (Aberg *et al.*, 2004) ont utilisé une tyrosinase pour greffer des peptides produits par l'hydrolyse chimique de la caséine sur le chitosane au niveau des groupements amines par des liaisons covalentes à pH 6,5 et à température ambiante en 24h. De même, une autre étude a montré la possibilité de greffer des peptides de la séricine sur les groupements amines du chitosane. Le greffage enzymatique s'est déroulé en présence de la tyrosinase à pH 6,5 et à température ambiante en 24h. Ce greffage a conduit à renforcer les propriétés antibactériennes du chitosane avec un apport de nouvelles propriétés apportées par des peptides séricine (antioxydant, anti-UV, hydratation, solubilité, etc.) (Anghileri *et al.*, 2007).

Par ailleurs, ces enzymes peuvent également catalyser le greffage de polymères d'origine protéique sur le chitosane afin de créer un copolymère (polysaccharide-protéine). Par exemple, la tyrosinase a catalysé le couplage entre la fibroïne de la soie du Bombyx du mûrier et le chitosane pour introduire les propriétés antibactériennes du chitosane dans les fibres de textile et renforcer la biocompatibilité de la soie dans le domaine biologique. Ce couplage s'est déroulé avec un rapport molaire (1.6 :1) de chitosane avec la fibroïne à pH 6,5

et à température ambiante en 24h (Freddi *et al.*, 2006 ; Sampaio *et al.*, 2005). De même, une autre étude a montré que la tyrosinase pouvait également catalyser le greffage de chaînes de gélatine sur le chitosane. Cet hydrogel a été produit grâce à une tyrosinase qui catalyse l'oxydation des résidus tyrosyles de la gélatine à pH 6 et 35 °C en une nuit (Chen H. T. *et al.*, 2002).

- Laccases (EC 1.10.3.2.)

Contrairement aux tyrosinases, les laccases sont capables d'oxyder des composés phénoliques *o*- ou *p*- diphénols *via* une réaction radicalaire aboutissant à la formation de semiquinones et/ou quinones correspondantes en présence d'oxygène moléculaire. De plus, elles ne possèdent pas l'activité monophénolasique (hydroxylation) qui est considérée comme la première étape dans le processus de mélanisation catalysé par les tyrosinases.

Ces enzymes ont été récemment utilisées afin de modifier les propriétés fonctionnelles du chitosane telles que des propriétés antioxydantes et antibactériennes par le greffage de phénols comme l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide tannique et la quercétine sur le chitosane (Bozic Mojca *et al.*, 2012a ; Bozic M. *et al.*, 2012b).

- Transglutaminases (EC 2.3.2.13)

Les transglutaminases peuvent catalyser la formation de liaisons covalentes entre un groupement amine primaire comme celui de la lysine et le groupement amide ($R\text{-}CO\text{-}NH_2$) des glutamines. Récemment, la transgutaminase a été utilisée pour obtenir un hydrogel produit par couplage entre le chitosane et la gélatine à pH 6 (Chen H. T. *et al.*, 2003). Même si le chitosane n'est pas nécessaire pour obtenir un hydrogel stable à partir de la gélatine, sa présence a permis un processus de gélification plus rapide et l'obtention d'un hydrogel fort et résistant.

- Phosphorylases (EC 2.7.7)

Les phosphorylases sont les enzymes responsables de la phosphorolyse. Ils ajoutent un ion phosphate PO_4^{3-} (ou *o*-phosphat*e*) à partir d'un ion hydrogénophosphate HPO_4^{2-} sur une

molécule organique lors d'une phosphorolyse. Ces enzymes ont été récemment utilisées afin de synthétiser des dérivés de chitosane soluble dans l'eau par le greffage de chaînes courtes d'amylose comme présenté dans la Figure 26.

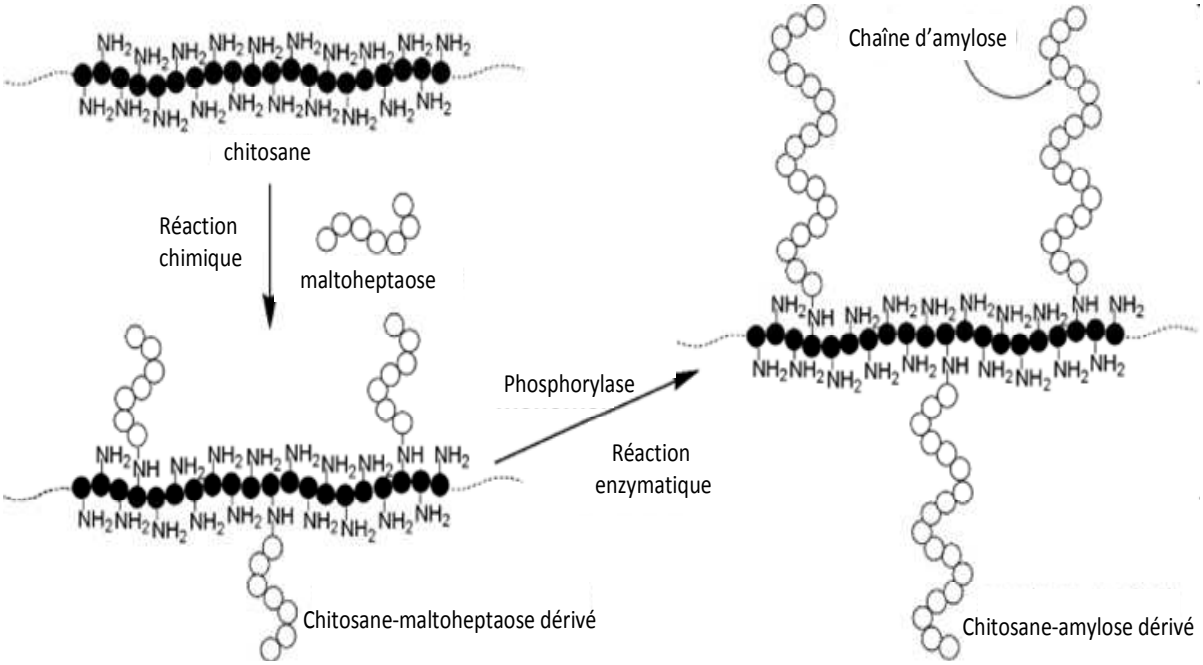


Figure 26 : synthèse du chitosane-amylase dérivé à partir du chitosane-maltoheptaose dérivé par une méthode chemo-enzymatique (Matsuda *et al.*, 2007)

D'abord, du maltoheptaose a été greffé sur le chitosane par voie chimique par l'amination réductrice en présence de sodium cyanotrihydroborate ($NaBH_3CN$) dans un mélange de 1 M d'acide acétique et de méthanol (1 :1 v/v) à température ambiante pendant 3 jours afin de produire un chitosane-maltoheptaose. Ensuite, l'élongation des chaînes α-glucane du chitosane-maltoheptaose est réalisée par voie enzymatique par la polymérisation catalysée *via* la phosphorylase en présence de α-D-Glucose 1-phosphate (G-1-P) afin d'obtenir du chitosan-amylose. La polymérisation enzymatique s'est déroulée en milieu tamponné d'acétate de sodium (pH 6,2) à une température de 40-45°C en 7 h (Kaneko *et al.*, 2007 ; Matsuda *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2011).

- Lipases (EC 3.1.1)

Les lipases sont des enzymes hydrosolubles capable d'effectuer l'hydrolyse de fonctions esters et sont spécialisées dans la transformation de triglycéride en glycérol et en acides gras (lipolyse). À ce titre, elles constituent une sous-classe des estérases.

Récemment, la lipase pancréatique porcine a été utilisée afin de conjuguer le chitosane avec l'acide polylactique (PLA) à 50°C. En conséquence, cette procédure a permis de synthétiser un nouveau copolymère (polysaccharide-polyester) présentant une bonne capacité d'adhésion et de prolifération cellulaire (Zeng *et al.*, 2012). Ainsi, ce copolymère peut être appliqué comme un matériau d'échafaudage pour le génie tissulaire.

III.5. Application des chitosanes dérivés par voie enzymatique

Des études récentes ont montré que la fonctionnalisation enzymatique du chitosane peut améliorer des propriétés déjà présentes ou créer de nouvelles propriétés avec la possibilité de maintenir ses propriétés initiales telles que la biodégradabilité, la biocompatibilité… . Ces chitosanes fonctionnalisés ont pu trouver des applications très importantes dans différents domaines.

III.5.1. Domaine médical et pharmaceutique

Le chitosane est normalement soluble en milieu acide (pKa< 6.3). C'est pour cette raison que l'utilisation du chitosane est limité dans certains domaines notamment le domaine biologique où il est nécessaire que le chitosane soit soluble à un pH physiologique. Différentes études ont montré que le greffage enzymatique de certains phénols sur les chaines de chitosane permettait d'obtenir des matériaux solubles à pH physiologique, par exemple avec l'acide chlorogénique (Kumar *et al.*, 2000 ; Kumar *et al.*, 1999) ou avec l'hexyloxyphénol (Chen H. T. *et al.*, 2000) à pH 6,5 en présence de tyrosinase. Ces dérivés de chitosane peuvent être utilisés dans le domaine pharmaceutique pour la fabrication de médicaments.

Différentes études ont rapporté la production d'hydrogels par voie enzymatique à base de chitosane modifié par voie chimique. Ces hydrogels ont été produits par une méthode chimio-enzymatique afin d'améliorer la solubilisation du chitosane à un pH physiologique (7,4), permettant la prolifération cellulaire. Ces propriétés sont importantes pour des applications médicales et pharmaceutiques telles que la régénération du cartilage, l'ingénierie tissulaire et la vectorisation de médicaments.

Le chitosane peut être modifié par voie chimique par la conjugaison avec des différentes molécules afin d'améliorer la solubilisation du chitosane au pH physiologique. Puis, des peroxydases en présence de H_2O_2 sont utilisées afin de former des hydrogels par polymérisation du chitosane modifié comme présenté dans la figure 25. Par exemple, des hydrogels tels que le complexe [chitosane- polyéthylène glycol- tyramine] peut être utilisé comme adhésif tissulaire (Lih *et al.*, 2012), le complexe [chitosane-rutine-tyramine] comme pansement des plaies (Tran *et al.*, 2012), le complexe [chitosane-acide glycolique- acide phlorétique] pour la régénération du cartilage (Jin *et al.*, 2009) et le complexe [chitosane-acide 3-(*p*-hydroxyphényl) propionique] en ingénierie tissulaire et pour la vectorisation de médicaments (Sakai *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le chitosane a été modifié par conjugaison enzymatique avec d'autres polymères pour produire des biomatériaux intéressants pour des applications biomédicales, en particulier pour l'ingénierie tissulaire. Par exemple, un copolymère [fibroïne de la soie - chitosane] est produit à pH 6,5 et à température ambiante pendant 24 h en présence de la tyrosinase afin d'améliorer la biocompatibilité de la soie (Freddi *et al.*, 2006 ; Sampaio *et al.*, 2005). De plus, un copolymère [acide polylactique -chitosane] est produit en présence de la lipase pancréatique porcine à 50 °C ; ce dernier permet un accroissement de l'adhésion cellulaire et peut donc être utilisé comme matériau d'échafaudage en ingénierie tissulaire (Zeng *et al.*, 2012).

III.5.2. Domaine agroalimentaire

La fonctionnalisation enzymatique du chitosane avec des composés phénoliques est une voie pour introduire des gammes de couleurs dans les produits dérivés du chitosane. Cette

couleur dépend du type de phénol et du pH du milieu réactionnel. Par exemple, une série de dérivés du chitosane colorés ont été produits par voie enzymatique tels qu'un chitosane orange par réaction avec la catéchine et l'épicatéchine, un chitosane brun par réaction avec la daidzéine, l'hexyloxyphenol, l'ester de gallate et le 4-tert-butylcatéchole l'épigallocatéchine gallate et un chitosane jaune par réaction avec la quercétine, la rutine et la fisétine (Chen H. T. *et al.*, 2000 ; Payne *et al.*, 1996 ; Sousa *et al.*, 2009 ; Vachoud *et al.*, 2001). Cette couleur est très stable car les dérivés formés sont stabilisés par des liaisons covalentes entre le chitosane et les produits d'oxydation des phénols (colorés). Ces dérivés colorés peuvent être utilisés comme agents colorants dans des applications alimentaires.

La fonctionnalisation enzymatique du chitosane avec des composés phénoliques a également trouvé des applications variées dans le domaine agroalimentaire grâce à l'amélioration de ses propriétés physico-chimiques et biologiques… .

Différentes études ont montré que la fonctionnalisation enzymatique du chitosane par la catéchine (Wu *et al.*, 2002) ou l'hexyloxyphénol (Chen H. T. *et al.*, 2000) en présence de tyrosinase avait permis de d'accroître leurs propriétés rhéologiques notamment la viscosité. Ces dérivés de chitosane présentant une viscosité élevée peuvent être utilisés comme agents liants (stabilisant, épaississant, émulsionnant, gélifiant...)

La fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques a également permis d'améliorer les propriétés antioxydantes de ses dérivés par l'introduction de composés phénoliques qui possèdent des activités antioxydantes élevées (Bozic Mojca *et al.*, 2012a ; Bozic M. *et al.*, 2012b ; Fras-Zemljic *et al.*, 2011 ; Sousa *et al.*, 2009 ; Torres *et al.*, 2012). Ces dérivés de chitosane avec une activité antioxydante améliorée peuvent être utilisés comme agents antioxydants dans des applications alimentaires.

De plus, ce procédé enzymatique a permis d'améliorer l'activité antibactérienne des dérivés de chitosane même si le chitosane natif possède normalement une activité antibactérienne liée à la présence de charges positives des groupements amines libres (NH_3^+) du chitosane (Shi *et al.*, 2006). Par exemple, la fonctionnalisation enzymatique du chitosane avec des acides phénolique (acide gallique et caféique) a amélioré son activité antibactérienne

sous conditions homogènes (chitosane sous forme liquide) à pH 4,5 en présence de la laccase de *Trametes versicolor* (Bozic M. *et al.*, 2012b). De même, à pH 3 en présence de la chloropéroxidase de *Caldaromydes fumago* le chitosane a été fonctionnalisé avec des flavonoïdes (quercétine et rutine) (Torres *et al.*, 2012).

Par ailleurs, un film de chitosane a été fonctionnalisé avec l'octyl gallate et le dodecyl gallate (esters d'acide gallique) en présence de tyrosinase à pH 6 (Vartiainen *et al.*, 2008) afin d'améliorer les propriétés antibactériennes et mécaniques de ce film pour des applications comme «emballage vert». Le chitosane sous forme de film a été également modifié par voie enzymatique avec la quercétine en présence de la peroxydase de *caldaromyces fumago* afin d'améliorer ses propriétés antibactériennes, antioxydantes et rhéologiques (plastique) (Torres *et al.*, 2012). Ce film modifié a présenté une activité antioxydante élevée permettant une diminution des phénomènes d'oxydation des fruits emballés.

III.5.3. Domaine environnemental

Le chitosane a pu être utilisé afin d'éliminer des composés phénoliques présents dans les eaux usées industrielles grâce à des enzymes oxydatives. Dans cette procédure, la tyrosinase est utilisée comme catalyseur permettant d'oxyder les composés phénoliques en quinones correspondantes qui réagissent avec le chitosane au niveau des groupements amines libres (Ikehata et Nicell, 2000 ; Kimura *et al.*, 2012 ; Suzuki *et al.*, 2010 ; Wada *et al.*, 1993).

De plus, le chitosane natif est utilisé pour éliminer les colorants indésirables (anioniques) qui sont considérés comme une grande problématique environnementale dans les eaux usées. Puisque, ce polymère est cationique, il lui manque la capacité d'adsorber les colorants cationiques. Des études ont montré que l'introduction de groupements carboxyles (-COOH) par le couplage enzymatique entre le chitosane et des composés phénoliques permettait de renforcer sa capacité à adsorber les colorants cationiques comme le Cristal Violet et le Bismarck Brun Y (Chao *et al.*, 2004) avec le maintien de sa capacité d'adsorption des colorants anioniques.

Par ailleurs, le chitosane a également été utilisé pour la valorisation de produits secondaires des industries. Ainsi, différentes études ont rapporté l'utilisation de tyrosinase

pour catalyser le couplage entre le chitosane et des matériaux d'origine protéique présents dans des eaux usées industrielles. Cette stratégie a permis d'obtenir des produits respectueux de l'environnement. Par exemple, le couplage enzymatique entre le chitosane et les peptides produits par l'hydrolyse chimique de la caséine en présence de tyrosinase (Aberg *et al.*, 2004) a permis l'élimination de ces peptides contaminant les eaux industriels... De même, grâce à la même enzyme, le couplage enzymatique entre le chitosane et les peptides de la séricine ont permis leur élimination des eaux usées industrielles (Anghileri *et al.*, 2007).

III.5.4. Domaine industriel

La fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques peut permettre de renforcer son caractère adhésif en fonction de la structure chimique des composés phénoliques et de la viscosité des dérivés de chitosane. Certains auteurs ont réussi à coupler le chitosane avec des composés phénoliques tels que l'acide sinapique, l'acide coumarique et l'acide férulique en présence de la laccase de *trametes versicolor* à pH 5 et ont montré une amélioration des propriétés adhésives (Peshkova et Li, 2003). Ces dérivés de chitosane peuvent être destinés à des applications industrielles comme adhésifs du bois.

La création de matières textiles fonctionnelles avec des propriétés antioxydantes et antibactériennes a également été envisagée par couplage enzymatique entre le chitosane sous forme de fibres et des flavonoïdes (Sousa *et al.*, 2009). Cette réaction a été mise en œuvre en présence de tyrosinase à pH 6,5 et 25°C pendant 20h en milieu aqueux. Par la même enzyme et dans les mêmes conditions réactionnelles, une autre étude a rapporté la possibilité de créer des matières textiles bioactives par couplage enzymatique entre le chitosane sous forme de fibres et la quercétine ou la fisétine (Fras-Zemljic *et al.*, 2011).

Objectifs du travail

Objectifs du travail

Comme le montre la revue bibliographique, les polyphénoloxydases sont capables de catalyser l'oxydation de différents composés phénoliques en générant directement ou indirectement un grand nombre de dérivés plus ou moins polymérisés ou polycondensés en milieu aqueux. Ces intermédiaires présentent des propriétés intéressantes comme la couleur ou l'activité antioxydante… laissant présager qu'ils pourraient être utilisés comme molécules actives « naturelles ». Malheureusement, ces intermédiaires sont vite polymérisés et difficiles à récupérer en raison de leur grande réactivité, Une solution pourrait être de bloquer ces intermédiaires par immobilisation dès leur formation sur des macromolécules insolubles en milieu aqueux. En effet, par cette procédure, il est possible de contrôler le degré de polymérisation lors de l'oxydation enzymatique des phénols et aussi d'obtenir directement du polymère fonctionnel pour d'éventuelles applications.

Dans des travaux précédents réalisés au laboratoire LIBio par Mustafa en 2005 et Issa en 2009, il a été montré qu'une oxydase comme la laccase de *Myceliophtora thermophila* pouvait oxyder en milieu diphasique certains acides cinnamiques tels que les acides férulique et sinapique avec, initialement, formation éphémère de dimères fortement colorés en rouge-orangé afin de produire de nouveaux colorants. A partir de ces travaux, nous avons envisagé la possibilité de produire de nouvelles molécules actives ayant le label « identique-nature ».

L'objectif principal de ce travail était de greffer par voie enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle sur le chitosane dans des conditions douces en milieu aqueux afin d'obtenir de nouvelles formes de chitosanes fonctionnalisés. Ainsi, les mécanismes du greffage (type de liaison, position du greffage et structure chimique des produits greffés) et les propriétés des chitosanes fonctionnalisés telles que les propriétés antioxydantes, physico-chimiques et biologiques seront évaluées.

Dans un premier temps, il s'agira d'étudier l'oxydation de l'acide férulique et de son ester (le férulate d'éthyle) par la laccase de *Myceliophtora thermophila* en milieu aqueux et dans des conditions expérimentales douces (30 °C et pH 7,5). Utiliser un acide et son ester

contribue à l'étude du mécanisme d'oxydation enzymatique d'un acide phénolique modèle, dont le groupement carboxyle est libre ou estérifié par l'éthanol. L'identification des produits d'oxydation pourra ainsi permettre de formuler des hypothèses quant au rôle du groupement carboxyle dans la réactivité des molécules. D'autre part, les propriétés des molécules formées seront évaluées comparativement aux molécules originales comme la couleur, l'activité antioxydante, antibactérienne et la cytotoxicité vis-à-vis de cellules saines (HUVEC) et de cellules cancéreuses (Caco2).

Dans un deuxième temps, les produits d'oxydation seront greffés sur un polymère naturel : le chitosane. Plusieurs raisons nous ont conduit à choisir le chitosane comme support de greffage de ces produits d'oxydation : la source majeure du chitosane vendu commercialement provient de la désacétylation de la chitine obtenue à partir de carapaces de crevettes et de crabes. De ce fait, il est peu coûteux et contribue à la valorisation de co-produits marins. De plus, ce biopolymère est décrit comme possédant naturellement des propriétés intéressantes telles qu'une activité antibactérienne, une bonne biodégradabilité et une faible toxicité. Il est également insoluble en milieu aqueux à pH 7,5 (le pH optimal de la laccase), et est ainsi facile à récupérer par simple filtration. A pH acide (pH< 6), ce biopolymère est chargé positivement par protonation des groupements amines et peut fixer des composés phénoliques par liaisons électrostatiques. Par contre en milieu basique (pH> 7,5), les groupements amines sont nucléophiles et peuvent réagir avec les quinones pour donner des liaisons covalentes (bases de Schiff ou adduits de type michaélien). Il faut noter que du chitosane produit par voie biotechnologique à partir de levures est maintenant disponible et ouvre des perspectives applicatives lorsque les produits d'origine animale ne sont pas souhaités. Le choix du biocatalyseur s'est porté sur la laccase de *Myceliophtora thermophila* car celle-ci possède un pH optimal d'activité voisin de la neutralité.

De la même façon que sur les molécules libres, des hypothèses sur le mécanisme du greffage (type de liaison, position du greffage) seront proposées et les propriétés de ces nouveaux chitosanes fonctionnalisés comme les propriétés antioxydantes, physico-chimiques et biologiques seront évaluées pour en envisager les applications éventuelles (agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques).

Plan de l'étude

Ce travail est divisé en deux grandes parties:

- Une première partie consacrée à une étude de faisabilité de l'oxydation enzymatique de l'acide férulique et du férulate d'éthyle par la laccase de *Myceliophtora thermophila* en milieu aqueux : purification de l'enzyme par ultrafiltration, caractérisation des produits d'oxydation, évaluation des propriétés fonctionnelles telles que antioxydantes, antibactériennes et cytotoxicité vis-à-vis de cellules HUVEC et Caco2.
- Une deuxième partie portant sur l'oxydation enzymatique des phénols étudiés en présence du chitosane afin de mettre en place une procédure de fonctionnalisation du chitosane par les produits d'oxydation des deux composés phénoliques étudiés. Ce volet est divisé en trois sous-parties :
    - Cinétique de l'oxydation enzymatique en présence du chitosane, mécanisme du greffage (type de liaison, position du greffage) et évaluation des propriétés antioxydantes.
    - Evaluation des propriétés physico-chimiques et antibactériennes des chitosanes natif et fonctionnalisé.
    - Evaluation des propriétés biologiques en termes d'adhésion et de croissance cellulaire des cellules HUVEC et Caco2 sur les chitosanes natif et fonctionnalisés sous forme de films.

Matériel et méthodes

Chapitre II. Matériel et méthodes

I. Biocatalyseur et produits chimiques

I.1. Laccase de *Myceliophtora thermophila* (E.C. 1.10.3.2)

Cette enzyme, commercialisée sous le nom de "Subérase®", est produite par la société Novozymes. Il s'agit d'une PPO du champignon *Myceliophtora thermophila* qui est produite en trois étapes (Berka *et al.*, 1997) :

1) isolement de la séquence de l'ADN génomique codant pour la laccase extra-cellulaire de ce champignon.

2) modification génétique *d'Aspergillus orizae* (champignon Ascomycète) pour recueillir le vecteur contenant la région de codage de cette laccase.

3) expression de l'enzyme chez ce dernier champignon.

L'enzyme est excrétée dans le milieu de fermentation et séparée des cellules par filtration. La préparation enzymatique est ensuite concentrée par ultrafiltration et évaporation. Elle est alors préservée et stabilisée par addition de NaCl et se présente sous la forme d'un liquide brun dont la densité est de 1,15 g/ml. Cette préparation est fournie avec une activité de 10500 U/mL (une unité enzymatique étant définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'oxydation de 0,01 µM de syringaldalzine ($C_{18}H_{20}N_2O_6$) (un substrat spécifique) par minute à pH 7,5 et à 30°C) (Harkin et Obst, 1973). D'après la fiche technique, l'enzyme est stable à 25°C pendant trois mois et possède une activité optimale à pH 7,5 et à 30°C.

Cette enzyme est conforme aux spécifications de pureté recommandées par la FAO/WHO et le FCC (Food Chemicals Codex) pour les enzymes utilisées dans les produits alimentaires (WO 94/28728, 1994) (Brinch et Pedersen, 2002).

I.2. Produits chimiques

Les différents produits chimiques utilisés sont répertoriés dans le Tableau 11, le Tableau 12, le Tableau 13 et la Figure 27.

Tableau 11: produits chimiques utilisés

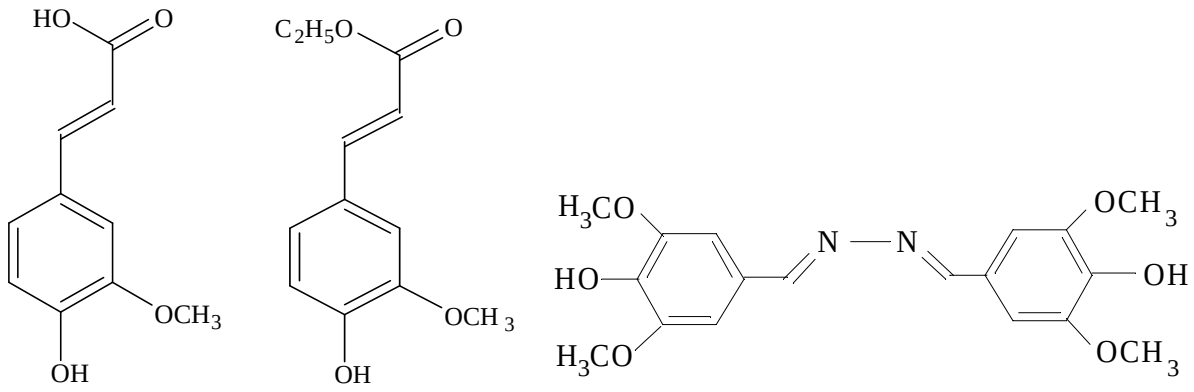
Désignation	Fabriquant	Référence
Chitosane	Aldrich	448869
Hexacyanoferrate de potassium	Prolabo	26810.232
Hydroxide de potassium	Merck	100778
Chlorure ferrique hexahydrate	Merck	Art.3943
1,1-diphényl -2-picril hydrazil (DPPH)	Sigma	D9132
Bromure de potassium	Prolabo	26 706.185
Peroxodisulfate de potassium	Fluka	60487
2,2´-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS)	Sigma	A1888
6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchromane- acide 2-carboxylique (Trolox)	Fluka	56510
Rouge Neutre	Sigma	N-2880
Phosphate de sodium monosodique	Prolabo	28.011
Phosphate de sodium disodique	Prolabo	28026.292
Phosphate de potassium	Sigma	P-3786
Sérum albumine bovine	Sigma	P0914
Acide bicinchoninique	Sigma	B9643
Tampon phosphate Dulbecco (BPS)	Sigma	D5652
Sérum de veau fœtal (SVF)	Eurobio	CVFSVF00-01
Méthylthiazolyldiphényl-tétrazolium bromide, Thiazolyl blue (MTT)	Sigma	M5655
Milieu d'Eagle Modifié par Dulbecco (DMEM)	Sigma	D5796
Milieu de croissance cellulaire endothéliale (ECGM)	ECACC	6091509
Chlorure de sodium	Prolabo	27810.295
Hydroxyde de sodium	Fluka	71690

Tableau 12 : solvants utilisés

Désignation	Fabriquant	Référence
Acétonitrile	Carlo - Erba	412412
Ethanol	Prolabo	MC310653
Isopropanol	Sigma	1-09516
Méthanol	Carlo - Erba	525102
Acide trifluoroacétique (TFA)	Sigma	T-6508
Acide acétique	Prolabo	20104.334
Diméthyl sulfoxyde	Fluka	41650

Tableau 13 : substrats phénoliques utilisés

Désignation	Fabriquant	Référence
Acide férulique	Aldrich	12,870-8
Férulate d'éthyle	Aldrich	60020
Syringaldazine	EGA-Chemie	17,753-9



Acide férulique (AF), Férulate d'éthyle (FE) **Syringaldazine**

Figure 27 : structures chimiques des substrats phénoliques utilisés au cours de l'étude

II. Oxydation enzymatique de composés phénoliques

II.1. Purification partielle de la laccase de *Myceliophtora thermophila*

Afin d'éliminer les phénols simples et polymérisés contenus dans l'extrait enzymatique qui lui confèrent une coloration brune et les peptides et les protéines non enzymatique de taille inférieure à 10 kDa, l'ultrafiltration sous azote a été utilisée à la température 4°C (Figure 28). Le système d'ultrafiltration utilisé est une cellule Amicon-8200 de 20 mL équipée d'une membrane en acétate de cellulose de point de coupure de 10 kDa (Sartorius-14539-63-G). Avant de lancer la purification, la membrane est nettoyée par immersion dans le mélange (eau distillée, acétone 50/50) pendant 60 minutes.

Figure 28 : système d'ultrafiltration Amicon-8200 pour éliminer les phénols, les peptides et les protéines de taille inférieure à 10 kDa présents dans la solution brute de la laccase

II.2. Caractérisation de la laccase purifiée

II.2.1. Dosages protéiques par la méthode au ABC

Afin de déterminer la concentration en protéines dans l'extrait enzymatique, la méthode à l'acide bicinchoninique est utilisée à l'aide du Bio-Rad Protein Assay kit**.** Le choix de cette méthode colorimétrique est dû à sa grande sensibilité (0,6 à 50 µg de protéines/mL). Elle présente aussi l'avantage, contrairement à d'autres méthodes, d'être insensible à la présence de composés phénoliques ou de polysaccharides. Son principe se fonde sur le fait que quatre résidus d'acides aminés (la cystéine, la cystine, le tryptophane et la tyrosine) sont

capables de réagir avec les cations Cu^{2+} en milieu basique en les réduisant en Cu^{+}. Ces cations monovalents, à leur tour, forment un complexe avec l'acide bicinchoninique (ABC). Ce complexe présente une coloration bleue pourpre qui a une absorbance maximale à 562 nm (Slocum et Deupree, 1991). Alors, plus la concentration en protéines dans l'échantillon analysé est importante, plus les ions Cu^{2+} seront réduits, plus de complexe sera formé et plus grande sera l'absorbance dans la longueur d'onde indiquée. La structure moléculaire de l'ABC et la formation du complexe sont présentées dans la Figure 29.

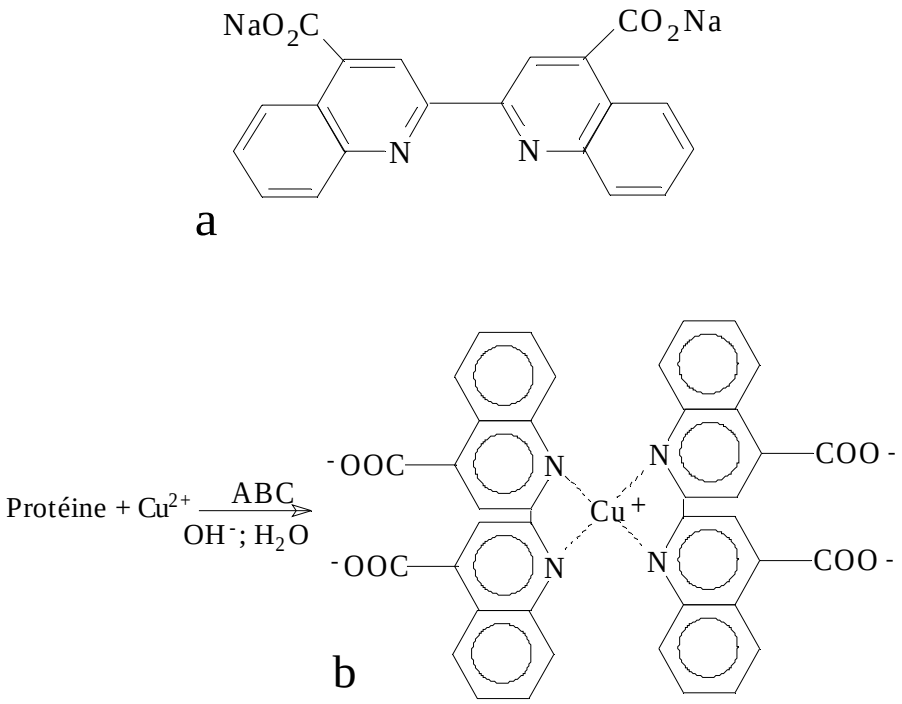


Figure 29 : structure de l'ABC (a) et formation du complexe ABC – Cu^{+} (b)

<u>Mode opératoire</u>

A partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) à 1 mg/mL, on prépare les solutions à 0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg/mL pour réaliser une gamme étalon. On prélève alors 50 µl de chaque tube et on y ajoute 1 ml du réactif ABC. Ensuite, on procède à l'incubation de ces mélanges en étuve à 37°C pendant 30 min, après quoi la densité optique (DO) est mesurée à la longueur d'onde λ = 562 nm, pour enfin tracer la courbe Absorbance = f (concentrations).

Pour doser les protéines dans la solution enzymatique brute, on en prépare d'abord les dilutions 1:50 et 1:100. Pour la dilution 1:50, on prélève 20 µL de solution et on y ajoute 980 µL de tampon phosphate pH= 7,5. Pour la dilution 1:100, 10 µL sont prélevés et ajoutés à 990 µL de la même solution tampon. Ensuite, on prélève 50 µL de chaque dilution et on y ajoute 1 mL du réactif BCA et on procède à l'incubation pendant 30 minutes en étuve à 37°C. Finalement, on en mesure la densité optique (DO) à λ= 562 nm. La concentration protéique est donc estimée à l'aide de la courbe d'étalonnage (y = 0,001 x, R^2 = 0,9949).

II.2.2. Mesure de l'activité enzymatique par spectrophotométrie

Pour déterminer l'activité enzymatique, nous avons mis en œuvre la méthode basée sur la détermination spectrophotométrique dans le visible des produits de l'oxydation d'un substrat phénolique (Mustafa et al,. 2005). Pour cette expérience, nous avons choisi la syringaldazine (un substrat spécifique de la laccase) (Figure 30) (I) comme substrat donneur d'électrons. Son oxydation par la laccase aboutit à une tétraméthoxy-azo-bisméthylène-quinone (II) dont l'absorbance maximale est à 526 nm (le coefficient d'extinction molaire pour le produit d'oxydation ε_{526} est de 65000 M^{-1}. cm^{-1}). Le schéma de la réaction est le suivant :

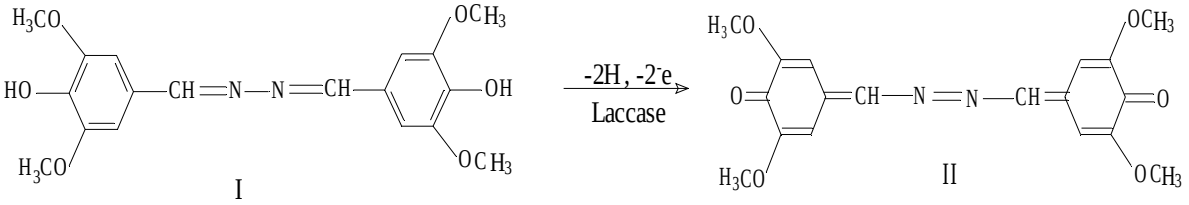


Figure 30 : oxydation de la syringaldazine par la laccase

<u>Mode Opératoire</u>

Dans une cuve de quartz, on place 2 mL du mélange réactionnel qui se compose

- 400 µL de solution de syringaldazine 0,2 mM (dissoute dans l'éthanol)

- 1530 µL de solution tampon phosphate de sodium (50 mM; 7,5).

- La réaction est déclenchée par l'addition au milieu réactionnel de 70 µL de solution enzymatique diluée au 1:50 dans du tampon phosphate. Après homogénéisation du milieu, la cuve est aussitôt placée dans un spectrophotomètre Shimadzu UV-1605 et l'évolution de la DO est enregistrée à 526 nm à 30°C par utilisation d'un bain-marie pendant 15 min.

La vitesse initiale (v) est calculée par la mesure de la pente initiale de la courbe donnant l'évolution de l'absorbance (DO) en fonction du temps. Ensuite, elle est exprimée en µM de produit d'oxydation /min/µg de protéine enzymatique en utilisant son coefficient d'extinction molaire ε_{526}= 65000 $M^{-1}.cm^{-1}$. L'activité enzymatique spécifique est estimée selon l'équation suivante (6) :

V (µmol/min/µ g de protéine) =

[V (DO/min) *10^6]/ [ε 526 (65000)*quantité de protéine dans l'échantillon (µg)] **Équation 6**

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'oxydation de 1 µM de syringaldazine par minute (Mustafa *et al.*, 2005).

II.2.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse utilise un gel de polyacrylamide fortement réticulé à travers lequel les protéines dénaturées migrent selon leur poids moléculaire. Ce gel de polyacrylamide est constitué d'un mélange d'acrylamide (CH_3=CH-CO-NH_2) qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et de bis-acrylamide (CH_2=CH-CO-NH-CO-CH=CH_2) qui forme des ponts entre les chaînes.

Les protéines sont dénaturées en utilisant à la fois un détergent comme le dodécyl sulfate de sodium (SDS : CH_3-$(CH_2)_{10}$-CH_2-O-SO_3^-, Na^+) et un agent réducteur qui coupera les ponts disulfures, comme le β-mercaptoéthanol. Le SDS, détergent anionique, se lie aux régions hydrophobes de la molécule protéique provoquant leur déroulement en chaînes polypeptidiques allongées. Chaque protéine fixe un grand nombre de molécules de détergent chargées négativement qui masquent la charge de la protéine et provoquent sa migration vers l'électrode positive lorsqu'on applique une tension. Les protéines de même taille tendent à se comporter de façon identique tandis qu'un mélange complexe de protéines est donc fractionné

en une série de bandes protéiques disposées par ordre de poids moléculaire. Il existe une relation linéaire entre le poids moléculaire et la distance de migration relative des protéines.

Mode opératoire

Le gel d'électrophorèse est constitué de deux parties (Laemmli, 1970) : un gel de séparation à 10 % qui permet la migration des protéines et un gel de concentration à 16% acrylamide, permettant d'obtenir une migration homogène des différentes protéines.

La création des puits de dépôt est réalisée à l'aide d'un peigne, inséré dans le gel de concentration avant la polymérisation de celui-ci.

La préparation des échantillons s'effectue de la façon suivante : à 10 µL d'échantillon protéique on ajoute 20 µL de solution dénaturante (10 % SDS, 7,5 % béta-mercaptoéthanol, 0,25 M Tris HCl pH 6,8, 50 % d'eau, 50 % glycérol et 0,1 % bromophénol bleu). Les échantillons sont placés au bain marie à 96°C durant 5 min avant d'effectuer des dépôts de 10 µL dans chaque puits. L'électrophorèse est réalisée sous une intensité constante de 30 V pendant 60 min et puis 180 V pendant 45 min. A la fin de la migration, les fractions protéiques sur les gels d'électrophorèse sont révélées au bleu de Coomassie R-250 (6 % dans 10 % d'acide acétique). Le marqueur utilisé, Mark12™ , s'étend de 200 Da à 6 kDa.

II.2.4. Mesure de la décoloration et élimination des phénols

Le suivi de la décoloration est effectué par mesure de l'absorbance à 420 nm contre un témoin qui contient la solution enzymatique initiale. Le pourcentage de décoloration est calculé par rapport à la solution enzymatique initiale selon l'équation suivante (7).

$$\% \text{ décoloration} = 1 - [DO_{420} \text{ (laccase brute)} / DO_{420} \text{ (laccase purifiée)}] * 100 \qquad \textbf{Équation 7}$$

Le choix de cette longueur d'onde est justifié par le spectre d'absorption de la solution enzymatique initiale de coloration brune. Ce critère de suivi de la décoloration d'une solution enzymatique a déjà été utilisé par Smith (Smith et Montgomery, 1985).

II.3. Oxydation enzymatique de composés phénoliques par la laccase

Cette expérience est effectuée dans le tampon phosphate de sodium au pH 7,5 et à la température 30°C au volume de 50 mL dans un bécher. Le milieu réactionnel se compose de 5 mL de solution d'acide férulique ou d'éthyle férulate 50 mM (de concentration finale 5 mM) et 45 mL de tampon phosphate de sodium. La réaction enzymatique se déclenche quand la laccase est ajoutée à 200 UI pour 15 mL du milieu réactionnel (130 µL de laccase pour 50 mL de milieu réactionnel). Un témoin sans enzyme permet de vérifier si les deux substrats phénoliques subissent une oxydation chimique par l'oxygène atmosphérique

La cinétique de la réaction est suivie pendant 4 h par CLHP à différents intervalles par prélèvement d'échantillons de 100 µL de milieu réactionnel. La réaction est stoppée par addition de 900 µL de méthanol à 0,03 % de TFA (Lacki et Duvnjak, 1996). Les échantillons sont filtrés avec soin avant d'être analysés à l'aide de membranes Ministar-CR (Cellulose régénérée) (Sartorius, 0,2µm de porosité).

II.4. Méthodes analytiques

II.4.1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse

Les différentes analyses au cours de ce travail sont réalisées sur une chaîne de CLHP de marque Shimadzu ; celle-ci est constituée des éléments suivants : une colonne apolaire (Lichrocart -Purospher RP 18, 250 x 4mm, 5µm) (Merck), un injecteur automatique : SIL-10 ADvp, une pompe : LC-10 AT_{VP}, un détecteur à barrettes de diodes UV/VIS : SPD-M 10 A_{VP} et un ordinateur avec logiciel d'acquisition et de traitement des chromatogrammes : CLASS-VP Ver.6, 1.

La phase mobile comporte deux solutions : la solution A, eau ultra pure avec 0,03 % de TFA et la solution B, mélange d'acétonitrile et de solvant A / (80:20 ; v/v). La méthode d'élution comporte un gradient de A et B avec un débit de 0,7 $ml.min^{-1}$; le volume d'injection est de 50 µL et la détection est effectuée par un balayage entre 200 et 800 nm. Pour l'acide férulique et l'éthyle férulate, les gradients d'élution sont précisés dans le

Tableau 14.

Tableau 14 : gradients d'élution pour l'analyse CLHP des substrats phénoliques

L'acide férulique

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	95	5
15	60	40
20	40	60
35	20	80
50	95	5

L'éthyle férulate

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	95	5
10	20	80
20	20	80
25	0	100
35	95	5

Dosage du substrat mis en jeu

Les substrats étudiés ont été quantifiés à leur maximum d'absorbation à l'aide de gammes d'étalonnages obtenues dans les mêmes conditions. La courbe d'étalonnage pour chaque substrat est réalisée avec des solutions de concentrations comprises entre 0 et 1 mM. Les solutions sont préparées à partir de la solution mère de substrat phénolique (50 mM dans du méthanol contenant 0,03 % de TFA).

Les coefficients de réponse (a) qui sont présentés dans le Tableau 15, sont calculés par la mesure de la pente de la courbe donnant l'évolution de l'aire du pic au λ_{max} en fonction de la concentration. Généralement, l'aire des pics augmente linéairement avec la concentration en substrat sur le domaine de concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 mM. Toutes les régressions linéaires ont un coefficient de corrélation R^2 supérieur à 0,99.

Tableau 15 : récapitulatif des étalonnages effectués au cours de cette étude

Substrats phénoliques	λ_{max} (nm)	a
Acide férulique	322	6,39E+07
Ethyle férulate	322	6,99E+07

II.4.2. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM)

Les analyses SM sont réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ dont l'analyseur est constitué d'une trappe ionique linéaire (ThermoElectron). L'acquisition et le traitement des données sont obtenus grâce au logiciel d'exploitation Xcalibur version 2.0.

L'analyse a été conduite en mode ESI positif dans les conditions MS suivantes : le voltage de spray est réglé à 6 kV, la température du capillaire est de 225°C, les débits de gaz source (azote) pour le sheath gaz (nébulisation), l'auxilliary gas (focalisation), le sweep (barrière) gas sont respectivement maintenus à 48, 5, 5 (en unités arbitraires par minute) et l'option sid (Source Induced Dissociation) de fragmentation dans la source est activée à une valeur de 50 V.

Le système CLHP utilisé comporte une pompe quaternaire Surveyor SM spécialement conçue pour les couplages CL-SM et un passeur automatique d'échantillons Surveyor AS (ThermoElectron). La colonne utilisée est une colonne LichroCART-Purospher RP18 de dimension 250 mm * 4,6 mm et de granulométrie 5 µm (Merck) dont la phase apolaire est constituée de silice greffée par des chaînes aliphatiques de 18 atomes de carbone. La phase mobile est composée des phases A (eau ultrapure à 0,03 % de TFA) et B (phase A / acétonitrile, 20 % / 80 %). Le débit est de 5 µl/min et le gradient binaire établi sur les 2 voies est décrit dans le Tableau 16.

Tableau 16 : gradient d'élution pour l'analyse CL-SM des produits d'oxydation

Temps (min)	Voie A	Voie B
0	85	15
40	0	100
50	0	100
50.1	85	15
65	85	15

II.5. Paramètres Michaelis-Menton et spécificité du substrat

Pour mieux comprendre l'influence des substrats phénoliques sur l'activité enzymatique, les constantes cinétiques apparentes, l'activité maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m) ont été déterminées pour chaque substrat à partir de la représentation de Hanes-Woolf selon l'équation suivante (8):

$$[S]_0 / V = (1/Vmax) * [S]_0 + (Km/Vmax) \qquad \textbf{Équation 8}$$

$[S]_0$: concentration initiale du substrat (1 à 5 mM), v : vitesse initiale de la réaction (µM substrat consommé/min/µg de protéines). La vitesse initiale (v) est calculée par la mesure de la pente initiale de la courbe donnant l'évolution de la concentration au substrat en fonction du temps. La réaction enzymatique a lieu à 30°C dans le tampon phosphate (50 mM, pH 7,5). La spécificité du substrat (Vmax/Km) indique la puissance catalytique de la laccase vis-à-vis du substrat oxydé. La constante Km indique l'affinité enzymatique entre la laccase et le substrat oxydé

II.6. Extraction des produits d'oxydation

Après 3h d'oxydation enzymatique, le milieu réactionnel est évaporé par l'évaporateur rotatif sous une pression base (Figure 31) afin d'assurer l'oxydation complète du substrat phénolique et d'éviter l'augmentation du degré de polymérisation.

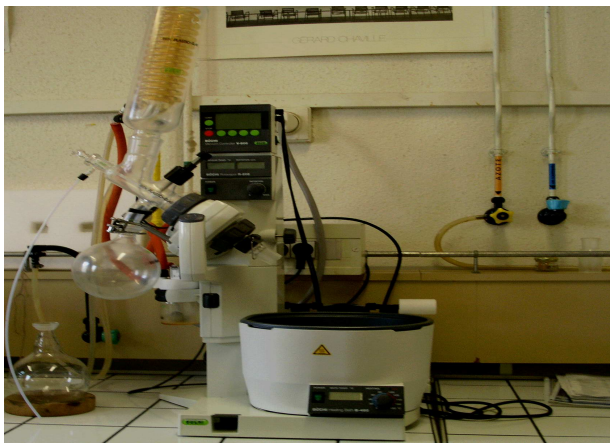


Figure 31 : évaporateur rotatif (Büchi R-205)

Ensuite, pour éliminer le reste du milieu réactionnel avec les produits d'oxydation, nous avons placé le milieu réactionnel dans le congélateur pendant 24h ce qui est séché par le lyophilisation pendant 48h. Enfin, les produits d'oxydation sont stockés au dessiccateur jusqu'à utilisation..

II.7. Mesure de la couleur des produits et du milieu réactionnel

La mesure de couleur est effectuée en réflectance avec le spectrocolorimètre Microflash 200D (Datacolor International, Montreuil) (Figure 32). Le spectrocolorimètre Microflash 200D est équipé avec un système intégré d'étalonnage. Le calibrage de l'appareil est réalisé avant chaque série d'analyses à l'aide de deux standards blanc et noir.

Figure 32 : datacolor International Microflash 2078S

Les résultats sont exprimés dans l'espace couleur CIELab. Ce modèle colorimétrique a été introduit en 1976 par la Commission International de l'Eclairage (CIE), il a pour but de représenter la perception humaine de la couleur de manière précise. Dans ce modèle tridimensionnel, chaque couleur y est donc représentée par trois paramètres L*, a*, et b*(Lathasree *et al.*, 2004).

- L* (la clarté) : représente la quantité de lumière blanche réfléchie par le produit et donc la variation d'intensité lumineuse de la couleur (plus ou moins sombre). Elle est exprimée en pourcentage : de 0 % pour le noir à 100 % pour le blanc.
- a*, variant de 0 à +a*, et mesurant la variation de la couleur du gris au rouge ;
- a*, variant de 0 à - a*, et mesurant la variation de la couleur du gris au vert ;

- b*, variant de 0 à +b*, et mesurant la variation de la couleur du gris au jaune ;
- b*, variant de 0 à -b*, et mesurant la variation de la couleur du gris au bleu ;

Le système CIELab permet aussi de définir une couleur par la saturation (Chroma, C*) qui représente le degré de pureté et d'intensité de la teinte. Selon le chroma, la couleur varie entre opaque et transparente.

Mode opératoire

Pour suivre l'évolution de la couleur du milieu réactionnel, 5 ml du milieu sont prélevés et placés dans une boîte de Pétri (diamètre 5cm). Ensuite les mesures sont effectuées directement en plaçant le disque de l'appareil sur la boîte de Pétri. Trois mesures sont réalisées par échantillon (1 flash par mesure).

Pour mesurer la couleur des produits d'oxydation ou des chitosanes fonctionnalisés, nous avons placé 100 mg dans un petit bécher et mesuré les coordonnées L*, a*, et b* directement à l'aide de l'appareil DataColor. Trois mesures sont réalisées par échantillon.

III. Fonctionnalisation enzymatique du chitosane

III.1. Purification du chitosane natif

Afin d'éliminer les impuretés du chitosane brut, une solution de concentration de chitosane de 1 % (p/v) est préparée en dissolvant la poudre de chitosane brut dans une solution d'acide chlorhydrique HCl (0,1 N). La solution est filtrée sous vide. Le filtrat obtenu est neutralisé par une solution de soude NaOH (1N) jusqu'à un pH de 8. Le précipité obtenu par neutralisation est lavé abondamment à l'eau distillée puis séché par lyophilisation. Enfin, le chitosane sec est broyé, homogénéisé, stocké dans des sacs plastiques à 4°C jusqu'à son utilisation.

III.2. Greffage enzymatique des produits d'oxydation sur le chitosane solide

Les expériences d'oxydation de l'acide férulique et de l'éthyle férulate par la laccase purifiée en présence de chitosane solide sont effectuées dans un bécher ouvert sans limitation d'oxygène. D'abord, 1 g de chitosane, 5 ml d'une solution de composé phénolique 50 mM (concentration finale = 5 mM) et 45 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,5 sont mis dans un bécher de 100mL. Deux témoins sont effectués : sans ajout de laccase pour mesurer la quantité du phénol greffé sur le chitosane en voie chimique, sans ajout de substrat phénolique pour mesurer la quantité de laccase greffée sur le chitosane et sans ajout de chitosane pour comparer la cinétique enzymatique de l'oxydation en présence et en absence de chitosane.

Le milieu réactionnel est préalablement thermostaté dans un bain-marie à 30ºC et maintenu sous une agitation de 500rpm tout au long de l'expérience. Pour déclencher la réaction, 130 µL (200 UI/15 ml) de laccase purifiée sont ajoutés. Après 4h de réaction, le milieu réactionnel est filtré sous vide et les chitosanes ainsi fonctionnalisés sont récupérés. Ensuite, les chitosanes fonctionnalisés sont lavés par l'eau distillée, le méthanol, l'éthanol et l'acétone pour éliminer toutes traces de composés phénoliques adsorbés par liaisons électrostatiques. Enfin, ces chitosanes séchés à température ambiante et conservés au dessiccateur jusqu'à utilisation.

III.3. Caractérisation structurale des chitosanes natif et fonctionnalisés

Analyse UV/visible

0,6 g de chitosane fonctionnalisé par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide férulique et du férulate déthyle, ainsi que 0,6 g du chitosane natif (témoin) sont dissous dans 100 mL d'une solution aqueuse acidifiée par HCl (pH = 2-3). Ces solutions sont maintenues sous légère agitation et à température ambiante pendant 24 heures pour assurer une dissolution maximale. La solution visqueuse obtenue pour chaque essai est ensuite filtrée sous vide pour garantir l'absence de particules solides de chitosane. Un balayage de spectre d'absorbance entre 190 et 900 nm est alors effectué en utilisant un spectrophotomètre UV-visible de marque Shimadzu UV-1605.

Analyse FT-IR

Le chitosane natif et le chitosane modifié par les produits d'oxydation de l'acide férulique et de l'éthyle férulate sont analysés, les trois ayant été lavés à plusieurs reprises avec du méthanol et de l'eau distillée, sont gardés dans un dessiccateur sous vide pendant 24 h pour enlever toute trace d'humidité. Ensuite, pour la réalisation de l'analyse par infra-rouge (FT-IR) avec un appareil BRUKER (TENSOR 27, FTIR spectromètre) à la température de 20°C et 128 scann, 1 mg de chitosane est mélangé avec 100 mg de bromure de potassium anhydre (KBr) et le mélange est finement homogénéisé et transformé en pastilles sous haute pression. Le spectre est ensuite réalisé entre 0 et 4000 cm^{-1}.

Analyse RMN-^{13}C

Le chitosane natif et le chitosane modifié par les produits d'oxydation de l'acide férulique et de l'éthyle férulate sont analysés par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN-^{13}C). Au préalable, les échantillons de chitosane sont lavés à l'eau distillée et à l'éthanol. Ils sont ensuite séchés à l'étuve pendant 24 h, puis sont stockés au dessiccateur. Le spectre RMN-$_{13}$C de chaque chitosane est déterminé à l'aide d'un Spectromètre RMN DRX AVIII 400 MHz 400, un sonde 4mm CPMAS H/X avec une rotation 9KHz à la température 293 K. La glycine (δCO = 176.03 ppm) est utilisé comme une référence externe pour calibrer l'appareil.

III.4. Caractérisation des produits d'oxydation greffés sur les chitosanes fonctionnalisés

Les chitosanes fonctionnalisés sont soumis à des hydrolyses chimiques et enzymatiques afin de liberer les produits d'oxydation greffés afin de les identifier par CLHP et LCMS (détermination de masse molaire).

Hydrolyse chimique

L'hydrolyse chimique des chitosanes fonctionnalisés est réalisée de la façon suivante : 50 mg de chaque type de chitosane sont placés dans un tube à vis contenant 10 mL de HCl

(3N). Afin d'éviter l'auto-oxydation par l'oxygène, l'air dans le tube est éliminé par l'azote pendant 5 min. Ensuite, le tube est laissé dans l'étuve à 110°C pendant 1h, et puis ils sont laissés à la température ambiante pour refroidir. L'extraction des produits d'oxydation greffés sur le chitosane est effectuée dans une ampoule à décanter de 500mL. Au début, les produits d'oxydation sont extraits par 100 mL d'acétate d'éthyle. Ensuite, l'acétate d'éthyle est récupéré et évaporé par l'évaporateur rotatif afin d'obtenir les produits d'oxydation en poudre. Afin d'identifier les produits d'oxydation, ils sont solubilisés dans le méthanol et puis analysés par CLHP et LCMS. Le chitosane natif est hydrolysé en suivant le même protocole pour l'utiliser comme un témoin.

Hydrolyse enzymatique

Même si, l'hydrolyse chimique est moins chère et très rapide, elle n'est pas spécifique pour l'hydrolyse des liaisons entre le chitosane et les produits d'oxydation. En fait, il y a des risques d'hydrolyse des produits d'oxydation eux-mêmes par la méthode chimique. Ainsi, l'hydrolyse enzymatique du chitosane pour produire des oligomères est une alternative. L'hydrolyse enzymatique est spécifique et offre plus de possibilités comparée à l'hydrolyse chimique (Hai *et al.*, 2003). L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans un réacteur, où la chitosanase est mélangée avec son substrat (chitosane). Ceci permet à la chitosanase d'hydrolyser les liens glycosidiques du chitosane et de libérer des oligomères de différents poids moléculaires (Dennhart *et al.*, 2008).

L'hydrolyse enzymatique des chitosanes fonctionnalisés est réalisée de la façon suivante : d'abord, le chitosane fonctionnalisé est dissous dans une solution aqueuse acidifiée à 0,1 % d'acide acétique puis une dilution est appliquée afin d'obtenir une solution de chitosane de concentration finale de 0,06 %. Après ajustement du pH entre 4 et 5, le polymère est ensuite hydrolysé enzymatiquement, pendant une nuit, à température ambiante, par action de la chitosanase de *Streptomyces griseus* (0,1 U/mL). Un hydrolysat du chitosane natif comme témoin a également été préparé par action de la chitosanase en suivant le même protocole que pour le chitosane fonctionnalisé.

III.5. Propriétés physico-chimiques des chitosanes natif et fonctionnalisés

III.5.1. Taille des particules

La distribution de taille des particules est déterminée par diffusion statique de la lumière grâce à un granulomètre Malvern Mastersizer S (Malvern Instruments Ltd, UK). L'appareil est équipé d'un laser de type He/Ne d'une puissance de 5 mW et opérant à une longueur d'onde de 632,8 nm. L'optique est composée d'une cellule de mesure de 0,5 mm sur laquelle est montée une lentille de type 300RF possédant une distance focale de 0,45 mm. L'intensité lumineuse diffusée par l'échantillon est récupérée par 42 photodiodes localisées à différents angles. L'acquisition est réalisée à l'aide du logiciel de traitement Malvern (Sizer Sv2.17) qui permet la récupération et l'analyse des données brutes.

La distribution de taille des particules est suivie dans de l'eau distillée filtrée (Millipore, membrane diamètre 0,22 μm). 0,25 g de poudre du chitosane sont mis dans 100 mL d'eau distillée pour obtenir une solution en suspension. Cette concentration permet l'obtention d'une obscuration satisfaisante. La répartition de taille est mesurée en fonction de la distribution volumique des particules (%).

III.5.2. Degré d'acétylation (DA)

Le degré d'acétylation (DA) est l'expression du pourcentage moyen des groupements amines acétylés dans le chitosane. Plusieurs méthodes ont été rapportées pour déterminer ce DA, telles que l'UV, l'IR, la RMN, la CPG, la titration ou le dosage de l'acide acétique.

Dans notre travail, nous avons utilisé deux méthodes pour confirmer les valeurs DA des échantillons des chitosanes. La première méthode est le dosage spectrophotométrique proposé par Liu et ses collèges (Liu D. *et al.*, 2006), basé sur la constatation que les absorptions maximales de la glucosamine (GlcN), de l'acétylglucosamine (GlcNAc) et du chitosane sont identiques et égaux à 201 nm. Pour cette expérience, 122 mg de chitosane est dissout dans 9,8 ml d'une solution d'HCl à 37 % en laissant sous agitation pendant 1h45 min à la température de 60°C. La solution obtenue est complétée à 1 L avec de l'eau distillée, de façon à ce que l'on ait une solution de chitosane de concentration 0,1M. L'absorbance de cette

solution est mesurée à 201 nm. Donc, le degré d'acétylation est calculé par l'équation suivante (9) :

$$DA (\%) = (161,1 * A * V – 0,0218 * m) / (3,3615 * m – 42,1 * A * V)$$ **Équation 9**

161,1 = MM GlcN; 42,1 = MM GlcNAc (203,2) – MM GlcN (161,1); A = absorbance à 201 nm; m = masse du chitosane en mg; V = volume de la solution en litre.

La deuxième méthode est l'IR (Brugnerotto *et al.*, 2001b), basé sur la proposition entre deux absorptions à 1320 et 1420 cm^{-1}. Selon les résultats d'IR des chitosane natif et fonctionnalisés, le degré d'acétylation est calculé par l'équation suivante (10):

$$DA\% = 31,92 * A_{1320} / A_{1420} – 12.20$$ **Équation 10**

III.5.3. Masse molaire (MM)

Une chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser à multiples angles (SEC-MALLS) est utilisée afin de déterminer la masse molaire des chitosanes natif et fonctionnalisés, selon la méthode décrite par Nguyen et ses collèges (Nguyen *et al.*, 2009).

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique analytique fondée sur la rétention sélective des macromolécules en solution en fonction de leur taille. Cette technique permet d'estimer la masse molaire moyenne et la polydispersité des polymères par comparaison avec des polymères étalons. L'association des deux techniques (chromatographie d'exclusion stérique couplée à la diffusion de la lumière laser à multiples angles (SEC-MALLS)) permet d'évaluer précisément M_w (une masse molaire moyenne en masse), M_n (une masse molaire moyenne en nombre) et I_p (un indice de polydispersité).

Afin de préparer une solution de concentration précise, les échantillons de chitosane sont mis 24 h à l'étuve à 60°C et le poids sec de l'échantillon est déterminé. Les solutions de chitosane (1mg/ml) sont préparées dans une solution (acide acétique 1 % - méthanol 100 % (3 :1)) à température ambiante. Les échantillons sont filtrés avec un filtre stérile de 0,2 µm (Acrodisc® Seringue Supor PALL Membrane®). La solution de solubilisation des échantillons

est même utilisée comme phase mobile de SEC. La phase mobile est filtrée avant l'utilisation par une membrane Durapore® hydrophile à 0,45 µm (47 mm de diamètre, Millipore).

Les analyses sont réalisées à température ambiante avec un débit de 0,7 mL/min et un volume d'injection de l'échantillon de 100 µL en utilisant une colonne de gel TSK, 7,8 mm de diamètre et 30 cm de longueur. Les chitosanes de masses moléculaires différentes sont utilisés comme standard afin de déterminer les masses moléculaires des chitosane natif et fonctionnalisés.

III.5.4. Quantité des composés phénoliques greffés sur le chitosane fonctionnalisé

Le dosage des phénols est réalisé selon la méthode décrite par Singleton et ses collèges (Singleton *et al.*, 1998) avec des modifications mineures. Après 4h de réaction enzymatique, les chitosanes fonctionnalisés sont récupérés en utilisant un filtre 0,2 µm (Ministar-RC membranes, Sartorius) sous vide. Ces chitosanes sont ensuite lavés par l'eau distillée, le méthanol, l'éthanol et l'acétone afin d'éliminer toutes les traces des phénols adsorbés par les liaisons électrostatiques. Enfin, la solution recueillie (milieu réactionnel initial avec les solvants de lavage) est utilisée afin de quantifier les phénols non-greffés.

En bref, 1 ml de solution recueillie est mélangé avec 1 ml de carbonate de sodium à 10 % (Na_2CO_3) et puis ce mélange est laissé pendant 10 min à 38 °C. Plus tard, 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteau (1/3) est ajouté à ce mélange et puis ce mélange est agité pendant 15 min à l'abri de la lumière à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 660 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-1605). L'acide gallique (40 µg/mL) et l'eau distillée sont utilisés comme standard et blanc, respectivement. La teneur en composés phénoliques est calculée par l'équation suivante traduite de l'acide gallique comme standard (11):

$$y = 0{,}009\ x \qquad (R^2\ 0{,}9997) \qquad \textbf{Équation 11}$$

Où, y est la valeur de l'absorbance à 660 nm et x la concentration du phénol non-greffé (mg/mL).

III.5.5. Concentration des groupements amines libres

Basé sur les résultats d'IR des chitosane natif et fonctionnalisés, nous avons calculé la concentration des groupements amines libres par l'équation suivante (12) :

$$[-NH_2]\ mol/L = Cp^* DDA / (100.\ M) \qquad \textbf{Équation 12}$$

Où, M est la masse molaire d'un motif moyen (g/mol), DDA est le degré de désacétylation du chitosane (%), Cp (1 %, p/p) est la concentration de chitosane utilisé dans la méthode IR

La masse molaire d'un motif moyen (M) de chitosane compte tenu du degré de désacétylation est calculé par l'équation suivante (13) :

$$M = Md * DDA + Ma * DA = 168\ g/mol \qquad \textbf{Équation 13}$$

Avec la masse molaire d'un motif déacétylé (Md) = 161 g/mol, la masse molaire d'un motif acétylé (Ma) = 203 g/mol.

III.5.6. Mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique (µM cm/Vs) est mesurée afin de déterminer l'efficacité du greffage. Pour la mesure, les échantillons de chitosane sont dissous à une concentration de 2 mg/mL dans l'acide acétique (1 % v/v), à pH 3 et puis filtrés soigneusement en utilisant un filtre 0,2 µm (Ministar-RC membranes, Sartorius) sous vide avant l'analyse. Toutes les mesures sont réalisés à 25 ± 0,1°C en utilisant un appareil de type Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Angleterre) équipé d'un laser vert (532 nm Type : doublé en fréquence DPSS). Chaque mesure est répétée trois fois et la moyenne des mobilités électrophorétiques est enregistrée.

III.5.7. Viscosité

Les chitosanes natif et fonctionnalisés par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide férulique et de l'éthyle férulate, à différentes concentrations (2-10 mg/mL) sont dissous dans l'eau à 1 % d'acide acétique (pH= 3). La viscosité de ces solutions est mesurée à

température ambiante en utilisant le viscomètre Stresstech de marque Reologica (taux de rotation fixé à 0,15 s^{-1}).

III.5.8. Stabilisation thermique

Afin de vérifier la stabilité thermique des chitosanes fonctionnalisés, une solution de chitosane fonctionnalisé (5 mg/ml dans 1 % d'acide acétique) est incubée aux températures de 50 et 100°C en conditions aérobies pendant 60 minutes selon la méthode décrite par Pasanphan (Pasanphan *et al.*, 2010). Puis, le test antioxydant DPPH est réalisé par ajout de 200 µL de solution de chitosane à 1800 µL de solution méthanolique DPPH (6.10^{-5} M). Ce mélange est homogénéisé pendant 15s et puis incubé à la température ambiante à l'abri de la lumière 30 min. Enfin, l'absorbance de ce mélange est mesurée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible de marque Shimadzu UV-1605. Le pourcentage d'inhibition de la formation des radicaux $DPPH^{\bullet}$ libres est calculé selon la formule suivante (14):

$$(\%)\ \text{d'inhibition DPPH} = 1-(Abs_{\text{molécules à tester}} / Abs_{100\ \%\ DPPH}) * 100 \qquad \textbf{Équation 14}$$

$Abs_{\text{molécules à tester}}$: absorbance de la solution des molécules à tester en présence du DPPH, $Abs_{100\%\ DPPH}$: absorbance de la solution contenant uniquement la solution de DPPH

III.5.9. Morphologie de la surface

La microscopie électronique à balayage (Hitachi SEM S2500) à 10 kV est utilisée afin d'étudier la surface des films et des particules des chitosanes natif et fonctionnalisés. Les particules de chitosane fonctionnalisé sont bien séché au préalable et stockés au dessiccateur. Ensuite, ces particules sont placées sur la surface plastique fixée au support (Bio-Rad type SC 502). La mesure est réalisée pour différentes magnifications (150x, 300x, 1000x et 2500x).

IV. Propriétés antioxydantes et antiradicalaires

Le pouvoir antiradicalaire ou antioxydant ne peut être mesuré qu'indirectement à partir de ses effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antiradicalaire sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des

méthodes dites « d'inhibition » dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de réagir avec ces espèces.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant ou antiradicalaire d'un échantillon. C'est pourquoi, en effectuant différents tests de mesure de pouvoir antioxydant, on peut dresser un profil plus global des propriétés antioxydantes ou antiradicalaires des échantillons étudiés (Frankel et Meyer, 2000).

IV.1. Propriété antiradicalaire

Piégeage des radicaux DPPH$^{\bullet}$

Le potentiel antiradicalaire d'une substance peut être testé à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tel que le radical 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl appelé DPPH$^{\bullet}$ (Figure 33).

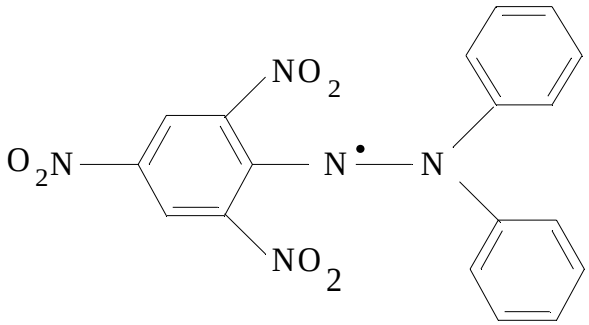


Figure 33 : structure chimique du DPPH$^{\bullet}$

En effet, à température ambiante et en solution, le radical DPPH$^{\bullet}$ présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne d'une disparition de cette coloration selon l'équation suivante (15).

$$DPPH^{\cdot} + AH \text{ -------}\rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot} \qquad \textbf{Équation 15}$$

La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par mesure colorimétrique à 517 nm. Elle rend ainsi compte du pouvoir piégeur des composés étudiés vis-à-vis du $DPPH^{\bullet}$ (Lee S. E. *et al.*, 2003).

Les produits d'oxydation sont solubilisés dans du méthanol à des concentrations différentes et 50 µL de ces solutions sont mélangés avec 1950 µL d'une solution méthanolique de $DPPH^{\bullet}$ (6.10^{-5} M). Alors que les chitosane natif et fonctionnalisés sont solubilisés dans l'acide acétique 1% (v/v) à des concentrations différentes et 200 µL de ces solutions sont mélangés avec 1800µl de la solution méthanolique de $DPPH^{\bullet}$ (6.10^{-5} M).

Ces mélanges sont fortement agités pendant 15s puis incubés pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'absorbance du mélange est ensuite mesurée à 517 nm contre un blanc constitué par du méthanol pur (Shimada *et al.*, 1992). Le trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E, a été utilisé à titre comparatif pour les produits d'oxydation.

Enfin, l'activité antiradicalaire des composés testés est évaluée par rapport à une solution méthanolique de radicaux $DPPH^{\bullet}$ qui représente le 100 %. Le pourcentage d'inhibition de formation des radicaux $DPPH^{\bullet}$ est calculé selon l'équation précédente (14).

L'activité antiradicalaire des produits d'oxydation est exprimée en valeur du TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) qui correspond à la concentration molaire de trolox permettant d'avoir le même pourcentage d'inhibition qu'une µM ou 1 g/L de produit, déterminée à partir des courbes d'inhibition en fonction de la concentration. Nous déterminons enfin la CI_{50} qui correspond à la concentration de molécule testée nécessaire pour faire disparaître 50 % de radicaux $DPPH^{\bullet}$.

Piégeage des radicaux $ABTS^{\bullet+}$

L'activité antiradicalaire d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical $ABTS^{\bullet+}$. L'ABTS est une substance ne possédant pas de radicaux libre au départ. Après mélange avec du persulfate de potassium, des radicaux libres ($ABTS^{\bullet+}$) se forment par

arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS (Re *et al.*, 1999). En effet, le mélange du persulfate de potassium et de l'ABTS provoque une oxydation incomplète de ce dernier faisant apparaître une coloration bleue intense.

Le contact entre le radical $ABTS^{\bullet+}$ et un donneur d'hydrogène conduit à l'$ABTS^{+}$ (Lien *et al.*, 1999) et à la décoloration de la solution (Figure 34). Cette décoloration sera suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm.

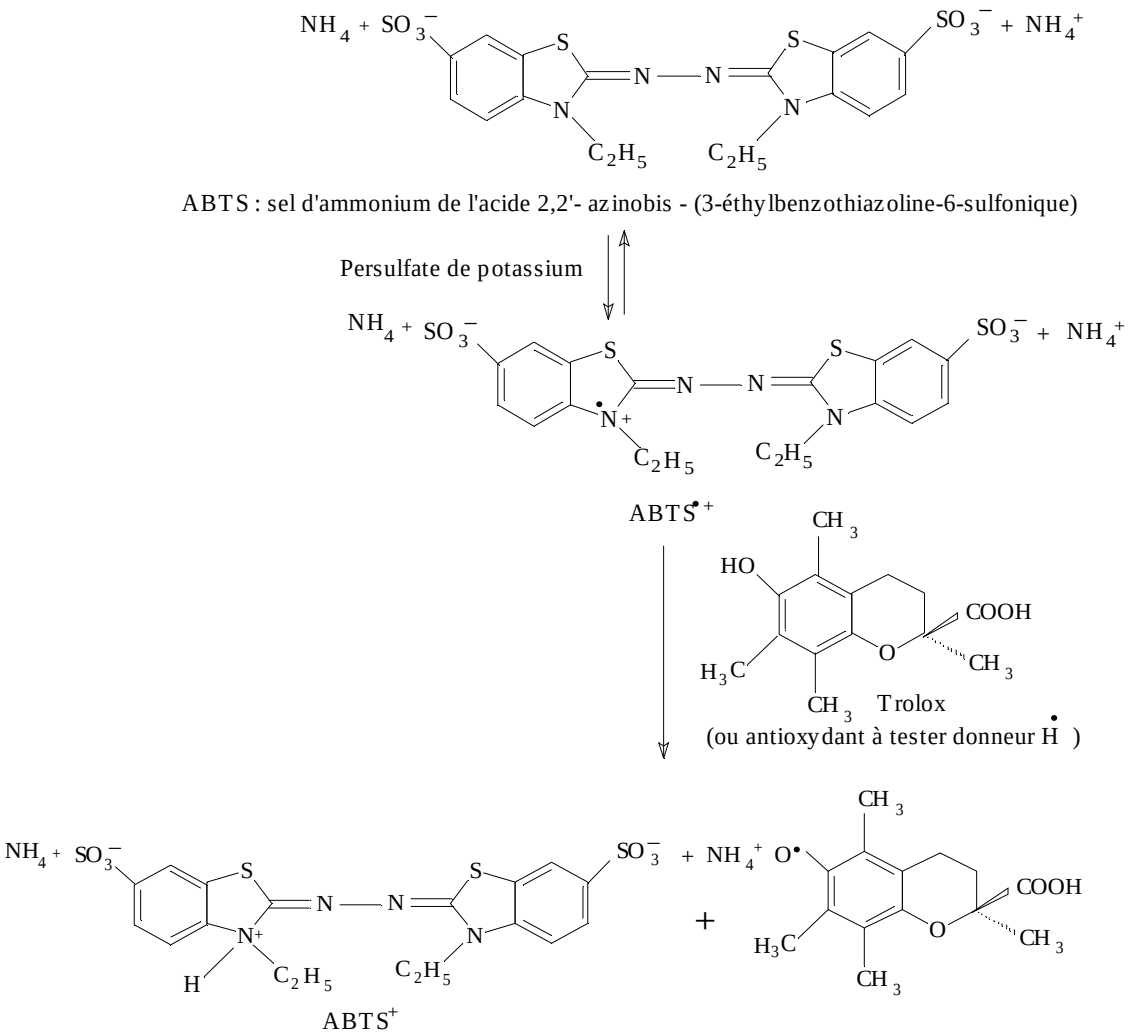


Figure 34 : formation et piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ par un antioxydant donneur de H• (Lien *et al.*, 1999)

L'activité antiradicalaire des produits d'oxydation sera comparée à celle d'un antioxydant de référence, le trolox (acide 6- hydroxy-2, 5,7, 8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E.

Le radical $ABTS^{\bullet+}$ est le produit d'oxydation de l'ABTS (7 mM) par du persulfate de potassium (2,45 mM) en solution aqueuse. Une fois la solution préparée, il faut la laisser pendant une nuit à température ambiante et à l'abri de la lumière pour que la réaction ait le temps de se faire totalement. Il en résulte l'apparition d'une coloration bleue intense. La solution d'$ABTS^{\bullet+}$ à 7 mM est diluée dans de l'éthanol afin d'obtenir une densité optique à 734 nm de l'ordre de 0,7± 0,02.

Des solutions de trolox ou des produits d'oxydation à des concentrations différentes sont préparées dans l'éthanol. Alors que des solutions des chitosane natif et fonctionnalisés à des concentrations différentes sont préparées dans l'acide acétique 1 % (v/v). Ensuite, 10 µL de ces solutions sont ajoutés à 1 mL de solution d'$ABTS^{\bullet+}$, et après 15 min d'incubation à 30°C, on mesure l'absorbance à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Re *et al.*, 1999). Dans un premier temps, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante (16) :

$$(\%)\ \text{d'inhibition ABTS} = 1-(Abs_{finale} / Abs_{initiale}) * 100 \qquad \textbf{Équation 16}$$

$Abs_{initiale}$: absorbance de l'$ABTS^{\bullet+}$ qui est égale à 0,7 ± 0,02, Abs_{finale} : absorbance de l'$ABTS^{\bullet+}$ en présence de la molécule testée

Dans un deuxième temps, l'activité antiradicalaire des produits d'oxydation est exprimée en valeur du TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) qui correspond à la concentration molaire de trolox permettant d'avoir le même pourcentage d'inhibition qu'une µM ou 1 g/L de produit, déterminée à partir des courbes d'inhibition en fonction de la concentration. Nous déterminons enfin la CI_{50} qui correspond à la concentration de molécule testée nécessaire pour faire disparaître 50 % de l'$ABTS^{\bullet+}$ initial : plus cette valeur est faible, plus le composé est antiradicalaire.

IV.2. Propriété antioxydante

Pouvoir réducteur sur le ferricyanure de potassium

Le pouvoir réducteur d'une substance est associé à son activité antioxydante. Le pouvoir réducteur des chitosanes natif et fonctionnalisés a été évalué d'après la méthode d'Oyaizu (Oyaizu, 1986), basée sur la réaction chimique de réduction du Fer(III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fer(II) comme suit :

2,5 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH=6,6) et 2,5 mL de $K_3Fe\ (CN)_6$ (1 % w/v) sont ajoutés à 1ml de chaque concentration des chitosanes solubles dans l'acide acétique 1 %. Le mélange est ensuite incubé dans un bain-marie à 50°C pendant 20 min puis on y ajoute 2,5 mL d'acide trichloroacétique (10 % w/v). Ce mélange est ensuite centrifugé à 10000 g pendant 10 min. On prélève ensuite 2,5 ml du surnageant et on y ajoute 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de $FeCl_3$ (0,1 % w/v). Enfin, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des molécules testées.

V. Propriétés antibactériennes

V.1. Préparation des solutions de chitosane

Les solutions de chitosanes natif et fonctionnalisés (10 mg/mL, pH 5,2) sont préparées en dissolvant la poudre du chitosane dans l'acide acétique (0,4 %, v/v, pH 3,2) et puis agitées pendant une nuit à 700 tours/min à température ambiante.

Les solutions de composés phénoliques (l'acide férulique, l'éthyle férulate et leurs produits d'oxydation) sont fraîchement préparées par la dissolution du phénol dans l'éthanol (50 %). Le composé phénolique est d'abord dissous dans l'éthanol pur (100 %) par l'agitation constante avant d'ajouter l'eau stérile. Toutes les solutions sont conservées à 4°C jusqu'à l'utilisation.

V.2. Micro-organismes et conditions de culture

Les souches suivantes et les conditions d'incubation sont utilisées pour évaluer l'activité antibactérienne de chitosanes natif et fonctionnalisés ainsi que les composés phénoliques : quatre agents pathogènes d'origine alimentaire, *Escherichia coli* CIP 54,8 (*E. coli*) et *Salmonella enterica* CIP 81.32 (*S. enterica*) comme des modèles de bactéries à Gram-négatif et *Staphylococcus aureus* CIP 76.25 (*S. aureus*) et *Listeria monocytogenes* CIP 82.110 (*L. monocytogenes*) comme des modèles de bactéries à Gram-positif sont obtenues de la collection publique [collection de l'Institut Pasteur (CIP), Paris, France]. Ces souches sont propagées pendant la nuit à 37°C en milieu Mueller-Hinton (MH). Les cultures obtenues sont diluées avec le Mueller-Hinton (MH) pour obtenir une densité optique finale (DO_{630}) de 0,1 correspondant à ~10^8 (UFC/mL). Cette concentration est utilisée pour les expériences d'activité antibactérienne.

V.3. Inhibition de la croissance bactérienne

Pour tester les composés phénoliques, une microplaque de 96 puits est incubée avec 90 µL de souches bactériennes à ~10^8 (UFC/mL) à l'exception de la première colonne de puits qui est incubée avec 90 µL de milieu Mueller-Hinton sans bactéries correspondant au blanc. Ensuite, 10 µL de chaque concentration de phénol (50 % de la concentration initiale de l'éthanol) sont ajoutés dans tous les puits de la microplaque à l'exception de la première colonne de puits qui est incubée avec 10 µL d'éthanol (50 %). Deux témoins sont utilisés dans deux colonnes de puits qui contiennent 90 µL de souches bactériennes à ~10^8 (UFC/mL) : l'un avec 10 µL d'eau distillée stérile (témoin positif) et un autre avec 10 µL d'éthanol (50 %) (témoin négatif).

Pour tester les chitosane natif et fonctionnalisés, une microplaque de 96 puits est remplie avec 75 µL de souches bactériennes en milieu double Mueller-Hinton (2X), pour assurer que les cellules ne meurent pas de carence nutritionnelle, à l'exception de la première colonne de puits qui est incubée avec 75 µL de milieu en milieu double Mueller-Hinton (2X) correspondant au blanc. Puis, 75 µL de chaque concentration de chitosane (pH 5,2) sont versés dans tous les puits de la microplaque à l'exception de la première colonne de puits qui

est incubée avec 75 µL d'acide acétique (0,4 %). Deux témoins sont utilisés dans deux colonnes : l'une avec 75 µL d'eau distillée stérile et une autre avec 75 µL d'acide acétique dont le pH est ajusté par NaOH 0,1 M (0,4 %, pH 5,2). Il est constaté que le mélange des solutions de chitosane (pH 5,2) avec le milieu de culture (pH 7,2) présente un milieu à pH 6. Ainsi, dans ce travail, l'activité antibactérienne des chitosanes natif et fonctionnalisés aura pH de 6 sans neutralisation par NaOH.

Après cela, les microplaques sont homogénéisées par agitation constante pendant 5 min. La croissance bactérienne à T0 est déterminée par la densité optique à 630 nm de chaque puits selon la méthode de Sanchez-Maldonado (Sanchez-Maldonado *et al.*, 2011) sur un lecteur de microplaques (multiscan GO W382TA, Thermo Scientific MIB, France). Ensuite, les microplaques sont incubées à 37°C pendant 16-18 h. Après l'incubation et avant la détermination de la densité optique pour TF, les microplaques sont agitées pendant 10 minutes pour éviter le précipite formé pendant l'incubation. Les tests ont été effectués en double. L'activité antibactérienne des composés phénoliques exprimée par pourcentage d'inhibition (%) est calculée par l'équation suivante (17) selon la méthode de Cueva (Cueva *et al.*, 2010) :

% d'inhibition de la croissance =

$$1- [(TF_{essai} – T0_{essai})-(TF_{blanc}-T0_{blanc})] / [(TF_{essai} – T0_{essai})-(TF_{blanc}-T0_{blanc})]* 100$$ **Équation 17**

Où, $T0_{essai}$ et TF_{essai} correspond à la densité optique à 630 nm de la croissance souche en présence des composés testés avant (T0) et après (TF) d'incubation, respectivement;

$T0_{blanc}$ et TF_{blanc} correspond à la densité optique à 630 nm du milieu Mueller-Hinton avec un solvant avant et après incubation, respectivement ;

$T0_{témoin}$ et $TF_{témoin}$ correspond à la densité optique à 630 nm de la croissance souche en présence de l'eau distillée stérile (témoin positif) avant et après incubation, respectivement.

L'inhibition de la croissance bactérienne est exprimée par la CI_{50}, qui est définie comme la concentration requise d'un composé phénolique provoquant une inhibition de 50 % de la croissance bactérienne après 16-18 h.

V.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La méthode INT (Eloff, 1998) est modifiée afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) de composés phénoliques ainsi que de chitosanes natif et fonctionnalisés vis-à-vis des souches bactériennes.

En utilisant les mêmes microplaques que précédemment, 10 µL de p-iodonitrotétrazolium violet (INT) (0,4 % dans l'eau stérile) sont ajoutés dans les puits de microplaque comme indicateur de la croissance bactérienne. La microplaque est puis incubée à 37°C pendant 30 min à l'abri de la lumière. Le sel de tétrazolium incolore agit comme accepteur d'électrons et est réduite en un produit coloré (formazan rouge) par les organismes vivants. Lorsque la croissance bactérienne est inhibée, la solution dans le puits reste incolore après l'incubation avec INT.

Les valeurs de CMI sont enregistrées comme la concentration minimale du composé antibactérien qui inhibe complètement la croissance bactérienne visible après 16-18 h (aucun signe de croissance) (Barry, 1976). Pour la détermination de CMB, 50 µL de chaque puits sans INT sont ensemencés sur des boîtes de gélose MH et puis ces boîtes sont incubées à 37°C pendant 24-48 h. CMB est définie comme la concentration minimale du composé antibactérien qui tue 99,9 % de cellules viables (aucune colonie n'est observée sur des boîtes de gélose MH) (Barry, 1976). Au moins, deux essais sont réalisés avec chaque souche et le composé antibactérien testé.

VI. Propriétés biologiques

VI.1. Lignées cellulaires

Les propriétés biologiques des molécules à tester ont été évaluées vis-à-vis d'une lignée cellulaire Caco2 et de cellules primaires HUVEC.

La lignée cellulaire Caco2 (cellules cancéreuses du colon humain), est une lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome colique humain, isolée dans les années 70 chez un homme de type caucasien de 72 ans (ECACC, Salisbury, UK). Les cellules présentent une phase exponentielle de croissance et entrent en différenciation spontanée dès qu'elles atteignent la confluence. La confluence est un terme de culture cellulaire qui décrit le recouvrement de la surface du support de culture par les cellules adhérentes cultivées en monocouche sur un support approprié. Ainsi, 100 % de confluence décrit un tapis cellulaire présentant une monocouche homogène sur toute la surface du flacon de culture. Les cellules Caco-2 proviennent de l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produites Animaux (URAFPA, ENSAIA-INPL, NANCY) et avaient été congelées à une concentration de 10^7 cellules /cryotube (1 mL).

Les cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, ECACC No. 07073101) sont des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale saine, qui proviennent de l'European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Ces cellules sont issues de plusieurs individus. Elles ont été cryopréservées en fin de culture primaire à une concentration initiale supérieure à $5.\ 10^5$ cellules/ml et peuvent être cultivées et propagées jusqu'au passage 7.

VI.2. Conservation des cellules

Congélation

Les cellules sont conservées par congélation en cryotubes à raison de 7.10^6 cellules/ml pour les cellules Caco2 et de 5.10^5 cellules/mL pour les cellules HUVEC. Pour cela, la suspension cellulaire est centrifugée (5 min à 800 tours/min ; Jouan GR4-11) et le culot est repris dans 0,9 mL de milieu de culture (Milieu "Eagle" Modifié par Dulbecco (DMEM) avec 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio) pour les cellules Caco2 ou Milieu de Croissance Cellulaire Endothéliale (ECGM) pour les cellules HUVEC) puis 0,1 mL de DMSO est ajouté goutte à goutte dans le cryotube placé dans un bac avec de la glace. Une fois ces étapes réalisées, les cryotubes sont placés dans un système de congélation (Nicool) contenant de l'azote liquide (-196°C). Plusieurs paliers de congélation sont réalisés, afin de limiter au

maximum la mort cellulaire. Lorsque le cycle de congélation est terminé, les cryotubes sont stockés dans une cuve d'azote liquide à -196°C.

Décongélation

Pour effectuer une culture cellulaire à partir d'un cryotube, on procède à sa décongélation à 37°C dans un bain-marie. La suspension décongelée est reprise dans 9 mL du milieu DMEM + 10 % de sérum de veau fœtal pour les cellules Caco-2 ou ECGM pour les cellules HUVEC dans une boîte de culture et placée dans un incubateur à 37°C en atmosphère enrichie avec 5 % de CO_2. Un changement de milieu après 24 h est effectué pour éliminer toutes les traces de DMSO puis le milieu de culture est périodiquement renouvelé jusqu'à la confluence des cellules.

VI.3. Culture cellulaire

Lignée Caco2

Les cellules sont décongelées à partir du stock cellulaire au passage 32 ; les passages correspondent au nombre de réensemencement des cellules après trypsination. Elles sont mises en culture dans des fioles de Roux T 25 (25 cm^2) contenant du milieu DMEM (Sigma). Le milieu est supplémenté par 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio), 100 U/mL pénicilline/streptomycine (1 % v/v) (Eurobio), 4 mM glutamine (2 % v/v) (Gibco, France) et 1 % (v/v) d'acides aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France). Les cellules sont ensemencées à raison de 1.10^5 cellules/ml de milieu et sont cultivées jusqu'à confluence. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère contrôlée en humidité contenant 5 % de CO_2 avec un changement de milieu de culture effectué toutes les 48 h.

Lorsque les cellules arrivent à confluence, le tapis cellulaire est lavé avec du tampon PBS (9,6 g/L, pH 7,2) et détaché par action de la trypsine (1 ml de solution de trypsine à 0,5 % /2,6 mM EDTA, Gibco, France) pendant 3 à 5 min dans un incubateur (37°C, 5 % CO_2) (Sanyo, MCO-20AIC). La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 2 volumes de milieu DMEM enrichi par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/mL pénicilline (1 % v/v), 4

mM glutamine (2 % v/v) et 1 % (v/v) d'acides aminés non essentiels. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 800 tours /min pendant 5 min. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique (Zeiss, Allemagne) après avoir ajouté 10 % de bleu trypan. Ce dernier permet de différencier le nombre de cellules mortes en colorant en bleu les cellules dont la membrane n'est plus intègre. Après comptage, il est obtenu, à confluence, environ 6.10^4 cellules Caco2/cm^2. Cette suspension cellulaire est alors diluée à la concentration de 5.10^4 cellules/ml pour être ensemencée sur microplaque.

Lignée HUVEC

Elles ont été décongelées à un passage P_0 et ont été cultivées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO_2, dans des fioles de Roux T 25 (25 cm^2) contenant du milieu de croissance cellulaire endothéliale (ECGM, ECACC No. 06091509). Le milieu est préparé en ajoutant un supplément de croissance (15 mL) au milieu basal (milieu sans sérum ajouté, 485 mL). Les cellules HUVEC sont ensemencées à $1,4.10^4$ cellules/ml de milieu et elles sont cultivées pendant 3 jours ou jusqu'à confluence. Un changement de milieu après 24 h est effectué pour éliminer toutes les traces de DMSO, puis régulièrement toutes les 24 h jusqu'à 90 % de confluence. Le milieu est éliminé de la fiole de Roux par aspiration et le tapis cellulaire est lavé avec du tampon phosphate (9,6 g/L PBS pH 7,2) et détaché par action de la trypsine (1mL de 0.5 % trypsine / 2,6 mM EDTA) à température ambiante. Après une minute, les cellules commencent à se décoller. L'action de la trypsine est inhibée par ajout de 2 volumes de milieu DMEM à 20 % de sérum de veau fœtal (SVF). Enfin, les cellules sont centrifugées à 800 tours/min pendant 5 min. Le culot cellulaire est redissous dans du milieu de culture et les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique en présence ou non de bleu trypan. À confluence, la concentration des cellules HUVEC est approximativement de $2,5.10^5$ cellules par boîte de 25 cm^2. Pour la réalisation des expériences, les cellules sont diluées avec du milieu ECGM pour obtenir une concentration de $5.\ 10^4$ cellules/ mL pour être ensemencées sur microplaque.

Le nombre de passages est limité à 7 pour les cellules HUVEC et à 60 pour les cellules Caco2 car il a été démontré que le nombre de passages peut influencer différentes activités et fonctions cellulaires (BriskeAnderson *et al.*, 1997 ; Lu *et al.*, 1996).

VI.4. Activité cytotoxique des produits d'oxydation

L'activité cytotoxique a été évaluée sur les produits d'oxydation, ainsi l'acide férulique et l'éthyle férulate. Des concentrations différentes entre 2 et 8 mg/mL d'acide férulique, d'éthyle férulate et du mélange des produits d'oxydation sont dissous dans du DMSO, avec une concentration finale en DMSO dans le milieu de culture ne dépassant pas 1 % (v/v) pour les cellules Caco2 et 0,25 % (v/v) pour les cellules HUVEC.

VI.4.1. Suivi de la croissance cellulaire à micro-échelle par le système cellscreen®

L'influence des molécules testées est évaluée sur la croissance des cellules à microéchelle et mesurée à l'aide de l'appareil Cellscreen® (Innovatis AG, Allemagne) (Viebahn *et al.*, 2006). En pratique, les cellules sont réparties dans une microplaque Nunc de 96 puits (8x12) à fond plat dont 8 puits sont ensemencés pour chaque condition à raison de 1.10^4 cellules/puits (200 µL de milieu DMEM pour les cellules Caco2 ou ECGM pour les cellules HUVEC). La microplaque est incubée à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO_2 pendant 24 h. Après 24 h, un tapis cellulaire adhérent est obtenu et 5 µL de molécules testées de concentrations comprises entre 2 et 8 mg/mL sont ajoutées afin d'obtenir des concentrations finales entre 50 et 200 µg/mL. La croissance des cellules est alors analysée à l'aide du système Cellscreen®. Le témoin correspond à des cellules cultivées dans du milieu additionné uniquement du solvant utilisé pour solubiliser les molécules.

Système Cellscreen®

La croissance du tapis de cellules au fond du puits peut être évaluée par le système Cellscreen®. Ce système automatisé (Figure 35) permet à partir d'un microscope et d'un système de photographie numérique, de prendre des photos des cellules dans une microplaque et de déterminer par analyse d'images le pourcentage de recouvrement de la surface d'un puits (Brinkmann *et al.*, 2002).

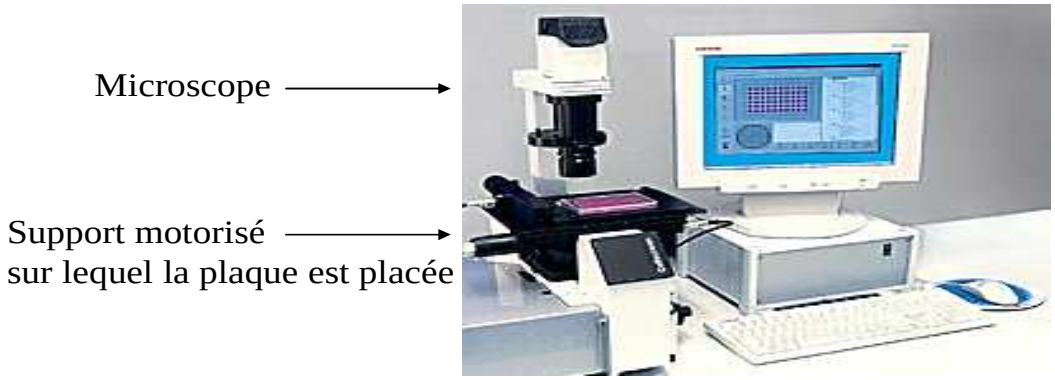


Figure 35 : système automatisé d'analyse de la croissance cellulaire : Cellscreen® (Innovatis , Allemagne)

La détermination du pourcentage de recouvrement en fonction du temps permet d'obtenir une estimation cinétique de la croissance cellulaire. En effet, il a été vérifié que la surface de recouvrement est proportionnelle à la concentration cellulaire. Les mesures sont effectuées aux temps 0 (temps d'ajout les molécules), 24 h et 48 h et permettent le calcul de la vitesse spécifique de croissance (en h^{-1}). La vitesse spécifique de croissance par heure (µ en h^{-1}) est calculée par l'équation suivante (18) :

$$\text{Ln } X/X_0 = \mu * (t-t_0) \qquad \textbf{Équation 18}$$

- au temps t_0 la concentration de cellules dans le milieu de culture est X_0
- au temps t la concentration cellulaire dans le milieu est X.

En traçant, Ln X/X_0 en fonction de temps, la pente qui est déterminée à partir de la partie linéaire représente la vitesse spécifique apparente de croissance µ (h^{-1}) entre t_0 et t.

Le suivi de la croissance par le Cellscreen® est basé sur la comparaison du pourcentage de recouvrement des puits "témoins" où les cellules ne sont pas mises en présence de la molécule à tester et des puits où les cellules sont soumises à différentes concentrations de la molécule.

VI.4.2. Evaluation de la viabilité cellulaire

La cytotoxicité éventuelle des molécules étudiées vis-à-vis des cellules Caco2 et des cellules HUVEC en culture est déterminée en utilisant le test au Rouge Neutre ou NRU (Neutral Red Uptak).

Un premier test a été envisagé consistant en la mesure de la viabilité par le test MTT qui est basée sur la transformation des sels de tétrazolium (jaunes) en cristaux de formazan (bleus) par des enzymes mitochondriales comme la succinate déshydrogénase active dans les cellules vivantes (Maher et McClean, 2006). Cependant, il est important de signaler que les sels de tétrazolium peuvent être directement transformés en cristaux de formazan en présence de certains flavonoïdes (Peng L. *et al.*, 2005b). Le test MTT est impossible à utiliser lors de test de cytotoxicité en présence de molécules présentant un pouvoir réducteur du MTT. C'est pourquoi, un autre test de viabilité basé sur un autre mécanisme a également été mis en œuvre tel que le test au rouge neutre.

Test au Rouge Neutre

Le rouge neutre (Figure 36) est un colorant ionique qui peut pénétrer dans les cellules à travers la membrane cellulaire par diffusion ionique. Le colorant se fixe alors sur les membranes des lysosomes intracellulaires (Borenfreund, 1992). Cette fixation du rouge neutre témoigne de l'intégrité cellulaire et elle est relative à la viabilité. Ainsi, en cas de mortalité, la membrane dégradée des lysosomes ne permet pas la fixation du rouge neutre. L'absorbance à 540 nm mesurée par spectrophotométrie est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

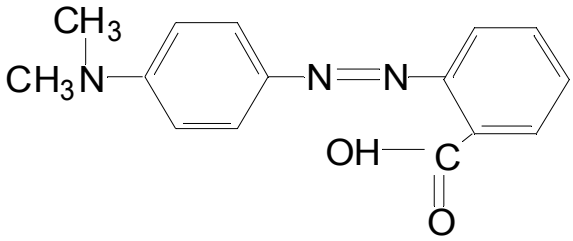


Figure 36 : structure chimique du Rouge Neutre

En pratique, les cellules sont ensemencées comme décrit précédemment à raison de 1.10^4 cellules/puits dans une microplaque de culture (Nunc) à 96 puits (8x12) et incubées pendant 24 h à 37°C et 5 % de CO_2. Après 24 h, les différentes concentrations de molécules à tester sont ajoutées. Après 48 h de culture, le milieu est éliminé, les cellules adhérées sont lavées au PBS, puis 200 µL de rouge neutre à 50 µg/mL préparés dans le milieu de culture sont ajoutés et la microplaque est incubée pendant 3 h à 37°C. Le milieu est à nouveau éliminé et les cellules sont lavées au PBS. Le rouge neutre est extrait des cellules en les soumettant à une solution de solubilisation (éthanol / acide acétique / eau, 50/1/49 v/v/v) sous agitation pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance peut enfin être mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le nombre de cellules vivantes après traitement par la dose choisie de molécules par rapport au nombre de cellules témoins non traitées, permet d'évaluer la cytotoxicité de ces molécules. Le pourcentage de mortalité est calculé par l'équation suivante (19):

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = 1-(Abs_{essai} / Abs_{témoin}) * 100 \qquad \textbf{Équation 19}$$

Abs_{essai} : absorbance de l'essai traité par les molécules, $Abs_{témoin}$: absorbance du témoin non traité par les molécules

L'activité cytotoxique des molécules testées est exprimée en CI_{50} qui correspond à la concentration de molécules induisant une diminution de 50 % de la concentration cellulaire.

VI.4.3. Analyse de l'apoptose et de la nécrose cellulaire

Cette analyse a été réalisée par cytométrie (Guava Easycyte®) (Figure 37). Dans un premier temps, les cellules HUVEC ou Caco2 sont cultivées en présence des composés phénoliques pendant 48 h puis elles sont trypsinées et comptées et une suspension cellulaire est préparée à la concentration 10^7 cellules/ml. Ensuite, 100 µL de l'échantillon sont placés dans une microplaque de 96-puits ainsi que 100 µL de réactif (Guava Nexin®, Millipore, 4700-1140). La plaque est laissée à l'obscurité pendant 20 min, puis analysée par le cytomètre. La population de cellules non apoptotiques témoin est issue d'un prélèvement d'une culture cellulaire en absence de composés phénoliques en conditions statiques.

Figure 37 : système (Guava Easycyte®)

Le réactif Nexin® contient de l'annexine V liée à la phycoérythrine (Annexin V-PE), et du 7-amino actinomycine D (7-AAD). L'annexine V se lie à la phosphatidyl-sérine (PS), un phospholipide de la face interne de la membrane plasmique, transloqué sur la face externe lorsque les cellules entrent en apoptose. Dû à une différence de potentiel de membrane, le 7-AAD ne diffuse pas à travers la membrane plasmique des cellules viables et en apoptose précoce, mais pénètre dans les cellules en apoptose tardive ou mortes (Figure 38). Enfin, le logiciel numérique nous donne les résultats exprimés par les pourcentages de chaque type de cellules (vivantes, apoptotiques précoces et apoptotiques tardives ou nécrotique).

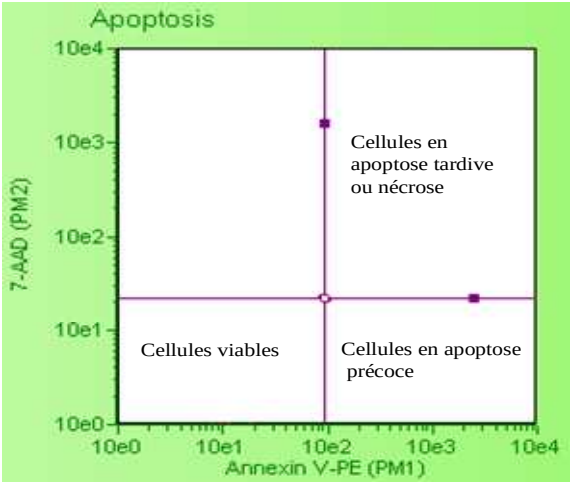


Figure 38 : schéma de la distribution des cellules par cytométrie (Guava Easycyte®)

VI.5. Adhésion cellulaire des films de chitosane

Un objectif de ce travail est d'étudier les interactions des cellules Caco2 ou des cellules HUVEC avec des films de chitosane natif et fonctionnalisé. En effet, une interaction convenable permettant l'adhésion des cellules Caco2 ou des cellules HUVEC sur les films de chitosane est cruciale pour permettre une croissance de ces cellules sur ces films.

A cette fin, l'étude s'est focalisée sur l'étude de l'adhésion et de la croissance de cellules Caco2 ou de cellules HUVEC sur les films de chitosane en fonction du type de chitosane (natif ou fonctionnalisé), de l'épaisseur des films et de la quantité de phénols greffés sur le chitosane fonctionnalisé. La culture des cellules Caco-2 ou des cellules HUVEC a été effectuée comme décrit dans le paragraphe précédent (VI.3).

VI.5.1. Fabrication des films de chitosane dans une plaque 24 puits

A partir de chitosane fonctionnalisé ou de chitosane natif sous forme solide, des films sont préparés en dispersant 5 mg de chitosane dans 100 mL d'acide acétique (1 %). La solution obtenue est maintenue sous légère agitation magnétique à température ambiante pendant la nuit. La solution obtenue est ensuite filtrée sous vide pour garantir l'absence de particules insolubles de chitosane. Les films sont préparés en fonction de la quantité de chitosane et de la quantité de phénols comme le suivant : 1 (ou 3 mL) de solution du chitosane natif ou fonctionnalisé est ajouté dans chaque puits afin d'obtenir des films de différentes épaisseurs. De plus, différents films sont élaborés en fonction de la quantité de phénols greffés sur le chitosane fonctionnalisé par l'ajout de chitosane fonctionnalisés soit après 4 h soit après 16 h de temps réactionnel.

Les films sont séchés à température ambiante pendant approximativement deux jours pour assurer l'évaporation complète du solvant. Les films ainsi formés sont neutralisés par une solution de NaOH (1M) pendant 1 h afin d'obtenir des films résistant à l'eau. Les films sont ensuite rincés à l'eau distillée plusieurs fois pendant 30 min à température ambiante jusqu'à atteindre un pH entre 7-8. Enfin, les films sont séchés pendant 24 h à température ambiante et stockés dans du tampon PBS (9,6 g/L ; pH 7,2).

VI.5.2. Caractérisation des films de chitosane

Epaisseur des films

A priori, les films fabriqué dans la plaque 24 puits sont décollé, puis l'épaisseur de ces films est déterminée selon la norme NF Q 03-016 avec un micromètre manuel (Messmer, Londres, Angleterre) (Figure 39) équipé d'une tête de mesure 5 mm de diamètre avec une sensibilité de 2 µm. L'épaisseur est mesurée en 5 points choisis au hasard sur chaque film et ensuite une valeur moyenne est calculée.

Figure 39 : micromètre manuel (Messmer, Londres, Angleterre)

Adsorption de protéine sur les films

L'adsorption des protéines du milieu de culture cellulaire sur les films de chitosane est évaluée d'après la méthode Holmes (Holmes et Tabrizian, 2011). En effet, la plaque contenant des films de chitosane est incubée avec le milieu de culture cellulaire complet soit DMEM supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal pour les Caco2 soit ECGM pour les HUVEC à 37°C et 5 % de CO_2. Un témoin est réalisé dans un puits vide sans film. Après incubation pendant une nuit, le milieu de culture est éliminé, et les films sont rincés trois fois par du tampon PBS (pH 7,2). Le milieu de culture éliminé ainsi que le tampon PBS de rinçage sont ensuite placés ensemble dans un tube afin d'évaluer la quantité de protéines non-adsorbées sur les films par dosage protéique par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) qui est décrit dans le paragraphe précédent (II.2.1)

VI.5.3. Mise en culture des cellules sur les films de chitosane

Dans un premier temps, les plaques 24 puits avec les films formés sont stérilisés sous UV rayons pendant 30 min. Les cellules Caco2 ou les cellules HUVEC sont ensuite ensemencées dans chaque puits soit sur les films de chitosane soit sur le polystyrène directement sans film (témoin) à raison de 5.10^4 cellules/mL (1 mL de milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF pour les cellules Caco2 ou ECGM pour les cellules HUVEC). Les plaques sont incubées pendant 3 jours à 37°C sous 5 % de CO_2.

Pour pouvoir caractériser l'adhérence, l'étalement et la croissance des cellules Caco2 ou des cellules HUVEC, des photos sont réalisées à l'aide d'un appareil photo (Canon) fixé sur un microscope optique. Les photos des cellules Caco2 ou HUVEC sur les films de chitosane ou sur le témoin ont été prises chaque jour pendant 3 jours de culture.

VI.5.4. Evaluation de la viabilité cellulaire

Un test de viabilité a été réalisé en fin d'expérience (3 jours). La quantité de cellules des puits avec film « essais» est comparée aux puits « témoins» (sans film). . Le test Rouge neutre ne peut pas être utilisé ; en effet, la solution de solubilisation (éthanol/acide acétique/eau, 50/1/49 v/v/v) solubilise également les films de chitosane. C'est pourquoi, un autre test de viabilité basé sur une autre solution de solubilisation a également été mis en œuvre tel que le test MTT.

<u>Test au MTT</u>

La viabilité cellulaire des films vis-à-vis de cellules Caco2 et de cellules HUVEC en culture a été déterminée en utilisant le test MTT (3-(4,5-diméthyle thiazol-2-yl) -*2,5* diphényle tétrazolium bromide qui permet d'évaluer l'activité mitochondriale des cellules (Maher et McClean, 2006). En effet, grâce à une enzyme (la succinate déshydrogénase mitochondriale active dans les cellules vivantes), qui a la propriété de catalyser la réduction du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs, le sel de tétrazolium MTT de couleur jaune est réduit en cristaux bleus de formazan (Figure 40). Cette réduction et par conséquent l'activité mitochondriale pourra être évaluée à 540 nm.

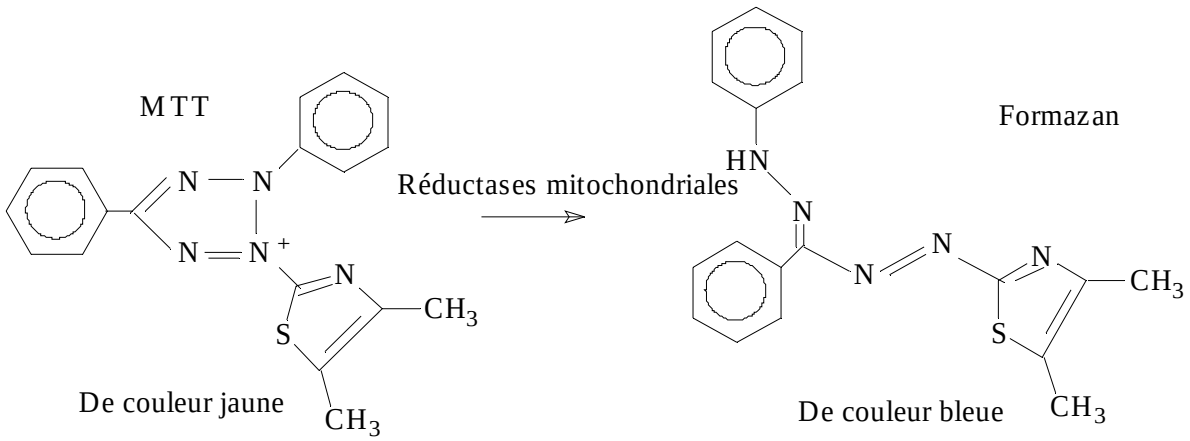


Figure 40 : réduction du MTT en formazan

En pratique, après 72 h de culture, les puits sont vidés et les films sont lavés au PBS, puis 800 µL de DMEM + 200 µL de MTT (à 2 g/L) sont ajoutés sur les films. La plaque est incubée pendant 4 h à 37°C, 5 % CO_2. Après incubation, les puits sont vidés, lavés au PBS et les cristaux de formazan formés sont solubilisés par 1ml d'isopropanol. La plaque est agitée 15 min à l'abri de la lumière puis la mesure de l'absorbance à 540 nm est réalisée par spectrophotométrie (multiscan GO W382TA, Thermo Scientific MIB, France). La mesure de l'activité mitochondriale des cellules après traitement par les films de chitosane par rapport à l'activité mitochondriale des cellules sans film, permet d'évaluer indirectement la cytotoxicité de ces films. Le pourcentage de mortalité est calculé d'après cette équation (20):

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = 1-(Abs_{essai} / Abs_{témoin}) \times 100 \qquad \textbf{Équation 20}$$

Abs_{essai} : absorbance de l'essai avec film, $Abs_{témoin}$: absorbance du témoin sans film

Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et discussion

Partie I : Oxydation enzymatique des composés phénoliques en milieu aqueux

I.1. Introduction

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes et prennent une importance croissante grâce à leur rôle d'antioxydants naturels. Pour cette raison, ils sont utilisés comme additifs dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique. La biotransformation enzymatique des composés phénoliques a consisté à essayer d'exploiter certaines transformations naturelles qui conduisent à de nouvelles structures moléculaires très diverses, colorées ou incolores. Ces molécules peuvent trouver des applications importantes dans des différents domaines comme des colorants alimentaires, des additifs antioxydants….

En général, les outils enzymatiques utilisés dans la biocatalyse de ces réactions se composent des polyphénoloxydases (PPO) par exemple des tyrosinases et des laccases, des peroxydases (POD). Ces enzymes se trouvent dans la nature, particulièrement dans les plantes et sont responsables de la bioconversion naturelle des composés phénoliques en pigments colorés (le brunissement enzymatique). Les réactions enzymatiques peuvent être aussi utilisées pour réticuler les biomatériaux fonctionnalisés afin d'améliorer leurs caractéristiques d'usage, telles que la stabilité. De plus, elles sont actives en milieu aqueux et dans des conditions expérimentales douces.

En particulier, selon la littérature, les travaux concernant l'oxydation enzymatique des composés phénoliques comme l'acide férulique ou le férulate d'éthyle ont été réalisés en milieu organique avec des tyrosinases ou des laccases en présence d'oxygène (O_2) (Adelakun *et al.*, 2012 ; Carunchio *et al.*, 2001 ; Mustafa *et al.*, 2005) ou des peroxydases en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Derat et Shaik, 2006 ; El Agha *et al.*, 2008 ; Yu *et al.*, 2007).

Cependant, aucune étude n'a été rapportée au sujet de l'oxydation enzymatique en milieu aqueux. Afin d'éviter les réactions en milieu organique, nous avons effectué l'oxydation en milieu aqueux afin de développer des méthodes davantage respectueuses de l'environnement et en accord avec les principes de la chimie verte.

Dans la première partie de la thèse, la synthèse de nouvelles molécules ayant des propriétés fonctionnelles intéressantes comme des propriétés optiques, antioxydantes… par l'oxydation enzymatique de l'acide férulique (FA) et d'ester éthylique de l'acide férulique (férulate d'éthyle, EF) a été étudiée en milieu aqueux. L'acide férulique (AF), un acide phénolique répandu qui peut être considéré comme un substrat modèle pour la laccase et le férulate d'éthyle (ester éthylique de l'acide férulique) comme la forme de l'acide férulique dans la nature ont été choisis afin d'étudier l'influence de la présence/l'absence du groupement carboxyle (-COOH) sur le mécanisme d'oxydation et les propriétés des produits … Ces réactions sont effectuées dans des conditions expérimentales douces de température, de pH et en milieu aqueux en absence de solvants organiques. Le choix du biocatalyseur s'est porté sur la laccase de *Myceliophthora thermophila* sp.

Cette étude a également pour objectif de déterminer les paramètres de Michaelis-Menten (Km, Vmax) de cette enzyme pour les deux substrats considérés, l'acide férulique et son ester éthylique. Enfin, les propriétés optiques (couleur), antioxydantes (ABTS) et cytotoxiques vis-à-vis de cellules saines HUVEC seront évaluées pour les produits d'oxydation en comparaison avec leurs substrats initiaux (AF et EF).

I.2. Laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: a green procedure for the synthesis of new compounds

Abdulhadi Aljawish[a], Isabelle Chevalot[b], Cédric Paris[a], Jordane Jasniewski[a], , Joël Scher[a], Lionel Muniglia[a,*].

[a] *Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602-F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

[b] *Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP-UMR 7274), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602-F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

Article accepté au « Food Chemistry »

Abstract

The enzymatic oxidation of ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) by *Myceliophthora thermophila* laccase as biocatalyst was performed in aqueous medium under an eco-friendly procedure to synthesize new active molecules. First, the commercial laccase was ultrafiltrated allowing the elimination of phenolic contaminants and increasing the specific activity by a factor 2. Then, kinetic parameters of this laccase were determined for both substrates (FA, EF) indicating a higher substrate affinity for ethyl ferulate. Additionally, enzymatic oxidation led to the synthesis of a FA-major product exhibiting a molecular mass of 386 g/mol and a EF-major product with a molecular mass of 442 g/mol. Structural analyses by mass spectrometry allowed the identification of dimeric derivatives. The optical properties of oxidation products showed the increase of red and yellow colors with FA-products compared to EF-products. Additionally, enzymatic oxidation led to the decrease of antioxidant and cytotoxic properties of oxidation products compared to initial substrates. Consequently, this enzymatic procedure in aqueous medium could provide new compounds presenting optical, antioxidant and cytotoxic interest.

Keywords: Laccase; Enzymatic oxidation; Ferulic acid; Ethyl ferulate; dye; antioxidant; cytotoxicity.

Corresponding author: Tel.: +33 383 595904; Fax: +33 383 595772

[*]E-mail address: lionel.muniglia@univ-lorraine.fr (L. Muniglia)

1. Introduction

The enzymatic oxidation of organic compounds in order to produce new classes of molecules has been widely investigated with a strong environmental concern (Burton, 1994). Oxidative enzymes can be subdivided into polyphenol oxidases (PPOs) using molecular oxygen as a co-substrate and peroxidases (POD) using hydrogen peroxide (H_2O_2) (Duran & Esposito, 2000). Recently, high interest concerns enzymatic oxidation due to its potential for the synthesis of bioactive molecules from phenolic molecules, exhibiting novel structures such as dimers and interesting properties such as antioxidant (Adelakun, Kudanga, Parker, Green, le Roes-Hill & Burton, 2012).

Polyphenol oxidases (PPOs) are multi-copper enzymes that catalyze the phenol oxidation to quinones which produce brown pigments in wounded tissues of vegetables with the concomitant reduction of oxygen to water (Nicolas, Richardforget, Goupy, Amiot & Aubert, 1994). These enzymes can be subdivided into tyrosinases and laccases (Walker & Ferrar, 1998). Recently, there have been a number of attempts to enzymatically modify phenolic molecules for improving their properties such as antioxidant activity (Adelakun et al., 2012; Yu, Han & Lou, 2007) or color properties (Mustafa, Muniglia, Rovel & Girardin, 2005; Ridgway, Oreilly, West, Tucker & Wiseman, 1996). Laccases (p-diphenol oxidase, E.C. 1.10.3.2) are among the enzymes that are currently being investigated. They belong to a small group named blue copper enzymes, containing a minimum of four copper atoms directly involved per active protein (Claus, 2004; Solomon, Sundaram & Machonkin, 1996). They are able of catalyzing the one-electron oxidation of phenols to produce phenoxy radicals as the primary oxidation products (semi-quinone) and concomitantly reduce molecular oxygen to water. The phenoxy radicals which are very reactive species and powerful electrophiles, can undergo a number of non-enzymatic reactions including covalent coupling to form dimers, oligomers and polymers through C–C, C–O and C–N bonds (Claus, 2004).

Phenolic compounds as ferulic acid and ethyl ferulate have been already oxidized by oxidative enzymes as laccases or peroxidases in organic medium and several dihydrodimers have been described. In fact, enzymatic oxidation of ferulic acid led to the formation of semi-quinone feruloyl radicals and then to the formation of oligomers (dimers, trimers…)

(Adelakun et al., 2012; Carunchio, Crescenzi, Girelli, Messina & Tarola, 2001; Mustafa et al., 2005). This oxidation can also be catalyzed by peroxidases using hydrogen peroxide (H_2O_2) (Derat & Shaik, 2006; El Agha, Makris & Kefalas, 2008; Ou, Kong, Zhang & Niwa, 2003; Yu et al., 2007) in a hydro-organic biphasic system. Additionally, previous studies reported enzymatic oxidation of ferulic acid esters as model feruloyl esters *in vitro* such as methyl ferulate (Wallace & Fry, 1995) or ethyl ferulate (Bunzel, Heuermann, Kim & Ralph, 2008; Ralph, Conesa & Williamson, 1998; Tufegdzic, Bogdanovic, Maksimovic & Vucinic, 2005) for determining the chemical structures of products. These oxidative reactions leading to the formation of ferulate dimers was catalyzed by peroxidases using hydrogen peroxide (H_2O_2). However, no study has been already reported concerning enzymatic oxidation in aqueous medium.

In the present study, a green procedure for the synthesis of nature identical stable compounds by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid (FA) and ethyl ester of ferulic acid (ethyl ferulate, EF) in aqueous medium was investigated. Ferulic acid (FA), a widespread phenolic acid that can be considered as a model substrate for laccase enzyme, and ethyl ferulate (EF), ethyl ester of ferulic acid, were chosen to compare the reactivity of phenolic substrates in the presence or not of free carboxylic groups. Laccase from *Myceliophthora thermophila* sp. was chosen due to its high reactivity in aqueous medium, at room temperature and neutral pH (Mustafa et al., 2005). Additionally, this work aimed to determine enzymatic oxidation parameters for both ferulic acid and its ethyl ester. Finally, color, antioxidant and cytotoxic properties will be evaluated for laccase-catalyzed oxidation products compared to the initial substrates (FA or EF).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and enzyme

Ferulic acid and ethyl ferulate were obtained from Fluka (France) with purity over than 99%; trolox was obtained from Fluka (Germany); syringaldazine was obtained from Ega-chemie with purity over than 99%. Methanol and acetonitrile (HPLC grade) were purchased

from Carlo Erba (Milwaukee, WI, USA); trifluoroacetic acid (TFA) (98%) and other chemicals with highest quality available were obtained from Sigma-Aldrich (France).

An industrial laccase named Suberase® (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerdt, Denmark) was purchased commercially from the Society Novozymes under liquid form. It must be kept between 0 and 10°C for suitable conservation. The Suberase® is a fungal laccase from *Myceliophthora thermophila* sp., which is considered as a member of family of polyphenol oxidases, obtained by submerged fermentation of a genetically modified *Aspergillus oryzae*. The enzymatic preparation was supplied as a brown liquid with a density at approximately 1.15 $g.ml^{-1}$. It was completely miscible with water.

2.2. Laccase characterization

To remove inactive peptides or proteins and to avoid the interaction between the phenolic interesting substrate and contaminated phenols which were initially present with the industrial laccase, partial purification of Suberase® (UF-laccase) was carried out at 4°C using an ultrafiltration device Amicon-8200 cell (20 ml) equipped with a membrane of cellulose acetate (cut off: 10 kDa) (SARTORUIS - 14539-63-G) under nitrogen gas to avoid oxidation by oxygen. Before the ultrafiltration starting, the membrane was cleaned in the acetone: distilled water mixture (1:1). Additionally, the industrial laccase was diluted by phosphate buffer at pH 7.5

The laccase purity was checked by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) on a 16% (w/v) polyacrylamide gel (Laemmli, 1970). SDS-PAGE was carried out using a mini-protein electrophoresis cell unit (Bio-Rad, USA). The laccase sample dissolved in sample buffer (10% SDS, 7.5% b-mercaptoethanol, 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 50% water, 50% glycerol and 0.1% bromophenol blue), then heated at 95°C for (5-10 min). Electrophoresis was performed at constant current 30 V for 60 min and then 180 V for 45 min. The proteins sub-unit bands were stained with (6%) Coomassie Brilliant Blue R-250 in acetic acid (10%), and detained in the same solvent system (but without dye). The molecular weight of enzyme protein was estimated using a Mark12™ Unstained Protein Standard of molecular weights between 6 - 200 kDa (Bio-Rad, USA).

Protein concentration in Suberase® was determined by Bicinchoninic acid (BCA) spectrophotometric method (Slocum & Deupree, 1991). Bovine serum albumin was used as standard in phosphate buffer (50 mM, pH 7.5).

The laccase activity at different pH (from 5 to 8) and different temperatures (from 20 to 50°C) was determined spectrophotometrically by measuring the increase of the absorbance at 525 nm caused by the oxidation of syringaldazine (2 µM, pH 7.5) in phosphate buffer (50 mM) using a spectrophotometer (Shimadzu UV- 1605). One unit of enzyme (UI) was defined as the amount in µmole of syringaldazine oxidized per minute and per µg of enzymatic protein using an extinction coefficient ε_{525} 65 $mM^{-1}.cm^{-1}$ (Mustafa et al., 2005).

To evaluate the purification efficacy, the laccase decolorization was carried out according to method (Smith & Montgomery, 1985) by measuring the absorbance at 420 nm toward raw laccase without purification (as a control). This wavelength (420 nm) was chosen because it gave a maximal absorbance corresponding to the UV/Visible spectra of colored initial enzymatic solution. The decolorization percent was calculated using the following equation (1):

$$\%decolorization= [Abs_{420}\,(raw\ laccase) - Abs_{420}\,(UF\text{-}laccase) / Abs_{420}\,(raw\ laccase)] \times 100 \quad (1)$$

2.3. Enzymatic oxidation of phenols

Oxidation of phenols (5 mM, final concentration) in a magnetic stirred batch reactor was carried out at 30°C in phosphate buffer (50 mM, pH 7.5). The reaction mixture was composed of 5 ml of methanol solution of 50 mM FA or EF and 45 ml of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5). This reaction was started by adding 0,13 ml of UF-laccase (13.5 U/ml). For the control, laccase was not added, in the same conditions. The reaction kinetic was monitored at various interval times by withdrawing samples (0.1 ml) from the reaction mixture. The enzymatic reaction was stopped by the addition of methanol (0.9 ml) containing 0.03% (v/v) of TFA (Lacki & Duvnjak, 1996).

2.4. Enzyme kinetics and substrate specificity

The Km value and maximum velocity (Vmax) (Michaelis-Menten kinetic parameters) of UF-laccase were determined by the Lineweaver-Burk plot. For that, different concentrations from 1 to 5 mM of two substrates (ferulic acid or ethyl ferulate) were oxidized by the same quantity of enzyme at 30°C in phosphate buffer (50 mM, pH 7.5). Substrate specificity (Vmax/Km) which determine enzymatic affinity toward phenolic substrate, was calculated by using the data obtained from the above plot (Lineweaver & Burk, 1934).

2.5. High performance liquid chromatography (HPLC)

To monitor the oxidation of substrate, reaction mixtures were analyzed by means of high performance liquid chromatography (HPLC) using a Shimadzu Class-VP HPLC system with a computer controlled system containing upgraded Class-VP 6.1 software. Separations were carried out on a reversed phase column LiChroCART RP-18 (Merck, 25 cm x 0.4 cm, particle size 5 µm). The detection was conducted between 190 and 700 nm on a multichannel photodiode- array detector (SPD-M10A VP). The elution was performed using a gradient of solvent A: water/ TFA (100:0.03; v/v) and solvent B: acetonitrile /water/ TFA (80:20:0.03; v/v/v) at a flow rate of 0.7 ml/min.

For ferulic acid**,** the steps of the gradient were as follow: linear gradient from 5% to 40% of B during 15 min, from 40% to 60% of B during 5 min and from 60% to 80% of B during 15 min. For ethyl ferulate, the steps of the gradient were as follow: linear gradient from 5% to 80% B during 10 min, constant at 80% of B in 10 min and from 80% to 100% during 5 min. Each analysis was performed in triplicate.

2.6. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS)

The mass spectra were obtained with the HPLC-MS system which comprised the binary solvent delivery pump and a linear ion trap mass spectrometer (LTQ-MS, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). LTQ equipped with an atmospheric pressure ionization interface operating in APCI positive mode (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation). Data were processed using Xcalibur software (version 2.0). The operational parameters of the mass

spectrometer were as shown below. The spray voltage was 6.0 kV. The temperatures of the APCI vaporizer and of the heated capillary were set to 400°C and 225°C, respectively. The flow rates of sheath gas, auxiliary gas, and sweep gas were set (in arbitrary units/min) to 48, 5, and 5, respectively. Capillary voltage was 1 kV, tube lens was 50 V, split lens was 70 V, and the front lens was - 6.75 V. All parameters were optimized by infusing a standard solution of ferulic acid at 0.1 g/l in mobile phase [A=water + TFA (0.03%) / B=phase A (20%) + acetonitrile (80%) – 1:4] at a flow rate of 5 $\mu l.min^{-1}$. In addition to full scan between 50 m/z and 1000 m/z, the products were monitored through specific MS^n scans (MS_2, MS_3) in order to obtain structural informations.

2.7. Recovery of laccase-catalyzed oxidation products

After 3 h of phenols oxidation reaction, to ensure a complete oxidation of substrate and to avoid the increasing of polymerization degree, the products were recovered by a rotary evaporator under reduced pressure, then freeze-dried was carried out for 48 h. After that, the preservation of recovered products was carried out in the desiccator until use.

2.8. Color measurement of laccase-catalyzed oxidation products

The recovered oxidation products color was described according to the CIE L*a*b* color system as a three-dimensional space based on opposite colors, where L*, a* and b* were the coordinates of the color in the cylindrical color space, based on the theory that color was perceived by black-white (L* = lightness), red-green (a*) and yellow-blue (b*) sensations (Lathasree, Rao, SivaSankar, Sadasivam & Rengaraj, 2004). These parameters a*, b* and L* were measured directly in triplicate using colorimeter (model 200) (Montreuil, France). Other optical parameter used was the Chroma (C) = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, that represented the perpendicular distance from lightness axis. This parameter was indicative of strong or weak color (intensity).

2.9. Antioxidant properties of laccase-catalyzed oxidation products by ABTS assay

The ABTS radical scavenging activities of ferulic acid, ethyl ferulate and laccase-catalyzed oxidation products were determined according to the method described by Re et al.

(Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang & Rice-Evans, 1999). The $ABTS^{\cdot+}$ radical cation was produced by the reaction between 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate in H_2O and allowing the mixture to stand in the dark, at room temperature, for 12–16h before use. For this study, the $ABTS^{\cdot+}$ solution was diluted with ethanol at 30°C, in order to obtain an absorbance of 0.700 ± 0.025 at 734 nm. Then, 10 µl of each molecule sample prepared in ethanol at different concentrations were mixed with 1 ml of diluted $ABTS^{\cdot+}$ solution and then the absorbance of $ABTS^{\cdot+}$ was measured at 734 nm and at 30°C exactly 6 min after initial mixing. Appropriate solvent blanks were run in each assay. The extent of decolorization is calculated as the percentage reduction of ABTS absorbance by following equation (2):

$$ABTS^{\cdot+} \text{ radical scavenging activity (\%)} = (1 - Abs_{sample} / Abs_{control}) \times 100 \quad (2)$$

$ABTS^{\cdot+}$ radical scavenging activity was expressed as the half-maximal inhibition concentrations (IC_{50}) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) values. IC_{50} value, which expressed as the antioxidant concentration to reduce the radicals by 50%, was calculated for each compound by linear regression analysis (Gulcin, 2010). TEAC value is defined as the concentration of standard trolox, a water-soluble vitamin E analogue that exhibited the same antioxidant capacity as a 1 µg/ml solution concentration of the antioxidant compound under investigation (Maisuthisakul, Pongsawatmanit & Gordon, 2007). All analyses were carried out in triplicate and results represented the mean values with standard deviation.

2.10. Cytotoxic properties of laccase-catalyzed oxidation products

2.10.1. Cells and cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, UK) and cultivated in Endothelial Basal Medium (Sigma-Aldrich, France). The medium was prepared by addition of the growth supplement (3%) (Sigma-Aldrich, France). HUVEC cells (Sigma-Aldrich, France) were cultivated between passages 1 and 7. The cells were usually split when reaching 80% confluence (5–7 days). They were first rinsed with Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium (D-PBS) and then trypsinised with a solution containing 0.25% trypsin and 1

mM EDTA (GIBCO, USA) and counted by Thoma cell under an optical microscope. For maintenance of the cell line, the cells were seeded at 2.10^4 cells/cm^2 in flasks. All experiments of cytotoxicity evaluation were performed between the passage 3 and 6.

2.10.2. Cell viability evaluation by Neutral red uptake (NRU) assay

To study the cytotoxic activity of ferulic and ethyl ferulate and their oxidation products, 96-well microplates were filled with 190 µl of diluted HUVEC cells at 5.10^4 cells/well. After 24 h of incubation at 37°C, under 5% CO_2 atmosphere, the cells were exposed to 10 µl of the phenolic compounds solubilised in DMSO (final concentration of DMSO was 0.25%) with various concentrations and incubated for 48 h at 37°C, under 5% CO_2 atmosphere. Two controls were used in two columns of the microplate which contain 190 µl of diluted cells: one with 10 µl of D-PBS and another with 10 µl of DMSO solution (final concentration of DMSO was 0.25%).

The NRU (neutral red uptake) assay is a cell viability method, based on the ability of viable cells to bind a neutral red dye within the membranes of intracellular lysosomes (Borenfreund, 1992). After 48 h of incubation, the culture medium (200 µl) was removed from each well of the microplate. The attached cells were rinsed with equal volume of D-PBS at pH 7.2. Then, 200 µl of neutral red solution (50 µg/ml) freshly prepared in the culture medium was added at each well. The microplate was then incubated with the cells and the neutral red solution for 3 h at 37°C. After incubation, the neutral red solution was eliminated and the attached cells were rinsed with D-PBS. The attached cells were solubilised in 200 µl of an ethanol/acetic acid/water solution (50%, 1%, 49%, v/v/v) to release the neutral red remained within the lysosomal or cytoplasmic compartments. The plates were then shaken at room temperature for 10 min. The absorbance of this final solution was measured at 540 nm using a microplate reader (multiscan GO W382TA, Thermo Scientific MIB, France). The relative cell viability was calculated according to the following equation (3):

$$\text{Relative cell viability (\%)} = ((1- (Abs_{\text{treated cell}}/Abs_{\text{control}})) \times 100 \quad (3)$$

With $Abs_{\text{treated cells}}$ and Abs_{control} be the absorbance values at 540 nm of sample with treated cells and control, respectively. Each test was carried out in six copies, and each experiment

was repeated triplicate. The results were expressed as IC_{50} mean values with the standard deviations. IC_{50} was defined as the concentration of a molecule leading to 50% of cell mortality. The cytotoxicity was evaluated based on cell viability relative to controls as proposed by Kong (Kong, Jiang, Zhou & Fu, 2009).

3. Results and discussion

3.1. Partial purification of laccase

Laccase has been partially purified by ultrafiltration with a yield of total activity of 91%. The results demonstrated that this method could eliminate almost 2.5 folds of total proteins and the specific activity of ultrafiltrated laccase (UF-laccase) increased by 2.1 folds compared to raw laccase (Table 1). Additionally, the color of the enzyme decreased of 90% after the ultrafiltration due to the elimination of phenolic molecules present in the raw laccase.

Table 1: Characterization of *Myceliophthora thermophila* laccase before/after partial purification by ultrafiltration

	Raw laccase	UF-laccase
Protein (mg/ml)	21.5	8.5
Total activity (µmole/min/ml)	5590	5100
Specific activity (µmol/min/µg protein)	0.26	0.57
Purification (fold)	1.0	2.1
Yield of activity (%)	100	91
Yield of coloration (%)	100	10

The optimal activities were determined to be pH 7.5 and temperature of 30°C, using syringaldazine as specific substrate (data not shown). The protein characterization showed that the UF-laccase presented a major protein band on SDS-PAGE with an apparent molecular mass close to 85 kDa as presented in Fig. 1 that is consistent with the molecular mass (82 kDa) of *Myceliophthora thermophila* laccase (Mustafa et al., 2005).

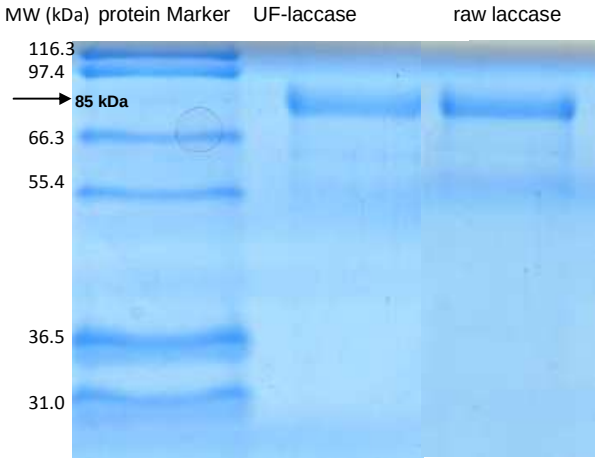


Fig. 1: SDS-PAGE of UF-laccase and raw laccase. MW, molecular weight

3.2. Kinetics of oxidation catalyzed by UF-laccase

Kinetics showed differences between the laccase-catalyzed oxidation of FA and EF as presented in Fig. 2. The oxidative rate of EF was higher than that of FA. Thus, the complete oxidation of FA was achieved after 150 min while the complete consumption of EF was after 120 min. Furthermore, it was verified that without laccase, FA or EF were not chemically oxidize by auto-oxidation (data not shown). After 3 h of oxidation reaction, laccase was inactive probably due to the interaction between oxidation products and the active site of enzyme (Whitaker, 1994; Whitaker, 1995). In fact, the enzyme inactivation is due to the reaction between intermediate products (free radicals from quinones or semi-quinones) and histidine groups of the enzyme active site linked to the binuclear copper. A previous study confirmed that the presence of macromolecule in reaction medium such as chitosan which quickly capture the oxidation products could protect the enzyme from inhibition during oxidation reaction (Aljawish et al., 2012).

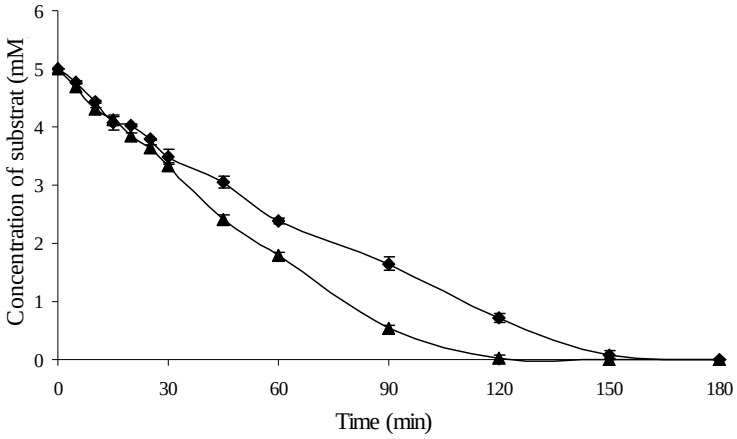


Fig. 2: Kinetics of oxidation of ferulic acid (♦) and ethyl ferulate (▲) by *Myceliophthora thermophila* laccase in aqueous medium (50 mM, pH 7.5)

The initial oxidation rate of FA and EF obeys to Michaelis-Menten kinetics as presented in Table 2. The results demonstrated that the Michaelis constant (K_m) of EF was lower than that of FA and the substrate specificity (V_{max}/K_m) of EF was 2 fold higher than that of FA while the maximum rates (V_{max}) were similar. As the Km value reflects the affinity between enzyme and substrate, the lower Km value of EF indicated a higher affinity for this substrate. Finally, the catalytic efficiency is higher for EF substrate than for FA due to a better Km.

Table 2: Kinetic parameters of UF-laccase for ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF)

Substrate	V_{max} (mM/min)	K_m (mM)	Catalytic efficiency (V_{max}/K_m)
FA	0.062 ± 0.003	1.64 ± 0.01	0.038 ± 0.002
EF	0.068 ± 0.002	0.95 ± 0.03	0.072 ± 0.001

3.3. Analyses HPLC/LC-MS of oxidation products

HPLC analyses of the reaction mixture after 90 min of oxidation reaction of ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) by UF-laccase revealed the presence of several peaks corresponding to various products as shown in Fig. 3. The identification of laccase-catalyzed oxidation products was focused only on the major product for FA and EF, because the other products are present in low concentrations and can be neglected compared to major products.

According to the retention time (Rt), these major products were called P (FA) corresponding to Rt of 26 min and P (EF) corresponding to Rt of 23 min.

The UV spectra of initial substrates, and their major products obtained by HPLC were presented in Fig. 3. After the enzymatic oxidation, the absorbance was decreased at 322 nm and it was increased at 230 nm due to the presence of oxidation products (quinones). These changes in the spectra were explained by ascribing the violet-shift of the absorption range and the intensity decrease of the distinguishable long-wave bands to the dissociation of carboxylic groups belonging to a conjugated system (Carunchio et al., 2001).

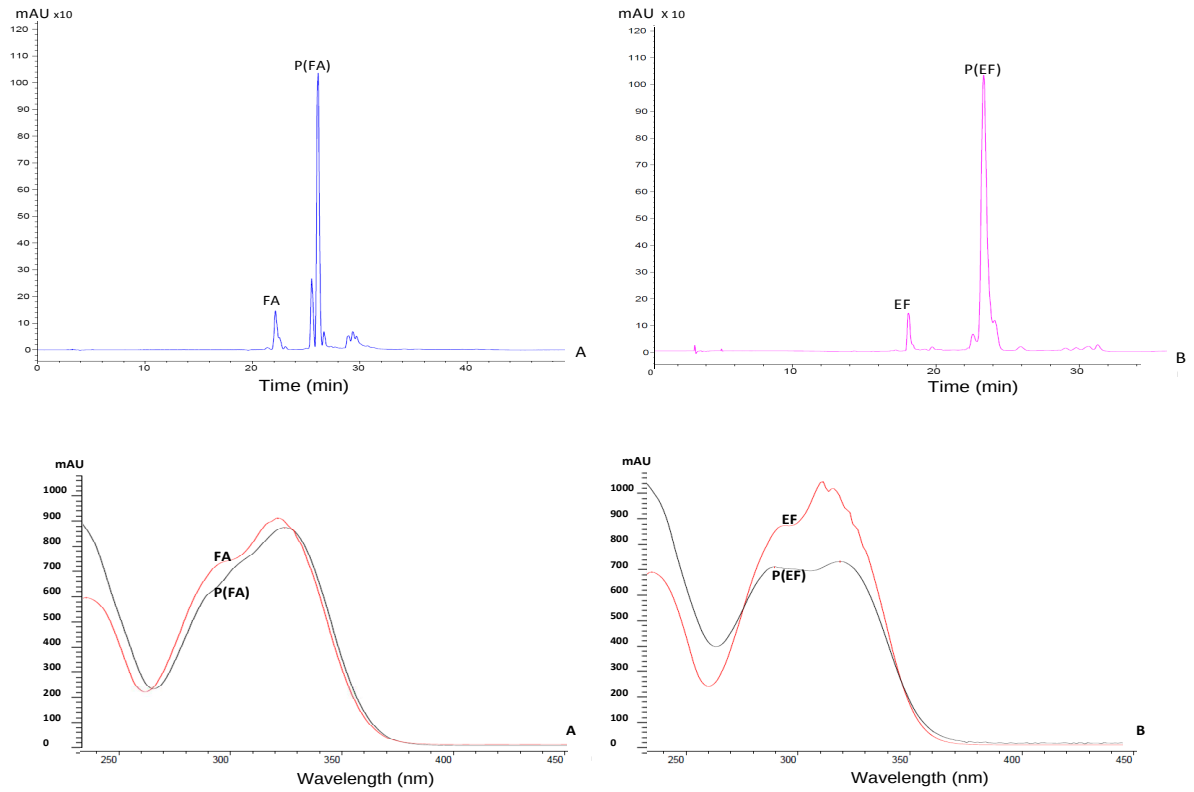


Fig. 3: Reaction mixture chromatogram at 322 nm and UV-spectra collected by HPLC of FA and its major product (A) and EF (B) and its major product

The LC–PDA-MS analyses in APCI positive ion mode showed that the major FA-oxidation product observed in UV led to mass spectrometry peaks on full scan MS at m/z= 387 $[M+H]^+$ as shown in Fig. 4-A . Fragmentation spectrum by MS^2 of the ion 387 allowed the characterisation of the structure (Fig. 4-B). Fragments indicating losses of H_2O (m/z=369)

and CO_2 (m/z=343) from the parent ion were detected. Subsequent removing of H_2O from single dehydrated parent ion (m/z=369) could account for the fragment with m/z=351 corresponding to double dehydrated parent ion. The ion with m/z=327 was indicative of a stepwise loss of a methyl radical and a hydrogen radical from decarboxylated dimer (m/z=343) leading to $[M+H-CO_2-CH_4]^+$. The formation of the ion m/z=281 after the fragmentation of the ion m/z= 343 by MS^3 could be attributed to decarboxylation of decarboxylated dimer (m/z=343) with concomitant removal of H_2O (Fig. 4-C). Moreover, further neutral loss of CH could be responsible of ion m/z=268. In addition, ion m/z=297 seen on fragmentation spectrum MS^3 (m/z=387,343) could be explained by concomitant loss of CO and H_2O from decarboxylated ion m/z=343 (Fig. 4-C). These results allowed to find the molecular mass of major FA-oxidation product at a molecular mass of 386 g/mol corresponding to molecular ions of the dimeric species of ferulic acid.

These observations were in accordance with those already described concerning FA-oxidation by *Pyricularia orysae* laccase (pH 6 at 37°C) in acetate buffer with 45% of ethanol (Carunchio et al., 2001) and peroxydase from onion solid wastes (pH 4 at 25°C) (El Agha et al., 2008). Indeed, both studies described the formation of three dimers as major oxidation products and the corresponding molecular masses were always (whatever the bonding type) the same as the one found in the present study (M=386 g/mol). Daughter ions described above are extremely close to those seen in case of dimer reported in other study (El Agha et al., 2008).

Moreover, the LC–PDA-MS analyses in APCI positive ion mode showed that the major EF-oxidation product observed in UV led to mass spectrometry peaks on full scan MS at m/z 443 as shown in Fig. 4-D. This observation was consistent with a dimer structure and was in agreement with data previously described concerning the oxidation of ethyl ferulate by peroxidase/H_2O_2 at pH 4 (Bunzel et al., 2008; Ralph et al., 1998).

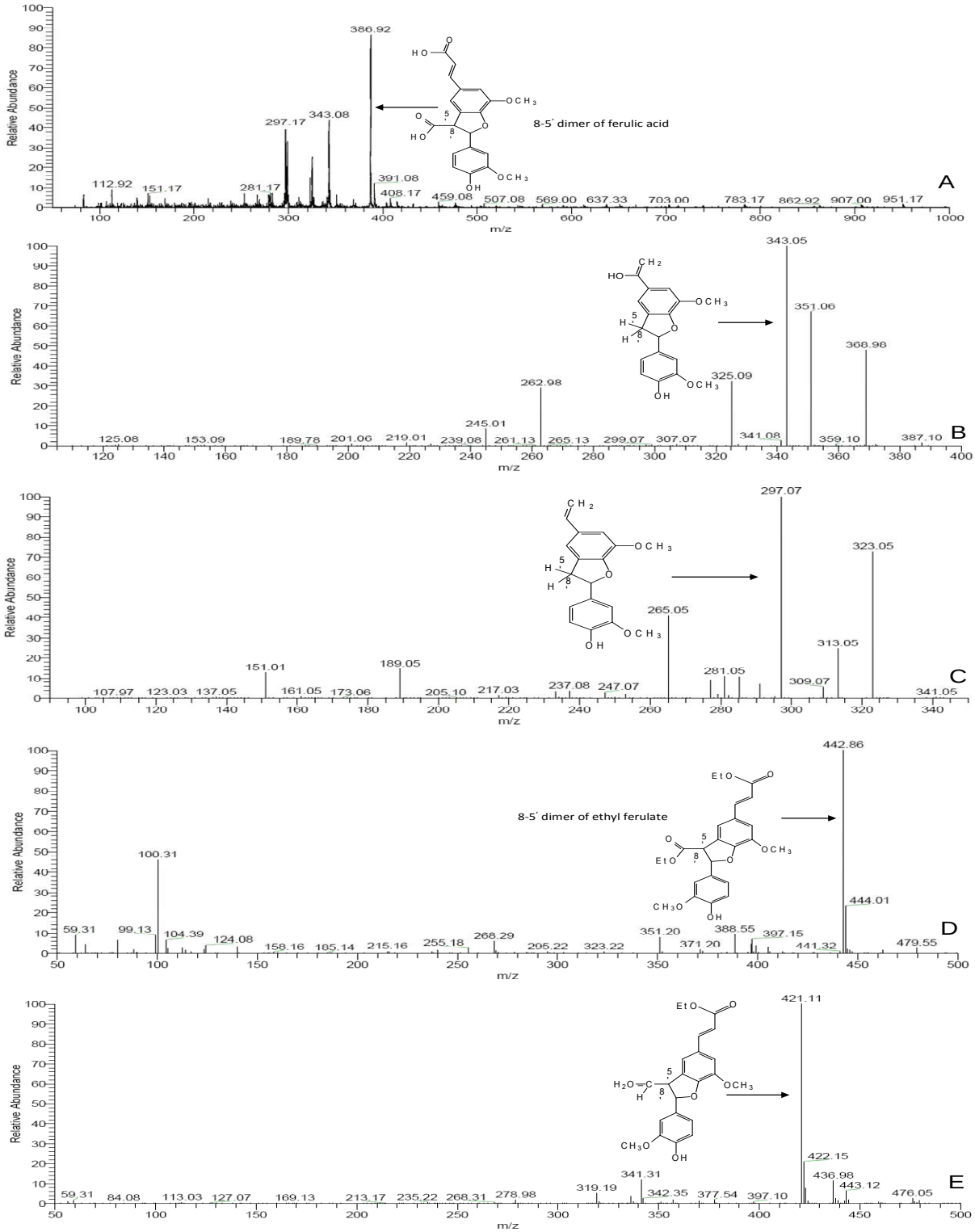


Fig. 4: LC-MS spectrums: (A) full scan MS spectrum of the major FA-oxidation product, (B) MS^2 fragmentation spectrum of ion m/z= 387, (C) MS^3 fragmentation spectrum of ion m/z= 343, (D) full scan MS spectrum of the major EF-oxidation product, (E) MS^2 fragmentation spectrum of ion m/z= 443

This structure was confirmed by the Fragmentation spectrum MS^2 of the ion 443 (Fig. 4-E) that showed most intense daughter ion with m/z= 397 indicating a stepwise loss of a H_2O and CO from the parent ion (m/z=443) leading to ion $[M+H-CO-H_2O]^+$. Subsequent removing of CO could account for the fragment with m/z=369 corresponding to ion $[M+H-2CO-H_2O]^+$. Fragment indicating subsequent loss of H_2O (m/z=351) was detected corresponding to ion $[M+H-2CO-2H_2O]^+$. Moreover, further neutral loss of two CH_4 could be explained by two concomitant removals of methyl radical and hydrogen radical leading to ion $[M+H-2CO-2H_2O-2CH_4]^+$ with m/z=319. The ion with m/z=275 was indicative of subsequent decarboxylation (CO_2) and ion m/z=247 was probably obtained after further neutral loss of CO corresponding to structure $[M+H-3CO-2H_2O-2CH_4-CO_2]^+$. Finally the ion m/z=221 was detected after concomitant losses of 2 CH (NL=26) corresponding to structure $[M+H-3CO-2H_2O-2CH_4-CO_2-2CH]^+$ $[M_{FE}-2H+H]^+$.

3.4. Color measurement of oxidation products

The optical properties of oxidation products were analyzed. During the oxidation reaction of ferulic acid and ethyl ferulate by laccase in aqueous medium, the reaction mixture color changed. In fact, during EF-oxidation reaction, the reaction mixture color changed from colorless to white and remained white until the complete consumption of EF while the FA-oxidation reaction changed the reaction mixture color from colorless to cristal light brown at the complete consumption of FA and after that, the FA-reaction mixture color became dark brown. To avoid brown oxidation products, the oxidation reactions were stopped after 3 h limiting high polymerization degree.

The values obtained for color parameters (a*, b* and L*) and C* values of laccase-catalyzed oxidation products recovered and freeze dried after 3 h of initial oxidation reaction, are presented in Table 3. FA-products were darker than EF-products, L* value of FA-products was lower compared to EF-products. Simultaneously, FA-products presented a higher color saturation (C*) than EF-products. In all cases, the chromatic coordinates a* and b* for laccase-catalyzed oxidation products were positive. In fact, FA-products showed an increase of a*, b* values indicating an increase in red and yellow color, more than that of EF-products. Furthermore, the color stability of FA-products was observed during two month under the

light and at room temperature (data not shown). This color varied from yellow to orange depending on products concentration.

Table 3: Color parameters (a*, b* and L*) and C* values of the laccase-catalyzed oxidation products of FA and EF after 3 h of reaction

	FA- products	EF- products
L* (Lightness)	62.70 ± 0.16	82.32 ± 0.49
a* (Redness)	12.67 ± 0.31	5.28 ± 0.05
b* (Yellowness)	24.33 ± 0.39	15.34 ± 0.26
(C*) color saturation	27.43 ± 0.60	15.89 ± 0.28

3.5. Antioxidant properties of laccase-catalyzed oxidation products

The ABTS radical scavenging activity method is based on the ability of molecules to quench the ABTS radical cation, in comparison with trolox which was used as reference molecule. The ABTS radical scavenging activities of initial phenols and their laccase-catalyzed oxidation products were expressed as the half-maximal inhibition concentrations (IC_{50}) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity TEAC. The comparative (IC_{50}) and (TEAC) values of tested phenols were shown in Table 4.

Table 4: IC_{50} values and TEAC coefficients of laccase-catalyzed oxidation products and initial substrates for ABTS method

ABTS	FA	P(FA)	EF	P(EF)	Trolox
IC_{50} (µg/ml)	1.34 ± 0.02	8.16 ± 0.21	2.89 ± 0.03	7.80 ± 0.12	2.19 ± 0.02
TEAC	1.64 ± 0.03	0.27 ± 0.01	0.76 ± 0.02	0.28 ± 0.01	1

The ABTS radical scavenging activity of initial phenols and their laccase-catalyzed oxidation products showed that FA exhibited higher radical scavenging activity than trolox (TEAC value higher than 1) corresponding to the results reported by other authors (Nilsson, Pillai, Onning, Persson, Nilsson & Akesson, 2005; Perez-Jimenez & Saura-Calixto, 2008). Additionally, the FA-scavenging activity was higher than EF-scavenging activity due to the

esterification of the carboxylate group of ferulic acid which decreases antioxidant effectiveness (Garcia-Conesa, Plumb, Kroon, Wallace & Williamson, 1997; Rice-Evans, Miller & Paganga, 1996). In fact, the scavenging activity of hydroxycinnamic acids as FA against ABTS radical was dependent on the number of hydroxyl groups on the benzene ring and *ortho* substitution with the electron donor methoxy group which increases the stability of the phenoxy radical as expected from the results reported by other authors (Chen & Ho, 1997; Garcia-Conesa et al., 1997; Pekkarinen, Stockmann, Schwarz, Heinonen & Hopia, 1999).

Laccase-catalyzed oxidation products from FA and EF exhibited similar scavenging activity which was lower than that of initial substrates (FA or EF) (Table 4). The similar activity of products are due to the oxidation and polymerization process decreasing the number of substitutes groups on the aromatic ring as -COOH, -OH and $-OCH_3$ which are mainly responsible of radical scavenging activity as well as the saturating of C=C bonds (Adelakun et al., 2012). Consequently, the esterification and the polymerization decreased the antioxidant action in the order: ferulic acid > trolox > ethyl ferulate > EF- or FA- laccase-catalyzed oxidation products. The similar antioxidant activity of oxidation products is mainly due to their similar chemical structures as presented in Fig.4 except the presence of ethyl groups in EF-dimers. In previous study, it was shown that IC_{50} value of natural antioxidant such as ascorbic acid (vitamin C) was almost 5.3 ± 0.3 µg/ml (Lin, Liu, Hu, Song & Zhao, 2012; Sheih, Wu & Fang, 2009) by ABTS method. Consequently, oxidation products of FA and EF presented similar antioxidant property than ascorbic acid and can be considered as promising antioxidant agents.

3.6. Cytotoxic properties of laccase-catalyzed oxidation products

The cytotoxic activity of ferulic acid, ethyl ferulate and their oxidation products were evaluated toward HUVEC cells by Neutral red uptake (NRU) assay. Prior to the assay, the effect of 0.25% (v/v) DMSO (the final concentration of DMSO in the assay) was investigated and no cytotoxic effect was observed on the growth of HUVEC cells (data not shown).

The Neutral red uptake (NRU) assay was used to evaluate the viability of the cells treated with phenol compounds tested at several concentrations (50, 100, 150 and 200 µg/ml)

during 48h. The results were expressed as IC_{50} mean values with the standard deviations. As shown in Fig. 5 presenting cell viability of phenolic compounds, it was found that at 50 µg/ml, oxidation products did not present any cytotoxic effect towards HUVEC cells while initial phenols (FA, EF) presented slight cytotoxic effect as also shown by other authors (Kong et al., 2009). Consequently, the oxidation and the polymerization of FA and EF decreased cytotoxic effect of these phenolic compounds. Additionally, it was found that ethyl ferulate (IC_{50} = 147.1 ± 4.7 µg/ml) exhibited higher cytotoxic effect toward HUVEC cells compared than ferulic acid (IC_{50} =163.5 ± 6.8 µg/ml).

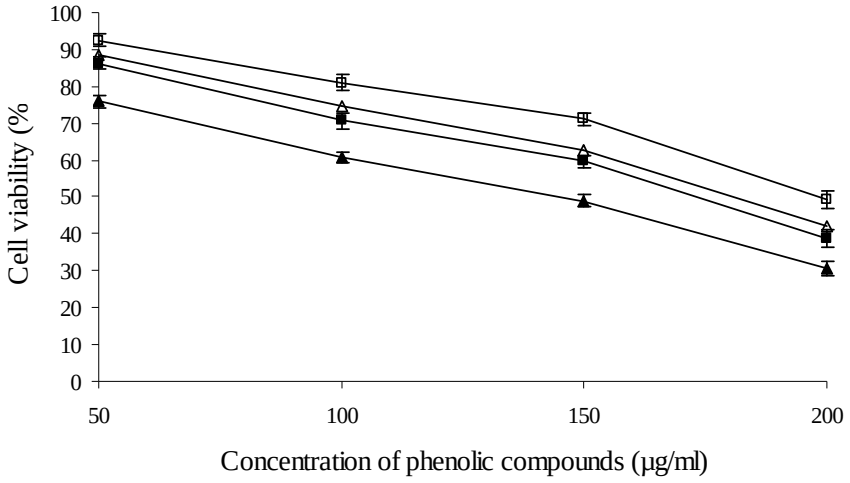


Fig. 5: Cell relative viability (%) of phenolic compounds tested toward HUVEC cells: FA (■), EF (▲), FA-products (□) and EF-products (Δ)

In previous studies, the cytotoxic activity of phenolic compounds was shown to increase with increasing their lipophilicity and consequently their ability to interact with the cell membrane and their transfer through it (Hadj Salem, Chevalot, Harscoat-Schiavo, Paris, Fick & Humeau, 2011; Mellou, Loutrari, Stamatis, Roussos & Kolisis, 2006). In addition, methoxy groups ($O\text{-}CH_3$) and alkyl chains through an ester or an amide bond also increased the cytotoxic activity by increasing the hydrophobicity of the molecules and consequently improve their interaction with cell membranes (Plochmann et al., 2007; Serafim et al., 2011). Thus, the cytotoxic activity of ferulic acid and its ethyl ester (ethyl ferulate) is probably related to their lipophilicity which is due to methoxy groups and alkyl chains. As the higher

lipophilicity of ethyl ferulate which is due to the esterification of the carboxylate group, its cytotoxic activity was higher than of ferulic acid against HUVEC cells. In previous studies, it was found that ester molecule presents a higher cytotoxic effect than initial molecule with either flavonoids such as quercetin and isoquercitrin (Hadj Salem et al., 2011) or phenolic acid such as ferulic acid and hexyl ferulate (Serafim et al., 2011). In another study, ferulic acid presented a cytotoxic effect toward HUVEC cells from a concentration of 80 µg/ml. This effect could be explained by the inhibition of adhesion protein synthesis of HUVEC cells by FA (Zhao, 2003).

Furthermore, FA or EF oxidation products (IC_{50} = 198.1 ± 8.8 µg/ml; 173.3 ± 8.1 µg/ml, respectively) presented lower cytotoxic activity toward HUVEC cells compared to their initial compounds (IC_{50} =163.5 ± 6.8 µg/ml for FA and 147.1 ± 4.7 µg/ml for EF). The decreased cytotoxic activity can be mainly attributed to the enzymatic oxidation and polymerization of phenolic compounds. In fact, the oxidation procedure decreased the number of benzene ring substitutions especially hydroxyl, methoxy groups being responsible of cytotoxic effects (Plochmann et al., 2007; Serafim et al., 2011) and the saturation of double bond of the alkyl chain decreasing hydrophobic character (Hadj Salem et al., 2011). Additionally, the cytotoxic activity of EF-products and FA-products was almost similar due to their similar chemical structure as presented in Fig. 4 except the presence of ethyl groups in EF-dimers which enhance the hydrophobicity and so the cytotoxic activity.

4. Conclusion

Enzymatic oxidation of ferulic acid and its ethyl ester was catalysed in aqueous medium by partially purified laccase of *Myceliophthora thermophila* in mild controlled temperature and pH (30°C and pH 7.5) as an eco-friendly procedure. This study demonstrated that the ultrafiltration method can increase the commercial laccase activity by a factor 2. This laccase had a higher affinity toward ethyl ferulate compared to ferulic acid. Furthermore, enzymatic oxidation led to two major dimers of FA and EF which were identified by HPLC and LC-MS. Furthermore, after 3 h of reaction, the reaction mixture color was transformed from colorless to white for FE-oxidation and from colorless to dark brown for FA-oxidation. Additionally, oxidation products presented lower antioxidant and cytotoxic properties compared to initial

phenols. Despite lower antioxidant properties, these products can be considered as antioxidant agents in comparison with natural antioxidant ascorbic acid. Consequently, the recovery of these laccase-catalyzed oxidation products provided new compounds with optical, antioxidant and cytotoxic interests.

These new compounds with double functionalities (color, antioxidant) and presenting low cell cytotoxicity may find useful applications in biotechnological domains such as food colorants for the replacement of synthetic colorants or as antioxidant additives for food preservation. Furthermore, previous studies demonstrated that these products tend to bind to other macromolecules such as chitosan (Aljawish et al., 2012; Bozic, Gorgieva & Kokol, 2012; Sousa, Guebitz & Kokol, 2009) as a method to avoid their high polymerization degree leading to some advantages as for the color stability in food products.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of Syrian Ministry of Higher Education and Aleppo-University for financial support.

Reference

Adelakun, O. E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I. R., le Roes-Hill, M., & Burton, S. G. (2012). Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, *74*(1-2), 29-35.

Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., Scher, J., & Muniglia, L. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, *87*(1), 537-544.

Borenfreund, E., Babich, H., (1992). The Neutral Red Cytotoxicity Assay. *Invittox.ECVAM*.

Bozic, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, *87*(4), 2388-2398.

Bunzel, M., Heuermann, B., Kim, H., & Ralph, J. (2008). Peroxidase-Catalyzed Oligomerization of Ferulic Acid Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(21), 10368-10375.

Burton, S. G. (1994). Biocatalysis with Polyphenol Oxidase - a Review. *Catalysis Today*, *22*(3), 459-487.

Carunchio, F., Crescenzi, C., Girelli, A. M., Messina, A., & Tarola, A. M. (2001). Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta*, *55*(1), 189-200.

Chen, J. H., & Ho, C. T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(7), 2374-2378.

Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, *35*(1-2), 93-96.

Derat, E., & Shaik, S. (2006). An efficient proton-coupled electron-transfer process during oxidation of ferulic acid by *horseradish peroxidase*: Coming full cycle. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(42), 13940-13949.

Duran, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B-Environmental*, *28*(2), 83-99.

El Agha, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2008). Peroxidase-Active Cell Free Extract from Onion Solid Wastes: Biocatalytic Properties and Putative Pathway of Ferulic Acid Oxidation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *106*(3), 279-285.

Garcia-Conesa, M. T., Plumb, G. W., Kroon, P. A., Wallace, G., & Williamson, G. (1997). Antioxidant properties of ferulic acid dimers. *Redox Report*, *3*(4), 239-244.

Gulcin, I. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*(1), 210-218.

Hadj Salem, J., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Paris, C., Fick, M., & Humeau, C. (2011). Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch and their acylated derivatives. *Food Chemistry*, *124*(2), 486-494.

Kong, N. H., Jiang, T., Zhou, Z. C., & Fu, J. L. (2009). Cytotoxicity of polymerized resin cements on human dental pulp cells in vitro. *Dental Materials*, *25*(11), 1371-1375.

Lacki, K., & Duvnjak, Z. (1996). Modeling the enzymatic transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenoloxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering*, *51*(3), 249-259.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680-685

Lathasree, S., Rao, A. N., SivaSankar, B., Sadasivam, V., & Rengaraj, K. (2004). Heterogeneous photocatalytic mineralisation of phenols in aqueous solutions. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical*, *223*(1-2), 101-105.

Lin, Y. L., Liu, J. L., Hu, Y. B., Song, X., & Zhao, Y. R. (2012). An antioxidant exopolysaccharide devoid of pro-oxidant activity produced by the soil bacterium *Bordetella sp B4*. *Bioresource Technology*, *124*, 245-251.

Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, *56*(3), 658-666.

Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., & Gordon, M. H. (2007). Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from *Teaw* (Cratoxylum formosum Dyer). *Food Chemistry*, *100*(4), 1620-1629.

Mellou, F., Loutrari, H., Stamatis, H., Roussos, C., & Kolisis, F. N. (2006). Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from *K562 cells*. *Process Biochemistry*, *41*(9), 2029-2034.

Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B., & Girardin, M. (2005). Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International*, *38*(8-9), 995-1000.

Nicolas, J. J., Richardforget, F. C., Goupy, P. M., Amiot, M. J., & Aubert, S. Y. (1994). Enzymatic Browning Reactions in Apple and Apple Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*(2), 109-157.

Nilsson, J., Pillai, D., Onning, G., Persson, C., Nilsson, A., & Akesson, B. (2005). Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to asses the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition & Food Research*, *49*(3), 239-246.

Ou, L., Kong, L. Y., Zhang, X. M., & Niwa, M. (2003). Oxidation of ferulic acid by *Momordica charantia peroxidase* and related anti-inflammation activity changes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *26*(11), 1511-1516.

Pekkarinen, S. S., Stockmann, H., Schwarz, K., Heinonen, I. M., & Hopia, A. I. (1999). Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(8), 3036-3043.

Perez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. (2008). Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. *International Journal of Food Science and Technology*, *43*(1), 185-191.

Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P., & Scheller, C. (2007). Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on *human leukemia cells*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *460*(1), 1-9.

Ralph, J., Conesa, M. T. G., & Williamson, G. (1998). Simple preparation of 8-5-coupled diferulate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(7), 2531-2532.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*(7), 933-956.

Ridgway, T., Oreilly, J., West, G., Tucker, G., & Wiseman, H. (1996). Potent antioxidant properties of novel apple-derived flavonoids with commercial potential as food additives. *Biochemical Society Transactions*, *24*(3), S391-S391.

Serafim, T. L., Carvalho, F. S., Marques, M. P. M., Calheiros, R., Silva, T., Garrido, J., Milhazes, N., Borges, F., Roleira, F., Silva, E. T., Holy, J., & Oliveira, P. J. (2011). Lipophilic Caffeic and Ferulic Acid Derivatives Presenting Cytotoxicity against *Human Breast Cancer Cells*. *Chemical Research in Toxicology*, *24*(5), 763-774.

Sheih, I. C., Wu, T. K., & Fang, T. J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology*, *100*(13), 3419-3425.

Slocum, T. L., & Deupree, J. D. (1991). Interference of Biogenic-Amines with the Measurement of Proteins Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, *195*(1), 14-17.

Smith, D. M., & Montgomery, M. W. (1985). Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'*anjou pears*. *Phytochemistry*, *24*(5), 901-904.

Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, *96*(7), 2563-2605.

Sousa, F., Guebitz, G. M., & Kokol, V. (2009). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. *Process Biochemistry*, *44*(7), 749-756.

Tufegdzic, S., Bogdanovic, J., Maksimovic, V., & Vucinic, Z. (2005). Characterization of enzymatically synthesized diferulate. *Biophysics from Molecules to Brain: in Memory of Radoslav K. Andjus*, vol. 1048 (pp. 466-470).

Walker, J. R. L., & Ferrar, P. H. (1998). Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, Vol. 15*, vol. 15 (pp. 457-498).

Wallace, G., & Fry, S. C. (1995). In-Vitro Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Ferulic Acid-Esters. *Phytochemistry*, *39*(6), 1293-1299.

Whitaker, J. R. (1994). Principle of enzymology for the food science. *Marcel Dekker, New York*, 271-556.

Whitaker, J. R. (1995). Polyphenol oxidase. *Food Enzymes Structure and Mechanism*, 271-307.

Yu, B. B., Han, X. Z., & Lou, H. X. (2007). Oligomers of resveratrol and ferulic acid prepared by peroxidase-catalyzed oxidation and their protective effects on cardiac injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(19), 7753-7757.

Zhao, Y.-M. W., X.-L. Hu, X.-H. Shen, F. He, Y. Shen, W.-H. Ruan, C.-G. (2003). Inhibitive effects of ferulic acid on adhesion molecules expression by activated endothelial cells. *Chinese Pharmacological Bulletin*, *19*(12), 1378-1380

I.3. Contribution de l'article

Cette étude a présenté une méthode de biotransformation douce de phénols naturels en milieu aqueux. Cette méthode enzymatique a permis l'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle (ester éthylique) grâce à la mise en œuvre de la laccase de *Myceliophtora thermophila*, connue pour catalyser l'oxydation de substrats phénoliques en quinones correspondant très réactives. Cette réaction enzymatique s'est déroulée dans des conditions expérimentales douces de température (30°C) et à pH 7,5, en milieu aqueux (tampon phosphate, 50 mM) et sans limitation de la quantité d'oxygène. Le temps réactionnel a été de 4h qui est le temps nécessaire à l'oxydation totale du substrat phénolique. Dans ce travail, nous avons choisi l'acide férulique comme substrat modèle de la laccase de *Myceliophtora thermophila* et également parce que ce substrat a été déjà bien étudié dans notre équipe notamment son oxydation en milieu organique.

La laccase utilisée dans cette étude a été partiellement purifiée par ultrafiltration en présence d'une membrane de cellulose afin d'éliminer les phénols présents et les molécules de faible poids molécules telle que les peptides … D'après le dosage des protéines par la méthode d'acide bicinchoninique (BCA) et l'activité enzymatique mesurée en présence de syringaldazine comme substrat modèle, nous avons montré que même si la quantité des protéines enzymatiques était moindre après cette étape de pré-purification, l'ultrafiltration permettait d'améliorer l'activité enzymatique d'un facteur 2,2. De plus, le poids moléculaire de la protéine enzymatique était quasiment 85 kDa déterminée par méthode SDS-PAGE. Ce poids moléculaire est en accord avec celui déterminée par d'autres auteurs (Mustafa *et al.*, 2005).

Les analyses chromatographiques (CL-HP, CL-MS) ont montré que l'acide férulique est totalement oxydé en 150 min, alors que le férulate d'éthyle est oxydé en 120 min. De plus, le produit majoritaire de chaque substrat à été identifié par rapport au temps de rétention et à sa masse moléculaire. Le produit majoritaire de l'acide férulique est obtenu à 26 min et présente une masse moléculaire de 386 g/mol, alors que le produit majoritaire du férulate d'éthyle est élué à 23 min et possède une masse moléculaire 443 g/mol. D'après les masses moléculaires de ces produits majoritaires, il a été mis en évidence que les produits sont des dimères de

l'acide férulique et du férulate d'éthyle. Le spectre UV-Visible des produits d'oxydation a montré une diminution de l'absorbance à la longueur d'onde 322 nm et une augmentation à 230 nm qui est issu de la formation des produits d'oxydation (quinones).

Les paramètres de Michaelis-Menten (Vmax, Km) ont été déterminés et ils ont montré que la constante de Michaelis (Km) du férulate d'éthyle était inférieure à celle de l'acide férulique. L'efficacité catalytique (Vmax / Km) du férulate d'éthyle est presque 2 fois supérieure à celle de l'acide férulique tandis que la vitesse maximale (Vmax) est presque similaire pour les deux substrats. Comme la constante de Michaelis (Km) reflète l'affinité entre l'enzyme et le substrat, la valeur plus faible de Km du férulate d'éthyle indique une affinité supérieure entre la laccase et le férulate d'éthyle.

Les paramètres de couleur (CIE L* a* b*) ont montré que la couleur du milieu réactionnel de l'acide férulique est jaune-orange pendant 120 min et devient brune en raison de la prolongation du degré de polymérisation. Le milieu réactionnel en présence du férulate d'éthyle reste lui incolore.

La détermination des propriétés antioxydantes a montré que l'acide férulique possède un pouvoir antioxydant plus important que celui du férulate d'éthyle lié à la présence d'un blocage des groupements carboxyles par estérification. De même, les produits d'oxydation de l'acide férulique ont présenté une activité antioxydante supérieure à celle des produits issus de l'oxydation du férulate d'éthyle. De plus, après oxydation et polymérisation, le pouvoir antioxydant des produits d'oxydation est inférieure en comparaison avec celui des substrats initiaux en raison de la diminution des groupements fonctionnels (-OH, -COOH) qui sont responsables des propriétés antioxydantes. En comparaison avec le trolox considéré comme agent antioxydant standard, l'ordre des substrats par rapport au pouvoir antioxydant est le suivant : acide férulique > trolox > férulate d'éthyle > produit de l'acide férulique> produits du férulate d'éthyle. D'après la littérature, les produits d'oxydation présentent un pouvoir antioxydant relativement similaire à celui de l'acide ascorbique qui est largement utilisé comme un agent antioxydant dans le domaine agroalimentaire. Ces résultats montrent la possibilité de l'utilisation de ces produits d'oxydation comme agents antioxydants.

Toutes ces molécules sont faiblement cytotoxiques vis-à-vis de cellules humaines HUVEC. L'éthyle férulate a présenté un effet toxique plus important que l'acide férulique en raison de ses propriétés hydrophobes, ce qui facilite sa pénétration à travers la membrane cellulaire. Les produits d'oxydation sont moins toxiques que les substrats initiaux probablement en raison de la diminution des groupements fonctionnels (-OH, -COOH et -OCH_3) qui sont responsables des propriétés cytotoxiques.

Ainsi, ces dérivés oxydés de l'acide férulique et du férulate d'éthyle présentent des propriétés intéressantes (antioxydantes et optiques) avec une faible cytotoxicité. Donc, ces néo-molécules peuvent trouver des applications dans différents domaines biotechnologiques tels que des colorants alimentaires pour le remplacement des colorants synthétiques ou des additifs antioxydants dans les aliments.

I.4. Complément de résultats

I.4.1. Propriétés cytotoxique et cytostatique des produits d'oxydation

Nous avons évalué l'effet cytotoxique des produits d'oxydation obtenus par voie enzymatique comparativement aux molécules originelles, l'acide férulique et le férulate d'éthyle, ceci afin de vérifier l'innocuité de ces produits en vue de leur utilisation en tant qu'ingrédients pour l'industrie agroalimentaire, cosmétique ou pharmaceutique. Par ailleurs, ces molécules ayant présenté des activités antioxydantes importantes, d'éventuelles capacités antiprolifératives vis-à-vis de cellules cancéreuses ont également été étudiées. Ainsi, les propriétés cytotoxiques et anticancéreuses ont été évaluées sur une lignée de cellules HUVEC et sur des cellules cancéreuses Caco2.

Afin d'évaluer si les molécules originales et leurs produits d'oxydation ont un impact sur les activités cellulaires, un test *in vitro* a été réalisé : le test au Rouge Neutre ; ce dernier permet de caractériser la fixation du rouge neutre sur les lysosomes lesquels ne sont plus intègres lorsque les cellules sont mortes. Même si le test MTT qui permet d'évaluer l'activité mitochondriale est plus commun et plus classique, celui-ci ne peut pas être utilisé avec tous les composés phénoliques. En effet, des travaux précédents ont rapporté que le test MTT pouvait être incompatible avec certains composés réducteurs notamment avec certains flavonoïdes (Peng Liang *et al.*, 2005a). Nous avons donc réalisé une expérience où les produits d'oxydation ont été placés en présence de sels de tétrazolium et nous avons également constaté que ces produits réduisaient considérablement le MTT en absence de cellules vivantes. Cette réaction croisée rend le test MTT impossible à utiliser pour évaluer l'activité mitochondriale des cellules en présence de ces molécules. C'est pourquoi nous avons utilisé le test au rouge neutre. Une molécule peut présenter un effet cytostatique, c'est à dire entraînant un ralentissement de la vitesse de croissance cellulaire ou cytotoxique impliquant un effet létal. Pour mieux caractériser ces deux effets, il est donc indispensable de pouvoir mesurer, d'une part, la vitesse de croissance des cellules et d'autre part, de mesurer leur viabilité en cours de culture. Cependant, il est très complexe de réaliser des cinétiques de croissance avec des cellules adhérentes, car il est impossible de faire des prélèvements dans le milieu de culture. C'est pourquoi le système Cellscreen® a été utilisé afin de permettre un

suivi morphologique et un suivi cinétique par analyse d'images de la croissance *in situ* dans les microplaques à 96 puits, de manière non invasive.

I.4.1.1. Propriétés cytostatiques vis-à-vis des cellules HUVEC

L'intérêt des expériences sur ce type de cellules saines (une lignée cellulaire endothéliale saine (HUVEC)) réside dans le fait que ce sont des cellules sanguines, et par conséquent elles sont en contact permanent avec les molécules circulantes dans le sang après passage de la barrière intestinale ou gastrique, ce qui permet d'évaluer éventuellement le pouvoir cytotoxique de nos biomolécules. En effet, l'acide férulique peut être disponible sous forme libre dans le sang après son passage à travers la barrière intestinale (Poquet *et al.*, 2008). L'effet des produits d'oxydation vis-à-vis des cellules HUVEC a été déterminé par la mesure de la croissance cellulaire au cours de l'expérience et par la viabilité effectuée après 48 h d'exposition par le test au Rouge Neutre.

L'effet cytotoxique des molécules originales et de leurs produits d'oxydation a été rapporté précédemment. Les expériences ont été réalisées à une concentration de DMSO (0.25%) à laquelle les molécules à tester sont solubilisées; cette concentration n'ayant montré aucune toxicité sur les cellules. Nous avons montré que toutes les molécules testées sont faiblement cytotoxiques vis-à-vis de cellules humaines HUVEC pour des concentrations de 50 µg/mL. En effet, un travail précédent a monté que l'acide férulique n'est pas toxique jusqu'à la concentration de 40 µg/ml (0.21 mM) vis-à-vis de cellules humaines HUVEC (Zhao *et al.*, 2003). En général, l'acide férulique a un effet toxique faible; c'est pourquoi il est utilisé dans les industries agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Ou et Kwok, 2004). De plus, le férulate d'éthyle a présenté un effet toxique plus important que l'acide férulique probablement en raison de ses propriétés d'hydrophobicité, facilitant sa pénétration à travers les membranes cellulaires (Mellou *et al.*, 2006 ; Salem *et al.*, 2011). Les produits d'oxydation apparaissent moins toxiques que les substrats initiaux probablement en raison de la diminution des groupements fonctionnels (-OH, -COOH et -OCH_3) qui sont responsables des propriétés cytotoxiques (Plochmann *et al.*, 2007 ; Serafim *et al.*, 2011)

Par ailleurs, l'effet cytostatique (un ralentissement de la vitesse de croissance cellulaire)

des produits d'oxydation vis-à-vis des cellules HUVEC a été évalué au cours de l'expérience pendant 48 h. Un suivi par analyses d'images des cellules incubées soit avec les produits d'oxydation, soit avec les molécules originales, est réalisé au cours du temps pour étudier la morphologie des cellules HUVEC et déterminer la vitesse spécifique de croissance cellulaire (µ). En ce qui concerne la morphologie cellulaire (Figure 41), nous avons constaté que les cellules HUVEC traitées aux concentrations les plus élevées des molécules testées (200 µg/ml) pendant 48 h présentaient des différences morphologiques (photo B, C, D, E) comparativement aux cellules non-traitées (témoin) (photo A). Ainsi, le tapis des cellules traitées est moins développé et le phénotype des cellules est davantage granuleux et sombre. Ceci indique une mortalité importante des cellules HUVEC à la concentration de 200 µg/mL, ce qui se traduit par une perte d'adhérence des cellules, et donc on peut observer quelques cellules en suspension. De plus, le tapis cellulaire en présence des molécules originales (photo B, D) est moins développé que celui en présence des produits d'oxydation (C, E).

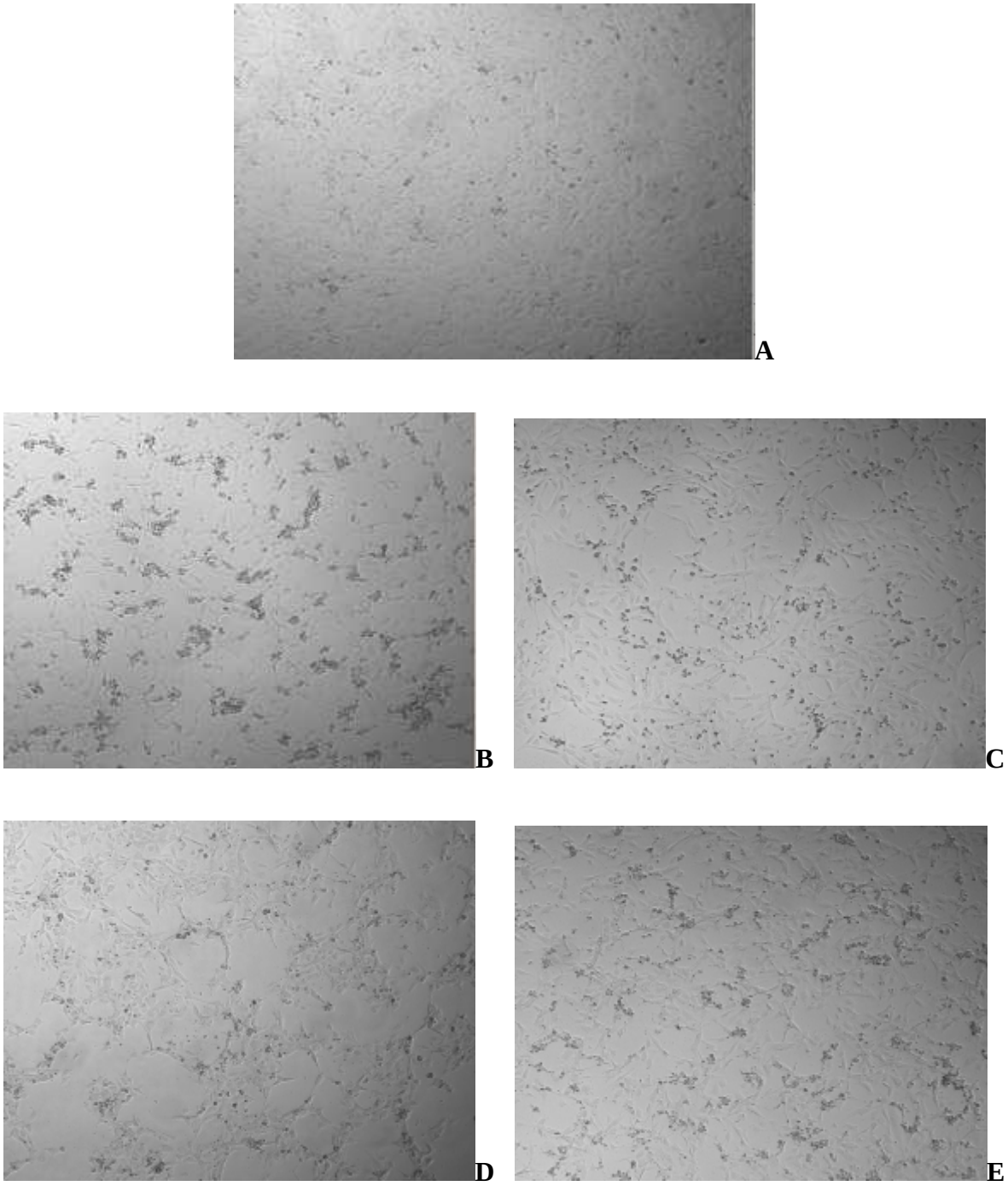


Figure 41 : analyse d'image par le Cellscreen® des cellules HUVEC cultivées dans du milieu de culture et après 48 h d'ajout de 200 µg de molécule/mL de milieu : A. sans ajout de molécule (témoin), B. ajout de l'acide férulique, C. ajout des produits de l'acide férulique, D. ajout du férulate d'éthyle, E. ajout des produits du férulate d'éthyle (grossissement x 40)

A partir de ces mesures, la surface de recouvrement par les cellules est déterminée par le système cellscreen® permettant d'évaluer la croissance cellulaire et en comparant la croissance des puits en présence des molécules testées et les puits témoins (non soumis aux molécules testées), il peut être déterminé si l'ajout de la molécule a eu un effet cytostatique après 48 h d'incubation.

La vitesse spécifique de croissance des cellules (µ) a été calculée entre 24 h et 48 h d'incubation. La Figure 42 montre que les vitesses spécifiques de croissance des cellules HUVEC ayant été soumises aux molécules testées à la concentration de 50 µg/mL ne sont pas significativement différentes de celle du témoin (0,009 h^{-1}). Néanmoins, aux concentrations supérieures à 100 µg/mL, les vitesses spécifiques de croissance cellulaire sont plus faibles. Par ailleurs, le férulate d'éthyle a montré un effet cytostatique plus important que celui de l'acide férulique probablement lié à la lipophilie plus élevée du férulate d'éthyle. Cette lipophilie devrait faciliter la pénétration de la molécule d'intérêt à travers la membrane cellulaire.

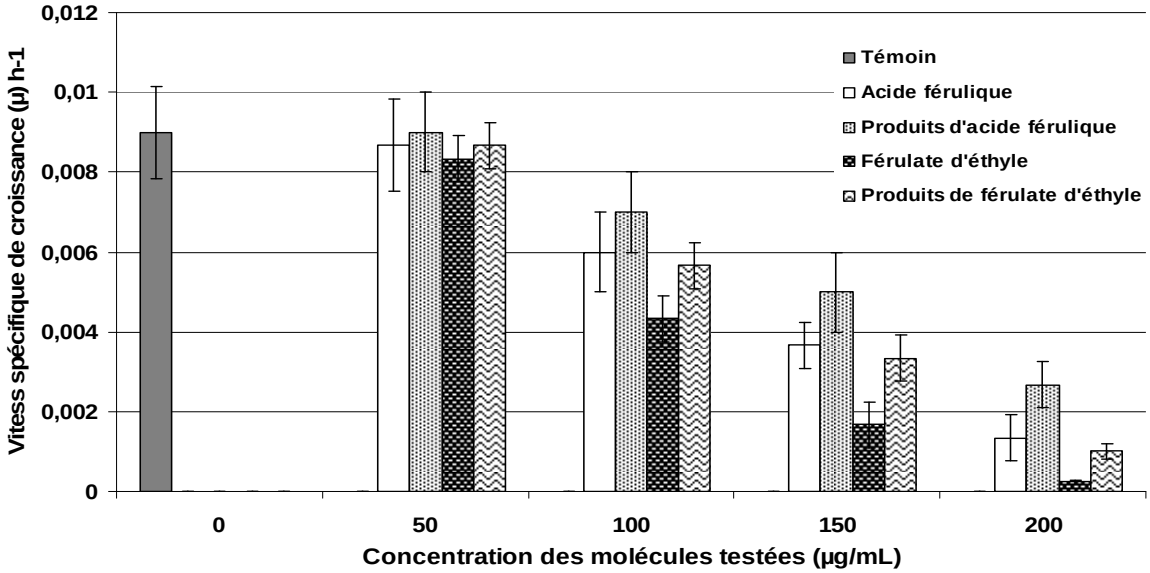


Figure 42 : vitesses spécifiques de croissance (µ, h^{-1}) de cellules HUVEC à 36 h d'incubation en présence d'acide férulique et ses produits et de férulate d'éthyle et ses produits à différentes concentrations

En conclusion, les produits d'oxydation ont présenté des propriétés fonctionnelles importantes telles que des propriétés optiques (la couleur), antioxydantes (ABTS) avec des propriétés cytostatiques et cytotoxiques moins importantes que les molécules originales. Ceci indique qu'ils pourraient être utilisés dans les domaines biotechnologiques comme colorants alimentaires afin de remplacer les colorants artificiels ou comme agents antioxydants afin de préserver les aliments.

Les activités biologiques telles que l'activité antioxydante des polyphénols notamment des flavonoïdes, permettant la prévention et la limitation des dommages causés par le stress oxydatif ont déjà été rapportées dans la littérature (Matkowski et Piotrowska, 2006) et certaines études ont montré que ces molécules présentaient conjointement des activités antiprolifératives vis-à-vis de cellules cancéreuses (Kilani-Jaziri et al., 2009 ; Mellou et al., 2006 ; Salem et al., 2010). Nous avons donc étudié si l'acide férulique, le férulate d'éthyle et leurs produits d'oxydation pouvaient présenter une potentielle activité anticancéreuse vis-à-vis de cellules Caco2

I.4.1.2. Propriétés cytotoxiques et cytostatique vis-à-vis des cellules Caco2

Le choix de la lignée cellulaire Caco2 est basé sur le fait que ces cellules permettent de modéliser l'absorption de ces produits au niveau de l'épithélium intestinal où elles peuvent être libérées de la matrice alimentaire grâce à la microflore colique (Couteau *et al.*, 2001). De plus, cette lignée de cellules est classiquement utilisée pour l'étude de la biodisponibilité de molécules actives telles que l'acide férulique libre (Konishi et Shimizu, 2003).

L'effet des produits d'oxydation vis-à-vis des cellules Caco2 a été déterminé par la mesure de la croissance cellulaire au long de l'expérience et par la viabilité déterminée après 48 h d'exposition. Pour réaliser ces expériences, les produits d'oxydation à tester ont été solubilisées dans du DMSO (1%) ; cette concentration n'ayant montré aucune toxicité sur la viabilité cellulaire en accord avec d'autres résultats rapportés dans la littérature (Salem *et al.*, 2011). Un suivi par analyses d'images par le système Cellscreen® des cellules incubées soit avec les produits d'oxydation, soit avec les molécules originales, est réalisé au cours du temps pour étudier la morphologie des cellules Caco2 (Figure 43).

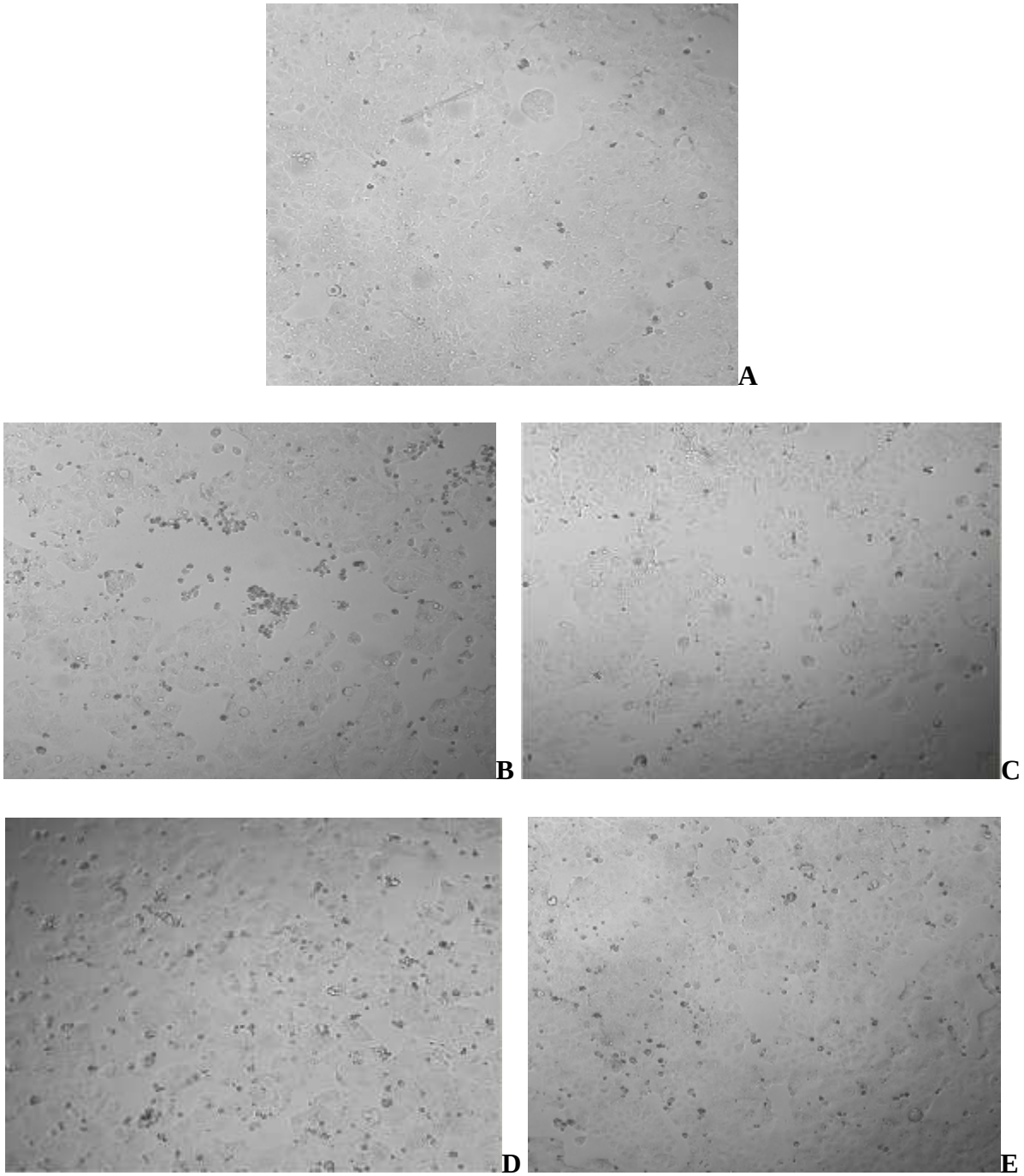


Figure 43 : analyse d'image par le Cellscreen® des cellules caco2 cultivées dans du milieu de culture et après 48 h d'ajout de 200 µg de molécule/mL de milieu : A. sans ajout de molécule (témoin), B. ajout de l'acide férulique, C. ajout des produits de l'acide férulique, D. ajout du férulate d'éthyle, E. ajout des produits du férulate d'éthyle (grossissement x 40)

Nous avons constaté que les cellules Caco2 témoin gardent la même morphologie pendant 48 h (photo-A). Après 48 h de traitement avec les produits d'oxydation à 200 µg/mL, les cellules présentent quasiment une morphologie similaire à celle du témoin (photo C et E). Par contre, après 48 h de traitement avec l'acide férulique et le férulate d'éthyle à 200 µg/mL, le tapis cellulaire est un peu moins développé et certaines cellules présentent un phénotype un peu plus granuleux et sombre (photo B et D). Ceci indique une légère mortalité des cellules, ce qui se traduit par une perte d'adhérence des cellules (photo d), avec observation de quelques cellules en suspension.

La vitesse spécifique de croissance des cellules (µ) entre 24 h et 48 h d'incubation a été déterminée. La Figure 44 montre que les vitesses spécifiques de croissance des cellules ayant été soumises aux molécules testées ne sont pas significativement différentes de celles des cellules témoin (0,023 h^{-1}).

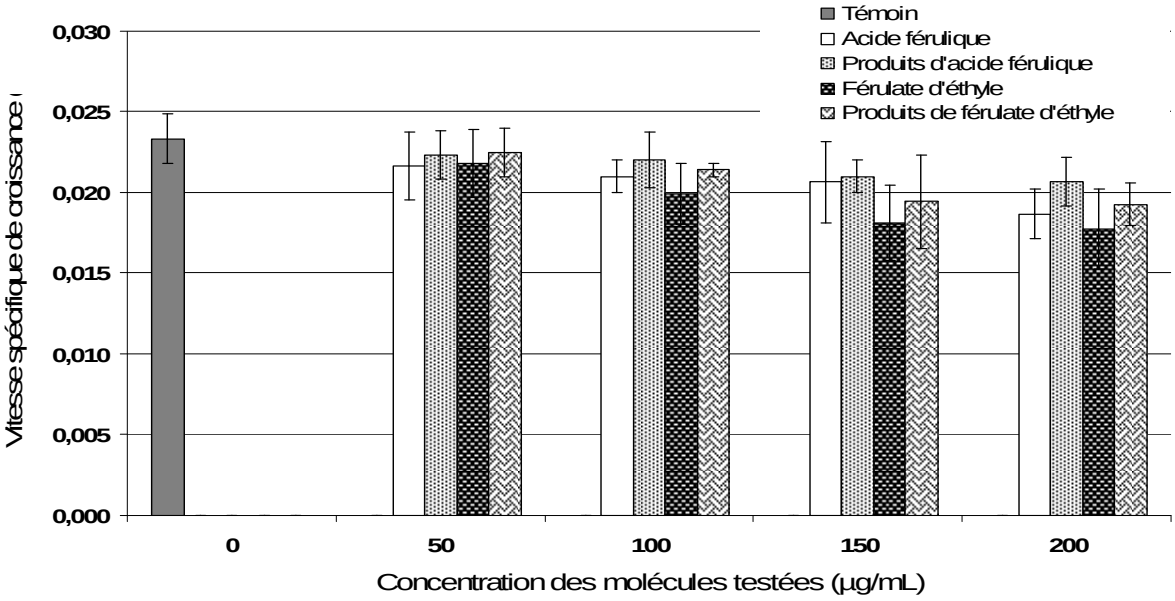


Figure 44 : vitesses spécifiques de croissance (µ, h^{-1}) de cellules Caco2 à 36 h d'incubation en présence d'acide férulique et ses produits d'oxydation et de férulate d'éthyle et ses produits d'oxydation à différentes concentrations

Le Tableau 17 met en évidence le pourcentage de viabilité des cellules Caco2 en fonction de différentes concentrations d'acide férulique, de férulate d'éthyle et des produits

d'oxydation. D'après les résultats, nous avons constaté que les produits d'oxydation et les molécules originales ont présenté un faible effet cytotoxique vis-à-vis des cellules Caco2 même à la concentration la plus élevée (200 µg/mL). De plus, le férulate d'éthyle et ses produits d'oxydation ont montré un effet cytotoxique un peu plus élevé que celui de l'acide férulique probablement lié à la lipophilie plus élevée du férulate d'éthyle par rapport à l'acide férulique.

Tableau 17 : pourcentage de viabilité des cellules Caco2 en fonction de différentes concentrations d'acide férulique, de férulate d'éthyle et de leurs produits d'oxydation

Viabilité %	AF	P (AF)	FE	P(FE)
50 (µg/mL)	96,2 ± 2,4	94,5 ± 1,8	91,1 ± 1,9	94,9 ± 1,1
100 (µg/mL)	92,9 ± 1,7	91,8 ± 2,1	88,4 ± 1,3	90,3 ± 1,4
150 (µg/mL)	89,1 ± 1,2	88,2 ± 1,5	83,9 ± 1,8	82,9 ± 1,9
200 (µg/mL)	85,3 ± 1,9	84,5 ± 1,1	77,9 ± 1,6	79,7 ± 2,2

En conclusion, les résultats obtenus ont montré que les cellules Caco2 sont plus résistantes que les cellules HUVEC aux composés phénoliques et à leurs dérivés oxydés. De plus, ces résultats *in vitro* confirment la faible toxicité ou la toxicité négligeable pour des concentrations inférieures à 150 µg/mL des molécules testées notamment des produits d'oxydation. Ces molécules n'ont pas présenté d'activité anticancéreuse significative vis-à-vis des cellules Caco2 et n'apparaissent donc pas comme des molécules candidates pour des applications dans le traitement du cancer.

Peu d'études sont rapportées dans la littérature sur l'activité anticancéreuse ou antiproliférative de l'acide férulique vis-à-vis de cellules Caco2. Des auteurs ont montré que l'acide férulique pourrait avoir des effets protecteurs contre le cancer du côlon à des concentrations supérieures à 500 µg/mL (Janicke *et al.*, 2005). Par contre, d'autres études ont montré que l'acide férulique entre 25 et 75 µM *in vitro* ne présentait aucun effet antiprolifératif vis-à-vis de trois lignées cellulaires du cancer du sein (MCF-7, MDA-MB-231 et HS578T) (Serafim *et al.*, 2011).

I.4.1.3. Influence des phénols sur le type de mortalité cellulaire

L'influence des phénols et de leurs produits d'oxydation (à la concentration la plus élevée étudiée, 200 µg/mL) sur le type de mortalité cellulaire des cellules HUVEC et Caco2, a été également étudiée. Pour cela, des analyses ont été réalisées par cytométrie en flux (Guava Easycyte®) en présence du réactif Nexin®. Ce réactif contient de l'annexine V liée à la phycoérythrine (Annexin V-PE), et du 7-amino actinomycine D (7-AAD). L'annexine V se lie à la phosphatidyl-sérine (PS), un phospholipide de la face interne de la membrane plasmique, transloqué sur la face externe lorsque les cellules entrent en apoptose. Dû à une différence de potentiel de membrane, le 7-AAD ne diffuse pas à travers la membrane plasmique des cellules viables et en apoptose précoce (nécrose), mais pénètre dans les cellules en apoptose tardive ou mortes.

D'après les résultats présentés dans la Figure 45, la plupart de la population des cellules mortes est positionnée dans la partie correspondante à la mortalité apoptotique tardive ou nécrotique. Une concentration de 200 µg/mL de produits d'oxydation de l'acide férulique a engendré près de 10 % de mortalité des cellules Caco2 et près de 60 % de mortalité des cellules HUVEC. De plus, puisque peu de cellules sont présentes dans la partie correspondante à la mortalité apoptotique précoce, nous pouvons supposer que la mortalité est davantage de type nécrotique

Dans la littérature, des travaux ont rapporté que les phénols tels que l'acide gallique et coumarique peuvent inhiber la prolifération et induire la nécrose dans les cellules cancéreuses telles que la lignée cellulaire K562 (Dedoussis *et al.*, 2005). L'acide gallique peut provoquer la mortalité nécrotique dans les cellules normale telles que les cellules HUVEC et la lignée cellulaire cancéreuse HeLa par la perte du potentiel de la membrane mitochondriale (You *et al.*, 2010). L'ester méthylique de l'acide gallique a pu provoquer la mortalité nécrotique des cellules primaires d'hépatocytes de rat (Park *et al.*, 2008). Cet effet est issu de la capacité des phénols à pénétrer à travers la membrane cellulaire et donc alterner la perméabilité.

Cependant, d'autres travaux ont rapporté que les phénols tels que la curcumine peuvent inhiber la prolifération et induire de l'apoptose dans les cellules cancéreuses telles que les

cellules de myélome multiple des os (Aggarwal et Shishodia, 2006 ; Bharti *et al.*, 2003) ou les cellules cancéreuses du sein par l'acide caféique (Kampa *et al.*, 2004) ou les cellules cancéreuses du leucémie par le dérivé d'acide férulique (férulamide) (Chen C. J. *et al.*, 2007). Cet effet est issu de la capacité des phénols de pénétrer à travers la membrane cellulaire et de produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Fabiani *et al.*, 2011).

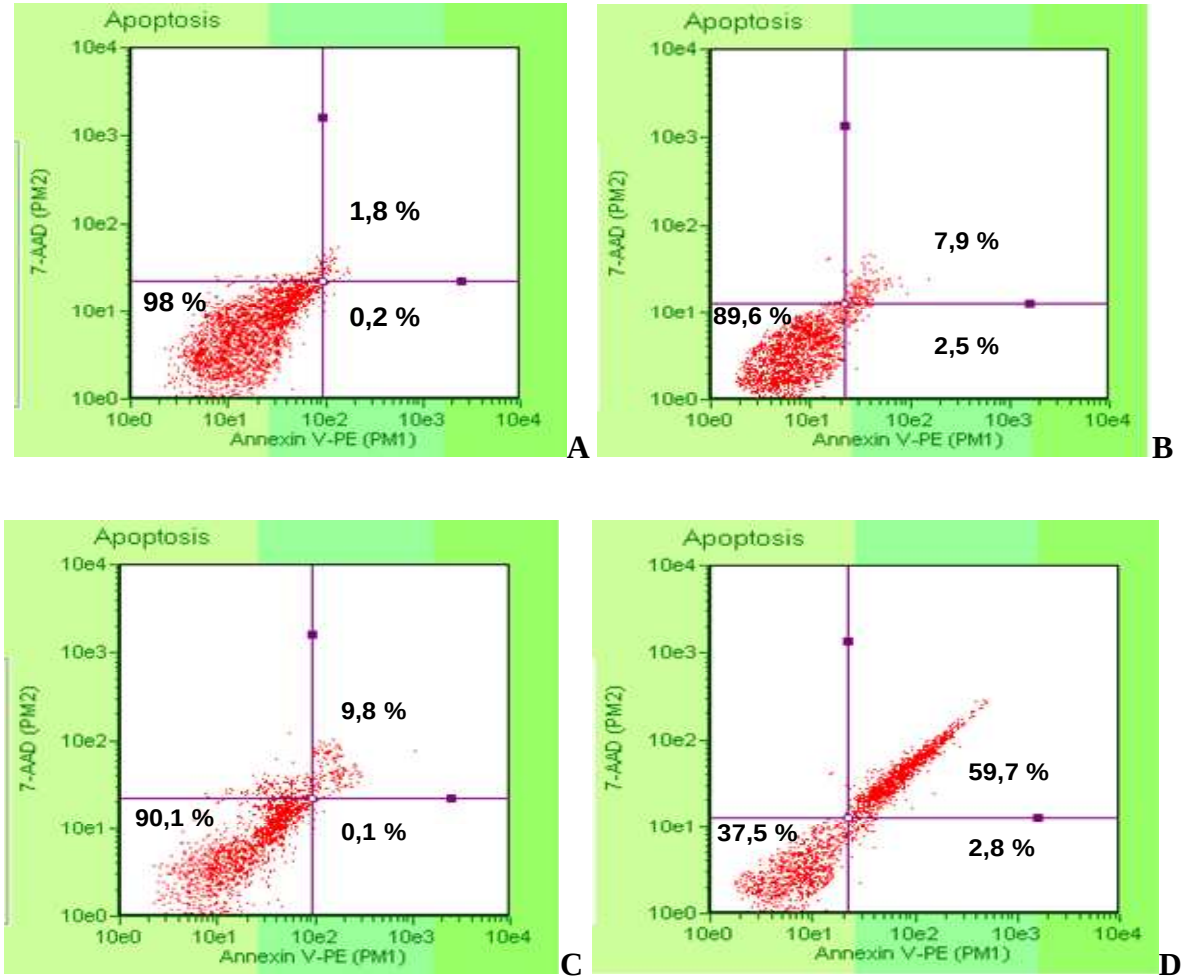


Figure 45 : pourcentage des cellules mortes et vivantes (Caco2 et HUVEC) par cytométrie : sans produits-AF (Caco2-A et HUVEC-B) et avec produits-AF (Caco2-C et HUVEC-D).

Les résultats ont donc montré qu'à une concentration de 200 µM, les produits d'oxydation de l'acide férulique induisaient une mort cellulaire davantage de type nécrotique : il serait intéressant de réaliser des cinétiques avec des concentrations plus faibles de produits

d'oxydation pour vérifier si la voie de mort cellulaire par apoptose ne pourrait pas être empruntée dans des conditions de toxicité moindre.

I.4.2. Propriétés antibactériennes des produits d'oxydation

L'inhibition de la croissance bactérienne par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) des produits d'oxydation a été déterminée. A partir de ces résultats, l'activité potentielle bactéricide ou bactériostatique a été évaluée. Quatre souches bactériennes d'origine alimentaire ont été choisies pour cette étude :

- Deux souches à Gram-négatif : *Escherichia coli* CIP 54.8 (*E. coli*) et *Salmonella enterica* CIP 81.32 (*S. enterica*).
- Deux souches à Gram-positif : *Staphylococcus aureus* CIP 76.25 (*S. aureus*) et *Listeria monocytogenes* CIP 82.110 (*L. monocytogenes*)

I.4.2.1. Inhibition de la croissance bactérienne

Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne sur les souches testées a été mesuré en présence des produits d'oxydation de l'acide férulique ou de ceux du férulate d'éthyle à différentes concentrations. Avant l'essai, l'influence sur la croissance bactérienne de 5 % (v/v) d'éthanol (la concentration maximale dans l'essai) a été vérifié et aucun effet inhibiteur n'a été observé sur aucunes des souches testées.

Comme le montre la Figure 46 qui présente l'inhibition de la croissance des souches bactériennes testées par les composés phénoliques étudiés à des concentrations finales allant de 0,1 à 1 mg/mL, les bactéries à Gram-négatif semblent plus résistantes que les bactéries à Gram-positif. Cette différence de sensibilité est probablement due à des différences dans la structure de l'enveloppe cellulaire entre les bactéries à Gram-négatif et celles à Gram-positif. En effet, les bactéries à Gram-négatif sont caractérisées par une couche mince de peptidoglycane et une membrane externe composée de lipopolysaccharide (LPS) qui n'est pas présente chez les bactéries à Gram-positif typique. La couche (LPS) agit comme une barrière contre la pénétration des composés phénoliques notamment les molécules hydrophobes (Perry

et al., 2009). Dans des travaux précédents, il a été constaté que les bactéries à Gram-positif tel que *S. aureus* sont apparues plus sensibles à l'action des acides phénoliques par rapport à des bactéries à Gram-négatif tel que *E. coli* (Cueva et al., 2010). De plus, les produits d'oxydation ont présenté une activité antibactérienne faible vis-à-vis de souches bactériennes testées car l'inhibition a été inférieure à 50 %.

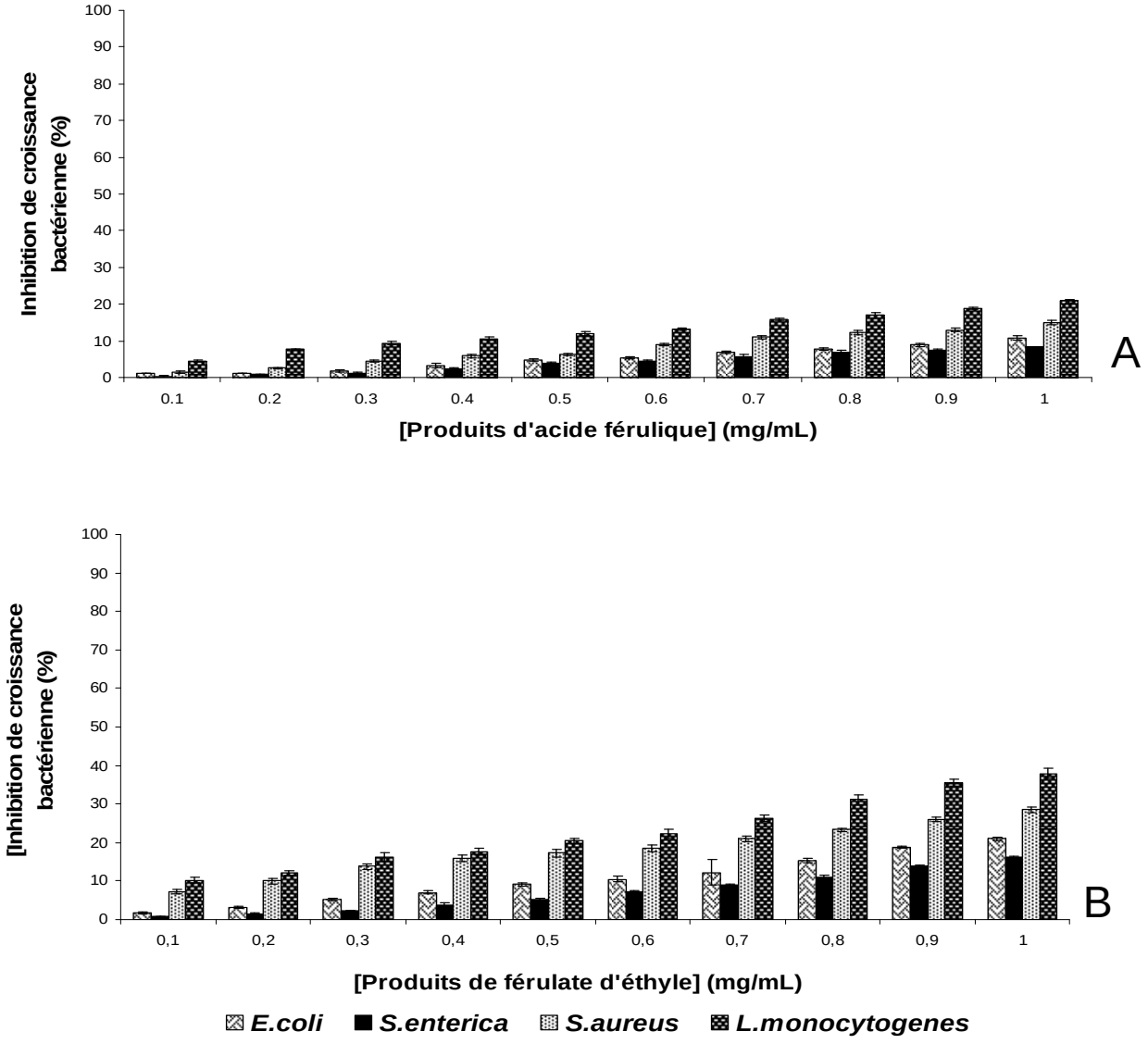


Figure 46 : inhibition de la croissance bactérienne (%) des produits de l'acide férulique (A) et des produits du férulate d'éthyle (B) vis-à-vis des souches bactériennes testées.

I.4.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Les activités bactériostatiques et bactéricides des composés phénoliques ont été étudiées en termes de concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration minimale bactéricide (CMB) contre les souches bactériennes testées (Tableau 18). D'après les valeurs de CMI et de CMB, les produits du férulate d'éthyle présentent une activité antibactérienne plus forte que celle obtenue avec les produits d'oxydation de l'acide férulique et ce pour toutes les souches bactériennes testées. L'activité antibactérienne plus importante des produits de férulate d'éthyle est probablement due à l'activité antibactérienne forte de la molécule initiale (férulate d'éthyle). En effet, il a déjà été montré que le férulate d'éthyle est un agent antibactérien plus efficace que l'acide férulique, ce qui est dû à l'hydrophobie plus élevée du férulate d'éthyle en raison de l'estérification du groupe carboxylique et de sa chaîne alkyle.

Tableau 18 : valeurs de CMI et de CMB (mg/mL) des composés phénoliques testés contre les souches bactériennes testées

		E. coli	*S. enterica*	*S. aureus*	*L. monocytogenes*
Produits d'acide férulique	CMI	>10	>10	7,50 ± 0,50	5,00 ± 0,25
	CMB	>10	>10	8,00 ± 0,50	5,50 ± 0,50
Produits de férulate d'éthyle	CMI	5,50 ± 0,25	6.00 ± 0,40	4,50 ± 0,50	2,50 ± 0,25
	CMB	6,00 ± 0,50	7,00 ± 0,50	5,25 ± 0,25	3,50 ± 0,30

Les valeurs sont des moyennes ± écart type (n = 3)

En comparant les concentrations inhibitrices des produits d'oxydation avec celles obtenues avec les molécules originales (l'acide férulique et le férulate d'éthyle), il s'avère que les produits d'oxydation présentent une activité antibactérienne moins importante contre toutes les souches bactériennes testées. En effet, l'oxydation enzymatique et la polymérisation des produits diminuent leur activité antibactérienne en raison de la réduction des substitutions cycliques benzéniques (-OH, -COOH) et de la saturation de la liaison double de la chaîne alkyle (Sanchez-Maldonado *et al.*, 2011). De plus, le procédé de polymérisation augmente la

longueur et la taille des composés phénoliques (degré de polymérisation) ce qui ralentit probablement la pénétration à travers la membrane bactérienne (Ikigai *et al.*, 1993).

I.5. Conclusion

Cette première partie de thèse a permis de développer une procédure verte de biotransformation d'acide férulique et de férulate d'éthyle grâce à la mise en œuvre de la laccase de *Myceliophtora thermophila* en milieu aqueux pour synthétiser de nouvelles molécules. L'activité spécifique de la laccase a été améliorée par une étape d'ultrafiltration à raison de 2,2 fois et une décoloration de 90% de la solution enzymatique a été obtenue grâce à l'élimination des composés phénoliques contaminants. La vitesse de l'oxydation du férulate d'éthyle a été plus rapide que celle mesurée avec l'acide férulique. De plus, cette oxydation a abouti à un produit majoritaire aussi bien pour le férulate d'éthyle avec un produit dimérique présentant une masse molaire de 443 g/mol que pour l'acide férulique avec un produit dimérique présentant une masse molaire de 386 g/mol. Ces néo-molécules synthétisées ont également présenté des propriétés fonctionnelles intéressantes telles que des propriétés optiques (molécules colorées), des activités antioxydantes comparables à celles de l'acide ascorbique et présentant une faible cytotoxicité. Cependant, ces nouvelles molécules possèdent des propriétés antibactériennes plus faibles que celles des molécules originales, probablement liés à la réduction des groupements fonctionnels lesquels sont responsables des activités antibactériennes des composés phénoliques.

Pour la suite de ce travail, il a été envisagé de fixer ces nouvelles molécules sur le chitosane comme support naturel. Les mêmes conditions réactionnelles que celles mises en œuvre lors de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques ont été conservées. L'objectif visé serait de permettre le contrôle de la polymérisation de ces produits d'oxydation par leur greffage sur le chitosane au fur et à mesure de leur synthèse et de bénéficier ainsi de leurs propriétés fonctionnelles telles que l'activité antioxydante et optique, permettant ainsi d'élargir le domaine d'application de ce biopolymère.

Partie II : Fonctionnalisation enzymatique du chitosane

II.1. Fonctionnalisation des particules de chitosane par la laccase de *Myceliophtora thermophila* dans des conditions douces et en milieu aqueux

II.1.1. Introduction

Le chitosane est un polysaccharide non-toxique, biodégradable et biocompatible, facile à obtenir par le traitement alcalin de la chitine et largement employé dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. En fait, parmi ces propriétés intéressantes, il présente de remarquables capacités de fixation des protéines et des composés phénoliques notamment en milieu acide. En revanche, ce polymère présente des inconvénients pour son utilisation telle qu'une activité antioxydante faible, une solubilité faible au pH neutre… Ainsi, afin d'apporter de nouvelles propriétés fonctionnelles intéressantes à ce polymère ou d'améliorer celles existantes, plusieurs travaux se sont orientés vers la fonctionnalisation du chitosane par voie chimique ou enzymatique.

Les procédés enzymatiques jouent un rôle capital dans ces procédés de synthèse « propre » notamment dans le domaine des biotechnologies. La modification enzymatique du chitosane consiste à oxyder par voie enzymatique des composés phénoliques en des produits intermédiaires (quinones, semiquinones) (radicaux libres) catalysés par des enzymes oxydatives comme les tyrosinases, les laccases (polyphénoloxydases, PPO) ou les peroxydases (POD).

Dans cette partie, nous avons étudié le greffage enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique ou du férulate d'éthyle sur le chitosane en poudre sous des conditions douces de température et de pH en milieu aqueux (tampon phosphate, pH 7,5). Cette étude est présentée sous forme d'un article publié dans *Carbohydrate Polymers*. L'acide férulique a été choisi comme un substrat modèle de la laccase de *Myceliophtora thermophila*. Le férulate d'éthyle, quant à lui, a été choisi pour étudier l'influence de la présence du groupement carboxylique (-COOH) sur le procédé enzymatique et les produits d'oxydation obtenus. De plus, nous avons fonctionnalisé le chitosane en poudre afin d'obtenir uniquement des liaisons

covalentes stables entre les groupements amines libres non-protonés (NH_2) à pH 7,5 (chitosane insoluble) et les produits d'oxydation et d'éviter les liaisons électrostatiques entre les groupements amines libres protonés (NH_2^{+3}) (chitosane soluble) et les produits d'oxydation.

Dans un premier temps, nous avons purifié le chitosane pour éliminer toutes les impuretés et donc obtenir un polymère homogène, lequel a été caractérisé par rapport à sa masse molaire, la taille des particules, le degré d'acétylation et la concentration des groupements amines libres.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence de la présence du chitosane dans le milieu réactionnel sur la cinétique d'oxydation des substrats phénolique et ainsi sur la stabilité de l'enzyme. En effet, le chitosane agit par adsorption des polyphénoloxydases ou des substrats phénoliques, ou par blocage des premiers intermédiaires quinoniques grâce à des réactions d'additions. Par ailleurs, nous avons étudié le mécanisme du greffage des produis d'oxydation sur le chitosane (le type de liaison, la position de greffage). De plus, nous avons étudié les propriétés fonctionnelles des chitosanes fonctionnalisés telles que la stabilité de la couleur, les propriétés antioxydantes et quelques propriétés physico-chimiques telles que le pourcentage des groupements amines libres et la mobilité électrophorétique.

II.1.2. Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions

Carbohydrate Polymers 87 (2012) 537–544

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions

Abdulhadi Aljawish[a], Isabelle Chevalot[b], Bernadette Piffaut[a], Corinne Rondeau-Mouro[c,1], Michel Girardin[a], Jordane Jasniewski[a], Joël Scher[a], Lionel Muniglia[a,*]

[a] Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), Nancy-Université, 2 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[b] Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Nancy-Université, 2 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[c] Laboratoire de RMN, Plate-forme Biopolymères Biologie Structurale (BiBS), UR1268 BIA-INRA, Rue de la Géraudière, BP 71627, F-44316 Nantes Cedex 3, France

Abstract

Chitosan particles were functionalized with ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) as substrates using laccase from *Myceliophtora thermophyla* as biocatalyst. The reactions were performed with chitosan particles under an eco-friendly procedure, in a heterogeneous system at 30°C, in phosphate buffer (50 mM, pH 7.5). The FA-chitosan derivative presented an intense yellow-orange color stable while the EF-chitosan derivative was colorless. The spectroscopic analyses indicated that the reaction products bound covalently to the free amino groups of chitosan exhibiting a novel absorbance band in the UV/Vis spectra between 300-350 nm, at C-2 region by the duplication of C-2 signal in the ^{13}C NMR spectrum, *via* Schiff base bond (N=C) exhibiting novel bands in the FT-IR spectrum at 1640 and 1620 cm^{-1}. Additionally, antioxidant capacities of chitosan derivatives showed that the chitosan derivatives presented improved antioxidant properties, especially for FA-chitosan derivative (EC_{50} were 0.52 ± 0.04, 0.20 ± 0.02 mg/ml for $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\cdot+}$ scavenging, respectively).

Keywords: chitosan; enzymatic functionalization; *Myceliophtora thermophyla* laccase; ferulic acid; ethyl ferulate; antioxidant properties.

*Corresponding author. Tel.: +33 383 595904; Fax: +33 383 595772
E-mail address: lionel.muniglia@univ-lorraine.fr (L. Muniglia)

1. Introduction

Chitin is a natural polysaccharide corresponding to the second-most naturally abundant polysaccharide, after cellulose. Chitin is obtained from the shells of crustaceans, the cuticles of insects, the cell walls of the fungi and the yeasts (Mathur & Narang, 1990). Chemically, the polymer skeleton of chitin consists of pyranose rings of β-(1,4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucose (N-acetylglucosamine, GlcNAc).

The most important chitin derivative is chitosan which consists of pyranose cycles of β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucose (N-glucosamine (GlcN) is the repeating unit of chitosan) linked with a glycosidic linkage, obtained mainly by deacetylation under alkaline conditions. Such procedure leads to a random distribution of acetylated/deacetylated units along chitosan chains (Khor & Lim, 2003). As a natural renewable resource, chitosan exhibits unique properties such as biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, and filmogenicity, as it presents some important applications in the biomedical, agriculture, functional food, wastewater purification, food packaging, and cosmetics domains (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008; Ravi Kumar, 2000; Rinaudo, 2006; Rinaudo, 2008). Furthermore, as this polysaccharide exhibits a strong metal ion chelating ability due to its N atoms, it can be used as antioxidant based on metal ion deactivation (Varma, Deshpande & Kennedy, 2004). However, it presents two main limitations to be considered as a practical antioxidant, especially, (i) its poor solubility due to its inter- and intramolecular hydrogen bonds network and (ii) the lack of H-atom donors to serve as a good chain breaking antioxidant. Hence, additional groups which could improve this property must be introduced for the development of a chitosan-based antioxidant. It can be expected that the functionalization of chitosan with quinones may enhance its antioxidant activity, antimicrobial activity and antifungal properties against a range of food microorganisms (Hoff, Liu & Bollag, 1985).

The modification of chitosan by enzyme catalysis has been intensively examined (Chao, Shyu, Lin & Mi, 2004; Chen, Kumar, Harris, Smith & Payne, 2000; Lenhart, Chaubal, Payne & Barbari, 1998; Muzzarelli, Ilari, Xia, Pinotti & Tomasetti, 1994; Sousa, Guebitz & Kokol, 2009; Vachoud, Chen, Payne & Vazquez-Duhalt, 2001; Vartiainen, Ratto, Lantto, Nattinen & Hurme, 2008). Enzymes may offer clean and safe alternatives to current practices using active

starting materials and safe conditions. This enzymatic approach occurs using polyphenol oxidases (PPOs) such as tyrosinases, peroxidases and laccases which convert phenols derivatives into quinines. These radicals are active species which can either condense with each other or react with nucleophilic function, such as the amino groups of chitosan. Although, the mechanism of the non-enzymatic reaction step is still poorly understood, experimental evidence appears to support the hypothesis that quinones can undergo (at least) two different types of reaction with amines to yield either Schiff-bases or Michael-type adducts, as well as oligomer-forming reactions with other quinones can be experimentally demonstrated (Kumar, Bristow, Smith & Payne, 2000; Kumar, Smith & Payne, 1999). By this way, chitosan can be enzymatically modified to create derivatives with a range of functional properties.

In general, functional properties are obtained by the association of this amino-polysaccharide with other biomacromolecules, as proteins (Babiker, 2002) or, more often, by the grafting of smaller molecules. For instance, Yamada, Chen, Kumar, Vesnovsky, Timmie Topoleski and Payne (2000) have successfully investigated the tyrosinase-catalyzed oxidation of 3,4-dihydroxyphenethylamine (dopamine) in the solutions of chitosan, producing gels with enhanced water-resistant adhesive properties. Similarly, Kumar, Smith and Payne (1999) reported an improvement of the chitosan solubility, obtained by the tyrosinase-catalyzed grafting of chlorogenic acid onto the chitosan. In an other work, these authors showed that the reaction of chitosan with *p*-cresol, and using tyrosinase as biocatalyst, led to significantly enhance the ability of the chitosan to form high viscous solutions which can be converted into biodegradable gels (Kumar, Bristow, Smith & Payne, 2000). With the same enzyme, Chen, Kumar, Harris, Smith and Payne (2000) studied the oxidation of the hexyloxyphenol and showed that the quinones bound covalently to the free amino groups of chitosan dissolved in the reaction medium. Recently, Sousa, Guebitz and Kokol (2009) showed the enhancement of antimicrobial and antioxidant properties of functionalized chitosan by the tyrosinase-catalyzed oxidation of flavonoids.

The purpose of this work is to study the mechanism of enzymatic grafting of phenolic compounds onto chitosan and to obtain, by simple and eco-friendly procedure, chitosan derivatives with improved or new functional properties. For this, chitosan solid particles were

directly suspended in an aqueous medium. The ferulic acid (FA) and its ester (ethyl ferulate, FE) were chosen as phenolic substrates with and without carboxylic groups. The *Myceliophthora thermophyla* laccase was utilized as biocatalyst which is able to oxidize ortho- and para-diphenols, methoxy-phenols, aromatic amines and monophenols (Karamyshev, Shleev, Koroleva, Yaropolov & Sakharov, 2003), as ferulic acid and it is active in aqueous medium, at room temperature and neutral pH (Mayer & Staples, 2002; Minussi, Pastore & Duran, 2002).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) (purity about 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (France). HCl 37% and ferric chloride ($FeCl_3;6H_2O$) were obtained from Merk (Germany), acetic acid and potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] were purchased from Prolabo (France). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethlyl-benzthiazoline-6-sulfonic) acid (ABTS), tetrafluoroacetic acid (TFA) and Chitosan HMW (high molecular weight, M_w 310-375 kDa) were purchased from Sigma-Aldrich (France); syringaldazine, trichloroacetic acid (TCA) from Fluka (France). Acetone, methanol, ethanol and acetonitrile were obtained from Carlo Erba (Milwaukee, WI, USA).

An industrial laccase named Suberase® (Novozymes, Bargsvaerdt, Denmark) was used in this study for the modification of chitosan particles. The Suberase® is a fungal laccase from *Myceliophthora thermophyla* produced by submerged fermentation of modified *Aspergillus orizae* strain. Laccase was partially purified by the ultrafiltration device with a cell Amicon-8200 (20 ml) equipped with a membrane of cellulose acetate (cut off 10 kDa) (SARTORIUS - 14539-63-G) under nitrogen.

2.2. Purification and characterization of the chitosan

To remove insoluble impurities from the chitosan and to obtain a homogeneous chitosan, a solution (1%, w/v) was prepared by dissolving chitosan powder in acetic acid (1%, v/v) and stirred overnight at 25°C then filtered (0.22 µm) under vacuum. The filtrate was

neutralized with a solution NaOH (1N) at pH8. The obtained precipitate was thoroughly washed with distilled water then dried by lyophilisation. Later on, the dried chitosan was milled, mixed, packed in plastic bags and stored at 4°C in cold room until needed.

The acetylation degree of chitosan (DA %) was determined by UV spectrophotometric method (Liu, Wei, Yao & Jiang, 2006) and infrared spectroscopy method (Brugnerotto, Lizardi, Goycoolea, Argüelles-Monal, Desbrières & Rinaudo, 2001). The particle size average of chitosan was determined using the static light scattering (Mastersizer S, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) with a 5 mW He–Ne laser operating at a wavelength of 632.8 nm with a 300RF lens. All measurements were carried out at least in triplicate.

- The molar mass average of chitosan monomer was measured using the equation (1):

$$M = M_d \,.\, DD + M_a.\, DA \qquad (1)$$

where M_d is the molar mass average of deacetylated monomer (161 $g.mol^{-1}$), M_a is the molar mass average of acetylated monomer (203 $g.mol^{-1}$), DD the deacetylation degree and DA the acetylation degree.

- The concentration of free amino groups from chitosan was measured using the equation (2):

$$[-NH_2]\ mol.L^{-1} = Cp.\, DD / (100.M) \qquad (2)$$

where M is the molar mass average of chitosan monomer and Cp the chitosan rate in KBr (1% w/w) corresponding to infrared spectroscopy method.

2.3. Enzymatic oxidation of FA, EF and their grafting onto the chitosan

To evaluate the ability of chitosan particles to graft the products from laccase-catalyzed oxidation of FA or EF in an aqueous medium, the reactions were carried out at 30°C in a magnetic stirred reactor under atmospheric conditions. In these experimental conditions, the dissolved oxygen was not limited for the reaction. Two reactions, with (I) and without (II) chitosan, were performed: for the reaction (I) 5 ml of methanol solution of 50 mM FA or EF, 45 ml of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and 1g of chitosan particles were mixed in the

beaker. For the reaction (II) chitosan was not added, but the reaction medium was the same. The reactions were started by adding 0,13 ml of Suberase® (13.5 U/ml of laccase). Additionally, a control without laccase (III) and another control without substrate (FA or EF) (IV) were performed in the same conditions.

The reaction kinetic was monitored by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using method (Mustafa, Muniglia, Rovel & Girardin, 2005). In order to avoid solid chitosan particles, samples were carefully filtered with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity 0.2 µm) before analysis. Each analysis was made in triplicate.

The enzymatic reaction was stopped after 4 h, by filtering with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity 0.2 µm) the reaction medium under vacuum. Later on, the chitosan recovered was extensively washed with an abundant amount of phosphate buffer pH 7.5, methanol, ethanol and then acetone to remove all traces of substrates and enzymatic proteins on the chitosan derivatives. Besides, this chitosan was chemically treated by HCl/ethanol (50:50) and by KOH/ethanol (50:50) at room temperature to verify the color stability.

2.4. Color measurement of the chitosan and its derivatives

The color of chitosan and its derivatives particles samples was assessed with equal little amounts (1g) using colorimeter (model 200) (Montreuil, France) employing the parameters L*(luminance) a* (redness) and b* (yellowness) defined in the CIELab system (Lathasree, Rao, Sivasankar, Sadasivam & Rengaraj, 2004). The parameters a*, b* and L* were measured directly in triplicate. Color difference (ΔE) was the magnitude of the resultant vector of three component differences: lightness difference (ΔL); red–green chromaticity difference (Δa); and yellow–blue chromaticity difference (Δb). Color differences were calculated using the following equation (3):

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \qquad (3)$$

Where $\Delta a = a_i - a_0$, $\Delta b = b_i - b_0$ and $\Delta L = L_i - L_0$. The index i, indicates the values observed for chitosan derivatives and index 0, indicates the values observed for chitosan (reference).

2.5. Structural characterization of the chitosan and its derivatives

All analyses were performed on the chitosan and its derivatives particles to confirm the products grafting of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF onto the chitosan derivatives particles. For UV/visible spectra using spectrophotometer (Shimadzu UV-1605) scanning 240-600 nm, chitosan samples were dissolved at 0.5% (w/v) in aqueous acetic acid (1%) at pH 3 and then the samples were carefully filtered with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity 0.2 µm). For Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis using a Tensor 27 (Bruker, Germany) with 128 scans, 10 KHz scanning and Spectra of 0-4000 cm^{-1}, samples were previously kept sheltered out from light and dried for 24 h at room temperature in a dessicator. The dried chitosan samples were ground and formed into a KBr pellets containing 1% w/w of chitosan before analysis. NMR experiments were performed on a Bruker AVIII-400 spectrometer operating at a ^{13}C frequency of 100.62 MHz and equipped with a double resonance H/X CP-MAS 4mm probe. The MAS rate was fixed at 9000 Hz and each experiment was recorded at ambient temperature (293 ± 1 K). The cross polarization pulse sequence used a 3.7 µs 90° proton pulse, a contact time of 1 ms at 74 kHz and a 6 s recycle delay for an acquisition time of 34 ms during which a dipolar decoupling of 74 KHz was applied. A typical number of 8192 scans were acquired for each spectrum. Chemical shifts were calibrated by using the peak at 176.03 ppm of glycine as an external standard.

2.6. Estimation of the grafting efficiency

2.6.1. Measurement of the amino groups concentration

To estimate the grafting degree of phenolic compounds onto the chitosan, the concentration of the chitosan free amino groups was measured using the equation (2) according to the infrared spectroscopy method (Brugnerotto, Lizardi, Goycoolea, Argüelles-Monal, Desbrières & Rinaudo, 2001)

The total acylation degree DA_{ct} of chitosan derivatives is the sum of the acetylation degree DA of chitosan and the acylation degree DA_c of acylated part of chitosan derivatives according to equation (4):

$$DA_{ct} \text{ of chitosan derivatives} = DA \text{ of chitosan} + DA_c \text{ of acylated part} \quad (4)$$

where DA_c of acylated part is determined by the difference between DA of chitosan and chitosan derivatives by infrared spectroscopy method by the following equation (5).

$$DA_c = DA \text{ of chitosan} - DA \text{ of chitosan derivatives} \quad (5)$$

Additionally, the molar mass average of chitosan derivatives monomer (M_m) is the sum of the molar mass average of chitosan monomer (M_d. DD + M_a. DA) and of the molar mass average of acylated part (M_c. DA_c) following equation (6):

$$M_m = M_d . DD + M_a . DA + M_c . DA_c \quad (6)$$

where M_d is the molar mass average of chitosan deacetylated monomer (161 $g.mol^{-1}$) and M_a is the molar mass average of chitosan acetylated monomer (203 $g.mol^{-1}$).

In this work, it was supported that the products of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF grafted onto the chitosan were of dimer type. Thus, the molar mass average of AF-chitosan derivative acylated dimer M_c is: $M_a + M_{AF} = 161 + 339 = 500$ $g.mol^{-1}$ while for M_c of FE-chitosan derivative acylated dimer is: $M_a + M_{FE} = 161 + 442 = 604$ $g.mol^{-1}$. Where M_{AF} is molar mass of colored ferulic acid dimer (Mustafa, Muniglia, Rovel & Girardin, 2005) and M_{FE} is molar mass of colorless ethyl ferulate dimer (Ralph, Quideau, Grabber & Hatfield, 1994)

2.6.2. Measurement of the electrophoretic mobility

Electro-kinetic property such as electrophoretic mobility was measured to determine the grafting efficiency. For measurement of electrophoretic mobility (µm.cm/V.s), chitosan samples were dissolved to reach a concentration of 2 mg/ml in aqueous acetic acid (1% v/v) at pH 3 and then carefully filtered with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity 0.2 µm) before analysis. All measurements of electrophoretic mobility of these solutions were performed at 25 ± 0.1°C using Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, England) equipped with a green laser 532 nm (Type: frequency doubled DPSS). Each measurement was repeated three times and the electrophoretic mobility average was recorded.

2.7. In vitro antioxidant properties of the chitosan and its derivatives

2.7.1. DPPH free radical scavenging activity

Each chitosan sample (0-1.5 mg/ml) in 1% (v/v) aqueous acetic acid (200 µl) was mixed with 1800 µl of methanolic solution containing $DPPH^{\bullet}$ radicals resulting in a final concentration of 6.10^{-5} M $DPPH^{\bullet}$. The mixture was shaken vigorously for 15 s and then left to stand in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance (Abs) of the resulting solution was measured at 517 nm using a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1605) against a blank without chitosan according to the method of Shimada, Fujikawa, Yahara and Nakamura (1992). The scavenging ability was calculated by the following equation (7):

$$DPPH^{\bullet}\ \text{Scavenging ability (\%)} = (1 - Abs_{sample}/Abs_{control})\ x100 \qquad (7)$$

The EC_{50} value, which expressed the antioxidant concentration to reduce the radicals by 50%, was a good indicator to quantify the antioxidant capacity. Each value represents the average ± standard deviation of three independent experiments.

2.7.2. ABTS radical cation decolorization assay

The spectrophotometric analysis of $ABTS^{\cdot+}$ radical scavenging activity was determined according to the method of Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang and Rice-Evans (1999). Chitosan (50-1000 µg/ml in 1% (v/v) aqueous acetic acid solution) was mixed with 1 ml of $ABTS^{\cdot+}$ solution which was produced by the reaction between 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate. After 30 min in the dark, the absorbance of $ABTS^{\cdot+}$ was measured at 734 nm and the scavenging capability was calculated using Eq. (7).

In this study, $ABTS^{\cdot+}$ radical scavenging activity was determined by the calculation of EC_{50} value, which expresses the antioxidant concentration to reduce the $ABTS^{\cdot+}$ radicals by 50%. Values were the average ± standard deviation of three independent experiments.

2.7.3. Measurement of reducing power

The reducing power was determined according to the method of Oyaizu (1986). Chitosan (0–5 mg/ml in 1% (v/v) aqueous acetic acid solution) was added to 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) and 1% (w/v) solution of potassium ferricyanide. After incubation at 50°C for 20 min, 10% (w/v) trichloroacetic acid solution was added. Following this, the mixture was centrifuged at 10,000g for 10 min and the supernatant was then combined with distilled water and 0.1% (w/v) solution of ferric chloride. Results were expressed as content of chitosan sample (mg/ml) in function of absorbance at 700 nm. Values were the average ± standard deviation of three independent experiments.

3. Results and discussion

3.1. Purification and characterization of the chitosan

The characterization of the purified chitosan gave a deacetylation degree of 83±1 %, a particule size average of 220±2 μm, a molar mass average of monomer of 159.8±7.0 $g.mol^{-1}$ and a concentration of free amino groups of 0.050±0.002 $mol.L^{-1}$.

3.2. Enzymatic oxidation of FA, EF and their grafting onto the chitosan

The laccase-catalyzed oxidation of FA or EF in the presence or absence of chitosan was studied and similar results were obtained as shown in Fig. 1. These results suggested that the presence of chitosan did not significantly interfere with the oxidative rate of FA or EF by laccase. As laccase remained active after 4 h of reaction in comparison with the reaction in the absence of chitosan (data not shown), it appeared that chitosan could protect the enzyme from inhibition during the oxidation of FA or EF. These authors demonstrated that the stability of laccase is presumably due to the rapid adsorption of the reactive quinones onto chitosan. In contrast, these results appeared to be different from those reported by other authors (Sun, 1992; Wada, Ichikawa & Tatsumi, 1993) who shows that the rate of reaction of several substrates including phenol were accelerated in the presence of chitosan. Moreover, as shown in Fig. 1, if the laccase was not added to the system, the initial concentration of FA or EF decreased for about 7.5-8% for 1g of chitosan addition and this percentage increased with an

increasing quantity of chitosan. This result indicated that physicochemical interactions between FA or EF and the chitosan particles probably occured. This phenomenon is in good agreement with the results reported by other authors (Sousa, Guebitz & Kokol, 2009) who found physicochemical interactions between chitosan particles and flavonoids in the presence of tyrosinase. Additionally, Murata, Nagaki, Kofuji and Kishi (2010) reported that the electrostatic complex between chitosan and FA formed during the preparation of chitosan-FA salt in a suspension of deionized water.

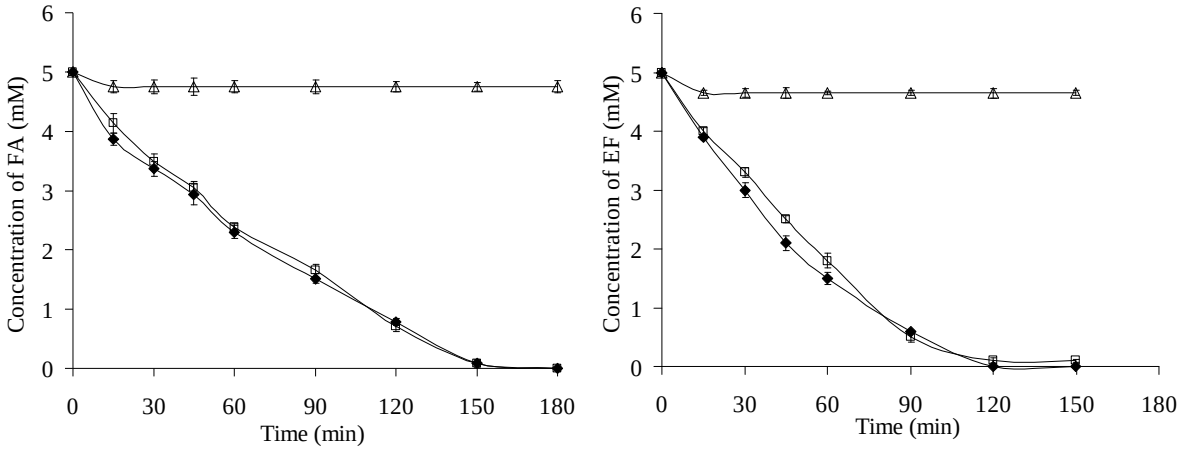


Fig. 1: FA or EF concentration in phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) containing FA or EF+ chitosan + laccase (□), FA or EF+ laccase without chitosan (♦), FA or EF+ chitosan without laccase (control) (Δ) at 30°C. Results from triplicate experiments.

Additionally, it was measured that laccase was adsorbed physically onto the chitosan particles for about 11% at neutral pH. The adsorbed enzyme was not active in these conditions probably due to a reduced accessibility of the active site or the denaturation of the enzymatic structure as already reported by other authors (Berger, Reist, Mayer, Felt, Peppas & Gurny, 2004; Carunchio, Crescenzi, Girelli, Messina & Tarola, 2001; Delanoy, Li & Yu, 2005) .

Moreover, the FA-chitosan derivative color was gradually modified towards yellow-orange while the EF-chitosan derivative remained colorless. Thus, it indicated that chitosan stabilized the colored and the colorless products formed in the initial steps of the substrate

oxidation according to the results of Sousa, Guebitz and Kokol (2009) who obtained a colored chitosan by grafting of products from tyrosinase-catalysed oxidation of flavonoids.

After 4 h, the chitosan derivatives was recovered and washed with different solvents. Besides, FA-colored chitosan derivative has been chemically treated by HCl/ethanol and by KOH/ethanol at room temperature. In both cases, colored chitosan preserved its visual color after the neutralization to pH 7.5. These observations suggested that the links between FA or EF products and the chitosan were of covalent nature. To confirm this hypothesis, UV/visible, FT-IR and ^{13}C-NMR analyses of the chitosan derivatives were performed.

3.3. Color measurement of the chitosan and its derivatives

The values obtained for color parameters (a*, b* and L*) and ΔE values of chitosan particles were shown in Table 1. The values of color parameters (a*, b* and L*) of AF-chitosan derivative were significantly different (ΔE = 44.36) when compared with those of chitosan. Indeed, with the products grafting of laccase-catalyzed oxidation of FA onto the chitosan, redness and yellowness increased and lightness decreased leading to a colored chitosan derivative (yellow-orange). On the other hand, the color parameters of chitosan and EF-chitosan derivative were very similar and color difference ΔE was not significant as shown in Table 1. Therefore, EF-chitosan derivative remained colorless.

Table 1: Color parameters (a*, b* and L*) and color difference (ΔE) of chitosan and its derivatives particles.

	L* (lightness)	a* (redness)	b* (yellowness)	ΔE (Color difference)
Chitosan	89.2 ± 0.10	0.1 ± 0.04	7.7 ± 0.14	0
FA-chitosan derivative	60.5 ± 0.30	21.5 ± 0.10	33.9 ± 0.41	44.4 ± 1.60
EF-chitosan derivative	85.2 ± 0.15	0.3 ± 0.02	8.2 ± 0.12	4.7 ± 0.20

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n =3).

3.4. Structural characterization of the chitosan and its derivatives

The aim of these chemical analyses was to provide chemical evidence that the products of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF reacted with chitosan amino groups and then to identify specific linkage.

For the chitosan derivatives solution, significant changes in the UV/Vis spectra were observed (Fig. 2). A large increase of the absorbance between 300 - 350 nm was observed probably due to a reaction between the products of laccase-catalyzed oxidation and free amino groups of chitosan (Muzzarelli, Littarru, Muzzarelli & Tosi, 2003; Nithianandam & Erhan, 1998; Ravi Kumar, 2000). Moreover, the large increase in the absorbance at 280 nm was probably caused by physically partial adsorption of laccase onto chitosan. Additionally, as presented in Fig. 2, the FA-chitosan derivative absorbed in the visible-region (colored chitosan) while the EF-chitosan derivative did not show any absorbance in this region (colorless chitosan). Thus, these results suggested that products synthesized by laccase-catalyzed oxidation of FA or EF could be covalently grafted onto the chitosan derivatives.

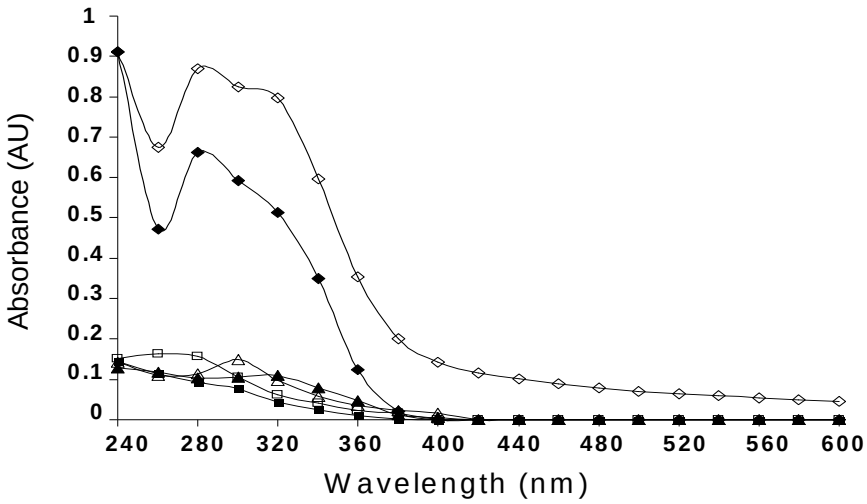


Fig. 2: UV/ visible spectra for chitosan (■), chitosan control with laccase (□), chitosan control with FA (▲), chitosan control with EF (Δ), FA-chitosan derivative (◊), EF-chitosan derivative (♦), and after washing with different solvents, chitosan samples were dissolved at 0.5% (w/v) in aqueous acetic acid 1% (pH 3) and then filtrated prior to measuring the spectra.

The second approach to characterize the products grafting of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF consisted in the measurement of FT-IR spectra of the chitosan derivatives discussed above. The figure 3 showed that when compared with the chitosan, the chitosan derivatives presented an absorption decrease at 1320 and 1380 cm^{-1} (attributed to the NH-bending of the glucosamine unit) (Sousa, Guebitz & Kokol, 2009), and at 1420 cm^{-1} (the symetric-NH_3^+ bending region) (Muzzarelli, Tanfani, Emanuelli & Mariotti, 1982) which may be associated with protonated glucosamine residues of chitosan. The decrease of these bands indicated a loss of -NH_3^+ groups that was consistent with a covalent reaction between the products of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF and the chitosan amino groups. In addition, the formation of a new band at 1465 cm^{-1} can be attributed to a phenyl group of phenolic compounds (Muzzarelli & Ilari, 1994). Thus, the changes observed at the 1000-1500 cm^{-1} region can be attributed to the aromatic C-O and aliphatic C-O bond stretching of FA or EF according to results reported by Soto, Freer and Baeza (2005) for chitosan glyoxylate. Moreover, in the FT-IR spectra of chitosan derivatives, new bands appeared at 1620 and 1640 cm^{-1} corresponding to the C=N vibrations that was characteristic of imines and C=C stretching vibrations due to Schiff base formed between the amino groups NH_3^+ of chitosan pyranose cycle with the phenolic moieties. This result was in good agreement to results obtained by Jin, Wang and Bai (2009) who confirmed that strong bands at 1620 and 1640 cm^{-1} may correspond to Schiff base bond between amino groups of chitosan with citral. These modifications in the spectra suggested that chitosan amino groups were subjected to covalent modifications of Schiff base type by the products of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF.

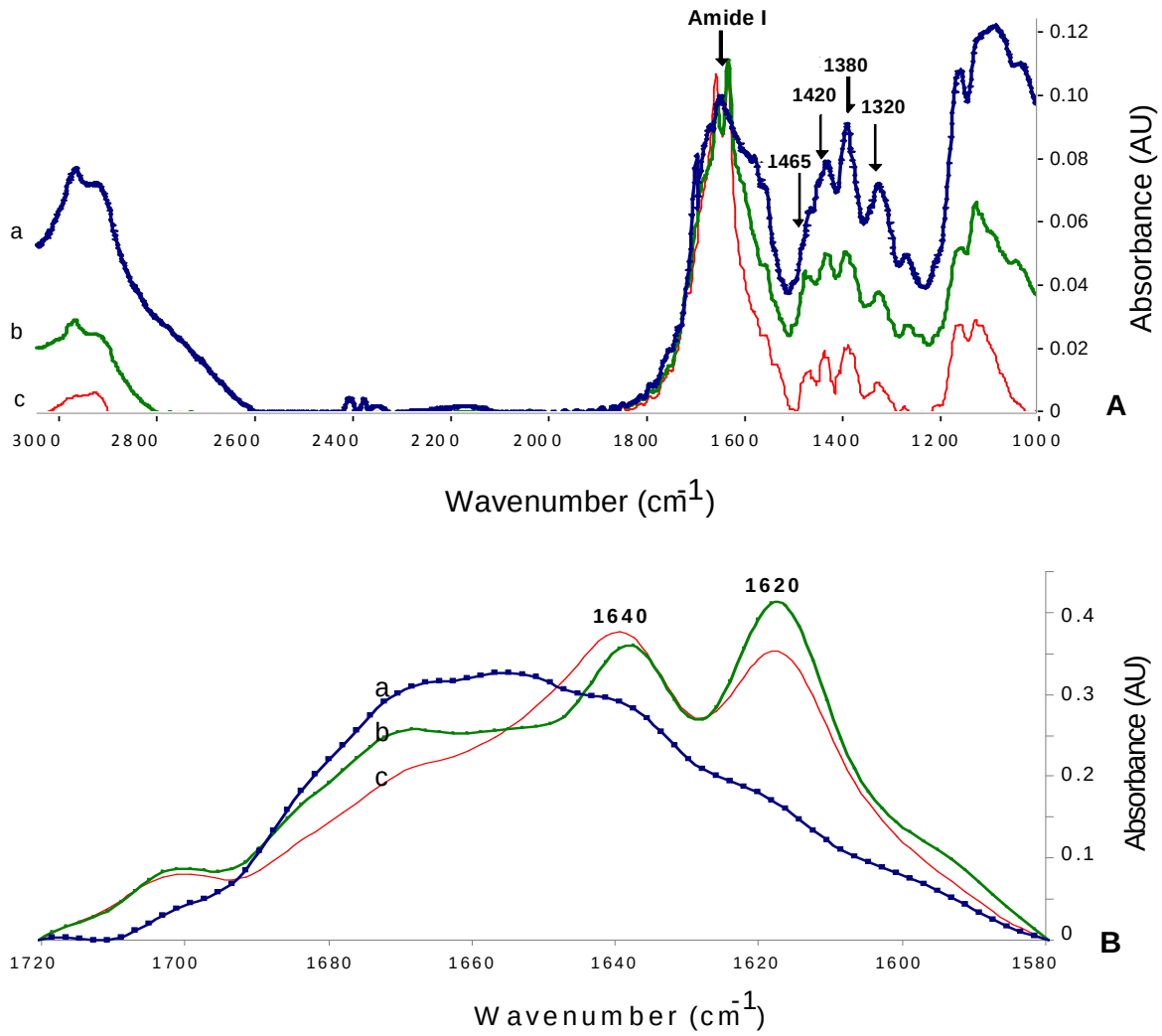


Fig. 3: FT-IR spectra (**A**) and amide I band (**B**) of chitosan (a), EF-chitosan derivative (b) and FA-chitosan derivative (c).

Further characterization of chitosan derivatives was performed using Solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance (^{13}C NMR). The ^{13}C NMR spectrum of chitosan and chitosan derivatives were shown in Fig. 4(A). Characteristic signals from oligosaccharides were observed between 45 and 120 ppm with additional peaks corresponding to aliphatic carbons around 23 ppm and carbonyl carbons in the 170-180 ppm region. Signal centered at 164.6 ppm was tentatively assigned to a rotation band.

The large signals centered at 58, 74.6, 82.8 and 104.8 ppm were assigned to C-2 and C-6, C-3 and C-5, C-4 and C-1 carbons respectively according to previous studies (Huang, Mendis, Rajapakse & Kim, 2006; Saitô, Tabeta & Ogawa, 1987). The methyl and carbonyl functions of acetylglucosamine were represented by C-7 and C-8 carbons around 174 ppm (C=O) and 23 ppm (CH3) respectively. Additional peaks were observed in the spectrum of FA and EF chitosan derivatives, especially the signal at 66.2 ppm may be attributed to the CH2 of ethyl group, signals at 28 and 30.62 ppm were characteristic of unshielded CH2 groups or OCH3 while the signal at 19.56 ppm may correspond to a methyl of EF. These additional peaks clearly indicated that the products of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF were grafted onto chitosan. In order to improve the spectral resolution and to distinguish the signals of C-2 and C-6, the hydration of the chitosan samples was performed using a saturated salt solution of NaCl. In general, conditioning of chitosan samples in this condition permitted to hydrate samples with 15% of water (w/w) (Gocho, Shimizu, Tanioka, Chou & Nakajima, 2000).

Fig. 4 shows the resulting ^{13}C NMR spectrum of chitosan and its derivatives. Most notable are the duplication of the C-2 signal around 58 ppm and the deformation of C-4 signal. The multiplicity of C-4 observed in fig. 4 was attributed to different conformations of the glucosidic bond between the anomeric C-1 and C-4 carbon and/or the presence of different polymorphs of chitosan. The duplication of C-2 signal could be attributed to the presence of a new conformation of C-2 due to the phenolic moieties grafting onto the chitosan derivatives. These results suggested that the products of laccase-catalyzed oxidation were grafted onto the chitosan derivatives at position C-2 that was consistent with results reported by other authors (Sampaio, Taddei, Monti, Buchert & Freddi, 2005).

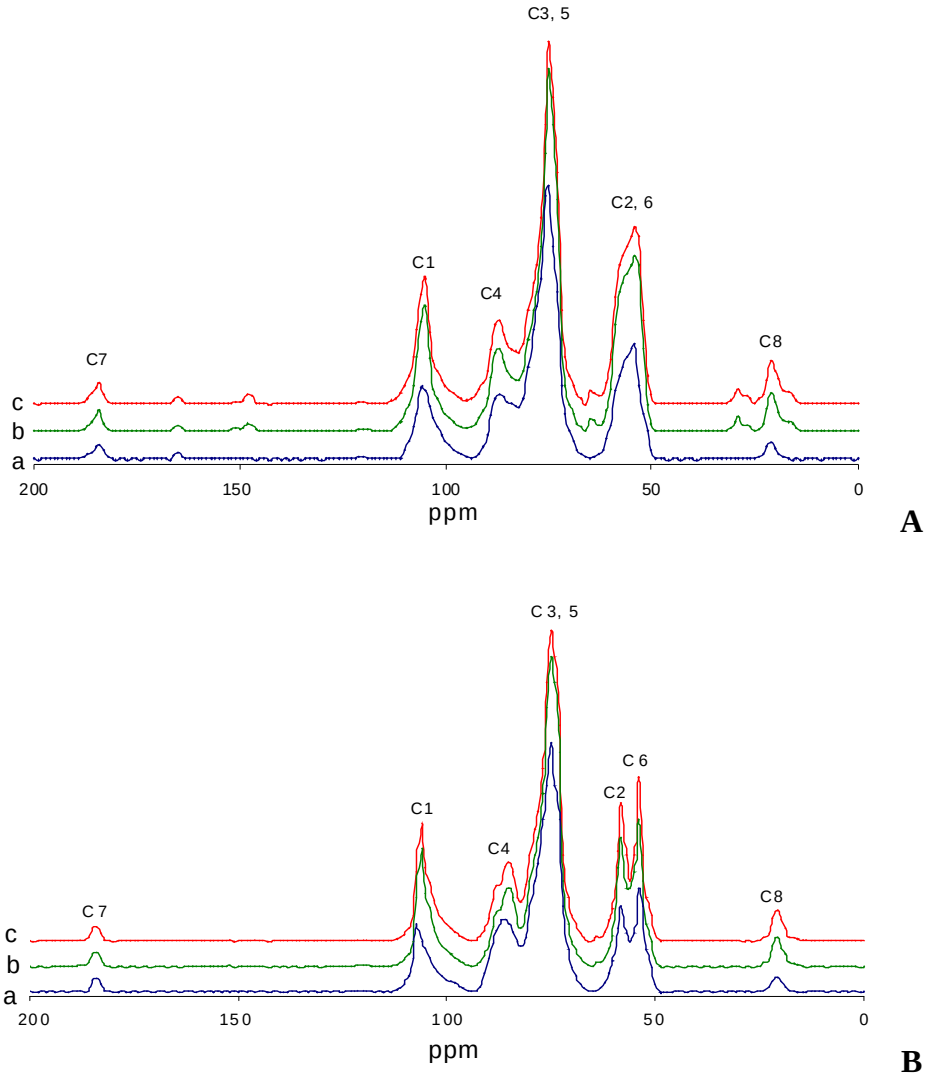


Fig. 4: (**A**) ^{13}C-NMR spectrum of chitosan (a), FA-chitosan derivative (b) and EF-chitosan derivative (c). (**B**) ^{13}C-NMR spectrum of chitosan hydration (a), FA-chitosan derivative hydration (b) and EF-chitosan derivative hydration (c)

3.5. Estimation of the grafting efficiency

3.5.1. Measurement of the amino groups concentration

The values DA_c, DA_m, M_m and percentage of bound NH_2 of chitosan derivatives increased with the products grafting of laccase- catalyzed oxidation of FA or EF onto the chitosan derivatives in comparison with the chitosan were shown in Table 2. Furthermore,

these values of FA-chitosan derivative were higher than EF-chitosan derivative. These results indicated that the quantity of FA-products grafted onto the chitosan was higher than EF-products.

Table 2: Values the acetylation degree (DA), the deacetylation degree (DD) the acylation degree (DA_c) of acylated part, the total acylation degree (DA_{ct}), the molar mass average of chitosan monomer (M_m) and the concentration of free amino groups [$-NH_2$] of chitosan and its derivatives regarding to this work.

	A_{1320}/ A_{1420}	DA%	DA_c%	DA_{ct}	DD%	M_m	[$-NH_2$] mol.L^{-1}
Chitosan	0.95	18	0	18	82	168.6	0.049
EF-chitosan derivative	0.75	11.8	6.2	24.2	75.8	208.6	0.036
FA-chitosan derivative	0.55	5.6	12.4	30.4	69.6	235.7	0.030

3.5.2. Measurement of the electrophoretic mobility

Electrophoretic mobility (EM) measurements were performed at pH 3 at concentration 2 mg/ml in aqueous acetic acid 1% (v/v) in triplicates. The electrophoretic mobility value of chitosan was determined as 6.97 ± 0.07 µm.cm/V.s as chitosan is positively charged due to free amino groups. This value was found to decrease with the products grafting of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF onto the chitosan (5.41 ± 0.10, 6.24 ± 0.12 µm.cm/V.s) respectivity. Additionally, the electrophoretic mobility decrease for FA-chitosan derivative solution was higher than for EF-chitosan derivative solution when compared with the electrophoretic mobility of chitosan. These results suggested that the quantity of FA-products grafted onto the chitosan was higher than EF-products.

3.6. In vitro antioxidant properties of the chitosan and its derivatives

3.6.1. DPPH free radical scavenging activity

The comparative EC_{50} values of chitosan and its derivatives were shown in Table 3. In the case of chitosan, no reduction of $DPPH^{\bullet}$ was observed as reported by other authors (Pasanphan, Buettner & Chirachanchai, 2010; Wu, Tseng & Juang, 2001). This may be partly

due to the inhibition of radical scavenging because of inter- and intramolecular hydrogen bonding. Although, the EC_{50} values in $DPPH^{\bullet}$ scavenging of FA-chitosan derivative and EF-chitosan derivative were determined as 0.52 ± 0.04 mg/ml and 1.50 ± 0.04 mg/ml, respectively. The scavenging activity of FA-chitosan derivative was three times higher than EF-chitosan derivative which can be attributed either to high antioxidant properties of pure FA (Nenadis, Zhang & Tsimidou, 2003) or to high quantity of the products of laccase-catalyzed oxidation of FA grafted onto chitosan when compared with pure EF. Thus, the introduction of an H-atom donating group, which was produced from laccase-catalyzed oxidation of FA or EF onto chitosan, appeared to be a good strategy to develop a chitosan derivative with increased antioxidant capacity leading to an antioxidant polymer.

Table 3: EC_{50} values of chitosan and its derivatives in antioxidant properties

	EC_{50} (mg/ml)		
	chitosan	FA-chitosan derivative	EF-chitosan derivative
Scavenging ability on $DPPH^{\bullet}$	-	0.52 ± 0.04	1.50 ± 0.04
Scavenging ability on $ABTS^{\cdot+}$	-	0.20 ± 0.02	0.66 ± 0.05

EC_{50} value corresponds to the effective concentration necessary at which the antioxidant activity was 50%, EC_{50} values were obtained by interpolation from linear regression analysis. Each value is expressed as mean ± standard deviation (n =3)

3.6.2. ABTS radical cation decolorization assay

The EC_{50} values in scavenging the $ABTS^{\cdot+}$ of the chitosan and its derivatives were also determined (Table 3). In the case of the chitosan, no reduction of $ABTS^{\cdot+}$ was observed and this may be partly due to the inhibition of radical scavenging because of inter- and intra molecular hydrogen links. The EC_{50} values in scavenging the $ABTS^{\cdot+}$ of FA-chitosan derivative and EF-chitosan derivative were 0.20 ± 0.02 mg/ml and 0.66 ± 0.05 mg/ml, respectively. The scavenging activity of FA-chitosan derivative was nearly three times higher than EF-chitosan derivative. Thus, an enhancement of the antioxidant activity in the chitosan derivatives with the products of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF was demonstrated.

3.6.3. Measurement of reducing power

In agreement to previous studies (Kanatt, Chander & Sharma, 2008), Fig. 5 shows that the chitosan presented almost negligible reducing power while it increased with increasing FA or EF-chitosan derivative concentration. Moreover the reducing power of FA-chitosan derivative was higher than EF-chitosan derivative. In general, the reducing properties are associated with the presence of reductones which show to exhibit antioxidant action by breaking the free radical chain by donating a hydrogen atom (Duh, 1998).

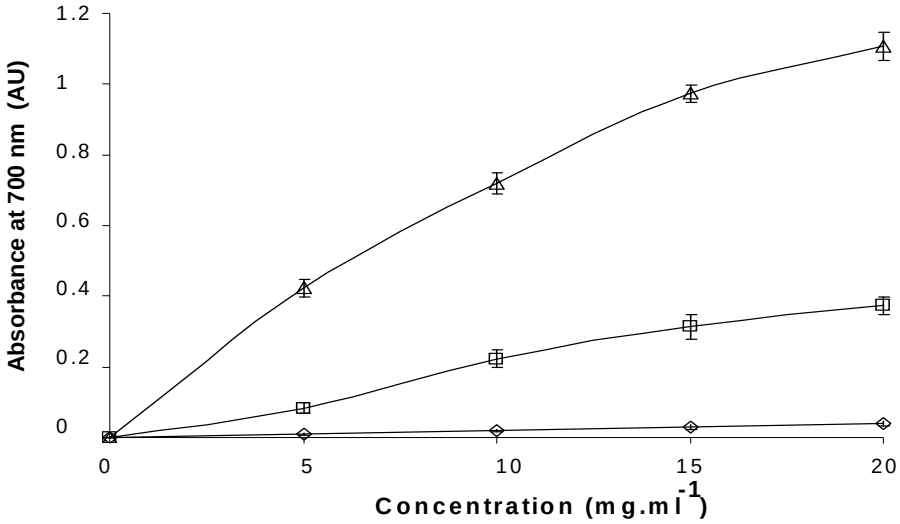


Fig. 5: Reducing activity of FA-chitosan derivative (Δ), EF-chitosan derivative (□) and chitosan (◊). Each value is expressed as mean ± standard deviation (n =3)

With the grafting of the products of laccase-catalyzed oxidation of FA or EF onto chitosan particles, the antioxidant properties were enhanced when compared with chitosan particles. It was observed that these enhancements were dependent on the antioxidant assay of the phenols used as well as on the quantity of the grafted phenols. Thus, the results of DPPH, ABTS radical scavenging activities and those of reducing power suggested that chitosan derivatives could be considered as an efficient antioxidant polymer.

4. Conclusion

In this work, the functionalization of chitosan particles by the oxidative products of FA or EF catalyzed by the *Myceliophtora thermophyla* laccase was investigated. This enzymatic reaction was carried out under mild operational conditions (at 30°C and pH 7.5), with the solid chitosan particles suspended in the reaction medium, without harsh acidic solubilization and without organic solvent.

In summary, the laccase from *Myceliophtora thermophyla* could oxidize FA and EF to reactive radicals and the oxidative rate of EF appeared the highest than that of FA. The presence of chitosan in the reaction medium did not influence the oxidative rate of FA or EF and it could protect the enzyme from inhibition of oxidative products during the oxidation. Additionally, the enzymatic functionalization led to colored and colorless chitosan derivatives with improved functional properties.

This finding hinted that the oxidative products of FA or EF were covalently bound onto the chitosan free $–NH_2$ groups at C-2 region of the chitosan particles by Schiff reaction and the grafting level of AF-oxidation products onto the chitosan was higher than that of EF-oxidation products. Additionally, the chitosan derivatives presented improved antioxidant properties especially for FA-chitosan derivative when compared with chitosan.

These results demonstrated the interests for using renewable resources and biochemical processing to create functional polymers. These innovative molecules present higher value-added properties and could be a model for applications in important biotechnological domains such as active food-packaging and antioxidant additives for foods as well as for cosmetics.

Acknowledgements

We are grateful to C. Paris; engineer ENSAIA-LIBio (Nancy), for providing HPLC analyses and technical assistance. The authors would like also to acknowledge the support of Syrian Ministry of Higher Education and Aleppo-University for financial support.

References

Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology, 43*(4), 726-745.

Babiker, E. E. (2002). Effect of chitosan conjugation on the functional properties and bactericidal activity of gluten peptides. *Food Chemistry, 79*(3), 367-372.

Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 57*(1), 19-34.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer, 42*(8), 3569-3580.

Carunchio, F., Crescenzi, C., Girelli, A. M., Messina, A., & Tarola, A. M. (2001). Oxidation of ferulic acid by laccase: Identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta, 55*(1), 189-200.

Chao, A. C., Shyu, S. S., Lin, Y. C., & Mi, F. L. (2004). Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan - To confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent. *Bioresource Technology, 91*(2), 157-162.

Chen, T., Kumar, G., Harris, M. T., Smith, P. J., & Payne, G. F. (2000). Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties. *Biotechnology and Bioengineering, 70*(5), 564-573.

Delanoy, G., Li, Q., & Yu, J. (2005). Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules, 35*(1-2), 89-95.

Duh, P.-D. (1998). Antioxidant activity of burdock (Arctium lappa Linné): Its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 75*(4), 455-461.

Gocho, H., Shimizu, H., Tanioka, A., Chou, T. J., & Nakajima, T. (2000). Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan. *Carbohydrate Polymers, 41*(1), 87-90.

Hoff, T., Liu, S. Y., & Bollag, J. M. (1985). Transformation of halogen-, alkyl-, and alkoxy-substituted anilines by a laccase of Trametes versicolor. *Applied and Environmental Microbiology, 49*(5), 1040-1045.

Huang, R., Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S.-K. (2006). Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). *Life Sciences, 78*(20), 2399-2408.

Jin, X., Wang, J., & Bai, J. (2009). Synthesis and antimicrobial activity of the Schiff base from chitosan and citral. *Carbohydrate Research, 344*(6), 825-829.

Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry, 107*(2), 845-852.

Karamyshev, A. V., Shleev, S. V., Koroleva, O. V., Yaropolov, A. I., & Sakharov, I. Y. (2003). Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme and Microbial Technology, 33*(5), 556-564.

Khor, E., & Lim, L. Y. (2003). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials, 24*(13), 2339-2349.

Kumar, G., Bristow, J. F., Smith, P. J., & Payne, G. F. (2000). Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer, 41*(6), 2157-2168.

Kumar, G., Smith, P. J., & Payne, G. F. (1999). Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and Bioengineering, 63*(2), 154-165.

Lathasree, S., Rao, A. N., Sivasankar, B., Sadasivam, V., & Rengaraj, K. (2004). Heterogeneous photocatalytic mineralisation of phenols in aqueous solutions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 223*(1-2), 101-105.

Lenhart, J. L., Chaubal, M. V., Payne, G. F., & Barbari, T. A. (1998). Enzymatic Modification of Chitosan by Tyrosinase. *ACS Symposium Series* pp. 188-198).

Liu, D., Wei, Y., Yao, P., & Jiang, L. (2006). Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydrate Research, 341*(6), 782-785.

Mathur, N. K., & Narang, C. K. (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal Of Chemical Education, 67*(11), 938-942.

Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry, 60*(6), 551-565.

Minussi, R. C., Pastore, G. M., & Duran, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology, 13*(6-7), 205-216.

Murata, Y., Nagaki, K., Kofuji, K., & Kishi, T. (2010). Functions of chitosan-ferulic acid salt for prevention of hypertension. *Food Science and Technology Research, 16*(5), 437-442.

Mustafa, R., Muniglia, L., Rovel, B., & Girardin, M. (2005). Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International, 38*(8-9), 995-1000.

Muzzarelli, R. A. A., & Ilari, P. (1994). Chitosans carrying the methoxyphenyl functions typical of lignin. *Carbohydrate Polymers, 23*(3), 155-160.

Muzzarelli, R. A. A., Ilari, P., Xia, W., Pinotti, M., & Tomasetti, M. (1994). Tyrosinase-mediated quinone tanning of chitinous materials. *Carbohydrate Polymers, 24*(4), 295-300.

Muzzarelli, R. A. A., Littarru, G., Muzzarelli, C., & Tosi, G. (2003). Selective reactivity of biochemically relevant quinones towards chitosans. *Carbohydrate Polymers, 53*(1), 109-115.

Muzzarelli, R. A. A., Tanfani, F., Emanuelli, M., & Mariotti, S. (1982). N-(carboxymethylidene)chitosans and N-(carboxymethyl)chitosans: Novel chelating

polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. *Carbohydrate Research, 107*(2), 199-214.

Nenadis, N., Zhang, H. Y., & Tsimidou, M. Z. (2003). Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: Effect of carbon side chain characteristic groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(7), 1874-1879.

Nithianandam, V. S., & Erhan, S. (1998). Quinone-amine polymers: 18 : A novel method for the synthesis of poly(alkyl aminoquinone)s. *Polymer, 39*(17), 4095-4098.

Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition 44*, 307-315.

Pasanphan, W., Buettner, G. R., & Chirachanchai, S. (2010). Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. *Carbohydrate Research, 345*(1), 132-140.

Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. H., & Hatfield, R. D. (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(23), 3485-3498.

Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers, 46*(1), 1-27.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26*(9-10), 1231-1237.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science, 31*(7), 603-632.

Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International, 57*(3), 397-430.

Saitô, H., Tabeta, R., & Ogawa, K. (1987). High-resolution solid-state 13C NMR study of chitosan and its salts with acids: Conformational characterization of polymorphe and helical structures as viewed from the conformation-dependent 13C chemical shifts. *Macromolecules, 20*(10), 2424-2430.

Sampaio, S., Taddei, P., Monti, P., Buchert, J., & Freddi, G. (2005). Enzymatic grafting of chitosan onto Bombyx mori silk fibroin: Kinetic and IR vibrational studies. *Journal of Biotechnology, 116*(1), 21-33.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40*(6), 945-948.

Soto, R., Freer, J., & Baeza, J. (2005). Evidence of chemical reactions between di- and poly-glycidyl ether resins and tannins isolated from Pinus radiata D. Don bark. *Bioresource Technology, 96*(1), 95-101.

Sousa, F., Guebitz, G. M., & Kokol, V. (2009). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. *Process Biochemistry, 44*(7), 749-756.

Sun, W. Q. (1992). Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnology Progress, 8*(3), 179-186.

Vachoud, L., Chen, T., Payne, G. F., & Vazquez-Duhalt, R. (2001). Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzyme and Microbial Technology, 29*(6-7), 380-385.

Varma, A. J., Deshpande, S. V., & Kennedy, J. F. (2004). Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. *Carbohydrate Polymers, 55*(1), 77-93.

Vartiainen, J., Ratto, M., Lantto, R., Nattinen, K., & Hurme, E. (2008). Tyrosinase-catalysed grafting of food-grade gallates to chitosan: Surface properties of novel functional coatings. *Packaging Technology and Science, 21*(6), 317-328.

Wada, S., Ichikawa, H., & Tatsumi, K. (1993). Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering, 42*(7), 854-858.

Wu, F. C., Tseng, R. L., & Juang, R. S. (2001). Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dyes and metal ions on chitosan. *Water Research, 35*(3), 613-618.

Yamada, K., Chen, T., Kumar, G., Vesnovsky, O., Timmie Topoleski, L. D., & Payne, G. F. (2000). Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue. *Biomacromolecules, 1*(2), 252-258.

II.1.3. Contribution de l'article

Cette étude présente une méthode verte permettant la fonctionnalisation d'un polymère issu d'une agro-ressource. Cette méthode enzymatique a permis de modifier le chitosane grâce à la mise en œuvre de la laccase de *Myceliophtora thermophila*, connue pour catalyser l'oxydation de substrats phénoliques en quinones très réactives. Cette réaction enzymatique s'est déroulée dans des conditions expérimentales douces de température (30 °C) et de pH (7,5) en milieu aqueux (tampon phosphate) et sans limitation de la quantité d'oxygène (Mustafa *et al.*, 2005). Le temps de fonctionnalisation a été de 4 h, ce qui est la durée nécessaire pour oxyder totalement le substrat phénolique.

La présence du chitosane dans le milieu réactionnel n'influence pas la cinétique d'oxydation des substrats phénoliques. Il est possible que le chitosane protège la laccase de l'inhibition liée aux radicaux libres dans le milieu réactionnels car ces radicaux réagissent avec le site actif de l'enzyme. Il est important de noter que la laccase s'est adsorbée sur le chitosane pendant la réaction (de l'ordre de 13 %) et qu'une perte de son activité a été observée. De plus, le substrat phénolique s'adsorbe sur le chitosane par des liaisons électrostatiques à raison de 8 %. Cette procédure enzymatique est un moyen de produire de nouvelles molécules colorées ou incolores dépendant du substrat utilisé. Il a été montré que les produits d'oxydation (radicaux libres) ont réagi avec les groupements amines du chitosane provoquant le changement de couleur du chitosane. En effet, après la fonctionnalisation, la couleur du chitosane, mesurée par le système CIELab, était jaune-orangée en présence des produits d'oxydation de l'acide férulique et incolore en présence des produits d'oxydation du férulate d'éthyle (Figure 47).

Figure 47 : couleurs du chitosane natif (A), du chitosane- AF (B) et du chitosane-FE (C)

Lors des essais de mesure de la stabilité de la couleur au traitement chimique (rinçage par HCl/éthanol et KOH/éthanol à la température ambiante) du chitosane fonctionnalisé, il s'est avéré que les produits d'oxydation sont probablement greffés de manière covalente sur le chitosane. Ce greffage a été confirmé par une importante augmentation de l'absorbance dans la région entre 300 et 350 nm du spectre UV-Visible. Le greffage de manière covalente a été confirmé, lors de l'étude par spectroscopie IR, la présence de nouveaux pics dans le spectre de chitosane fonctionnalisé en comparaison avec le spectre du chitosane natif au niveau de la région 1640-1620 cm^{-1} suggère que les liaisons covalentes sont du type base de Schiff. Enfin, ces résultats ont été corrélés avec une approche RMN du solide. En effet, le doublement détecté au niveau du carbone 2 (C_2) du spectre des chitosanes fonctionnalisés confirme que le greffage s'est déroulé sur le chitosane au niveau du C_2.

Le dosage des groupements amines libres, la mesure de la densité de charge de la surface du chitosane et le degré d'acétylation ont permis de montrer que la quantité des produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur le chitosane est quasiment deux fois plus importante que celle obtenue avec le férulate d'éthyle. L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène est que la présence du groupement carboxyle (-COOH) dans la structure chimique de l'acide férulique donne plus de possibilités pour produire de nouvelles molécules en comparaison avec le férulate d'éthyle qui ne contient pas de groupement carboxyle. Par conséquent, le nombre élevé des produits d'oxydation de l'acide férulique amène à une multitudes de possibilité de réaction avec les groupements amines du chitosane entraînant ainsi la formation de nombreux produits différents.

Enfin, la fonctionnalisation enzymatique du chitosane par les produits d'oxydation apporte des propriétés antioxydantes intéressantes aux nouveaux polymères. En effet, le chitosane natif ne possède pas de propriété antioxydante significative en raison du blocage des groupements hydrogène qui donne des électrons. Après la fonctionnalisation, les chitosanes fonctionnalisés présentent des propriétés antioxydantes importantes en comparaison avec celles du chitosane natif. De plus, le chitosane fonctionnalisé par les produits d'oxydation de l'acide férulique présente les propriétés antioxydantes les plus importantes. Ces résultats sont également dus aux quantités greffées sur le chitosane plus importantes pour les produits d'oxydation de l'acide férulique (presque deux fois plus en

comparaison avec les produits du férulate d'éthyle). Ces nouvelles propriétés des chitosanes fonctionnalisés devraient permettre leur utilisation en tant qu'agent antioxydant dans de différents domaines.

Ces résultats démontrent la possibilité d'utiliser des ressources renouvelables couplées à une réaction enzymatique pour fonctionnaliser écologiquement le chitosane et former ainsi un dérivé coloré ou incolore selon le du substrat phénolique utilisé.

II.1.4. Complément de résultats (caractérisation des produits d'oxydation greffés sur les chitosanes fonctionnalisés)

Hydrolyse chimique

L'hydrolyse chimique a été effectuée sur les chitosanes fonctionnalisés. En parallèle, le chitosane natif a subi le même traitement pour l'utiliser comme témoin. Les résultats de l'extraction ont montré que l'extrait du chitosane fonctionnalisé par l'acide férulique est coloré en jaune-orange, alors que l'extrait du chitosane fonctionnalisé par le férulate d'éthyle est faiblement coloré (jaune pâle). L'extrait du chitosane natif était quant à lui incolore (Figure 48).

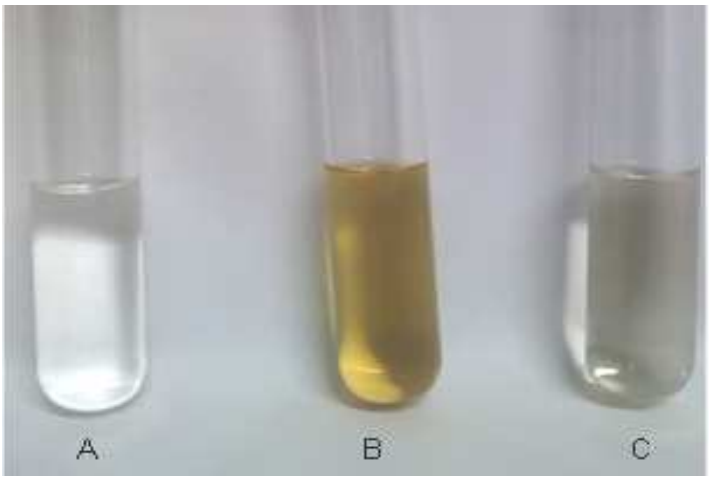


Figure 48 : couleur des extraits des trois types de chitosanes en voie chimique : (A) chitosane natif, (B) chitosane fonctionnalisé par l'acide férulique et (C) chitosane fonctionnalisé par le férulate d'éthyle

Par ailleurs, les extraits des chitosanes ont été analysés par spectroscopie de masse par infusion directe dans l'appareillage CL-SM pour identifier les produits d'oxydation par rapport à leurs masses molaires. Les extraits de chitosanes fonctionnalisés ont présenté plusieurs pics, alors que l'extrait du chitosane natif n'a montré aucun pic (Figure 49). Ces résultats indiquent que les pics des extraits de chitosanes fonctionnalisés correspondaient à plusieurs produits d'oxydation dont l'un parmi eux était majoritaire.

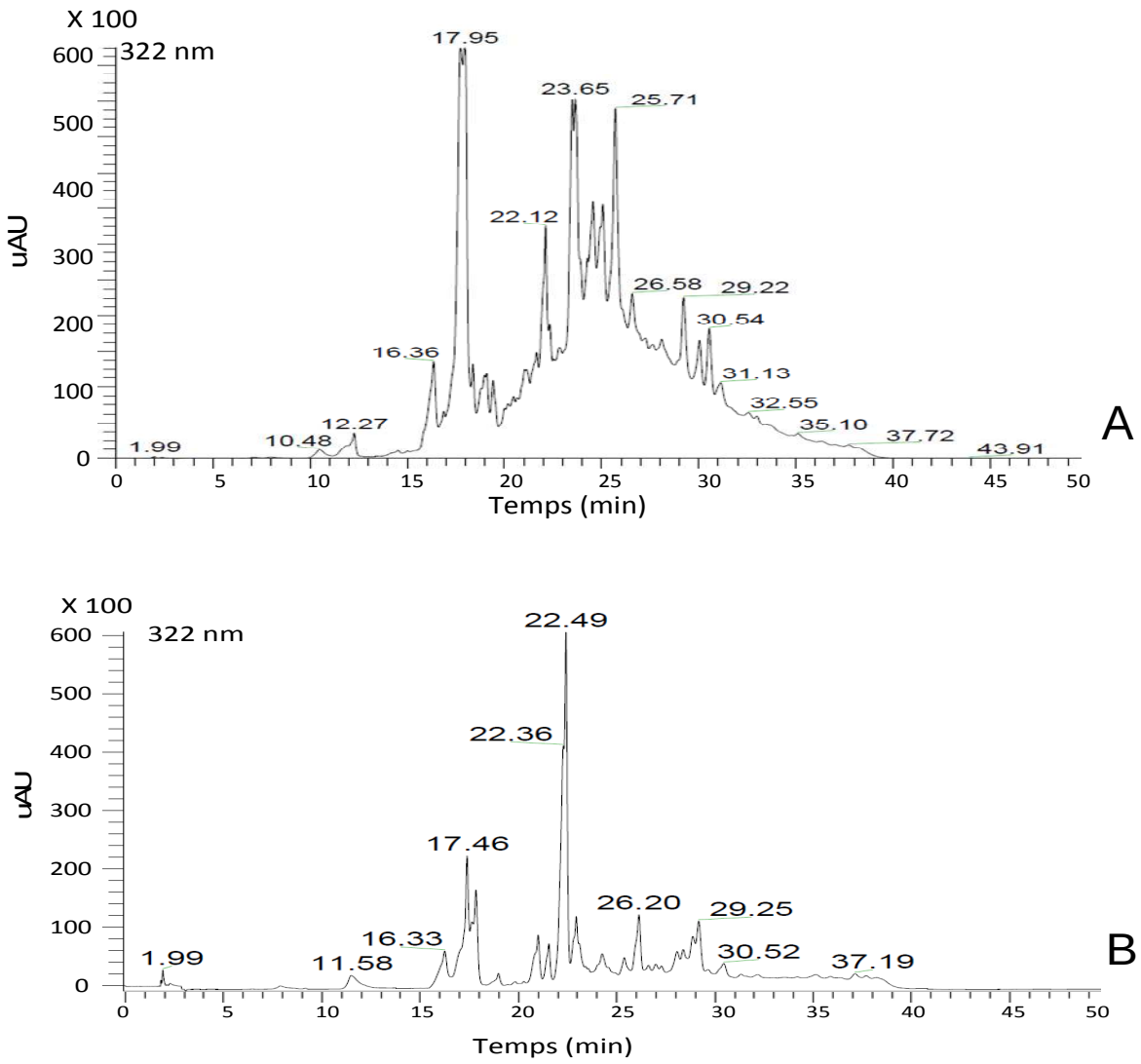


Figure 49 : chromatogrammes CL-SM à 322 nm des extraits des chitosanes fonctionnalisés par l'acide férulique (A) et par le férulate d'éthyle (B)

Selon les masses molaires des produits d'oxydation qui sont présentées dans le

Tableau 19, nous avons trouvé que les produits d'oxydation greffés sur les groupements amines libres du chitosane fonctionnalisés pouvaient être des monomères des dimères et trimères, les produits majoritaires étant la forme dimérique aussi bien pour l'acide férulique que pour le férulate d'éthyle.

Tableau 19 : valeurs m/z mesurées sur les extraits après hydrolyse chimique des chitosanes fonctionnalisés

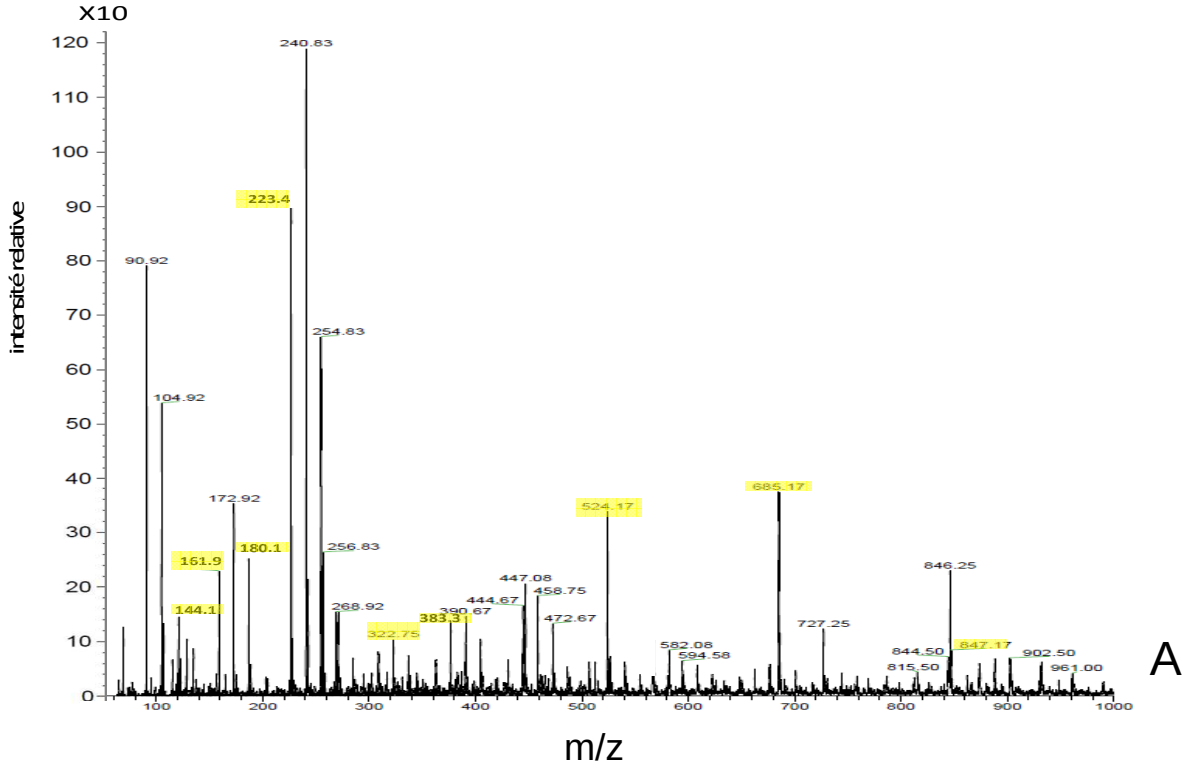
Temps de rétention (min)	m/z	Caractérisation
Acide férulique		
17,9	386	Dimère- AF
18,05	194	Monomère- AF
23,65	341	Dimère- AF
24,5	533	Trimère (dimère AF+AF)
25,8	341	Dimère- AF
29,2	297	Fraction de dimère- AF
Férulate d'éthyle		
17,6	222	Monomère- FE
22,56	442	Dimère- FE

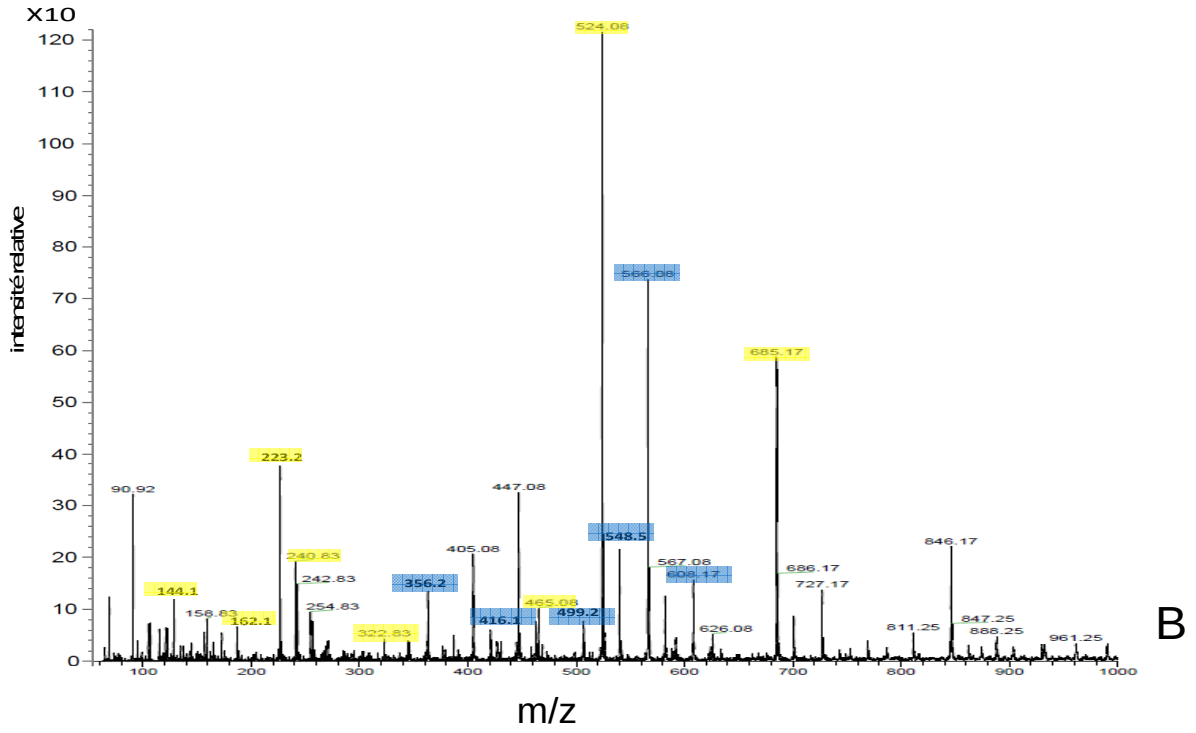
Enfin, l'hydrolyse chimique se déroule à une température élevée (100 °C) et dans un milieu acide (pH 2,5), ainsi elle n'était pas bien contrôlée et également peu sélective pour hydrolyser les liaisons entre les groupements amines et les produits d'oxydation. Par conséquent, des risques d'hydrolyse des produits d'oxydation eux-mêmes ne sont pas à exclure. C'est pour cela, nous avons envisagé de choisir une autre méthode d'hydrolyse plus sélective et plus contrôlée afin d'identifier les produits d'oxydation greffés sur les chitosanes fonctionnalisés.

Hydrolyse enzymatique et analyse CL-SM

Devant les inconvénients apportés par l'hydrolyse chimique, nous avons fait appel à l'hydrolyse enzymatique par la chitosanase pour préserver les liaisons entre les produits d'oxydation et les résidus glucosamines. Dans un premier temps, les hydrolysats ont été analysés en masse par infusion directe dans l'appareillage. Le matériel utilisé associe un spectromètre de masse de type trappe ionique avec un système de chromatographie liquide à gradient binaire autorisant des couplages CL-SM. Le système de détection de l'appareil permet d'analyser seulement des masses dont le rapport m/z est compris entre 50 et 4000

g/mol, aussi était-il nécessaire de procéder à une hydrolyse préalable du chitosane fonctionnalisé. Les spectres du chitosane natif hydrolysé et ceux des chitosanes fonctionnalisés hydrolysés sont présentés dans la Figure 50.





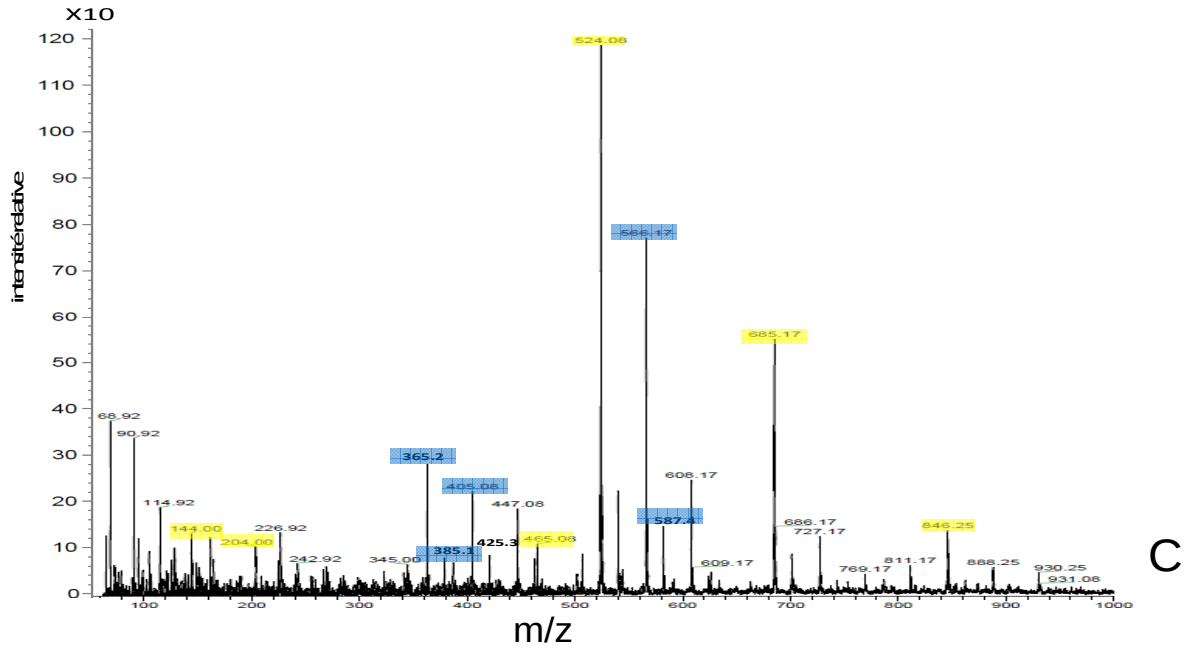


Figure 50 : spectres ESI-SM des hydrolysats du chitosane natif (A), du chitosane fonctionnalisé par l'acide férulique (B) et du chitosane fonctionnalisé par le férulate d'éthyle (C). Les pics attribués aux oligomères correspondant au chitosane natif sont surlignés en jaune et ceux attribués aux oligomères du chitosane fonctionnalisé sont surlignés en bleu

Le Tableau 20 présente les valeurs m/z théoriques et obtenues dans le cas des 6 premières familles d'oligomères après hydrolyse du chitosane natif. La comparaison de ces valeurs prouve que le chitosane a bien été hydrolysé par la chitosanase.

Tableau 20 : valeurs m/z théoriques et observées pour l'hydrolysat du chitosane natif*en mode positif ESI

Famille n = 1 à n = 6	**mono**	**di**	**tri**	**tétra**	**penta**	**hexa**
$(Gln)_x$	180 **(180)**	341	502	663	824	985
$(Gln)_x$-H_2O	162 **(162)**	323 **(323)**	484	645	806	967
$(Gln)_x$-2 H_2O	144 **(144)**	305	466	627	788	949
[GlcNAc. $(Gln)_{x-1}$]	222 **(223)**	383 **(383)**	544	705	866	1027
[GlcNAc. $(Gln)_{x-1}$]-H_2O	204	365	526 **(524)**	687 **(685)**	848 **(847)**	1009

** Les valeurs observées sont indiquées en gras et entre parenthèses dans le tableau*

Pour chaque degré de polymérisation allant de n=1 à n=6, deux structures sont a priori envisageables à savoir l'homo-oligomère (Gln)x et l'hétéro-oligomère [GlcNAc. (Gln)x-1] pour lequel la présence du groupement N-acétylé terminal s'explique par le fait que le chitosane est obtenu par désacétylation partielle du polymère de chitine à hauteur de 75 %. Trois formes déshydratées formées dans la source et dérivant des deux structures précédentes à savoir (Gln)x-H_2O, (Gln)x-2 H_2O et [GlcNAc. (Gln)x-1]-H_2O sont également attendues.

Le spectre ESI^+-MS relatif au chitosane natif montre un pic de base à m/z = 223 attribuable à la forme [GlcNAc.$(Gln)_{x-1}$] montrant que l'hydrolyse enzymatique a majoritairement conduit au monomère de glucosamine. D'un point de vue qualitatif, la présence en faible quantité de monomères, dimères, trimères et tétramères de glucosamine est aussi à noter. L'observation des oligomères sous forme déshydratée (m/z=144, 162, 323, 524 et 685) est en accord avec les précédents résultats (Kerwin *et al.*, 1999 ; Shahgholi *et al.*, 1996 ; Wu *et al.*, 2002).

Le Tableau 21 présente les résultats obtenus pour l'hydrolysat obtenu par la méthode enzymatique des chitosanes fonctionnalisés. Selon les valeurs m/z, les produits d'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle sont majoritairement greffés sur le chitosane

fonctionnalisé en forme de monomère ou dimère. Ces résultats sont en accord avec les résultats de l'hydrolyse chimique des chitosanes fonctionnalisés qui ont montré la présence du monomère et du dimère des produits d'oxydation sur les chitosanes fonctionnalisés.

Tableau 21 : valeurs m/z observées pour l'hydrolysat de l'AF-chitosane, du FE-chitosane et du chitosane natif

m/z	**détails**	**caractérisation**
Hydrolysant AF-chitosane		
356,2	194+162	Monomère AF + monomère-$(Gln)_x$-H_2O
416,1	194+222	Monomère AF +monomère-[GlcNAc. $(Gln)_{x-1}$]
499,2	194+305	Monomère AF + dimère-$(Gln)_x$-2 H_2O
548,5	386+162	Dimère AF + monomère-$(Gln)_x$-H_2O
566,08	386+180	Dimère AF + monomère-$Gln)_x$
608,17	386+222	Dimère AF + monomère-[GlcNAc. $(Gln)_{x-1}$]
Hydrolysant FE-chitosane		
365,2	221+144	Monomère FE + monomère-$(Gln)_x$-2 H_2O
385,1	222+163	Monomère FE + monomère-$(Gln)_x$-H_2O
405,05	222+183	Monomère FE + monomère-$Gln)_x$
566,17	222+344	Monomère FE + dimère-$(Gln)_x$
587,4	443+144	Dimère FE + monomère-$(Gln)_x$-2 H_2O

En conclusion, d'après les résultats de l'hydrolyse chimique et enzymatique des chitosanes fonctionnalisés, nous avons trouvé que les produits d'oxydation greffés enzymatiquement sur les groupements amines libres (NH_2) du chitosane sont majoritairement sous forme de monomère ou de dimère.

II.2. Caractérisation des chitosanes natif et fonctionnalisés : propriétés antibactériennes et physico-chimiques.

II.2.1. Introduction

Le chitosane et ses dérivés ont attiré beaucoup l'attention car il présente des activités antimicrobiennes, antifongiques et antivirales (Rabea *et al.*, 2003). Ces activités sont probablement dues à la charge positive portée par le chitosane, cependant le mode d'action n'est pas encore entièrement élucidé. A l'heure actuelle, plusieurs hypothèses ont été proposées : des changements dans la perméabilité de la membrane bactérienne, la rupture de la barrière de la membrane cytoplasmique ou le blocage de transport des éléments nutritifs, induisant la mort cellulaire (Raafat *et al.*, 2008).

De nombreuses études ont été menées sur la modification du chitosane afin d'améliorer ses fonctionnalités en lui apportant des propriétés antioxydantes, physico-chimiques et/ou antimicrobiennes. Cette modification du chitosane permet d'introduire de nouvelles propriétés et d'élargir ainsi le champ des applications possibles. En effet, la modification chimique du chitosane se déroule généralement dans des conditions difficiles telles que des températures et/ou des pressions élevées. Du fait du manque de sécurité de ce type de procédés chimiques et des préoccupations environnementales de plus en plus importantes, des méthodes alternatives pour modifier le chitosane sont constamment recherchées (Bozic M. *et al.*, 2012b).

Récemment, les enzymes ont été utilisées, pour greffer des dérivés phénoliques sur le chitosane, comme une alternative intéressante aux approches chimiques toxiques, nocives pour l'environnement et qui plus est non spécifiques (Bozic Mojca *et al.*, 2012a ; Bozic M. *et al.*, 2012b). La modification enzymatique du chitosane est généralement réalisée à l'aide des polyphénoloxydases (PPO) comme les tyrosinases, les peroxydases et les laccases qui convertissent des dérivés phénoliques en quinones correspondantes. Ces radicaux (quinones) sont des espèces actives qui peuvent soit se condenser avec d'autres radicaux afin de former des oligomères soit réagir avec des molécules nucléophiles présentes dans le milieu réactionnel, tels que les groupements amines libres du chitosane. Deux types de réaction

peuvent avoir lieu soit par formation d'une base de Schiff soit par formation d'adduit de type michaélien (Kumar *et al.*, 2000 ; Kumar *et al.*, 1999).

L'étude qui suit est présentée sous forme d'un article en révision dans *International Journal of Biological Macromolécules*. Le but de ce travail est d'étudier quelques propriétés physico-chimiques et les propriétés antibactériennes des chitosanes natif et fonctionnalisés. La fonctionnalisation enzymatique du chitosane s'est déroulée par le greffage enzymatique des produits d'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle catalysé par la laccase de *Myceliophtora thermophila*. Ce greffage a été réalisé dans des conditions hétérogènes, à 30 °C, dans un milieu aqueux (tampon phosphate 50 mM, pH 7,5) afin d'obtenir principalement des liaisons covalentes et de limiter ainsi des interactions électrostatiques entre les produits d'oxydation et les groupements fonctionnels du chitosane. Dans ce travail, nous avons déterminé la viscosité, la quantité de phénol greffé et la masse moléculaire des chitosanes fonctionnalisés. En parallèle ; les propriétés antibactériennes des chitosanes fonctionnalisés ont été déterminées par la méthode de mesure de la densité optique (la méthode classique) mais également par la méthode INT (méthode optimisée lors de ces travaux). Pour ce faire, nous avons choisi quatre souches bactériennes alimentaires pathogènes, à Gram positif (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus*) et à Gram négatif (*Escherichia coli, Salmonella enterica*).

II.2.2. Physicochemical and antibacterial properties of chitosan enzymatically functionalized with ferulic acid and ethyl ferulate

Abdulhadi Aljawish[a], Isabelle Chevalot[b], Jordane Jasniewski[a], Joël Scher[a], Lionel Muniglia[a,*].

[a]Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602-F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[b]Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP-UMR 7274), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602-F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Projet de publication - Journal of « Carbohydrate Polymers »

Abstract

Chitosan and its enzymatically functionalized derivatives with ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) were evaluated for their physico-chemical properties. The antibacterial activity of chitosan and its derivatives as well as ferulic acid and ethyl ferulate against four bacterial strains ($Gram^+$ and $Gram^-$) was also investigated. Results demonstrated that enzymatic grafting of oxidation products onto chitosan changed its morphological surface, increased its molecular weight and its viscosity as well as improved its thermal antioxidant stability. Additionally, both Gram-positive bacteria (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) were more sensitive to all molecules tested than both Gram-negative bacteria (*E. coli*, *S. enterica*). Ethyl ferulate presented the highest antibacterial activity probably due to its higher hydrophobicity compared to ferulic acid. Additionally, chitosan and its derivatives showed similar antibactericidal activity against all bacterial strains tested. Finally, this enzymatic procedure provided functional chitosan derivatives with improved properties such as viscosity, antioxidant stability as well as the preservation of initial antibacterial activity of chitosan.

Keywords: Antibacterial activity; physico-chemical properties; enzymatic functionalization, chitosan derivatives, phenolic compounds.

Corresponding author Tel.: +33 383 595904; Fax: +33 383 595772

E-mail address: lionel.muniglia@univ-lorraine.fr (L. Muniglia)

1. Introduction

Chitosan is one of the most widely used polymers, with high range of applications. Chitosan (amino polysaccharide) is chemically composed of pyranose cycles of β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucose (N-glucosamine (GluN) is the building unit of chitosan) linked with a glycosidic linkage, obtained mainly from deacetylation of chitin under alkaline conditions [1]. As a natural renewable resource, chitosan exhibits unique properties such as biocompatibility, biodegradability and non-toxicity [2], and consequently presents various applications in the biomedical, agricultural, functional food, wastewater purification, environmental protection, food texturing or food packaging, and cosmetics domains [3, 4].

In recent years, chitosan and its derivatives have attracted much attention due to their antimicrobial activities against fungi, bacteria, and viruses [5]. Although the exact mode of antibacterial action of chitosan is still not fully understood, several mechanisms suggested that the actual processes of antibacterial activity could be due to changes in the bacterial membrane permeability, breakdown of the cytoplasmic membrane barrier or the blockage of nutrient transport, inducing cell death [6].

Many investigations were carried out on chitosan modification in order to upgrade its functionality with antioxidant, physicochemical and antimicrobial properties by the incorporation of an active principle to its polysaccharide backbone. Enzymatically or chemically modification of chitosan were carried out thanks to its reactive groups which are the free amino groups on deacetylated units at C2 and the hydroxyl groups at the C3 and C6. Consequently, these modifications of chitosan can introduce various properties and enlarge the field of its potential applications depending on the types of side chains. The chemical modification typically concerned reactive reagents and harsh conditions. Due to growing safety and environmental concerns, alternative modification methods were constantly investigated [7]. Recently, enzymes have been used to graft phenolic derivatives onto chitosan macromolecules [8-12] as an attractive alternative to toxic, environmentally unfriendly and non-specific chemical approaches.

The enzymatic modification of chitosan was usually carried out using polyphenol oxidases (PPOs) such as tyrosinases, peroxidases and laccases which convert phenols derivatives into quinones. These radicals are active species that can either condense together or react with nucleophilic function, such as the free amino groups of chitosan by two different types of reaction with amines to yield either Schiff-bases or Michael-type adducts; oligomer-forming reactions with other quinones were also experimentally demonstrated [7, 13]. In the same way, chitosan can be enzymatically modified to create derivatives with a range of functional properties. Authors reported that thanks to laccase catalysis, phenolic compounds can be covalently grafted onto free amino groups of chitosan at region C2 *via* Schiff base bond (N=C) [8]. The results demonstrated that the quantity of ferulic acid products grafted onto chitosan was higher than ethyl ferulate products. Additionally, the phenols grafting led to the increase of molecular weight average of chitosan monomer and to the decrease of the quantity of free amino groups (positive charges) of chitosan derivatives in comparison with chitosan. Finally, chitosan derivatives presented new functional properties such as color and antioxidant properties [8].

The purpose of the present work is to study some physicochemical and antibacterial properties of functionalized chitosan derivatives produced by enzymatic grafting of the oxidative products of ferulic acid (FA) or ethyl ferulate (EF) [8]. These reactions were catalyzed by the *Myceliophtora thermophila* laccase under heterogeneous reaction conditions, in aqueous medium leading to covalent bonds and avoiding electrostatic interactions between oxidation products and amino groups of chitosan. In this study, the viscosity, the molecular weight and the quantity of oxidized phenols grafted were evaluated as well as the thermal antioxidant stability and the surface morphology of chitosan derivatives. Bacterial growth inhibition and bacteriostatic/bactericidal activities were finally evaluated by optical density method as classic method and INT method as new method towards two Gram positive (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus*) and two Gram negative strains (*Escherichia coli, Salmonella enterica*).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan HMW (high molecular weight), *P*-iodonitrotetrazolium violet (INT), ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) (purity about 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (France). Chitosan derivatives were produced by enzymatic grafting of the oxidative products of ferulic acid (FA) or ethyl ferulate (EF) onto chitosan using the *Myceliophtora thermophila* laccase under heterogeneous reaction conditions (chitosan particles) at 30°C and pH 7.5 in aqueous medium for 4 h as reported in a previous work [8]. HCl 37% and ferric chloride ($FeCl_3$; $6H_2O$) were obtained from Merk (Germany). Acetic acid was purchased from Prolabo (France). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Acetone, methanol, ethanol and acetonitrile were obtained from Carlo Erba (Milwaukee, WI, USA). Mueller-Hinton broth (MH) culture medium was purchased from BioMerieux S.A. (France).

2.2. Determination of phenolic content in chitosan-derivatives

Phenolic contents were determined by the method described by Singleton et al. [14]. After 4 h of enzymatic reaction, the chitosan derivatives were recovered by filtering the reaction medium under vacuum with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity 0.2 µm). Later on, chitosan derivatives recovered were extensively washed with an abundant amount of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5), methanol, ethanol and then acetone to remove all traces of substrates adsorbed by electrostatic forces. Then, the reaction medium and washing liquid were quantitatively accumulated to evaluate the phenolic content non-grafted onto chitosan derivatives.

Briefly, 1 ml of accumulated liquid was mixed with 1 ml of 10% sodium carbonate and then this mixture was left for 10 min at 38°C. Later on, 1 ml of Folin- Ciocalteau reagent (1/3) was added to the mixture and then it was shaken for 15 h in the dark at room temperature. Absorbance was measured at 660 nm using a UV–visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1605). Gallic acid (40 µg/ml) and water were used as standard and blank, respectively. The phenolic content was calculated by the following equation (1) established from gallic acid as a standard:

$$y = 0.009\ x\ (R^2\ 0.9997) \qquad (1)$$

x and y are the absorption value at 660 nm and concentration of phenol ungrafted (mg/ml), respectively.

2.3. Molecular weight determination of chitosan and its derivatives

Size exclusion chromatography with multi-angle laser light scattering detectors (SEC-MALLS) (Viscotek TDA305 - Malvern, France) was used to study the molecular weight distributions of chitosan and its derivatives according to the method described by [15]. Refractive index (RI) and ultra-violet absorption (UV) detection were employed and molecular weights were determined relative to chitosan standards (American Polymer Standards Corporation). For all samples, chitosan solutions (1 mg/ml) were prepared by direct dissolution in acetate buffer (5% acetic acid; 0.3 M sodium chloride, pH 4) at room temperature. The samples were filtered with a sterile syringe filter of 0.2 µm pore size (Acrodisc® Syringe Supor® Membrane PALL). The acetate buffer used for dissolution was from the same batch as the mobile phase used for SEC. Mobile phase is filtered before use through a hydrophilic Durapore® membrane with 0.45 µm pore size (47 mm diameter, Millipore).

Analyses were performed at 30°C at a flow rate of 0.7 ml/min with sample injection volume of 100 µl using a Viscotek A6000M gel column and OmniSEC 4.6 Software (Malvern), of 7.8 mm ID and 30 cm length. Chitosans with different molecular weights were used as a standard for determine the molecular weight of chitosan and its derivatives.

2.4. Morphological analysis

Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the morphology of the surface of chitosan and its derivatives in powder form. The powders were examined with a Hitachi SEM S2500 instrument operating at 10 kV. They were spread at the surface of a sticky plastic circle fixed on a support. Then, the samples were covered with gold particles by sputtering (Bio-Rad type SC 502). Different magnifications were performed: 150×, 300×, 1000× and 2500×.

2.5. Rheological analysis (Viscosity)

For measurement of viscosity, the chitosan samples were dissolved to different concentrations from 2 to 10 mg/ml in aqueous acetic acid (1%) (pH 3). All measurements of the viscosities of these solutions were made at 25±1°C using a rheometer (Kinexus Malvern) with diameter of 60 mm and a gap distance of 0.052 mm with fixed rotational shear rate of 0.15 s^{-1}. Values are the average ± standard deviation of three replicate experiments.

2.6. Antioxidant stability

To verify the antioxidant stability of chitosan derivatives, aqueous solutions of chitosan derivatives (5 mg/ml in 1% (v/v) aqueous acetic acid) were incubated at 50°C and 100°C under aerobic conditions for 60 min [16]. Afterward, $DPPH^{\bullet}$ scavenging activity was examined using 200 µl which was mixed with 1800 µl of methanolic solution containing $DPPH^{\bullet}$ radicals resulting in a final concentration of 6.10^{-5} M $DPPH^{\bullet}$. The mixture was shaken vigorously for 15 s and then left to stand in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance (Abs) of the resulting solution was measured at 517 nm using a UV-visible spectrophotometer against a blank without chitosan according to the method [17]. The scavenging ability was calculated by the following equation (2):

$$DPPH^{\bullet}\ \text{Scavenging ability (\%)} = (1 - Abs_{sample}/Abs_{control}) \times 100 \qquad (2)$$

Each value represents the average ± standard deviation of three independent experiments.

2.7. Evaluation of antibacterial activity

2.7.1. Preparation of stock solutions

Chitosan and its derivatives solutions (1%, w/v, pH 5.2) were prepared by dissolving chitosan and its derivatives powder in aqueous acetic acid (0.4%, v/v, pH 3.2) and stirred overnight at 700 rpm at room temperature. Stock solutions of phenolic compounds were freshly prepared by dissolving the appropriate amount of the phenolic compound in one part of 100% (v/v) ethanol and one part of sterile water to obtain final concentration of ethanol

50%. The phenolic compounds were first dissolved in ethanol (100%) by constant shaking before adding the water. The stock solutions were reserved at 4°C until use.

2.7.2. Microorganisms and culture conditions

The following strains and incubation conditions were used to evaluate the antibacterial activity of chitosan and its derivatives as well as initial phenols: four foodborne pathogens, *Escherichia coli* CIP 54.8 and *Salmonella enterica* CIP 81.32 as model Gram-negative bacteria and *Listeria monocytogenes* CIP 82.110 and *Staphylococcus aureus* CIP 76.25 as model Gram-positive bacteria, were obtained from public collection [Collection de l'Institut Pasteur (CIP), Paris, France]. These strains were propagated overnight at 37°C in liquid Mueller-Hinton broth (MH) (25 g/l of water). The cultures obtained were diluted with Mueller-Hinton broth (MH) to obtain a final optical density (OD_{630}) of 0.1 corresponding to ~10^8 (CFU/ml). This concentration was used for antibacterial activity experimentations.

2.7.3. Bacterial growth inhibition

For phenolic compounds, 96-well microplate was filled with 90 µl of diluted bacterial strains. Then, 10 µl of each phenol concentration (50% initial ethanol concentration) was added in wells. Two controls were used in two columns which contain 90 µl of diluted bacterial strains: one with 10 µl of sterile distilled water and another with 10 µl of ethanol (50%). Tests were carried out in triplicate.

For the chitosan and its derivatives, 96-well microplate was filled with 75 µl of diluted bacterial strains in double Mueller-Hinton broth (2X) to avoid the cell death from nutrition deficiency. Then, 75 µl each chitosan concentration (pH 5.2) was poured in wells. Two controls were used in two columns: one with 75 µl of sterile distilled water and another with 75 µl of acetic acid adjusted by NaOH 0.1 M (0.4%, pH 5.2). It was found that mixing of the chitosan solutions (pH 5.2) and the culture medium (pH 7.2) presents a pH of 6. Tests were carried out in triplicate.

After that, the microplates were homogenized by constant shaking for 5 min. Bacterial growth at T0 was determined by optical density at 630 nm according to method [18] of each

well on a microplate reader (multiscan GO W382TA, Thermo Scientific MIB, France) with a blank consisting in culture medium. Then, the microplates were incubated at 37°C for 16-18 h. After incubation and before optical density determination for TF, the microplates were shaken for 10 min to resuspend bacteria. The antibacterial activity of all tested compounds was reported as inhibition percentage (%) by the following equation (3) according to method [19]:

$$\%\text{Inhibition} = 1 - \frac{(TF_{sample} - T0_{sample}) - (TF_{Blank} - T0_{Blank})}{(TF_{Growth} - T0_{Growth}) - (TF_{Blank} - T0_{Blank})} \quad X\ 100 \qquad (3)$$

where $T0_{Sample}$ and TF_{Sample} corresponded to the optical density at 630 nm of the strain growth in the presence of the tested compounds before (T0) and after (TF) incubation, respectively; $T0_{Blank}$ and TF_{Blank} corresponded to the liquid Mueller-Hinton broth medium with solvent before and after incubation, respectively; and $T0_{Growth}$ and TF_{Growth} to the strain growth in the presence of the sterile distilled water (positive control) before and after incubation, respectively.

2.7.4. Minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) determination

The INT method [20] was modified to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of phenolic compounds and of chitosan and its derivatives against bacterial strains in terms of bacteriostatic and bactericidal activities. Using the same previous 96-well microplates prepared in the optical density method, 10 µl of p-iodonitrotetrazolium violet (INT) as an indicator of bacterial growth, dissolved in water at a final concentration of 0.4% (w/v), were added to the wells and then incubated at 37°C for 30 min in the dark. The colorless tetrazolium salt acts as an electron acceptor and is reduced to a red-colored formazan product by biologically active organisms. When bacterial growth was inhibited, the solution in the well remained colorless after incubation with INT. MIC values were recorded as the minimal concentration of antibacterial compound that completely inhibited bacterial visible growth after 16-18 h (no evidence of growth) [21], i.e. a colorless well. For MBC determination, 50 µl from each well without INT

were spread on MH agar plates (25 g of MH and 13 g of agar in a liter of water) and incubated at 37°C for 24-48 h. MBC was defined as the minimal concentration of antibacterial compound that results in 99.9% dead cells in the primary inoculum (no colony was observed on MH agar plates) [21]. At least, two duplicate tests were performed with each strain and antibacterial compounds.

3. Results and discussion

3.1. Determination of phenolic content in chitosan-derivatives

The phenolic content in reaction medium after 4 h of enzymatic reaction was determined using gallic acid as a standard (Table 1). The quantity of FA-oxidation products grafted onto chitosan (50.20% ± 2.5) was almost 1.5 times higher than of EF-oxidation products (30.50% ± 2.00). For instance, 1 mg of FA or EF chitosan derivatives contained almost 25 µg of FA-oxidation products and almost 17 µg of EF-oxidation products, respectively. In fact, the presence of free carboxyl group in ferulic acid structure led to several oxidation products as reported in previous study with laccase [22], whereas the esterification of carboxyl group in ethyl ferulate structure led to a single oxidation product as also already reported with peroxidase [23]. This hypothesis may explain the higher amount of FA-oxidation products grafted onto chitosan derivative compared to EF-oxidation products.

Table 1: Determination of phenolic content in ferulic acid or ethyl ferulate chitosan derivatives in 1 ml of reaction medium

	Ferulic acid (FA)	Ethyl ferulate (EF)
Initial phenol quantity (mg)	0.97 ± 0.03	1.10 ± 0.05
Grafted phenol quantity (mg)	0.49 ± 0.02	0.33 ± 0.03
Grafted phenol percent (%)	50.20 ± 2.50	30.50 ± 2.00
(µg of grafted phenol /mg of chitosan)	24.50 ± 1.00	16.50 ± 1.50

Each value represents the average ± standard deviation of three independent experiments

3.2. Molecular weight determination of chitosan and its derivatives

Changes in molecular weight of chitosan by the grafting of laccase-catalyzed oxidation products were studied by SEC–MALLS analyses. The results demonstrated that the molecular weight of chitosan (249 kDa) increases with the grafting of laccase-catalyzed oxidation products. Additionally, the molecular weight of FA- chitosan derivative (277 kDa) was higher than that of EF-chitosan derivative (271 kDa). The higher molecular weight of FA-chitosan derivative can be mainly attributed to the higher quantity of FA- oxidation products grafted onto chitosan compared to EF-oxidation products [8].

3.3. Morphological analysis

The SEM micrographs of chitosan as influenced by the grafting of laccase-catalyzed oxidation products of ferulic acid or ethyl ferulate were shown in Fig. 1. The initial chitosan matrix formed a continuous phase permeated by an amorphous system of voids, which in-turn revealed the spatial dimensions of these images. These micrographs showed that there is an obvious and large variation in the microstructural properties of chitosan as control treatment and those of their FA or EF chitosan derivatives. Chitosan as control has a tendency to form a large polysaccharide reticular structure with overlapping filamentous appearance. In fact, the chitosan appeared almost a smooth surface with some grooves. Whereas, FA or EF chitosan derivatives obviously altered the systematic aggregation of chitosan. The microstructure of chitosan derivatives clearly appeared as a matrix with globular units of various sizes displayed in homogeneous/continuous phase of smooth and regularly control chitosan aggregates. Moreover, the globular units of chitosan derivatives aggregates were displayed with explicit boundaries. Consequently, the appearance of plentiful spherical particles with some irregularities might be attributed to the grafting of laccase-catalyzed oxidation products onto free amino groups of chitosan.

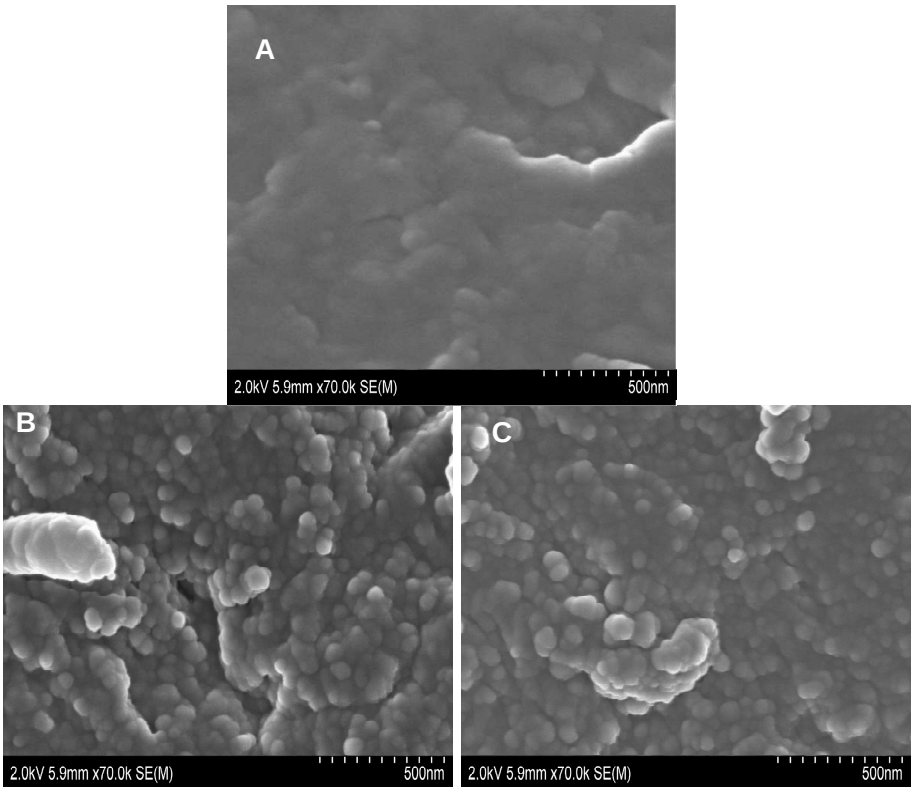


Fig. 1: Surface view of SEM micrographs of chitosan (A), FA-chitosan derivative (B), and EF-chitosan derivative (C).

3.4. Viscosity measurement

As quantitative measurement of rheological behaviour, the viscosity was determined depending on polymer concentration of chitosan and its derivatives. The modified chitosan samples formed viscous solutions when the polymer was dissolved above a concentration of 8 mg/ml. At low polymer concentrations, chitosan and its derivatives presented solutions with low viscosities which were almost similar (Fig. 2). With increasing polymer concentration, the viscosity of chitosan derivatives solutions increased, especially for AF-chitosan solution as compared with that of chitosan solution. Such increase in viscosity with polymer concentrations was also observed by enzymatic grafting of phenols such as dodecyl gallate, catechin and hexyloxyphenol onto chitosan in the presence of tyrosinase enzyme [24-26]. These high viscosities were characteristic of associative thickeners and can be attributed to the formation of physical crosslinks resulting from hydrophobic interactions between the side groups of modified chitosan chains [25, 27-29]. These physical cross-links led to the

formation of a polymers network which presented useful rheological properties. Although EF molecule is more hydrophobic than FA molecule, FA-chitosan solution presented higher viscosity due to the higher quantity of FA-products grafted onto chitosan as compared with EF-products [8]. Therefore, the functionalization of this polymer allowed the increase of its thickener potential.

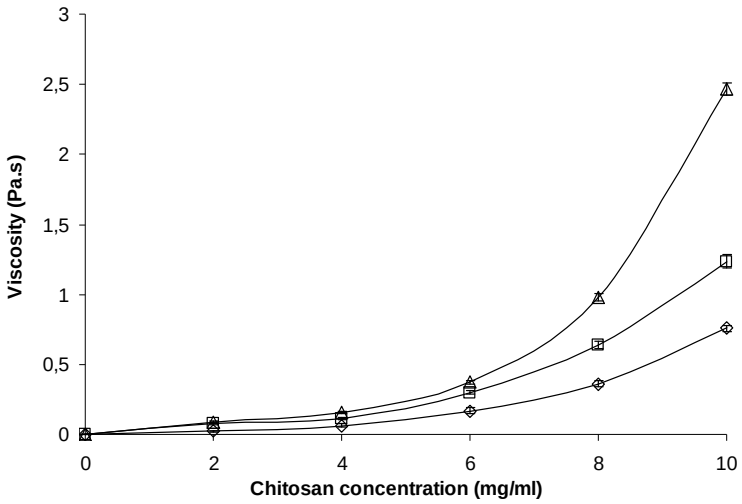


Fig. 2: Viscosity of solutions containing FA-chitosan derivative (Δ), EF-chitosan derivative (□) and chitosan (◊). Viscosities were measured at 25 ± 1°C and a fixed rotational shear rate of 0.15 s^{-1}

3.5. Antioxidant stability

The antioxidant potential of chitosan derivatives, after being subjected to 50 or 100°C for 60 min, was evaluated by following the reduction of the radical $DPPH^{\bullet}$ (Table 2). The EC_{50} values at 25°C of FA- chitosan derivative and EF-chitosan derivative were 0.52 ± 0.03 and 1.50 ± 0.05 mg/ml, respectively. Chitosan did not present any antioxidant activity as reported in a previous study [8]. It was clearly shown that before and after incubation at 50 or 100°C, EC_{50} values were almost similar. This result was in accordance with results reported concerning acid gallic grafting onto chitosan in the presence of peroxidase enzyme [16]. Consequently, this suggested the possibility of using FA or EF-chitosan derivatives as natural antioxidant polymer products for applications at high temperatures.

Table 2: EC_{50} values of chitosan derivatives in antioxidant properties after 60 min stay at 25, 50 and 100°C.

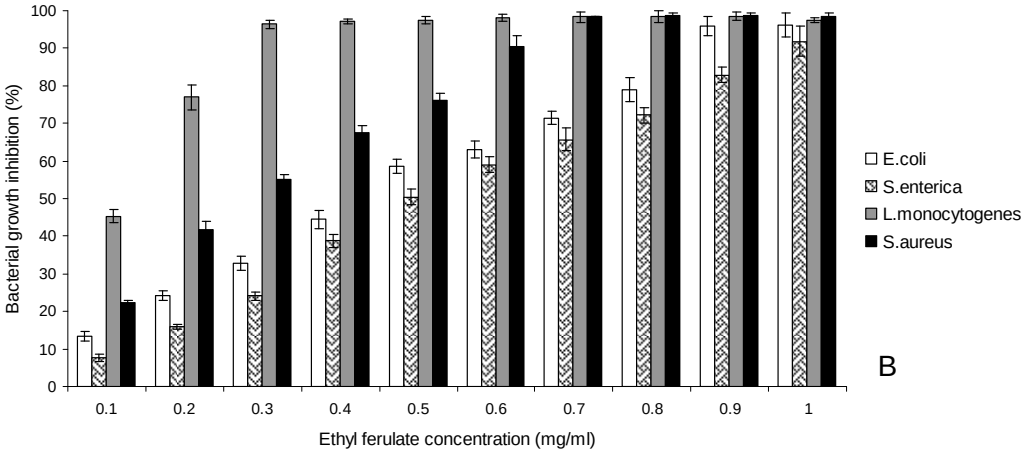
	EC_{50} (mg/ml) for scavenging ability on DPPH radicals	
Storage temperature for 60 min	FA- chitosan derivative	EF- chitosan derivative
25°C	0.52 ± 0.04	1.50 ± 0.04
50°C	0.50 ± 0.02	1.55 ± 0.05
100°C	0.55 ± 0.03	1.54 ± 0.05

EC_{50} value: the effective concentration at which the antioxidant activity was 50%, EC_{50} value was obtained by interpolation from linear regression analysis. Each value is expressed as mean ± standard deviation (n =3)

3.6. Evaluation of antibacterial activities

3.6.1. Phenolic compounds

The growth response (% inhibition) of four bacterial strains was measured at 630 nm in the presence of ferulic acid and ethyl ferulate at several concentrations as presented in Fig. 3. Prior to the assay, the effect of 5% (v/v) ethanol (the final concentration of ethanol in the assay) was investigated and no inhibitory effect on the growth of tested bacterial strains was measured (data no shown). Gram-negative bacteria were most resistant, especially *S. enterica* than Gram-positive bacteria, especially *L. monocytogenes* (Fig. 3). In fact, minimum inhibitory concentration (MIC) of ferulic acid that completely inhibited bacterial visible growth was almost 0.3 and 0.8 mg/ml for *L. monocytogenes* and *S. aureus* respectively, while more than 1 mg/ml for *E. coli* and *S. enterica*. Whereas, minimum inhibitory concentration (MIC) of ethyl ferulate was almost 0.3 and 0.7 mg/ml for *L. monocytogenes* and *S. aureus* respectively, while 0.9 and more than 1 mg/ml for *E. coli* and *S. enterica*. These results were consistent with those reported for the susceptibility of *E. coli* and *S. aureus* towards phenolic acids [19]. This result was mainly due to the differences in cell wall structure. In fact, the high resistance of Gram-negative bacteria is mainly due to the lipopolysaccharide layer (LPS) which provides a penetration barrier against antibacterial compounds [30, 31]



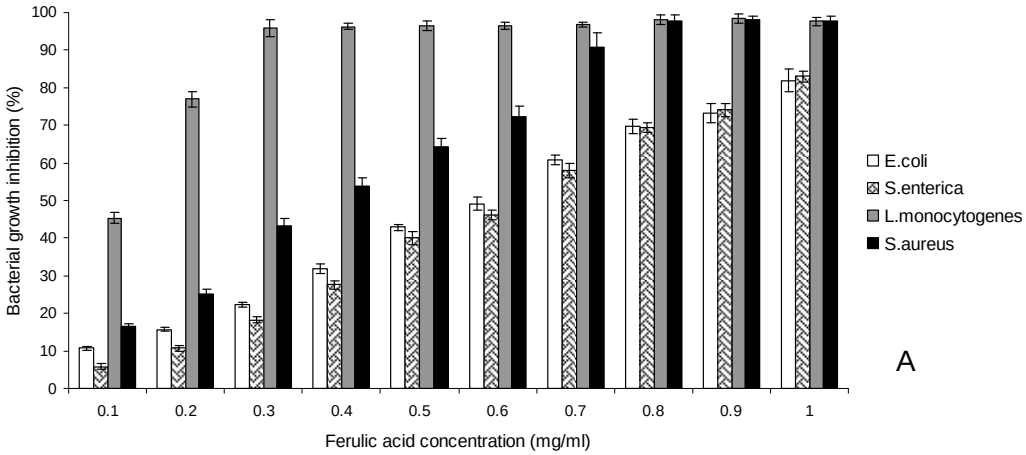


Fig. 3: Bacterial growth inhibition (%) of ferulic acid (A), ethyl ferulate (B), against bacterial strains tested as measured at 630 nm.

Bacteriostatic and bactericidal activities of phenolic compounds against chosen bacterial strains were studied in term of MIC and MBC thanks to a simple and rapid method (INT) as shown in Table 3. In comparison with optical density method, MIC values determined by INT method were in accordance with those determined in Fig. 3. Additionally, MIC/MBC values by INT method confirmed that ethyl ferulate (ester) was the most potent compound against all bacterial strains tested compared to ferulic acid according to previous results obtained for gallic acid and octyl gallate (ester) against *S. aureus* [32]. Additionally, the MBC values were no more than twice those corresponding to the MIC values for phenolic compounds tested

[33], suggesting that they present bactericidal activity. These results confirmed the validity of the INT method used to determine MIC and MBC as a simple and rapid method.

Table 3: Minimum inhibitory concentration MIC (mg/ml), minimum bactericidal concentration MBC (mg/ml) values of phenolic compounds tested against different pathogens bacterial strains

		Bacterial strains			
		E. coli	*S. enterica*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*
Ferulic acid	MIC	1.25 ± 0.06	1.35 ± 0.07	0.30 ± 0.02	0.78 ± 0.03
	MBC	1.35 ± 0.07	1.45 ± 0.10	0.35 ± 0.03	0.85 ± 0.04
Ethyl ferulate	MIC	1.00 ± 0.05	1.10 ± 0.05	0.20 ± 0.02	0.63 ± 0.02
	MBC	1.15 ± 0.06	1.25 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.75 ± 0.03

Values are mean ± standard deviation (n = 3)

The high antibacterial action of ethyl ferulate can be mainly attributed to its high lipophilicity which is due to the esterification of the carboxylate group. In fact, antibacterial activity of phenolic compound is due to the effects of benzene ring substitutions (hydroxyl and methoxy groups) as well as the double bond in alkyl side-chain which both increase the lipophilicity [18]. The antibacterial activity increases with higher lipophilicity which facilitates penetration across the bacterial membrane [32] and depends on the length of the alkyl chain [34].

However, it is important to notice that results concerning the antibacterial activity of the phenolic compounds were methodology-dependent. In several works, it was demonstrated that results of MIC depended on antibacterial method used and on the species of microorganisms. For example, MIC values of ferulic acid against *E. coli* as Gram-negative bacteria varied from 0.16 to 1.94 mg/ml [18, 34-36], whereas, MIC values of ferulic acid against *L. monocytogenes* as Gram-positive bacteria varied from 0.15 to 0.3 mg/ml [37, 38]. Thus, it was difficult to compare antibacterial effects of same phenolic compounds presented by different studies. As the MIC values of ferulic acid determined in the present work were in the same range of MIC values of ferulic acid reported in other studies against *E. coli* and *L.*

monocytogenes, the INT method used in the present study can be validated as a simple and rapid method to evaluate antibacterial activity.

Finally, variations in antibacterial activities among bacteria could reflect differences in cell surface structures between Gram-negative and Gram positive bacteria. Additionally, the lipophilicity and the saturated side-chain length (alkyl chain) influenced the antibacterial potential of the phenolic compounds against the different microorganisms. MIC/MBC values suggested a bactericidal action of these phenolic compounds FA and EF.

3.6.2. Chitosan derivatives obtained by enzymatic functionalization

The growth inhibition of bacterial strains tested was measured at 630 nm in the presence of chitosan and its derivatives at several concentrations as presented in Fig. 4. Prior to the assay, the effect of 0.2% (v/v) of acetic acid (final concentration of acetic acid in the assay) was investigated at pH 6 to avoid acidic pH effect. It was found that acetic acid at 0.2% (v/v) and pH 6 presented less than 10% of bacterial growth inhibition against all bacterial strains tested (data not shown) and thus it was considered as negligible. The efficient antibacterial concentration of chitosan and its derivatives was investigated at pH 6.

Results showed that gram-negative bacteria were most resistant especially *S. enterica* in comparison with Gram-positive bacteria, especially *L. monocytogenes* (Fig. 4). In fact, minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosan and its derivatives that completely inhibited bacterial visible growth was almost 0.3 and 0.4 mg/ml for *L. monocytogenes* and *S. aureus* respectively, while 0.6 and more than 1 mg/ml for *E. coli* and *S. enterica*. These results were in agreement with previous results concerning the susceptibility of *S. aureus* and *L. monocytogenes* (G^+), *E. coli* and *S. enterica* (G^-) towards chitosan which was soluble in aqueous acetic acid [39-41]. The high resistance of Gram-negative bacteria is probably due to the lipopolysaccharide layer (LPS) providing an efficient outer permeability barrier against macromolecules and hydrophobic substances [39, 42]. Consequently, the resistance of the bacterial strains tested towards chitosan and its derivatives decreased in the following order: *S. enterica* > *E. coli* > *S. aureus* > *L. monocytogenes.*

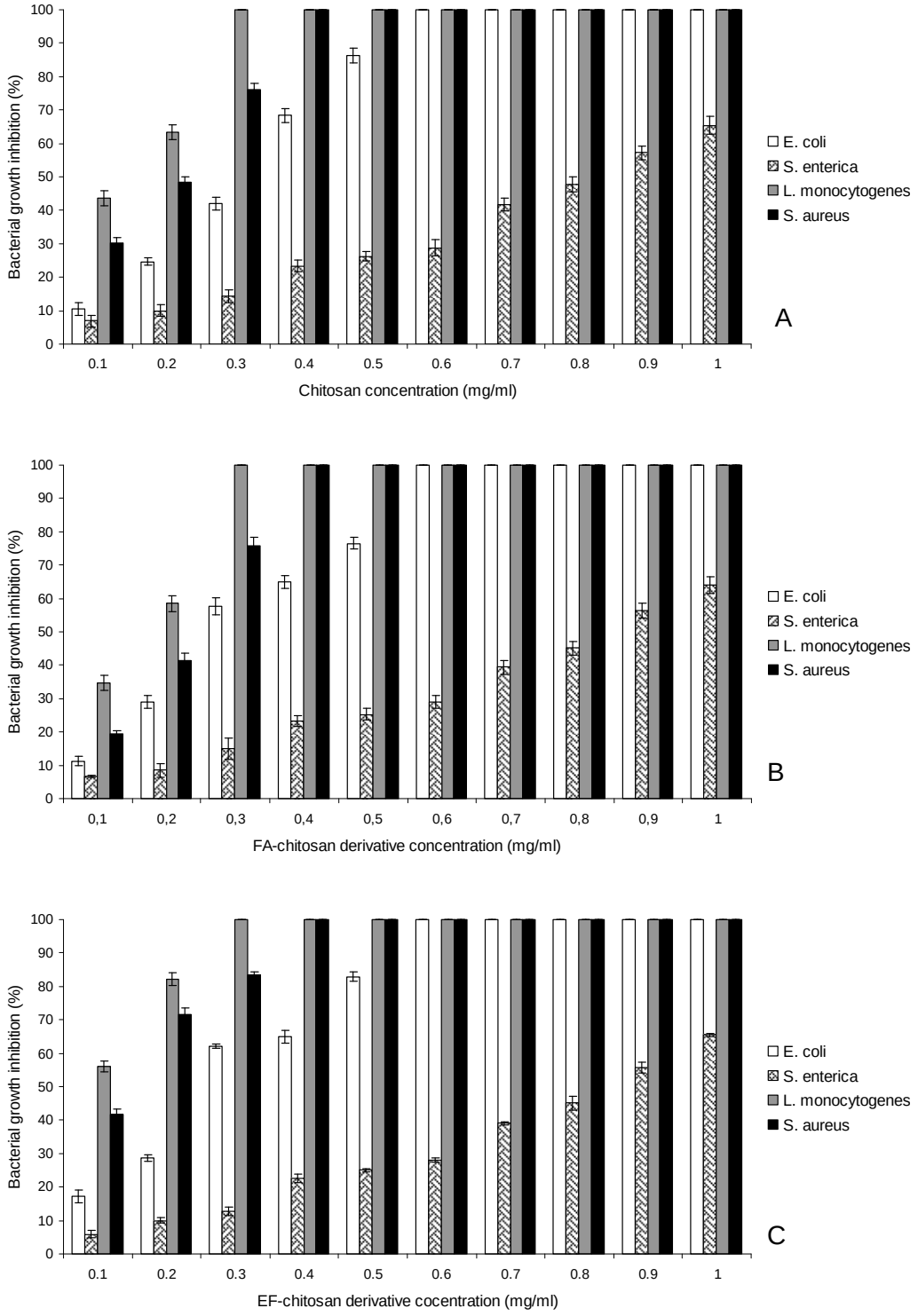


Fig. 4: Bacterial growth inhibition of chitosan (A), FA-chitosan derivative (B) and EF-chitosan derivative (C) against bacterial strains as measured at 630 nm

Bacteriostatic and bactericidal activities of chitosan and its derivatives against bacterial strains were evaluated in term of MIC and MBC (Table 4). In comparison with optical density method, MIC values determined by INT method were in accordance with those determined in Fig. 4. Additionally, MIC/MBC values by INT method confirmed that chitosan and its derivatives exhibited similar antibacterial activities against all tested strains. Additionally, the MBC values were no more than twice those corresponding to the MIC values for chitosan and its derivatives [33], suggesting that they present bactericidal activity. These results confirmed the validity of the INT method used to determine MIC and MBC as a simple and rapid method.

Table 4: Minimum inhibitory concentration MIC (mg/ml) and minimum bactericidal concentration MBC (mg/ml) values of chitosan and its derivatives against different pathogens bacterial strains

		Bacterial strains			
		E. coli	*S. enterica*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*
Chitosan	MIC	0.60 ± 0.05	2.00 ± 0.10	0.25 ± 0.05	0.40 ± 0.03
	MBC	0.65 ± 0.05	2.30 ± 0.05	0.30 ± 0.02	0.45 ± 0.05
FA-chitosan derivative	MIC	0.60 ± 0.07	2.10 ± 0.15	0.30 ± 0.03	0.50 ± 0.05
	MBC	0.75 ± 0.10	2.40 ± 0.10	0.35 ± 0.03	0.55 ± 0.05
EF-chitosan derivative	MIC	0.65 ± 0.05	2.10 ± 0.15	0.30 ± 0.05	0.40 ± 0.05
	MBC	0.70 ± 0.10	2.30 ± 0.10	0.30 ± 0.05	0.50 ± 0.10

Values are mean ± standard deviation (n = 3)

The antibacterial activity of chitosan was demonstrated to be correlated to its cationic nature (positively charged amino-groups), whereas many of bacterial cell components (cell wall, DNA, RNA …) are negatively charged [43]. Chitosan derivatives presented antibacterial activity which can be due either to free amino-groups of chitosan, without phenols grafting, which can be responsible for a part of antibacterial activity either to the antibacterial activity of phenols grafted themselves. Additionally, this antibacterial activity can also be due to the enhancement of hydrophobic property of chitosan due to phenols grafting. This property should favor the interaction with the phospholipids layer, one major component of the

bacterial membrane, and subsequently can enhance the antibacterial activity of chitosan derivatives by increasing membrane permeability according to previous results already reported [44]. Furthermore, the increase of molecular weight and viscosity of chitosan derivatives can enhance their antibacterial activity by forming an impermeable layer around the cell, thus blocking the transport of essential solutes substrates into the cell [45].

On the other hand, the similar antibacterial activities of chitosan and its derivatives against bacterial strains can be mainly attributed to the balance between a decrease of antibacterial activity of chitosan resulting from the reduction of free amino-groups (decreased deacetylation degree) [8] and the antibacterial activity of phenols grafted onto chitosan derivatives.

In the present study, enzymatic functionalization of chitosan by heterogeneous functionalization method could preserve the initial antibacterial activity of chitosan. In other studies already reported, it was found that enzymatic functionalization of chitosan either improved its antibacterial activity [10, 12] or decreased its antibacterial activity [11]. In fact, this property depended on the nature of phenol grafted derivatives and functionalization method (homogeneous or heterogeneous). Generally, using homogeneous method (soluble chitosan), antibacterial activity of chitosan was improved due to protonated amino groups ($-NH_3^+$) available on chitosan which cross-linked with phenolic compounds by electrostatic interactions. The presence of protonated amino groups onto chitosan gave bioadhesive property for negatively-charged microbial surfaces [46]. In this case, antibacterial activity of chitosan was mainly due to both protonated amino groups of chitosan and phenolic compounds. Whereas, using heterogeneous method (chitosan particles), antibacterial activity of chitosan was decreased due to non-protonated amino groups ($-NH_2$) on chitosan which cross-linked with phenolic compounds by covalent bonds [8, 47], thus amino groups of chitosan was not available and the antibacterial activity of chitosan was only due to phenolic compounds. Consequently, this method is not adequate to improve antibacterial activity of chitosan derivatives, but led to the formation of stable chitosan derivatives by covalent bonds with an ecofriendly procedure

4. Conclusion

In the present study, antibacterial activity and some physico-chemical properties of chitosan and its enzymatically functionalized derivatives were investigated. Results demonstrated that enzymatic grafting of oxidized phenols onto chitosan increased its molecular weight and its viscosity. Additionally, this process improved the thermal antioxidant stability of chitosan derivatives allowing their use as natural antioxidant polymer products for applications at high temperature. Furthermore, ethyl ferulate presented high antibacterial activity due to its higher lipophilicity compared to ferulic acid. Additionally, chitosan and its derivatives presented similar antibacterial and mote precisely bactericidal activities against all strains tested. Similar MIC values determined by optical density method and INT method confirmed the validity of the INT method used to determine MIC and MBC as a simple and rapid method.

This work demonstrated the interest of enzymatic functionalization of chitosan to create new functional properties as color, antioxidant activity [8] with high antioxidant stability, high viscosity, thickener property and the preservation of initial antibacterial activity of chitosan. Further works are in progress to prepare films of enzymatically functionalized chitosan derivatives and to study their properties as physico-chemical, antioxidant, and antibacterial in order to produce functional materials for biotechnological applications such as active food-packaging.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of Syrian Ministry of Higher Education and Aleppo-University for financial support.

References

[1] M.N.V. Ravi Kumar, Reactive and Functional Polymers, 46 (2000) 1-27.

[2] S. Sabnis, L.H. Block, International Journal of Biological Macromolecules, 27 (2000) 181-186.

[3] D.G. Kim, Y.I. Jeong, C. Choi, S.H. Roh, S.K. Kang, M.K. Jang, J.W. Nah, International Journal of Pharmaceutics, 319 (2006) 130-138.

[4] M. Rinaudo, Progress in Polymer Science (Oxford), 31 (2006) 603-632.

[5] E.I. Rabea, M.E.T. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, Biomacromolecules, 4 (2003) 1457-1465.

[6] D. Raafat, K. Von Bargen, A. Haas, H.G. Sahl, Applied and Environmental Microbiology, 74 (2008) 3764-3773.

[7] G. Kumar, P.J. Smith, G.F. Payne, Biotechnology and Bioengineering, 63 (1999) 154-165.

[8] A. Aljawish, I. Chevalot, B. Piffaut, C. Rondeau-Mouro, M. Girardin, J. Jasniewski, J. Scher, L. Muniglia, Carbohydrate Polymers, 87 (2012) 537-544.

[9] M. Bozic, S. Gorgieva, V. Kokol, Carbohydrate Polymers, 87 (2012) 2388-2398.

[10] M. Bozic, S. Gorgieva, V. Kokol, Carbohydrate Polymers, 89 (2012) 854-864.

[11] L. Fras-Zemljic, V. Kokol, D. Cakara, Textile Research Journal, 81 (2011) 1532-1540.

[12] F. Sousa, G.M. Guebitz, V. Kokol, Process Biochemistry, 44 (2009) 749-756.

[13] G. Kumar, J.F. Bristow, P.J. Smith, G.F. Payne, Polymer, 41 (2000) 2157-2168.

[14] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, Methods in Enzymology, 299 (1999) 152-178.

[15] S. Nguyen, S. Hisiger, M. Jolicoeur, F.M. Winnik, M.D. Buschmann, Carbohydrate Polymers, 75 (2009) 636-645.

[16] W. Pasanphan, G.R. Buettner, S. Chirachanchai, Carbohydrate Research, 345 (2010) 132-140.

[17] K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, T. Nakamura, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40 (1992) 945-948.

[18] A.F. Sanchez-Maldonado, A. Schieber, M.G. Ganzle, Journal of Applied Microbiology, 111 (2011) 1176-1184.

[19] C. Cueva, M.V. Moreno-Arribas, P.J. Martin-Alvarez, G. Bills, M.F. Vicente, A. Basilio, C.L. Rivas, T. Requena, J.M. Rodriguez, B. Bartolome, Research in Microbiology, 161 (2010) 372-382.

[20] J.N. Eloff, Planta Medica, 64 (1998) 711-713.

[21] A. Barry, Lea and Febiger, 87 (1976) 388-389.

[22] R. Mustafa, L. Muniglia, B. Rovel, M. Girardin, Food Research International, 38 (2005) 995-1000.

[23] J. Ralph, M.T.G. Conesa, G. Williamson, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (1998) 2531-2532.

[24] J. Vartiainen, M. Ratto, R. Lantto, K. Nattinen, E. Hurme, Packaging Technology and Science, 21 (2008) 317-328.

[25] L.Q. Wu, H.D. Embree, B.M. Balgley, P.J. Smith, G.F. Payne, Environmental Science and Technology, 36 (2002) 3446-3454.

[26] T.H. Chen, G. Kumar, M.T. Harris, P.J. Smith, G.F. Payne, Biotechnology and Bioengineering, 70 (2000) 564-573.

[27] N. Cathébras, A. Collet, M. Viguier, J.F. Berret, Macromolecules, 31 (1998) 1305-1311.

[28] B. Nystrom, A.L. Kjoniksen, C. Iversen, Advances in Colloid and Interface Science, 79 (1999) 81-103.

[29] J. Desbrieres, C. Martinez, M. Rinaudo, International Journal of Biological Macromolecules, 19 (1996) 21-28.

[30] C.C. Perry, M. Weatherly, T. Beale, A. Randriamahefa, Journal of the Science of Food and Agriculture, 89 (2009) 958-964.

[31] M. Kong, X.G. Chen, C.S. Liu, C.G. Liu, X.H. Meng, L.J. Yu, Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 65 (2008) 197-202.

[32] J. Rua, L. Fernandez-Alvarez, C. de Castro, P. del Valle, D. de Arriaga, M.R. Garcia-Armesto, Foodborne Pathogens and Disease, 8 (2011) 149-157.

[33] I. Kubo, K. Fujita, K. Nihei, A. Nihei, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (2004) 1072-1076.

[34] R. Merkl, I. Hradkova, V. Filip, J. Smidrkal, Czech Journal of Food Sciences, 28 (2010) 275-279.

[35] D. Stead, Journal of Applied Bacteriology, 75 (1993) 135-141.

[36] G. Tuncel, C. Nergiz, Letters in Applied Microbiology, 17 (1993) 300-302.

[37] A.M. Wen, P. Delaquis, K. Stanich, P. Toivonen, Food Microbiology, 20 (2003) 305-311.

[38] M.E. RamosNino, M.N. Clifford, M.R. Adams, Journal of Applied Bacteriology, 80 (1996) 303-310.

[39] Y. Li, X.G. Chen, N. Liu, C.S. Liu, C.G. Liu, X.H. Meng, L.J. Yu, J.F. Kenendy, Carbohydrate Polymers, 67 (2007) 227-232.

[40] H.K. No, N.Y. Park, S.H. Lee, S.P. Meyers, International Journal of Food Microbiology, 74 (2002) 65-72.

[41] A.A. Tayel, S. Moussa, K. Opwis, D. Knittel, E. Schollmeyer, A. Nickisch-Hartfiel, International Journal of Biological Macromolecules, 47 (2010) 10-14.

[42] Z. Zhong, R. Xing, S. Liu, L. Wang, S. Cai, P. Li, Carbohydrate Research, 343 (2008) 566-570.

[43] F. Shahidi, J.K.V. Arachchi, Y.J. Jeon, Trends in Food Science and Technology, 10 (1999) 37-51.

[44] Y. Hu, Y. Du, J. Yang, Y. Tang, J. Li, X. Wang, Polymer, 48 (2007) 3098-3106.

[45] P. Eaton, J.C. Fernandes, E. Pereira, M.E. Pintado, F. Xavier Malcata, Ultramicroscopy, 108 (2008) 1128-1134.

[46] T.P.T. Cushnie, A.J. Lamb, International Journal of Antimicrobial Agents, 26 (2005) 343-356.

[47] R.A.A. Muzzarelli, G. Littarrua, C. Muzzarelli, G. Tosi, Carbohydrate Polymers, 53 (2003) 109-115.

II.2.3. Contribution de l'article

Cette partie était consacrée à l'étude des propriétés physico-chimiques et antibactériennes des chitosane natif et fonctionnalisés par voie enzymatique. En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, nous avons choisi trois propriétés physico-chimiques (la viscosité, la quantité de phénol greffé et la masse moléculaire) qui jouent un rôle important aux niveaux des propriétés antibactériennes. De plus, la morphologie de la surface du chitosane et la stabilité à la chaleur de l'activité antioxydante ont été évaluées. Dans cette étude, nous avons choisi la méthode de densité optique afin d'étudier l'inhibition bactérienne en fonction de la concentration du chitosane, ainsi que la méthode INT pour étudier l'activité antibactérienne pour déterminer la CMI et CMB et établir ainsi le modes d'action (bactériostatique oubactéricide).

La quantité de produits d'oxydation de l'acide férulique greffé sur le chitosane était presque deux fois plus importante que celle obtenue avec le férulate d'éthyle. En effet, la présence du groupement carboxyle libre sur l'acide férulique permet normalement une plus grande diversité de produits d'oxydation. Par contre, l'esterification du groupement carboxyle sur le férulate d'éthyle conduit à un seul produit lors de l'oxydation enzymatique. Cette hypothèse peut expliquer la grande quantité des produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur le chitosane.

Le greffage enzymatique des produits d'oxydation a augmenté la masse moléculaire des chitosanes fonctionnalisés par rapport au chitosane natif. En outre, le chitosane-AF présente une masse moléculaire (277 kDa) plus importante que celle du chitosane-FE (271 kDa) en raison de la grande quantité des produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur le chitosane en comparaison des produits du férulate d'éthyle. De plus, le greffage enzymatique des produits d'oxydation a fait augmenter la viscosité des solutions des chitosanes fonctionnalisés, notamment pour la solution de chitosane-AF. En effet, l'augmentation de la viscosité peut s'expliquer par la formation de liaisons physiques inter-chaînes résultant notamment des interactions hydrophobes s'établissant entre les chaînes latérales des chitosanes fonctionnalisés. Malgré le fait que le férulate d'éthyle (ester éthylique de l'acide férulique) est plus hydrophobe que l'acide férulique, la viscosité du chitosane-AF était plus

élevée que celle du chitosane-FE ce qui peut être dû à la grande quantité de produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur le chitosane. Ensuite, les chitosanes fonctionnalisés ont présenté une bonne stabilité de l'activité antioxydante vis-à-vis de la température (100°C pendant 60 min). Cette propriété permettrait l'utilisation des chitosanes fonctionnalisés dans applications utilisant une température élevée. Il est également important de noter que les particules des chitosanes fonctionnalisés ont présenté une plus grande hétérogénéité de surface en comparaison avec le chitosane natif. Par ailleurs, les résultats concernant les propriétés antibactériennes ont montré que les bactéries à Gram-positif ont été plus sensibles que celles à Gram-négatif vis-à-vis de l'action des différents chitosanes. Cette sensibilité différente peut être issue de la différence dans la structure de l'enveloppe cellulaire. Par conséquent, la résistance des souches bactériennes testées contre le chitosane et ses dérivés a diminué dans l'ordre suivant: *S. enterica> E. coli> S. aureus> L. monocytogenes*.

L'éthyl férulate a présenté une activité antibactérienne plus élevée en raison de sa grande lipophilie en comparaison avec celle de l'acide férulique. Ainsi, le chitosane natif et ses dérivés ont montré la même activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes testées. Ce résultat peut être dû à l'équilibre entre la diminution de l'activité antibactérienne du chitosane résultant de la réduction des groupements aminés libres et l'activité antibactérienne des phénols greffés sur le chitosane. En effet, l'activité antibactérienne des chitosanes fonctionnalisés peut être issue des groupements amines libres restant sans greffage, des composés phénolique greffés, de la viscosité élevée, de la masse moléculaire élevée et de l'hydrophobie élevée. Ainsi, selon les valeurs de CMI et de CMB, l'activité antibactérienne du chitosane natif et de ses dérivés était bactéricide en raison des valeurs similaires de CMI et CMB.

Enfin, cette procédure a permis d'apporter de nouvelles propriétés physico-chimiques aux chitosanes fonctionnalisés telles que la stabilisation de l'activité antioxydante vis-à-vis de la température, une viscosité plus élevée ce qui permet d'envisager son emploi comme épaississant. De plus, cette procédure a permis de préserver l'activité antibactérienne initiale du chitosane natif. Ainsi, ces nouvelles propriétés du chitosane fonctionnalisé élargissent les champs d'application du chitosane dans différents domaines comme ingrédients alimentaires.

II.3. Propriétés biologiques : adhérence et croissance des cellules HUVEC et Caco2 sur les films de chitosanes

II.3.1. Introduction

L'intérêt des biomatériaux polymères augmente d'année en année. Les biomatériaux à visée clinique, doivent avoir d'excellentes propriétés de surface. En effet, la surface du matériau venant en contact directement avec le tissu vivant lorsque le matériau est implanté dans le corps, la réponse de l'organisme vis-à-vis de ce matériau, notamment l'adhérence cellulaire dépendra de ses propriétés physico-chimiques telles que la rugosité de surface, la topographie de surface, la rigidité, la cristallinité, le comportement de gonflement, la teneur en eau, la balance hydrophobie/hydrophilie, la charge de surface, la présence de groupements fonctionnels,… (Hou *et al.*, 2004 ; Roach *et al.*, 2007). Ces propriétés peuvent directement influencer l'adsorption des protéines d'adhésion (Vitronéctine, fibronéctine) et donc les interactions cellulaires ultérieures avec la surface du matériau.

Depuis plusieurs années, le chitosane a reçu une attention accrue comme biomatériau polymère prometteur avec des applications variées dans les industries pharmaceutiques et biomédicales. Le chitosane est devenu un biomatériau très prometteur en raison de sa biodégradabilité, sa biocompatibilité, sa non-toxicité et son faible coût (Sabnis et Block, 2000). Plus récemment, les propriétés du chitosane et de ses dérivés par voie chimique ou enzymatique ont été étudiées pour différentes applications telles que dans la cicatrisation des plaies et l'ingénierie tissulaire (Shi *et al.*, 2006) .

Cependant, malgré les multiples applications potentielles du chitosane, son utilisation reste limitée à cause de sa faible solubilité à pH neutre et par des propriétés physiques peu favorables. En effet, le chitosane est rigide et cassant (fragilité élevée), ce qui est une conséquence directe de liaisons hydrogènes fortes intra- et intermoléculaire. En outre, les films de chitosane présentent une faible adhérence cellulaire probablement liée à son caractère hydrophile élevé (Holmes et Tabrizian, 2011). Par conséquent, de nombreux travaux ont été rapportés concernant la modification des propriétés physico-chimiques et mécaniques du chitosane par voie chimique afin d'obtenir une augmentation de caractère hydrophobe et ainsi

d'accroître son affinité vis-à-vis de cellules humaines différenciées (Bettini *et al.*, 2008 ; Hozumi *et al.*, 2010 ; Neamnark *et al.*, 2007 ; Roach *et al.*, 2007).

La modification du chitosane peut améliorer certaines propriétés d'intérêt pour les applications biomédicales telles que sa solubilité à pH neutre (Jin *et al.*, 2009 ; Kumar *et al.*, 1999 ; Sakai *et al.*, 2009), et également introduire d'autres propriétés telles que l'apport d'un équilibre hydrophile/hydrophobe à la surface du chitosane (Nagaoka *et al.*, 1992 ; Neamnark *et al.*, 2007) ainsi que la possibilité de maintenir des propriétés de bioadhérence (Hoffman *et al.*, 1997) et de biodégradabilité (Singh et Ray, 1998). Récemment, des enzymes oxydatives tels que les laccases, les tyrosinases et les peroxidases ont démontré être des biocatalyseurs potentiels stéréo-sélectifs pour le greffage de phénols oxydés sur le chitosane (Bozic Mojca *et al.*, 2012a ; Bozic M. *et al.*, 2012b ; Sousa *et al.*, 2009), apparaissant ainsi comme des alternatives intéressantes par rapport aux approches chimiques non spécifiques.

Dans ce contexte, les propriétés biologiques concernant l'adhésion et la croissance cellulaire de films de chitosane natif et fonctionnalisé par l'acide férulique ou le férulate d'éthyle ont été évaluées. Les chitosanes fonctionnalisés à base d'acide férulique et de férulate d'éthyle ont été produits en présence de la laccase de *Myceliophtora thermophila* à 30 °C, en milieu aqueux. Les films ont été produits dans des plaques 24 puits ($2cm^2$ / puits) et stérilisés par les rayons UV pendant 15 min. Dans un premier temps, ce travail a consisté à mesurer l'épaisseur du film, la quantité de phénols oxydés greffés et la capacité d'adsorption de protéines. Dans un deuxième temps, la morphologie des cellules HUVEC et la viabilité cellulaire ont été évaluées. L'étude qui suit est présentée sous forme d'une publication qui sera soumise dans *Journal of Biomaterials*.

II.3.2. Adhesion and viability of endothelial cells on chitosan films enzymatically functionalized with phenolic compounds

Abdulhadi Aljawish[a], Lionel Muniglia[a], Jordane Jasniewski[a], Joël Scher[a], Isabelle Chevalot[b,*].

[a] Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602-F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[b] *Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP-UMR 7274), 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA40602-F-54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

Projet de publication-Journal of "Process Biochemistry"

Abstract

Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) growth on chitosan films and on chitosan derivatives films enzymatically functionalized with ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) was assessed by evaluating of their adhesion, morphology and viability.

Chitosan derivative films exhibited improved protein adsorption properties compared to chitosan films. The cell morphology indicated a well attachment and spread phenotype of HUVEC cells on chitosan derivative films while these cells often did not spread and remained round on chitosan films. Cell viability showed improved cell adhesion on chitosan derivative films compared to chitosan film and this adhesion was enhanced with the quantity of oxidized phenols grafted. In addition, FA-/EF-chitosan films exhibited almost similar cell adhesion. Furthermore, cell adhesion was increased with the film thickness all films. These results demonstrate that oxidized phenols grafting on chitosan is promising process to achieve enhanced cell adhesion and to create useful functional biomaterials.

Keywords: Chitosan films; chitosan derivatives enzymatically functionalized; cell adhesion; HUVEC cells.

Corresponding author: Tel.: +33 383595795; Fax: +33 383595804

[*]E-mail address: isabelle.chevalot@univ-lorraine.fr (I. Chevalot)

1. Introduction

Any biomaterial that is clinically used must have excellent properties in bulk as well as on the surface. As the biomaterial surface first comes into contact with the living tissue when the biomaterial is placed inside the body, the initial response of the body to the biomaterial depends on physico-chemical nature of this biomaterial such as surface roughness, surface topography, stiffness, crystallinity, swelling behaviour, water content, hydrophobicity/hydrophilicity, surface charge, chemical functionalities, etc [1-3]. These properties may directly influence adsorption of adhesion proteins and subsequent cellular interactions [4].

Chitosan, a deacetylated form of chitin, is a natural polymer composed of 2-amino-2-deoxy-D-glucose and 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose units. For several years chitosan received increased attention as one promising polymeric materials with a wide large number of applications in pharmaceutical and biomedical industries [5, 6]. Chitosan became an interesting biomaterial due to its good biodegradability, biocompatibility, no toxicity and low cost, which provide it with huge potential for future development [7]. More recently, the potential value of chitosan and its derivatives has been investigated for different applications such in wound healing and tissue-engineering [8].

Despite the vast applicabilities of chitosan, its utilization is somewhat limited by its poor solubility in neutral pH, poor workability and its physical properties that are rigid and brittle (high brittleness), a direct result of the strong intra- and inter-molecular hydrogen bonding. Furthermore, chitosan membrane alone adheres to tissues but does not show cell attachment due to its high hydrophilicity [9, 10]. Consequently, several works have been attached to chemically modify physicochemical and mechanical properties of chitosan such as the increase of hydrophobic character as well as affinity for differentiated human cells [2, 11-13].

Chitosan modification can improve some interest properties for biomedical application such as increasing solubility in neutral pH [14-16] and also induce other desired properties such as the induction of balance between the hydrophilic and hydrophobic properties on the chitosan surface [13, 17] with possibility to maintain some interesting properties such as

mucoadhesivity [18] and biodegradability [19] and thus enlarge the field of its potential applications. Recently, the use of oxidative enzymes such as tyrosinases, laccases and peroxidases have been shown as potential regio- and stereo-selective catalysts for grafting of oxidized phenols onto chitosan [20-23], being an attractive alternative to toxic, environmentally unfriendly, and non-specific chemical approaches.

The purpose of the present work is to study biological properties of cell adhesion and viability on chitosan and its enzymatically functionalized derivatives films. In fact, chitosan as solid particles has been enzymatically functionalized with ferulic acid and ethyl ferulate under mild conditions (T 30°C and pH 7.5) in aqueous medium. Consequently, the phenolic compounds have been covalently grafted thanks to laccase catalysis onto the free amino groups of chitosan at region C-2 via Schiff base bond (N=C) [24]. In this study, chitosan and its derivatives films were prepared with solution-casting technique as a function of grafted phenols quantity and film thickness in 24-well plate. The adhesion and growth of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) on chitosan and its derivatives films have been investigated.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan HMW (high molecular weight, Mw 310-375 kDa) was purchased from Sigma-Aldrich (France). Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Endothelial Basal Medium, Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium (D-PBS), methyl thiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and neutral red uptake were purchased from Sigma (Germany). Acetic acid was purchased from Prolabo (France). Ethanol and isopropanol were obtained from Carlo Erba (Milwaukee, WI, USA).

2.2. Chitosan derivatives by enzymatic functionalization

Enzymatic functionalization of chitosan by grafting of laccase-catalyzed oxidation products of ferulic acid (FA) and ethyl ferulate (EF) was performed according to method [24]. The reactions were carried out at 30°C by adding 5 ml of methanol solution of 50 mM FA or

EF, 45 ml of phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) and 1g of chitosan particles in the beaker. The reactions were started by adding 0,13 ml of Suberase® (13.5 U/ml of laccase). In present study, enzymatic functionalization of chitosan was carried out at two temps (4 h, 16 h).

2.3. Determination of phenolic content onto chitosan derivatives

In present work, phenolic content onto chitosan derivatives was indirectly determined by measuring the content of phenols remained in reaction medium. After 4h and 16h of functionalization temps, the chitosan derivatives were recovered by filtering the reaction medium under vacuum with Ministar-RC membranes (Sartorius, porosity 0.2 µm). Later on, chitosan derivatives recovered were extensively washed with an abundant amount of phosphate buffer pH 7.5, methanol, ethanol and then acetone to remove all traces of substrates adsorbed by electrostatic forces. Then, the initial reaction medium and washing liquid were quantitatively accumulated for evaluate the phenolic content non-grafted onto chitosan derivatives (phenols remained in reaction medium).

Content of phenols remained in reaction medium after 4h and 16h of functionalization temps were determined by the method [25]. Briefly, 1 ml of accumulated liquid was mixed with 1 ml of 10% sodium carbonate (Na_2CO_3) and then this mixture was left for 10 min at 38°C. Later on, 1 ml of Folin- Ciocalteau reagent (1/3) was added to the mixture and then it was shaken for 15 min in the dark at room temperature. Absorbance was measured at 660 nm using a UV–visible spectrophotometer (Shimadzu UV- 1605). Gallic acid (40 µg/ml) and water were used as standard and blank, respectively. The phenolic content was calculated by the following equation (1) resulted from gallic acid as a standard:

$$y = 0.009\ x\ (R^2\ 0.9997) \qquad (1)$$

where (y) is the absorbance value at 660 nm and (x) is the concentration of phenol non-grafted (mg/ml).

2.4. Preparation of chitosan derivatives films

Chitosan and its derivatives solutions (0.5%, w/v) were prepared by dissolving chitosan and its derivatives powder in aqueous acetic acid (1%, v/v) and stirred overnight at 700 rpm and room temperature. Chitosan films were prepared in 24-well plates. In every essay, two 24-well plates were prepared for study cellular adhesion as a function of three parameters: the chitosan type, the film thickness and the phenols grafted quantity onto the chitosan.

The first 24-well plate was prepared by adding 1 ml in each well, while the second 24-well plate was prepared by adding 3 ml in each well for obtain different film thickness. Each plate was prepared as a function of the chitosan type and the phenols grafted quantity onto the chitosan at 4 h and 16 h of functionalization temps as following order: two columns with FA-chitosan derivative, two columns with EF-chitosan derivative, a column with chitosan and a column without chitosan (control). Drying process has taken place at room temperature for two days under the flow hood to avoid dusts. Thus, in each well, thin films were formed containing 2.5 mg (1 ml) or 7.5 mg (3 ml) chitosan.cm^{-2}. Dried chitosan films were neutralized by incubation with 1 M NaOH for an hour, followed by washing with distilled water up to reach pH 7-8. Then, neutralized films were kept with phosphate-buffered saline (PBS) up to use. Finally, before use, chitosan films were sterilized for 30 min with UV rays.

2.5. Characterisation of chitosan-based films

2.5.1. Thickness measurement

The film thickness was measured using the standard NF Q 03-016 with a manual micrometer (Messmer, London, England) equipped with a head measuring 5 mm in diameter a sensitivity of 2 µm. The thickness was measured in 5 randomly selected points on each film and then an average value of three films was calculated (µm).

2.5.2. Color measurement

Measurements were carried out with a Minolta CM, CR-210 colorimeter (Minolta, Colombes, France) employing the parameters L*(lightness) a* (redness) and b* (yellowness)

defined in the CIELab system [26]. Measurements were taken as the average of at least three points on the center and the outer periphery of each film. Color difference (ΔE) was the magnitude of the resultant vector of three component differences: lightness difference (ΔL); red–green chromaticity difference (Δa); and yellow–blue chromaticity difference (Δb). Color differences were calculated using the following equation (2):

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (2)$$

Where $\Delta a = a_i - a_0$, $\Delta b = b_i - b_0$ and $\Delta L = L_i - L_0$. The index i, indicated the values observed for chitosan derivative films and index 0, indicated the values observed for chitosan film (reference).

2.5.3. Surface morphology

Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the surface morphology of chitosan and its derivatives films. The films were examined with a Hitachi SEM S2500 instrument operating at 10 kV. They were placed at the surface of a sticky plastic circle fixed on a support. Then, the samples were coated with gold particles by sputtering (Bio-Rad type SC 502). Different magnifications were performed: 50×, 100×, 200× and 500×.

2.5.4. Water sorption isotherms

Water sorption isotherms were determined gravimetrically using DVS technique (Surface Measurement Systems, London, UK) equipped with a Cahn microbalance. The DVS apparatus monitors the moisture sorption capacities of chitosan films as function of relative humidity (RH). The changes in sample weight over time at 25 °C and at any desired RH (between 0% and 98%) were recorded. About 10-15 mg of sample was loaded onto the quartz sample pan. The program was initially set to control the humidity at 0% for 12 h (drying phase). This step allowed the sample water activity to decrease to zero and internally equilibrate. The sample was then subjected to successive steps of 10% RH increase, up to 98%. For each step, mass changes (m) and the rate of mass changes (dm/dt) were plotted against time. The equilibrium was considered to be reached when changes in mass with time

(dm/dt) were lower than 0.002%/min (i.e. 2 g water/100 g db/day). All experiments were run at 25°C and 2-4 tests were carried out for each sample. The accuracy of the system was ±1.0% RH and ± 0.2°C, respectively.

2.5.5. Protein adsorption on films

Protein adsorption on films have been evaluated in accordance with method [10] with minor modifications. Before the evaluation of protein adsorption, the 24-wall plate containing chitosan films was sterilized with 70% (v/v) ethanol for 1h and then washed three times (20 min each wash) in 1x sterile phosphate buffered saline without calcium (PBS) buffer, pH 7.2 to ensure complete of the ethanol.

For evaluate of protein adsorption, the sterile 24-wall plate was incubated by 1 ml of complete cell culture medium (Endothelial Cell Growth Medium, ECGM) in each well containing chitosan films under same conditions of cell culture (at 37°C and a humidified atmosphere of 5% CO_2). Control included wells without chitosan films. After 24 h of incubation, the cell culture medium was removed, and films were rinsed twice in 1 x sterile phosphate-buffered saline without calcium (PBS) buffer. Then, the cell culture medium removed and washing liquid were quantitatively accumulated for evaluate the protein content non-adsorbed onto chitosan films. The concentration of total proteins in the accumulated solution and in initial cell culture medium was determined *via* the bicinchoninic acid (BCA) method with a kit from Sigma (France). Analysis was performed at an absorbance of 562 nm using microplate spectrophotometer (multiscan GO W382TA, Thermo Scientific MIB, France). Each protein concentration was calibrated using a concurrently produced standard curve using the bovine serum albumin in phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) provided with the assay kit.

2.6. Biological characterizations

2.6.1. Cells and cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, UK) and cultivated in Endothelial Basal

Medium (Sigma-Aldrich, France). The medium was prepared by addition of the growth supplement (3%) (Sigma-Aldrich, France). HUVEC cells (Sigma-Aldrich, France) were cultivated between passages 1 and 7. The cells were usually split when reaching 80% confluence (5-7 days). They were first rinsed with Dulbecco's phosphate-buffered saline without calcium (D-PBS) and then trypsinised with a solution containing 0.25% trypsin and 1 mM EDTA (GIBCO, USA) and counted by Thoma cell under an optical microscope. For maintenance of the cell line, the cells were seeded at 2.10^4 cells/cm^2 in flasks. All experiments of cytotoxicity evaluation were performed between the passage 3 and 6.

2.6.2. Cell adhesion and viability of chitosan derivatives films

For cell adhesion and viability experiments, sterile 24-well plate containing chitosan films was filled with 1 ml of diluted HUVEC cells at 1.10^5 cells/well (5.10^4 cells/cm^2). Cells were allowed to attach for 4 days at 37°C under 5% CO_2 atmosphere. The images of attached cells were taken using an optical microscope equipped with a digital camera (Nikon).

2.6.2.1. Cell morphology and attachment

For analysis of cell morphology and attachment, culture medium was removed after 3 days of incubation and then chitosan films were rinsed once in PBS. Cell morphology were observed under an inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and images were taken at 10x and 32x magnification by a digital camera (DXM1200F, Nikon) in the presence and the absence of chitosan films.

2.6.2.2. Cell viability evaluation

The cell viability of chitosan films was determined using MTT assay. MTT method (the colorimetric methylthiazoletetrazolium method) is based on the reduction of the tetrazolium salt, methyl thiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) into a crystalline blue formazan product by the cellular oxidoreductases of viable cells [27]. The resultant formazan crystal formation is proportional to the number of viable cells. Following 4 days incubation, 200 µl of MTT (5 mg/ml in PBS, pH 7.4) was added to all wells and the plate was then incubated at 37°C under 5% CO_2 atmosphere for 4 h. Medium with MTT was then gently aspirated from

test cultures and 1 ml of isopropanol was added to all wells for dissolving of the formazan crystals. The plates were then shaken at room temperature for 10 min and the absorbance was read at 540 nm in a microplate reader. The relative cell viability was calculated according to the following equation (3):

$$\text{Cell viability (\%)} = ((1- (Abs_{\text{treated cell}}/Abs_{\text{control}})) \times 100 \qquad (3)$$

where $Abs_{\text{treated cells}}$ (with film) and Abs_{control} (without film) are the absorbance values at 540 nm of sample with treated cells and control, respectively. Each test was carried out in quadruplicate, and each experiment was repeated thrice.

3. Results and discussion

3.1. Determination of phenolic content onto chitosan derivatives

The content of phenols remained in reaction medium was determined using gallic acid as a standard after 4 h and 16 h of enzymatic reaction. As shown in Table 1, the quantity of FA-oxidation products grafted onto chitosan was almost 50% and 90% of total quantity of ferulic acid used after 4 h and 16 h of enzymatic reaction, respectively. The quantity of EF-oxidation products grafted onto chitosan was almost 30% and 46% of total quantity of ethyl ferulate used after 4h and 16 h of enzymatic reaction, respectively. Consequently, the quantity of FA-oxidation products grafted onto chitosan was almost two times higher than that of EF-oxidation products.

Table 1: Determination of phenolic content onto FA or EF-chitosan derivatives

	Reaction time (h)	Ferulic acid (FA)	Ethyl ferulate (EF)
Grafted phenol percent (%)	4	50.2 ± 3.5	30.5 ± 2.1
	16	90.5 ± 4.3	46.4 ± 2.9
µg of phenol /mg of chitosan	4	24.5 ± 1.0	17.0 ± 1.5
	16	44.0 ± 2.0	25.5 ± 2.5

Each value represents the average ± standard deviation of three independent experiments

In fact, the presence of a free carboxyl group in ferulic acid structure led to several oxidation products as reported in previous study with laccase [28], whereas the esterification of carboxyl group in ethyl ferulate structure led to a single oxidation product as also already reported with peroxidase [29]. This hypothesis may explain the higher amount of FA-oxidation products grafted onto chitosan derivative compared to EF-oxidation products.

3.2. Characterisation of chitosan-based films

3.2.1. Color measurement

To verify the progress of functionalization reaction and the homogeneity of chitosan and its derivatives films, the color parameters (a*, b* and L*) and ΔE values of chitosan particles were determined in Table 2. The values of color parameters (a*, b* and L*) of AF-chitosan films were significantly different (ΔE = 30.1) when compared with those of chitosan films. Indeed, with the products grafting of laccase-catalyzed oxidation of FA onto the chitosan film, redness and yellowness increased and lightness decreased leading to a colored FA-chitosan films (yellow-orange). On the other hand, the color parameters of chitosan films and EF-chitosan films were very similar and color difference ΔE was not significant as shown in Table 2. Therefore, EF-chitosan films were colorless.

Table 2: Color parameters (a*, b* and L*) and color difference (ΔE) of chitosan and its derivatives films after 4 h of functionalization reaction.

Films	L* (lightness)	a* (redness)	b* (yellowness)	ΔE (Color difference)
Chitosan	86.7 ± 0.8	1.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0
FA-chitosan	70.6 ± 0.6	5.8 ± 0.2	26.9 ± 1.4	30.1 ± 1.3
EF-chitosan	82.4 ± 1.1	1.5 ± 0.1	2.4 ± 0.2	4.2 ± 0.2

Each value is expressed as mean ± standard deviation (n =3).

3.2.2. Surface morphology

The SEM micrographs of chitosan films as influenced by the grafting of laccase-catalyzed oxidation products of ferulic acid or ethyl ferulate were shown in Fig. 1. Results

showed that chitosan film presented more homogenous surface than chitosan derivative films. FA-chitosan film surface was more heterogeneous than EF-chitosan film surface. In fact, heterogeneous surface of chitosan derivative film is probably due to oxidized phenols grafted. Additionally, high heterogeneous surface of FA-chitosan derivative film is due to high quantity of FA-products grafted compared to EF-products grafted as reported in previous study [24].

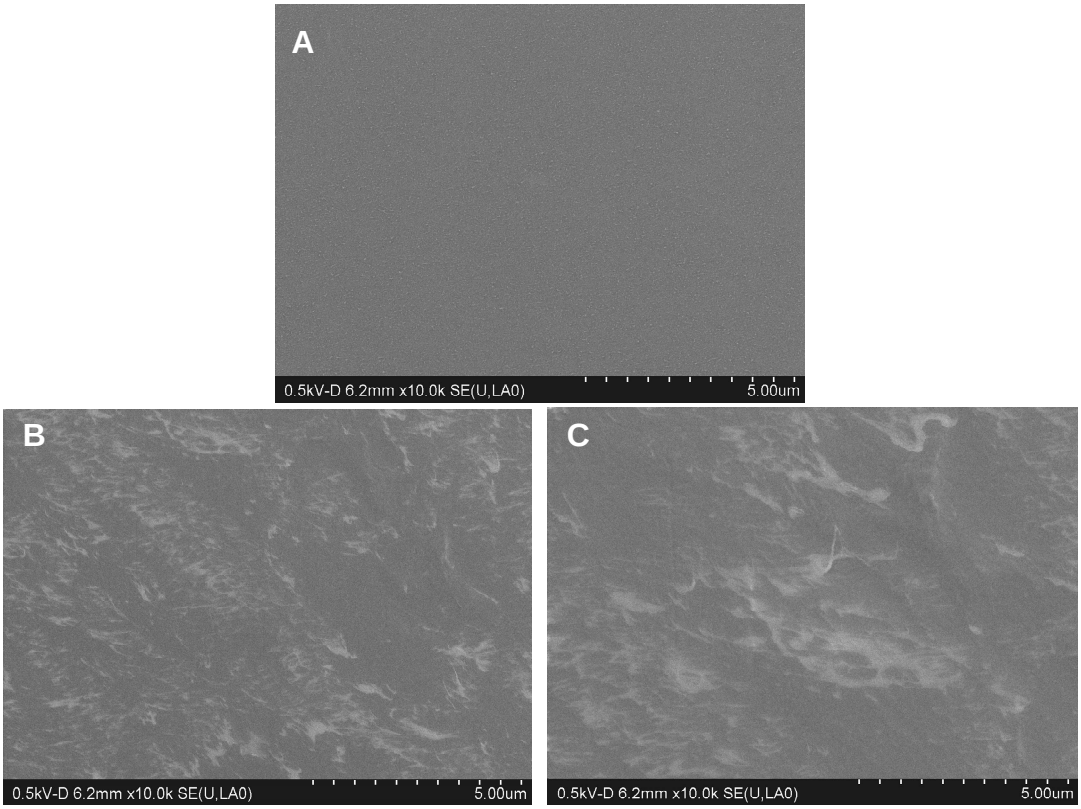


Fig. 1: SEM micrographs of film surface of chitosan (A), FA-chitosan derivative (B), and EF-chitosan derivative (C).

3.2.3. Water sorption isotherms for films hydrophobicity evaluation

To describe water sorption isotherms, a popular GAB model was applied [30] and the parameters of this model X_m and C were determined on the way of adjustment of the curves of the model with the experimental results. The water sorption isotherms of chitosan and its derivatives films at 25°C are presented in Fig. 2. All the water sorption curves of the films are sigmoid in shape, revealing a slower increase in the equilibrium moisture content until

relative humidity 70%; thereafter, there is a dramatic increase in the slope of the isotherm, indicating the presence of non-bound or free-state water associated with enhanced solubilization as described by Su et al. [31].

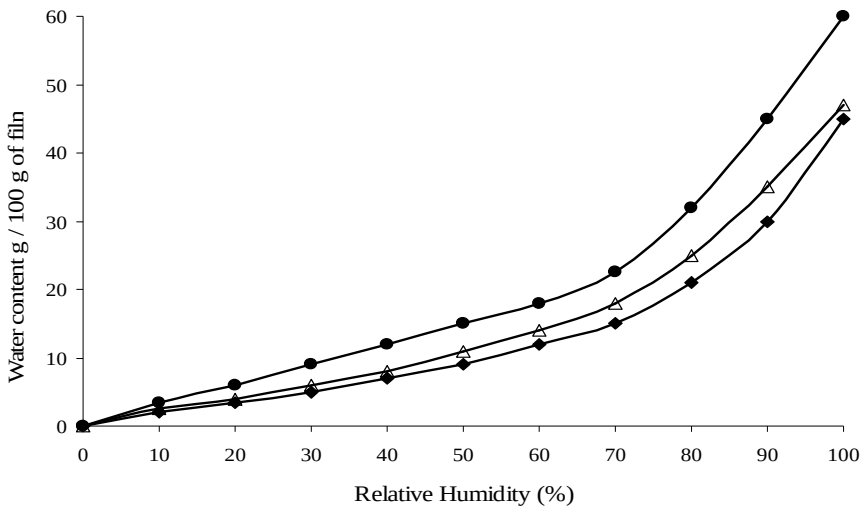


Fig. 2: Water sorption isotherm of chitosan film (●), EF-chitosan film (Δ) and FA-chitosan film (♦) estimated at 25°C from 0% to 98% RH.

As presented in Table 3, the values of GAB parameters, X_m and C, of chitosan films were more important than that of chitosan derivative films. Additionally, FA-/EF-chitosan derivative films presented similar values of the monolayer water content. In fact, value of the monolayer water content (X_m) (g of water/100 g of dry base) and the value of constant C, related to the water-substrate interaction energy. High values of GAB parameters of chitosan films is due to the greater hydrophilic nature of this polymer and to the stronger interactions established between water molecules and functional groups of chitosan (-OH, $-NH_2$) as a result of the interactions of the type of hydrogen bonds. Whereas, the grafting of oxidized phenols onto chitosan derivatives reduced the water amount bound to specific polar sites of chitosan due to the presence of phenolic hydrophobic site chains. These results suggested that chitosan derivative films are more hydrophobic than chitosan films. Furthermore, similar X_m values of both chitosan derivatives indicated that their hydrophobic properties are similar due to the high quantity of FA-products grafted and the high hydrophobicity of EF-products grafted as reported in a previous study [24].

Table 3: Parameters obtained from the fitted curves with GAB model for chitosan and its derivatives films

Film	X_m	C	R^2
chitosan	7.83	8.97	0.99
FA-chitosan derivative	6.44	5.07	0.98
EF-chitosan derivative	6.48	7.38	0.99

X_m: monolayer moisture content g of water/100 g of dry base; C: constant of GAB model.

3.2.4. Protein adsorption on chitosan and its derivatives films

As *in vivo* protein adsorption plays a key role in mediating cell-surface interactions, total protein adsorption on chitosan and its derivatives films was determined (Fig. 3). After 24 h of incubation with complete cell culture medium, higher total protein adsorption occurred in wells without film (control). Chitosan films presented low total protein adsorption compared to chitosan derivative films and control (without film). Additionally, no significant differences in total protein adsorption were observed between chitosan derivative films and control (without film).

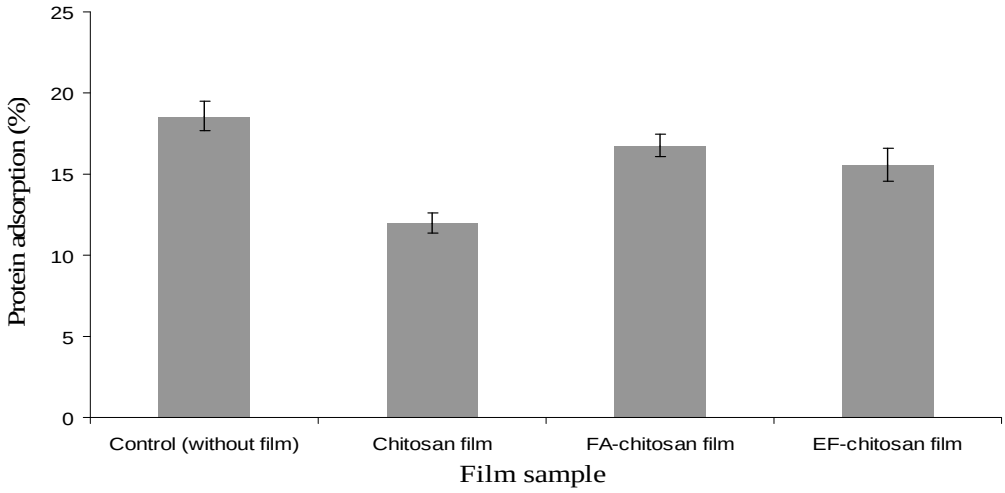


Fig. 3: Total protein adsorption to chitosan films, FA/EF derivative films and control (without film) compared to total protein of complete cell culture medium (ECGM)

In general, hydrophobic surfaces tend to adsorb larger amounts of proteins than hydrophilic surfaces [32, 33]. As plate 24 well is composed from polystyrene, high total protein adsorption can be due to high hydrophobicity of polystyrene. While, low total protein adsorption of chitosan film can be due to its high hydrophilicity. Furthermore, high total protein adsorption of FA-/EF-chitosan derivative films can be due to their high hydrophobicity compared to chitosan films as shown above. Additionally, a previous study showed that that FA-/EF-chitosan derivatives presented high hydrophobicity compared to chitosan due to oxidized phenols grafted [24]. The lack of differences in total protein adsorption between FA/EF chitosan derivative films may be probably due to the almost similar hydrophobicity of FA and EF chitosan films. In fact, the high quantity of FA-products grafted and the high hydrophobicity of EF-products grafted can lead to similar FA-/EF-film hydrophobicity [24]. Furthermore, high protein adsorption on FA/EF chitosan derivative films can be due to their heterogeneous surface producing from oxidized phenols grafting as presented above. In general, it was shown that protein adsorption was improved on heterogeneous and roughness surface [2]. In previous study, blood protein adsorption increased significantly as film surface roughness of polyester urethane and poly (lactic acid-co-glycolic acid) increased [34].

3.3. Biological characterizations

3.3.1. Cell morphology and attachment

Attachment of cells on the surface of a material is one of the prerequisites for evaluation its biological compatibility for possible use in biomedical applications. HUVEC cells were cultured on chitosan and its derivative films for 3 days. Results showed that the HUVEC cells attached more on control (without film) than on chitosan and its derivative films (Fig. 4-A). Furthermore, HUVEC cells attached more on chitosan derivative films than on chitosan films.

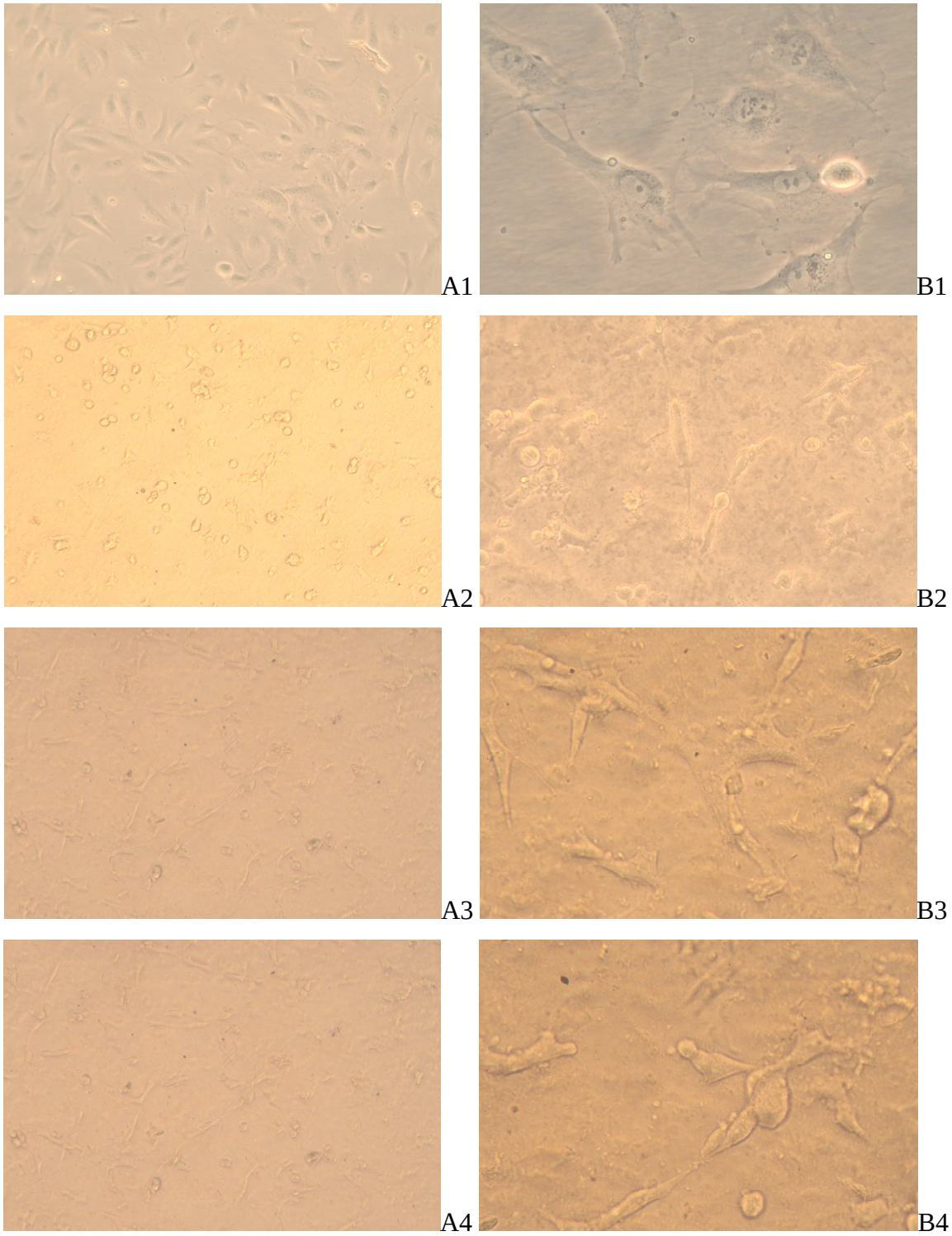


Fig. 4: Photos of HUVEC cell cultivated for 3days on films of chitosan (A2, B2), FA-chitosan (A3, A3) and EF-chitosan (A4, B4) compared to control (without film) (A1, B1) by optical microscope (Olympus, Tokyo, Japan) at 10x (A) and 32x (B) magnifications

The observation of cell morphology of HUVEC cells as presented in Fig. 4-B revealed that HUVEC cells on chitosan films were adhered but they often did not spread and remained round. Whereas, HUVEC cells on chitosan derivative films demonstrated a well attachment and spread phenotype. Furthermore, on chitosan derivative films, HUVEC cells exhibited different cell morphology compared to control (without chitosan) that can be probably due to the different attachment mechanisms of cells cultured on the different surfaces. In addition, the evidence of cell-to-cell interaction was indicative of non-cytotoxic response of the HUVEC cells to the phenolic substrate on chitosan derivative films.

3.3.2. Cell viability

The cell viability was evaluated on chitosan and its derivative films towards HUVEC cells by evaluating the reduction of MTT to formazan crystals over 4h. As presented in Fig. 5, it was found that chitosan derivative films exhibited improved cell viability compared to chitosan films. The cell viability increased as the quantity of oxidized phenols grafted onto chitosan was increased for chitosan derivative films. In addition, FA-/EF-chitosan derivative films showed almost similar cell viability towards HUVEC cells mainly due to similar total protein adsorption.

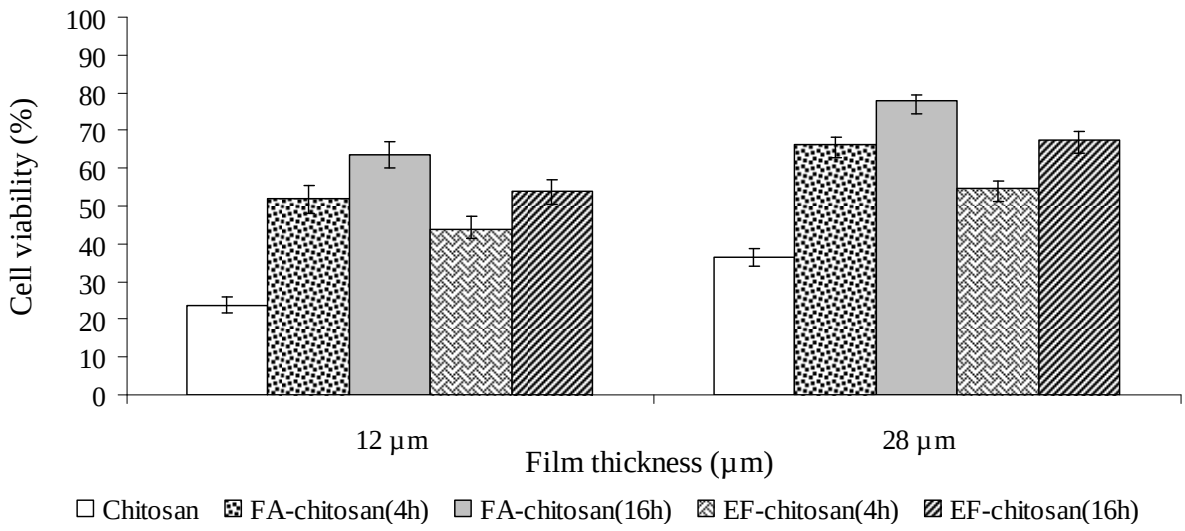


Fig. 5: Effect of film thickness and oxidized phenols grafted on HUVEC viability of chitosan and its derivatives films

Furthermore, two thicknesses were used to study the influence of film thickness on the cell adhesion. Using a manual micrometer, it has been found that 1 ml and 3 ml of chitosan solution (0.5% v/v) in each well (2 cm^2) of 24-well plate provided chitosan films with 12 µm ± 1 and 28 ± 2, respectively. Results indicated that cell viability for all films increased as the film thickness was increased according to results of Uygun et al, 2010 who studied the influence of film thickness on cell adhesion. These authors found that rat mesenchymal stem cells (MSCs) and rat hepatocyates cultivated on chitosan films of various thicknesses demonstrated significant improved cell adhesion, spreading and proliferation as film thickness was increased [35]. These authors showed that the increases in cell spreading with membrane thickness could be correlated with microstructural changes in the film as the thickness was increased. In fact, the analysis of film crystalline structure by X-ray diffraction (XRD) revealed an increased amorphous fraction in films with increasing thickness. Additionally, the level of vitronectin binding increased proportionally with increasing film thickness due to changes in film microstructure (crystallinity). Finally, the improved cellular responses were likely due to enhanced adsorption of the serum adhesion protein vitronectin, presumably due to reduced film crystallinity [35]. These results demonstrated that film thickness was an important design variable that can be manipulated in chitosan-based scaffolds to achieve enhanced cell spreading, proliferation and growth.

In the studies already reported, it was found that chitosan film alone showed slightly cell adhesion property due to its high hydrophilicity which is related to its high content of hydroxyl (-OH) and free primary amino groups ($-NH_2$) [9, 10]. Therefore, different authors reported the modification of chitosan properties such as physicochemical and mechanical properties for enhancing of cell adhesion. For example, the chemical modification of chitosan by polyethylene glycol (PEG) improved the protein adsorption and cellular adhesion, growth and proliferation of 3T3 embryonic mouse fibroblasts [36]. In other study, the chitosan modification with hexanoyl chloride via a heterogeneous acylation reaction increased its hydrophobicity and its biocompatibility of fibroblast-like cells (L929) [13]. The presence of sucrose or raffinose with phosphate salts in the chitosan film-forming solution affords smooth, amorphous materials in the form of soft and elastic film with optimal biocompatibility of endothelial HUVEC cells [12]. As an attractive alternative to toxic,

environmentally unfriendly and non-specific chemical approaches, the enzymatic modification by oxidative enzymes for oxidized phenols grafting onto chitosan is promising method of chitosan modification [22].

The grafting of oxidized phenols onto chitosan can induce a balance between the hydrophobic and hydrophilic properties which can improve cell adhesion. In fact, FA-/EF-oxidized phenols grafting could increase hydrophobic properties of hydrophilic chitosan due obviously to the presence of the hydrophobic side chains of oxidized phenols grafted [24]. In previous work, *N*-acyl chitosan, especially *N*- hexanoyl chitosan, showed best cell adhesion due to the induction of balance between the hydrophobic and hydrophilic properties on the surface [13]. In fact, high hydrophilic surface of materials which contains high water levels within the surface can reduce both protein adsorption and cell adhesion on the polymeric surface [1, 37]. Whereas, despite high hydrophobic surfaces tend to adsorb larger quantity of proteins than hydrophilic surfaces [32, 33], these proteins adsorb more strongly and thus cell adhesive proteins (fibronectin and vitronectin) can not displace it [38]. Thus, it was found that the moderate hydrophobic surfaces are more favorable for cell adhesion such as for HUVEC and HeLa cells [38].

Furthermore, the grafting of FA- or EF- oxidized phenols onto chitosan can change its functional groups. In previous study, it was shown that this grafting reduced free amino groups onto chitosan derivatives [24]. In fact, the reduced of free amino groups was 38.8% for FA-chitosan and 26.5% for EF-chitosan compared to chitosan. Several authors demonstrated that free amino groups that interact with cell membrane due to their cationic nature are not favorable for cell adhesion [39]. In fact, chemical modification of poly ($_L$-lysine) (PLL) by hydrogen transfer addition of N,N-dimethylacrylamide (DMAA) to the primary amino groups resulted in new water soluble derivative of poly ($_L$-lysine) with reduced cell toxicity without modification of original properties (biocompatibility, biodegradability,…). These authors showed that during incubation of rat red blood cells with poly ($_L$-lysine) (PLL), an amount of haemoglobin was released following red blood cell lysis due to membrane damage [39]. Furthermore, other studies showed that polymers with tertiary amino groups exhibited a lower toxicity than those with primary and secondary residues [3].

In addition, the grafting of oxidized phenols onto chitosan can induce new functional groups or increase the quantity of initial functional groups such as hydroxyl groups of phenols. In previous study, this grafting allowed introducing methyl and methoxy groups (-OCH_3, -CH_3) and increased hydroxyl groups (-OH). Thus, this process increased negative charges and decreased positive charges [24]. In general, neutral polymers and polyanions show less cytotoxicity than polycations. Polycations such as protamine and poly ($_L$-lysine) have been shown to induce cellular damage in a variety of cultured cells [40]. Several authors studied the influence of functional group substitution on cell adhesion of polymer. The studies indicated that the growth of bovine aortic endothelial cells (BAEC) increased as functional groups (-OH, -CH_3) were increased [41]. In addition, the introduction of hydroxyl groups improved blood compatibility of cellulose [42] and improved mouse fibroblasts cell growth on polyethylene glycol (PEG)-chitosan [36]. In previous study, the cell adhesion for HUVEC and HeLa cells increased in the following order of functional group substitution: OH > CH_3 > COOH > NH_2 [38].

FA- or EF- oxidized phenols grafting onto chitosan could also change the surface morphology of films as presented above. In fact, alterations in surface morphology and roughness have been used to influence cell and tissue responses to implants [43]. In previous study, it was shown that heterogeneous surface is more favorable for cell adhesion than homogeneous surface mainly due to improved protein adsorption on roughness surface [2]. Several study showed that cellular adhesion increased as surface roughness increased due to increased protein adsorption [34]. Additionally, it was observed that higher surface roughness of polystyrene polymer (PS) enhanced cellular adhesion of human MG63 osteosarcoma cells [44].

Finally, the grafting of oxidized phenols onto chitosan could induce a balance between the hydrophobic and hydrophilic properties, reducing free amino groups (-NH_2), introducing new functional groups (-OCH_3, -CH_3) or increase initial functional groups (-OH) and thus can increase the density of negative charges. Additionally, this grafting could increase surface roughness and thus increase protein adsorption on the surface. These new properties of chitosan derivative films improved HUVEC cell adhesion which increased as the quantity of oxidized phenols grafted were increased.

4. Conclusion

The grafting of oxidized phenol onto chitosan led to FA-colored chitosan and EF-colorless chitosan. This process also increased its hydrophobic properties and decreased free amino groups [24]. The present results indicated that oxidized phenol grafting onto chitosan improved its protein adsorption properties. The morphology of cells on chitosan derivative films indicated a well attachment and spread phenotype while they often did not spread and remained round on chitosan films. Cell viability showed improved cell adhesion on chitosan derivative films compared to chitosan film. This cell viability increased as the film thickness and the oxidized phenols grafted quantity were increased. Finally, FA-/EF-chitosan derivative films showed almost similar cell viability.

These results clearly emphasized the interests of using renewable resources and eco-friendly biochemical processing to create useful functional biomaterials. These innovative biomaterials are good candidates for biomedical applications especially, tissue engineering to create functional tissue.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support of Syrian Ministry of Higher Education and Aleppo-University for financial support.

Reference

1. Wang YX, Robertson JL, Spillman WB, Claus RO. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. Pharmaceutical Research 2004 Aug;21(8):1362-1373.

2. Roach P, Eglin D, Rohde K, Perry CC. Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications. Journal of Materials Science-Materials in Medicine 2007 Jul;18(7):1263-1277.

3. Dekie L, Toncheva V, Dubruel P, Schacht EH, Barrett L, Seymour LW. Poly-L-glutamic acid derivatives as vectors for gene therapy. Journal of Controlled Release 2000 Mar;65(1-2):187-202.

4. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. Tissue Engineering 2005 Jan;11(1-2):1-18.

5. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science 2006 Jul;31(7):603-632.

6. Kim DG, Jeong YI, Choi C, Roh SH, Kang SK, Jang MK, et al. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics 2006 Aug;319(1-2):130-138.

7. Sabnis S, Block LH. Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems - I. Molecular modifications. International Journal of Biological Macromolecules 2000 Jun;27(3):181-186.

8. Shi CM, Zhu Y, Ran XZ, Wang M, Su YP, Cheng TM. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. Journal of Surgical Research 2006 Jun;133(2):185-192.

9. Mochizuki M, Kadoya Y, Wakabayashi Y, Kato K, Okazaki I, Yamada M, et al. Laminin-1 peptide-conjugated chitosan membranes as a novel approach for cell engineering. Faseb Journal 2003 Mar;17(3):875-+.

10. Holmes CA, Tabrizian M. Enhanced MC3T3 preosteoblast viability and adhesion on polyelectrolyte multilayer films composed of glycol-modified chitosan and hyaluronic acid. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2011 Feb;100A(2):518-526.

11. Hozumi K, Otagiri D, Yamada Y, Sasaki A, Fujimori C, Wakai Y, et al. Cell surface receptor-specific scaffold requirements for adhesion to laminin-derived peptide-chitosan membranes. Biomaterials 2010 Apr;31(12):3237-3243.

12. Bettini R, Rornani AA, Morganti MM, Borghetti AF. Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008 Jan;68(1):74-81.

13. Neamnark A, Sanchavanakit N, Pavasant P, Bunaprasert T, Supaphol P, Rujiravanit R. In vitro biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film. Carbohydrate Polymers 2007 Mar;68(1):166-172.

14. Kumar G, Smith PJ, Payne GF. Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. Biotechnology and Bioengineering 1999 Apr;63(2):154-165.

15. Jin R, Teixeira LSM, Dijkstra PJ, Karperien M, van Blitterswijk CA, Zhong ZY, et al. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. Biomaterials 2009 May;30(13):2544-2551.

16. Sakai S, Yamada Y, Zenke T, Kawakami K. Novel chitosan derivative soluble at neutral pH and in-situ gellable via peroxidase-catalyzed enzymatic reaction. Journal of Materials Chemistry 2009;19(2):230-235.

17. Nagaoka S, Takiuchi H, Yokota K, Mori Y, Tanzawa H, Kikuchi T. Interactions between blood components and hydrogels with poly(oxyethylene) chain of various chain length. Kobunshi Ronbunshu 1992; 39:165–171.

18. Hoffman AS, Chen GH, Wu XD, Ding ZL. Graft copolymers of peo-ppo-peo triblock polyethers on bioadhesive polymer backbones: Synthesis and properties. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 1997 Apr;213:23-POLY.

19. Singh DK, Ray AR. Characterization of grafted chitosan films. Carbohydrate Polymers 1998 Jul;36(2-3):251-255.

20. Fras-Zemljic L, Kokol V, Cakara D. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan-based viscose fibres enzymatically functionalized with flavonoids. Textile Research Journal 2011 Sep;81(15):1532-1540.

21. Sousa F, Guebitz GM, Kokol V. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. Process Biochemistry 2009 Jul;44(7):749-756.

22. Bozic M, Gorgieva S, Kokol V. Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. Carbohydrate Polymers 2012 Jul;89(3):854-864.

23. Bozic M, Gorgieva S, Kokol V. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. Carbohydrate Polymers 2012 Mar;87(4):2388-2398.

24. Aljawish A, Chevalot I, Piffaut B, Rondeau-Mouro C, Girardin M, Jasniewski J, et al. Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. Carbohydrate Polymers 2012 Jan;87(1):537-544.

25. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 1998. p. 152-178.

26. Lathasree S, Rao AN, Sivasankar B, Sadasivam V, Rengaraj K. Heterogeneous photocatalytic mineralisation of phenols in aqueous solutions. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical 2004;223(1-2):101-105.

27. Maher S, McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. Biochemical Pharmacology 2006;71(9):1289-1298.

28. Mustafa R, Muniglia L, Rovel B, Girardin M. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. Food Research International 2005;38(8-9):995-1000.

29. Ralph J, Conesa MTG, Williamson G. Simple preparation of 8-5-coupled diferulate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1998 Jul;46(7):2531-2532.

30. Lewicki PP. The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. International Journal of Food Science and Technology 1997 Dec;32(6):553-557.

31. Su JF, Huang Z, Zhao YH, Yuan XY, Wang XY, Li M. Moisture sorption and water vapor permeability of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol)/glycerol blend films. Industrial Crops and Products 2010 Mar;31(2):266-276.

32. Elbert DL, Hubbell JA. Surface treatments of polymers for biocompatibility. Annual Review of Materials Science 1996;26:365-394.

33. Noh H, Vogler EA. Volumetric interpretation of protein adsorption: Mass and energy balance for albumin adsorption to particulate adsorbents with incrementally increasing hydrophilicity. Biomaterials 2006 Dec;27(34):5801-5812.

34. Milleret V, Hefti T, Hall H, Vogel V, Eberli D. Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation. Acta Biomaterialia 2012 Dec;8(12):4349-4356.

35. Uygun BE, Bou-Akl T, Albanna M, Matthew HWT. Membrane thickness is an important variable in membrane scaffolds: Influence of chitosan membrane structure on the behavior of cells. Acta Biomaterialia 2010 Jun;6(6):2126-2131.

36. Zhang M, Li XH, Gong YD, Zhao NM, Zhang XF. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG. Biomaterials 2002 Jul;23(13):2641-2648.

37. Ratner BD, Hoffman AS, Hanson SR, Harker LA, Whiffen JD. Blood-compatibility-water-content relationships for radiation-grafted hydrogels. Journal of Polymer Science: Polymer Symposia 1979;66(1):363-375.

38. Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. Biomaterials 2007 Jul;28(20):3074-3082.

39. Ferruti P, Knobloch S, Ranucci E, Duncan R, Gianasi E. A novel modification of poly(L-lysine) leading to a soluble cationic polymer with reduced toxicity and with potential as a transfection agent. Macromolecular Chemistry and Physics 1998 Nov;199(11):2565-2575.

40. Westergren I, Johansson BB. Altering the Blood-Brain-Barrier in the Rat by Intracarotid Infusion of Polycations - a Comparison between Protamine, Poly-L-Lysine and Poly-L-Arginine. Acta Physiologica Scandinavica 1993 Sep;149(1):99-104.

41. Tidwell CD, Ertel SI, Ratner BD, Tarasevich BJ, Atre S, Allara DL. Endothelial cell growth and protein adsorption on terminally functionalized, self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. Langmuir 1997 Jun;13(13):3404-3413.

42. Vienken J, Diamantoglou M, Hahn C, Kamusewitz H, Paul D. Considerations on Developmental Aspects of Biocompatible Dialysis Membranes. Artificial Organs 1995 May;19(5):398-406.

43. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. Biomaterials 1999 Dec;20(23-24):2311-2321.

44. Dowling DP, Miller IS, Ardhaoui M, Gallagher WM. Effect of Surface Wettability and Topography on the Adhesion of Osteosarcoma Cells on Plasma-modified Polystyrene. Journal of Biomaterials Applications 2011 Sep;26(3):327-347.

II.3.3. Contribution de l'article

Cette étude a permis d'étudier les propriétés d'adhérence et de croissance cellulaire sur des films de chitosane natif et fonctionnalisé par voie enzymatique.

Les résultats ont montré que la quantité de produits d'oxydation issus de l'acide férulique qui est greffée sur le chitosane à 4h de réaction enzymatique était plus élevée que celle des produits d'oxydation issus du férulate d'éthyle. Cette quantité est doublée pour les deux molécules après 16h de réaction enzymatique.

Par ailleurs, la microscopie électronique à balayage a permis de mettre en évidence que les films de chitosanes fonctionnalisés présentaient une surface plus hétérogène que celle du film de chitosane natif. En outre, la gravimétrie d'adsorption de vapeur d'eau a montré que la quantité d'eau adsorbée sur les films de chitosane fonctionnalisé était inférieure à celle sur le film de chitosane natif. Ce résultat indique que les chitosanes fonctionnalisés sont davantage hydrophobes par rapport au chitosane natif, ce qui est lié au greffage des produits d'oxydation. En outre, la quantité d'eau adsorbée sur les films de chitosanes fonctionnalisés par l'acide férulique et le férulate d'éthyle est similaire, indiquant que l'hydrophobie des deux types de films n'est pas significativement différente. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une plus grande quantité de produits greffés à partir d'acide férulique est obtenue même si celui-ci présente une hydrophobie inférieure au férulate d'éthyle. Par ailleurs, les films de chitosanes fonctionnalisés sont capables d'adsorber une plus grande quantité de protéines en comparaison avec les films de chitosane natif. Ce résultat peut être lié à l'hydrophobie plus élevée des chitosanes fonctionnalisés. En effet, des études ont montré que les surfaces hydrophobes permettent une adsorption supérieure des protéines par rapports aux surfaces hydrophiles (Elbert et Hubbell, 1996 ; Noh et Vogler, 2006). Une adsorption de protéines permet la formation d'une interface sur laquelle d'autres protéines ou cellules vont pouvoir s'adsorber. Les interactions entre des cellules et une surface peuvent être influencées en modifiant les propriétés de cette surface, chimiques (groupes fonctionnels), de charge et de topographie (rugosité). Il a été démontré que les cellules sont sensibles à la topographie,

Il a ainsi été vérifié que la croissance des cellules HUVEC sur les films de chitosanes fonctionnalisés a été supérieure à celle évaluée sur des films de chitosane natif mais avec une croissance similaire sur les films de chitosanes fonctionnalisés par AF ou FE. D'un point de vue morphologique, les cellules HUVEC ont réussi à adhérer sur les films de chitosane natif mais sont restées de forme ronde et aucune croissance n'a été mise en évidence. Par contre, sur les films de chitosanes fonctionnalisés, les cellules ont réussi à adhérer, à s'étaler et leur expansion a été mise en évidence.

Par ailleurs, leur viabilité est corrélée avec la quantité de chitosane ayant permis d'obtenir des films de 12 ou 28 µm. L'augmentation de la quantité de chitosanes natif ou fonctionnalisés a permis une meilleure adsorption des protéines améliorant ainsi l'adhésion cellulaire (Uygun *et al.*, 2010). De plus, la viabilité cellulaire augmente avec la quantité de produits d'oxydation des phénols greffés sur les chitosanes fonctionnalisés. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses peuvent être émises. En effet, cette viabilité cellulaire supérieure sur les films de chitosanes fonctionnalisés peut être due à l'équilibre hydrophobe/hydrophile (Neamnark *et al.*, 2007). Elle peut être également liée à la réduction de la quantité de groupements amines libres lesquelles ne sont pas favorables à la croissance des cellules (Ferruti *et al.*, 1998). Ce résultat peut également être dû à l'augmentation de groupements présents à la surface du film et qui seraient favorables à la croissance tels que -OH, OCH_3 (Arima et Iwata, 2007 ; Keselowsky *et al.*, 2003). Enfin, cette viabilité cellulaire supérieure peut être aussi liée à l'hétérogénéité de surface des films de chitosanes fonctionnalisé par le greffage de phénols sur le chitosane, permettant une meilleure adhésion des cellules.

II.3.4. Complément de résultats

II.3.4.1. Adhérence cellulaire de cellules Caco2 sur les films de chitosanes

La caractérisation des propriétés d'adhérence et de croissance des cellules sur les films de chitosanes natif et fonctionnalisés par voie enzymatique est un élément crucial pour évaluer l'intérêt de ces matériaux. L'adhérence, l'étalement et la croissance des cellules sont des réactions séquentielles qui suivent l'ensemencement des cellules et sont des étapes décisives pour la survie cellulaire sur les films. Après avoir étudié les propriétés biologiques de films de chitosane natif et fonctionnalisé vis-à-vis de cellules normales (HUVEC), les capacités de croissance de cellules cancéreuses (Caco2) sur ces films de chitosane natif et fonctionnalisés ont été également évaluées.

III.3.4.1.1. Adsorption des protéines sur les films de chitosanes

Après 24 h d'incubation avec le milieu complet de la culture cellulaire (Milieu "Eagle" Modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les films des chitosanes fonctionnalisés et le contrôle (sans film) par rapport à l'adsorption des protéines (Figure 51).

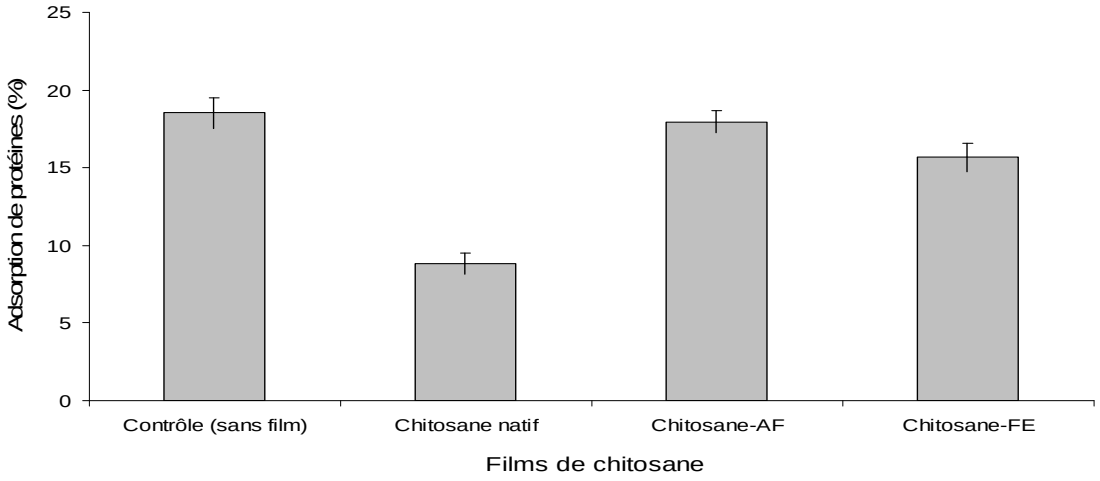


Figure 51 : adsorption de protéines (%) des films de chitosane natif, chitosane-AF, chitosane-FE et contrôle (sans films) en comparaison de la quantité des protéines totales du milieu culture initial (DMEM)

III.3.4.1.2. Morphologie cellulaire et l'attachement

Les cellules Caco2 ont été ensemencées dans des puits contenant les films de chitosane natif et fonctionnalisés et leur croissance a été suivie pendant 3 jours. La croissance des cellules Caco2 sur le contrôle (sans film) a été supérieure à celle sur les films de chitosane natif et fonctionnalisés (Figure 52-A) visualisée par la présence d'un tapis cellulaire plus dense. Par ailleurs, la croissance des cellules Caco2 sur les films de chitosanes fonctionnalisés a été plus importante que celle sur les films de chitosane natif.

De plus, le suivi de la morphologie cellulaire de cellules Caco2 dans la Figure 52-B a permis de mettre en évidence que les cellules Caco2 sur les films de chitosanes avaient certes bien adhéré, mais étaient restées de forme ronde. Par contre, sur les films de chitosanes fonctionnalisés, les cellules Caco2 ont montré non seulement un bon attachement mais également une propagation avec un phénotype proche de celui des cellules en croissance en flacons de culture. Ces résultats obtenus sont bien en accord avec ceux obtenus avec les cellules HUVEC précédemment.

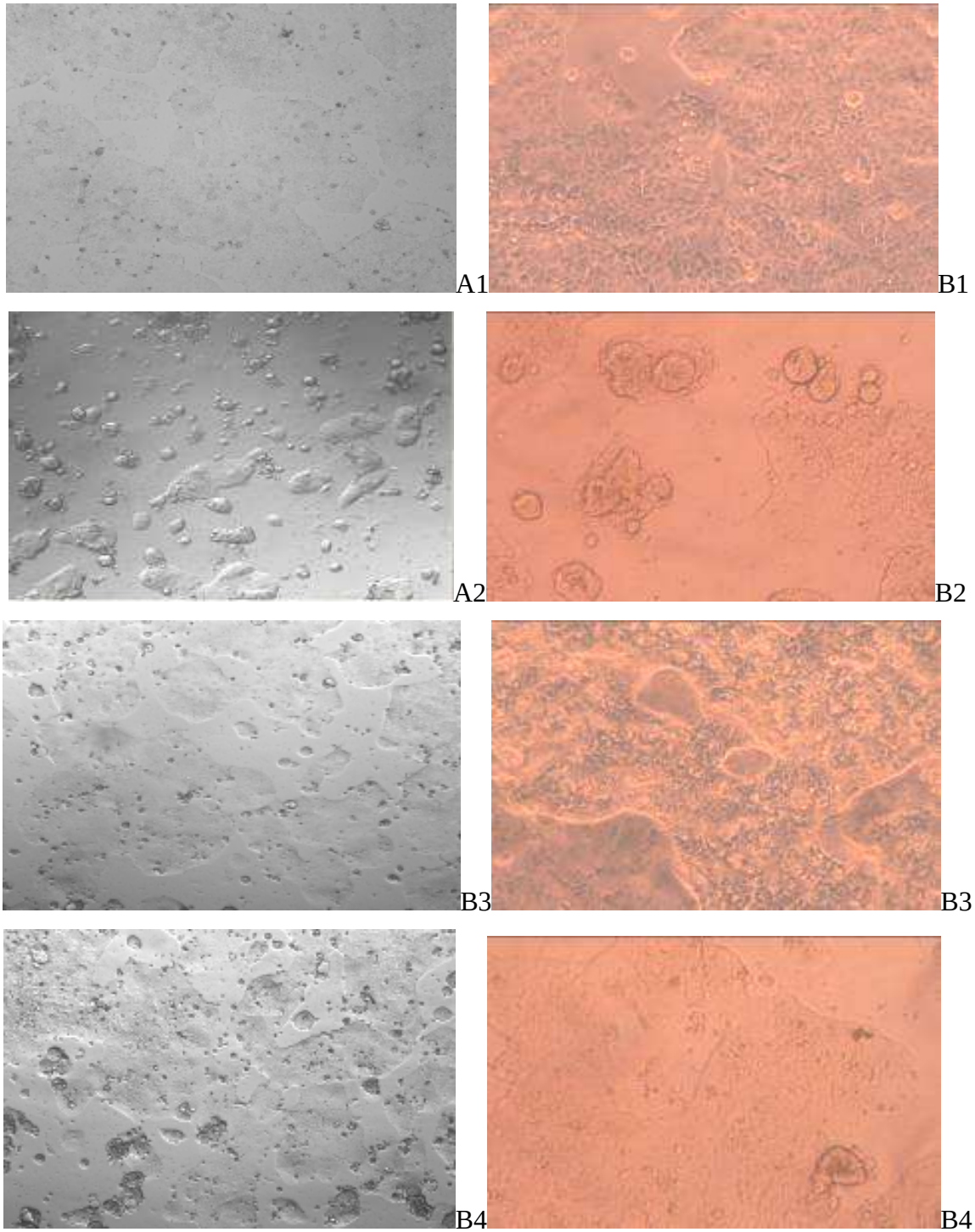


Figure 52 : photos prises de cellules Caco2 cultivées pendant 3 jours sur les films de chitosane natif (A2, B2), chitosane-AF (A3, A3) et chitosane-FE (A4, B4) par rapport au témoin (sans film) (A1, B1) par microscope optique (Olympus, Tokyo, Japon) à 10x (A) et 32x (B) agrandissement

III.3.4.1.3. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée sur les films de chitosane natif et fonctionnalisés vis-à-vis des cellules Caco2 par méthode MTT après 4 h comparativement à des cellules en croissance sur le polystyrène traité (fonds des puits de microplaques). Comme présenté dans la Figure 53, il a été démontré que les films de chitosanes fonctionnalisés ont permis l'obtention d'une viabilité cellulaire supérieure à celle obtenue sur les films de chitosane natif.

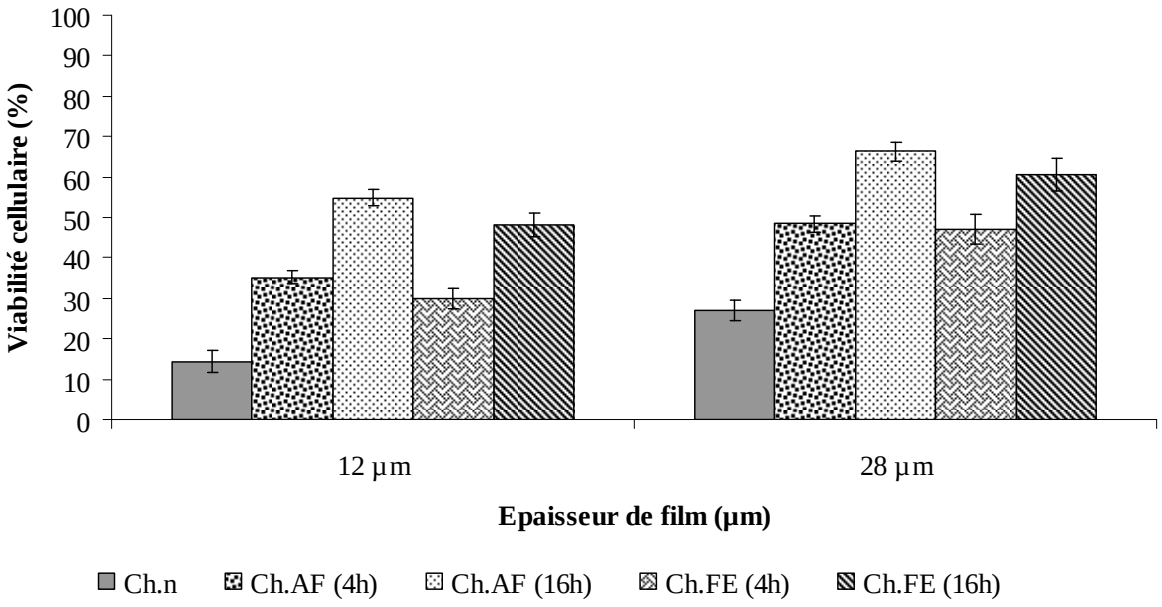


Figure 53 : effet de l'épaisseur de film et les phénols oxydés greffés des films de chitosane natif et ses dérives sur la viabilité des cellules Caco2. Le contrôle (100%) correspond à la viabilité des cellules Caco2 dans les puits en absence de film.

Un fait important est à noter : en comparant la croissance des cellules HUVEC avec celle des cellules Caco2, nous avons trouvé que la viabilité des cellules HUVEC était supérieure à celle des cellules Caco2 sur les films de chitosane natif et fonctionnalisés (Figure 54). Ainsi, ces films sont davantage favorables à la croissance des cellules normales (HUVEC) qu'à celle des cellules cancéreuses (Caco2).

Peu d'études dans la littérature concernent l'adhérence, l'étalement et la croissance de cellules Caco2 sur des films de chitosane. Citons, cependant, les travaux de Borchard

(Hidalgo *et al.*, 1989) qui ont mis en évidence qu'un dérivé de chitosane (avec du glutamate) soluble présentait une cytotoxicité (inférieure à 50 % par rapport au témoin) vis-à-vis des cellules Caco2. Ces auteurs ont démontré que les interactions électrostatiques et ioniques entre les charges positives du chitosane et les charges négatives des membranes cellulaires pouvaient altérer la perméabilité de cellules Caco2. Dans notre cas, puisque le chitosane n'est pas soluble sous forme de film dans le milieu de culture, les groupements amines ne sont pas protonés. En conséquence, les interactions électrostatiques et ioniques entre les groupements amines du chitosane chargés positivement et les groupements charges négativement des membranes des cellules Caco2 sont faibles ce qui pourrait engendrer la faible adhésion des cellules caco2 ensemencées sur les films de chitosane natif et fonctionnalisés.

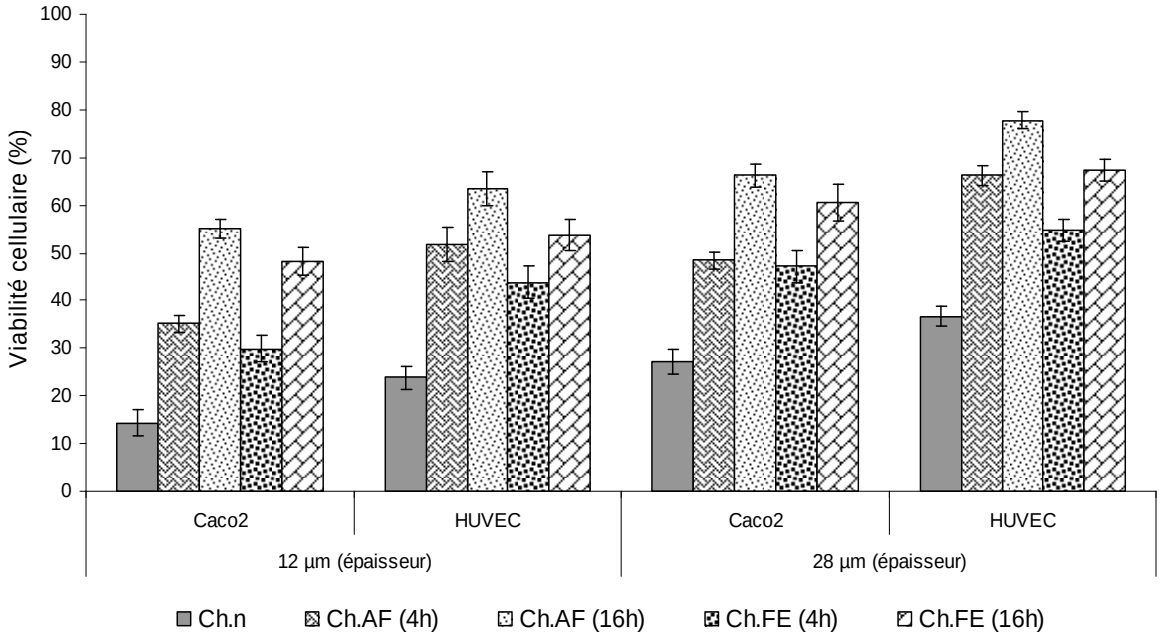


Figure 54 : comparaison entre la croissance des cellules HUVEC et Caco2 en fonction de l'épaisseur du film et des phénols oxydés greffés sur les films. Le contrôle (100%) correspond à la viabilité des cellules Caco2 ou HUVEC sur le polystyrène traité

Enfin, le greffage des produits d'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle sur le chitosane pourrait améliorer l'adhérence et la croissance des cellules normales (HUVEC) mais ils n'ont pas apporté d'activité antiproliférative significatives vis-à-vis des

cellules cancéreuses (Caco2). Les films de chitosanes natif et fonctionnalisés ont donc été plus favorables pour la croissance des cellules HUVEC que pour celle des cellules Caco2.

Ces premiers résultats semblent très prometteurs car ils montrent que les films de chitosane fonctionnalisés sont compatibles avec la croissance de cellules endothéliales saines (HUVEC). D'autres expériences avec des cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont à réaliser pour étudier la capacité de ces cellules à adhérer sur les films de chitosanes fonctionnalisés afin d'envisager leur développement en ingénierie tissulaire.

Conclusions et Perspective

Conclusions et perspectives

Rappelons que l'objectif initial de ce travail concernait l'étude de l'oxydation enzymatique de l'acide férulique et de son ester éthylique, le férulate d'éthyle, par la laccase de *Myceliophtora thermophila* (E.C.1.10.3.2) en milieu aqueux (tampon phosphate) et dans des conditions expérimentales douces (30 °C et pH 7,5) en tant que procédure « verte » pour la synthèse de nouvelles biomolécules présentant des fonctionnalités intéressantes, comme une activité antibactérienne ou une activité antioxydante. A l'heure actuelle, aucune étude ne porte sur l'étude de l'oxydation enzymatique de composés phénoliques en milieu aqueux et à pH 7,5 par la laccase de *Myceliophtora thermophila* sauf un travail antérieur au sein du laboratoire (Mustafa *et al.*, 2005). En effet, la plupart des laccases parmi celles les plus utilisées ont un pH optimal proche de 4. Cependant, l'utilisation de cette enzyme sous sa forme commerciale (Suberase™) reste problématique en raison de sa couleur brune issue des phénols présents dans la solution enzymatique. Ces phénols contaminants peuvent interagir lors de la réaction d'oxydation enzymatique des phénols d'intérêt. Pour les éliminer, l'ultrafiltration a permis d'améliorer l'activité spécifique de la laccase commerciale (Suberase™) de l'ordre de 2,2 fois et de décolorer la solution de l'ordre de 90 % par rapport à la coloration initiale.

La comparaison de l'oxydation enzymatique des phénols a montré que la vitesse d'oxydation du férulate d'éthyle était plus rapide que celle de l'acide férulique, ce qui est probablement dû à l'affinité accrue entre la laccase et le férulate d'éthyle. L'oxydation enzymatique a conduit à un produit majoritaire ayant une masse molaire de 386 g/mol pour l'acide férulique et de 443 g/mol pour le férulate d'éthyle. Ces résultats suggèrent que les produits d'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle sont de forme dimérique, lui conférant potentiellement une meilleure stabilité par rapport à d'autres formes (monomères…). De plus, l'oxydation enzymatique a conduit à des produits colorés (jaune-orange) à partir de l'acide férulique et à des produits quasiment incolores à partir du férulate d'éthyle.

L'évaluation des propriétés antioxydantes montrent que les produits d'oxydation présentent un pouvoir antioxydant moins important que les molécules d'origine, phénomène

prévisible en raison de l'oxydation des substrats et qui peut s'expliquer, notamment, par la diminution du nombre des groupements fonctionnels (-OH, -COOH) après l'oxydation et la condensation. Même si le pouvoir antioxydant des produits d'oxydation est moindre, il reste proche du pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique qui est largement utilisé comme agent antioxydant dans le domaine agroalimentaire (Lin *et al.*, 2012). Par conséquent, ces produits d'oxydation pourraient être utilisés comme agents antioxydants.

Concernant les propriétés antibactériennes, il est à noter que l'oxydation et la polymérisation enzymatique ont réduit l'activité antibactérienne des produits d'oxydation ce qui est probablement dû à la diminution des groupements fonctionnels (-OH, -COOH). L'activité antibactérienne de l'acide férulique (acide hydroxycinnamique) et de son ester éthylique (le férulate d'éthyle) résulte des substitutions du noyau benzénique (groupes hydroxyle et méthoxyle) et de la double liaison dans la chaîne latérale alkyle qui augmente l'hydrophobie. Puisque l'hydrophobie du férulate d'éthyle est plus élevée en raison de l'estérification du groupe carboxylique et de sa chaîne alkyle, son activité antibactérienne est supérieure à celle de l'acide férulique. En outre, ces produits d'oxydation présentent une activité bactéricide en raison de leur capacité à pénétrer à travers la membrane cellulaire.

De plus, les propriétés cytotoxiques ont montré que les produits d'oxydation sont moins toxiques que les phénols d'origine. En effet, l'oxydation et la polymérisation des produits réduisent le nombre de groupements fonctionnels qui sont responsables de la toxicité tel que le groupement carboxylique (Plochmann *et al.*, 2007). Ces produits d'oxydation à des concentrations de 200 µg/mL ont davantage induit une mort cellulaire de type nécrotique vis-à-vis des cellules HUVEC.

Ainsi, notre étude a permis le développement d'une méthode respectueuse de l'environnement pour synthétiser de nouvelles biomolécules présentant des propriétés fonctionnelles intéressantes comme le pouvoir antioxydant et colorant tout en étant faiblement cytotoxique. Par conséquent, elles pourraient trouver des applications en industrie alimentaire en tant que colorants « identiques-nature » pour le remplacement de colorants synthétiques.

Afin de contrôler et de minimiser le degré de polymérisation des produits d'oxydation instables et donc de renforcer leurs propriétés fonctionnelles, nous avons envisagé le greffage

des produits d'oxydation de l'acide férulique et du férulate d'éthyle par voie enzymatique sur un support insoluble. Pour cela, nous avons choisi le chitosane, biopolymère possédant des groupements amines libres qui jouent un rôle nucléophile. Cette procédure est mise en œuvre en présence de particules solides de chitosane (catalyse hétérogène) dans des conditions douces (pH 7,5 et 30 °C) en milieu aqueux. Le corollaire de ce procédé est le greffage de composés phénoliques sur le chitosane, ce qui contribue à apporter ou renforcer ses propriétés fonctionnelles. Au préalable, comme le chitosane utilisé dans ce travail est d'origine animale (marine), nous l'avons purifié pour éliminer la majorité des impuretés et pour limiter l'inhibition de l'enzyme. De plus, le chitosane a été caractérisé notamment au niveau de la masse molaire, de la masse molaire moyenne du monomère, de la taille des particules, du degré de désacétylation et de la concentration des groupements amines libres.

D'un point de vue cinétique, il a été mis en évidence que le chitosane n'influençait pas les vitesses d'oxydation. Cependant, il pourrait avoir un rôle de protection de la laccase vis-à-vis de l'inhibition liée aux radicaux libres dans le milieu réactionnel. Cette procédure enzymatique a permis de produire un chitosane coloré (jaune-orange) grâce aux produits d'oxydation obtenus à partir de l'acide férulique. Avec les produits d'oxydation du férulate d'éthyle (incolores), le chitosane n'a pas présenté de changement significatif de sa coloration. Après le traitement chimique du chitosane coloré, il s'est avéré que la couleur est stable, ce qui suggère que les produits d'oxydation sont greffés sur le chitosane par des liaisons covalentes.

Les analyses structurales ont montré que les produits d'oxydation sont bien greffés sur le chitosane du fait de l'absorbance élevée à la longueur d'onde entre 300-350 nm ce qui est probablement due à la réaction entre les produits d'oxydation et les groupements amines libre de chitosane. Grâce à la spectroscopie infrarouge, la présence des nouveaux pics dans le spectre du chitosane fonctionnalisé au niveau de la région 1640-1620 cm^{-1} confirme la formation de liaisons covalentes de type base de Schiff C=N. De plus, par spectroscopie RMN du solide, le doublement détecté au niveau de carbone 2 (C_2) du spectre des chitosanes fonctionnalisés confirme que le greffage s'est déroulé sur le chitosane au niveau du carbone en position C_2. Par ailleurs, l'analyse CL-MS après hydrolyse chimique ou enzymatique confirme que la majorité des produits d'oxydation greffés sur le chitosane sont de forme

dimérique. Ce résultat confirme que la forme la plus stable et la plus abondante parmi les produits d'oxydation est la forme dimérique. En ce qui concerne l'efficacité du greffage, la quantité des produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur le chitosane est plus importante que le niveau de greffage avec les produits du férulate d'éthyle. En effet, la présence du groupement carboxyle libre sur l'acide férulique permet une plus grande diversité de produits d'oxydation en présence de laccase (Mustafa *et al.*, 2005). Cette diversité de produits d'oxydation peut conduire à une grande possibilité de réaction avec les groupements amines libres de chitosane.

La caractérisation physico-chimique a montré que le greffage enzymatique des produits d'oxydation sur le chitosane aboutit à une augmentation de la masse moléculaire et de la viscosité. En effet, la présence des phénols sur le chitosane induit la formation d'une réticulation physique résultant des interactions hydrophobes entre les chaînes latérales de chitosane fonctionnalisé augmentant ainsi sa viscosité en solution. Bien que le férulate d'éthyle soit plus hydrophobe que l'acide férulique, la viscosité du chitosane-AF est plus élevée que celle mesurée avec le férulate d'éthyle. Ce phénomène est probablement lié à la quantité supérieure de produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur le chitosane. De plus, cette procédure contribue à renforcer la stabilité de l'activité antioxydante des chitosanes fonctionnalisés même soumis à des températures élevées (50 à 100 °C pendant 60 min). Cette propriété permettrait l'utilisation des chitosanes fonctionnalisés dans des applications dont les procédés mettent en œuvre des températures élevées. Par contre, le greffage des produits d'oxydation aboutit à une diminution de la concentration des groupements amines libres en raison du greffage des produits d'oxydation ce qui a, à son tour, réduit le degré de désacétylation et la mobilité électrophorétique des chitosanes fonctionnalisés. Cette diminution confirme la réaction entre les produits d'oxydation et les groupements amines libres de chitosane.

Par ailleurs, la mesure des propriétés antioxydantes et antiradicalaires suggère que le greffage enzymatique des produits d'oxydation permet de les améliorer. Le chitosane natif ne présente aucune activité antioxydante. En effet, pour les chitosanes de grande masse molaire, le blocage des hydrogènes inter- intramoléculaires qui sont responsables du pouvoir antioxydant expliquerait cette observation (Pasanphan *et al.*, 2010). Par contre, après le

greffage enzymatique des produits d'oxydation, les chitosanes fonctionnalisés présentent des propriétés antioxydantes importantes comparativement au chitosane natif. De plus, le chitosane-AF présente des propriétés antioxydantes plus importantes que celles du chitosane-FE. Ces résultats sont dus aux propriétés antioxydantes supérieures des produits d'oxydation de l'acide férulique, et au fait que la quantité des produits d'oxydation de l'acide férulique greffés sur le chitosane est presque deux fois plus élevée que celle obtenue avec les produits du férulate d'éthyle. Ces nouvelles propriétés du chitosane fonctionnalisé permettraient son utilisation en tant qu'agent antioxydant dans différents domaines comme ceux de l'agroalimentaire ou de la cosmétique.

De même, la détermination des propriétés antibactériennes montre que le chitosane natif et ses dérivés présentent la même activité antibactérienne contre toutes les souches bactériennes testées. Ce résultat peut être dû à l'équilibre entre la diminution de l'activité antibactérienne du chitosane en raison de la réduction des groupements amines libres et l'activité antibactérienne des phénols greffés sur le chitosane fonctionnalisé. En effet, les groupements amines libres de chitosane natif sont responsables de l'activité antibactérienne. Cependant, le greffage des phénols sur le chitosane fonctionnalisé augmente la masse molaire, la viscosité et l'hydrophobie probablement responsables de l'activité antibactérienne des chitosanes fonctionnalisés. De plus, l'activité antibactérienne du chitosane natif et de ses dérivés est de type bactéricide en raison des valeurs presque similaires entre la CMI et la CMB.

Au niveau des propriétés biologiques évaluées sur la croissance des cellules animales à pH 7,2, le chitosane sous forme liquide n'a pas pu être testé car il précipite à cette valeur neutre de pH. Pour cette raison, nous avons envisagé de tester le chitosane sous forme de film. En termes de caractérisation, nous avons mesuré l'épaisseur, l'adsorption des protéines, l'hydrophobie et la morphologie de la surface des films de chitosanes natif et fonctionnalisés ainsi que leur influence sur l'adhérence et la viabilité cellulaire vis-à-vis des cellules HUVEC et Caco2.

La microscopie électronique à balayage des films de chitosanes fonctionnalisés montre une surface plus hétérogène que celle obtenue avec du chitosane natif, ce qui est

probablement dû au greffage des produits d'oxydation. De plus, la gravimétrie d'adsorption de vapeur d'eau a montré que la quantité d'eau adsorbée sur les films de chitosanes fonctionnalisés en fonction du temps est moins importante que celle sur le film de chitosane natif. Ce résultat indique que les chitosanes fonctionnalisés sont plus hydrophobes que le chitosane natif, propriété apportée par la nature des produits d'oxydation greffés. En outre, les quantités d'eau adsorbées sur les films de chitosanes fonctionnalisés par l'acide férulique et le férulate d'éthyle sont similaires. De même, les quantités de protéines adsorbées sur les films de chitosanes fonctionnalisés sont plus importantes par comparaison avec les films de chitosane natif. De plus, les films de chitosanes fonctionnalisés par l'acide férulique et par le férulate d'éthyle présentent la même capacité d'adsorption des protéines en raison de leur hydrophobie proche.

Par ailleurs, au niveau de la morphologie cellulaire, les cellules HUVEC et Caco2 adhèrent sur les films de chitosane natif, mais de morphologie arrondie et ne présentant pas de croissance significative. Par contre, sur les films de chitosanes fonctionnalisés, les cellules adhèrent correctement, s'étalent et présentent une croissance nettement plus importante. De plus, les films de chitosanes fonctionnalisés permettent une adhésion et une croissance des cellules HUVEC et Caco2 supérieure en comparaison avec les films de chitosane qui étant plus hydrophiles sont moins favorables à l'adhésion et à la croissance cellulaire.

Après trois jours de croissance, les films de chitosanes fonctionnalisés permettent une meilleure viabilité cellulaire pour les lignées HUVEC et Caco2 en comparaison avec les résultats obtenus avec les films de chitosane natif. Aucune différence significative concernant la viabilité cellulaire n'a été signalée entre les films de chitosanes fonctionnalisés par AF ou FE. La viabilité cellulaire augmente avec la quantité de produits d'oxydation des phénols greffés sur les chitosanes fonctionnalisés. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses peuvent être émises. La présence des phénols sur le chitosane peut accroître l'hydrophobie qui est considérée comme favorable pour l'adhésion cellulaire. De plus, le greffage des produits d'oxydation contribue à réduire la quantité de groupements amines libres et à accroître par contre la quantité de groupements fonctionnels tels que -OH, $-CH_3$ qui sont favorables à la croissance cellulaire. Le greffage des produits d'oxydation engendre également une

hétérogénéité au niveau de la surface des films de chitosanes fonctionnalisés, cette modification de topographie est favorable à l'adhésion cellulaire.

Pour conclure, cette procédure dite « verte » permet de contrôler la polymérisation des produits intermédiaires par greffage des produits d'oxydation sur le chitosane. Ce procédé de fonctionnalisation apporte des propriétés intéressantes aux nouveaux chitosanes telles que des propriétés antioxydantes et optiques (couleur), tout en améliorant ses propriétés physico-chimiques avec notamment la stabilisation thermique de l'activité antioxydante. De plus, les propriétés biologiques du chitosane natif ont été améliorées telles que l'adhésion et la croissance cellulaires avec la préservation de ses propriétés antibactériennes permettant ainsi d'élargir son champ d'applications éventuelles dans les domaines agroalimentaires, médicaux ou cosmétiques.

Enfin, il reste plusieurs points à élucider nécessaires à l'approfondissement de ce travail de thèse. D'un point de vue fondamental, il est indispensable de séparer les produits d'oxydation par des méthodes chromatographiques et de déterminer leur masse moléculaire par CL-SM et la structure chimique par ^{1}H-RMN de chaque produit purifié. De plus, il est également indispensable de caractériser chaque produit pur par rapport aux propriétés antioxydantes, optiques, antibactériennes et cytotoxiques afin de choisir le produit le plus intéressant pour ses applications éventuelles. Il serait également intéressant de réaliser des cinétiques avec des concentrations plus faibles (inférieure à 200 µg/ml) de produits d'oxydation de l'acide férulique, du férulate d'éthyle et les molécules originales pour vérifier si la voie de mort cellulaire par apoptose ne pourrait pas être empruntée dans des conditions de toxicité moindre.

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques de chitosanes fonctionnalisés, la quantité d'acide acétique adsorbée sur le chitosane fonctionnalisé doit être déterminée pour évaluer son effet vis-à-vis des cellules animales et des bactéries. En outre, il est nécessaire d'étudier la viscosité des solutions des chitosanes fonctionnalisés en fonction de la température, de l'agitation et du temps pour évaluer leur stabilité et donc préciser leur champ d'application industrielle. D'ailleurs, pour bien comprendre le comportement des cellules HUVEC et Caco2 sur les films de chitosane, il est important d'étudier la vitesse d'adhésion

cellulaire sur les films en fonction du temps ainsi que la cristallinité des films par diffraction aux rayons X (XRD).

A plus le long terme et pour développer et compléter ce travail, quelques pistes semblent prometteuses :

- fonctionnaliser enzymatiquement le chitosane par méthode homogène (sous forme liquide) pour comprendre la différence avec la méthode hétérogène (sous forme solide) et pour améliorer davantage les propriétés fonctionnelles notamment les propriétés antioxydantes et antibactériennes. Pour mener à bien ces essais, le chitosane doit être soluble à une concentration de 5 mg/mL et pH 6 (pka ~ 6,3). L'enzyme utilisée doit donc être active à pH acide, la laccase de *Myceliophtora thermophila* est active à pH 6 tout comme la laccase de *Trametes versicolor* à pH 4,5.

- fonctionnaliser enzymatiquement des chito-oligosaccharides de chitosane solubles dans l'eau pour approfondir le mécanisme de greffage entre les produits d'oxydation et les groupements amines libres NH_2 et identifier les structures chimiques éventuelles de produits d'oxydation greffés. De plus, cette étude sera très utile pour améliorer la solubilité du chitosane fonctionnalisé à une valeur de pH physiologique pour des applications dans les domaines médicaux ou pharmaceutiques. Pour obtenir ces chito-oligosaccharides, deux méthodes sont décrites : une méthode chimique en utilisant l'acide chlorhydrique (Varum *et al.*, 2001) et une méthode enzymatique en utilisant une chitosanase (Dennhart *et al.*, 2008).

- fabriquer des films alimentaires puis étudier leurs propriétés fonctionnelles telles que les propriétés mécaniques (barrière à l'oxygène, élasticité…), antioxydantes et antibactériennes ainsi que leur application en emballage des aliments fragiles comme des légumes ou des fruits.

- étudier l'adhérence et la croissance de cellules souches mésenchymateuses (CSM) sur des films de chitosanes fonctionnalisés afin de les valoriser dans des applications médicales comme matériau en ingénierie tissulaire.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

Aaslyng D., Henrilk N. and Karen R.O. (1999). Laccase with improved dyeing properties. *United States Patent 5948121 Novo Nordisk.* 850-925.

Aberg C.M., Chen T.H., Olumide A., Raghavan S.R. and Payne G.F. (2004). Enzymatic grafting of peptides from casein hydrolysate to chitosan. potential for value-added byproducts from food-processing wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (52) 788-793.

Acero E.H., Ribitsch D., Rodriguez R.D., Dellacher A., Zitzenbacher S., Marold A., Greimel K.J., Schroeder M., Kandelbauer A., Heumann S., Nyanhongo G.S., Schwab H. and Guebitz G.M. (2012). Two-step enzymatic functionalisation of polyamide with phenolics. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic.* (79) 54-60.

Adelakun O.E., Kudanga T., Parker A., Green I.R., le Roes-Hill M. and Burton S.G. (2012). Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic.* (74) 29-35.

Agematu H., Tsuchida T., Kominato K., Shibamoto N., Yoshioka T., Nishida H., Okamoto R., Shin T. and Murao S. (1993). Enzymatic dimerization of penicillin X. *Journal of Antibiotics.* (46) 141-148.

Aggarwal B.B. and Shishodia S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology.* (71) 1397-1421.

Agullo E., Rodriguez M.S., Ramos V. and Albertengo L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience.* (3) 521-530.

Aktas N., Sahiner N., Kantoglu O., Salih B. and Tanyolac A. (2003). Biosynthesis and characterization of laccase catalyzed poly(catechol). *Journal of Polymers and the Environment.* (11) 123-128.

Alexandre G., Jacoud C., Faure D. and Bally R. (1996). Population dynamics of a motile and a non-motile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motility variation in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology.* (19) 271-278.

Anghileri A., Lantto R., Kruus K., Arosio C. and Freddi G. (2007). Tyrosinase-catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates. *Journal of Biotechnology.* (127) 508-519.

Anyanwutaku I., Petroski R. and Rosazza J. (1994). Oxidative coupling of mithramycin and hydroquinone catalyzed by copper oxidases and benzoquinone. Implications for the mechanism of action of aureolic acid antibiotics. *Bioorg Med Chem.* (2) 543-51.

Arima Y. and Iwata H. (2007). Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials.* (28) 3074-3082.

Aye K.N., Karuppuswamy R., Ahamed T. and Stevens W.F. (2006). Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. *Bioresource Technology.* (97) 577-582.

Bacon A., Makin J., Sizer P.J., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Illum L., Chatfield S. and Roberts M. (2000). Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infection and Immunity.* (68) 5764-5770.

Bacon A., Markin J., Sizer P. J., Jabbal-Gill I., Hinchcliffe M., Illum L., Chatfield S. and Roberts M. (2000). Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infection and Immunity.* (68) 5764-5770.

Baldrian P. (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *Fems Microbiology Reviews.* (30) 215-242.

Bao W., O'Malley D.M., Whetten R. and Sederoff R.R. (1993). A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science.* (260) 672-674.

Barry A. (1976). The antimicrobial Susceptibility Test: Principales and Pratices *Lea and Febiger.*

Barton S.C., Pickard M., Vazquez-Duhalt R. and Heller A. (2002). Electroreduction of O2 to water at 0.6 V (SHE) at pH 7 on the 'wired' *Pleurotus ostreatus* laccase cathode. *Biosensors and Bioelectronics.* (17) 1071-1074.

Bautista-Banos S., Hernandez-Lauzardo A.N., Velazquez-del Valle M.G., Hernandez-Lopez M., Barka E.A., Bosquez-Molina E. and Wilson C.L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection.* (25) 108-118.

Berka R.M., Schneider P., Golightly E.J., Brown S.H., Madden M., Brown K.M., Halkier T., Mondorf K. and Xu F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in Aspergillus oryzae. *Applied and Environmental Microbiology.* (63) 3151-3157.

Betcheva R., Stamenova M., Boutris C. and Tzanov T. (2003). Objective evaluation of the efficiency of cellulase finishing of cotton fabrics dyed with reactive dyes. *Macromolecular Materials and Engineering.* (288) 957-963.

Bettini R., Rornani A.A., Morganti M.M. and Borghetti A.F. (2008). Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* (68) 74-81.

Bharti A.C., Donato N., Singh S. and Aggarwal B.B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood.* (101) 1053-1062.

Bisognano C. (2000). Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. *Université de Genève, Faculté de Siences.* 70-85.

Bogdanovskaya V.A., Tarasevich M.R., Kuznetsova L.N., Reznik M.F. and Kasatkin E.V. (2002). Peculiarities of direct bioelectrocatalysis by laccase in aqueous-nonaqueous mixtures. *Biosensors and Bioelectronics.* (17) 945-951.

Bollag J.M., Chu H.L., Rao M.A. and Gianfreda L. (2003). Enzymatic oxidative transformation of chlorophenol mixtures. *Journal of Environmental Quality.* (32) 63-69.

Borenfreund E., Babich, H., (1992). The Neutral Red Cytotoxicity Assay. *Invittox.ECVAM.*

Bozic M., Gorgieva S. and Kokol V. (2012a). Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydrate Polymers.* (89) 854-864.

Bozic M., Gorgieva S. and Kokol V. (2012b). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers.* (87) 2388-2398.

Brinch D.S. and Pedersen P.B. (2002). Toxicological studies on laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* (35) 296-307.

Brinkmann M., Lutkemeyer D., Gudermann F. and Lehmann J. (2002). New technologies for automated cell counting based on optical image analysis 'The Cellscreen'. *Cytotechnology.* (38) 119-127.

BriskeAnderson M.J., Finley J.W. and Newman S.M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* (214) 248-257.

Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Argaelles-Monal W., Desbriares J. and Rinaudo M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer.* (42) 3569-3580.

Burton S.G. (1994). Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today.* (22) 459-487.

Burton S.G. (2003 a). Laccases and phenol oxidase in organic synthesis - A review. *Current Organic Chemistry.* (7) 1317-1331.

Burton S.G. (2003 b). Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology.* (21) 543-549.

Burton S.G., Boshoff A., Edwards W. and Rose P.D. (1998). Biotransformation of phenols using immobilised polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic.* (5) 411-416.

Burton S.G., Duncan J.R., Kaye P.T. and Rose P.D. (1993). Activity of mushroom polyphenol oxidase in organic medium. *Biotechnology and Bioengineering.* (42) 938-944.

Carunchio F., Crescenzi C., Girelli A.M., Messina A. and Tarola A.M. (2001). Oxidation of ferulic acid by laccase: Identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta.* (55) 189-200.

Chao A.C., Shyu S.S., Lin Y.C. and Mi F.L. (2004). Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan - to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent. *Bioresource Technology.* (91) 157-162.

Chatelet C., Damour O. and Domard A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials.* (22) 261-268.

Chen C.J., Hsu M.H., Kuo S.C., Lai Y.Y., Chung J.G. and Huang L.J. (2007). (2E)-N,N-dibutyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acrylamide induces apoptosis and cell cycle arrest in HL-60 cells. *Anticancer Research.* (27) 343-349.

Chen H.T., Calabrese Barton S., Binyamin G., Gao Z., Zhang Y., Kim H.H. and Heller A. (2001). A miniature biofuel cell [19]. *Journal of the American Chemical Society.* (123) 8630-8631.

Chen H.T., Embree H.D., Brown E.M., Taylor M.M. and Payne G.F. (2003). Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: potential for in situ applications. *Biomaterials.* (24) 2831-2841.

Chen H.T., Embree H.D., Wu L.Q. and Payne G.F. (2002). In vitro protein-polysaccharide conjugation: Tyrosinase-catalyzed conjugation of gelatin and chitosan. *Biopolymers.* (64) 292-302.

Chen H.T., Kumar G., Harris M.T., Smith P.J. and Payne G.F. (2000). Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties. *Biotechnology and Bioengineering.* (70) 564-573.

Chirkov S.N. (2002). The antiviral activity of chitosan (review). *Applied Biochemistry and Microbiology.* (38) 1-8.

Choi B.K., Kim K.Y., Yoo Y.J., Oh S.J., Choi J.H. and Kim C.Y. (2001). *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* (18) 553-557.

Claus H. (2004). Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron.* (35) 93-96.

Colombo G. and Carrea G. (2002). Modeling enzyme reactivity in organic solvents and water through computer simulations. *Journal of Biotechnology.* (96) 23-33.

Coma V., Deschamps A. and Martial-Gros A. (2003). Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer - Antimicrobial Activity Assessment on Dairy-Related Contaminants. *Journal of Food Science.* (68) 2788-2792.

Couteau D., McCartney A.L., Gibson G.R., Williamson G. and Faulds C.B. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology.* (90) 873-881.

Couto S.R., Sanroman M. and Gubitz G.M. (2005). Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere.* (58) 417-422.

Craven M.R., Ledward D.A. and Taylor A.J. (1981). The production and analysis of food colourants derived from vegetable material. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* (32) 847-848.

Crini G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology.* (97) 1061-1085.

Cuero R.G., Osuji G. and Washington A. (1991). N-Carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnology Letters.* (13) 441-444.

Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Martin-Alvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A., Rivas C.L., Requena T., Rodriguez J.M. and Bartolome B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology.* (161) 372-382.

D'Annibale A., Celletti D., Felici M., Dimattia E. and Giovannozzi-Sermanni G. (1996). Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnologica.* (16) 257-270.

Dec J., Haider K. and Bollag J.M. (2003). Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions. *Chemosphere.* (52) 549-556.

Dedoussis G.V.Z., Kaliora A.C. and Andrikopoulos N.K. (2005). Effect of phenols on natural killer (NK) cell-mediated death in the K562 human leukemic cell line. *Cell Biology International.* (29) 884-889.

Dennhart N., Fukamizo T., Brzezinski R., Lacombe-Harvey M.E. and Letzel T. (2008). Oligosaccharide hydrolysis by chitosanase enzymes monitored by real-time electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Biotechnology.* (134) 253-260.

Denuziere A., Ferrier D., Damour O. and Domard A. (1998). Chitosan - chondroitin sulfate and chitosan - hyaluronate polyelectrolyte complexes: Biological properties. *Biomaterials.* (19) 1275-1285.

Derat E. and Shaik S. (2006). An efficient proton-coupled electron-transfer process during oxidation of ferulic acid by *horseradish peroxidase*: Coming full cycle. *Journal of the American Chemical Society.* (128) 13940-13949.

Desbrières J. (2002). Chitin and chitosan. *Chitine et chitosane.* 39-44.

Devlieghere F., Vermeulen A. and Debevere J. (2004). Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology.* (21) 703-714.

Diaz-Garcia M.E. and Valencia-Gonzalez M.J. (1995). Enzyme catalysis in organic solvents: A promising field for optical biosensing. *Talanta.* (42) 1763-1773.

Domard A. and Piron E. (2000). Recent approach of metal binding by chitosan and derivatives. *Advances in Chitin science.* (4) 295-301.

Dordick J.S. (1992). Designing enzymes for use in organic solvents. *Biotechnology Progress.* (8) 259-267.

Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A. and Gianfreda L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme and Microbial Technology.* (31) 907-931.

Dutau G., Rance F., Fejji S., Juchet A., Bremont F. and Nouilhan P. (1996). Intolérance aux additifs alimentaires chez l'enfant : mythe ou réalité? *Revue Française d'Allergologie.* (36) 129-142.

Dutkiewicz J.K. (2002). Superabsorbent materials from shellfish waste - A review. *Journal of Biomedical Materials Research.* (63) 373-381.

El Agha A., Makris D.P. and Kefalas P. (2008). Peroxidase-Active Cell Free Extract from Onion Solid Wastes: Biocatalytic Properties and Putative Pathway of Ferulic Acid Oxidation. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* (106) 279-285.

El Ghaouth A., Arul J., Asselin A. and Benhamou N. (1992). Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research.* (96) 769-779.

Elbert D.L. and Hubbell J.A. (1996). Surface treatments of polymers for biocompatibility. *Annual Review of Materials Science.* (26) 365-394.

Eloff J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica.* (64) 711-713.

Enayatzamir K., Alikhani H.A. and Couto S.R. (2009). Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials.* (164) 296-300.

Enguita F.J., Maral D., Martins L.O., Grenha R., Henriques A.O., Lindley P.F. and Carrondo M.A. (2004). Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry.* (279) 23472-23476.

Fang S.W., Li C.F. and Shih D.E.F. (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied Kumquat. *J. Food Protect.* (56) 136-140.

Ferruti P., Knobloch S., Ranucci E., Duncan R. and Gianasi E. (1998). A novel modification of poly(L-lysine) leading to a soluble cationic polymer with reduced toxicity and with potential as a transfection agent. *Macromolecular Chemistry and Physics.* (199) 2565-2575.

Figueroa-Espinoza M.C., Morel M.H. and Rouau X. (1998). Effect of Lysine, Tyrosine, Cysteine, and Glutathione on the Oxidative Cross-Linking of Feruloylated Arabinoxylans by a Fungal Laccase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (46) 2583-2589.

Frankel E.N. and Meyer A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* (80) 1925-1941.

Fras-Zemljic L., Kokol V. and Cakara D. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan-based viscose fibres enzymatically functionalized with flavonoids. *Textile Research Journal.* (81) 1532-1540.

Freddi G., Anghileri A., Sampaio S., Buchert J., Monti P. and Taddei P. (2006). Tyrosinase-catalyzed modification of Bombyx mori silk fibroin: Grafting of chitosan under heterogeneous reaction conditions. *Journal of Biotechnology.* (125) 281-294.

Gamelas J.A.F., Tavares A.P.M., Evtuguin D.V. and Xavier A.M.B. (2005). Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic.* (33) 57-64.

Gerente C., Lee V.K.C., Le Cloirec P. and McKay G. (2007). Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption - Mechanisms and models review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* (37) 41-127.

Gianfreda L., Sannino F., Filazzola M.T. and Leonowicz A. (1998). Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic.* (4) 13-23.

Gianfreda L., Xu F. and Bollag J.M. (1999). Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal.* (3) 1-25.

Golan-Goldhirsh A. and Whitaker J.R. (1984). Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite, and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (32) 1003-1009.

Golz-Berner K., Walzel B., Zastrow L. and Doucet O. (2005). Cosmetic and dermatological preparation containing copper binding proteins for skin lightening. *Int Pat Appl CN1674857.* 650-680.

Gomes S.A.S.S., Nogueira J.M.F. and Rebelo M.J.F. (2004). An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics.* (20) 1211-1216.

Gonzalez T., Terran M.C., Yagae S., Zapico E., Galletti G.C. and Gonzalez A.E. (2000). Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal- biotreated distillery wastewater using Trametes sp. I-62 (CECT 20197). *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* (14) 1417-1424.

Grabovac V., Guggi D. and Bernkop-Schnurch A. (2005). Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* (57) 1713-1723.

Guibal E. (2005). Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. *Progress in Polymer Science.* (30) 71-109.

Hadzhiyska H., Calafell M., Gibert J.M., Daga J.M. and Tzanov T. (2006). Laccase-assisted dyeing of cotton. *Biotechnology Letters.* (28) 755-759.

Hahn V., Mikolasch A., Manda K., Gordes D., Thurow K. and Schauer F. (2009a). Derivatization of amino acids by fungal laccases: Comparison of enzymatic and chemical methods. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic.* (60) 76-81.

Hahn V., Mikolasch A., Manda K., Gordes D., Thurow K. and Schauer F. (2009b). Laccase-catalyzed carbon-nitrogen bond formation: coupling and derivatization of unprotected l-phenylalanine with different para-hydroquinones. *Amino Acids.* (37) 315-321.

Hai L., Diep T.B., Nagasawa N., Yoshii F. and Kume T. (2003). Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms.* (208) 466-470.

Harkin J.H. and Obst J.R. (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia.* (37) 381-387.

Harvey B.M. and Walker J.R.L. (1999). Studies with plant laccases: I, Comparison of plant and fungal laccases. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics.* (3) 45-51.

Helander I.M., Nurmiaho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J. and Roller S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* (71) 235-244.

Heux L., Brugnerotto J., Desbriares J., Versali M.F. and Rinaudo M. (2000). Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules.* (1) 746-751.

Hidalgo I.J., Raub T.J. and Borchardt R.T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* (96) 736-749.

Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R. and Kues U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *Febs Journal.* (273) 2308-2326.

Hoffman A.S., Chen G.H., Wu X.D. and Ding Z.L. (1997). Graft copolymers of peo-ppo-peo triblock polyethers on bioadhesive polymer backbones: Synthesis and properties. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society.* (213) 23-POLY.

Holmes C.A. and Tabrizian M. (2011). Enhanced MC3T3 preosteoblast viability and adhesion on polyelectrolyte multilayer films composed of glycol-modified chitosan and hyaluronic acid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* (100A) 518-526.

Hossain K.M.G., Gonzalez M.D., Lozano G.R. and Tzanov T. (2009). Multifunctional modification of wool using an enzymatic process in aqueous-organic media. *Journal of Biotechnology.* (141) 58-63.

Hou H.M., Zhou J.T., Wang J., Du C.H. and Yan B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry.* (39) 1415-1419.

Hozumi K., Otagiri D., Yamada Y., Sasaki A., Fujimori C., Wakai Y., Uchida T., Katagiri F., Kikkawa Y. and Nomizu M. (2010). Cell surface receptor-specific scaffold requirements for adhesion to laminin-derived peptide-chitosan membranes. *Biomaterials.* (31) 3237-3243.

Ikehata K. and Nicell J.A. (2000). Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology.* (74) 191-199.

Ikigai H., Nakae T., Hara Y. and Shimamura T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica Et Biophysica Acta.* (1147) 132-136.

Intra A., Nicotra S., Riva S. and Danieli B. (2005). Significant and unexpected solvent influence on the selectivity of laccase-catalyzed coupling of tetrahydro-2-naphthol derivatives. *Advanced Synthesis & Catalysis.* (347) 973-977.

Jackson R. (2008). Wine science: principale and application. *Third ed. London: Academic press.*

Janicke B., Onning G. and Oredsson S.M. (2005). Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (53) 6658-6665.

Jarosz-Wilkoa,azka A., Ruzgas T. and Gorton L. (2004). Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology.* (35) 238-241.

Jayakumar R., Prabaharan M., Reis R.L. and Mano J.F. (2005). Graft copolymerized chitosan - present status and applications. *Carbohydrate Polymers.* (62) 142-158.

Jin R., Teixeira L.S.M., Dijkstra P.J., Karperien M., van Blitterswijk C.A., Zhong Z.Y. and Feijen J. (2009). Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* (30) 2544-2551.

Johannes C. and Majcherczyk A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology.* (78) 193-199.

Kaminski W., Tomczak E. and Jaros K. (2008). Interactions of metal ions sorbed on chitosan beads. *Desalination.* (218) 281-286.

Kampa M., Alexaki V.I., Notas G., Nifli A.P., Nistikaki A., Hatzoglou A., Bakogeorgou E., Kouimtzoglou E., Blekas G., Boskou D., Gravanis A. and Castanas E. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research.* (6) R63-R74.

Kanatt S.R., Chander R. and Sharma A. (2008). Chitosan glucose complex - A novel food preservative. *Food Chemistry.* (106) 521-528.

Kaneko Y., Matsuda S. and Kadokawa J. (2007). Chemoenzymatic syntheses of amylose-grafted chitin and chitosan. *Biomacromolecules.* (8) 3959-3964.

Kasaai M.R., Arul J., Chin S.L. and Charlet G. (1999). The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* (120) 201-205.

Kermasha S., Bao H., Bisakowski B. and Yaylayan V. (2002). Characterization of the biocatalysis of tyrosinase in selected organic solvent media using model phenolic substrates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* (19-20) 335-345.

Kerwin J.L., Turecek F., Xu R.D., Kramer K.J., Hopkins T.L., Gatlin C.L. and Yates J.R. (1999). Mass spectrometric analysis of catechol-histidine adducts from *insect cuticle*. *Analytical Biochemistry.* (268) 229-237.

Keselowsky B.G., Collard D.M. and Garcia A.J. (2003). Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* (66A) 247-259.

Kilani-Jaziri S., Neffati A., Limem I., Boubaker J., Skandrani I., Sghair M.B., Bouhlel I., Bhouri W., Mariotte A.M., Ghedira K., Dijoux Franca M.-G.v. and Chekir-Ghedira L. (2009). Relationship correlation of antioxidant and antiproliferative capacity of Cyperus rotundus products towards K562 erythroleukemia cells. *Chemico-Biological Interactions.* (181) 85-94.

Kim K.W. and Thomas R.L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry.* (101) 308-313.

Kim S.K. and Rajapakse N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers.* (62) 357-368.

Kim S.Y., Zille A., Murkovic M., Gebitz G. and Cavaco-Paulo A. (2007). Enzymatic polymerization on the surface of functionalized cellulose fibers. *Enzyme and Microbial Technology.* (40) 1782-1787.

Kim Y., Cho N.S., Eom T.J. and Shin W. (2002). Purification and characterization of a laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation. *Bulletin of the Korean Chemical Society.* (23) 985-989.

Kimura Y., Yamamoto M., Shimazaki R., Kashiwada A., Matsuda K. and Yamada K. (2012). Use of chitosan for removal of bisphenol a from aqueous solutions through quinone oxidation by polyphenol oxidase. *Journal of Applied Polymer Science.* (124) 796-804.

Klokkevold P.R., Fukayama H., Sung E.C. and Bertolami C.N. (1999). The effect of chitosan (poly-n-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* (57) 49-52.

Kobayashi S. and Higashimura H. (2003). Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in Polymer Science (Oxford).* (28) 1015-1048.

Kochkina Z.M. and Chirkov S.N. (2000). Influence of chitosan derivatives on the development of phage infection in the *Bacillus thuringiensis* culture. *Microbiology.* (69) 217-219.

Kong M., Chen X.G., Xing K. and Park H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology.* (144) 51-63.

Konishi Y. and Shimizu M. (2003). Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco2 cell monolayers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* (67) 856-862.

Konovalova I.N., Novikov V.Y., Stepanova N.V. and Reut K.V. (2004). Recovery of lipids from aqueous dispersions with chitosan solutions. *Russian Journal of Applied Chemistry.* (77) 254-259.

Krajewska B. (2005). Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Separation and Purification Technology.* (41) 305-312.

Kramer K.J., Kanost M.R., Hopkins T.L., Jiang H., Zhu Y.C., Xu R., Kerwin J.L. and Turecek F. (2001). Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron.* (57) 385-392.

Kudanga T., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M. and Burton S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology.* (48) 195-208.

Kumar G., Bristow J.F., Smith P.J. and Payne G.F. (2000). Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer.* (41) 2157-2168.

Kumar G., Smith P.J. and Payne G.F. (1999). Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and Bioengineering.* (63) 154-165.

Kurita K. (2006). Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology.* (8) 203-226.

Kurita K., Kaji Y., Mori T. and Nishiyama Y. (2000). Enzymatic degradation of chitin: Susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers.* (42) 19-21.

Lacki K. and Duvnjak Z. (1996). Modeling the enzymatic transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenoloxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering.* (51) 249-259.

Laemmli U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* (227) 680-685

Laflamme P., Benhamou N., Bussiares G. and Dessureault M. (1999). Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany.* (77) 1460-1468.

Lahiji A., Sohrabi A., Hungerford D.S. and Frondoza C.G. (2000). Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *Journal of Biomedical Materials Research.* (51) 586-595.

Lang G. and Cotteret J. (1999). Hair dye composition containing laccase. *Int Pat Appl WO9936036.* (31) 489-498.

Lathasree S., Rao A.N., SivaSankar B., Sadasivam V. and Rengaraj K. (2004). Heterogeneous photocatalytic mineralisation of phenols in aqueous solutions. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical.* (223) 101-105.

Lee K.Y., Ha W.S. and Park W.H. (1995). Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. *Biomaterials.* (16) 1211-1216.

Lee S.E., Shin H.T., Hwang H.J. and Kim J.H. (2003). Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytotherapy Research.* (17) 1041-1047.

Li P., Zhang J.L. and Wang A.Q. (2006). Progress in analytical chemistry of chitosan and its derivatives. *Progress in Chemistry.* (18) 467-473.

Li Y., Chen X.G., Liu N., Liu C.S., Liu C.G., Meng X.H., Yu L.J. and Kenendy J.F. (2007). Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate Polymers.* (67) 227-232.

Lien E.J., Ren S.J., Bui H.Y.H. and Wang R.B. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine.* (26) 285-294.

Lih E., Lee J.S., Park K.M. and Park K.D. (2012). Rapidly curable chitosan-PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing. *Acta Biomaterialia.* (8) 3261-3269.

Liu D., Wei Y., Yao P. and Jiang L. (2006). Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. *Carbohydrate Research.* (341) 782-785.

Liu L., Li S., Garreau H. and Vert M. (2000). Selective enzymatic degradations of poly (L-lactide) and poly(-caprolactone) blend films. *Biomacromolecules.* (1) 350-359.

Liu W.G. and De Yao K. (2002). Chitosan and its derivatives - a promising non-viral vector for gene transfection. *Journal of Controlled Release.* (83) 1-11.

Liu X.F., Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z. and Yao K.D. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science.* (79) 1324-1335.

Lou M.M., Zhu B., Muhammad I., Li B., Xie G.L., Wang Y.L., Li H.Y. and Sun G.C. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. *Carbohydrate Research.* (346) 1294-1301.

Lu S., Gough A., Bobrowski W. and Stewart B. (1996). Transport properties are not altered across Caco2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* (85) 270-273.

Maher S. and McClean S. (2006). Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells *in vitro*. *Biochemical Pharmacology.* (71) 1289-1298.

Malette W.G. and Quigley H.J. (1985). Method of achieving hemostasis, inhibiting fibroplasia, and promoting regeneration in a tissue wound. *Brevet USA n°US4532134.*

Manda K., Hammer E., Mikolasch A., Gordes D., Thurow K. and Schauer F. (2006). Laccase-induced derivatization of unprotected amino acid L-tryptophan by coupling with p-hydroquinone 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide. *Amino Acids.* (31) 409-419.

Mao L.C. and Wu T. (2007). Gelling properties and lipid oxidation of kamaboko gels from grass carp (Ctenopharyngodon idellus) influenced by chitosan. *Journal of Food Engineering.* (82) 128-134.

Matkowski A. and Piotrowska M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia.* (77) 346-353.

Matsuda S., Kaneko Y. and Kadokawa J. (2007). Chemoenzymatic synthesis of amylose-grafted chitosan. *Macromolecular Rapid Communications.* (28) 863-867.

Mayer A.M. and Staples R.C. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* (60) 551-565.

Mellou F., Loutrari H., Stamatis H., Roussos C. and Kolisis F.N. (2006). Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Process Biochemistry.* (41) 2029-2034.

Messerschmidt A. (1997). Multi-Copper Oxidases. *World Scientific Singapore.*

Micard V. and Thibault J.F. (1999). Oxidative gelation of sugar-beet pectins: Use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins. *Carbohydrate Polymers.* (39) 265-273.

Mikolasch A., Hahn V., Manda K., Pump J., Illas N., Gordes D., Lalk M., Salazar M.G., Hammer E., Julich W.D., Rawer S., Thurow K., Lindequist U. and Schauer F. (2010). Laccase-catalyzed cross-linking of amino acids and peptides with dihydroxylated aromatic compounds. *Amino Acids.* (39) 671-683.

Mikolasch A., Niedermeyer T.H.J., Lalk M., Witt S., Seefeldt S., Hammer E., Schauer F., Gesell M., Hessel S., Julich W.D. and Lindequist U. (2006). Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from Trametes sp. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* (54) 632-638.

Mikolasch A., Niedermeyer T.H.J., Lalk M., Witt S., Seefeldt S., Hammer E., Schauer F., Salazar M.G., Hessel S., Julich W.D. and Lindequist U. (2007). Novel cephalosporins synthesized by amination of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives using fungal laccases II. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* (55) 412-416.

Mikolasch A. and Schauer F. (2009). Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology.* (82) 605-624.

Mikolasch A., Wurster M., Lalk M., Witt S., Seefeldt S., Hammer E., Schauer F., Julich W.D. and Lindequist U. (2008). Novel beta-lactam antibiotics synthesized by amination of catechols using fungal laccase. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* (56) 902-907.

Minussi R.C., Pastore G.M. and Duran N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science and Technology.* (13) 205-216.

Moldes D., Daz M., Tzanov T. and Vidal T. (2008). Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource Technology.* (99) 7959-7965.

Mougin C., Jolivalt C., Briozzo P. and Madzak C. (2003). Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters.* (1) 145-148.

Mustafa R., Muniglia L., Rovel B. and Girardin M. (2005). Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. *Food Research International.* (38) 995-1000.

Muzzareli R. A. A. (1996). Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate polymers.* (29) 309-316.

Muzzarelli R.A.A.,]euniaux C. and Gooday G.W. (1986). Chitin in Nature and Technalogy. *New York: Plenum Publishing Corporation.*

Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Tarsi R., Miliani M., Gabbanelli F. and Cartolari M. (2001). Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. *Biomacromolecules.* (2) 165-169.

Nagaoka S., Takiuchi H., Yokota K., Mori Y., Tanzawa H. and Kikuchi T. (1992). Interactions between blood components and hydrogels with poly(oxyethylene) chain of various chain length. *Kobunshi Ronbunshu.* (39) 165–171.

Neamnark A., Sanchavanakit N., Pavasant P., Bunaprasert T., Supaphol P. and Rujiravanit R. (2007). *In vitro* biocompatibility evaluations of hexanoyl chitosan film. *Carbohydrate Polymers.* (68) 166-172.

Negishi O. and Ozawa T. (2000). Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. *Phytochemistry.* (54) 481-487.

Nguyen S., Hisiger S., Jolicoeur M., Winnik F.M. and Buschmann M.D. (2009). Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and H-1 NMR after semi-preparative SEC. *Carbohydrate Polymers.* (75) 636-645.

Nicolas J.J., Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M.J. and Aubert S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical reviews in food science and nutrition.* (34) 109-157.

Noh H. and Vogler E.A. (2006). Volumetric interpretation of protein adsorption: Mass and energy balance for albumin adsorption to particulate adsorbents with incrementally increasing hydrophilicity. *Biomaterials.* (27) 5801-5812.

Norsker M., Jensen M. and Adler-Nissen J. (2000). Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocolloids.* (14) 237-243.

Nystrom B., Kjaniksen A.L. and Iversen C. (1999). Characterization of association phenomena in aqueous systems of chitosan of different hydrophobicity. *Advances in Colloid and Interface Science.* (79) 81-103.

Olteanu C.E. and Enescu D. (2007). Chitosan involved tissue engineering and regenerative medicine. *Romanian Biotechnological Letters.* (12) 3217-3233.

Onishi H. and Machida Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials.* (20) 175-182.

Onsoyen E. and Skaugrud O. (1990). Metal recovery using chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* (49) 395-404.

Osman Z. and Arof A.K. (2003). FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta.* (48) 993-999.

Oszmianski J. and Lee C.Y. (1990). Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (38) 1202-1204.

Oszmianski J. and Wojdylo A. (2007). Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. *European Food Research and Technology.* (224) 755-762.

Ou S.Y. and Kwok K.C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* (84) 1261-1269.

Oyaizu M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* (44) 307-315.

Pa J.H. and Yu T.L. (2001). Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions. *Macromolecular Chemistry and Physics.* (202) 985-991.

Park E.J., Zhao Y.Z., An R.B., Kim Y.C. and Sohn D.H. (2008). 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose from Galla Rhois Protects Primary Rat Hepatocytes from Necrosis and Apoptosis. *Planta Medica.* (74) 1380-1383.

Pasanphan W., Buettner G.R. and Chirachanchai S. (2010). Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. *Carbohydrate Research.* (345) 132-140.

Payne G.F., Chaubal M.V. and Barbari T.A. (1996). Enzyme-catalysed polymer modification: Reaction of phenolic compounds with chitosan films. *Polymer.* (37) 4643-4648.

Peng L., Wang B. and Ren P. (2005a). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* (45) 108-111.

Peng Y., Han B., Liu W. and Xu X. (2005b). Preparation and antimicrobial activity of hydroxypropyl chitosan. *Carbohydrate Research.* (340) 1846-1851.

Perry C.C., Weatherly M., Beale T. and Randriamahefa A. (2009). Atomic force microscopy study of the antimicrobial activity of aqueous garlic versus ampicillin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* (89) 958-964.

Peshkova S. and Li K.C. (2003). Investigation of chitosan-phenolics systems as wood adhesives. *Journal of Biotechnology.* (102) 199-207.

Piontek K., Antorini M. and Choinowski T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry.* (277) 37663-37669.

Piron E., Accominotti M. and Domard A. (1997). Interaction between chitosan and uranyl ions. Role of physical and physico-chemical parameters on the kinetics sorption. *Langmuir.* (13) 1653-1658.

Plochmann K., Korte G., Koutsilieri E., Richling E., Riederer P., Rethwilm A., Schreier P. and Scheller C. (2007). Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* (460) 1-9.

Polak J. and Jarosz-Wilkolazka A. (2012). Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry.* (47) 1295-1307.

Poquet L., Clifford M.N. and Williamson G. (2008). Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metabolism and Disposition.* (36) 190-197.

Prabaharan M. and Mano J.F. (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery.* (12) 41-57.

Qin C.Q., Du Y.M., Xiao L., Li Z. and Gao X.H. (2002). Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules.* (31) 111-117.

Quaratino D., D'Annibale A., Federici F., Cereti C.F., Rossini F. and Fenice M. (2007). Enzyme and fungal treatments and a combination thereof reduce olive mill wastewater phytotoxicity on Zea mays L. seeds. *Chemosphere.* (66) 1627-1633.

Raafat D., von Bargen K., Haas A. and Sahl H.G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology.* (74) 3764-3773.

Rabea E.I., Badawy M.E.T., Stevens C.V., Smagghe G. and Steurbaut W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules.* (4) 1457-1465.

Ralph J., Quideau S., Grabber J.H. and Hatfield R.D. (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1.* 3485-3498.

Rao S.B. and Sharma C.P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research.* (34) 21-28.

Ratajska M. and Boryniec S. (1998). Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. *Reactive and Functional Polymers.* (38) 35-49.

Ravi Kumar M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers.* (46) 1-27.

Rawel H.M., Kroll J. and Rohn S. (2001). Reactions of phenolic substances with lysozyme - Physicochemical characterisation and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chemistry.* (72) 59-71.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine.* (26) 1231-1237.

Rinaudo M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford).* (31) 603-632.

Rissom S., Schwarz-Linek U., Vogel M., Tishkov V.I. and Kragl U. (1997). Synthesis of chiral Îµ-lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron Asymmetry.* (8) 2523-2526.

Riva S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology.* (24) 219-226.

Roach P., Eglin D., Rohde K. and Perry C.C. (2007). Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine.* (18) 1263-1277.

Roberts G.A.F. (1992). Chitin chemistry. *London: Macmillan Press.*

Rodraguez Couto S. and Toca Herrera J.L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances.* (24) 500-513.

Roller S. and Covill N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology.* (47) 67-77.

Romero C., Brenes M., Garcia P. and Garrido A. (1998). Effect of amino acids on the chemical oxidation of olive o-diphenols in model systems. *Food Chemistry.* (63) 319-324.

Rompel A., Fischer H., Meiwes D., Baldt-Karentzopoulos K., Magrini A., Eicken C., Gerdemann C. and Krebs B. (1999). Substrate specificity of catechol oxidase from *Lycopus europaeus* and characterization of the bioproducts of enzymic caffeic acid oxidation. *FEBS Letters.* (445) 103-110.

Rouet-Mayer A.M., Philippon J. and Nicolas J. (1993). Enzymatic browning biological aspects. *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, Academic Press Limited, London,.* (1) 499-506.

Sabnis S. and Block L.H. (2000). Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems - I. Molecular modifications. *International Journal of Biological Macromolecules.* (27) 181-186.

Sajomsang W., Tantayanon S., Tangpasuthadol V. and Daly W.H. (2008). Synthesis of methylated chitosan containing aromatic moieties: Chemo selectivity and effect on molecular weight. *Carbohydrate Polymers.* (72) 740-750.

Sakai S., Yamada Y., Zenke T. and Kawakami K. (2009). Novel chitosan derivative soluble at neutral pH and in-situ gellable via peroxidase-catalyzed enzymatic reaction. *Journal of Materials Chemistry.* (19) 230-235.

Salem J.H., Chevalot I., Harscoat-Schiavo C., Paris C., Fick M. and Humeau C. (2011). Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch and their acylated derivatives. *Food Chemistry.* (124) 486-494.

Salem J.H., Humeau C., Chevalot I., Harscoat-Schiavo C., Vanderesse R., Blanchard F. and Fick M. (2010). Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochemistry.* (45) 382-389.

Sampaio S., Taddei P., Monti P., Buchert J. and Freddi G. (2005). Enzymatic grafting of chitosan onto Bombyx mori silk fibroin: kinetic and IR vibrational studies. *Journal of Biotechnology.* (116) 21-33.

Sanchez-Maldonado A.F., Schieber A. and Ganzle M.G. (2011). Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology.* (111) 1176-1184.

Sarni-Manchado P., Cheynier V. and Moutounet M. (1997). Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid o-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry.* (45) 1365-1369.

Schipper N.G.M., Olsson S., Hoogstraate J.A., deBoer A.G., Varum K.M. and Artursson P. (1997). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs .2. Mechanism of absorption enhancement. *Pharmaceutical Research.* (14) 923-929.

Selinheimo E., Kruus K., Buchert J., Hopia A. and Autio K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science.* (43) 152-159.

Serafim T.L., Carvalho F.S., Marques M.P.M., Calheiros R., Silva T., Garrido J., Milhazes N., Borges F., Roleira F., Silva E.T., Holy J. and Oliveira P.J. (2011). Lipophilic Caffeic and Ferulic Acid Derivatives Presenting Cytotoxicity against Human Breast Cancer Cells. *Chemical Research in Toxicology.* (24) 763-774.

Shahgholi M., Ross M.M., Callahan J.H. and Smucker R.A. (1996). Electrospray mass spectrometric detection of chitobiose in enzyme hydrolysates of marine phytoplankton. *Analytical Chemistry.* (68) 1335-1341.

Shepherd R., Reader S. and Falshaw A. (1997). Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal.* (14) 535-542.

Shi C., Zhu Y., Ran X., Wang M., Su Y. and Cheng T. (2006). Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *Journal of Surgical Research.* (133) 185-192.

Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. and Nakamura T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (40) 945-948.

Singh D.K. and Ray A.R. (1998). Characterization of grafted chitosan films. *Carbohydrate Polymers.* (36) 251-255.

Slocum T.L. and Deupree J.D. (1991). Interference of Biogenic-Amines with the Measurement of Proteins Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry.* (195) 14-17.

Smith D.M. and Montgomery M.W. (1985). Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'anjou pears. *Phytochemistry.* (24) 901-904.

Solomon E.I., Sundaram U.M. and Machonkin T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews.* (96) 2563-2605.

Sorlier P., Denuziare A., Viton C. and Domard A. (2001). Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules.* (2) 765-772.

Sousa F., Guebitz G.M. and Kokol V. (2009). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan enzymatically functionalized with flavonoids. *Process Biochemistry.* (44) 749-756.

Speiciene V., Guilmineau F., Kulozik U. and Leskauskaite D. (2007). The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. *Food Chemistry.* (102) 1048-1054.

Strand S.P., Vandvik M.S., Varum K.M. and Ostgaard K. (2001). Screening of chitosans and conditions for bacterial flocculation. *Biomacromolecules.* (2) 126-133.

Strauss G. and Gibson S.M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids.* (18) 81-89.

Struszczyk M.H. (2002). Chitin and chitosan - Part II. Applications of chitosan. *Polimery.* (47) 396-403.

Sudarshan N.R., Hoover D.G. and Knorr D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology.* (6) 257-272.

Suzuki M., Sugiyama T., Musashi E., Kobiyama Y., Kashiwada A., Matsuda K. and Yamada K. (2010). Use of Chitosan for Removal of Bisphenol A and Bisphenol Derivatives Through Tyrosinase-Catalyzed Quinone Oxidation. *Journal of Applied Polymer Science.* (118) 721-732.

Szamocki R., Flexer V., Levin L., Forchiasin F. and Calvo E.J. (2009). Oxygen cathode based on a layer-by-layer self-assembled laccase and osmium redox mediator. *Electrochimica Acta.* (54) 1970-1977.

Tayel A.A., Moussa S., Opwis K., Knittel D., Schollmeyer E. and Nickisch-Hartfiel A. (2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules.* (47) 10-14.

Taylor A.J. and Clydesdale F.M. (1987). Potential of oxidised phenolics as food colourants. *Food Chemistry.* (24) 301-313.

Thalmann C.R. and Lotzbeyer T. (2002). Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase. *European Food Research and Technology.* (214) 276-281.

Thanou M. and Junginger H. (2005). Pharmaceutical applications of chitosan and derivativesz in: Polysccharide, Structural diversity and functional versatility *New York : Marcel Dekker 2ed.* 661-670.

Tharanathan R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. *Trends in Food Science and Technology.* (14) 71-78.

Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S and M S. (1988). Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* (36) 784–790.

Tomihata K. and Ikada Y. (1997). *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials.* (18) 567-575.

Torres E., Marin V., Aburto J., Beltran H.I., Shirai K., Villanueva S. and Sandoval G. (2012). Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films. *Applied Biochemistry and Microbiology.* (48) 151-158.

Toscano G., Colarieti M.L. and Greco Jr G. (2003). Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. *Enzyme and Microbial Technology.* (33) 47-54.

Trabelsi S.K., Tahar N.B. and Abdelhedi R. (2004). Electrochemical behavior of caffeic acid. *Electrochimica Acta.* (49) 1647-1654.

Tran N.Q., Joung Y.K., Lih E. and Park K.D. (2012). In Situ Forming and Rutin-Releasing Chitosan Hydrogels as Injectable Dressings for Dermal Wound Healing. *Biomacromolecules.* (12) 2872-2880.

Tripathi P. and Dubey N.K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology.* (32) 235-245.

Tual C., Espuche E., Escoubes M. and Domard A. (2000). Transport properties of chitosan membranes: Influence of crosslinking. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics.* (38) 1521-1529.

Tzanov T., Silva C.J., Zille A., Oliveira J. and Cavaco-Paulo A. (2003). Effect of some process parameters in enzymatic dyeing of wool. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* (111) 1-13.

Ueno H., Mori T. and Fujinaga T. (2001). Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews.* (52) 105-115.

Vachoud L., Chen T.H., Payne G.F. and Vazquez-Duhalt R. (2001). Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan. *Enzyme and Microbial Technology.* (29) 380-385.

Vartiainen J., Ratto M., Lantto R., Nattinen K. and Hurme E. (2008). Tyrosinase-catalysed grafting of food-grade gallates to chitosan: Surface properties of novel functional coatings. *Packaging Technology and Science.* (21) 317-328.

Varum K.M., Myhr M.M., Hjerde R.J.N. and Smidsra¸d O. (1997). *In vitro* degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research.* (299) 99-101.

Vazquez-Duhalt R., Tinoco R., D'Antonio P., Topoleski L.D.T. and Payne G.F. (2001). Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: Smart biocatalysts and biocatalytic hydrogels. *Bioconjugate Chemistry.* (12) 301-306.

Vermuë M.H. and Tramper J. (1995). Interrelations of Chemistry and Biotechnology .5. Biocatalysis in Nonconventional Media - Medium Engineering Aspects. *Pure and Applied Chemistry.* (67) 345-373.

Viebahn C.S., Tirnitz-Parker J.E.E., Olynyk J.K. and Yeoh G.C.T. (2006). Evaluation of the "Cellscreen" system for proliferation studies on liver progenitor cells. *European Journal of Cell Biology.* (85) 1265-1274.

Vinsova J. and Vavrikova E. (2011). Chitosan Derivatives with Antimicrobial, Antitumour and Antioxidant Activities - a Review. *Current Pharmaceutical Design.* (17) 3596-3607.

Wada S., Ichikawa H. and Tatsumi K. (1993). Removal of Phenols from Waste-Water by Soluble and Immobilized Tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering.* (42) 854-858.

Walker J.R.L. and Ferrar P.H. (1998). Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* (15) 457-498.

Wang C.L., Zhao M., Li D.B., Cui D.Z., Lu L. and Wei X.D. (2010). Isolation and characterization of a novel *Bacillus subtilis* WD23 exhibiting laccase activity from forest soil. *African Journal of Biotechnology.* (9) 5496-5502.

Weiss R.F. (1970). The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep-Sea Research and Oceanographic Abstracts.* (17) 721-735.

Widsten P. and Kandelbauer A. (2008). Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology.* (42) 293-307.

Witayakran S. and Ragauskas A.J. (2009). Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis.* (351) 1187-1209.

Wong K.K.Y. and Mansfield S.D. (1999). Enzymatic processing for pulp and paper manufacture - a review. *Appita Journal.* (52) 409-418.

Wu L.Q., Embree H.D., Balgley B.M., Smith P.J. and Payne G.F. (2002). Utilizing renewable resources to create functional polymers: Chitosan-based associative thickener. *Environmental Science & Technology.* (36) 3446-3454.

Wydro P., Krajewska B. and Hac-Wydro K. (2007). Chitosan as a lipid binder: A Langmuir monolayer study of chitosan - Lipid interactions. *Biomacromolecules.* (8) 2611-2617.

Xu F. (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry.* (35) 7608-7614.

Xu F. (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry.* (272) 924-928.

Xu F. (2001). Dioxygen reactivity of laccase: Dependence on laccase source, pH, and anion inhibition. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology.* (95) 125-133.

Xu F., Kulys J.J., Duke K., Li K., Krikstopaitis K., Deussen H.J.W., Abbate E., Galinyte V. and Schneider P. (2000). Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology.* (66) 2052-2056.

Yague S., Terran M.C., Gonzalez T., Zapico E., Bocchini P., Galletti G.C. and Gonzalez A.E. (2000). Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete Coriolopsis gallica monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* (14) 905-910.

Yamada K., Chen T.H., Kumar G., Vesnovsky O., Topoleski L.D.T. and Payne G.F. (2000). Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue. *Biomacromolecules.* (1) 252-258.

Yang L.Q., Yang B., Zeng D., Wang D., Wang Y. and Zhang L.M. (2011). Formation and properties of a novel complex composed of an amylose-grafted chitosan derivative and single-walled carbon nanotubes. *Carbohydrate Polymers.* (85) 845-853.

You B.R., Moon H.J., Han Y.H. and Park W.H. (2010). Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis. *Food and Chemical Toxicology.* (48) 1334-1340.

Yu B.B., Han X.Z. and Lou H.X. (2007). Oligomers of resveratrol and ferulic acid prepared by peroxidase-catalyzed oxidation and their protective effects on cardiac injury. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (55) 7753-7757.

Yun Yang B. and Montgomery R. (1999). Degree of acetylation of heteropolysaccharides. *Carbohydrate Research.* (323) 156-162.

Zeng Q.H., Tian Y., Zhou C.R. and Luo B.H. (2012). Enzymatic Synthesis of Chitosan-Graft-Poly (L-Lactide) Copolymers under Single-Mode Microwave Irradiation. *Acta Polymerica Sinica.* 593-598.

Zhao Y.M., Wang X.L., Hu X.H., Shen F., He Y., Shen W.H. and Ruan C.G. (2003). Inhibitive effects of ferulic acid on adhesion molecules expression by activated endothelial cells. *Chinese Pharmacological Bulletin.* (19) 1378-1381.

Zhong Z., Xing R., Liu S., Wang L., Cai S. and Li P. (2008). Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities *in vitro*. *Carbohydrate Research.* (343) 566-570.

Fonctionnalisation enzymatique du chitosane par des composés phénoliques : évaluation des propriétés biologiques et physico-chimiques de ces nouveaux biopolymères

L'oxydation de l'acide férulique et de son ester (le férulate d'éthyle) par la laccase de *Myceliophtora thermophila* a été étudiée en milieu aqueux et dans des conditions expérimentales douces (30 °C et pH 7,5) afin de synthétiser de nouvelles molécules naturelles grâce à un procédé vert. L'oxydation enzymatique a permis l'obtention d'intermédiaires colorés pour l'acide férulique et incolores pour le férulate d'éthyle. En outre, le férulate d'éthyle a été plus rapidement totalement oxydé que l'acide férulique. De plus, cette procédure a abouti à des produits majoritairement dimériques avec MM = 443 g/mol et MM = 386 g/mol pour le férulate d'éthyle et l'acide férulique, respectivement. Les nouvelles molécules synthétisées ont présenté des propriétés antioxydantes importantes avec de faibles propriétés antibactériennes et cytotoxiques. En présence du chitosane insoluble dans le milieu réactionnel, la laccase a été protégée de l'inhibition liée aux produits d'oxydation et le degré de polymérisation de ces produits a été contrôlé. De plus, les produits d'oxydation ont réagi avec les groupements NH_2 libres permettant la formation de liaisons covalentes de type base de Schiff (C=N) au niveau du C2 sur le chitosane. La majorité des produits d'oxydation greffés sur le chitosane était de forme dimérique. Cette procédure a permis d'obtenir du chitosane coloré avec l'acide férulique et incolore avec le férulate d'éthyle tout en présentant de nouvelles propriétés dues au greffage de composés phénoliques. Ces chitosanes dérivés ont présenté des propriétés fonctionnelles intéressantes telles que antioxydantes, physico-chimiques (stabilisation thermique) et biologiques (adhésion cellulaire) ainsi que la conservation des propriétés antibactériennes du chitosane natif.
Mot clés : laccase, oxydation enzymatique, milieu aqueux, phénols, chitosane, propriétés antioxydantes, antibactériennes, physico-chimiques, cellules animales

Enzymatic functionalization of chitosan by phenolic compounds : evaluation of biological and physico-chemical properties of these new biopolymers

Oxidation of ferulic acid and its ester (ethyl ferulate) by *Myceliophtora thermophila* laccase has been studied in aqueous medium under mild experimental conditions (30°C and pH 7.5) as a green process to synthesize natural neo-molecules. Enzymatic oxidation led to colored and colorless intermediaries for ferulic acid and ethyl ferulate, respectively. Additionally, ethyl ferulate was oxidized faster than ferulic acid. This procedure has led to dimeric major products with MM = 443 g/mol and MM = 386 g/mol for ethyl ferulate and ferulic acid, respectively. New synthesized molecules demonstrated important antioxidants properties with weak antibacterial and cytotoxic properties. With insoluble chitosan particles in the reaction medium, laccase was protected from inhibition due to oxidation products and the polymerization degree of these products was checked. In addition, the oxidation products reacted with the free NH_2 groups forming covalent bonds of Schiff base type (C=N) at C-2 region. The majority of the oxidation products grafted onto chitosan was of dimeric form. This procedure led to colored and colorless chitosans by ferulic acid and ethyl ferulate, respectively, with new properties due to grafting of phenolic compounds. These chitosan derivatives presented interesting functional properties such as antioxidant, physico-chemical (thermal stability) and biological (cell adhesion) as well as the preservation of antibacterial properties of native chitosan.
Keyword: laccase, enzymatic oxidation, aqueous medium, phenols, chitosan, antioxidant, antibacterial, physico-chemical, animal cells