

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



Mémoire de Master en Chimie
Option: Chimie de l'Environnement

Présenté par
CHAREF KHODJA Sabrina

SUJET

**EXTRACTION D'UN BIO POLYMERE A PARTIR
D'UNE BIOMASSE FONGIQUE**

Soutenu le : 10Juillet 2016, devant le jury composé de :

MANSOUR BENAMAR Malika (MCA)	UMMTO	Présidente
ADOUR Lydia (Professeur)	Université d'Alger1	Promoteur
LATEB Yacine (MAA)	UMMTO	Co-Promoteur
KADOUCHE Slimane (MCB)	UMMTO	Examineur
DERMACHE Samia (MAA)	UMMTO	Examinatrice

Remerciements

A ce stade de ma vie estudiantine, et à l'occasion de la présentation de mon mémoire de master, j'ai l'honneur et le devoir d'exprimer mes louanges absolues à **ALLAH**, mon créateur généreux et omnipotent, tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail, pour tous ses dons et ses faveurs.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude à ma promotrice le professeur **ADOUR LYDIA** qui a accepté de m'encadrer, de diriger ce travail, pour tous les efforts qu'elle a consenti tout au long de l'élaboration de ce modeste travail pour son aide très précieuse. Ses encouragements, ses précieux conseils et la confiance qu'elle m'a toujours témoignée m'ont été d'une grande aide.

Je tiens à exprimer mes remerciements à mon Co-promoteur Mr **LATEB Yacine** qui a dirigé ce travail avec beaucoup de patience et d'intérêt

Un grand merci pour M^{elle} **AILI DYHIA** pour sa contribution concrète son aide, son soutien matériel et moral afin de terminer ce travail. Je n'oublierai pas de remercier M^{elle} **TAOUINT AISSA NADJIA** pour l'aide précieuse pour la réalisation de mes analyses ATR.

J'exprime ma profonde gratitude aux techniciennes de laboratoire pédagogique de chimie de l'environnement qui m'ont accueillie et mis à ma disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.

Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit et m'ont honoré en acceptant d'examiner ce modeste travail : la Présidente de jury Madame **MANSOUR BENAMAR Malika** (Maître de Conférence Classe A à l'université de TiziOuzou), les examinateurs : Monsieur **KADOUCHE Slimane** (Maître de conférence Classe B) et M^{elle} **Dermeche Samia** (Maître Assistante à l'Université de TiziOuzou).

Mes hommages s'adressent également aux membres de ma famille surtout mes parents pour leur soutien et leur patience dont ils ont preuve et leur confiance en moi, ce qui m'a aidé moralement pour faire aboutir ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements à toute ma promotion de Master et à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de mon mémoire.

Dédicaces

*A mes chers parents, mon père et ma mère qui sont une source de bonheur et
qui m'ont toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite.*

A mes sœurs Lydia et Sarah, et mon frère Anis

*A toute ma famille et tous ceux qui ont participé de
près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

CHAREF KHODJA Sabrina

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Partie théorique

CHAPITRE I : PRESENTATION DE L'ESPECE FONGIQUE *Penicillium camemberti*

I-La moisissure <i>Penicillium camemberti</i>	3
I.1- Taxonomie et classification de <i>P. camemberti</i>	3
I.1.1- Taxonomie	3
I.1.2- Classification de <i>P. camemberti</i>	4
I.2- Structure et caractère morphologique	5
I.3- La composition de la paroi cellulaire	6
I.4- Les caractères physiologiques de <i>P. camemberti</i>	8
I.4.1- Vitesse de croissance	8
I.4.2- Température et temps de germination	9
I.4.3- Humidité	9
I.4.4- Oxygène (aération)	10
I.4.5- pH	10
I.4.6-Lumière	10
I.5- Les exigences nutritionnelles	11
I.5.1- Sources de carbone et d'azote	11
I.5.2- Les sels minéraux	11
I.5.3- Les exigences gazeuses	12
I.6- Les applications industrielles de <i>P. camemberti</i>	12
I.6.1 - Fabrication des fromages	12
I.6.2- Fabrications pharmaceutiques	13
I.6.3- Lutte contre la pollution	13

CHAPITRE II : LES POLYSACCHARIDES FONGIQUES

II.1- Introduction	15
II.2- Les polysaccharides fongiques	16
II.2.1- Le glucane	17
II.2.1.1- β -(1,3)-glucane	17

II.2.1.2- β -(1,6)-glucane	18
II.2.2- La chitine	19
II.2.2.1- Structure	19
II.2.3-Le chitosane.....	21
II.2.3.1- Structure	21
II.2.4-La cellulose.....	22
II.2.4.1- Structure	22
II.3- Procédé d'isolation du chitosane à partir d'une source fongique.....	23
II .3.1- Extraction du chitosane libre	23
II.3.2-Extraction du chitosane total (chitosane libre et chitosane lié au glucane)	25
II.3.3-Séparationdu complexe chitosane-glucane.....	26
II.4- Facteurs influents sur la qualité et la quantité du chitosane	29
II.4.1-Traitement alcalin	29
II.4.2- Traitement acide	29
II.4.3-Température et temps d'incubation	30
II.4.4- Taille des particules	30
II.5- Caractéristiques du chitosane fongique.....	30
II.5.1- Solubilité	30
II.5.2- Viscosité	31
II.5.3- Degré de désacétylation DDA.....	32
II.5.4- Cristallinité	33
II.5.5- Poids moléculaire	33
II.6-Les applications du chitosane fongique	33
II.6.1- Dans la conservation des aliments	33
II.6.2- Pour stimuler l'immunité des plantes	34
II.6.3-Dans l'ingénierie tissulaire	34
II.6.4-Dans la dépollution.....	34

Partie expérimentale

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES

III.1- Matériel	
III.1.1- Petit matériel.....	35
III.1.2-Matériel mycologique	35
III.1.3- Appareillage.....	35
III.1.4- Solutions et réactifs utilisés	35

III.2- Méthodes	35
III.2.1-Préparation de la biomasse de <i>Penicillium camemberti</i>	35
III.2.1.1- Préparation de l'inoculum	35
III.2.1.2- Préparation du milieu solide	36
III.2.1.3- Inoculation et incubation du milieu solide	36
III.2.1.4- Récupération de la biomasse de <i>Penicillium camemberti</i>	36
III.2.2- Extraction des biopolymères.....	37
III.2.2.1- Extraction de la chitine et du chitosane libre.....	37
III.2.2.2- Extraction du chitosane total	40
III.2.3- Caractérisation	41
III.2.3.1- Détermination de la granulométrie	41
III.2.3.2- Mesure de la matière sèche	41
III.2.3.3- Détermination du taux de cendres	42
III.2.3.4- Potentiel d'hydrogène (pH)	42
III.2.3.5- Spectroscopie ATR	42
III.2.3.6- Détermination de la structure par Microscope Electronique à Balayage (MEB)	43

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1- Développement du mycélium de <i>P. camemberti</i>	44
IV.2- Récupération des biomasses de <i>P. camemberti</i> à différentes températures de croissance	44
IV.3- Caractérisation physico-chimique des biomasses sèches	46
IV.4- Détermination de la morphologie des biomasses par spectroscopie ATR et par Microscope Electronique à Balayage	47
IV.4.1- Interprétation des spectres ATR des biomasses	54
IV.4.2- Interprétation des micrographies MEB des biomasses	56
IV.5- Traitement des biomasses	56
IV.5.1- Extraction de la chitine et du chitosane libre	56
IV.5.1.1- Traitement alcalin des biomasses	56
IV.5.1.1.1- Analyse des fractions insolubles (AIM) par Microscope Electronique à Balayage	58
IV.5.1.2- Traitement acide des fractions insoluble (AIM)	62

IV.5.1.2.1- Analyses des fractions insolubles (AAIM) par spectroscopie ATR et par Microscope Electronique à Balayage	65
IV.5.1.2.1.1- Interprétation des spectres ATR des fractions insolubles(AAIM)	73
IV.5.1.2.1.2- Interprétation des micrographies MEB des fractions insolubles (AAIM).....	74
IV.5.1.2.3- Analyse du produit final obtenu de la biomasse T28°C par spectroscopie ATR et par Microscope Electronique à Balayage	74
IV.5.1.2.3.1- Interprétation des spectres ATR du produit final obtenu de T28°C	79
IV.5.1.2.3.2- Interprétation des micrographies MEB du produit final obtenu de T28°C.....	79
IV.5.2- Conclusion sur l'extraction du chitosane libre	80
IV.5.3- Extraction du chitosane total	81
IV.5.3.1-Traitement alcalin des biomasses	81
IV.5.3.1.1- Analyse des AIM issus du traitement basique (NaOH 11M)	84
IV.5.2.1.1.1- Interprétation des spectres ATR des AIM T20°C, T25°C et T28°C	91
IV.5.2.1.1.2- Interprétation des micrographies MEB des AIM T20°C, T25°C et T28°C	93
IV.5.3. 2-Traitement acide des AIM T20°C, AIM T25°C et T28°C	93
IV.5.3.3- Séparation des fractions solubles et insolubles dans le milieu acide.....	94
IV.5.4- Conclusion sur l'extraction du chitosane total	94
Conclusion générale	95
Références bibliographiques	

Listes de figures

Figure 1 : Structure de l'appareil sporifère de <i>Penicillium camemberti</i>	6
Figure 2 : Structure schématique de la paroi fongique de <i>C.albicans</i>	8
Figure 3: Schéma de fragment ramifié de β -(1,3)-glucane qui contient une liaison β -(1,6) ...	18
Figure 4: Organisation moléculaire de la paroi cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figure 5: Schéma de fragment linéaire de chitine, N-acétylglucosamine contenant des liaisons β -(1,4). Le groupement est entouré en rouge	20
Figure 6 : Structure du chitosane	22
Figure 7 : Chaines de glucose avec des liaisons hydrogène intra et inter chaines	22
Figure 8 : Schéma générale du procédé d'extraction du chitosane libre.....	27
Figure 9 : Schéma générale du procédé d'extraction du chitosane total	28
Figure 10 : Broyage de la biomasse sèche	36
Figure 11 : Schéma général d'extraction du chitosane libre	37
Figure 12: Montage de la réaction de solubilisation du chitosane dans l'acide acétique 2% à 95°C pendant 8 heures	38
Figure 13 : Schéma du procédé d'extraction du chitosane total	39
Figure 14: Production du mycélium de <i>Penicillium camemberti</i> sur milieu YPGA après 6 jours d'incubation et à différentes températures : (a) T20°C ; (b) T25°C ; (c) T28°C	43
Figure 15 : Des échantillons de biomasses obtenues après broyage : (a) T20°C ; (b) T25°C ; (c) T28°C.....	45
Figure 16 : Les biomasses récupérées à différentes température	45
Figure 17: Les trois fractions obtenues après l'analyse granulométrique de la biomasse à T25°C :(a) $D > 850 \mu m$;(b) $500 < D < 850 \mu m$;(c) $D < 500 \mu m$	46
Figure 18 (a) : Spectre ATR de la biomasse cultivée à T20°C	48
Figure 18 (b) : Micrographie MEB de la biomasse cultivée à T20°C	49
Figure 19 (a) : Spectre ATR de la biomasse cultivée à T25°C	50
Figure 19 (b) : Micrographie MEB de la biomasse cultivée à T25°C	51
Figure 20 (a) : Spectre ATR de la biomasse cultivée à T28°C	52
Figure 20 (b) : Micrographie MEB de la biomasse cultivée à T28°C	53

Figure 21 : Les fractions AIM issues du traitement alcalin (NaOH 1 M) des biomasses cultivées à T28°C, T25°C et T20°C	56
Figure 22 : Les fractions AIM obtenues après lavage jusqu'à pH6 des biomasses cultivées à T28°C, T25°C et T20°C et traitées par NaOH 1M	57
Figure 23 : Les fractions AIM après séchage et broyage obtenues par le traitement alcalin des biomasses cultivées à différentes températures : (a) T20°C, (b) T25°C et (c)T20°C	57
Figure 24 : Pourcentage des fractions AIM récupérées après traitement alcalin (NaOH 1M) des biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C	58
Figure 25 : Micrographie MEB de la fraction AIM T20°C	59
Figure 26 : Micrographie MEB de la fraction AIM T25°C	60
Figure 27 : Micrographie MEB de la fraction AIM T28°C	61
Figure 28 : Les fractions insolublesAAIM après séchage et broyage : (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C	62
Figure 29 : Masses des fractions AAIM obtenues après le traitement acide 2% des AIM T20°C, T25°C et T28°C.....	63
Figure 30 : Précipités obtenusde T20°C, T25°C et T28°C après l'ajout de NaOH 2M pour la fraction soluble dans l'acide acétique :(a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C.....	64
Figure31 (a) : Spectre ATR de la fraction AAIM T20°C	66
Figure 31 (b) : Micrographies MEB de la fraction AAIM T20°C.....	67
Figure 32 (a) : Spectre ATR de la fraction AAIM T25°C	68
Figure 32 (b) : Micrographies MEB de la fraction AAIM T25°C.....	69
Figure 33 (a) : Spectre ATR de la fraction AAIM T28°C	70
Figure 33 (b) : Micrographies MEB de la fraction AAIM T28°C.....	71
Figure 34 : Spectre ATR de la chitine commerciale	72
Figure35 (a) : Spectre ATR du produit final T28°C	75
Figure 35 (b) : Micrographies MEB du produit final T28°C.....	76
Figure 36 (a) : Spectre ATR du chitosane commerciale.....	77
Figure 36 (b): Micrographies MEB du chitosane commercial	78
Figure 37 : Les fractions AIM obtenues après traitement alcalin (NaOH 11M) : (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C (pH=12).....	81
Figure 38 : Les fractions AIM obtenues après lavage jusqu'à pH 6:(a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C	82
Figure 39 : Les fractions AIM issus de traitement avec NaOH 11M après séchage : (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C.....	82

Figure 40 : Pourcentage des fractions AIM obtenues après traitement alcalin (NaOH 11M) des biomasses T20°C, T25°C et T28°C	83
Figure 41 (a) : Spectre ATR de la fraction AIM T20°C	85
Figure 41 (b) : Micrographie MEB de la fraction AIM T20°C	86
Figure 42 (a) : Spectre ATR de la fraction AIM T25°C	87
Figure 42 (b) : Micrographie MEB de la fraction AIM T25°C	88
Figure 43 (a) : Spectre ATR de la fraction AIM T28°C	89
Figure 43 (b) : Micrographies MEB de la fraction AIM T28°C.....	90
Figure 44 : Suspensions de AIM obtenues après le reflux acide des fractions AIM (pH=5, turbidité >800 NTU).....	93

Listes de tableaux

Tableau 1 : Pourcentage des constituants de la paroi chez les levures et champignon	8
Tableau 2 : Arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine	20
Tableau 3 : Comportement des constituants de la fraction AIM en solution suivant le pH ...	25
Tableau 4 : Variation de la solubilité du chitosane en fonction de DDA à pH 6.....	31
Tableau 5 : Les biomasses récupérées à différentes températures.....	45
Tableau 6 : Granulométries et caractères physico-chimiques des biomasses cultivées à différentes températures	46
Tableau 7 : Attribution des principaux pics ATR présents dans les biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C	55
Tableau 8 : Les masses des fractions AIM obtenues de chaque biomasse après traitement alcalin (NaOH 1M).....	57
Tableau 9 : Masses des fractions insolubles AAIM et les masses du précipité.....	62
Tableau 10 : Pourcentage de la chitine et du chitosane dans la fraction AIM.....	63
Tableau 11 : Pourcentages de chitine et de chitosane obtenuespour chaque biomasse cultivée à différentes températures	64
Tableau 12 : principales bandes d'absorption de AAIM T20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C	65
Tableau 13 : Principale bandes d'absorption du produit final T28°C et du chitosane commercial	74
Tableau 14 : Degré de désacétylation du produit final extrait de la biomasse cultivée à T28°C et du chitosane commercial	80
Tableau 15 : Masses des AIM obtenues de chaque biomasse après traitement alcalin (NaOH 11M).....	82
Tableau 16 : Principale bandes d'absorption des fractions AIM issues du traitement alcalin (NaOH 11M) des biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C	84

Liste des abréviations :

μm : micromètre

A_w:activity water

AAIM: Alcalin Acid Insoluble Material

AcSM: Acétique Soluble Material

AIM: Alcalin Insoluble Material

CTS T28°C: Chitosane récupéré de la biomasse cultivée à 28°C

DA : Degré d'Acétylation

Da : Dalton

DDA :Degré de Désacétylation

g : gramme

l : litre

mg : milligramme

MS : Matière Sèche

MSM : Molasses Salt Medium

pH : Potentiel d'Hydrogène

PM : Poids Moléculaire

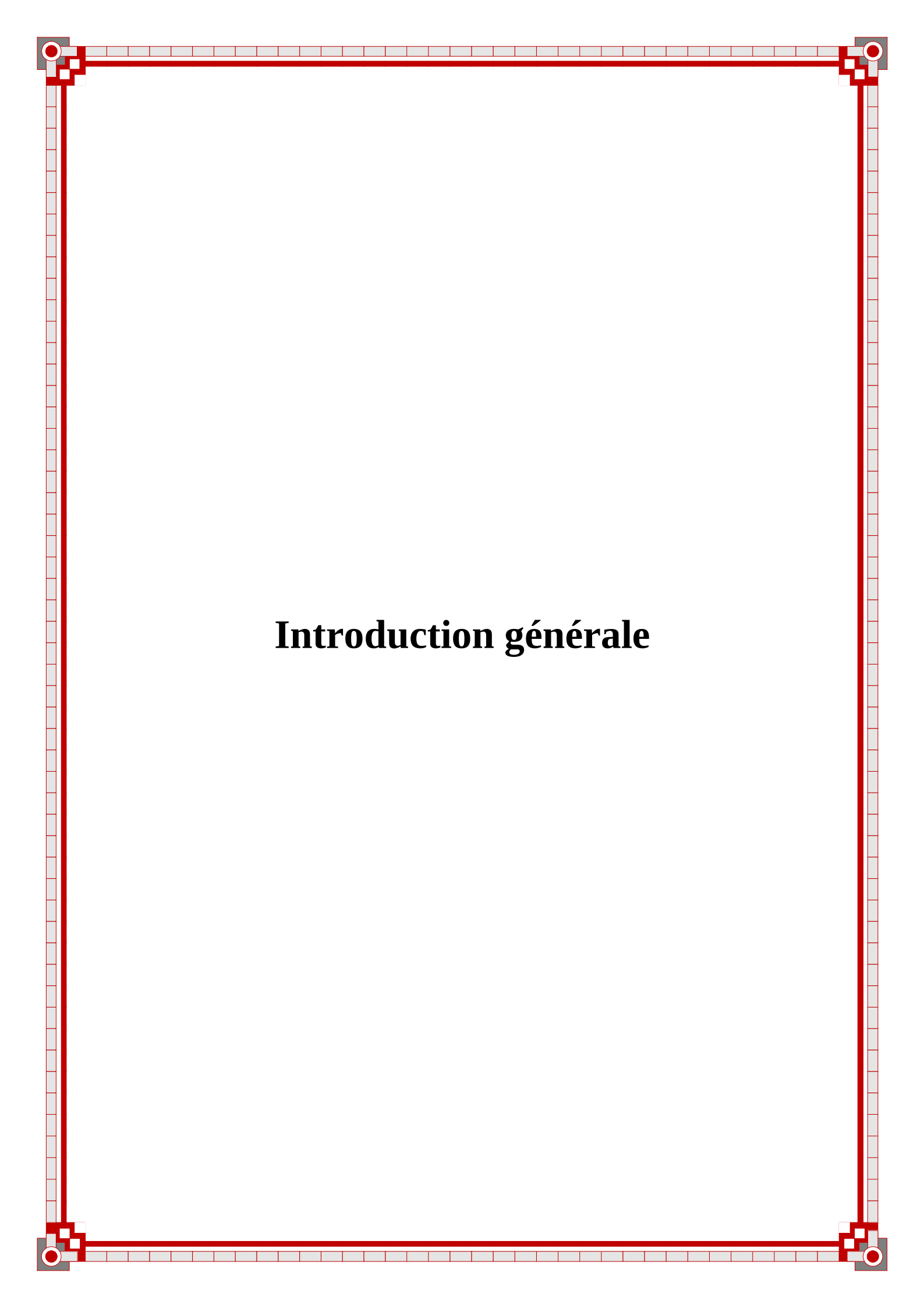
rpm : revolution per minutes

T :température (°C)

t : temps

YPG: Yeast Peptone Glucose

YPGA: Yeast Peptone Glucose Agar



Introduction générale

La chitine est un copolymère composé d'unités de N-acétyle-D-glucosamine (NAG) et D-glucosamine liés par des liaisons glycosidiques de type β -(1,4), au sein duquel le pourcentage en unités NAG dépasse 40% (DA > 40%). Le chitosane est le dérivé désacétylé de la chitine, sa structure renferme plus d'unité D-glucosamine que d'unité NAG (DDA > 60%), ce qui lui confère une solubilité remarquable dans les solutions acides diluées (Nwe et Stevens, 2008).

Les Polysaccharide chitine et chitosane ont reçu beaucoup d'intérêt pour l'application potentielle dans le secteur agricole, biomédecine, la biotechnologie et l'industrie alimentaire en raison des propriétés de biocompatibilité, de biodégradabilité et de bioactivité (Kurita, 1998 ; Synowiecki et al, 2003).

La chitine est le polymère le plus abondant sur le globe après la cellulose, et il est le constituant principal des carapaces de crustacés, des cuticules de certains insectes, et des parois cellulaires fongiques (Ruiz-Herrera, 1992). Le Chitosane, est moins abondant que la chitine, c'est un biopolymère structurel présents dans les parois cellulaires de certaines espèces fongiques, particulièrement celles appartenant à la classe des Zygomycètes (Arcidiacono et al, 1989; Arcidiacono and Kaplan 1992). Comme, il peut se retrouver dans la paroi de plusieurs genres tels que : Mucor, Absidia et Rhizopus (Ruiz-Herrera, 1992; Khor, 2001).

La chitine est extraite, industriellement, à partir de crabes et de coquilles des crevettes obtenus comme sous-produits de l'industrie des produits de la mer (Jeuniaux, 1978). La production de chitine et de chitosane à partir de sources fongiques a gagné une attention accrue au cours des dernières années en raison du potentiel avantages par rapport à la source marine. Par exemple, l'approvisionnement et la disponibilité de déchets des crustacés sont limités par les saisons et les emplacements de l'industrie de la pêche, tandis que le mycélium peut être produit par simple fermentation indépendamment de leur emplacement géographique ou de la saison (White et al, 1979). En outre, les mycéliums fongiques ont des teneurs faibles en matières minérales par rapport aux coquilles de crustacés, et par conséquent la déminéralisation n'est pas nécessaire pendant le traitement (Teng et al, 2001).

Des progrès récents dans la technologie de fermentation suggèrent qu'une large gamme d'organismes fongiques contenant de la chitine/chitosane peut être une nouvelle voie de production de ces polysaccharides. De nombreux articles scientifiques ont montré que ces espèces sont aisément cultivables en milieu renfermant des nutriments simples comme sources

de carbone et d'azote et parfois des oligo-éléments. Dans le cas du chitosane, ce polymère peut être isolé de leur paroi par des traitements basiques et acides. Le mycélium de diverses espèces fongiques, appartenant à la classe des Ascomycetes, des Zygomycetes, des Basidiomycetes et des Deutermoycetes, est une source alternative de chitine et chitosane (Pochanavanich and Suntornsuk, 2002). Il est considéré comme une source prometteuse de chitine/chitosane, car la culture fermentaire des microorganismes offre la possibilité de maîtriser les propriétés physiques de ce polymère, et cela par la régulation de divers facteurs tels que la composition du milieu de croissance. Il en est de même du protocole d'extraction (températures, concentration des acides et des bases utilisés et la durée des traitements correspondant) (Di Lena et al, 1994).

Un nombre important de travaux ont été publiés sur l'isolation des chitosanes (libre et lié) dans les Zygomycètes et les Basidiomycètes. La recherche bibliographique a montré que très peu d'études ont été faites sur les Ascomycètes. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à la production des polysaccharides (chitine, chitosane libre ou complexe de chitosane) à partir du mycélium d'un champignon choisi : *Penicillium camemberti*. C'est une moisissure à usage comestible fréquemment utilisée dans la fabrication des fromages à pâte molle telles que : le Camembert.

Pour la réalisation du mémoire de master, deux parties ont été conçues :

1. Une partie théorique organisée en deux chapitres :

Le 1^{er} concerne la présentation des moisissures (taxonomie, morphologie, composition de la paroi cellulaire, conditions de croissance et les domaines d'utilisation).

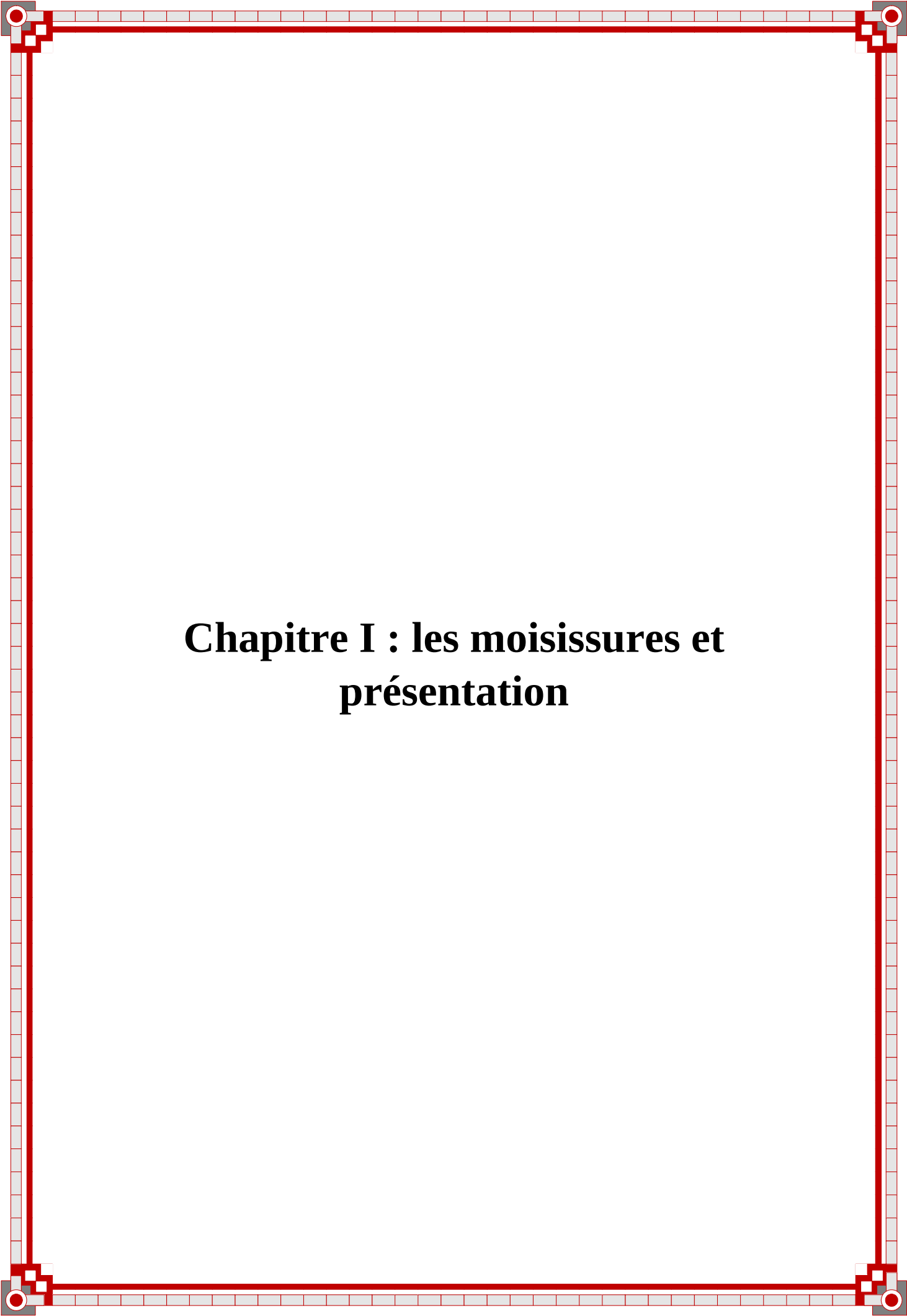
Le 2^{ème} concerne les polysaccharides fongiques.

2. La partie expérimentale comporte :

Dans la première étape, une présentation de la culture du champignon sur milieu solide (YPGA) inoculé par des spores de *Penicillium camemberti* a été faite suivie d'une description du mode d'extraction du chitosane libre dans la paroi du mycélium.

La deuxième étape consiste dans l'extraction du chitosane total (regroupant chitosane libre et chitosane lié au glucane) par l'utilisation d'une autre méthode proposée par Nwe et Stevens (2002a). Dans cette étude, quelques étapes supplémentaires ont été rajoutées.

A la fin du mémoire, une conclusion générale ainsi que quelques perspectives ont été présentées.



Chapitre I : les moisissures et présentation

II.1- Introduction

Les polysaccharides, polyosides, ou glycanes sont arbitrairement définis comme des polymères de haut poids moléculaire résultant de l'assemblage d'un grand nombre d'oses simple par des liaisons osidiques formées par l'élimination d'une molécule d'eau entre l'hydroxyle hémiacétalique en C₁ d'un ose et l'un quelconque des hydroxyles de l'autre molécule osidique (Bruneton, 1999). Dans le groupe des polysaccharides, on peut distinguer:

1. Les homopolysaccharides (ou homoglycannes) qui sont constitués par un seul type d'oses :
 - polyglucosides ou glucanes (amidon, glycogène, cellulose);
 - polymannosides ou mannanes ;
 - polygalactosides ou galactanes : Certaines d'entre elles peuvent être sulfatés (agar-agar et carraghénane).
 - polyfructosides ou fructosanes ou fructanes (inuline);
 - polyxylosides ou xylanes (ce sont aussi des pentosanes).
2. Les hétéropolysaccharides (ou polyholosides mixtes) qui par hydrolyse donnent naissance à plusieurs oses :
 - galactomannanes (galactose et mannose);
 - hémicellulose (xylose et arabinose).

Les polyuronides peuvent être reliés à cet ensemble ; ils forment un groupe important de colloïdes naturels:

- pectine (polygalacturonides);
- acides alginiques (polymannuronides);
- gomme arabique, constituée de molécules très ramifiées contenant de l'acide Glucuronique, du Arabinose, du Rhamnose et du Galactose (Biserte et al, 1977).

Leurs propriétés rhéologiques (gélifiant, stabilisant; émulsifiant, épaississant,...) sont mises à profit dans l'agro- alimentaire, l'industrie pétrolière, la cosmétique, les peintures, les adhésifs, les biomatériaux... leur bonne biocompatibilité confère à ces biomolécules des vastes possibilités d'utilisation dans l'industrie en général et plus précisément dans l'industrie chimique ainsi que dans l'industrie pharmaceutique et médicale (Delattre, 2005).

Selon leurs origines, les polysaccharides peuvent être classés en trois catégories ; les polysaccharides animaux, les polysaccharides extraits d'algues et les polysaccharides fongiques.

Les polysaccharides animaux (l'Acide hyaluronique, Héparine, Glycogène...) sont soit impliqués dans la structure des tissus conjonctifs (hyaluronanes, dermatanes sulfate et chondroïtines), soit dans des mécanismes de communications cellulaires *via* leurs propriétés fonctionnelles (héparines et héparanesulfate) (Delattre, 2005).

D'une manière générale, les parois des algues brunes (Phaeophyceae) ainsi que celle des algues vertes (Chlorophyceae) possèdent des polysaccharides de type carraghénanes, Agar-Agar (géluse) et alginates. Selon Delattre 2005, les parois des algues rouges contiennent essentiellement des galactanesulfatés tels que : les carraghénanes.

Les parois fongiques sont des structures en multicouches constituées de 75% des polysaccharides (chitine, glucanes et glycoprotéines) organisés en microfibrilles (ils sont composés de chitine).

II .2- Les polysaccharides fongiques

Les champignons représentent un ensemble extrêmement hétérogène d'organismes dont les individus sont distribués dans toutes sortes d'habitats. Cette caractéristique a pour conséquence une grande diversité métabolique et biochimique.

Les polysaccharides représentent un pourcentage majeur de la biomasse fongique (jusqu'à environ 75 %). Ils forment une gaine protectrice autour du mycélium et assurent ainsi un rôle de soutien pour ce dernier. Le principal représentant de ces polymères fongiques est la chitine (Delattre, 2005). Les polysaccharides fongiques peuvent être classés en deux catégories suivant leurs fonctions : les polymères dits structurels ou polysaccharides fibrillaires qui sont situés à proximité de la membrane plasmique pour être en mesure d'accomplir leur fonction mécanique, ils sont donc responsables de la rigidité de la paroi cellulaire. Les polymères de matrice ou polymères amorphes de type gel matriciel agissant comme interconnexion des molécules, et ils sont présents dans la paroi cellulaire entière (Wessel et Sietsma, 1981; Wessels, 1994).

Le Glucane et /ou la chitine ont généralement été dotés de la fonction structurelle, bien que certains mannoprotéines, normalement considérés comme polymères de matrice typiques, peuvent également jouer un rôle important dans le maintien de l'architecture globale des murs (Wessels et Sietsma, 1981; Ruiz-Herrera, 1992; Wessels, 1994; Sentandreu et al, 1994).

II.2.1- Leglucane

Leglucane est un polysaccharide d'importance majeure dans la structure pariétale, leur pourcentage dans la paroi des ascomycètes est le plus significatif. Ce polymère est constitué exclusivement de monomères de D-glucose, selon le type de liaisons chimiques, on distingue les α - et β -glucanes, ces deux types contiennent des liaisons 1,3- et /ou (1,4), mais seulement les β -(1,3)-glucanes qui contiennent des liaisons (1,6). Les deux types de glucanes sont présents chez la plupart des espèces fongiques de différents groupes taxonomiques, bien que les β -glucanes soient les plus abondants (Ruiz-Herrera, 1992 ; Wessels, 1994 ; Sentandreu et al, 1994 ; Latgé, 2010).

Les β -glucanes sont liés à la chitine par des liaisons covalentes en passant par des acides aminés, ce lien explique l'insolubilité d'une partie des glucanes sous les conditions alcalines (Siestma et al, 1977).

II.2.1.1- β -(1,3)-glucane

C'est un homopolymère linéaire de glucose dont les unités monomères sont liées l'une à l'autre par une liaison β -(1,3) avec quelques branchements en β -(1,6) (Figure 3) (Legentil et al, 2015). Chez les cellules en phase stationnaire, le β -(1,3)-glucane est présent sous forme d'énormes chaînes linéaires composées de plus de 1500 monomères de glucose, et elles ont une forme semblable à celle d'un ressort flexible capable d'exister sous différents degrés d'extension. Cette caractéristique procure entre autres à la paroi cellulaire sa propriété d'élasticité (Klis et al, 2002). β -(1,3)-glucane rentre dans la structure de la paroi cellulaire de la plupart des champignons, sauf la paroi des hyphes des zygomycètes (Bartnicki-Garcia, 1968 ; Wessels et Sietsma, 1982 ; Barreto-Bergter et Corin, 1983). Des études ont suggéré que les extrémités non-réductrices de β -(1,3)-glucane fortement ramifiés sont liées à la chitine par des liaisons β -(1,4) (Fontaine, 2000 ; Klis et al, 2002 ; Aguilar-Uscanga and Francois, 2003).

La présence de β -glucane dans la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* est établie en 1950 (Bell et Northcote, 1950). Il constitue la composante structurale majeure de la paroi interne de cette levure, comptant pour plus de la moitié de son poids sec (Cabib et al, 2001) et formant la fraction soluble dans les conditions alcalines (Klis et al, 1997). Chez *S. cerevisiae*, entre 40 et 50 embranchements sont formés sur chaque chaîne de β 1,3-glucanes (Lipke and Ovalle, 1998). Suite à l'élongation de ces chaînes latérales, celles-ci sont liées à la chitine, aux β -(1,6)-glucane-mannoprotéines (GPI) puis aux mannoprotéines qui possèdent des séquences internes répétées (Pir) (Mouyna et al, 2000) (Figure 4).

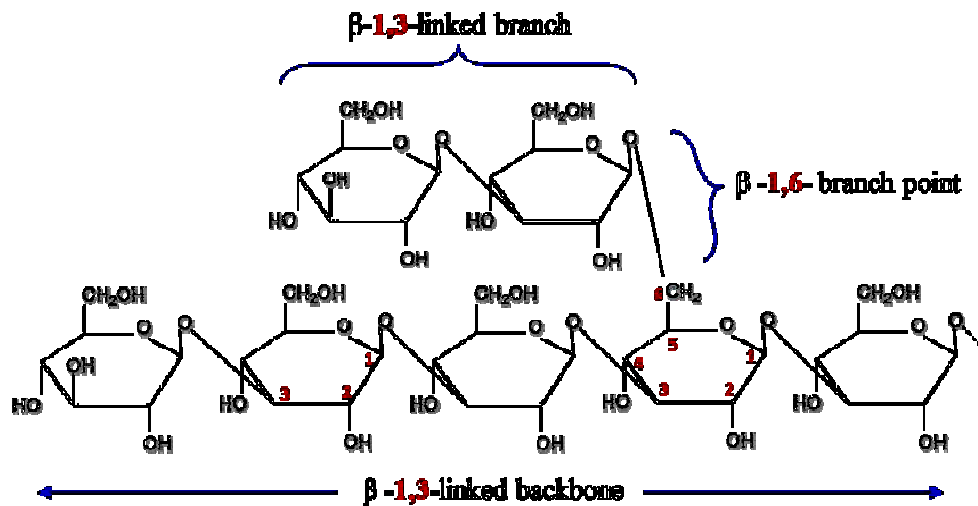


Figure3: Schéma de fragment ramifié de β -(1,3)-glucane qui contient une liaison β -(1,6) (modifié après Ruiz-Herrera, 1991; Roemer et al, 1994)

II.2.1.2- β -(1,6)-glucane

Le β -(1,6)-glucane est un polysaccharide fortement ramifié formé de chaînes amorphes de β -(1,6)-glucose, ils rentrent dans la composition de la paroi cellulaire de nombreux espèces fongiques (Barreto-Bergter et Corin, 1983). Le β -(1,6)-glucane est une composante structurale relativement mineure (5%) mais essentielle à la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* (Rohet et al, 2002). Sous sa forme mature, il est composé d'environ 350 monomères de glucose et possède plusieurs embranchements, le β -(1,6)-glucane est responsable d'interconnecter le β -(1,3)-glucane et la chitine avec les protéines de la paroi cellulaire (Azuma et al, 2002; Kollar et al, 1997; Shahinian and Bussey, 2000) (Figure 3). Selon Klis et al (2001), β -(1,6)-glucane présente jusqu'à 20% de la paroi cellulaire chez *Candida albicans*.

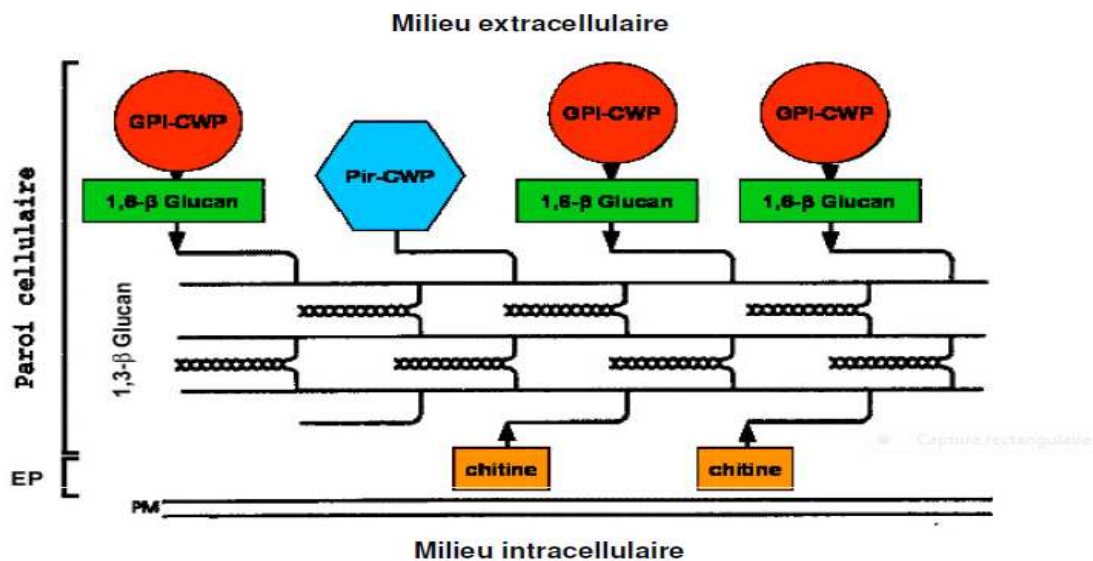


Figure 4: Organisation moléculaire de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* (Smits et al, 2001).

II.2.2- La chitine

La chitine est l'un des polymères naturels les plus abondants sur le globe avec la cellulose (Khanafari et al, 2008). Ce polysaccharide entre dans la composition de la paroi cellulaire des eucaryotes, incluant des organismes unicellulaires (levures, amibes, diatomées) et multicellulaires (champignons filamenteux, arthropodes, nématodes, mollusques), il est également présent chez certaines éponges et algues marines (Ehrlich et al, 2007). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la chitine occupe approximativement 2% du poids sec de la paroi cellulaire. Au cours de la croissance végétative, il se trouve principalement au site de bourgeonnement et dans les cicatrices de bourgeonnement (Bulawa et al, 1986), toutefois une faible quantité de chitine est aussi retrouvée dans la paroi latérale où il forme des liaisons covalentes avec β -(1,3) et β -(1,6)-glucanes (Cabibet et al, 2001; Choi et al, 1994).

II.2.2.1- Structure

La chitine est un polymère linéaire formé de monomères de β -(1,4)-N-acétylglucosamine (Figure 5). Environ 20-400 chaînes du polysaccharide s'associent par l'intermédiaire de liaisons hydrogène pour créer la forme structurale du polysaccharide et donner naissance à des microfibrilles qui confèrent le rôle squelettique de la chitine (Ruiz-Herrera and San-Blas, 2003).

Les études cristallographiques effectuées sur la chitine ont montré que ce dernier est polymorphique, il se présente sous trois formes différentes (Tableau 2). Les microfibrilles peuvent s'orienter de manière parallèle (chitine β), antiparallèle (chitine α), ou en alternance entre parallèle et antiparallèle (chitine γ) (Kramer, 1998). Les trois formes se distinguent par le degré d'hydratation, la taille et le nombre de chaînes de chitine (Merzendorfer, 2006). La chitine α est la plus stable et aussi la plus abondante, dans laquelle les chaînes polysaccharidiques sont disposées de façon antiparallèle, ce qui donne naissance à de nombreux ponts hydrogène, et confère une grande stabilité au polymère vis-à-vis des solvants courants et des solutions aqueuses (Crini, 2005).

La chitine β est une forme moins abondante dont les chaînes polysaccharidiques sont toutes parallèles entre elles; les ponts hydrogènes sont inexistant, ce qui confère à la chitine β des propriétés de solubilité et de caractère hydrophile avec l'eau. Enfin la troisième forme, la chitine γ , implique deux chaînes parallèles qui alternent avec une chaîne antiparallèle (Muzzarelli, 1985).

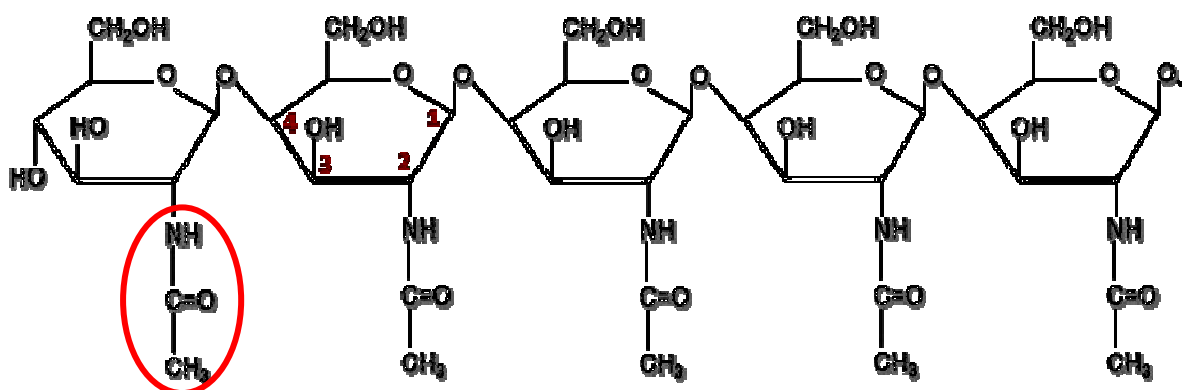


Figure 5: Schéma de fragment linéaire de chitine, *N*-acétylglucosamine contenant des liaisons β -(1,4). Le groupement acétyle est entouré en rouge (Latgé, 2010).

Tableau 2: arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine.

Forme	Arrangement des chaînes	schématisation
chitine α	antiparallèle	↓↑↓↑↓↑
chitine β	parallèle	↑↑↑↑↑
chitine γ	2 parallèle pour une antiparallèle	↑↑↓↑↑↓

II.2.3-Le chitosane

Le chitosane est une substance peu répandue dans la nature. Il est présent dans la paroi cellulaire de certains micro-organismes fongiques (champignons zygomycètes) et dans le mycélium de *Mucor rouxii*, *Rhizopusoryzae* et *Absidiacoerulea*, et n'est signalé que dans les exosquelettes de certains insectes (par exemple la paroi abdominale des reines de termites) (Crini et al, 2009).

Le chitosane, le dérivé désacétylé de la chitine est un constituant important de la paroi cellulaire à divers moments au cours du cycle de vie de certaines espèces fongiques (Christodoulidou et al, 1996). Le chitosane n'est pas directement synthétisé mais plutôt l'enzyme déacétylase peut agir d'une manière efficace pour convertir la chitine en chitosane (Muzzarelli, 1977). Les enzymes désacétylases de la chitine sont probablement situées à proximité de les régions où la chitine traverse la membrane plasmique (Araki et Ito, 1975; Kafetzopoulos et al, 1993), dès que la chitine est synthétisée, l'enzyme déacétylase la convertit en chitosane. Parmi les quelques espèces fongiques indiqués pour synthétiser le chitosane, ceux appartenant à la classe des mucorales se sont avérés générer le chitosane au cours de la phase de croissance végétative (Orlowski, 1991), tandis que *S.cerevisiae* produit le chitosane uniquement pendant le stade de sporulation (Christodoulidou et al, 1996).

II.2.3.1- Structure

Le chitosane est un aminopolysaccharide d'origine biologique. Leur structure chimique, représentée sur la figure 6, résulte de l'enchaînement d'unités de répétition N-acétyl- D glucosamine et D-glucosamine liées en β -(1,4). Les structures de la chitine et du chitosane diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C-2 : acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane. Le terme « chitosane » est donc habituellement limité à toute chitine suffisamment N-déacétylée pour être soluble en milieu acide dilué. Pour parler de chitosane, il faut que la chitine soit désacétylée entre 50 % et 100 % (Jaepyoung et al, 2006a; Rinaudo, 2007; Rinaudo, 2008). Le chitosane a trois types de groupements fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C2, C3 et C6, respectivement. Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés intéressantes très différentes de celles de la chitine. Le chitosane, est soluble dans les acides faibles, il possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Rinaudo, 2006).

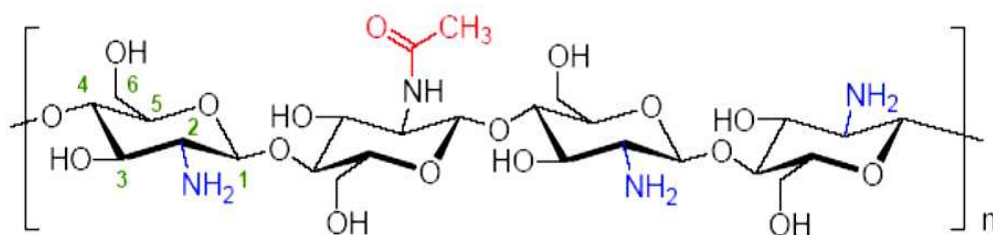


Figure 6 :La structure du chitosane (Seng et J.M, 1988).

II.2.4- La cellulose

La cellulose est le composé organique le plus synthétisé sur la terre (Guigrard ,1996). Bien que les champignons soient considérés comme des organismes chitineux, des traces de cellulose ont parfois été détectées dans leurs parois cellulaires mais aucun gène de cellulose synthase n'a été identifié. Typiquement les parois des ascomycètes contiennent la cellulose au lieu de la chitine comme composant majeure de la paroi cellulaire, bien que certains d'eux contiennent de petites quantités de chitine en mélange avec la cellulose (Nasraoui, 2015). La teneur de cellulose dans le mycélium de *P. cinnamomi* est estimée à 11% (Bartnicki-Garcia 1966).

II.2.4.1- Structure

La cellulose est un homopolymère linéaire constitué par l'enchaînement d'unités D-glucopyranoses liées entre elles par les liaisons glycosidiques β -(1,4) (Delattre, 2005). La cellulose est donc un polyglucose formé par un enchaînement de monomères de β -D-glucopyranose par des liaisons (1 $\rightarrow$ 4), dont la masse moléculaire peut être supérieure à 2×10^6 daltons. L'existence de liaisons hydrogènes inter-chaînes entraîne la formation de fibres qui confèrent à la cellulose un rôle de squelette (Figure 7) (Jarvis, 2003)

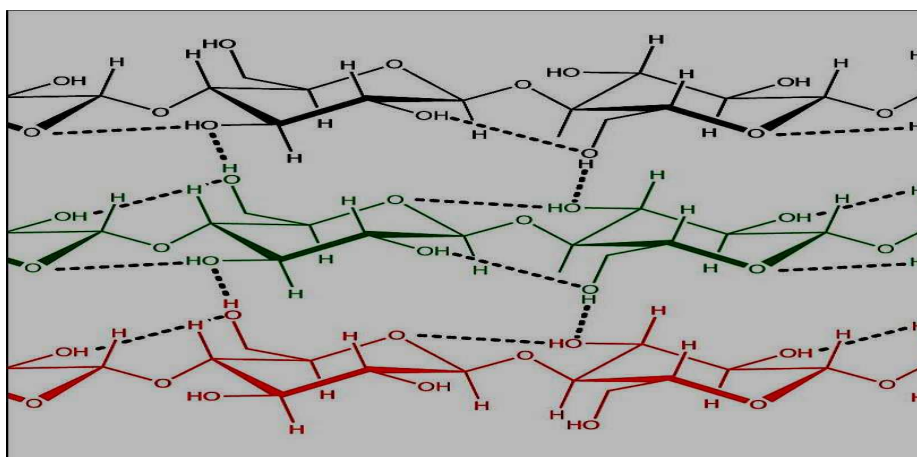


Figure 7: Chaines de glucose avec des liaisons hydrogène intra- et inter- chaînes

II.3- Procédé d'isolation du chitosane à partir d'une source fongique

L'extraction du chitosane à partir de mycélium des champignons présente plusieurs avantages. D'une part, les ressources de déchets issus des crustacés dépendent des saisons et la localisation géographique des sites de pêche, tandis que le mycélium peut être obtenu facilement par un processus de fermentation convenable, ce dernier n'a pas de limitations saisonnières ou géographiques (White et al, 1979). D'autre part, le mycélium contient des quantités faibles en matières minérales par rapport aux déchets des crustacés, donc l'étape de déminéralisation n'est pas nécessaire (Teng et al, 2001).

Les champignons impliqués dans le processus d'extraction du chitosane, sont habituellement, récoltés dans la phase exponentielle de croissance, afin d'obtenir un rendement maximal de chitine et chitosane. Bien que les champignons peuvent croître en milieu solide, la culture des champignons destinés à l'extraction du chitosane est effectuée sur milieu YPG, PDB et MSM (Chatterjee et al, 2004). Le chitosane est présent dans un seul taxon de champignons, où il se trouve sous deux formes : le chitosane libre et le chitosane lié au β -glucanes de manière covalente (Bartnicki-Garcia, 1968 ; Wessel et al, 1990). Par conséquent, afin d'extraire la matière chitineuse pure, ce réseau de glycoprotéines et β -glucanes doit être enlevé.

Divers procédés d'extraction du chitosane à partir des espèces fongiques ont été développés dans la littérature, et ils peuvent être divisés en deux catégories : procédé chimique et procédé enzymatique (Cai et al, 1999). Les procédés chimiques d'extraction du chitosane à partir d'une biomasse fongique sont similaires au processus industriel de son extraction à partir des crustacés (crevettes), excepté l'étape de déminéralisation, cela est dû au faible teneur de mycélium fongique en minéraux (Synowiecki et al, 1997). Généralement, le processus d'extraction comporte trois étapes ; la première étape est le traitement alcalin qui permet d'éliminer les protéines et les polysaccharides solubles, la deuxième étant le reflux acide qui vise à séparer la chitine et le chitosane, et l'étape de précipitation qui vise à récupérer le chitosane en milieu basique.

II.3.1- Extraction du chitosane libre

L'étape de déprotéinisation consiste à décomposer la paroi cellulaire en retirant les glycoprotéines, l'enveloppe externe et les composants matriciels de la cellule. La fraction insoluble dans le milieu alcalin (AIM) contient principalement les matériaux chitineux et β -glucanes liés de manière covalente et représentent la structure du squelette de la paroi

cellulaire (Fontaine et al,2000). La solution d'hydroxyde de sodium est choisie dans la littérature pour cette étape de déprotéinisation parmi une large gamme de produits, cependant, la concentration, la température et la durée de traitement variant largement selon les auteurs (Muzzarelli and Peters, 1997).

White et ses collaborateurs (1979) ont proposé une étape initiale de traitement alcalin impliquant l'homogénéisation de la biomasse, en mélangeant à grande vitesse, suivie par un traitement avec un mélange de NaOH 1M et d'éthanol 95% dans un rapport de 1/10 (poids/volume) de la biomasse sèche par rapport à un volume de NaOH / EtOH dans des conditions de bain de vapeur pendant 90 minutes. Par la suite, Rane et Hoover (1993) ont optimisé le traitement alcalin, proposant que le plus efficace procédé de séparation de la fraction insoluble en milieu liquide alcalin est de mettre à l'autoclave la cellule homogénéisée dans NaOH 1M pendant 15 minutes à 121 °C, avec un rapport (1/40) (poids/volume) de la masse cellulaire sèche à la solution alcaline.

La procédure de Rane et Hoover (1993) a été employée par plusieurs auteurs, mais parfois avec des variations de concentrations de NaOH, du rapport de la masse sèche à la solution alcaline ainsi que le temps de réaction (Tan et al, 1996; Jaworska, 2003; Rane and Hoover, 1993; Pochanavanichet Suntomsuk, 2002). Par exemple, Synowiecki et ses collaborateurs (1997) ont effectué la déprotéinisation de *mucor rouxii* dans NaOH à 2% (poids/volume) à 90°C pendant deux heures avec un rapport de (1/30) (poids/volume) de la biomasse sèche à la solution de NaOH.

Une fois la fraction AIM est récupérée par centrifugation, elle est traitée avec une solution acide telle que l'acide acétique (2-10%) à 90-121°C pendant 1-24 heures pour dissoudre la matière soluble dans l'acide acétique (AcSM) et la séparer de l'autre fraction qui est insoluble (AAIM). La fraction AcSM est généralement considérée riche en chitosane fongique, qui peut être précipité par l'augmentation du pH jusqu'à 9-10 en utilisant une solution alcaline d'hydroxyde de sodium 2N, suivi d'une centrifugation et d'un lavage avec l'acétone et l'éthanol (Tan et al, 1996; Synowiecki et Al-Khateeb, 1997; Chatterjee et al, 2005). Le schéma général qui permet d'extraire le chitosane libre est montré sur la figure 8.

Il faut signaler que le rendement du chitosane obtenu par les étapes décrites dans la figure 8 est très faible, car les conditions de traitement adoptées permettent seulement d'extraire le chitosane non lié (Nwee Stevens, 2002). Les conditions de traitement douces ne permettent pas de briser le complexe chitine/chitosane-glucane (Muzzarelli et al, 1980) qui constitue un assemblage rigide dans la paroi cellulaire (Gooday, 1995; Robson, 1999) et empêche l'extraction du chitosane total.

II.3.2-Extraction du chitosane total (chitosane libre et chitosane lié au glucane)

Pour pouvoir décomposer la fraction AIM en ces différents constituants (complexe chitosane-glucane, chitosane libre et glucane), la matrice de la paroi cellulaire fongique, constitués de polysacchides amorphes soluble en milieu alcalin, doit être dissocié en premier. Par la suite, la liaison covalente entre le chitosane et le glucane doit être brisé par hydrolyse enzymatique. Ces étapes de traitement permet d'extraire le chitosane total (à savoir, le chitosane libre plus chitosane lié au glucane) présent dans la paroi cellulaire.

Les études effectuées sur *Gongronella butleri* et *Absidia coerulea* ont montré que la meilleure décomposition du mycélium est obtenue lorsque celui-ci est traité avec NaOH 11M à 45°C pendant 13 h, suivi du traitement de la fraction AIM par une solution d'acide acétique 0,35 M à 95°C pendant 5h. L'utilisation de NaOH 11M permet d'admettre que les protéines, les glucanes solubles, les autres polysaccharides, l'ADN et l'ARN peuvent être éliminée durant l'étape de lavage à l'eau distillé jusqu'à pH neutre (Nwe et al, 2010). Dans ce cas, le chitosane et le complexe chitosane-glucane peuvent se retrouver dans la fraction insoluble AIM (Nwe et Stevens, 2002 et 2002a). Ces polymères restent en suspension dans l'acide acétique 0,35M durant le traitement acide de la AIM à 95°C pendant 5 heures (Tableau 3). Le procédé d'extraction du chitosane totale est représenté sur la figure 9.

Tableau 3: Comportement des constituants de la fraction AIM en solution suivant le pH (Nwe et al, 2010)

pH de la solution	Solubilité du chitosane et du glucane		
	chitosane	glucanes	Chitosane -glucane
4	soluble	insoluble	suspension turbide
9	précipité	soluble	précipité
		insoluble	précipité

Suivant leur nature polycationique, les chitosanes se dissolvent dans les acides organiques à pH 4 et ils se précipitent à pH =9, la plupart des glucanes sont insolubles à pH=4 et pH=9. Les constituants de la AIM forment une suspension stable à pH=4 et ils se précipite à pH=9 (Nwe et Stevens, 2002a), ces observations ont permis de supposer que le glucane et le chitosane sont liés l'un à l'autre et montrent des comportements suspension/précipitation suivant la nature physico-chimique du chitosane constitutif du complexe : à pH=4, le chitosane est partiellement protoné ce qui lui confère l'aptitude de maintenir le complexe en

suspension, tandis qu'à pH =9 le chitosane perd ses charges et ne peut plus maintenir le complexe, ce dernier se précipite (Nwe et Stevens, 2002a).

II.3.3-Séparation du complexe chitosane-glucane

Selon les travaux de Nwe et Stevens (2002 et 2002 a) et les travaux de Nwe et ces collaborateurs sur la paroi cellulaire du champignon *Gongronellabutleri* (appartenant à la division des zygomycètes), La turbidité de la suspension décroît d'une turbidité initiale de 1000 NTU jusqu'à 10 NTU lorsqu'elle est traitée par l'enzyme commerciale de l' α -amylase dans les conditions optimales :pH =4,5 ;4% (v/v) d'enzyme à 65°C pendant 3heures à une vitesse d'agitation de 225 rpm.

Une grande quantité de surnageant clair et de précipité est obtenue après le traitement enzymatique (Figure 9).Le précipité contient du glucane libéré du complexe chitosane-glucane tandis que le surnageant contient du chitosane totale y compris le chitosane libre et le chitosane résultant du clivage du complexe chitosane-glucane par l'enzyme (Nwe et Stevens, 2002a).

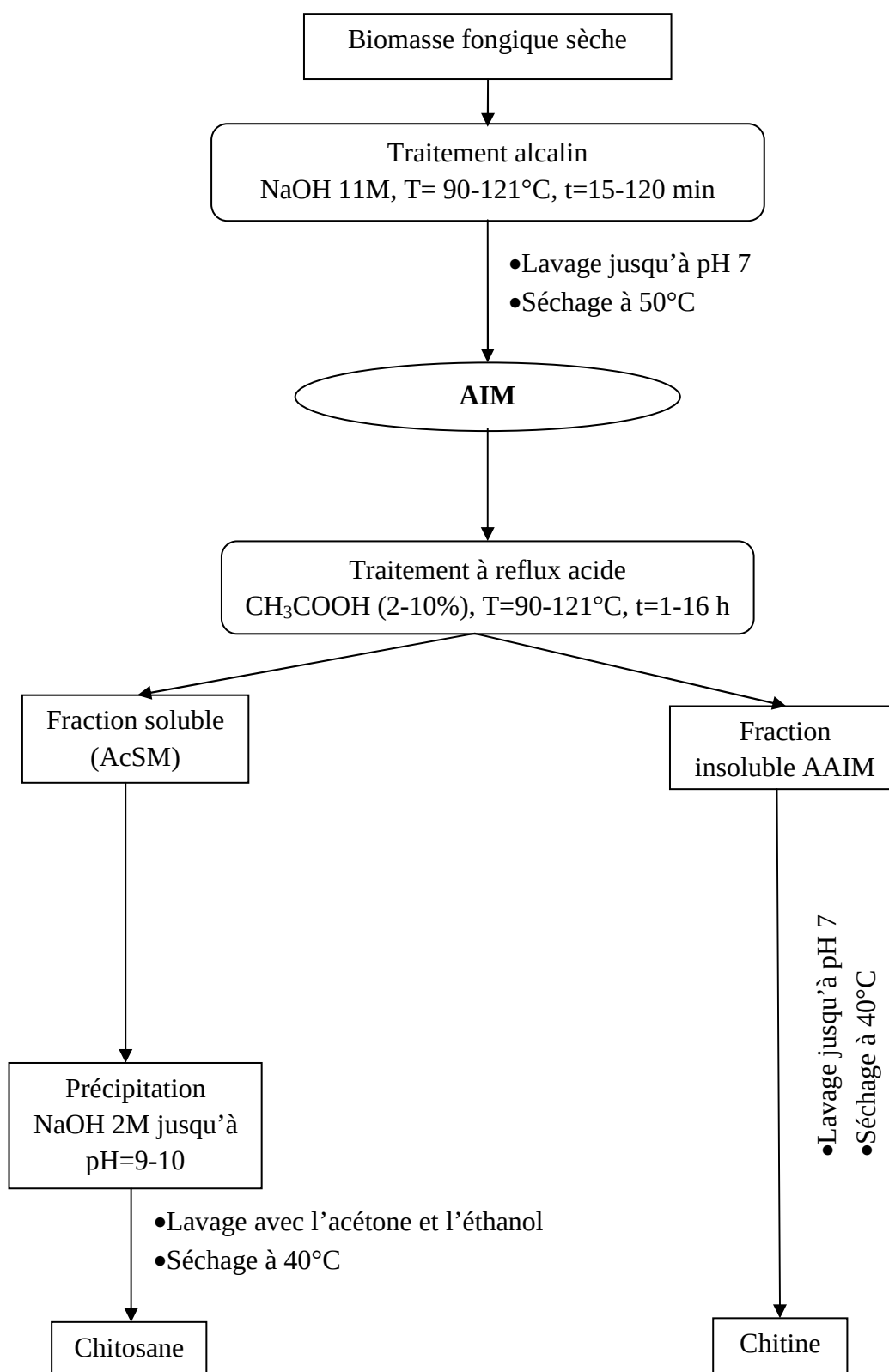


Figure 8: schéma générale du procédé d'extraction du chitosane libre (Rane et Hoover, 1993 ; Crestini et al, 1996)

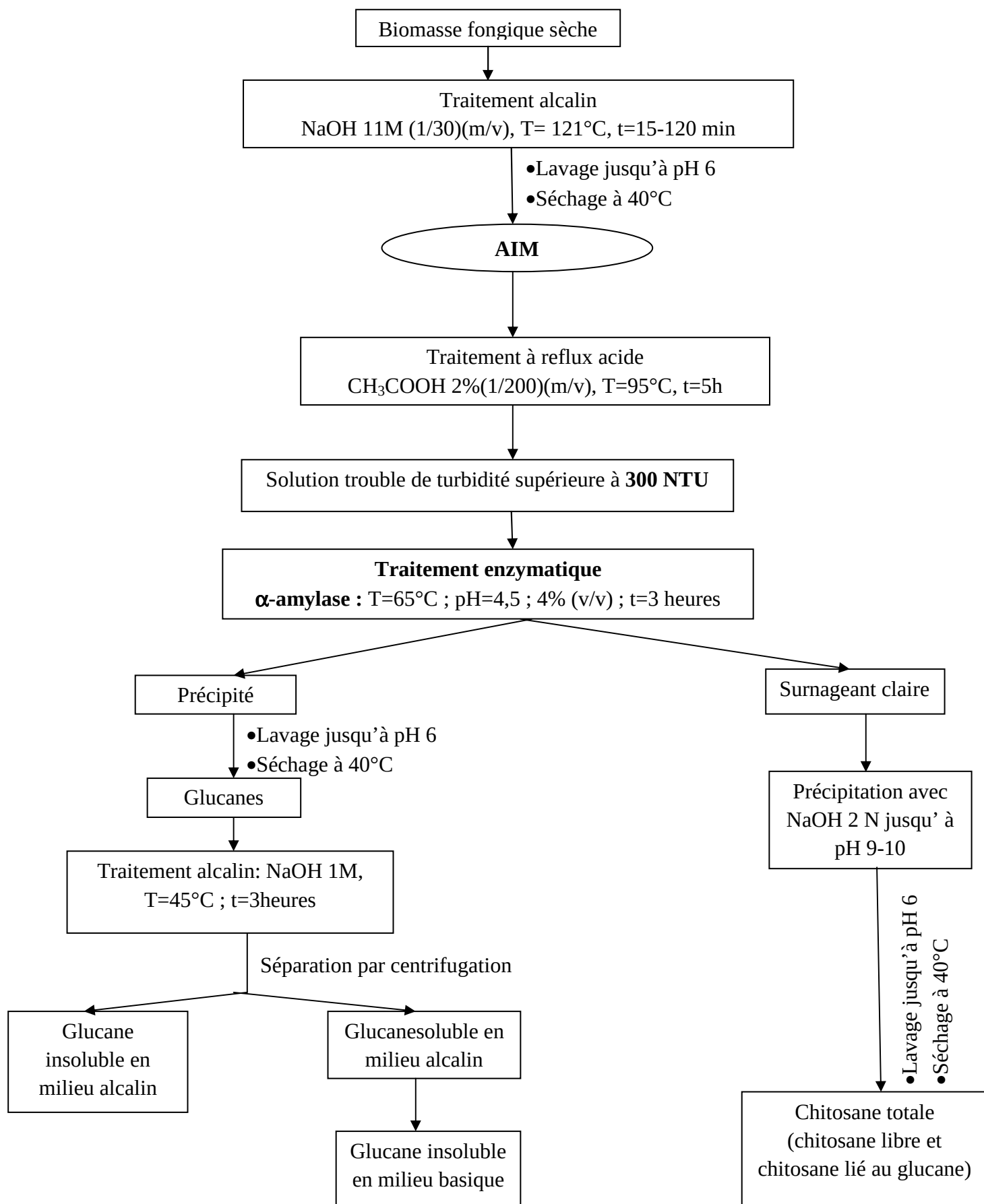


Figure9: Schéma générale du procédé d'extraction du chitosane total (Nwe et Stevens, 2002a)

II.4-Facteurs influents sur la qualité et la quantité du chitosane fongique

Le rendement de chitosane issu de la biomasse fongique dépend largement de plusieurs facteurs, telles que la souche de champignons utilisés, les méthodes de culture et les paramètres du procédé, tels que le pH, la température, la vitesse de mélange, le temps d'incubation, la taille des particules et le bouillon rhéologique. Une augmentation du rendement de chitosane peut être obtenue soit par l'augmentation du rendement de la biomasse ou par une augmentation de la teneur de la paroi cellulaire en chitosane (Jaworska and Konieczna, 2001).

Le protocole d'extraction est un facteur vital qui affecte les propriétés physico-chimiques du chitosane tel que le poids moléculaire, le degré de désacétylation DDA et la cristallinité, ainsi que la viscosité qui dépend directement du poids moléculaire, donc il doit être soigneusement sélectionné en fonction de l'application souhaitée du chitosane (Billmeyer, 1971). La concentration de l'acide et de la base utilisés dans le processus d'extraction, la température, la durée d'incubation et la taille des particules sont les principaux facteurs influents sur les propriétés physico-chimiques du chitosane. Cependant, la maîtrise de ceux-ci suit le contrôle de la composition du milieu de croissance ainsi que les paramètres du procédé d'extraction utilisé.

II.4.1-Traitement alcalin

La concentration de la base utilisée lors du traitement alcalin influe significativement sur le DDA. Kannan et al (2010) ont montré qu'une augmentation de la concentration de la solution alcaline a provoqué une augmentation de DDA.

II.4.2- Traitement acide

La nature de l'acide utilisé peut affecter le rendement final du chitosane. Le meilleur rendement du chitosane est obtenu par l'utilisation de l'acide formique à la place de l'acide acétique (Kannan et al, 2010). Les auteurs ont, également observé que, les effets et les interactions des acides ayant les mêmes concentrations pour un même temps d'incubation sont différents : le degré de désacétylation (DDA) du chitosane solubilisé par l'acide chlorhydrique est plus important que celui du chitosane solubilisé par l'acide acétique et l'acide formique. L'acide chlorhydrique est le plus fort parmi eux, ce qui lui a permis de provoquer une forte hydrolyse du groupement acétyle ainsi que la partie intérieure de l'assemblage monomérique du chitosane.

L'augmentation de la concentration des différents acides utilisés a provoqué une augmentation significative de degré de désacétylation. L'aspect du produit final dépend à son tour des conditions de traitement. Ainsi, les conditions douces ont donné un chitosane de couleur claire tandis que l'élévation de la concentration des acides a donné un chitosane ayant une couleur sombre.

II.4.3-Température et Temps d'incubation

Pour tenir compte des interactions effectives entre la base et les constituants de la paroi cellulaire fongique, l'augmentation de la température et des temps d'incubation est nécessaire. On outre, un long temps d'incubation assure pour la base le temps de réaction nécessaire pour attaquer la structure de la chitine et celle du chitosane et les séparer en d'autres polysaccharides. Kannan et al (2010) ont atteint un rendement maximal à une température de 121°C après 30 min de temps d'incubation. Le degré de désacétylation est aussi accru lorsque le temps d'incubation et la température sont élevés (Kannan et al, 2010).

II.4.4-Taille des particules

La taille des particules et la densité de la chitine affectent le degré de désacétylation DDA du chitosane en modifiant le taux de pénétration de la solution alcaline (nécessaire pour l'hydrolyse de la chitine en chitosane) à l'intérieur des zones amorphes, ainsi qu'à l'intérieur des zones cristallines de la chitine. Donc le degré de désacétylation DDA du chitosane augmente lorsque la taille des particules et la densité de la chitine augmente et il décroît lorsque ces deux derniers diminuent (Kannan et al, 2010).

II.5- Caractéristiques du chitosane fongique

La chitine et le chitosane fongiques sont, potentiellement différents de ceux qui sont isolés des crustacés : dans le poids moléculaire, le degré de désacétylation (DDA) et la distribution des groupements chargés. Toutefois, la recherche a besoin d'évaluer le procédé le plus économique qui permet d'extraire le chitosane à partir d'une source fongique.

II.5.1-Solubilité

En général, la solubilité du chitosane dépend non seulement de la valeur moyenne de DD, mais aussi de la distribution des groupements acétyles le long de la chaîne macromoléculaire, et également de son poids moléculaire (Rinaudo et Domard, 1989 ; Abida,

1991 ; Kubota et Eguchi, 1997). L'examen de l'influence de la protonation du chitosane en présence de l'acide acétique et l'acide chlorhydrique (Rinaudo et al, 1999) sur la solubilité a montré que le degré d'ionisation dépend du pH et pK de l'acide. La solubilisation du chitosane ayant un faible degré de désacétylation a lieu pour un degré d'ionisation $\alpha=0,5$ du chitosane, cette valeur correspond à pH=4,5-5 dans l'acide chlorhydrique. La solubilité du chitosane diminue lorsque la valeur de DDA diminue (Tableau 4) (Thanou et Junginger, 2005), et elle augmente lorsque la masse molaire diminue (Grabovac et al, 2005).

Tableau 4: Variation de la solubilité du chitosane en fonction de DDA à pH =6 (Thanou et Junginger, 2005)

Degré de désacétylation DDA(%)	Solubilité du chitosane
>75	Parfaite
=50	Moyenne
< 40	Faible

La solubilité du chitosane est habituellement testée dans l'acide acétique, et ce par la solubilisation du chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique 1% ou 0,1M, la concentration des protons est au moins égale à la concentration des unités $-NH_2$ qui sont impliquées (Rinaudo, 2006). Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, plus la solubilité du chitosane est accrue. Le chitosane est, en effet, insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées, ainsi que dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau (Kurita, 2006).

II.5.2-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 de DDA, de PM, mais aussi du pH (Pa et Yu, 2001), plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte. La viscosité augmente également avec le DDA, car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion de groupements amine libres est importante, plus il est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante (Wang et Xu, 1994). La viscosité dépend aussi de la concentration et de la température; comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente (Chen et Tsail, 1998), et elle est fonction de la PM des chaînes macromoléculaires (Berth et al, 1998).

Plusieurs méthodes ont été développées pour la détermination de la viscosité. La viscosimétrie est la méthode la plus employée, elle repose sur la connaissance des paramètres de la relation de Mark-Houwink :

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

$[\eta]$: la viscosité intrinsèque

M : le poids moléculaire moyen du polymère en (g)

K et a : paramètres qui dépend du système polymère-solvant à une température donnée en (ml /g)

II.5.3-Degré de désacétylation DDA

Le degré de désacétylation représente le taux de groupements acétylés par rapport aux groupements non acétylés (Zohuriaan-Mehr, 2005). C'est un paramètre extrêmement important car il influence non seulement les caractéristiques physique et chimique du chitosane telle que la solubilité, la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère, et donc la viscosité des solutions, mais aussi sur la biodégradation et l'activité immunologique de celui-ci. Diverses méthodes ont été développées afin de déterminer le degré de désacétylation DDA telle que la spectroscopie Infra Rouge (Brugnerotto et al, 2001 ; Miya et al, 1980 ; Domszy et Roberts, 1985), la spectroscopie UV, la résonance magnétique nucléaire RMN, la titration colloïdale et la titration potentiométrique (Xuan Jiang, 2003). La méthode la plus simple est celle proposée par Khan et al (2000), et qui repose sur la spectroscopie infra rouge, ainsi le DDA est déterminé en utilisant la relation suivante :

$$DDA\% = \left[100 - 100 \times \left(\frac{A_{CO}/A_{OH}}{1,33} \right) \right]$$

A_{CO} et A_{OH} représentent l'absorbance du groupement carbonyle de l'amide I et l'absorbance du groupement hydroxyle qui est stable dans la structure de la chitine et du chitosane, et qui n'est pas affecté par l'hydrolyse de la chitine en chitosane. Le facteur 1,33 représente le rapport (A_{CO} / A_{OH}) pour un chitosane entièrement désacétylé.

Le chitosane issu des champignons a un degré de désacétylation de 70 à 90% et un poids moléculaire moyen de $1 \text{ à } 2 \cdot 10^5$ Da. Ces paramètres dépendent fortement de l'espèce

fongique utilisée et des conditions de traitement appliqué sur cette dernière au cours du processus d'extraction du chitosane (Ivshina et al, 2009).

II.5.4-Cristallinité

Le chitosane est une substance semi-cristalline, il se cristallise dans le système orthorhombique. Samuels (1981) a proposé deux formes de chitosane avec deux types de cristallinité, le type I correspond à une famille ayant DDA=60% et qui se présente sous forme de sels du chitosane et il est plus désordonné que le type II qui possède un fort DDA (90% environ), il se trouve sous forme d'une amine libre.

II.5.5-Poids moléculaire PM

La valeur du poids moléculaire d'un chitosane dépend fortement du procédé de fabrication car celui-ci peut induire unedépolymérisation des chaînes macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production. Leschaînes de chitosane ont des poids très variés, entre 1 et 2.10^5 Da selon les applications visées (Ivshina et al,2009). LePM affecte la solubilité du chitosane et ses propriétés rhéologiques notamment saviscosité. Ainsi, en augmentant le poids moléculaire du chitosane, on augmente sa viscosité et ondinue sa solubilité. Il peut aussi influencer significativement sur les propriétés du polymère ensolution, comme le paramètre DDA(Chen et Zhao, 2012).

II.6- Les applications du chitosane fongique

II.6.1- Dans la conservation des aliments

Les études ont montré que le chitosane possède une forte activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif et Gram négatif, incluant les agents pathogènes alimentaire telle que *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, et *Listeriamonocytogenes*(Hadwiger et al,1986 ; No et al, 2002).Deux théories ont été proposée pour expliquer le mécanisme de l'activité antimicrobienne du chitosane,selon la première l'interaction entre les molécules du chitosane chargés positivement et la membrane cellulaire microbienne chargé négativement abouti à la perturbation de la membrane cytoplasmique,et par la suite à la perte des constituants intracellulaire (Sudharshan et al,1992). Selon la deuxième théorie, les oligosccharides de chitosane pénètrent facilement dans le noyau de la cellule eucaryote et interfère avec la transcription de l'ARN et la synthèse des protéines (Hadwiger et al,1986).

II.6.2- Pour stimuler l'immunité des plantes

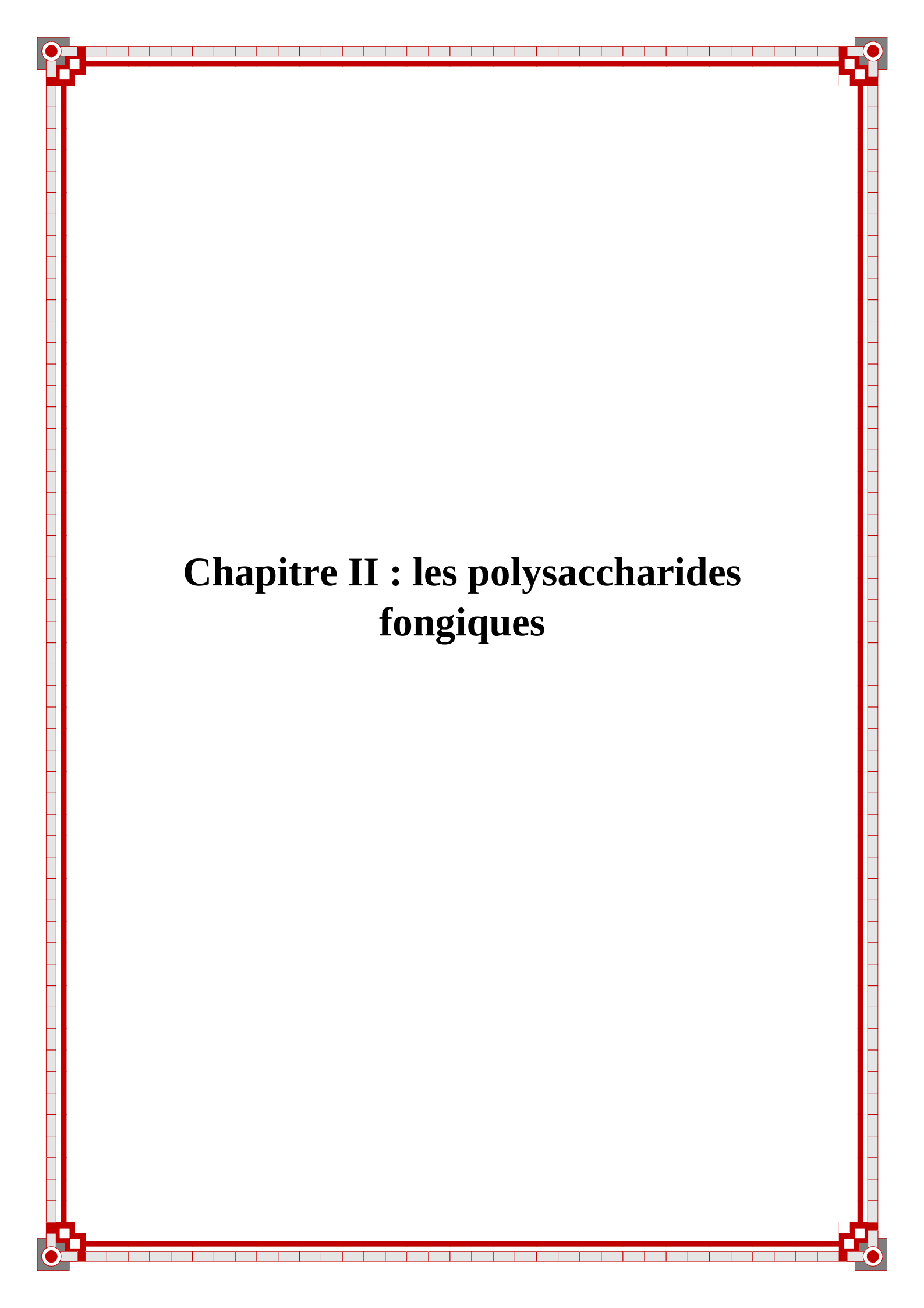
Dans l'agriculture, le chitosane a été utilisé dans les graines, les feuilles, les fruits et légumes, celui-ci a montré l'aptitude d'agir comme agent puissant pour stimuler la défense des plantes et inhiber la croissance des agents pathogènes (champignons et bactéries) (Shibuya et Mimami, 2001). Le chitosane réduit significativement les quantités de polygalacturonases produites par *Botrytis cinerea* qui provoque des dégradations cytologiques sur les hyphes du poivre (Glaouth et al, 1997). Il induit, également, la synthèse de phytoalexins sur les feuilles de riz, ce dernier est un antiparasite puissant qui provoque l'inhibition de la croissance fongique (Agrawal et al, 2002). Selon Ben-Shalom (2003), la croissance de *Botrytis cinerea* chez le concombre pulvérisé par le chitosane avant son inoculation est inhibée par l'augmentation de l'activité de chitosanase et peroxidase.

II.6.3- Dans l'ingénierie tissulaire

Le chitosane est un polymère bioadhésif et biologiquement actif, il possède des effets antigéniques et des activités antimicrobiennes et hémostatiques. Le chitosane est également biocompatible, biodégradable, non toxique et peut accélérer la régénération tissulaire et la cicatrisation des blessures (Onishi et al, 1994; Tokura et al, 1994; Maslova et Krasavtsev, 1998; Shigemasa et al, 1998; Kim et al, 2001; Vandevord et al, 2002; cités dans Nweet Stevens, 2008 et 2008a).

II.6.4- Dans la dépollution

Le chitosane fongique peut participer à l'élimination des métaux lourds toxiques qui sont considérés comme un véritable danger pour les espèces animales et végétales, et ce grâce aux groupements amine et hydroxyle situés à la surface et constitue des sites d'adsorption de ce genre de polluants persistants (Kleekayai et Suntornsuk, 2011). Le chitosane isolé de *M. indicus* est utilisé pour l'élimination des ions Cu^{2+} d'une solution aqueuse et comparé au chitosane des crustacés. La biosorption du chitosane fongique s'est avérée plus rapide que celle du chitosane issu des crustacés, cela est due au fait que le poids moléculaire du chitosane fongique est plus faible que celui du chitosane des crustacés. Donc après la saturation des groupements amines situés à la surface de celui-ci jouant le rôle de site de coordination pour les ions Cu^{2+} , ces derniers vont pénétrer facilement et rapidement à l'intérieur du chitosane fongique (Lo et al, 1999).



Chapitre II : les polysaccharides fongiques

II.1- Introduction

Les polysaccharides, polyosides, ou glycanes sont arbitrairement définis comme des polymères de haut poids moléculaire résultant de l'assemblage d'un grand nombre d'oses simple par des liaisons osidiques formées par l'élimination d'une molécule d'eau entre l'hydroxyle hémiacétalique en C₁ d'un ose et l'un quelconque des hydroxyles de l'autre molécule osidique (Bruneton, 1999). Dans le groupe des polysaccharides, on peut distinguer:

1. Les homopolysaccharides (ou homoglycannes) qui sont constitués par un seul type d'oses :
 - polyglucosides ou glucanes (amidon, glycogène, cellulose);
 - polymannosides ou mannanes ;
 - polygalactosides ou galactanes : Certaines d'entre elles peuvent être sulfatés (agar-agar et carraghénane).
 - polyfructosides ou fructosanes ou fructanes (inuline);
 - polyxylosides ou xylanes (ce sont aussi des pentosanes).
2. Les hétéropolysaccharides (ou polyholosides mixtes) qui par hydrolyse donnent naissance à plusieurs oses :
 - galactomannanes (galactose et mannose);
 - hémicellulose (xylose et arabinose).

Les polyuronides peuvent être reliés à cet ensemble ; ils forment un groupe important de colloïdes naturels:

- pectine (polygalacturonides);
- acides alginiques (polymannuronides);
- gomme arabique, constituée de molécules très ramifiées contenant de l'acide Glucuronique, du Arabinose, du Rhamnose et du Galactose (Biserte et al, 1977).

Leurs propriétés rhéologiques (gélifiant, stabilisant; émulsifiant, épaississant,...) sont mises à profit dans l'agro- alimentaire, l'industrie pétrolière, la cosmétique, les peintures, les adhésifs, les biomatériaux... leur bonne biocompatibilité confère à ces biomolécules des vastes possibilités d'utilisation dans l'industrie en général et plus précisément dans l'industrie chimique ainsi que dans l'industrie pharmaceutique et médicale (Delattre, 2005).

Selon leurs origines, les polysaccharides peuvent être classés en trois catégories ; les polysaccharides animaux, les polysaccharides extraits d'algues et les polysaccharides fongiques.

Les polysaccharides animaux (l'Acide hyaluronique, Héparine, Glycogène...) sont soit impliqués dans la structure des tissus conjonctifs (hyaluronanes, dermatanes sulfate et chondroïtines), soit dans des mécanismes de communications cellulaires *via* leurs propriétés fonctionnelles (héparines et héparanesulfate) (Delattre, 2005).

D'une manière générale, les parois des algues brunes (Phaeophyceae) ainsi que celle des algues vertes (Chlorophyceae) possèdent des polysaccharides de type carraghénanes, Agar-Agar (géluse) et alginates. Selon Delattre 2005, les parois des algues rouges contiennent essentiellement des galactanesulfatés tels que : les carraghénanes.

Les parois fongiques sont des structures en multicouches constituées de 75% des polysaccharides (chitine, glucanes et glycoprotéines) organisés en microfibrilles (ils sont composés de chitine).

II .2- Les polysaccharides fongiques

Les champignons représentent un ensemble extrêmement hétérogène d'organismes dont les individus sont distribués dans toutes sortes d'habitats. Cette caractéristique a pour conséquence une grande diversité métabolique et biochimique.

Les polysaccharides représentent un pourcentage majeur de la biomasse fongique (jusqu'à environ 75 %). Ils forment une gaine protectrice autour du mycélium et assurent ainsi un rôle de soutien pour ce dernier. Le principal représentant de ces polymères fongiques est la chitine (Delattre, 2005). Les polysaccharides fongiques peuvent être classés en deux catégories suivant leurs fonctions : les polymères dits structurels ou polysaccharides fibrillaires qui sont situés à proximité de la membrane plasmique pour être en mesure d'accomplir leur fonction mécanique, ils sont donc responsables de la rigidité de la paroi cellulaire. Les polymères de matrice ou polymères amorphes de type gel matriciel agissant comme interconnexion des molécules, et ils sont présents dans la paroi cellulaire entière (Wessel et Sietsma, 1981; Wessels, 1994).

Le Glucane et /ou la chitine ont généralement été dotés de la fonction structurelle, bien que certains mannoprotéines, normalement considérés comme polymères de matrice typiques, peuvent également jouer un rôle important dans le maintien de l'architecture globale des murs (Wessels et Sietsma, 1981; Ruiz-Herrera, 1992; Wessels, 1994; Sentandreu et al, 1994).

II.2.1- Leglucane

Leglucane est un polysaccharide d'importance majeure dans la structure pariétale, leur pourcentage dans la paroi des ascomycètes est le plus significatif. Ce polymère est constitué exclusivement de monomères de D-glucose, selon le type de liaisons chimiques, on distingue les α - et β -glucanes, ces deux types contiennent des liaisons 1,3- et /ou (1,4), mais seulement les β -(1,3)-glucanes qui contiennent des liaisons (1,6). Les deux types de glucanes sont présents chez la plupart des espèces fongiques de différents groupes taxonomiques, bien que les β -glucanes soient les plus abondants (Ruiz-Herrera, 1992 ; Wessels, 1994 ; Sentandreu et al, 1994 ; Latgé, 2010).

Les β -glucanes sont liés à la chitine par des liaisons covalentes en passant par des acides aminés, ce lien explique l'insolubilité d'une partie des glucanes sous les conditions alcalines (Siestma et al, 1977).

II.2.1.1- β -(1,3)-glucane

C'est un homopolymère linéaire de glucose dont les unités monomères sont liées l'une à l'autre par une liaison β -(1,3) avec quelques branchements en β -(1,6) (Figure 3) (Legentil et al, 2015). Chez les cellules en phase stationnaire, le β -(1,3)-glucane est présent sous forme d'énormes chaînes linéaires composées de plus de 1500 monomères de glucose, et elles ont une forme semblable à celle d'un ressort flexible capable d'exister sous différents degrés d'extension. Cette caractéristique procure entre autres à la paroi cellulaire sa propriété d'élasticité (Klis et al, 2002). β -(1,3)-glucane rentre dans la structure de la paroi cellulaire de la plupart des champignons, sauf la paroi des hyphes des zygomycètes (Bartnicki-Garcia, 1968 ; Wessels et Sietsma, 1982 ; Barreto-Bergter et Corin, 1983). Des études ont suggéré que les extrémités non-réductrices de β -(1,3)-glucane fortement ramifiés sont liées à la chitine par des liaisons β -(1,4) (Fontaine, 2000 ; Klis et al, 2002 ; Aguilar-Uscanga and Francois, 2003).

La présence de β -glucane dans la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* est établie en 1950 (Bell et Northcote, 1950). Il constitue la composante structurale majeure de la paroi interne de cette levure, comptant pour plus de la moitié de son poids sec (Cabib et al, 2001) et formant la fraction soluble dans les conditions alcalines (Klis et al, 1997). Chez *S. cerevisiae*, entre 40 et 50 embranchements sont formés sur chaque chaîne de β 1,3-glucanes (Lipke and Ovalle, 1998). Suite à l'élongation de ces chaînes latérales, celles-ci sont liées à la chitine, aux β -(1,6)-glucane-mannoprotéines (GPI) puis aux mannoprotéines qui possèdent des séquences internes répétées (Pir) (Mouyna et al, 2000) (Figure 4).

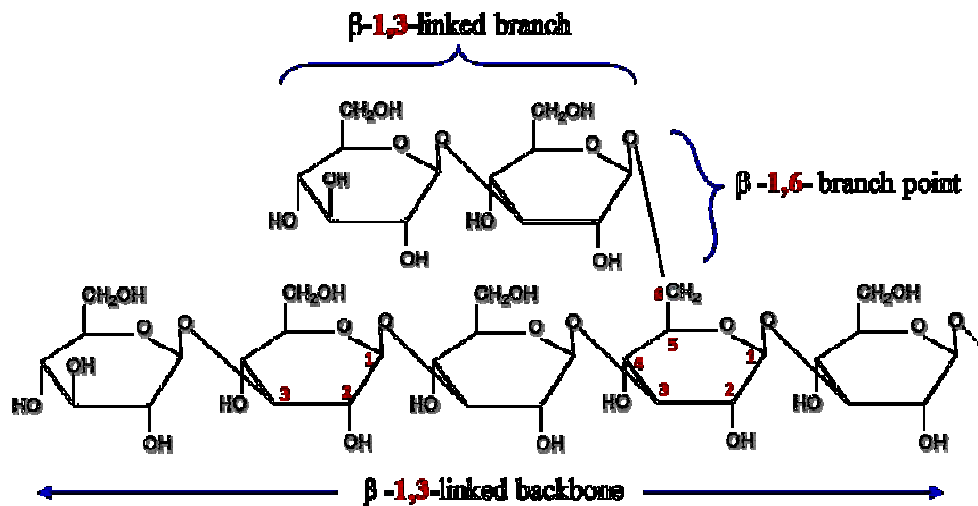


Figure3: Schéma de fragment ramifié de β -(1,3)-glucane qui contient une liaison β -(1,6) (modifié après Ruiz-Herrera, 1991; Roemer et al, 1994)

II.2.1.2- β -(1,6)-glucane

Le β -(1,6)-glucane est un polysaccharide fortement ramifié formé de chaînes amorphes de β -(1,6)-glucose, ils rentrent dans la composition de la paroi cellulaire de nombreux espèces fongiques (Barreto-Bergter et Corin, 1983). Le β -(1,6)-glucane est une composante structurale relativement mineure (5%) mais essentielle à la paroi cellulaire de *S. cerevisiae* (Rohet et al, 2002). Sous sa forme mature, il est composé d'environ 350 monomères de glucose et possède plusieurs embranchements, le β -(1,6)-glucane est responsable d'interconnecter le β -(1,3)-glucane et la chitine avec les protéines de la paroi cellulaire (Azuma et al, 2002; Kollar et al, 1997; Shahinian and Bussey, 2000) (Figure 3). Selon Klis et al (2001), β -(1,6)-glucane présente jusqu'à 20% de la paroi cellulaire chez *Candida albicans*.

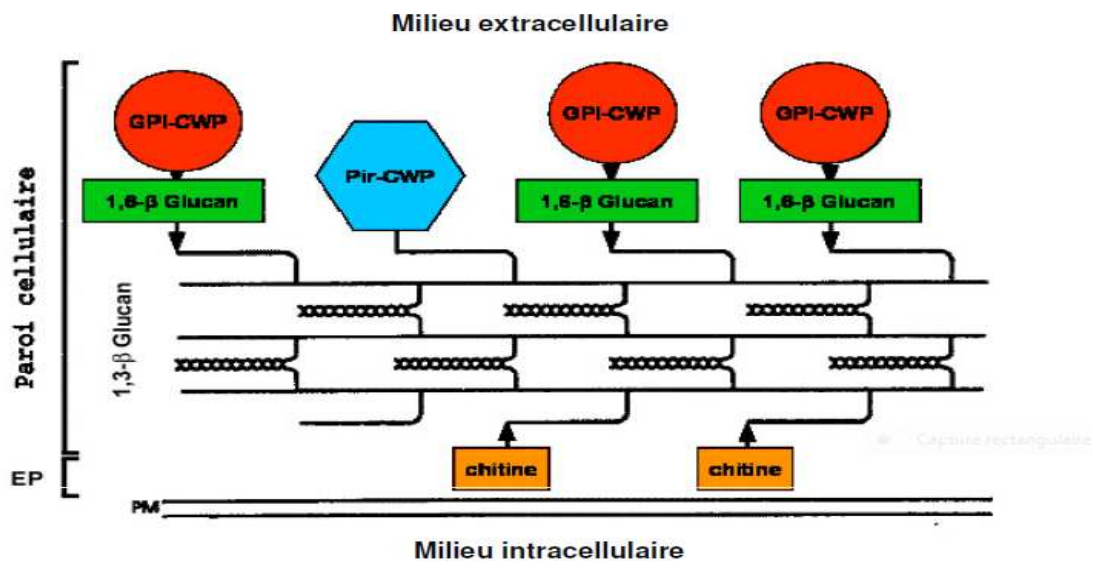


Figure 4: Organisation moléculaire de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* (Smits et al, 2001).

II.2.2- La chitine

La chitine est l'un des polymères naturels les plus abondants sur le globe avec la cellulose (Khanafari et al, 2008). Ce polysaccharide entre dans la composition de la paroi cellulaire des eucaryotes, incluant des organismes unicellulaires (levures, amibes, diatomées) et multicellulaires (champignons filamenteux, arthropodes, nématodes, mollusques), il est également présent chez certaines éponges et algues marines (Ehrlich et al, 2007). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la chitine occupe approximativement 2% du poids sec de la paroi cellulaire. Au cours de la croissance végétative, il se trouve principalement au site de bourgeonnement et dans les cicatrices de bourgeonnement (Bulawa et al, 1986), toutefois une faible quantité de chitine est aussi retrouvée dans la paroi latérale où il forme des liaisons covalentes avec β -(1,3) et β -(1,6)-glucanes (Cabibet et al, 2001; Choi et al, 1994).

II.2.2.1- Structure

La chitine est un polymère linéaire formé de monomères de β -(1,4)-N-acétylglucosamine (Figure 5). Environ 20-400 chaînes du polysaccharide s'associent par l'intermédiaire de liaisons hydrogène pour créer la forme structurale du polysaccharide et donner naissance à des microfibrilles qui confèrent le rôle squelettique de la chitine (Ruiz-Herrera and San-Blas, 2003).

Les études cristallographiques effectuées sur la chitine ont montré que ce dernier est polymorphique, il se présente sous trois formes différentes (Tableau 2). Les microfibrilles peuvent s'orienter de manière parallèle (chitine β), antiparallèle (chitine α), ou en alternance entre parallèle et antiparallèle (chitine γ) (Kramer, 1998). Les trois formes se distinguent par le degré d'hydratation, la taille et le nombre de chaînes de chitine (Merzendorfer, 2006). La chitine α est la plus stable et aussi la plus abondante, dans laquelle les chaînes polysaccharidiques sont disposées de façon antiparallèle, ce qui donne naissance à de nombreux ponts hydrogène, et confère une grande stabilité au polymère vis-à-vis des solvants courants et des solutions aqueuses (Crini, 2005).

La chitine β est une forme moins abondante dont les chaînes polysaccharidiques sont toutes parallèles entre elles; les ponts hydrogènes sont inexistant, ce qui confère à la chitine β des propriétés de solubilité et de caractère hydrophile avec l'eau. Enfin la troisième forme, la chitine γ , implique deux chaînes parallèles qui alternent avec une chaîne antiparallèle (Muzzarelli, 1985).

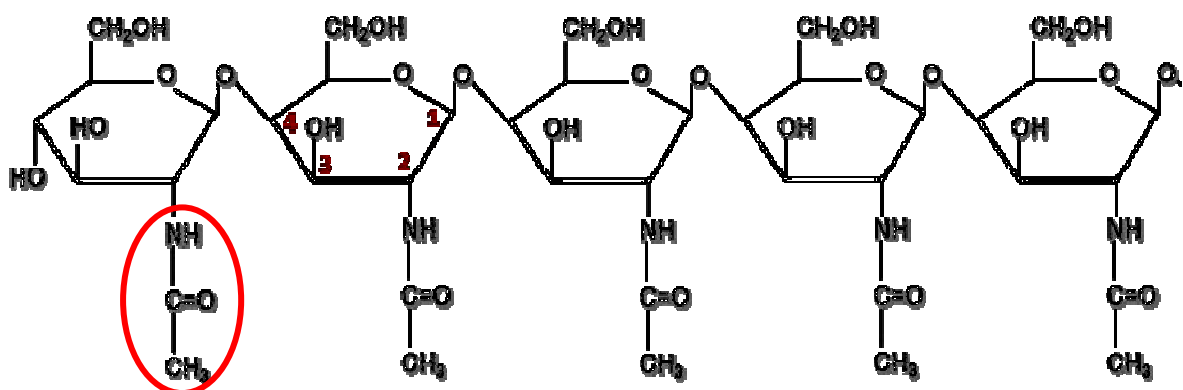


Figure 5: Schéma de fragment linéaire de chitine, *N*-acétylglucosamine contenant des liaisons β -(1,4). Le groupement acétyle est entouré en rouge (Latgé, 2010).

Tableau 2: arrangement des chaînes dans les trois formes de chitine.

Forme	Arrangement des chaînes	schématisation
chitine α	antiparallèle	↓↑↓↑↓↑
chitine β	parallèle	↑↑↑↑↑
chitine γ	2 parallèle pour une antiparallèle	↑↑↓↑↑↓

II.2.3-Le chitosane

Le chitosane est une substance peu répandue dans la nature. Il est présent dans la paroi cellulaire de certains micro-organismes fongiques (champignons zygomycètes) et dans le mycélium de *Mucor rouxii*, *Rhizopusoryzae* et *Absidiacoerulea*, et n'est signalé que dans les exosquelettes de certains insectes (par exemple la paroi abdominale des reines de termites) (Crini et al, 2009).

Le chitosane, le dérivé désacétylé de la chitine est un constituant important de la paroi cellulaire à divers moments au cours du cycle de vie de certaines espèces fongiques (Christodoulidou et al, 1996). Le chitosane n'est pas directement synthétisé mais plutôt l'enzyme déacétylase peut agir d'une manière efficace pour convertir la chitine en chitosane (Muzzarelli, 1977). Les enzymes désacétylases de la chitine sont probablement situées à proximité de les régions où la chitine traverse la membrane plasmique (Araki et Ito, 1975; Kafetzopoulos et al, 1993), dès que la chitine est synthétisée, l'enzyme déacétylase la convertit en chitosane. Parmi les quelques espèces fongiques indiqués pour synthétiser le chitosane, ceux appartenant à la classe des mucorales se sont avérés générer le chitosane au cours de la phase de croissance végétative (Orlowski, 1991), tandis que *S.cerevisiae* produit le chitosane uniquement pendant le stade de sporulation (Christodoulidou et al, 1996).

II.2.3.1- Structure

Le chitosane est un aminopolysaccharide d'origine biologique. Leur structure chimique, représentée sur la figure 6, résulte de l'enchaînement d'unités de répétition N-acétyl- D glucosamine et D-glucosamine liées en β -(1,4). Les structures de la chitine et du chitosane diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C-2 : acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane. Le terme « chitosane » est donc habituellement limité à toute chitine suffisamment N-déacétylée pour être soluble en milieu acide dilué. Pour parler de chitosane, il faut que la chitine soit désacétylée entre 50 % et 100 % (Jaepyoung et al, 2006a; Rinaudo, 2007; Rinaudo, 2008). Le chitosane a trois types de groupements fonctionnels réactifs, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C2, C3 et C6, respectivement. Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés intéressantes très différentes de celles de la chitine. Le chitosane, est soluble dans les acides faibles, il possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement (Rinaudo, 2006).

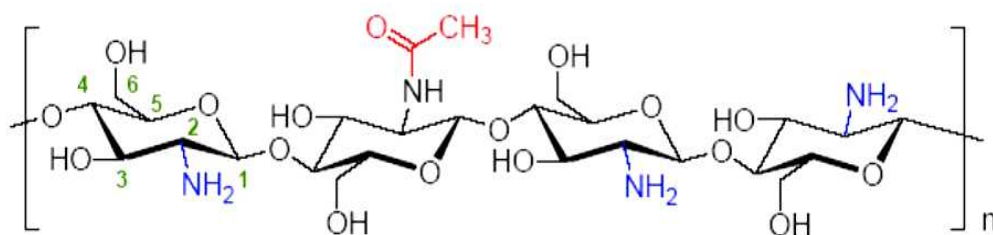


Figure 6 :La structure du chitosane (Seng et J.M, 1988).

II.2.4- La cellulose

La cellulose est le composé organique le plus synthétisé sur la terre (Guigrard ,1996). Bien que les champignons soient considérés comme des organismes chitineux, des traces de cellulose ont parfois été détectées dans leurs parois cellulaires mais aucun gène de cellulose synthase n'a été identifié. Typiquement les parois des ascomycètes contiennent la cellulose au lieu de la chitine comme composant majeure de la paroi cellulaire, bien que certains d'eux contiennent de petites quantités de chitine en mélange avec la cellulose (Nasraoui, 2015). La teneur de cellulose dans le mycélium de *P. cinnamomi* est estimée à 11% (Bartnicki-Garcia 1966).

II.2.4.1- Structure

La cellulose est un homopolymère linéaire constitué par l'enchaînement d'unités D-glucopyranoses liées entre elles par les liaisons glycosidiques β -(1,4) (Delattre, 2005). La cellulose est donc un polyglucose formé par un enchaînement de monomères de β -D-glucopyranose par des liaisons (1 $\rightarrow$ 4), dont la masse moléculaire peut être supérieure à 2×10^6 daltons. L'existence de liaisons hydrogènes inter-chaînes entraîne la formation de fibres qui confèrent à la cellulose un rôle de squelette (Figure 7) (Jarvis, 2003)

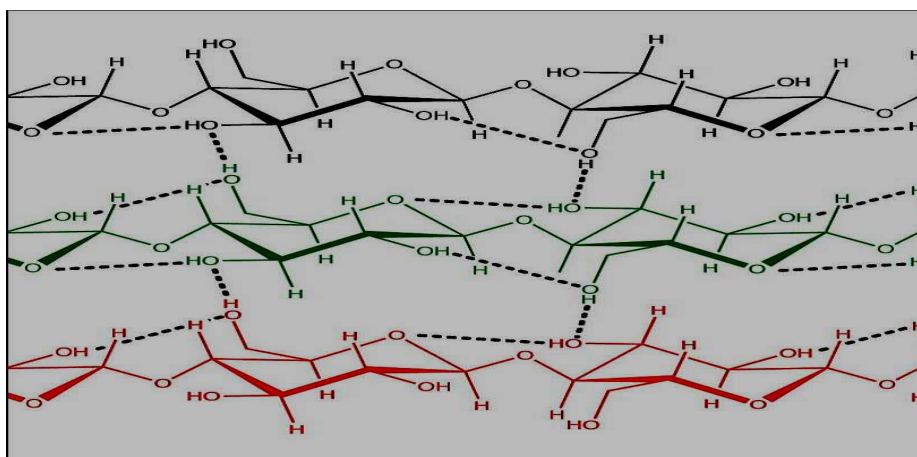


Figure 7: Chaines de glucose avec des liaisons hydrogène intra- et inter- chaînes

II.3- Procédé d'isolation du chitosane à partir d'une source fongique

L'extraction du chitosane à partir de mycélium des champignons présente plusieurs avantages. D'une part, les ressources de déchets issus des crustacés dépendent des saisons et la localisation géographique des sites de pêche, tandis que le mycélium peut être obtenu facilement par un processus de fermentation convenable, ce dernier n'a pas de limitations saisonnières ou géographiques (White et al, 1979). D'autre part, le mycélium contient des quantités faibles en matières minérales par rapport aux déchets des crustacés, donc l'étape de déminéralisation n'est pas nécessaire (Teng et al, 2001).

Les champignons impliqués dans le processus d'extraction du chitosane, sont habituellement, récoltés dans la phase exponentielle de croissance, afin d'obtenir un rendement maximal de chitine et chitosane. Bien que les champignons peuvent croître en milieu solide, la culture des champignons destinés à l'extraction du chitosane est effectuée sur milieu YPG, PDB et MSM (Chatterjee et al, 2004). Le chitosane est présent dans un seul taxon de champignons, où il se trouve sous deux formes : le chitosane libre et le chitosane lié au β -glucanes de manière covalente (Bartnicki-Garcia, 1968 ; Wessel et al, 1990). Par conséquent, afin d'extraire la matière chitineuse pure, ce réseau de glycoprotéines et β -glucanes doit être enlevé.

Divers procédés d'extraction du chitosane à partir des espèces fongiques ont été développés dans la littérature, et ils peuvent être divisés en deux catégories : procédé chimique et procédé enzymatique (Cai et al, 1999). Les procédés chimiques d'extraction du chitosane à partir d'une biomasse fongique sont similaires au processus industriel de son extraction à partir des crustacés (crevettes), excepté l'étape de déminéralisation, cela est dû au faible teneur de mycélium fongique en minéraux (Synowiecki et al, 1997). Généralement, le processus d'extraction comporte trois étapes ; la première étape est le traitement alcalin qui permet d'éliminer les protéines et les polysaccharides solubles, la deuxième étant le reflux acide qui vise à séparer la chitine et le chitosane, et l'étape de précipitation qui vise à récupérer le chitosane en milieu basique.

II.3.1- Extraction du chitosane libre

L'étape de déprotéinisation consiste à décomposer la paroi cellulaire en retirant les glycoprotéines, l'enveloppe externe et les composants matriciels de la cellule. La fraction insoluble dans le milieu alcalin (AIM) contient principalement les matériaux chitineux et β -glucanes liés de manière covalente et représentent la structure du squelette de la paroi

cellulaire (Fontaine et al,2000). La solution d'hydroxyde de sodium est choisie dans la littérature pour cette étape de déprotéinisation parmi une large gamme de produits, cependant, la concentration, la température et la durée de traitement variant largement selon les auteurs (Muzzarelli and Peters, 1997).

White et ses collaborateurs (1979) ont proposé une étape initiale de traitement alcalin impliquant l'homogénéisation de la biomasse, en mélangeant à grande vitesse, suivie par un traitement avec un mélange de NaOH 1M et d'éthanol 95% dans un rapport de 1/10 (poids/volume) de la biomasse sèche par rapport à un volume de NaOH / EtOH dans des conditions de bain de vapeur pendant 90 minutes. Par la suite, Rane et Hoover (1993) ont optimisé le traitement alcalin, proposant que le plus efficace procédé de séparation de la fraction insoluble en milieu liquide alcalin est de mettre à l'autoclave la cellule homogénéisée dans NaOH 1M pendant 15 minutes à 121 °C, avec un rapport (1/40) (poids/volume) de la masse cellulaire sèche à la solution alcaline.

La procédure de Rane et Hoover (1993) a été employée par plusieurs auteurs, mais parfois avec des variations de concentrations de NaOH, du rapport de la masse sèche à la solution alcaline ainsi que le temps de réaction (Tan et al, 1996; Jaworska, 2003; Rane and Hoover, 1993; Pochanavanichet Suntomsuk, 2002). Par exemple, Synowiecki et ses collaborateurs (1997) ont effectué la déprotéinisation de *mucor rouxii* dans NaOH à 2% (poids/volume) à 90°C pendant deux heures avec un rapport de (1/30) (poids/volume) de la biomasse sèche à la solution de NaOH.

Une fois la fraction AIM est récupérée par centrifugation, elle est traitée avec une solution acide telle que l'acide acétique (2-10%) à 90-121°C pendant 1-24 heures pour dissoudre la matière soluble dans l'acide acétique (AcSM) et la séparer de l'autre fraction qui est insoluble (AAIM). La fraction AcSM est généralement considérée riche en chitosane fongique, qui peut être précipité par l'augmentation du pH jusqu'à 9-10 en utilisant une solution alcaline d'hydroxyde de sodium 2N, suivi d'une centrifugation et d'un lavage avec l'acétone et l'éthanol (Tan et al, 1996; Synowiecki et Al-Khateeb, 1997; Chatterjee et al, 2005). Le schéma général qui permet d'extraire le chitosane libre est montré sur la figure 8.

Il faut signaler que le rendement du chitosane obtenu par les étapes décrites dans la figure 8 est très faible, car les conditions de traitement adoptées permettent seulement d'extraire le chitosane non lié (Nwee Stevens, 2002). Les conditions de traitement douces ne permettent pas de briser le complexe chitine/chitosane-glucane (Muzzarelli et al, 1980) qui constitue un assemblage rigide dans la paroi cellulaire (Gooday, 1995; Robson, 1999) et empêche l'extraction du chitosane total.

II.3.2-Extraction du chitosane total (chitosane libre et chitosane lié au glucane)

Pour pouvoir décomposer la fraction AIM en ces différents constituants (complexe chitosane-glucane, chitosane libre et glucane), la matrice de la paroi cellulaire fongique, constitués de polysacchides amorphes soluble en milieu alcalin, doit être dissocié en premier. Par la suite, la liaison covalente entre le chitosane et le glucane doit être brisé par hydrolyse enzymatique. Ces étapes de traitement permet d'extraire le chitosane total (à savoir, le chitosane libre plus chitosane lié au glucane) présent dans la paroi cellulaire.

Les études effectuées sur *Gongronella butleri* et *Absidia coerulea* ont montré que la meilleure décomposition du mycélium est obtenue lorsque celui-ci est traité avec NaOH 11M à 45°C pendant 13 h, suivi du traitement de la fraction AIM par une solution d'acide acétique 0,35 M à 95°C pendant 5h. L'utilisation de NaOH 11M permet d'admettre que les protéines, les glucanes solubles, les autres polysaccharides, l'ADN et l'ARN peuvent être éliminée durant l'étape de lavage à l'eau distillé jusqu'à pH neutre (Nwe et al, 2010). Dans ce cas, le chitosane et le complexe chitosane-glucane peuvent se retrouver dans la fraction insoluble AIM (Nwe et Stevens, 2002 et 2002a). Ces polymères restent en suspension dans l'acide acétique 0,35M durant le traitement acide de la AIM à 95°C pendant 5 heures (Tableau 3). Le procédé d'extraction du chitosane totale est représenté sur la figure 9.

Tableau 3: Comportement des constituants de la fraction AIM en solution suivant le pH (Nwe et al, 2010)

pH de la solution	Solubilité du chitosane et du glucane		
	chitosane	glucanes	Chitosane -glucane
4	soluble	insoluble	suspension turbide
9	précipité	soluble	précipité
		insoluble	précipité

Suivant leur nature polycationique, les chitosanes se dissolvent dans les acides organiques à pH 4 et ils se précipitent à pH =9, la plupart des glucanes sont insolubles à pH=4 et pH=9. Les constituants de la AIM forment une suspension stable à pH=4 et ils se précipite à pH=9 (Nwe et Stevens, 2002a), ces observations ont permis de supposer que le glucane et le chitosane sont liés l'un à l'autre et montrent des comportements suspension/précipitation suivant la nature physico-chimique du chitosane constitutif du complexe : à pH=4, le chitosane est partiellement protoné ce qui lui confère l'aptitude de maintenir le complexe en

suspension, tandis qu'à pH =9 le chitosane perd ses charges et ne peut plus maintenir le complexe, ce dernier se précipite (Nwe et Stevens, 2002a).

II.3.3-Séparation du complexe chitosane-glucane

Selon les travaux de Nwe et Stevens (2002 et 2002 a) et les travaux de Nwe et ces collaborateurs sur la paroi cellulaire du champignon *Gongronellabutleri* (appartenant à la division des zygomycètes), La turbidité de la suspension décroît d'une turbidité initiale de 1000 NTU jusqu'à 10 NTU lorsqu'elle est traitée par l'enzyme commerciale de l' α -amylase dans les conditions optimales :pH =4,5 ;4% (v/v) d'enzyme à 65°C pendant 3heures à une vitesse d'agitation de 225 rpm.

Une grande quantité de surnageant clair et de précipité est obtenue après le traitement enzymatique (Figure 9).Le précipité contient du glucane libéré du complexe chitosane-glucane tandis que le surnageant contient du chitosane totale y compris le chitosane libre et le chitosane résultant du clivage du complexe chitosane-glucane par l'enzyme (Nwe et Stevens, 2002a).

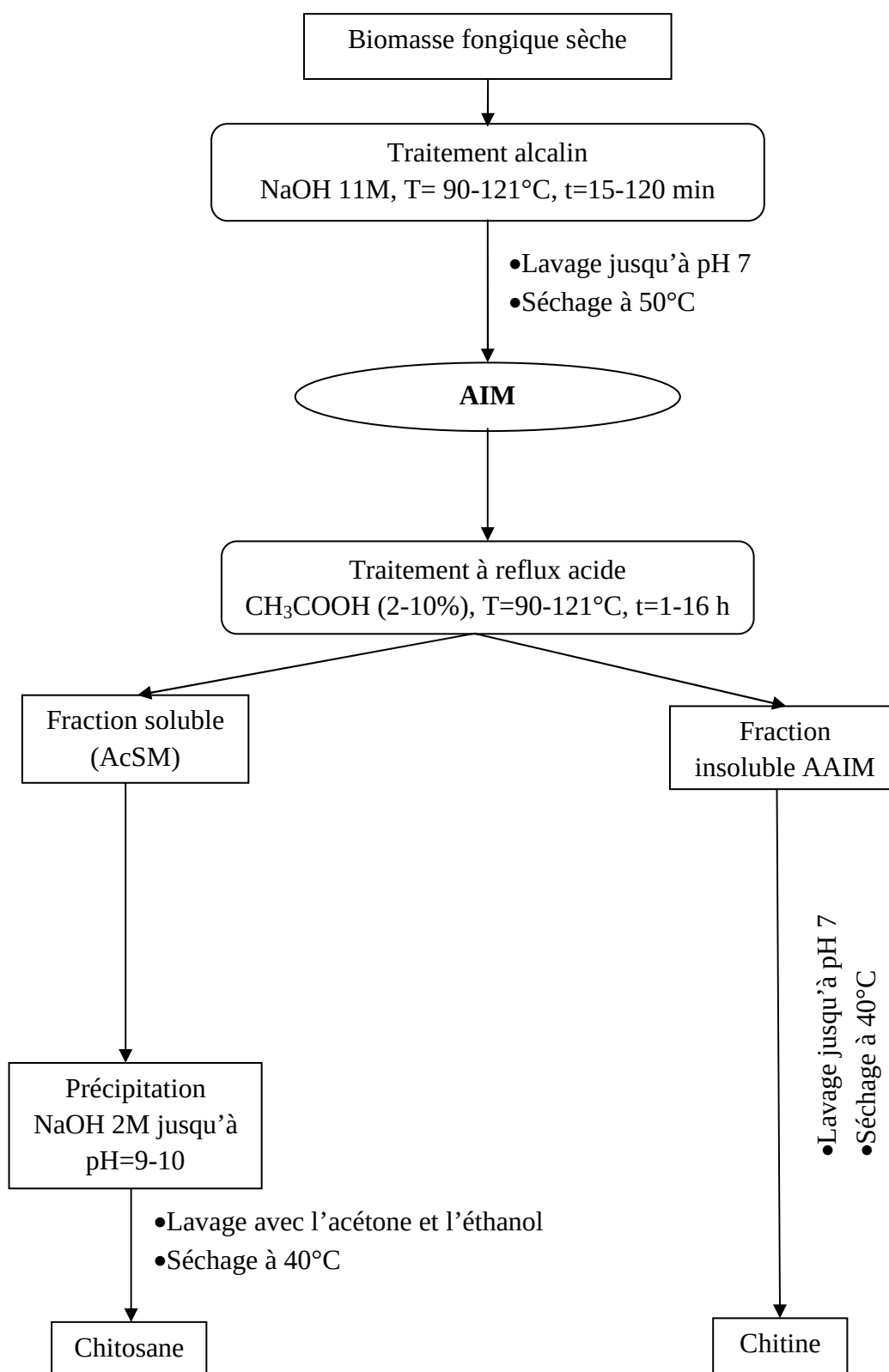


Figure 8: schéma générale du procédé d'extraction du chitosane libre (Rane et Hoover, 1993 ; Crestini et al, 1996)

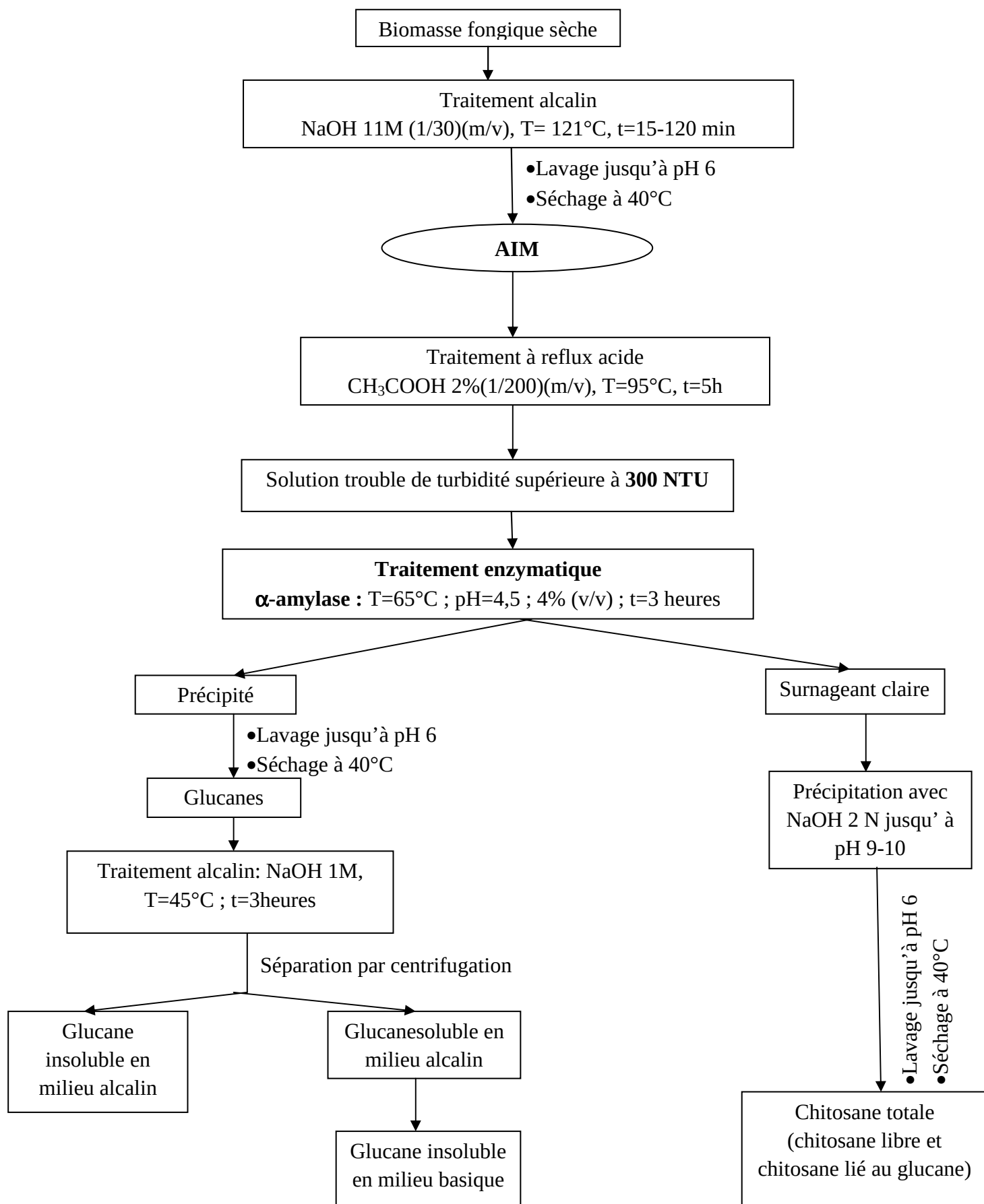


Figure9: Schéma générale du procédé d'extraction du chitosane total (Nwe et Stevens, 2002a)

II.4-Facteurs influents sur la qualité et la quantité du chitosane fongique

Le rendement de chitosane issu de la biomasse fongique dépend largement de plusieurs facteurs, telles que la souche de champignons utilisés, les méthodes de culture et les paramètres du procédé, tels que le pH, la température, la vitesse de mélange, le temps d'incubation, la taille des particules et le bouillon rhéologique. Une augmentation du rendement de chitosane peut être obtenue soit par l'augmentation du rendement de la biomasse ou par une augmentation de la teneur de la paroi cellulaire en chitosane (Jaworska and Konieczna, 2001).

Le protocole d'extraction est un facteur vital qui affecte les propriétés physico-chimiques du chitosane tel que le poids moléculaire, le degré de désacétylation DDA et la cristallinité, ainsi que la viscosité qui dépend directement du poids moléculaire, donc il doit être soigneusement sélectionné en fonction de l'application souhaitée du chitosane (Billmeyer, 1971). La concentration de l'acide et de la base utilisés dans le processus d'extraction, la température, la durée d'incubation et la taille des particules sont les principaux facteurs influents sur les propriétés physico-chimiques du chitosane. Cependant, la maîtrise de ceux-ci suit le contrôle de la composition du milieu de croissance ainsi que les paramètres du procédé d'extraction utilisé.

II.4.1-Traitement alcalin

La concentration de la base utilisée lors du traitement alcalin influe significativement sur le DDA. Kannan et al (2010) ont montré qu'une augmentation de la concentration de la solution alcaline a provoqué une augmentation de DDA.

II.4.2- Traitement acide

La nature de l'acide utilisé peut affecter le rendement final du chitosane. Le meilleur rendement du chitosane est obtenu par l'utilisation de l'acide formique à la place de l'acide acétique (Kannan et al, 2010). Les auteurs ont, également observé que, les effets et les interactions des acides ayant les mêmes concentrations pour un même temps d'incubation sont différents : le degré de désacétylation (DDA) du chitosane solubilisé par l'acide chlorhydrique est plus important que celui du chitosane solubilisé par l'acide acétique et l'acide formique. L'acide chlorhydrique est le plus fort parmi eux, ce qui lui a permis de provoquer une forte hydrolyse du groupement acétyle ainsi que la partie intérieure de l'assemblage monomérique du chitosane.

L'augmentation de la concentration des différents acides utilisés a provoqué une augmentation significative de degré de désacétylation. L'aspect du produit final dépend à son tour des conditions de traitement. Ainsi, les conditions douces ont donné un chitosane de couleur claire tandis que l'élévation de la concentration des acides a donné un chitosane ayant une couleur sombre.

II.4.3-Température et Temps d'incubation

Pour tenir compte des interactions effectives entre la base et les constituants de la paroi cellulaire fongique, l'augmentation de la température et des temps d'incubation est nécessaire. On outre, un long temps d'incubation assure pour la base le temps de réaction nécessaire pour attaquer la structure de la chitine et celle du chitosane et les séparer en d'autres polysaccharides. Kannan et al (2010) ont atteint un rendement maximal à une température de 121°C après 30 min de temps d'incubation. Le degré de désacétylation est aussi accru lorsque le temps d'incubation et la température sont élevés (Kannan et al, 2010).

II.4.4-Taille des particules

La taille des particules et la densité de la chitine affectent le degré de désacétylation DDA du chitosane en modifiant le taux de pénétration de la solution alcaline (nécessaire pour l'hydrolyse de la chitine en chitosane) à l'intérieur des zones amorphes, ainsi qu'à l'intérieur des zones cristallines de la chitine. Donc le degré de désacétylation DDA du chitosane augmente lorsque la taille des particules et la densité de la chitine augmente et il décroît lorsque ces deux derniers diminuent (Kannan et al, 2010).

II.5- Caractéristiques du chitosane fongique

La chitine et le chitosane fongiques sont, potentiellement différents de ceux qui sont isolés des crustacés : dans le poids moléculaire, le degré de désacétylation (DDA) et la distribution des groupements chargés. Toutefois, la recherche a besoin d'évaluer le procédé le plus économique qui permet d'extraire le chitosane à partir d'une source fongique.

II.5.1-Solubilité

En général, la solubilité du chitosane dépend non seulement de la valeur moyenne de DD, mais aussi de la distribution des groupements acétyles le long de la chaîne macromoléculaire, et également de son poids moléculaire (Rinaudo et Domard, 1989 ; Abida,

1991 ; Kubota et Eguchi, 1997). L'examen de l'influence de la protonation du chitosane en présence de l'acide acétique et l'acide chlorhydrique (Rinaudo et al, 1999) sur la solubilité a montré que le degré d'ionisation dépend du pH et pK de l'acide. La solubilisation du chitosane ayant un faible degré de désacétylation a lieu pour un degré d'ionisation $\alpha=0,5$ du chitosane, cette valeur correspond à pH=4,5-5 dans l'acide chlorhydrique. La solubilité du chitosane diminue lorsque la valeur de DDA diminue (Tableau 4) (Thanou et Junginger, 2005), et elle augmente lorsque la masse molaire diminue (Grabovac et al, 2005).

Tableau 4: Variation de la solubilité du chitosane en fonction de DDA à pH =6 (Thanou et Junginger, 2005)

Degré de désacétylation DDA(%)	Solubilité du chitosane
>75	Parfaite
=50	Moyenne
< 40	Faible

La solubilité du chitosane est habituellement testée dans l'acide acétique, et ce par la solubilisation du chitosane dans une solution aqueuse d'acide acétique 1% ou 0,1M, la concentration des protons est au moins égale à la concentration des unités $-NH_2$ qui sont impliquées (Rinaudo, 2006). Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, plus la solubilité du chitosane est accrue. Le chitosane est, en effet, insoluble dans l'eau et dans les solutions alcalines concentrées ou diluées, ainsi que dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau (Kurita, 2006).

II.5.2-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 de DDA, de PM, mais aussi du pH (Pa et Yu, 2001), plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte. La viscosité augmente également avec le DDA, car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion de groupements amine libres est importante, plus il est soluble et par voie de conséquence sa viscosité est plus importante (Wang et Xu, 1994). La viscosité dépend aussi de la concentration et de la température; comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente (Chen et Tsail, 1998), et elle est fonction de la PM des chaînes macromoléculaires (Berth et al, 1998).

Plusieurs méthodes ont été développées pour la détermination de la viscosité. La viscosimétrie est la méthode la plus employée, elle repose sur la connaissance des paramètres de la relation de Mark-Houwink :

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

$[\eta]$: la viscosité intrinsèque

M : le poids moléculaire moyen du polymère en (g)

K et a : paramètres qui dépend du système polymère-solvant à une température donnée en (ml /g)

II.5.3-Degré de désacétylation DDA

Le degré de désacétylation représente le taux de groupements acétylés par rapport aux groupements non acétylés (Zohuriaan-Mehr, 2005). C'est un paramètre extrêmement important car il influence non seulement les caractéristiques physique et chimique du chitosane telle que la solubilité, la flexibilité des chaînes macromoléculaires, la conformation du polymère, et donc la viscosité des solutions, mais aussi sur la biodégradation et l'activité immunologique de celui-ci. Diverses méthodes ont été développées afin de déterminer le degré de désacétylation DDA telle que la spectroscopie Infra Rouge (Brugnerotto et al, 2001 ; Miya et al, 1980 ; Domszy et Roberts, 1985), la spectroscopie UV, la résonance magnétique nucléaire RMN, la titration colloïdale et la titration potentiométrique (Xuan Jiang, 2003). La méthode la plus simple est celle proposée par Khan et al (2000), et qui repose sur la spectroscopie infra rouge, ainsi le DDA est déterminé en utilisant la relation suivante :

$$DDA\% = \left[100 - 100 \times \left(\frac{A_{CO}/A_{OH}}{1,33} \right) \right]$$

A_{CO} et A_{OH} représentent l'absorbance du groupement carbonyle de l'amide I et l'absorbance du groupement hydroxyle qui est stable dans la structure de la chitine et du chitosane, et qui n'est pas affecté par l'hydrolyse de la chitine en chitosane. Le facteur 1,33 représente le rapport (A_{CO} / A_{OH}) pour un chitosane entièrement désacétylé.

Le chitosane issu des champignons a un degré de désacétylation de 70 à 90% et un poids moléculaire moyen de $1 \text{ à } 2.10^5$ Da. Ces paramètres dépendent fortement de l'espèce

fongique utilisée et des conditions de traitement appliqué sur cette dernière au cours du processus d'extraction du chitosane (Ivshina et al, 2009).

II.5.4-Cristallinité

Le chitosane est une substance semi-cristalline, il se cristallise dans le système orthorhombique. Samuels (1981) a proposé deux formes de chitosane avec deux types de cristallinité, le type I correspond à une famille ayant DDA=60% et qui se présente sous forme de sels du chitosane et il est plus désordonné que le type II qui possède un fort DDA (90% environ), il se trouve sous forme d'une amine libre.

II.5.5-Poids moléculaire PM

La valeur du poids moléculaire d'un chitosane dépend fortement du procédé de fabrication car celui-ci peut induire unedépolymérisation des chaînes macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production. Leschaînes de chitosane ont des poids très variés, entre 1 et 2.10^5 Da selon les applications visées (Ivshina et al,2009). LePM affecte la solubilité du chitosane et ses propriétés rhéologiques notamment saviscosité. Ainsi, en augmentant le poids moléculaire du chitosane, on augmente sa viscosité et ondinue sa solubilité. Il peut aussi influencer significativement sur les propriétés du polymère ensolution, comme le paramètre DDA(Chen et Zhao, 2012).

II.6- Les applications du chitosane fongique

II.6.1- Dans la conservation des aliments

Les études ont montré que le chitosane possède une forte activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif et Gram négatif, incluant les agents pathogènes alimentaire telle que *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, et *Listeriamonocytogenes*(Hadwiger et al,1986 ; No et al, 2002).Deux théories ont été proposée pour expliquer le mécanisme de l'activité antimicrobienne du chitosane,selon la première l'interaction entre les molécules du chitosane chargés positivement et la membrane cellulaire microbienne chargé négativement abouti à la perturbation de la membrane cytoplasmique,et par la suite à la perte des constituants intracellulaire (Sudharshan et al,1992). Selon la deuxième théorie, les oligosccharides de chitosane pénètrent facilement dans le noyau de la cellule eucaryote et interfère avec la transcription de l'ARN et la synthèse des protéines (Hadwiger et al,1986).

II.6.2- Pour stimuler l'immunité des plantes

Dans l'agriculture, le chitosane a été utilisé dans les graines, les feuilles, les fruits et légumes, celui-ci a montré l'aptitude d'agir comme agent puissant pour stimuler la défense des plantes et inhiber la croissance des agents pathogènes (champignons et bactéries) (Shibuya et Mimami, 2001). Le chitosane réduit significativement les quantités de polygalacturonases produites par *Botrytis cinerea* qui provoque des dégradations cytologiques sur les hyphes du poivre (Glaouth et al, 1997). Il induit, également, la synthèse de phytoalexins sur les feuilles de riz, ce dernier est un antiparasite puissant qui provoque l'inhibition de la croissance fongique (Agrawal et al, 2002). Selon Ben-Shalom (2003), la croissance de *Botrytis cinerea* chez le concombre pulvérisé par le chitosane avant son inoculation est inhibée par l'augmentation de l'activité de chitosanase et peroxidase.

II.6.3- Dans l'ingénierie tissulaire

Le chitosane est un polymère bioadhésif et biologiquement actif, il possède des effets antigéniques et des activités antimicrobiennes et hémostatiques. Le chitosane est également biocompatible, biodégradable, non toxique et peut accélérer la régénération tissulaire et la cicatrisation des blessures (Onishi et al, 1994; Tokura et al, 1994; Maslova et Krasavtsev, 1998; Shigemasa et al, 1998; Kim et al, 2001; Vandevord et al, 2002; cités dans Nweet Stevens, 2008 et 2008a).

II.6.4- Dans la dépollution

Le chitosane fongique peut participer à l'élimination des métaux lourds toxiques qui sont considérés comme un véritable danger pour les espèces animales et végétales, et ce grâce aux groupements amine et hydroxyle situés à la surface et constitue des sites d'adsorption de ce genre de polluants persistants (Kleekayai et Suntornsuk, 2011). Le chitosane isolé de *M. indicus* est utilisé pour l'élimination des ions Cu^{2+} d'une solution aqueuse et comparé au chitosane des crustacés. La biosorption du chitosane fongique s'est avérée plus rapide que celle du chitosane issu des crustacés, cela est due au fait que le poids moléculaire du chitosane fongique est plus faible que celui du chitosane des crustacés. Donc après la saturation des groupements amines situés à la surface de celui-ci jouant le rôle de site de coordination pour les ions Cu^{2+} , ces derniers vont pénétrer facilement et rapidement à l'intérieur du chitosane fongique (Lo et al, 1999).

Chapitre III : matériels et méthodes

III.1. Matériel

Le matériel d'étude est constitué de matériel mycologique, de produits chimiques et d'appareillages utilisés au cours de l'expérimentation.

III.1.1. Petit matériel

- Verrerie de laboratoire : fioles jaugées (de 100, 1000 et 500 ml), entonnoir, béchers, burette, pipette de 10 ml, Mortier en céramique, ballon de 250 ml, verres de montre
- Thermomètre
- Papier pH
- Tamis de diamètres 500 et 850 μm

III.1.2. Matériel mycologique

- Spores lyophilisées de *Penicillium camemberti*

III.1.3. Appareillage

- Spectrophotomètre Infrarouge ATR, de marque BRUKER modèle TENSOR 27
- Balance de précision, de marque OHAUS, modèle Pioneer TM
- Centrifugeuse de marque EBA 20
- Étuve
- pH mètre, de marque OHAUS instrument (type : pH 211)
- Microscope électronique à Balayage

III.1.4. Solutions et réactifs utilisés

- Hydroxyde de sodium (NaOH) sous forme de pastilles (BICHEM Chemopharma) avec une teneur en $\text{Na}_2\text{CO}_3 < 2\%$ et (Sigma Aldrich) ayant une teneur en $\text{Na}_2\text{CO}_3 < 0.5\%$ et DP $> 96\%$
- Acide acétique (CH_3COOH) 100% (AnalaR NORMAPUR)

III.2- Méthodes

III.2.1- Préparation de la biomasse de *Penicillium camemberti* (Pc):

III.2.1.1- Préparation de l'inoculum

La préparation du milieu PDA est faite dans un flacon de 500 ml, et selon le mode opératoire suivant :

1. Peser 10 g d'agar et 10 g de glucose.
2. Verser les 10g d'agar et de glucose dans un flacon de 500 ml.
3. Préparer l'extrait de pomme de terre :

- 3.1. Prendre un ou deux pomme de terre, et les éplucher.
- 3.2. Peser 100 g, et les découper en dés puis les faire bouillir dans 100ml d'eau distillée pendant 15 min.
- 3.3. Filtrer la pomme de terre à l'aide d'un tissu.
- 3.4. Récupérer le filtrat dans le flacon contenant le glucose et l'agar, puis ajuster jusqu'à 500 ml.
- 3.5. Placer le flacon dans l'autoclave pendant 20 min à $T=120^{\circ}\text{C}$.

20 ml du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) sont coulées dans 1 boite de pétri de 90 mm de diamètre. 10 boites ont été préparées, ensuite ensemencées par des spores lyophilisées de champignon *Penicillium camemberti* (*Pc*) puis incubées à température ambiante ($20-22^{\circ}\text{C}$) jusqu'à une bonne sporulation. 100 ml du milieu YPG ont été préparés, puis coulées dans les 10 boites précédentes. Par simple agitation, on effectue un prélèvement en surface des spores activées.

III.2.1.2- Préparation du milieu solide

La préparation du milieu nutritif est faite dans des flacons de 1L. La composition du milieu nécessite de l'eau distillé, 5g d'extrait de levure, 10g de peptone, 20g de glucose, les phosphates (3,4g de KH_2PO_4 et 3,07g de NaH_2PO_4), 50 ml d'Oglio éléments (solution de Trinci) et 20g d'agar ; le pH est ajusté à 5. Un litre de la solution de Trinci contient : 15g de EDTA di Na, $2\text{H}_2\text{O}$; 5ml de NaOH (10M) ; 5g de MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$; 1,3g de CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$; 0,4g de ZnSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g de MnSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$; 0,1g de CuSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$; 2,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, $6\text{H}_2\text{O}$; 0,073g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, $6\text{H}_2\text{O}$ et 1 litre d'eau distillée.

Le mélange est réparti dans des flacons de 180 ml et placé dans un bain marie, la solution est chauffée progressivement jusqu'à la formation d'un gel homogène. Après stérilisation à 120°C pendant 20 min, on laisse refroidir, ensuite le milieu est réparti dans des boites de pétri à raison de 20 ml /boite.

III.2.1.3-Inoculation et incubation du milieu solide

Après solidification, la suspension de spores activées de *P.camemberti* est ensemencée sur 100 boites de pétri de 90 mm de diamètres, ces dernières sont incubées à différentes températures 20°C , 25°C et 28°C pendant 6 jours.

III.2.1.4- Récupération de la biomasse de *Penicillium camemberti*

Après la période d'incubation désiré, la biomasse humide a été récupérée, séchée à l'air libre jusqu'au poids constant puis pesée et broyée en particules de différents diamètres.



Figure 10: Broyage de la biomasse sèche

III.2.2- Extraction des biopolymères

III.2.2.1- Extraction de la chitine et du chitosane libre

L'extraction du chitosane libre est effectuée selon la méthode modifiée de Rane et Hoover (1993), et Crestini et al (1996) présentée dans la figure 11.

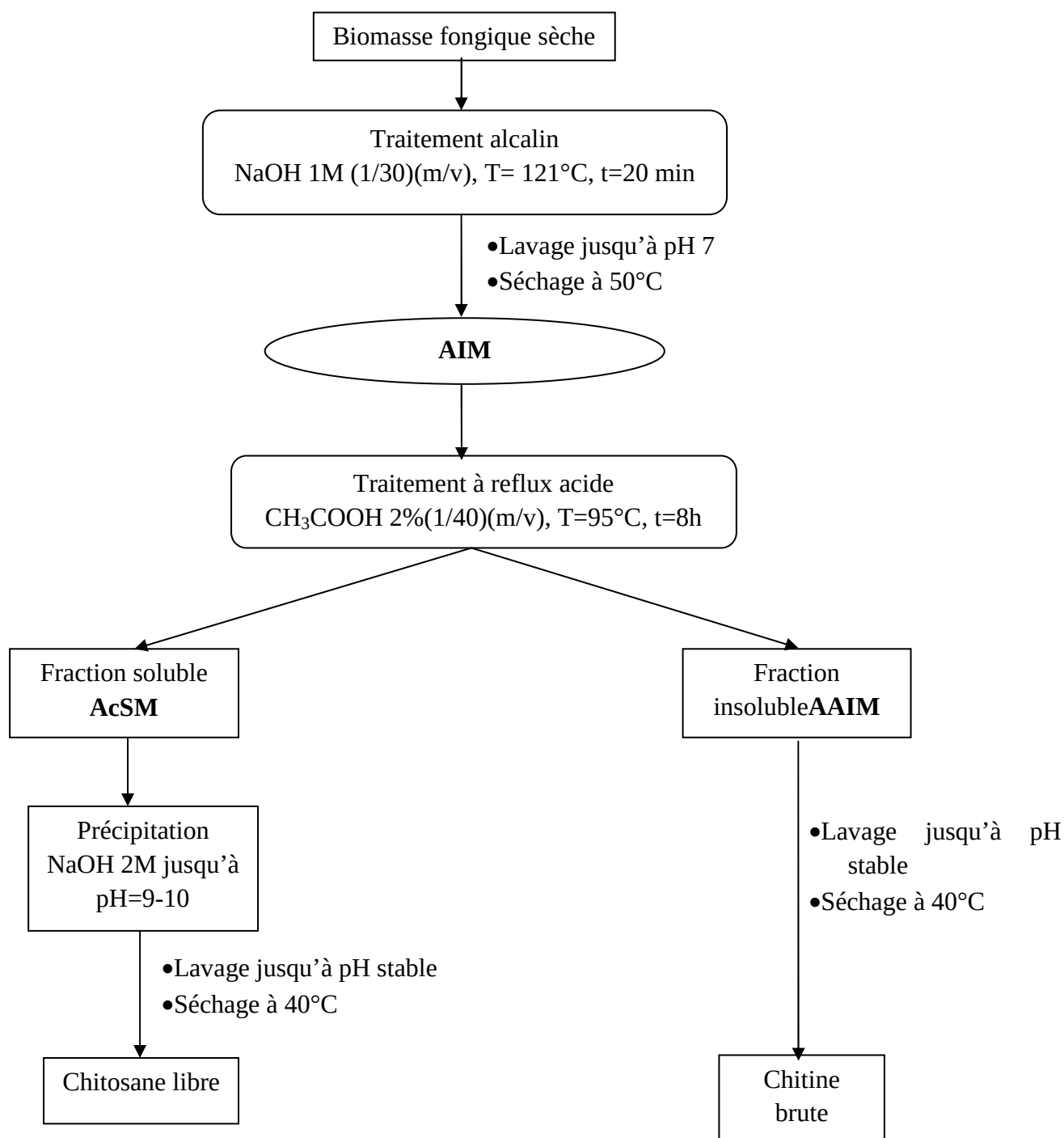


Figure 11: Schéma du procédé adopté pour l'extraction du chitosane libre (Rane et Hoover, 1993 ; Crestini et al, 1996)

1. Pour chaque échantillon, on a utilisé les fractions de biomasse ayant le plus faible diamètre ($D < 850 \mu\text{m}$).
2. Nous avons mélangé 15g de biomasse de chaque température avec 450ml d'une solution d'hydroxyde de sodium NaOH 1M dans un rapport (1/30) (masse /volume) (Rane et

Hoover,1993 ;Crestini et al, 1996) .Le mélange est laissé dans l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

3. On a récupéré la fraction insoluble dans NaOH 1M (symbolisée AIM) de chaque biomasse traité par centrifugation à une vitesse de 12000tr/min pendant 15 min.
4. Les fractions AIM sont ensuite lavées avec environ 4 litres d'eau distillée jusqu'à pH stable.
5. Les fractions AIM sont séchées à l'étuve à 50°C pendant environ 24 heures. A la fin, les matériaux sont pesés et broyés à l'aide d'un mortier en céramique.
6. Nous avons mélangé 2g de chaque AIM sèche avec 80ml de la solution d'acide acétique 2% (v/v), ce mélange est chauffé à 95°C pendant 8h dans un ballon de 250 ml muni d'un réfrigérant (Figure 11). La fraction insoluble dans l'acide acétique (AAIM) de chaque échantillon est extraite par centrifugation à une vitesse de 12000tr/min pendant 15 min, puis lavé à l'eau distillée (1 Litre environ pour chaque AAIM) jusqu'à atteindre un pH 6 et laissée séchée à l'étuve à 40°C pendant 48h .Le pH du surnageant est ajusté jusqu'à 10 en utilisant la solution d'Hydroxyde de Sodium NaOH 2M, le précipité est lavé avec environ 420ml d'eau distillée jusqu'à ce que le pH des eaux de lavage soit égal à 6. En fin, le précipité obtenu est stocké dans des petits béchers et laissé sécher à l'étuve à 40°C pendant 48h.



Figure 12: Montage de la réaction de solubilisation du chitosane dans l'acide acétique 2% à 95°C pendant 8heures

III.2.2.2-Extraction du chitosane total (chitosane libre et chitosane lié au glucane)

La méthode adoptée dans ce cas pour l'extraction du chitosane total y compris le chitosane libre et le chitosane lié au glucane est celle proposée par Nwe et Stevens en 2002 pour les champignons appartenant à la classe des zygomycètes (Figure 13).

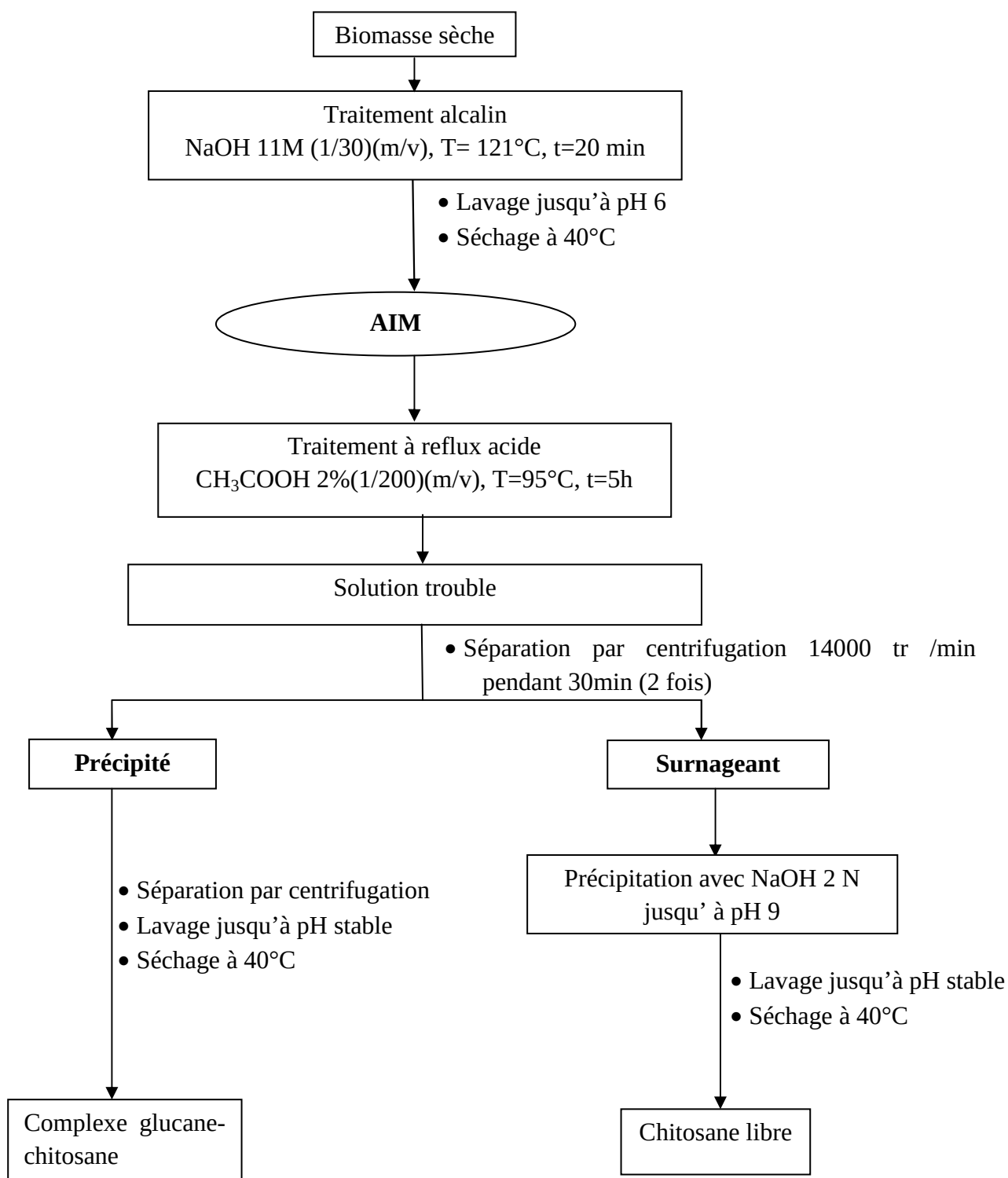


Figure 13: Schéma du procédé d'extraction du chitosane total (chitosan libre et chitosane lié au glucane (Nwe et Stevens, 2002)

1. Pour chaque échantillon, on a utilisé les fractions de biomasse ayant le plus faible diamètre ($D < 850 \mu\text{m}$)
2. Nous avons mélangé 5g de biomasse de chaque température avec 150 ml d'une solution d'Hydroxyde de Sodium NaOH 11M. Le mélange est laissé dans l'autoclave à 120°C pendant 20 min.
3. On a récupéré la fraction insoluble dans NaOH 11M (la AIM) de chaque échantillon de biomasse par centrifugation à une vitesse de 12000tr/min pendant 15 min
4. Les AIM obtenues sont lavées à l'eau distillée (3Litres) jusqu'à ce que le pH des eaux de lavage atteigne la valeur 6, elles sont ensuite laissées sécher à l'étuve à 40°C pendant environ 3jours, et enfin broyées et pesées.
5. Nous avons mélangé 0,3g de chaque AIM sèche avec 60ml de la solution d'acide acétique 2% (v/v), ce mélange est chauffé à 95°C pendant 5h dans un ballon de 250 ml muni d'un réfrigérant. Les constituants de la solution turbide obtenue (de turbidité supérieure à 800 NTU) sont séparés par centrifugation avec une vitesse de 14000 tr/min pendant 30 min. On a obtenu un surnageant clair et un précipité de couleur marron, ces deux derniers sont séparés par centrifugation à une vitesse de 14000 tr/min pendant 30 min, et ils sont lavés et séchés à l'étuve à 40°C .

III.2. 3- Caractérisation

III.2.3.1-Détermination de la granulométrie

Pour séparer les particules présentes dans chaque échantillon suivant leurs granulométries, nous avons fait passer les biomasses de $T20^\circ\text{C}$, $T25^\circ\text{C}$ et $T28^\circ\text{C}$ à travers deux tamis ayant des pores 850 et $500 \mu\text{m}$ de diamètre, et nous avons pesé la masse de chaque fraction récupérée dans chaque tamis.

III.2.3.2- Mesure de la matière sèche

La méthode consiste à faire sécher 2g du mycélium introduit dans un creuset préalablement séché et pesé dans une étuve à 105°C pendant 5h (Iso 287) , les résultats sont exprimés en pourcentage (%), et Ils sont calculés par la formule suivante (Afnor, 1986) :

$$M_s = \left(\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \right)$$

M_0 : masse en gramme du creuset vide.

M_1 : masse en gramme du creuset contenant l'échantillon avant séchage ;

M_2 :est la masse gramme du creuset contenant l'échantillon après séchage.

III.2.3.3- Détermination de taux de cendres

Les cendres sont déterminées par incinération. La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche (à 105°C pendant 5h) est suivie par une calcination au four à moufle à 550°C pendant 5h, les cendres exprimées en pourcentage de masse sont données par la formule (Audigié et al, 1984).

$$\text{Taux de cendre} = \frac{(M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} \times 100$$

M_0 : est la masse (g) du creuset vide

M_1 : est la masse (g) du creuset contenant l'échantillon avant incinération

M_2 : est la masse (g) du creuset contenant l'échantillon après incinération

III.2.3.4- Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH est déterminé par la mesure du pH d'une suspension de la biomasse dans l'eau distillé à un rapport de 1/10 (masse/volume) après 3 heures à l'aide d'un pH mètre de type HANNA.

III.2.3.5- Spectroscopie Infra Rouge ATR

La spectroscopie IR constitue une méthode de choix pour déterminer la structure des biomasses T20°C, T25°C et T28°C, elle permet également de suivre l'influence des traitements appliqués durant le processus d'extraction des biopolymères, par la mise en évidence de l'apparition ou la disparition de certaines bandes de façon significative.

Les spectres IR sont enregistrés avec un spectromètre ATR de marque BRUKER modèle TENSOR 27 en effectuant un balayage de 500-4000 cm^{-1} et en utilisant les biomasses T20°C, T25°C et T28°C les AIM issus du traitement alcalin (NaOH 1M et 11M) les AAIM résultant du traitement acide des AIM (obtenues par traitement NaOH 1M) et le produit final obtenue des biomasses T20°C et T28°C.

Les spectres des AIM issues du traitement avec NaOH 11M ainsi que les spectres des produits obtenus à la fin du processus d'extraction sont comparés au spectre du chitosane commerciale, tandis que les spectres des AAIM sont comparés au spectre de la chitine commerciale.

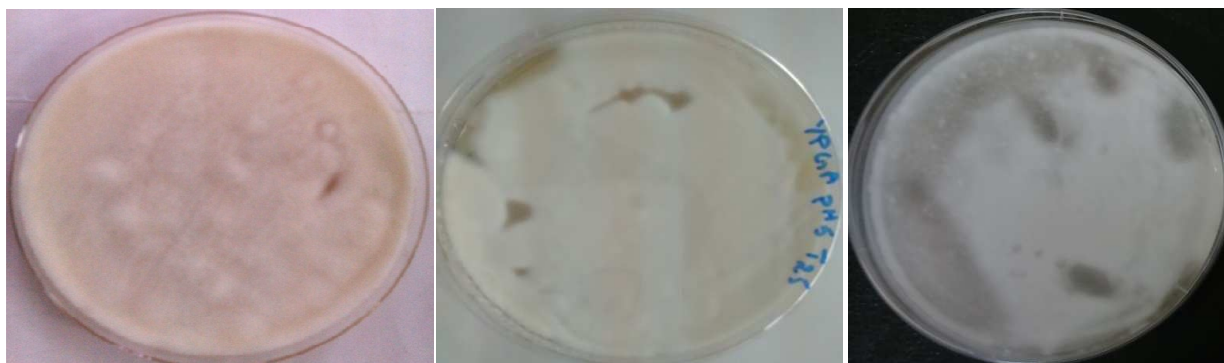
III.2.3.6- Détermination de la morphologie par Microscope Electronique à Balayage MEB

Nous avons procédé à l'observation de la morphologie des biomasses T20°C, T25°C et T28°C, la morphologie des AIM des AAIM ainsi que celle des biopolymères sous différentes échelles (entre 1mm et 5µm) afin de détecter les changements au niveau de la surface après chaque traitement.

Chapitre IV : résultats et discussion

IV.1-Développement du mycélium de *Penicillium camemberti*

Pour chaque température (20°C, 25°C et 28°C) et sur l'ensemble des 100 boîtes de pétri, un développement uniforme et homogène a été observé. Dans la figure 14, une illustration de la croissance du mycélium de *Penicillium camemberti* est donnée pour 01 échantillon



représentatif.

Le recouvrement total de la surface de la boîte de pétri est plus marqué lorsque *P.camemberti* est développée à 20°C et à 25°C, tandis qu'à 28°C, on a remarqué que le recouvrement de la surface est faible et non homogène. Selon Choisy et ses collaborateurs (1984), la (a) température optimale de croissance (b) la moisissure *P.camemberti* (c) tuée entre

Figure 14: Production du mycélium de *Penicillium camemberti* sur milieu YPGA après 6 jours d'incubation et à différentes températures : (a) T 20°C ; (b) T 25°C ; (c) T 28°C

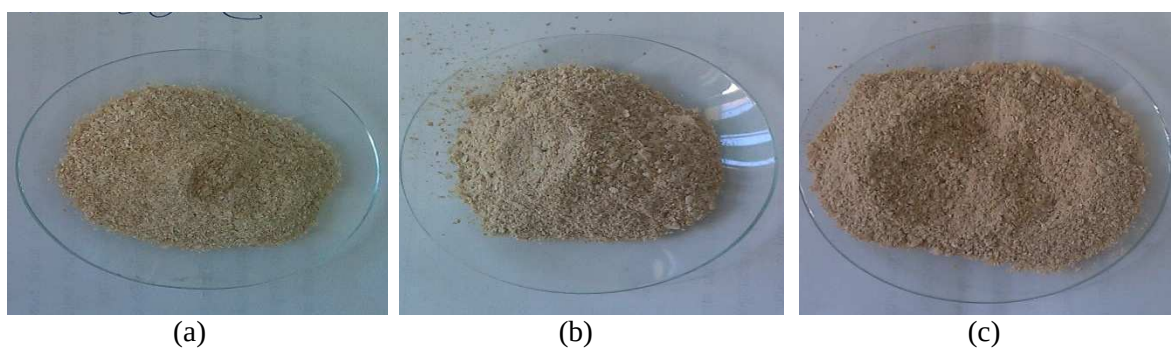
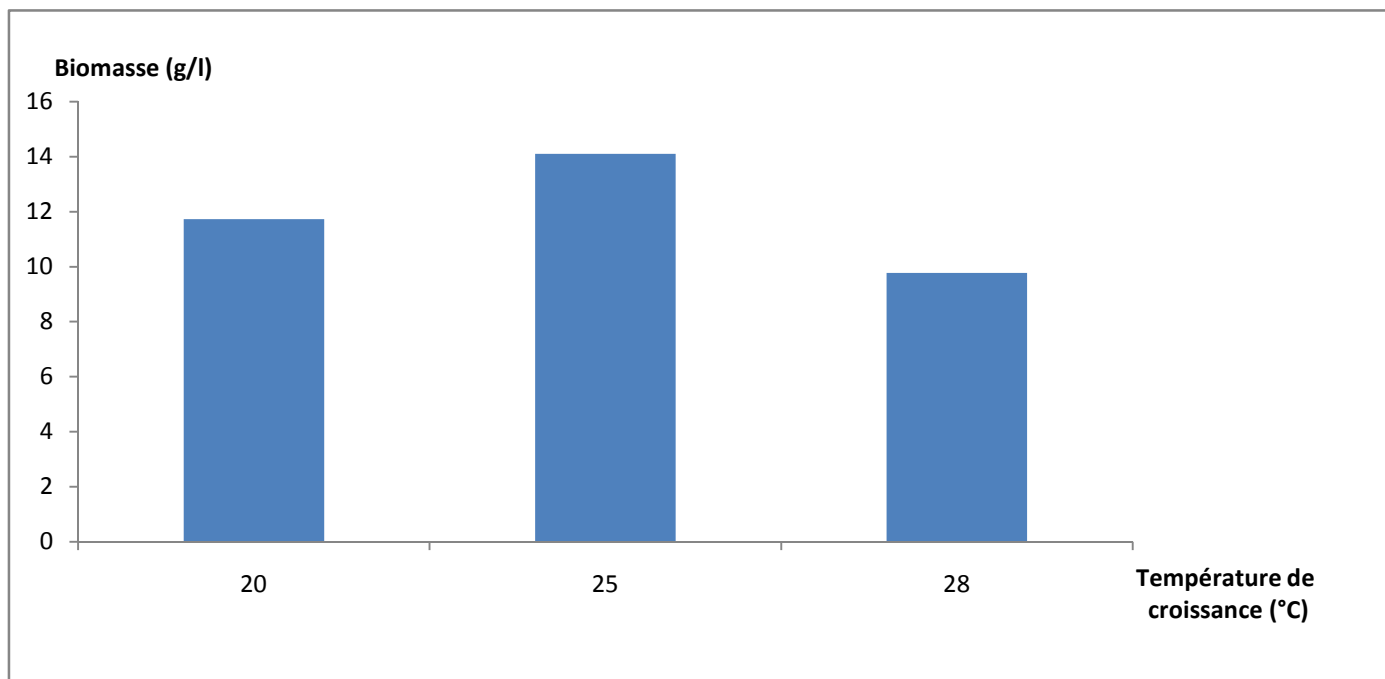
IV.2- Récupération des biomasses de *P.camemberti* à différentes températures de croissance

Les biomasses ont été séparées du milieu gélosé, lavées à l'eau distillée, séchées, pesées puis broyées (Figure 15). Les masses obtenues ainsi que leur concentration sont présentées dans le tableau 5. Le mycélium de *Penicillium camemberti* développé à température de 25°C a donné la plus grande quantité de biomasse (28,21g) comparée à ceux qui se sont développés à 20°C et à 28°C (23,46 g et 19,54 g, respectivement) (Figure 16).

Tableau 5: Les biomasses récupérées à différentes températures d'incubation

	Température d'incubation (°C)		
	20	25	28
Biomasse totale* sèche en (g)	23,46	28,21	19,54

* : volume nutritionnel : 2l

**Figure 15:** Des échantillons de biomasses obtenues après broyage : (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C

IV.3. Caractérisation physico-chimique des biomasses sèches

Les caractéristiques physico-chimiques des trois biomasses cultivées à différentes températures $T_{20^{\circ}\text{C}}$, $T_{25^{\circ}\text{C}}$ et $T_{28^{\circ}\text{C}}$ sont données dans le tableau 6. Un exemple des trois fractions de différents diamètres obtenus après l'analyse granulométrique de la biomasse $T_{25^{\circ}\text{C}}$ est illustré dans la figure 17.

Tableau 6: Granulométries et caractères physico-chimiques des biomasses cultivées à différentes températures

Granulométrie (μm)	Masses en gramme des particules retenues dans les tamis ayant des pores de diamètre D (μm) pour chaque biomasse cultivée à T ($^{\circ}\text{C}$)		
	$T_{20^{\circ}\text{C}}$	$T_{25^{\circ}\text{C}}$	$T_{28^{\circ}\text{C}}$
$D > 850$	1,05	3,37	1,47
$500 < D < 850$	8,49	8,39	8,51
$D < 500$	13,81	16,26	9,43
Paramètres physico-chimique			
pH^*	6,66	7,03	6,90
Matière sèche* (%)	88,71	89,15	87,19
Taux de cendres* (%)	3,49	5,67	1,2
Coloration	Verdâtre	Verdâtre	Verdâtre

* : Calculé à partir de la biomasse totale.

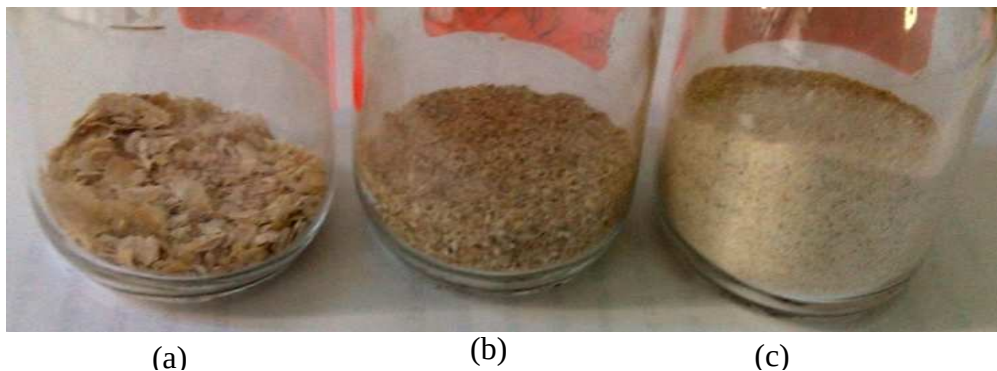


Figure 17: Les trois fractions obtenues après l'analyse granulométrique de la biomasse à $T_{25^{\circ}\text{C}}$: (a) $D > 850 \mu\text{m}$; (b) $500 < D < 850 \mu\text{m}$; (c) $D < 500 \mu\text{m}$

- Les trois biomasses sont caractérisées par une structure fine. D'après l'analyse granulométrique, on constate que la fraction ayant un diamètre inférieur à $850 \mu\text{m}$ est la

plus dominante pour chaque biomasse, tandis que la masse de la fraction de diamètre supérieur à 850 μm est faible.

- Les biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C possèdent un pH de l'ordre de 6,66 ; 7,03 et 6,90 respectivement. D'après la classe des pH, nos échantillons sont neutres.
- La détermination de la matière sèche (MS), qui nous renseigne sur la quantité totale de la matière organique susceptible d'être exploitée, constitue 89,15% ; 87,51 % et 88,71% du poids sec des biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C, respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celle trouvées par Bizet et ses collaborateurs (1997) pour le champignon *P.camemberti*. Cette différence est due certainement aux conditions de croissance telle que la température et la nature du substrat nécessaire à la croissance du microorganisme.
- L'examen du tableau 6 indique que les biomasses cultivées à différentes températures T20°C, T25°C et T28°C renferment des quantités faibles en minéraux qui sont de l'ordre 3,49% ; 5,67% et 1,2%, respectivement. D'une part, on peut dire que ces résultats sont compatibles avec ceux trouvés par Bizet et ses collaborateurs (1997) pour le champignon *P.camemberti* (soit environ $4,5 \pm 0,3$) avec une légère différence qui est due aux conditions de culture (nature du substrat et température d'incubation). D'autre part, ils confirment que l'étape de déminéralisation n'est pas nécessaire durant le procédé d'extraction du chitosane à partir du mycélium de *Penicillium camemberti*.

IV.4.Détermination de la morphologie des biomasses spectroscopie ATR et MEB

Ces analyses ont été faites pour les biomasses de granulométrie $D < 850 \mu\text{m}$ (Tableau 6). Les figures 18(a) ; 19(a) et 20(a) représentent les spectres ATR des biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C respectivement. On note la présence des bandes d'absorption de la chitine, du glucane, des protéines et des lipides. L'examen de ces spectres fait apparaître des bandes d'absorptions caractéristiques regroupées dans le tableau 7.

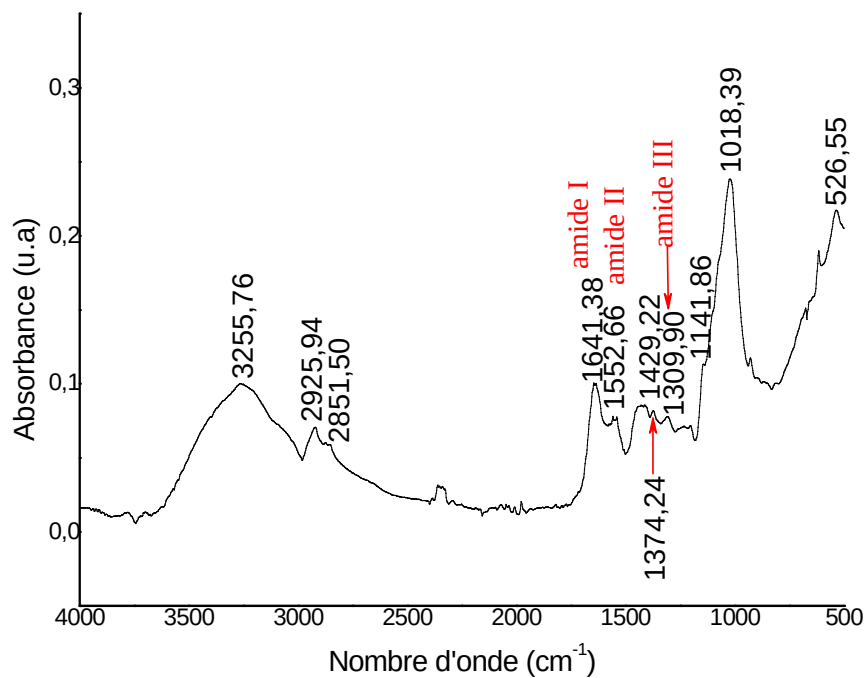
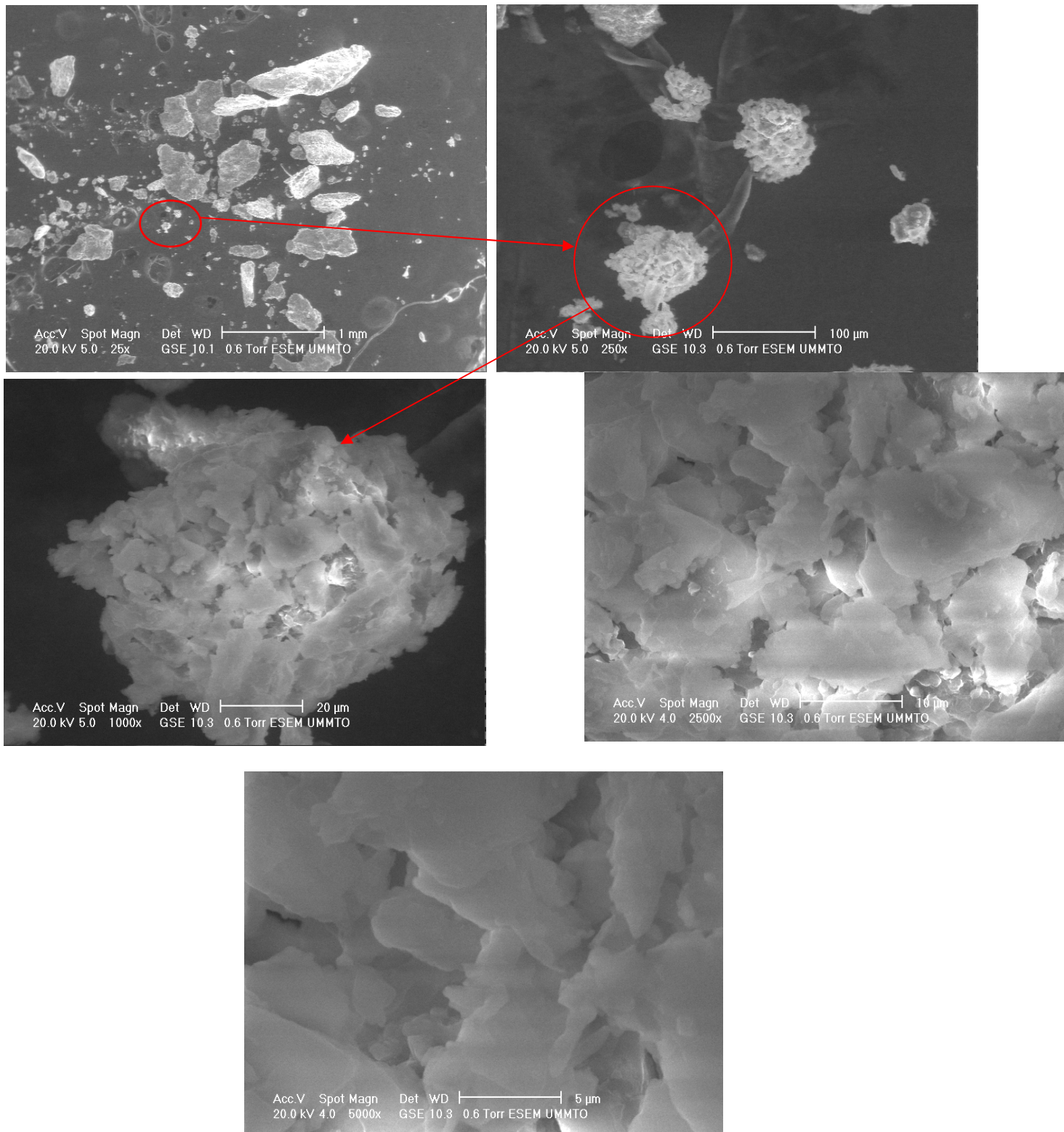


Figure 18 (a) : Spectre ATR de la biomasse cultivée à T20°C.

**Figure 18 (b) :** Micrographie MEB de la biom

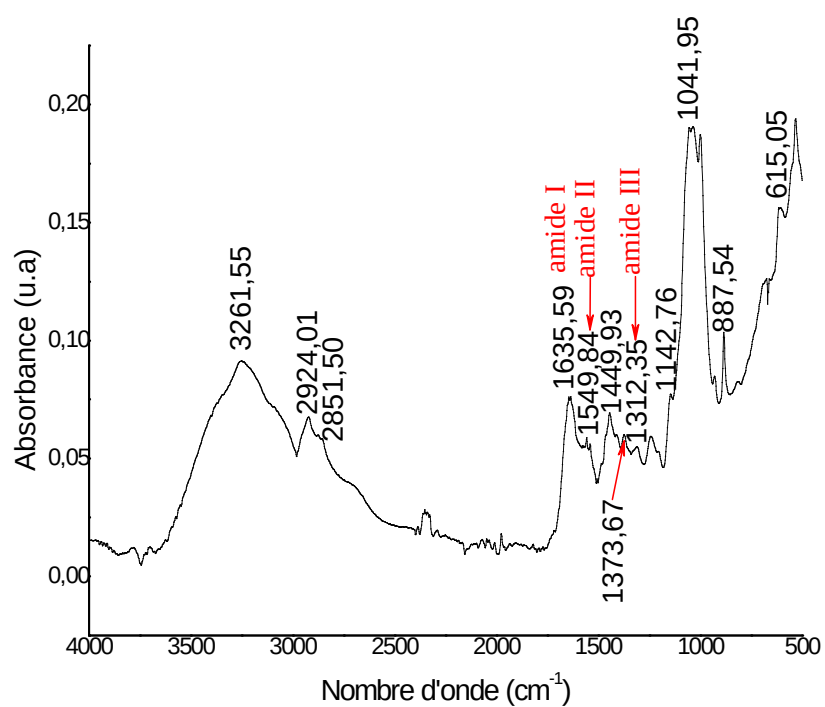


Figure 19 (a) : Spectre ATR de la biomasse cultivée à T25°C.

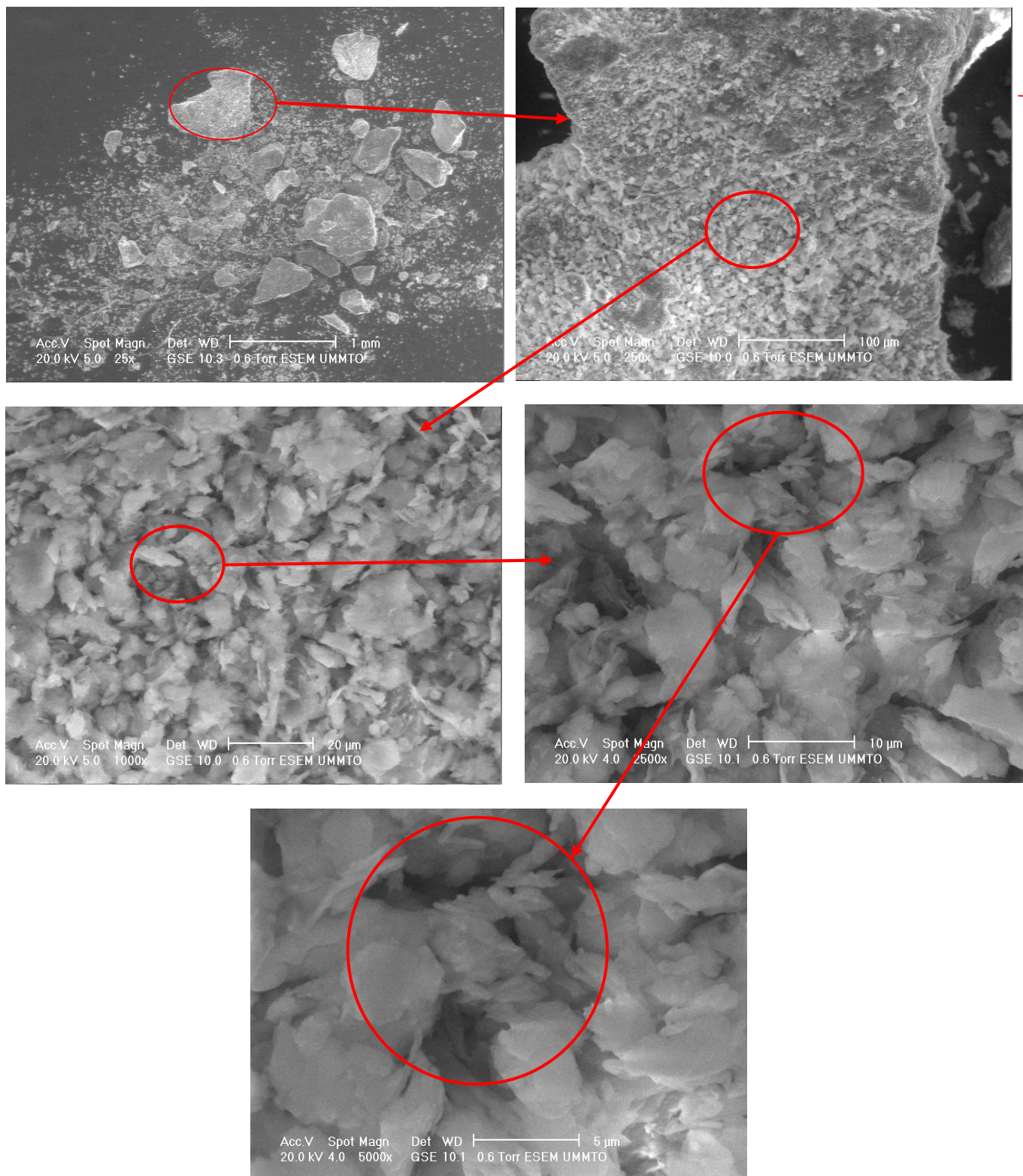


Figure 19 (b) : Micrographie MEB de la biomasse cultivée à T25°C

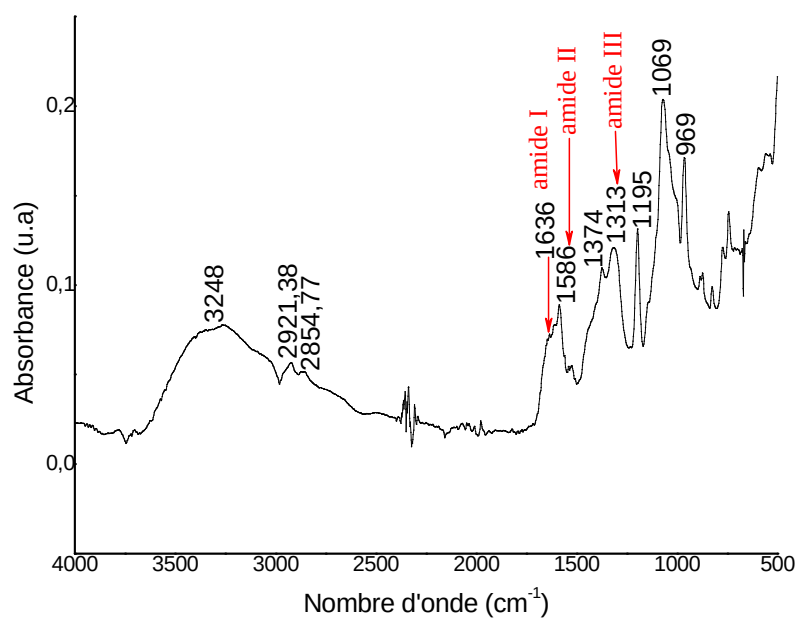


Figure 20 (a) : Spectre ATR de la biomasse cultivée à T28°C

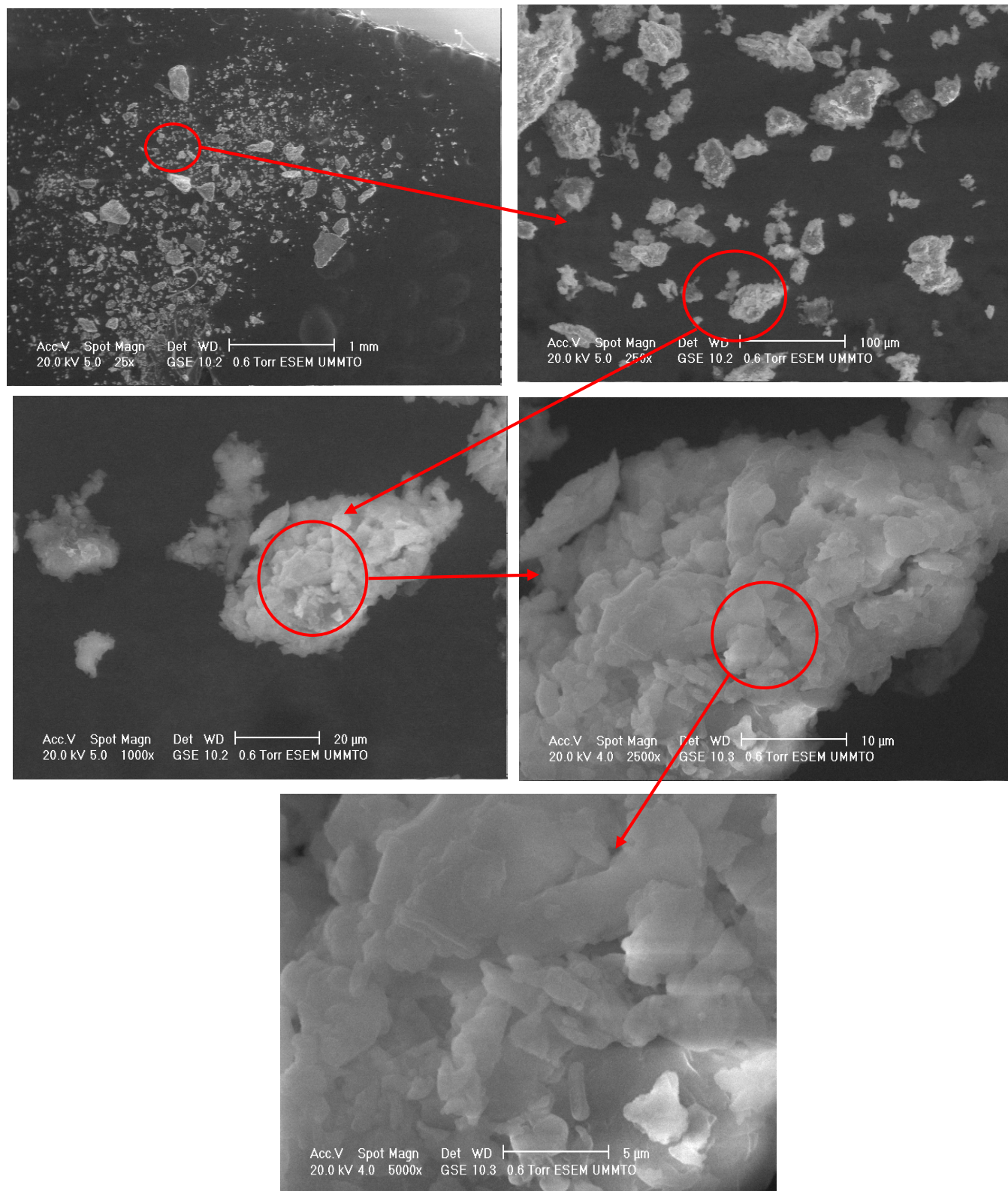


Figure 20 (b) : Micrographie MEB de la biomasse cultivée à T28°C

IV.4.1- Interprétation des spectres ATR des biomasses

- Les spectres des biomasses T20°C, T25°C et T28°C montrent une large bande d'absorption entre 3600 et 3012 cm^{-1} qui est probablement due aux vibrations de valence des groupements O-H et N-H de la chitine et du groupement O-H du glucane (Shorik et al, 2010).
- La biomasse T20°C marque un pic d'absorption à 2925,94 cm^{-1} et une bande large de faible intensité entre 1446-1408 cm^{-1} qui correspond respectivement à la vibration de valence et de déformation des liaisons C-H de la chitine et du glucane dans le complexe chitine-glucane (Skorik et al, 2010). Dans le spectre de la biomasse T25°C on remarque aussi l'apparition d'un pic d'absorption de faible intensité à 2924,01 et 1449,56 cm^{-1} . Ces pics correspondent respectivement, à la vibration de valence et de déformation des liaisons C-H de la chitine et du glucane dans le complexe chitine-glucane (Skorik et al, 2010), on remarque également l'apparition d'un faible pic à 2921,38 cm^{-1} dans le spectre de la biomasse T28°C, tandis que le pic à 1440 cm^{-1} n'est pas séparé du pic adjacent malgré son existence.
- Les spectres de T20°C et T25°C marquent un pic de faible intensité à 2851,50 cm^{-1} qui est légèrement décalé vers 2854,77 cm^{-1} dans le spectre de la biomasse T28°C indiquant la présence de petites quantités de lipides (Skorik et al, 2010).
- La présence des pics d'absorption de faible intensité à 1641,38 ; 1635,59 cm^{-1} et d'une bande d'absorption à 1636 cm^{-1} (qui est masqué) sur les spectres des biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C, respectivement, correspondent à l'amide I de la chitine et à la vibration du groupement C-N des protéines (Skorik et al, 2010).
- Les pics d'absorption à 1558,93 ; 1558,84 ; 1586 cm^{-1} pour T20°C, T25°C et T28°C, respectivement, correspondent à l'amide II de la chitine et à la vibration des liaisons N-H des protéines (Skorik et al, 2010).
- Les petits pics de très faible intensité à 1371,97 ; 1375,18 et 1377 cm^{-1} qui apparaissent dans le spectre des biomasses T20°C, T25°C et T28°C, respectivement, sont attribués aux vibrations de déformation des groupements CH_2 et CH_3 de la chitine.
- La présence des pics de très faible intensité à 1303,90 et 1312,35 cm^{-1} sur le spectre de la biomasse T20°C et T25°C, respectivement, ainsi que l'apparition du pic de faible intensité à 1313 cm^{-1} sur le spectre de la biomasse T28°C correspondent tous aux vibrations de valence des liaisons C-N de l'amide III de la chitine.
- Les petits pics de très faible intensité qui apparaissent à 1141,86 et 1142,76 cm^{-1} sur le spectre de la biomasse T20°C et T25°C, respectivement, et le pic intense qui apparaît à

1195cm⁻¹ sur le spectre de la biomasse T28°C sont attribués aux vibrations de valence de la liaison C-O-C et la liaison C-C de la chitine.

- Les pics d'intensité importante qui apparaissent à 1018,39 ; 1041,95 et 1069cm⁻¹ dans le spectre des biomasses T20°C, T25°C et T28°C, respectivement, correspondent à la vibration de valence des liaisons C-O-H de la chitine et du glucane.
- Les petits pics qui apparaissent à 926,90 et 930,18cm⁻¹ dans le spectre de la biomasse T20°C et T25°C, respectivement, ainsi que le pic intense qui apparaît à 969 cm⁻¹ dans le spectre de la biomasse T28°C indiquent que les unités glycosidiques de la chitine et du glucane sont liées par des liaisons β (Skorik et al, 2010)

Tableau 7: Attribution des principaux pics ATR présents dans les biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C

Bandes d'absorption (cm ⁻¹)			Attribution
Biomasse T20°C	Biomasse T25°C	Biomasse T28°C	
3600 -3012	3600 -3012	3600 -3012	v O-H et v N-H
1018,39	1041,95	1069	v C-O-H
2925 et 1446-1408	2924,01 et 1449,56	2921,38 et 1440	v C-H et δ C-H
1371,97	1375,18	1377	δ CH ₂ et δ CH ₃
1330,90	1312,35	1313	Amide III : v C-N
1641,38	1635,59	1636	Amide I : v C=O
1558,93	1558,84	1586	Amide II : v N-H
1141,86	1142,76	1195	v C-O-C et v C-C
892,78	890,59	894,98	liaisons β

δ : vibration de déformation, v: vibration de valence

Les observations par ATR ont permis de conclure que les biomasses T20°C, T25°C et T28°C sont constituées d'un mélange de chitine, glucane (sous forme de complexe) dans lesquels les unités monomères sont liées par des liaisons β , et de quantités minimes de lipides et de protéines.

Si on compare les biomasses cultivées à des températures différentes, on constate que les spectres ATR sont différents surtout à la température d'incubation de 28°C. Cette distinction se manifeste par le masquage du groupement amide I de la présence des pics très intenses dans la zone 1500-1100 cm⁻¹. Contrairement aux températures 20°C et 25°C, le pic de

l'amide I est très visible et les pics dans le domaine $1500-1100\text{ cm}^{-1}$ sont de très faible intensité et non séparés.

IV.4.2- Interprétation des micrographies MEB des biomasses

Les figures 18(b) ;19(b) et 20 (b) représentent les micrographies des biomasses cultivées à 20°C , 25°C et 28°C respectivement.

En comparant les micrographes des biomasses 20°C , 25°C et 28°C , on a constaté que les surfaces des biomasses sont de structure cristallines, hétérogène et poreuses. Elles apparaissent sous forme d'agrégats de particules de dimensions de l'ordre de $1\mu\text{m}$. Les trois biomasses cultivées à températures différentes manifestent des structures semblables. Ceci est dû probablement à la présence du complexe chitine-glucane identifié dans les spectres ATR.

IV.5-Traitement des biomasses

IV.5.1- Extraction de la chitine et du chitosane libre

IV.5.1.1-Traitement alcalin (NaOH 1M) des biomasses

Pour chaque biomasse, 15g de la fraction ayant un diamètre $<850\mu\text{m}$ sont traités avec 450 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium 1M dans l'autoclave à 120°C pendant 20min (Figure 21). Les fractions AIM sont récupérées par centrifugation à 12000 tr /min pendant 15 min. Elles sont ensuite lavées jusqu'à pH stable (Figure 22), puis séchées et broyées (Figure 23). Les masses des fractions AIM obtenues de chaque biomasse sont regroupées dans le tableau 8.

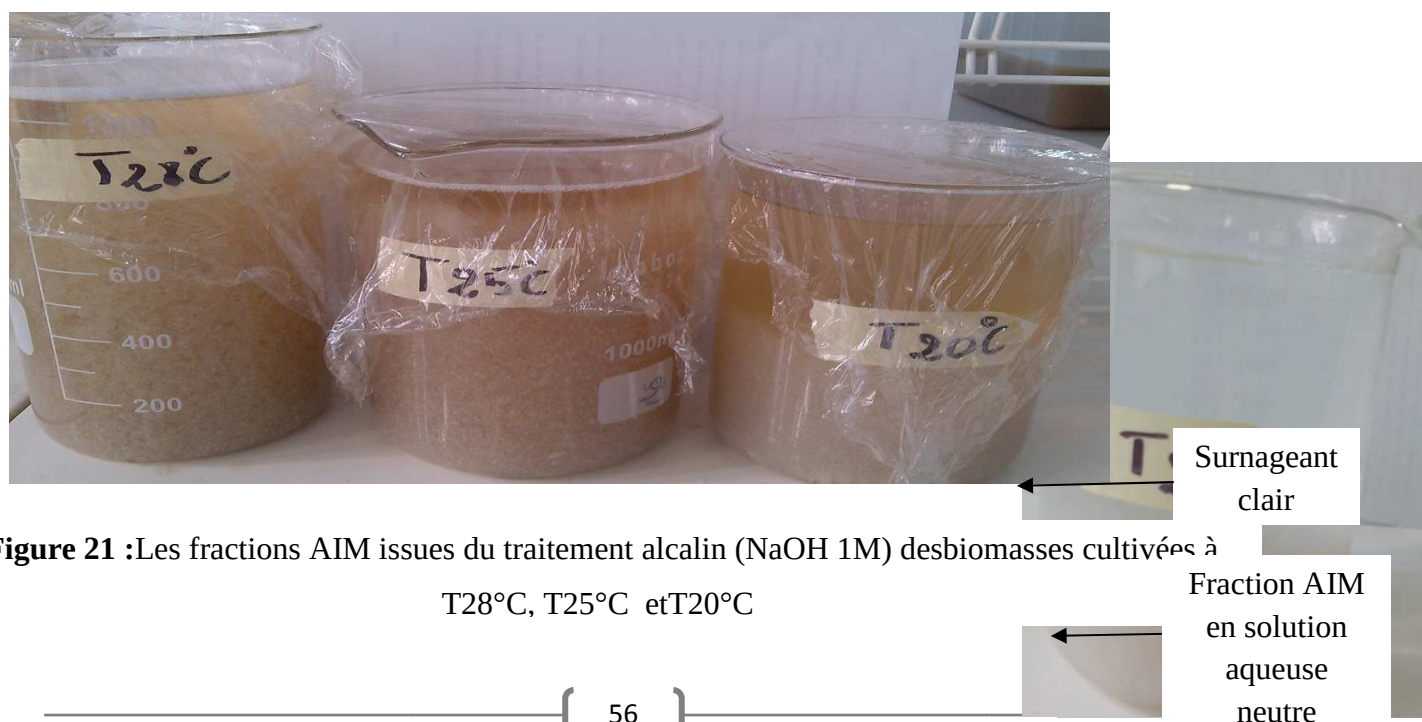


Figure 21 : Les fractions AIM issues du traitement alcalin (NaOH 1M) des biomasses cultivées à 28°C , 25°C et 20°C

La coloration marron du surnageant obtenue par traitement alcalin des biomasses est due à la solubilisation des protéines dans NaOH 1M. Après lavage jusqu'à pH 6 et séchage, les fractions AIM retrouvent leur coloration initiale.



Figure 22: Les fractions AIM obtenues après lavage jusqu'à pH 6 des biomasses cultivées à T28°C, T25°C et T20°C et traitées par NaOH 1M

Figure 23: Les fractions AIM après séchage et broyage obtenues par le traitement alcalin des biomasses cultivées à différentes températures : (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C

Tableau 8: Les masses des fractions AIM obtenues de chaque biomasse après traitement alcalin (NaOH 1M)

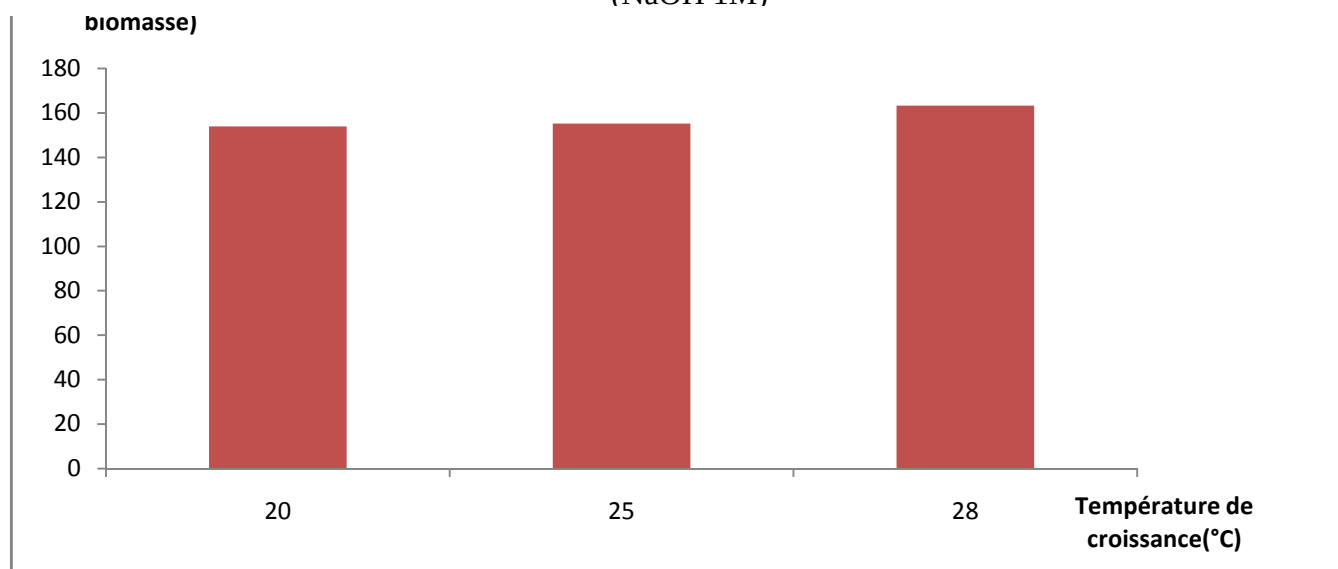


Figure 24: Pourcentage des fractions AIM récupérées après traitement alcalin (NaOH 1M) des biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C

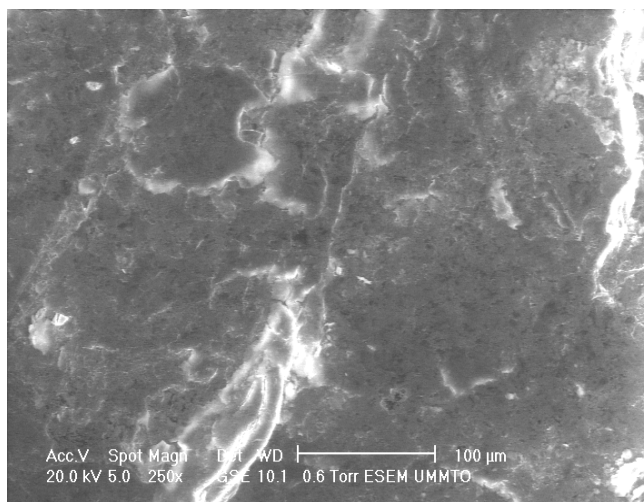
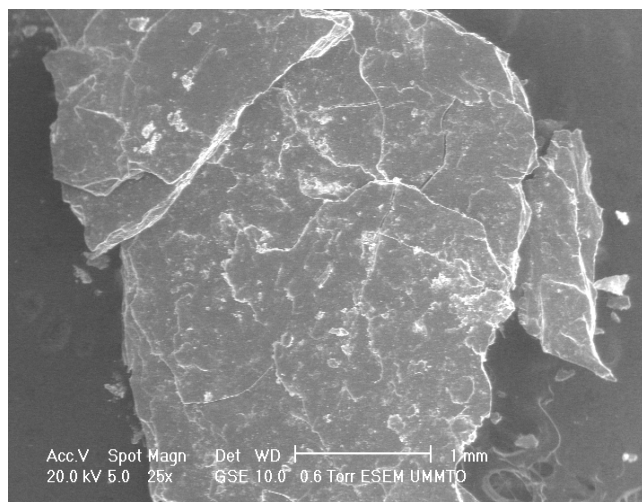
Les masses des fractions AIM (Tableau 8) obtenues après traitement alcalin des biomasses sont presque identiques et situées entre 2,31g et 2,45 g, si on tient compte des pertes

dues au lavage répété de la biomasse. Dans le milieu nutritif YPGA (Yeast Peptone Glucose Agar), la biomasse renferme une grande proportion (plus de 80%) de protéines, des polysides et d'autres polysaccharides solubles dans le milieu alcalin (NaOH 1M). Seule une faible quantité insoluble est donc obtenue 15,4% ; 15,53% et 16,33% correspondant à 15 g de biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C, respectivement, (Figure 24). Ces quantités malgré faibles ont subi différents traitements afin d'extraire des polysaccharides à haute valeur ajoutée.

IV.5.1.1.1-Analyse des AIM par Microscope Electronique à Balayage MEB

Les micrographies MEB des fractions AIM T20°C, T25°C et T28°C issues du traitement alcalin (NaOH 1M) sont illustrées sur les figures 25, 26 et 27, respectivement.

Pour toutes les biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C, le traitement basique 1M a modifié leurs structures. Pour l'ensemble, il y a disparition des pores et de la structure cristalline et apparition par fusion des agrégats donnant naissance à une nouvelle forme compacte et rigide. Les agrégats se sont étalés en longueurs créant ainsi une surface assez importante et homogène.



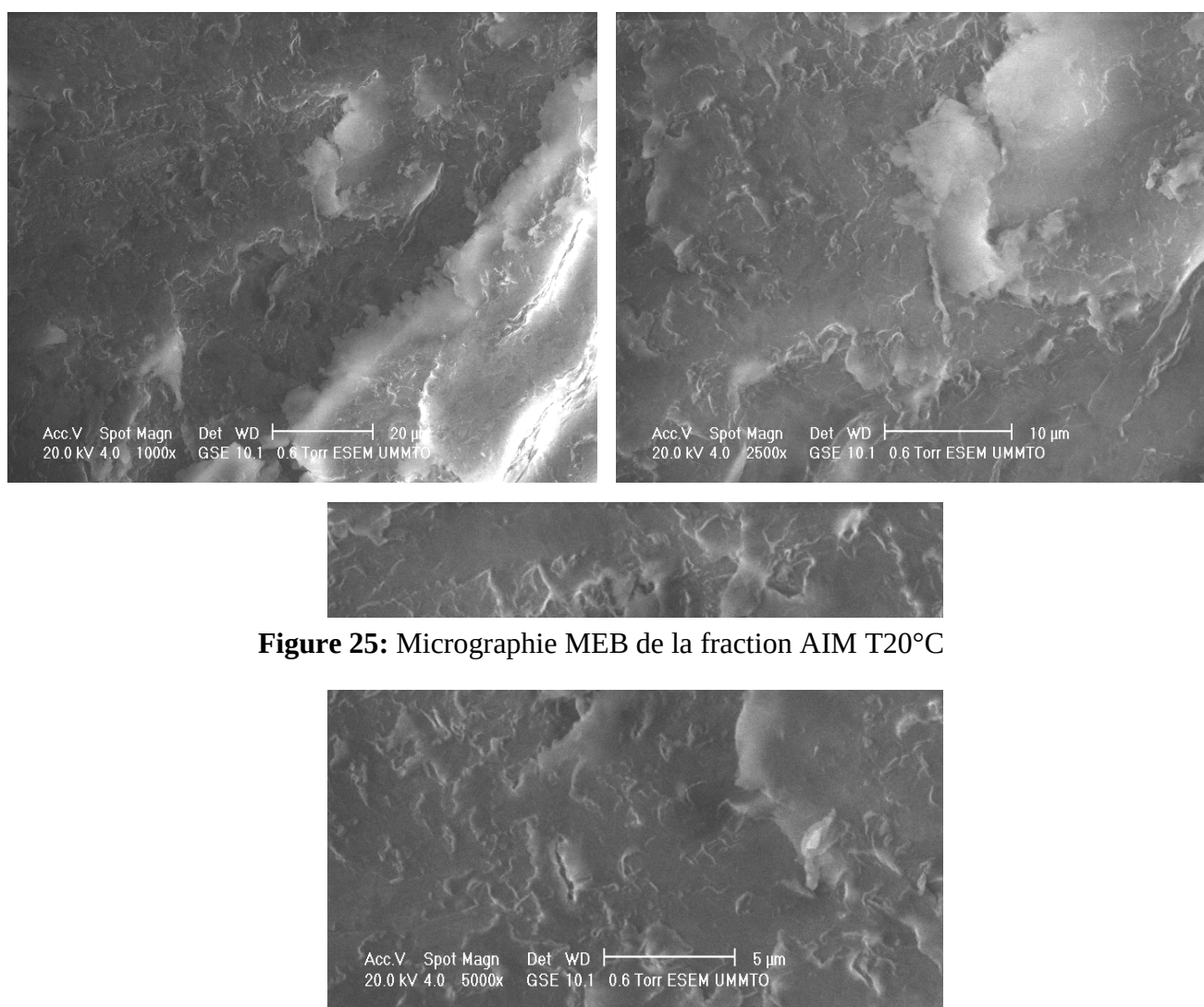


Figure 25: Micrographie MEB de la fraction AIM T20°C

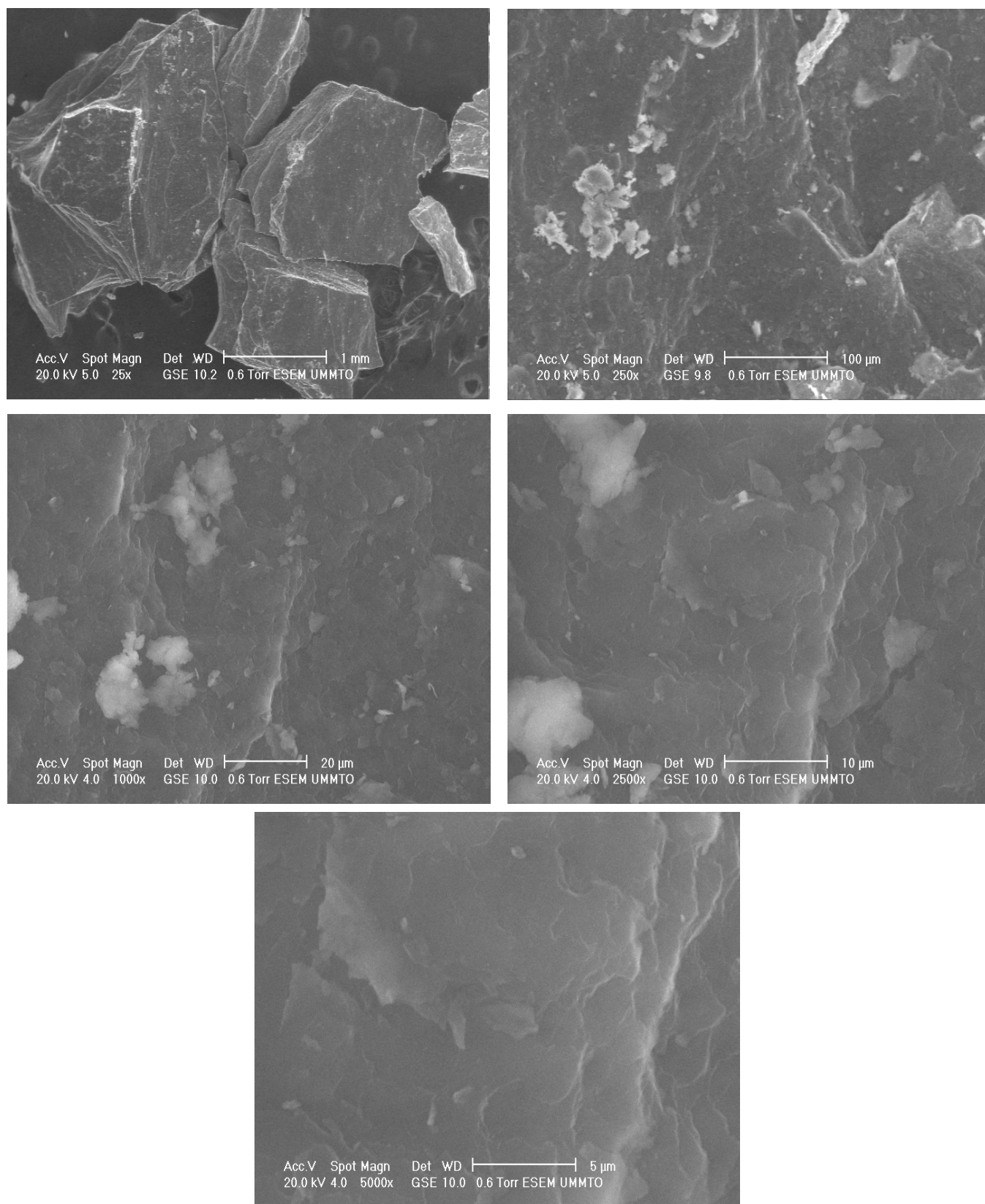
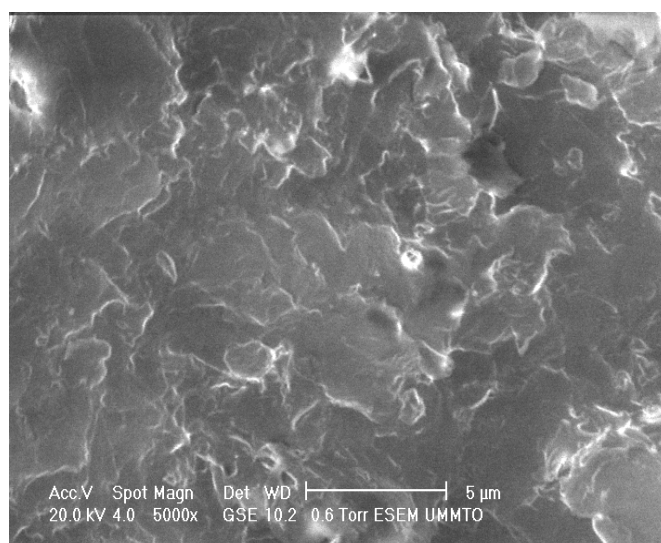
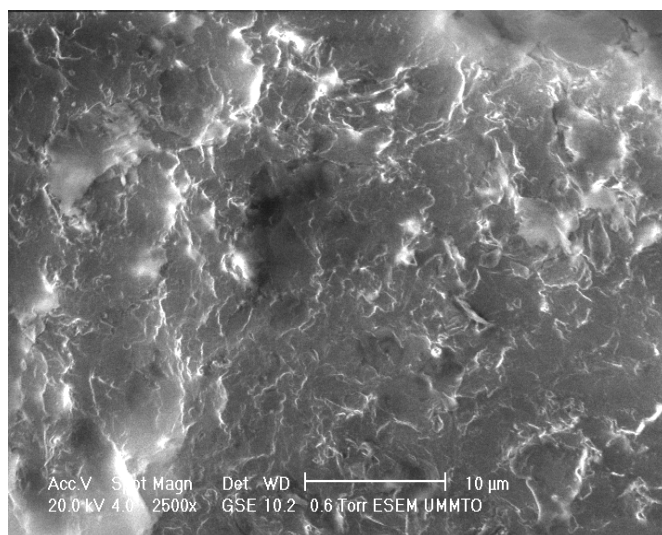
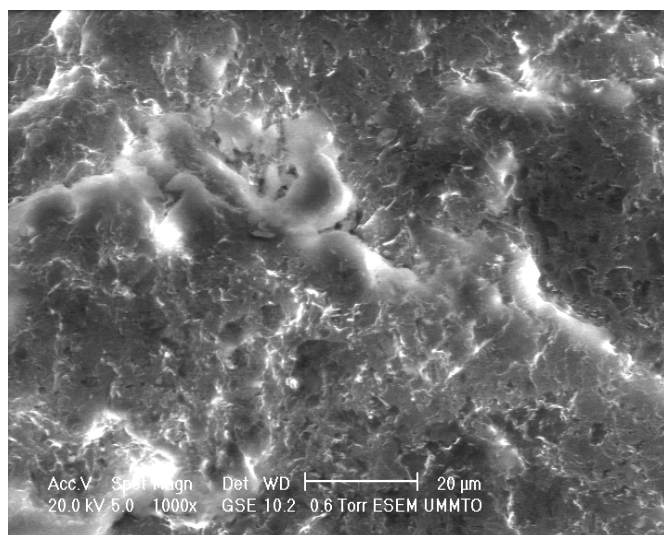
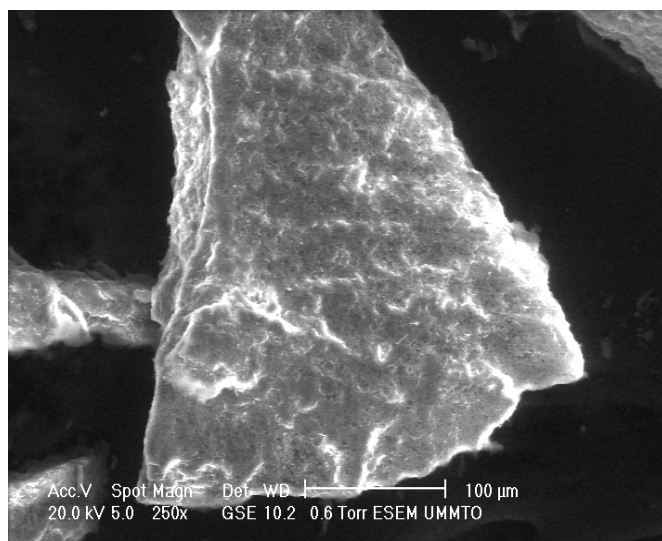
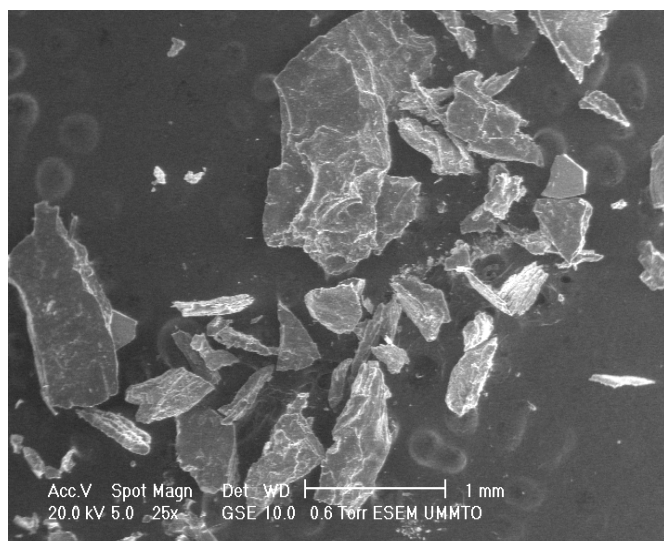


Figure 26: Micrographie MEB de la fraction AIM T25°C



IV.5.1.2-Traitement acide des fractions AIM

La solubilisation des fractions AIM dans l'acide acétique 2% a permis de produire 02 phases séparées : fraction insoluble AAIM et fraction soluble AcSM. Cette dernière manifeste une précipitation lorsqu'un ajustement du pH avec la solution NaOH 2M a été effectué. La fraction insoluble AAIM ainsi que le précipité obtenu sont lavés à l'eau distillée jusqu'à pH neutre puis séchés (Figure 28). Les résultats des différentes fractions solides sont rassemblés dans les tableaux 9 et 10.

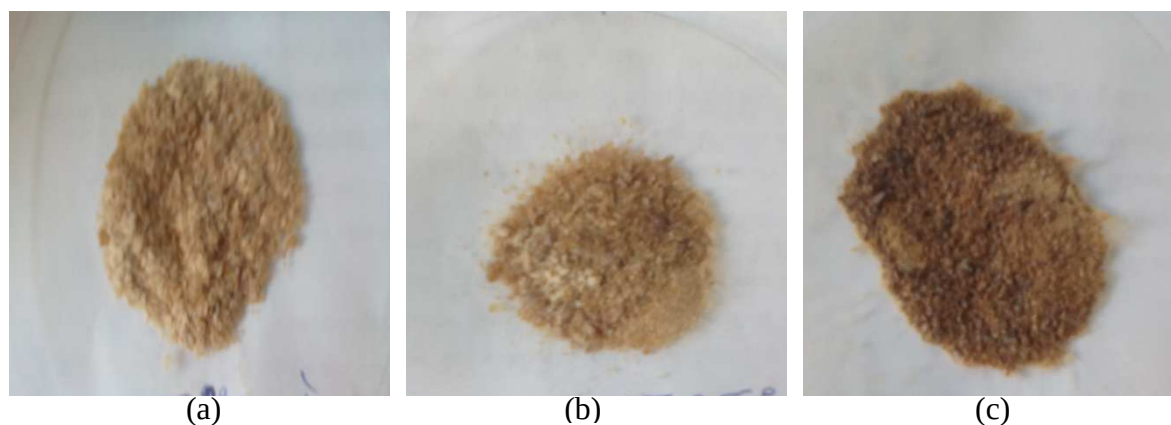


Figure 28: Les fractions AAIM après séchage et broyage : (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C

Tableau 9: Masses des fractions insolubles AAIM et celles des précipités correspondantes

Température d'incubation (°C)	20	25	28
Masse de la fraction AAIM* (mg)	1790	1780	1760
Précipité	+	+	++
Masse du chitosane libr (mg)	négligeable	négligeable	20

* : Correspondant à 2g de chaque AIM

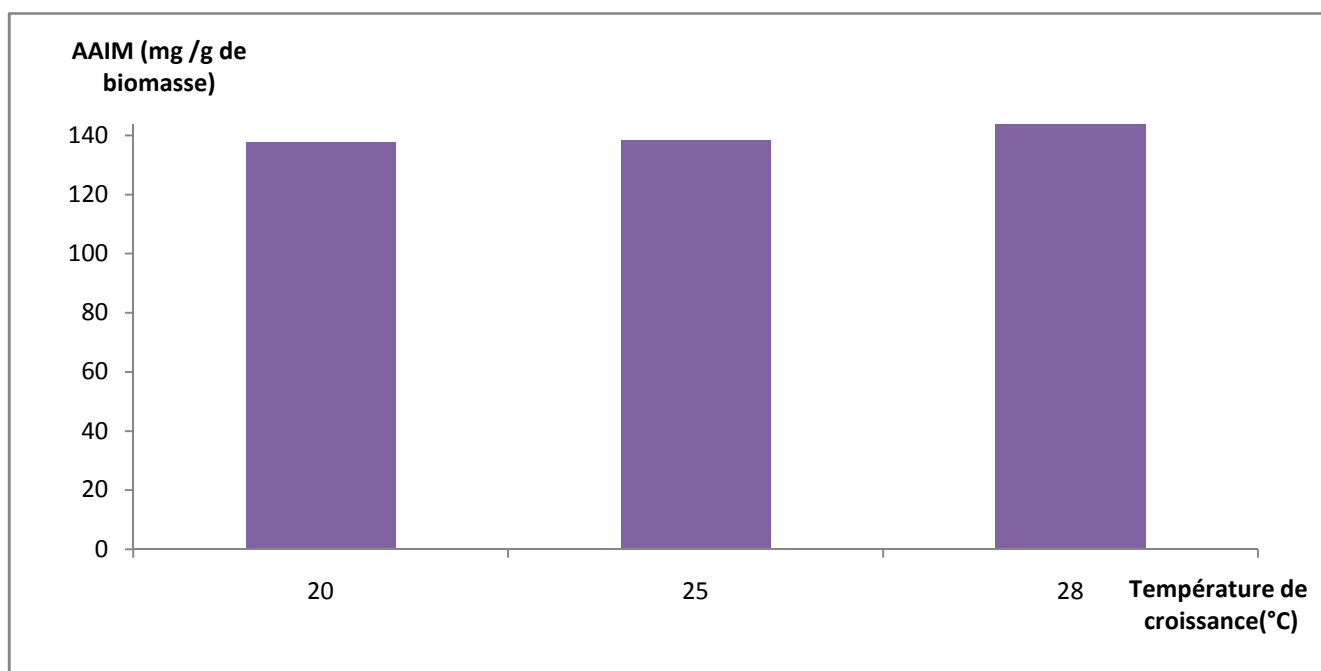
+ : Faible présence

++ : Forte présence

Tableau 10: Pourcentage de la chitine et du chitosane dans la fraction AIM

Température d'incubation (°C)	T20°C	T25°C	T28°C
Fraction AAIM* (%)	89,5	89	88
Chitosane libre* (%)	négligeable	négligeable	1

* :Calculé par rapport à 2 g de chaque AIM



On constate que toutes les fractions AIM sont constituées majoritairement (88-89,5%) de molécules insolubles dans l'acide acétique 2% pour les températures T20°C, T25°C et T28°C (Figure 28). Le reste de ces fractions AIM contiennent de très faibles quantités de molécules qui se précipitent dans NaOH 2M (Figure 29).

Figure 29 : Pourcentage des fractions AAIM obtenues après le traitement acide à 2% des AIM T20°C, T25°C et T28°C

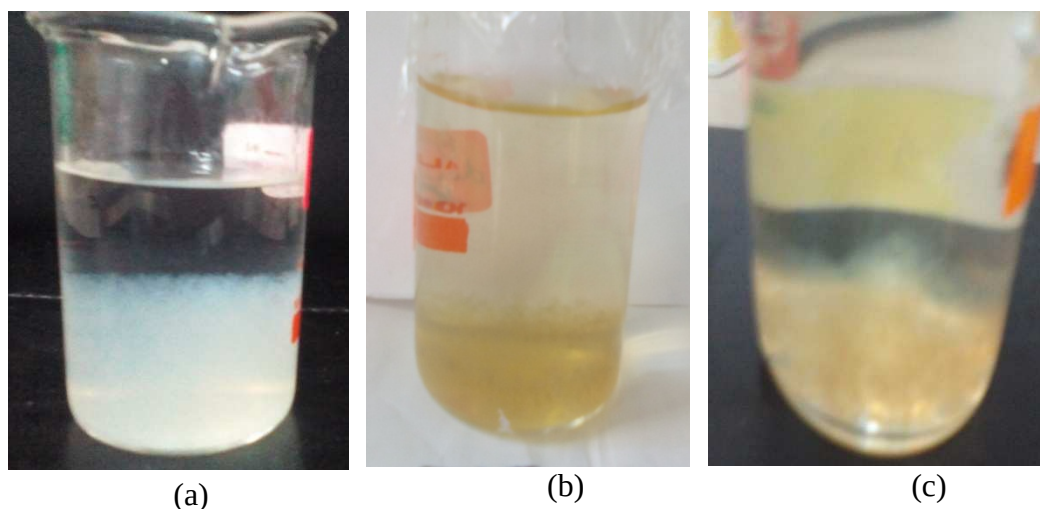


Figure 30 : Précipités obtenus de T20°C, T25°C et T28°C après ajout de NaOH 2M pour la fraction soluble dans l'acide acétique : (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C

Le tableau 11 donne les quantités de chitine et du chitosane libre obtenues à partir de *Penicillium camemberti* (exprimées en g/100 g de biomasse sèche).

Tableau 11: Pourcentages de chitine et de chitosane obtenus pour chaque biomasse cultivée à différentes températures

Température de croissance (°C)	Concentration de la biomasse* (g/l)	g/100g de biomasse	
		Chitine	Chitosane
20	7,5	13,78	Négligeable
25	7,5	13,83	Négligeable
28	7,5	14,38	0,13

* : volume nutritionnel 2l

Il a été démontré, dans cette étude, que la température d'incubation du *Penicillium camemberti* sur milieu YPGA influe sur la production de la biomasse. La meilleure production est obtenue à 25°C, tandis qu'à 28°C la quantité de biomasse est faible. Le traitement alcalin suivi du traitement acide a permis d'extraire 13,78 ; 13,83 et 14,38% de molécules insolubles en milieu alcalin et acide (AAIM) pour 15 g de biomasse cultivés aux températures T20°C, T25°C et T28°C, respectivement. La meilleure fraction AAIM semble correspondre à la

température de 28°C où la croissance mycélienne est la plus faible (9,77g/l contre 14,10 g/l à 25 °C)

IV.5.1.2.1- Analyses des fractions AAIM par spectroscopie ATR et par Microscope Electronique à Balayage MEB

Les fractions AAIM issues du traitement basique et acide des biomasses T20°C, T25°C et T28°C sont analysées par spectroscopie ATR et par Microscope Electronique à Balayage MEB, les spectres ATR sont comparés à ceux de la chitine commerciale (Figure 34).

Il est remarqué que la zone située entre 1100 et 900 cm^{-1} présente des pics visibles chez la chitine et non pas chez les différentes fractions AAIM. Probablement, ce résultat démontre que nos produits représentent une chitine liée dite chitine brute. En effet, selon Ruiz-Herrera(1992), le champignon étudié appartenant à la classe des Ascomycètes est composé de complexe chitine-glucane au lieu du chitosane-glucane.

L'attribution des principaux pics pour AAIMT20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C est présentée sur le tableau 12:

Tableau 12: Principales bandes d'absorption des fractions AAIM T20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C et de la chitine commerciale

Bandes d'absorption IR (cm^{-1})				Attribution
Chitine commerciale	AAIM T20°C	AAIM T25°C	AAIM T28°C	
3436,72 et 3259,57	3351,20	3327,79	3340,22	ν O-H et ν N-H
2923,42 et 1424,39	2919,64 et 1426,75	2919,24 et 1426,01	2921,10 et 1428,94	ν C-H et δ C-H
1626,56	1645,45	1641,06	1643,93	Amide I : ν_{as} C=O
1551,58	1556,94	1554,02	1554,75	Amide II : ν_{s} N-H
1372,16	1374,08	1371,89	1372,62	δ CH ₂ et δ CH ₃
1307,80	1308,98	1311,18	1311,91	Amide III : ν C-N
1152,60 et 1077,65	1155,38	1152,45	1153,18	ν C-O-C et ν C-C
1024,65	1027,37	1027,37	1025,18	ν C-O-H
946,58	892,78	890,59	894,98	Liaison β

ν_{as} , ν_{s} : vibrations de valence asymétrique et symétrique ; δ vibrations de déformation

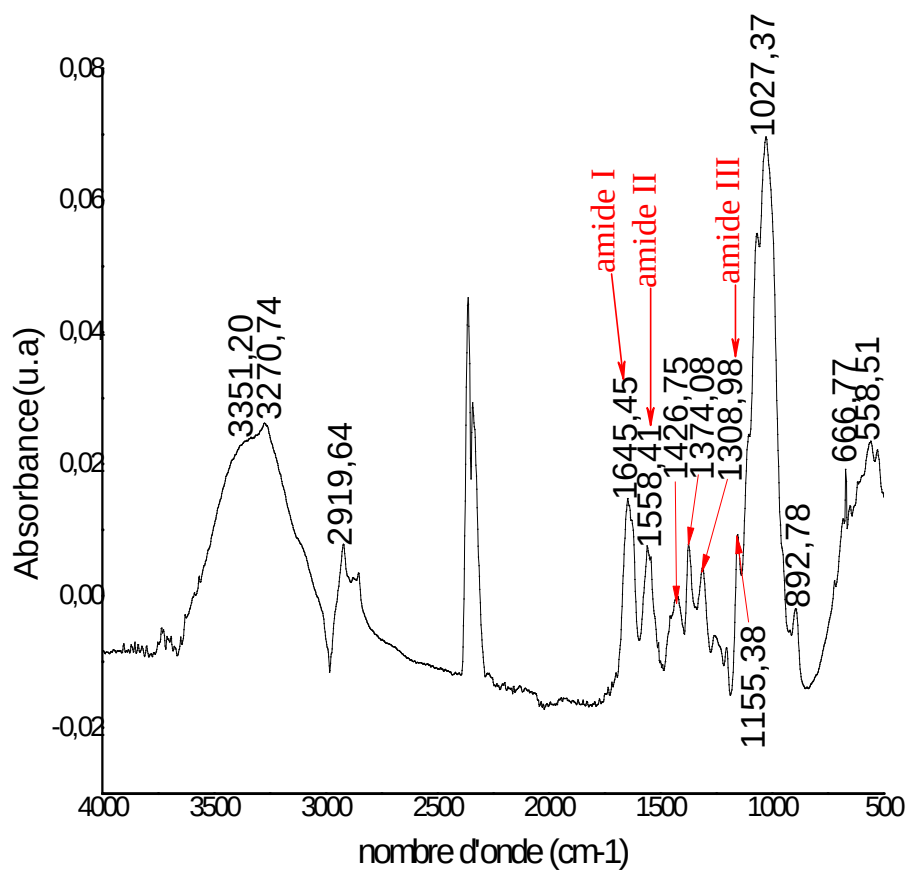


Figure 31 (a) : Spectre ATR de la fraction AAIM T20°C

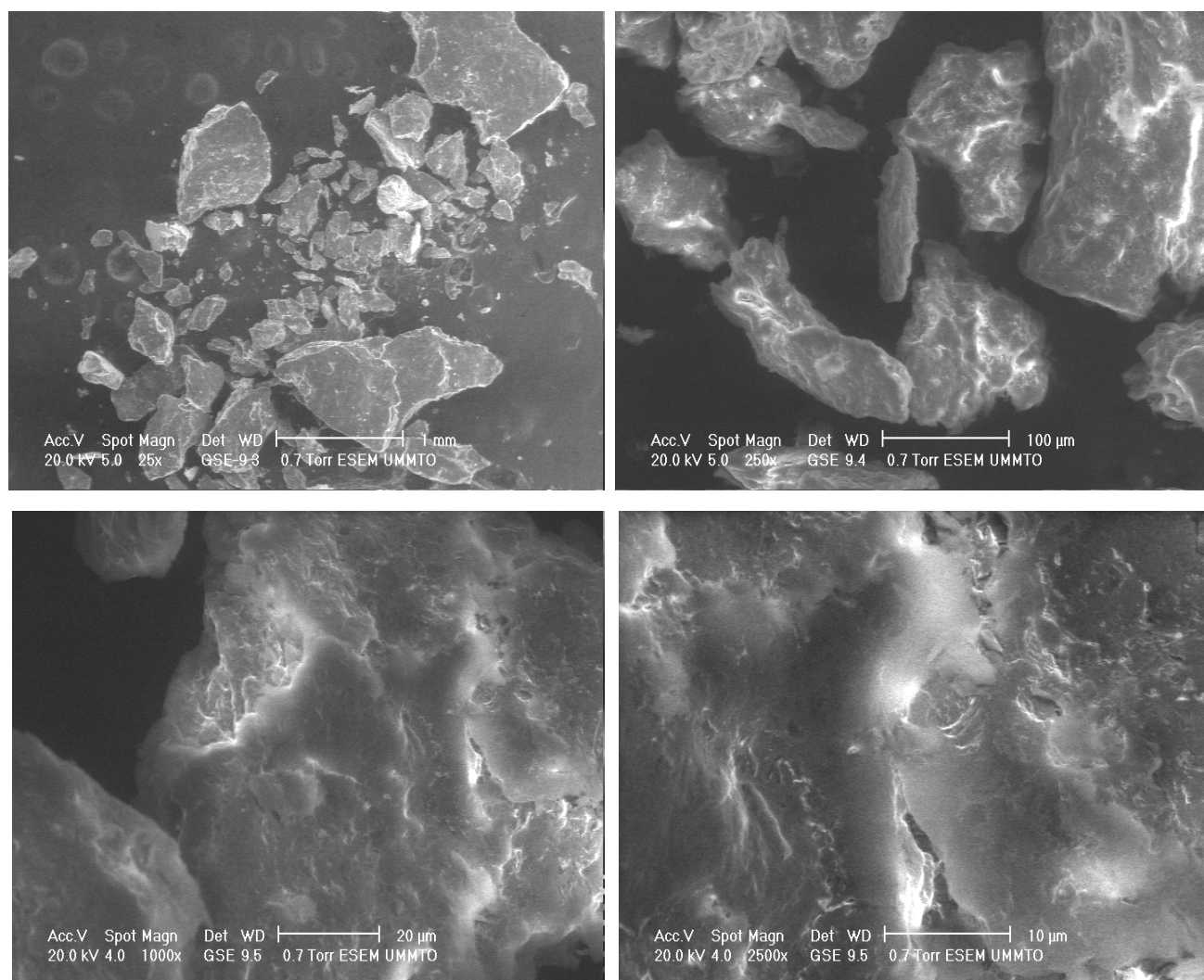


Figure 31 (b) : Micrographies MEB de la fraction AAIM T20°C

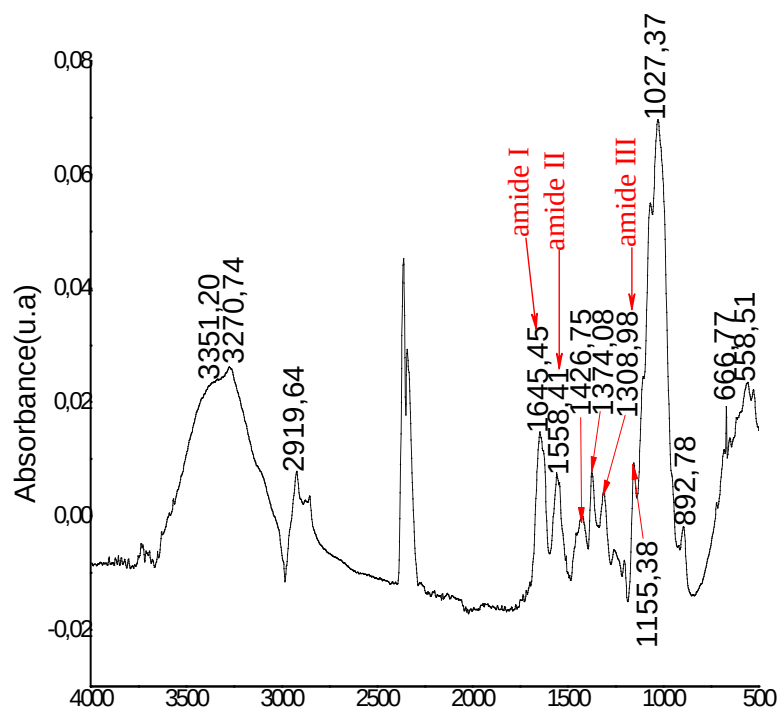


Figure 32 (a) : Spectre ATR de la fraction AAIM T25°C

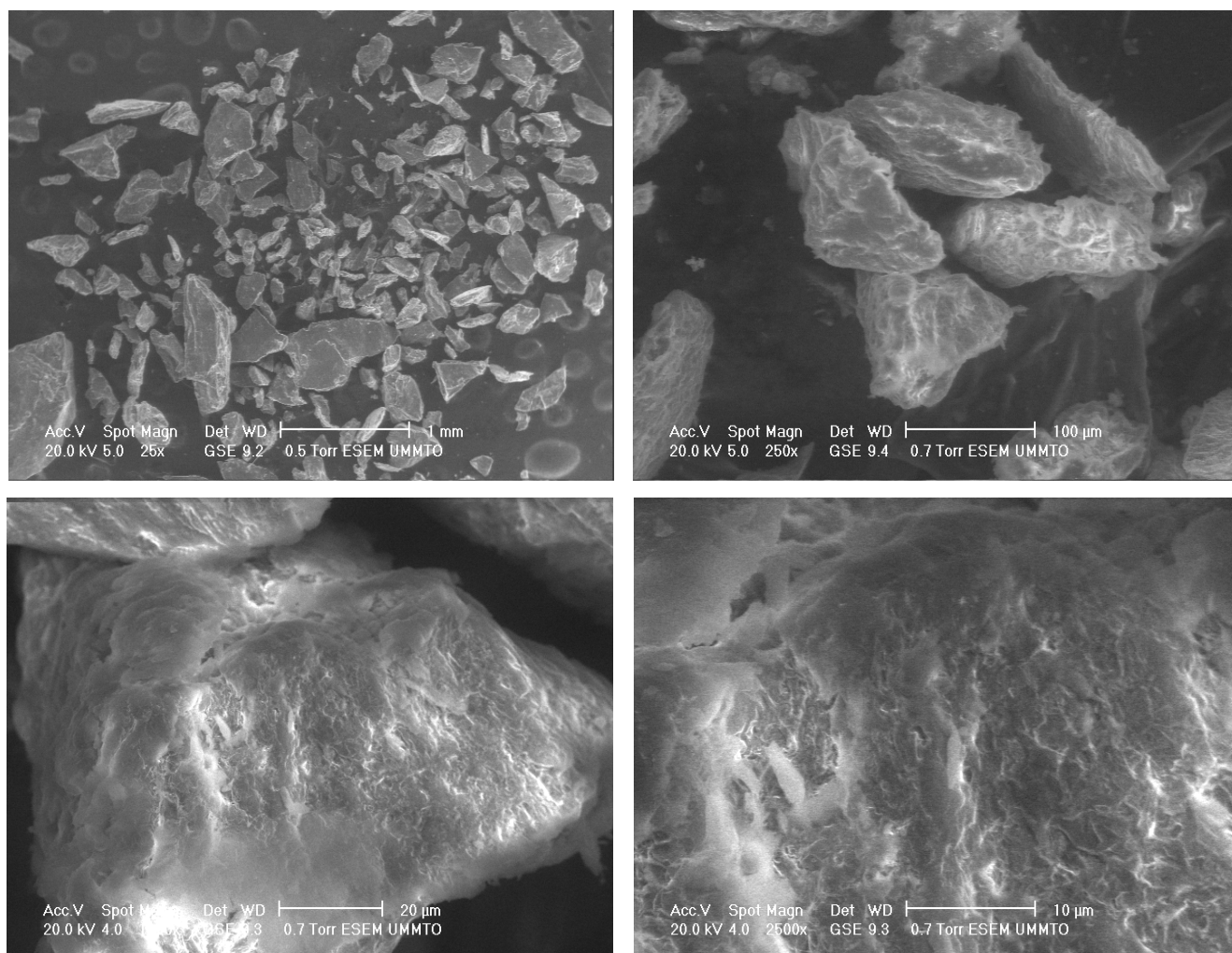


Figure 32 (b) : Micrographies MEB de la fraction AAIM T25°C

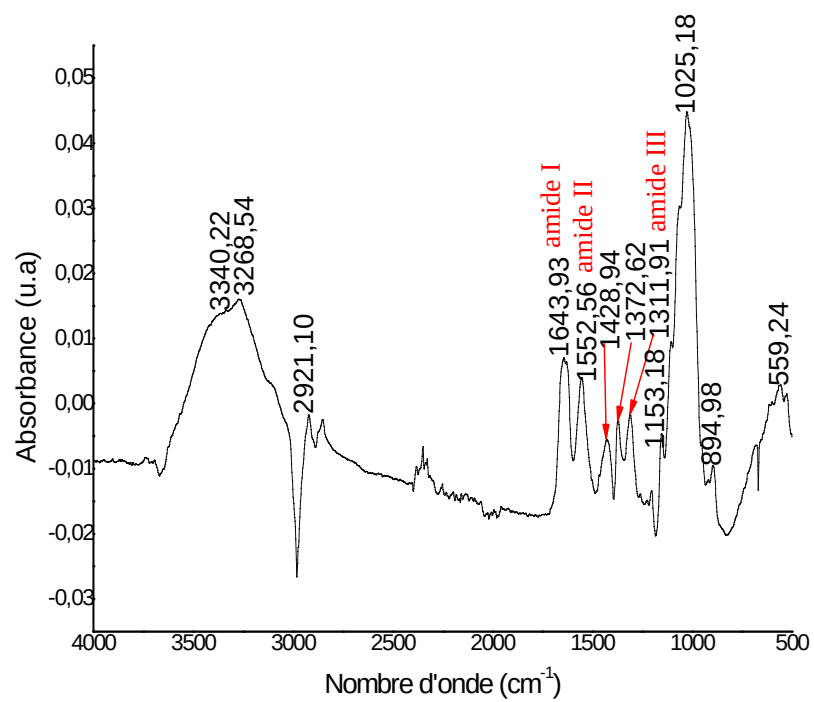


Figure 33 (a) : spectre ATR de la fraction AAIM T28°C

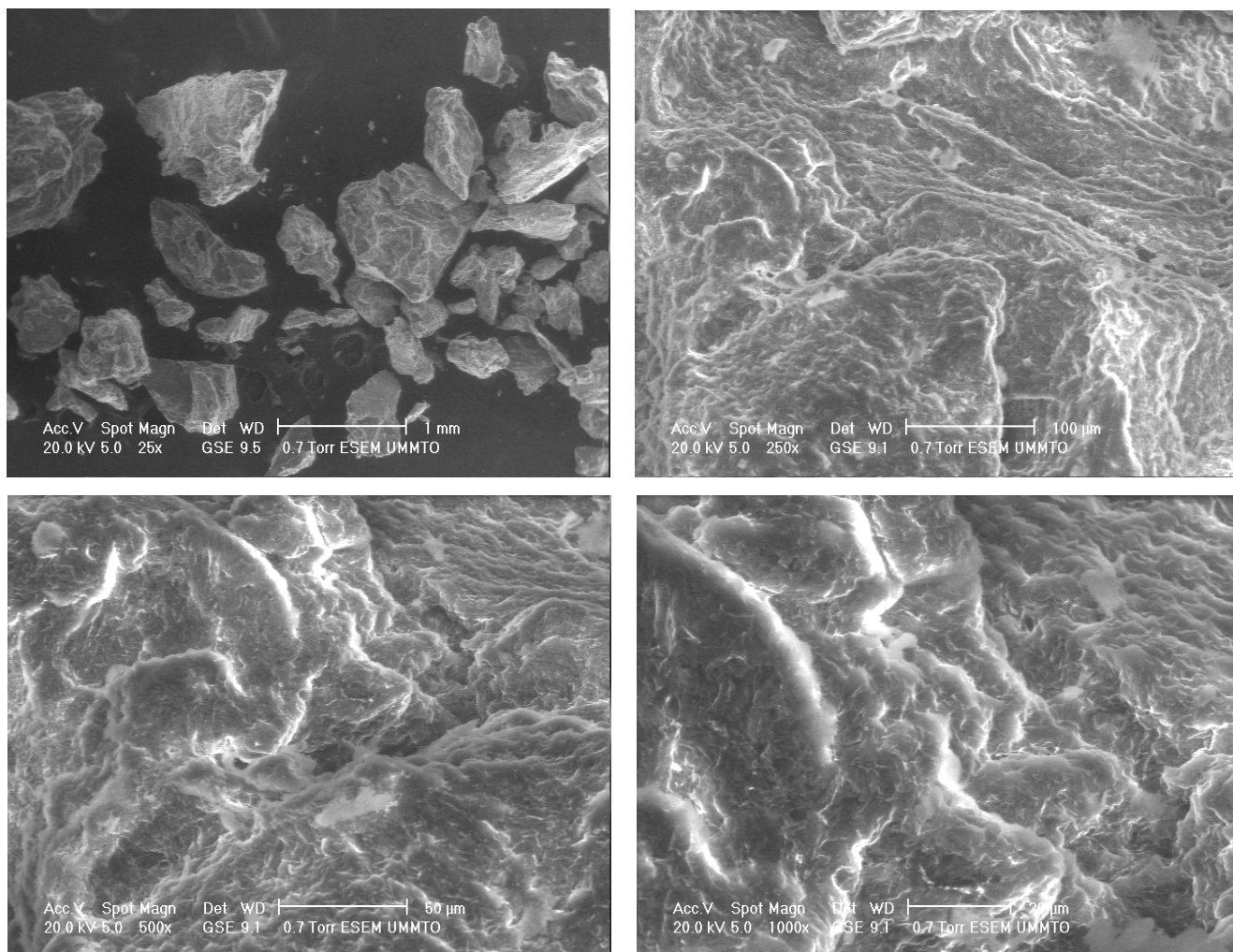


Figure 33 (b) : Micrographies MEB de la fraction AAIM T28°C

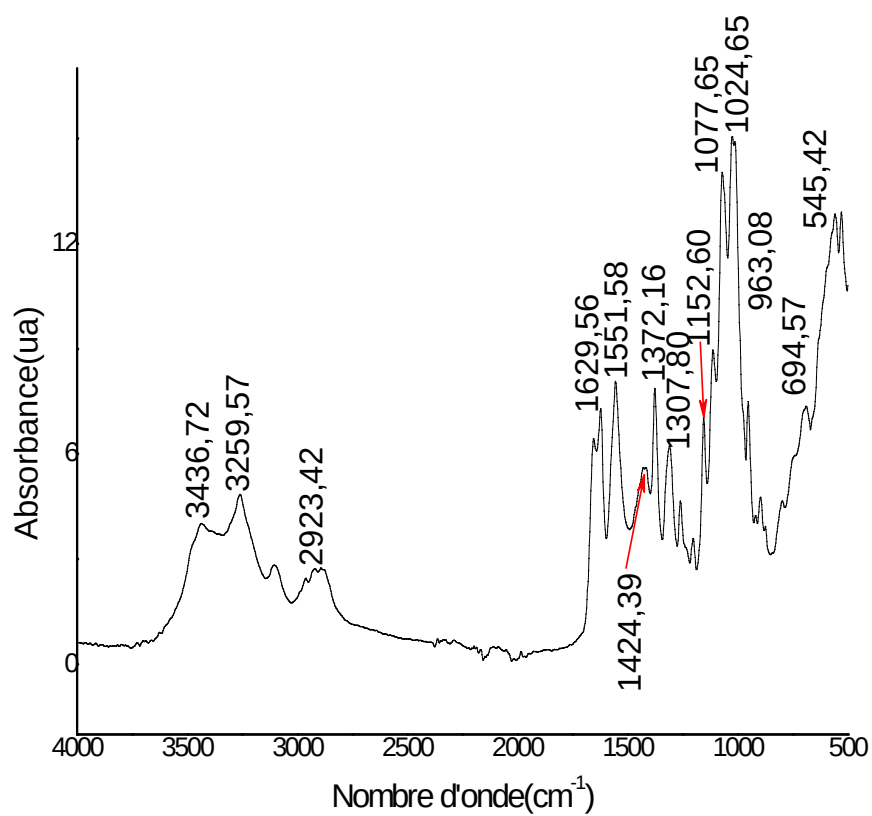


Figure 34: Spectre ATR de la chitine commerciale

IV.5.1.2.1.1-Interprétation des spectres ATR des fractions insolublesAAIM

Les spectres d'absorption des AAIM T20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C sont représenté sur les figures 31(a) ; 32(a) et 33(a), respectivement. On remarque que les trois spectres sont similaires à celui de la chitine commerciale (Figure 34).

Les bandes d'absorption à 3351,20 ; 3327,79 et 3340,22 cm^{-1} qui apparaissent sur les spectres de AAIM T20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C, respectivement, sont caractéristique des vibrations de valence des fonctions O-H et des fonctions N-H de la chitine.

Les pics à 2919,64 et 1426,75 ; 2919,24 et 1426,01 ; 2921,10 et 1428,94 cm^{-1} qui apparaissent sur les spectres de AAIM T20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C, respectivement, sont caractéristiques des vibrations de valence et de déformation des liaisons C-H de la chitine.

Les deux pics non séparés à 1645,45 cm^{-1} pour la AAIM T20°C ; à 1643,93 cm^{-1} pour la AAIM T25°C et à 1630,82 cm^{-1} sur le spectre de AAIM T28°C correspondent à la vibration asymétrique de valence du groupement C=O de l'amide I de la chitine.

Les pics intenses à 1556,94 ; 1554,02 et à 1554,75 cm^{-1} sur les spectres AAIM T20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C, respectivement, sont attribués aux vibrations symétriques de valence des liaisons N-H de l'amide II de la chitine.

Les pics moyennement intense à 1374,08 ; 1371,89 et à 1372,62 cm^{-1} sur les spectres de AAIM T20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C, respectivement, correspondent aux vibrations de déformation du groupement CH_2 et CH_3 de la chitine.

L'apparition du pic d'absorption à 1308,98 cm^{-1} pour AAIM T20°C ; à 1311,18 cm^{-1} et à 1311,91 cm^{-1} pour AAIM T28°C confirme la présence de vibration de valence de la liaison C-N de l'amide III de la chitine.

Les pics intenses à 1155,38 et 1027,37 cm^{-1} pour AAIM T20°C ; à 1152,45 et 1027,37 cm^{-1} pour AAIM T25°C, ainsi qu'à 1153,18 et 1025,18 cm^{-1} pour AAIM T28°C sont attribués aux vibrations de valence de la liaison C-O-C et C-C de la chitine.

Selon Skorik et al(2010), Les pics de faible intensité qui apparaissent à 892,78 ; 890,59 et à 894,98 cm^{-1} sur les spectres de AAIM T20°C, AAIM T25°C et AAIM T28°C,

respectivement, indiquent que les unités glycosidiques de la chitine sont liées par des liaisons β .

IV.5.1.2.1.2- Interprétation des micrographies MEB des fractions insolubles AAIM

Les figures 31(b), 32(b) et 33(b) montrent les micrographies des fractions AAIM T20°C, T25°C et T28°C, respectivement. Ces dernières sont semblables à celles des fractions AIM correspondantes, mais avec apparition d'une structure plus fibreuse notamment à la température d'incubation de 28°C. Cette morphologie est très spécifique à la chitine commerciale.

IV.5.1.2.1.3-Analyses du produit final obtenu de la biomasse T28°C par spectroscopie ATR et par Microscope Electronique à Balayage MEB

Seul le produit final à T28°C a été analysé car les quantités obtenues pour des biomasses cultivées à T20°C et T25°C sont très faibles et insuffisantes. Le spectre du produit final T28°C (figure 33 (a)) est comparé au spectre du chitosane commercial (Figure 34 (a)). L'attribution des principaux pics pour le chitosane commercial ainsi que pour le produit final de T28°C est présentée sur le tableau 13.

Tableau 13: Principales bandes d'absorption du produit final T28°C et du chitosane commercial

Bandes d'absorption IR cm^{-1}		Attribution
Produit final de T28°C	Chitosane commercial	
3357,99	3356,47	ν O-H et ν N-H
2925,94 et 1456,22	2859,83 et 1421,50	ν C-H
1635,59	1659,85	Amide I : ν C=O
1581,59	1575,05	ν NH ₂
n'est pas séparé du pic adjacent	1317,65	Amide III : ν C-N
1371,35	1369,13	δ CH ₂ et δ CH ₃
1012,60	1028,44	ν C-O-H

ν : vibrations de valence ; δ vibrations de déformation

ν : vibrations de valence ; δ vibrations de déformation

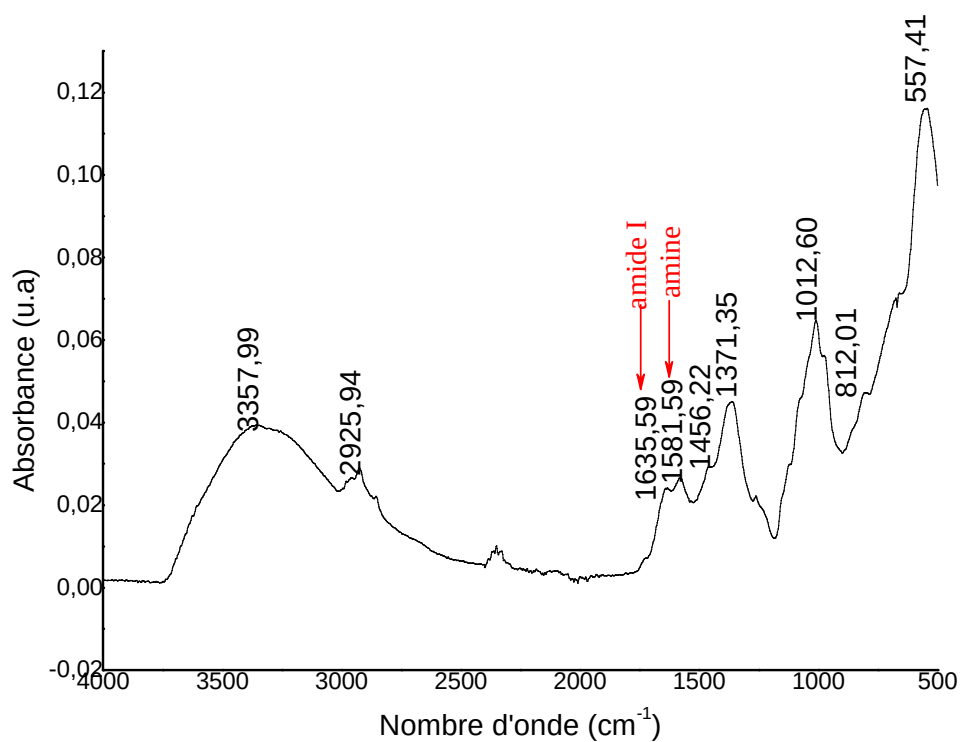


Figure 35 (a) : Spectre ATR du produit final T28°C

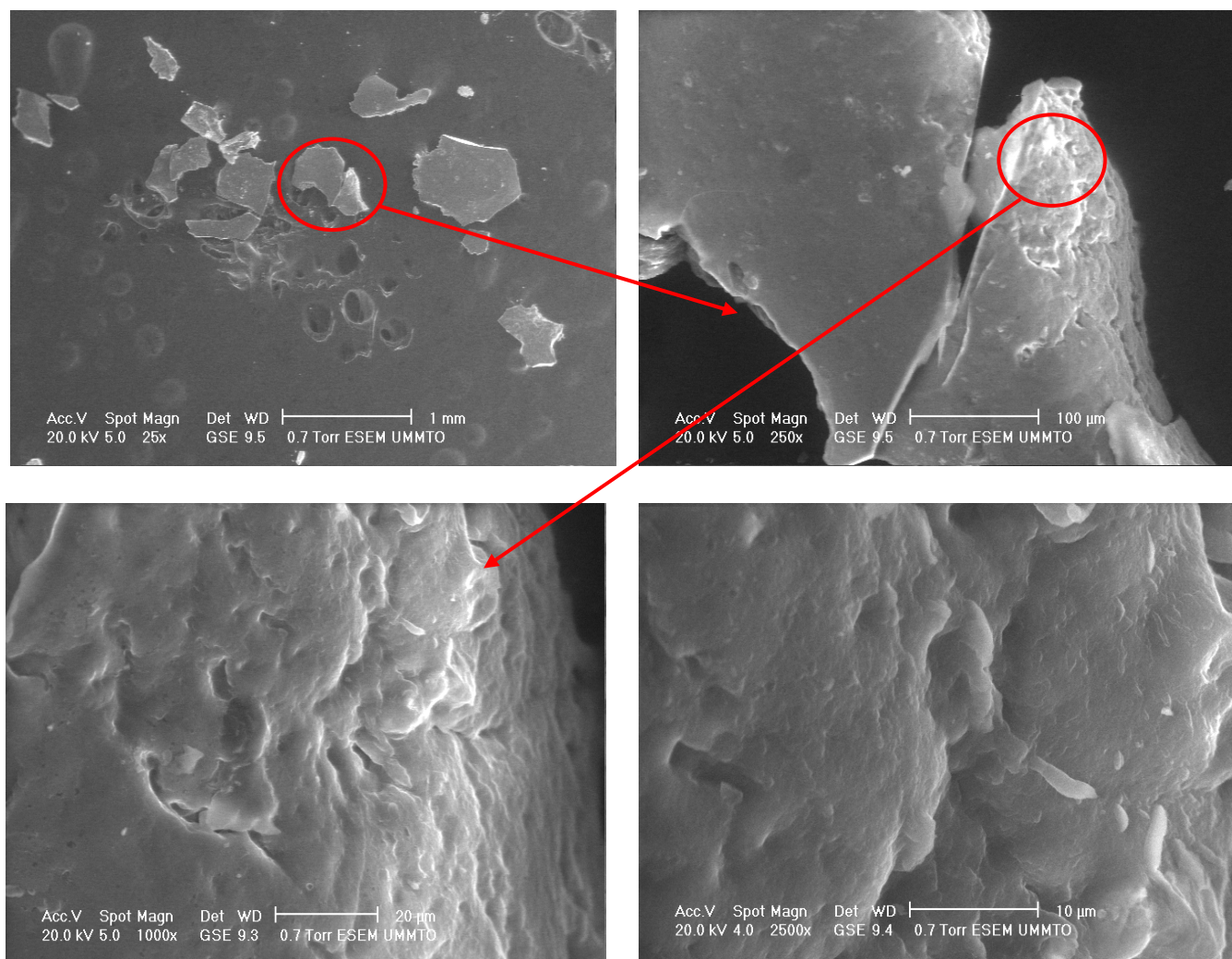


Figure 35 (b) : Micrographies MEB du produit final T28°C

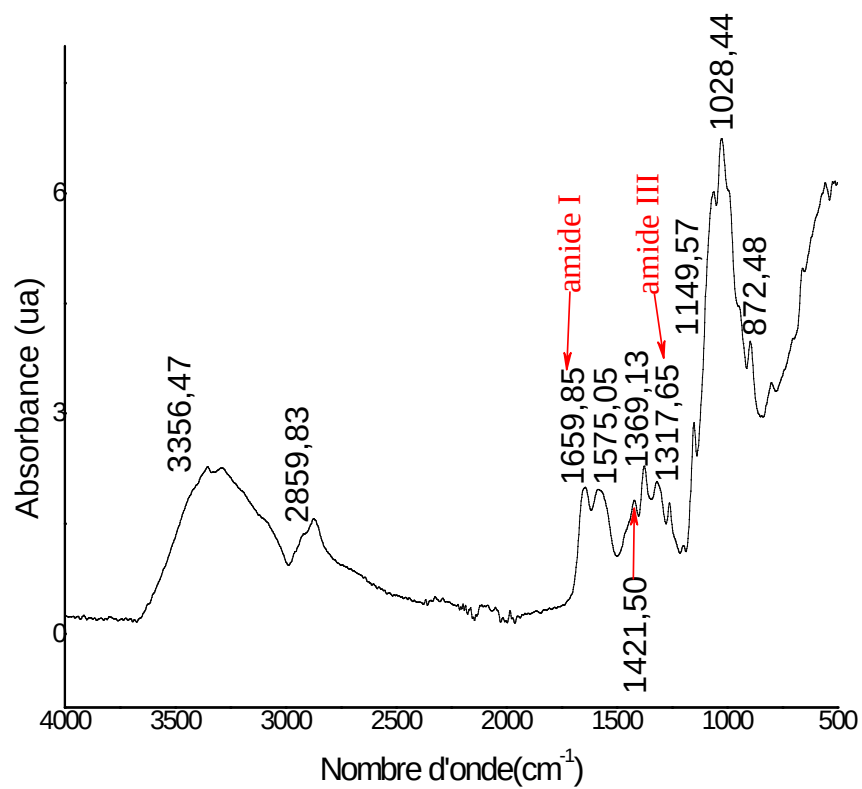


Figure 36 (a) : Spectre ATR du chitosane commerciale

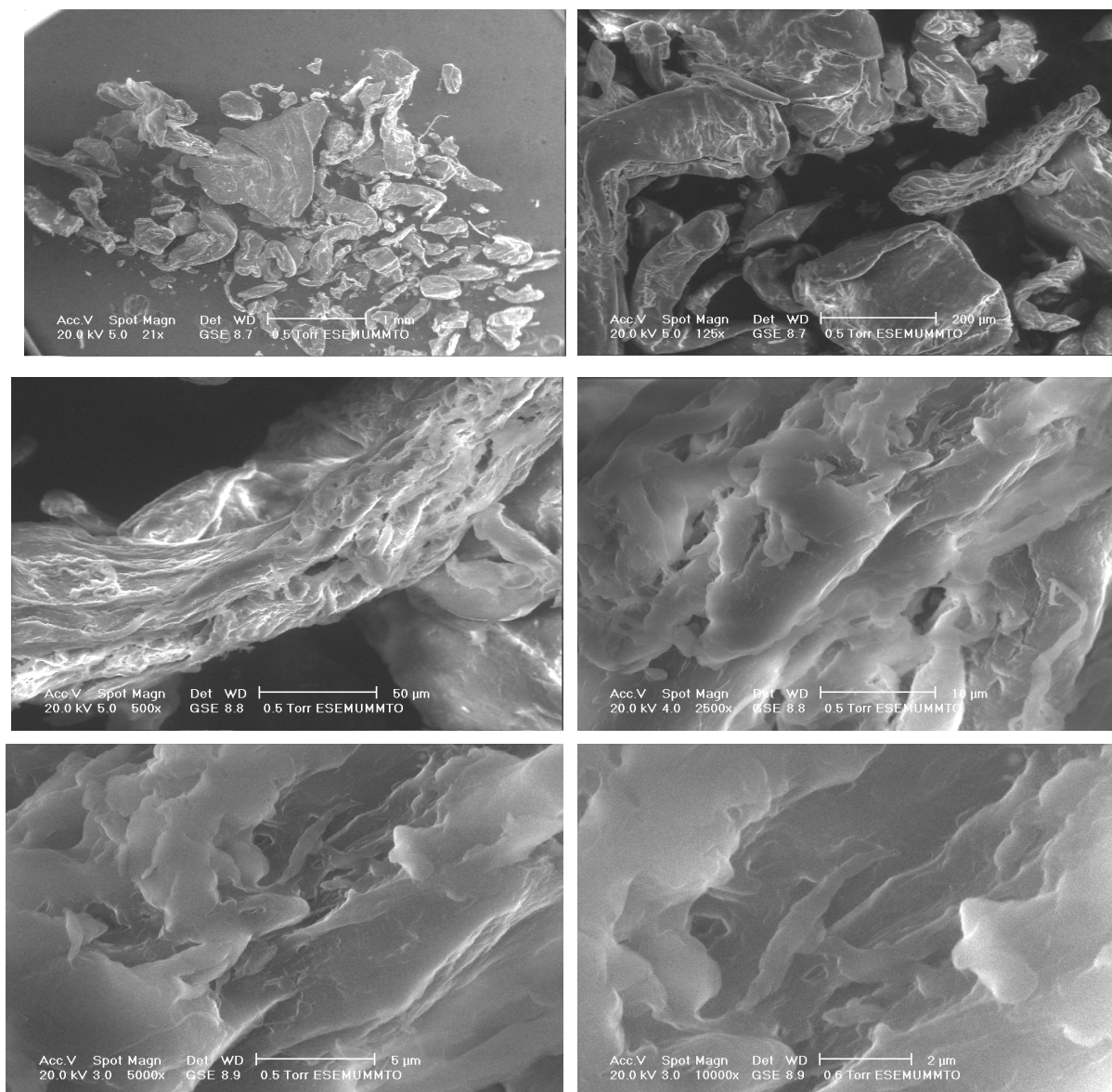


Figure 36 (b): Micrographies MEBdu chitosane commercial

IV.5.1.2.1.3.1-Interprétation des spectres ATR du produit final obtenu de la biomasse T28°C

- La bande large à $3357,99\text{ cm}^{-1}$ est attribué aux vibrations de valence des fonctions O-H et N-H du chitosane
- Le pic de faible intensité à $2925,94$ et à $1456,22\text{ cm}^{-1}$ sont dues respectivement aux vibrations de valence et de déformation des liaisons C-H du chitosane
- Le pic caractéristique des vibrations de valence du groupement C=O de l'amide I du chitosane est présent mais avec un déplacement vers $1635,59\text{ cm}^{-1}$ accompagné d'un affaiblissement de l'intensité d'absorption par rapport à celle observé dans le spectre de la chitine T28°C (AAIM T28°C).
- L'apparition du pic à $1581,59\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de valence du groupement amine ($-\text{NH}_2$), ce pic est absent dans le spectre de la AAIM T28°C.
- Le pic à $1371,35\text{ cm}^{-1}$ est associé aux vibrations de déformation des groupements CH_3 et CH_2 , tandis que les pics correspondant aux vibrations des liaisons C-N de l'amide III et aux vibrations des liaisons C-O-C qui doivent apparaître normalement à $1319,78$ et $1120,14\text{ cm}^{-1}$ respectivement ne sont pas séparés des autres pics
- Le pic à $1012,60\text{ cm}^{-1}$ est attribué aux vibrations de valence des liaisons C-O-H.

Le spectre ATR du produit final extrait de la biomasse cultivée à T28°C n'est pas identique à celui du chitosane d'origine marine, mais il ressemble au spectre du chitosane extrait de l'espèce *Penicillium viridicatum* étudiée par Ebrahimzadeh et ses collaborateurs (2012)

IV.5.1.2.3.1.2-Interprétation des micrographies MEB du produit final obtenu de la biomasse T28°C

Les micrographies MEB du produit final extrait de la biomasse cultivée à T28°C montrent une structure différente de celle du chitosane commercial. Le calcul du degré de désacétylation DDA permet d'expliquer ce résultat obtenu.

Le degré de désacétylation DDA du chitosane obtenue de la biomasse cultivée à T28°C est déterminé en utilisant la formule de Khan et al (2000) :

$$DDA\% = \left[100 - 100 \times \left(\frac{A_{1655}/A_{3450}}{1,33} \right) \right]$$

Cette méthode est considérée par certains auteurs comme méthode absolue, et les résultats obtenus par cette dernière sont en bon accord avec les valeurs de la RMN (Czechowska-Biskup, R et al, 2012)

L'échantillon	A _{1655 cm⁻¹}	A _{3450 cm⁻¹}	DDA%
Chitosane T28°C (CTS T28 °C)	0,024 1635,59 cm ⁻¹	0,039 3357,99 cm ⁻¹	54,46
Chitosane commercial	1,867 1317,65 cm ⁻¹	2,27 1421,5cm ⁻¹	76 ,68

Le degré de désacétylation DDA du chitosane commerciale est calculé par la formule suivante (Brungerotto et al ,2001).

$$DDA\% = 100 - \left(\frac{\left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 0,3822}{0,03233} \right)$$

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 14

Tableau 14:Degré de désacétylation du produit final extrait de la biomasse cultivée à T 28°C et du chitosane commercial

D'aprèsle tableau,on remarque que le chitosane T28°C possède un degré de désacétylation DD acceptable, cette valeur est proche de celle du chitosane extrait de l'espèce *P.viridicatum*cultivée (qui est d'environ 49,4%) (Ebrahimzadeh, 2012). Cette différence est probablement due au temps d'incubation et à la nature du milieu de culture .en effet,le champignon *P.camembertia* été cultivé sur milieu solide (YPGA) pendant 6 jours à 28°C, tandis que l'espèce *P.viridicatum*a été cultivée sur milieu liquide (YPG) pendant 14 jours à 27°C. Ce résultat nous permet de voir l'influence des conditions de cultures notamment la nature du milieu de croissance et la durée d'incubation sur les caractéristiques du chitosane.

IV.5.2- Conclusion sur l'extraction du chitosane libre

Dans cette partie, nous avons procédé à l'extraction du chitosane libre de la paroi cellulaire du champignon *P.camemberti* développé à différentes températures (20°C, 25°C et 28°C) en utilisant le procédé proposé par Rane and Hoover, 1993 et par Cristini et ses collaborateurs, 1996. La température 25°C a donné le meilleur rendement de biomasse (28,21g pour un volume réactionnel de 2 l), c'est la température optimale pour la production de la biomasse, mais à 28°C, le rendement de la biomasse est plus faible (19,54g). Le pourcentage de la fraction AIM issu du traitement alcalin de la biomasse T28°C étant le plus significatif (16,33%) comparativement à celle obtenues à 20°C et 25 °C. D'après les calculs des masses, la fraction AIM T28°C contient une quantité importante de chitine liée, accompagnée d'une très faible quantité du chitosane libre. La quantité du chitosane obtenue des biomasses T20°C et T25°C est négligeable.

La moisissure *P.camemberti* cultivée sur solide (milieu YPGA) présente une faible teneur en chitosane libre comparativement aux rendements de chitosane obtenus avec d'autres espèces de *penicillium* (*P.waksmanii*, *P.citrinum*, *P.viridicatum* et *P.aurantiigriseum*) cités par Ebrahimzadeh et ses collaborateurs (2012).

IV.5.3- Extraction du chitosane total (chitosane libre et chitosane lié au glucane)

Il faut signaler qu'aucuns travaux n'ont été cités concernant l'extraction du chitosane total du mycélium de la souche *Penicillium*. Notons que le procédé adopté dans cette étude concerne celui proposé par Nwe et Stevens (2002) pour les Zygomycètes.

IV.5.3.1- Traitement alcalin des biomasses

Pour chaque biomasse déjà séchée et broyée, une quantité de 5g ayant un diamètre <850 µm a été mélangée à la solution basique d'hydroxyde de sodium 11M afin de solubiliser les protéines et autres constituants solubles en milieu alcalin (Figure 37). Les fractions AIM sont récupérées, lavées jusqu'à ce que le pH soit stable (Figure 38), puis séchées et broyées (Figure 39). Les masses des AIM obtenues pour chaque biomasse sont

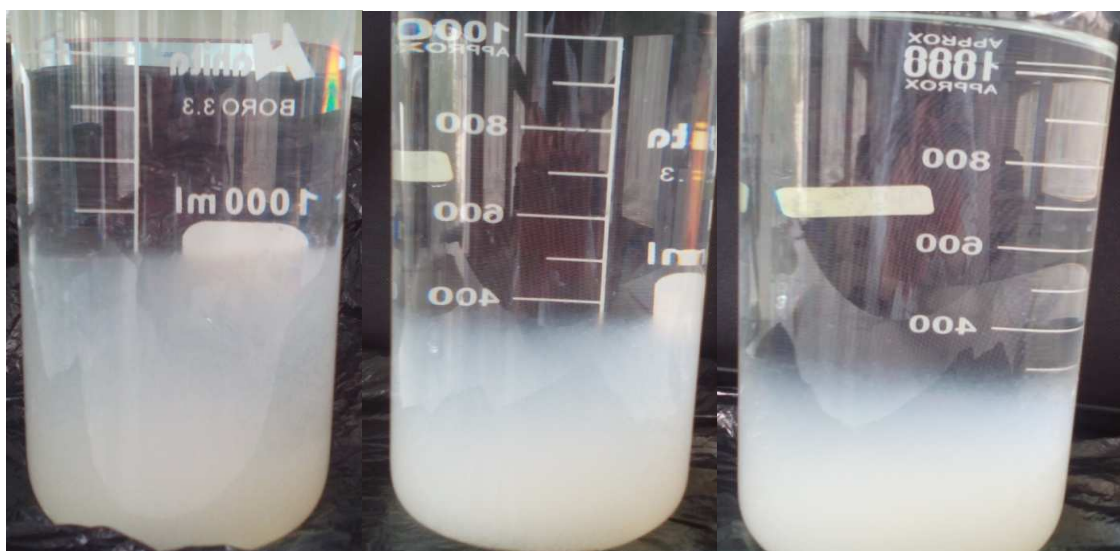
regroupées dans le tableau 15.

Surnageant coloré



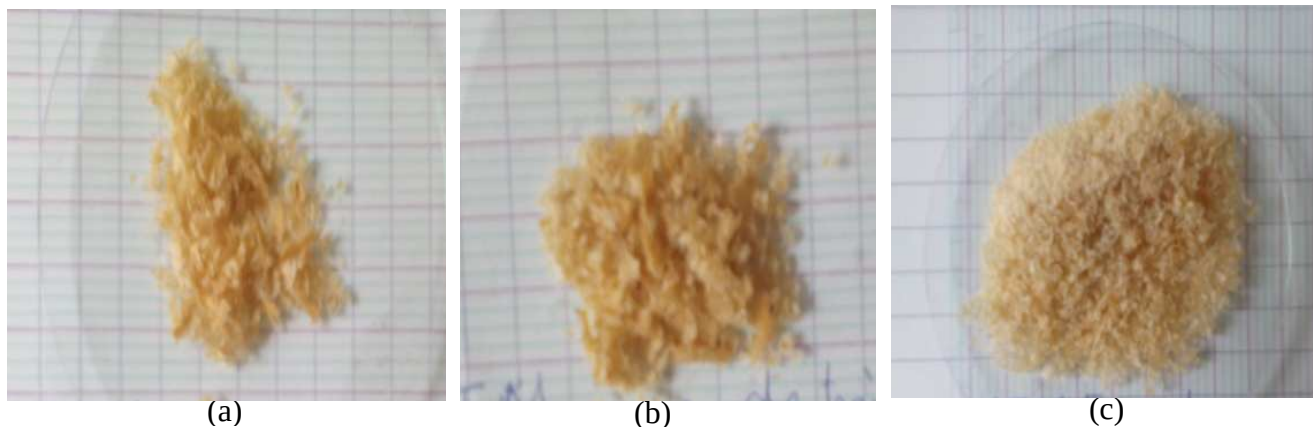
(a) (b) (c)

Figure 37: Les fractions AIM obtenues après traitement alcalin (NaOH 11M) : (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C (pH=12)



(a) (b) (c) (a)

Figure 38: Les fractions AIM obtenues après lavage jusqu'à pH 6: (a) T20°C, (b) T25°C et (c) T28°C



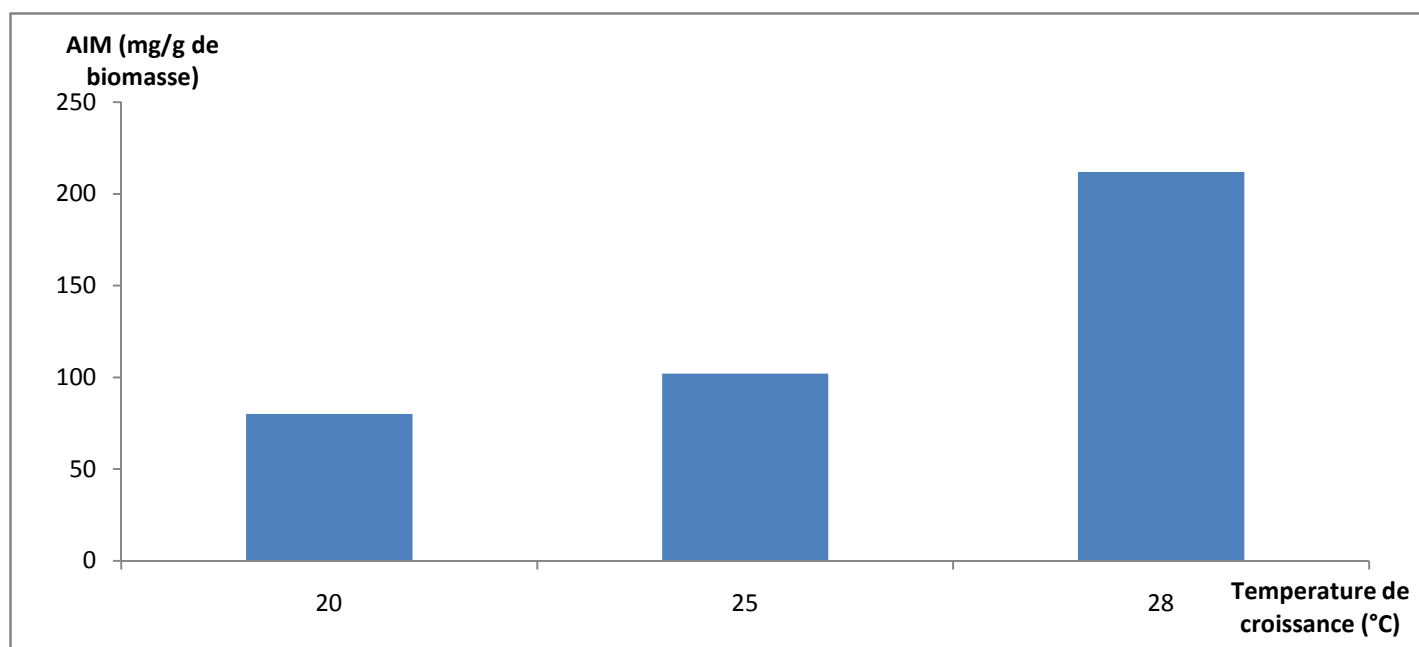
(a) (b) (c)

Figure 39: les AIM issus du traitement avec

Tableau 15: Masses des AIM obtenues de chaque biomasse après traitement alcalin (NaOH 11M

Température d'incubation (°C)	20	25	28
Masse de la fraction AIM (g)	0,40	0,51	1,06

* : pour 5 g de biomasse



La biomasse T28°C traitée par NaOH 11M a donné la quantité de AIM la plus importante avec une masse de 1,06 g, contre 0,51 g pour la biomasse T25°C, et biomasse 0,40g pour la biomasse T20°C (Figure 40). Ces résultats montrent que la moisissure *P.camemberti* développée à 20°C et 25°C synthétise plus de protéines que de polysaccharides tels que la chitine et le glucane. Ceci justifie les faibles quantités de AIM récupérés après traitement alcalin des biomasses. Tandis que, lorsque la température est moins favorable à la

Figure 40: Pourcentage des fractions AIM obtenues après traitement alcalin (NaOH 11M) des biomasses T20°C, T25°C et T28°C

croissance (28°C), le champignon synthétise des polysaccharides qui lui confère une résistance contre les contaminations entourant le mycélium et provenant du milieu extérieur.

On remarque également que les fractions AIM issues du traitement alcalin (NaOH 11M) des biomasses possèdent une couleur claire contrairement aux fractions AIM résultant du traitement alcalin (1M), car la solution basique de concentration 11M a provoqué la solubilisation totale des protéines, elles sont donc entraînées par les eaux de lavage. Tandis qu'en solution alcaline (1M), la solubilisation des protéines est partielle, la quantité restante donne la coloration aux fractions AIM.

IV.5.3.1.1- Analyse des AIM issus du traitement basique (NaOH 11M) par spectroscopie ATR et par Microscope Electronique à Balayage MEB

Les spectres d'absorption des AIM T20°C, T25°C et T28°C sont représentés sur les figures 41(a), 42(a) et 43(a), respectivement. Ces derniers sont comparés au spectre du chitosane commerciale (Figure 36(a)). Les micrographies des AIM T20°C, T25°C et T28°C sont représentées sur les figures 41(b), 42(b) et 43(b) respectivement et sont également comparées aux micrographies du chitosane commercial (Figure 36(b)).

L'attribution des principaux pics d'absorption des fractions AIM T20°C, T25°C et T28°C est regroupée dans le tableau 16.

Bandes d'absorption IR (cm ⁻¹)				Attribution
AIM T20°C	AIM T25°C	AIM T28°C	Chitosane commercial	
3356,06	3351,20	3319,74	3356,47	ν O-H et ν N-H
2924,01 ; 2850,72 et 1419,57	2919,64 ; 2850,15 et 1420,16	2920,37 ; 2846,49 et 1422,36	2859,83 et 1421,50	ν C-H et δ C-H
1639,45	1646,18	1643,99	1659,85	Amide I : ν C=O
1578,66	1576,69	1576,69	1575,05	ν NH ₂
1367,50	1372,62	1366,03	1369,13	δ CH ₂ et δ CH ₃
1309,63	1314,10	1314,10	1317,65	Amide III : ν C-N

Tableau 16: Principale bandes d'absorption des fractions AIM issues du traitement alcalin (NaOH 11M) des biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C

δ : vibration de déformation, v: vibration de valence

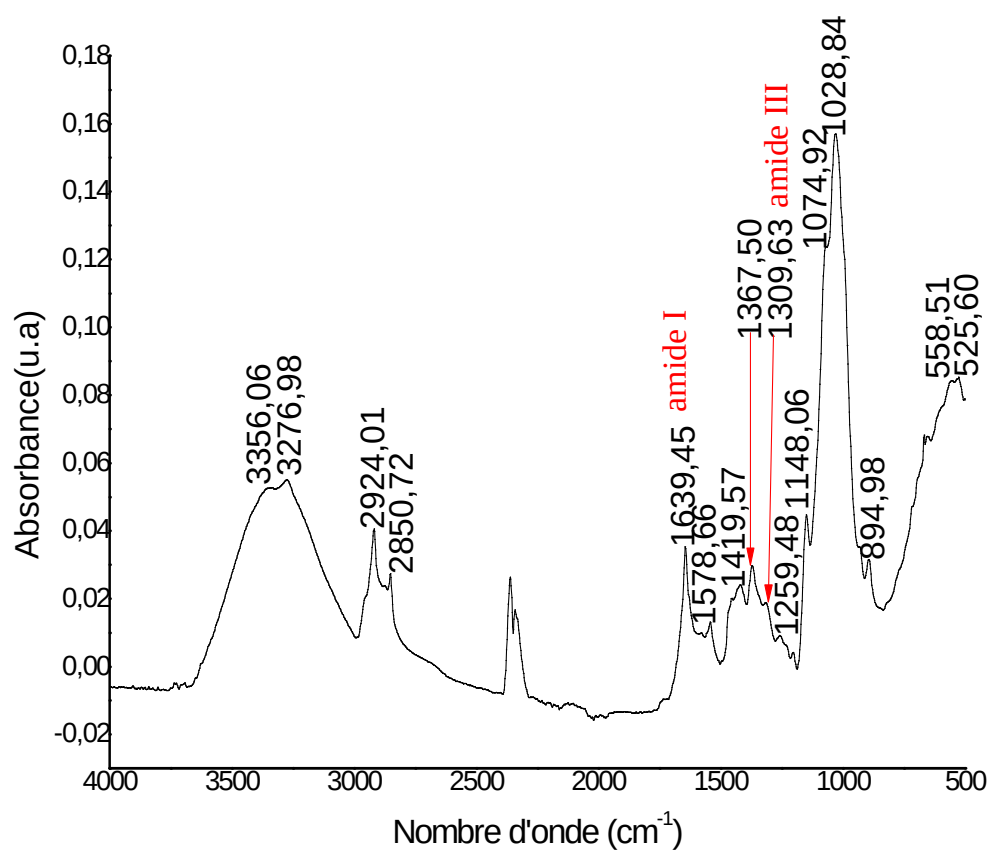


Figure 41 (a) : Spectre ATR de la fraction AIM T20°C

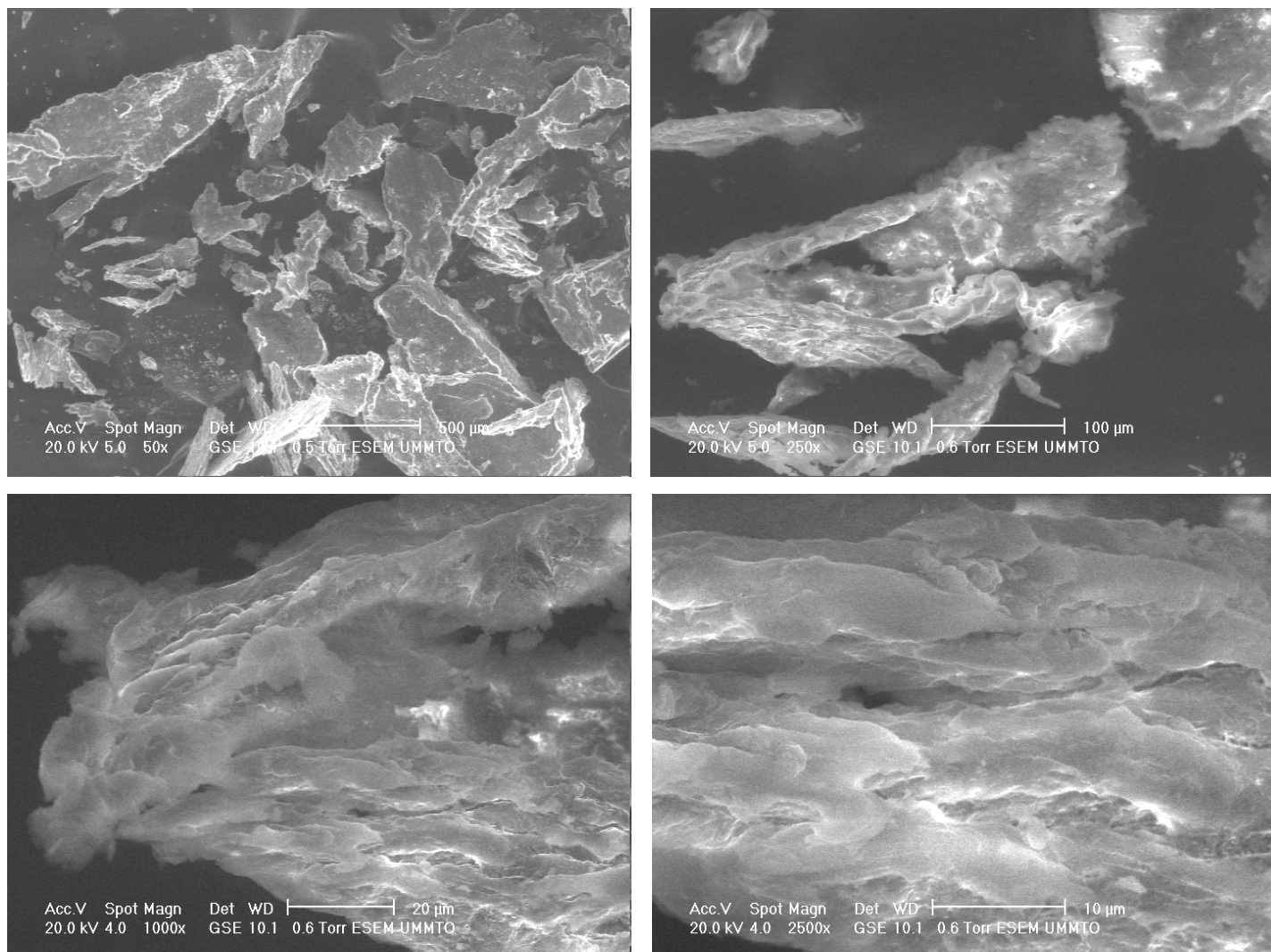


Figure 41(b) : Micrographie MEB de la fraction AIM T20°C

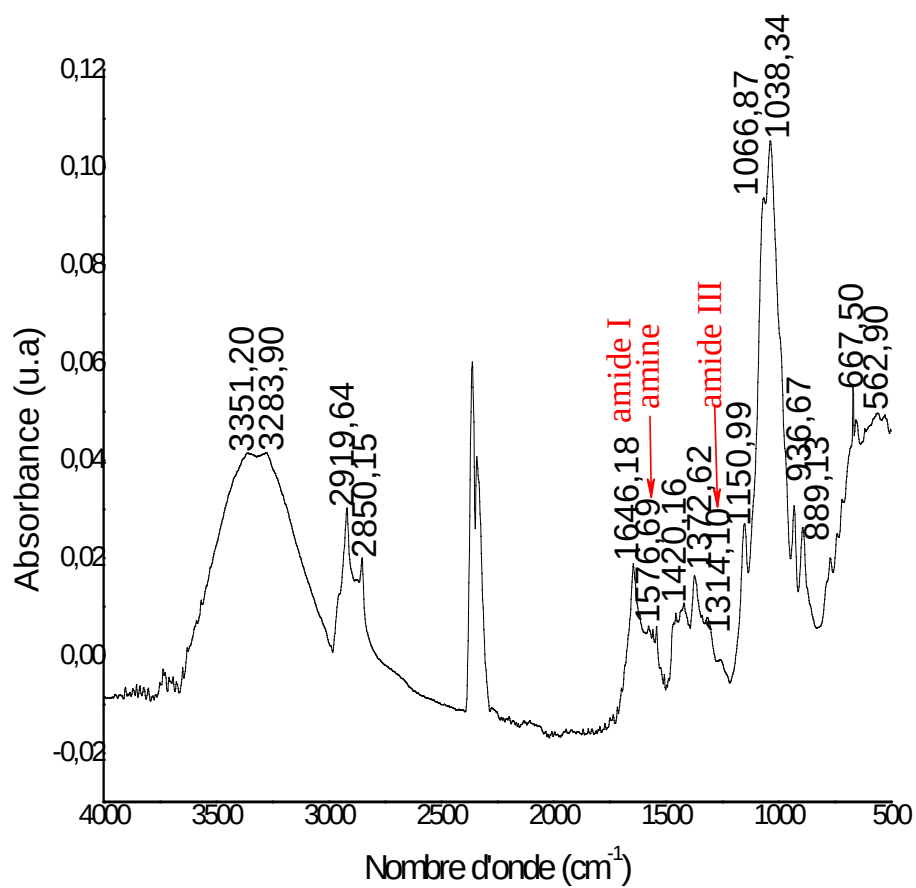


Figure 42 (a) : Spectre ATR de la fraction AIM T25°C

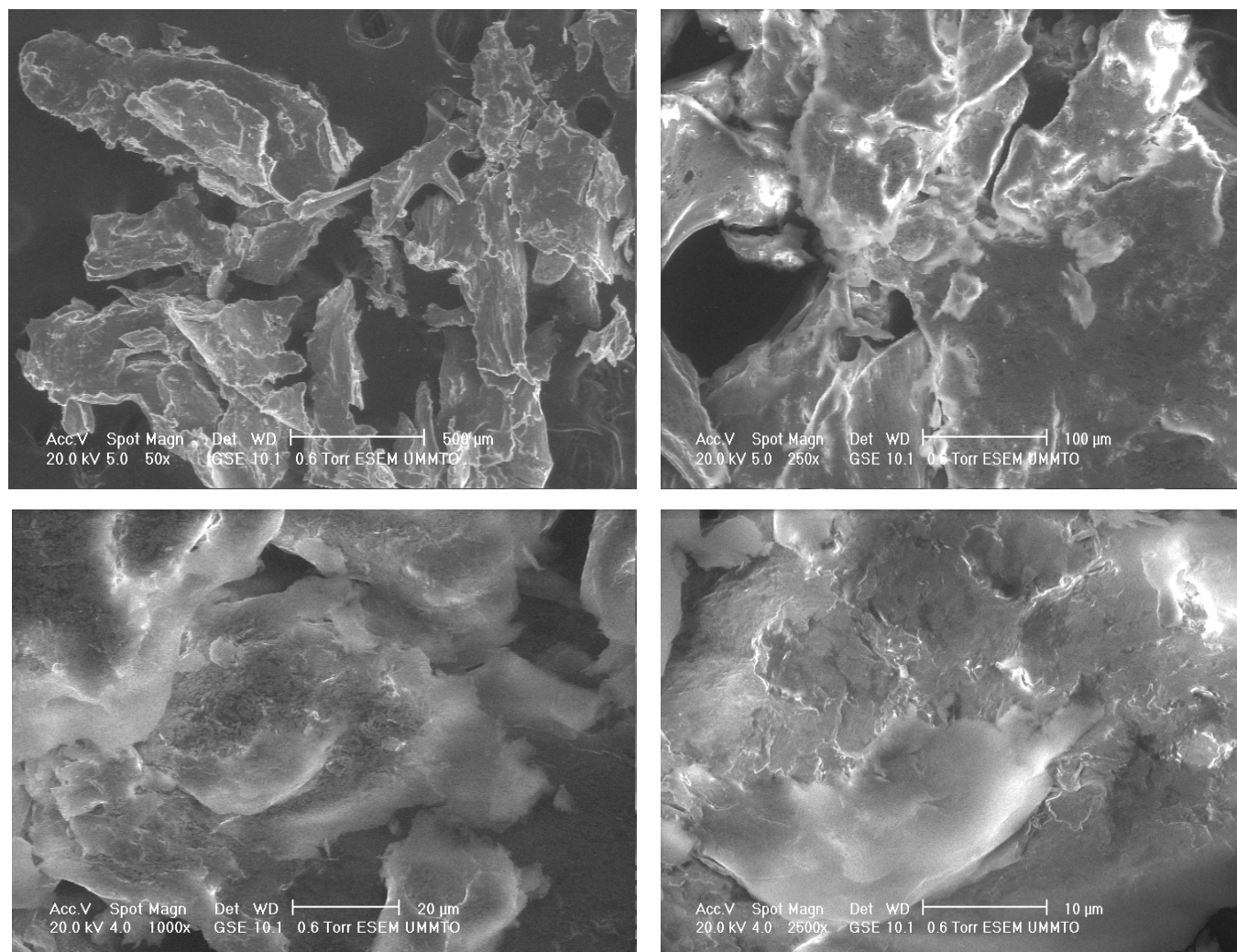


Figure 42 (b) : Micrographie MEB de la fraction AIM T25°C

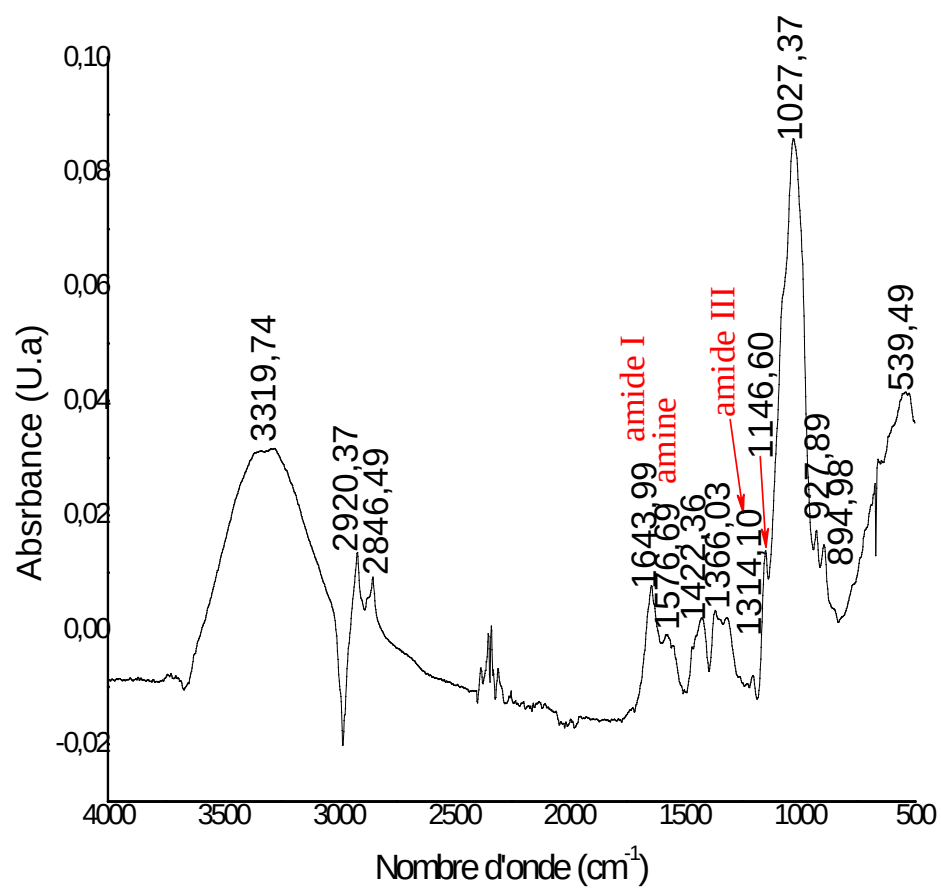


Figure 43 (a) : Spectre ATR de la fraction AIM T28°C

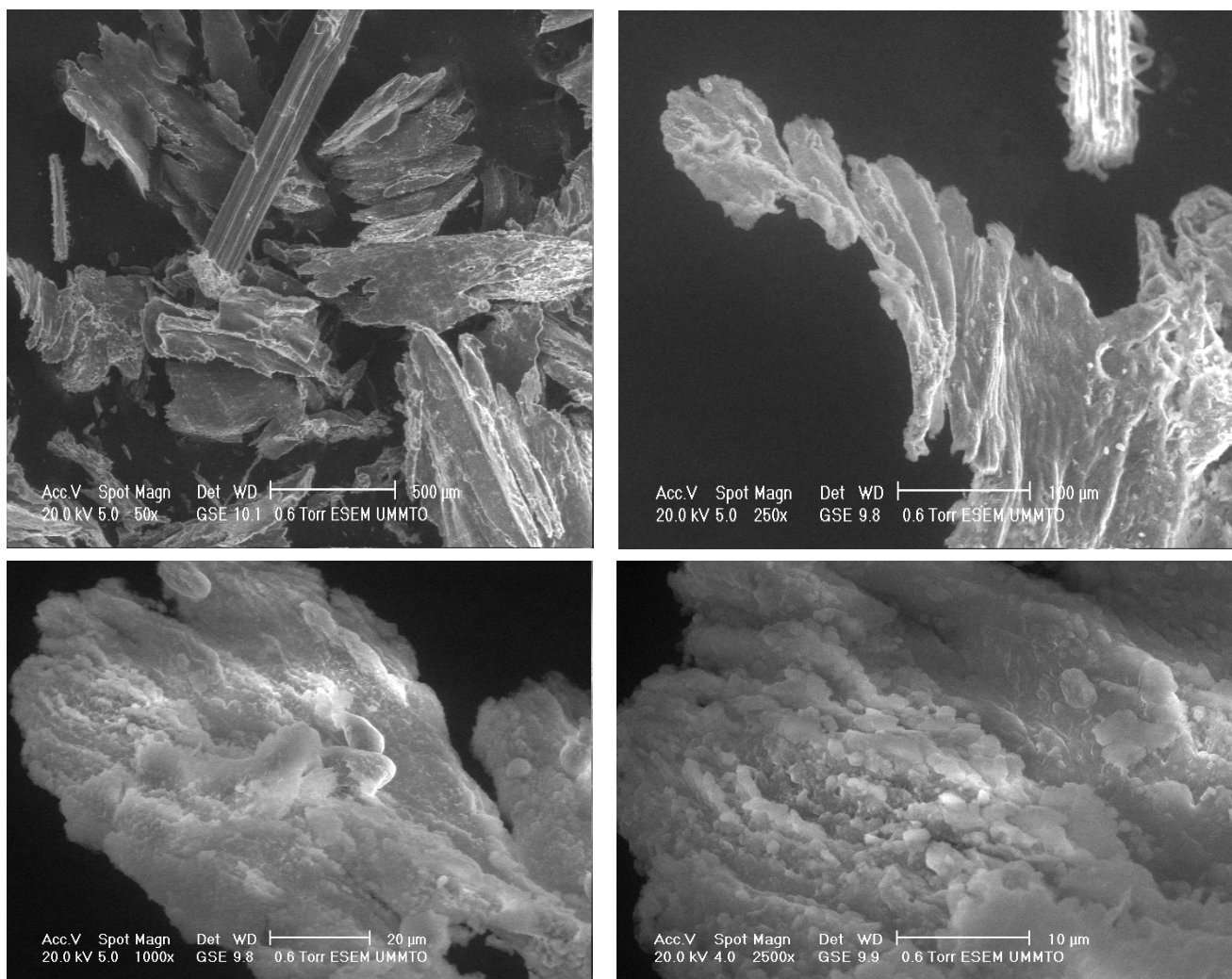


Figure 43 (b) : Micrographies MEB de la fraction AIM T28°C

IV.5.3.1.1.1- Interprétation des spectres ATR des fractions insolubles AIM**Pour le spectre de AIM T20°C**

- La bande à $3356,06\text{ cm}^{-1}$ est caractéristique des vibrations de valence des fonctions O-H et N-H du chitosane
- Les pics à $2924,01$ et $2850,72\text{ cm}^{-1}$ correspondent aux vibrations de valence des liaisons C-H du chitosane, et le pic à $1419,57\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de déformation des mêmes liaisons.
- Le pic fin à $1639,45\text{ cm}^{-1}$ est attribué aux vibrations de valence du groupement C=O de l'amide I du chitosane, avec un léger déplacement et un affaiblissement de l'intensité d'absorption par rapport au pic observé sur le spectre de la biomasse T20°C à $1641,38\text{ cm}^{-1}$.
- Le pic à $1578,66\text{ cm}^{-1}$ est caractéristique des vibrations de valence du groupement amine qui caractérise le chitosane, ce pic est absent sur le spectre de la biomasse T20°C
- Disparition du pic caractéristique de l'amide II, qui est probablement masqué par les ramifications du glucane.
- Les pics à $1367,50$ et à $1309,63\text{ cm}^{-1}$ correspondent respectivement aux vibrations de déformation de $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$ et aux vibrations de valence des liaisons C-N de l'amide III
- L'apparition des pics à $1148,06$ et $1074,92\text{ cm}^{-1}$ est due aux vibrations de valence des liaisons C-O-C et des liaisons C-C. Le pic à $1028,84\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de valence des liaisons C-O-H.

Pour le spectre de AIM T25°C

- La bande à $3351,20\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de valence des fonctions O-H et N-H du chitosane.
- Les deux pics de faible intensité à $2919,64$ et $2850,15\text{ cm}^{-1}$ sont attribués aux vibrations de valence des liaisons C-H, et le pic à $1420,26\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de déformation des liaisons C-H.
- La liaison C=O (amide I) est aussi présente avec un déplacement vers $1646,18\text{ cm}^{-1}$ et une diminution de l'intensité d'absorption par rapport au pic à $1635,59\text{ cm}^{-1}$ qui apparaît sur le spectre de la biomasse T25°C.
- Le pic de faible intensité qui apparaît à $1576,69\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations du groupement amine, ce pic qui est propre au chitosane n'apparaît pas sur le spectre de la biomasse T25°C. On note l'absence du pic caractéristique de l'amide II.

- L'apparition du pic de faible intensité à $1372,62$ et $1314,10\text{ cm}^{-1}$ est due respectivement aux vibrations de déformation des liaisons $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$ et aux vibrations de valence des liaisons C-N de l'amide III.
- Les pics qui apparaissent à $1150,99$ et $1066,87\text{ cm}^{-1}$ sont dus aux vibrations de valence des liaisons C-O-C et C-C. Le pic à $1038,34\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de valence des liaisons C-O-H.

Pour le spectre de AIM T28°C

- La bande à $3319,74\text{ cm}^{-1}$ est caractéristique des vibrations de valence des fonctions O-H et des fonctions N-H du chitosane
- Les pics à $2920,37$ et $2846,49\text{ cm}^{-1}$ sont attribués aux vibrations de valence des liaisons C-H, et le pic à $1422,36\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de déformation des liaisons C-H du chitosane.
- La bande de vibration de valence qui apparaît sur le spectre à $1643,99\text{ cm}^{-1}$ est attribuée à la présence des liaisons C=O (amide I) du chitosane avec un déplacement et un affaiblissement de l'intensité d'absorption par rapport au pic à 1636 cm^{-1} sur le spectre de la biomasse T28°C.
- Le pic de faible intensité qui apparaît à $1576,69\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de valence du groupement amine, il est absent dans le spectre de la biomasse T28°C, mais le pic caractéristique des vibrations de l'amide II n'apparaît pas sur ce spectre
- Les pics à $1366,03$ et $1314,10\text{ cm}^{-1}$ correspondent respectivement aux vibrations de déformation des liaisons $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$ et aux vibrations de valence des liaisons C-N de l'amide III du chitosane
- Le pic à $1146,60\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de valence des liaisons C-O-C et C-C, le pic intense qui apparaît à $1027,37\text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations de valence des liaisons C-O-H.

Les trois spectres des fractions AIM T20°C, T25°C et T28°C sont identiques. Ils ne ressemblent ni au spectre du chitosane commercial, ni au spectre de la chitine libre. On remarque l'absence du pic caractéristique du groupement de l'amide II sur les spectres des fractions AIM, celui-ci est probablement masqué par les ramifications du glucane. On note également que l'intensité d'absorption du groupement amine observé sur les trois spectres est moins importante que celle de l'amine du chitosane commercial (chitosane libre). Ces différences sont évidentes, car les fractions AIM obtenues avec NaOH 11M contiennent du

chitosane lié au glucane, tandis que le chitosane commerciale est un chitosane libre. La présence de la fonction amine dans les spectres des AIM confirme que, pratiquement, toute la chitine présente dans la paroi du champignon *Penicillium camemberti* (démontrée dans la 1^{ère} partie de l'étude), sous sa forme libre ou lié au glucane est désacétylé sous l'effet de NaOH concentré (11M).

IV.5.3.1.1.2-Interprétation des micrographies MEB des fractions insolubles AIM

Les micrographies MEB des AIM issue du traitement alcalin (NaOH 11M) des biomasses cultivées à T20°C, T25°C et à T28°C montrent une structure moins cristalline très similaire à celle du chitosane commercial.

IV.5.3.2-Traitement acide des fractions insolubles AIM

A partir de 0,3g de chaque AIM séché, le traitement avec l'acide acétique 2% a formé une suspension de AIM (Figure 44) présentant une forte turbidité supérieure à 800 NTU.

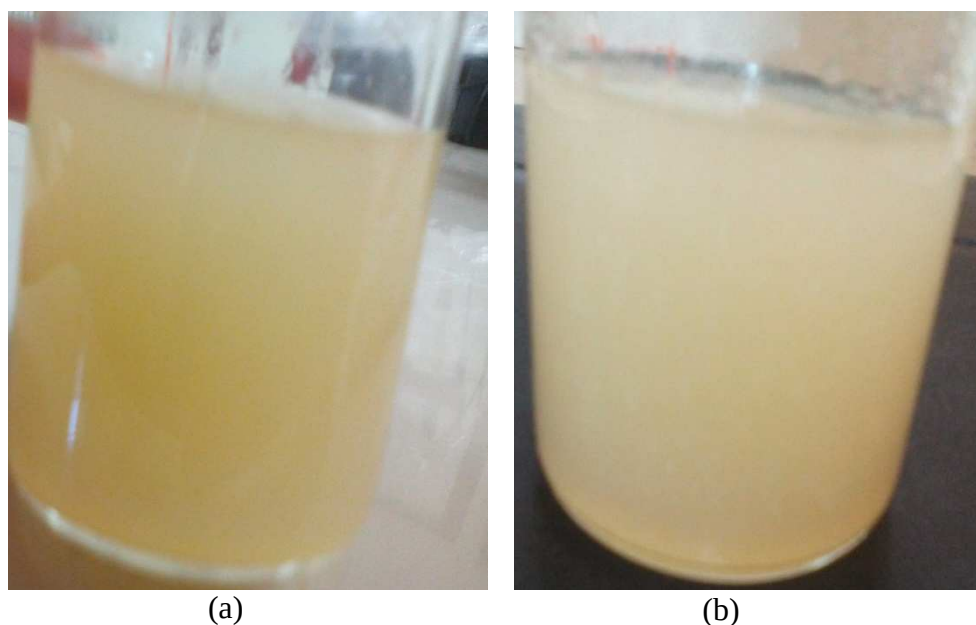


Figure 44: Suspensions de AIM obtenues après le reflux acide des fractions AIM (pH=5, turbidité >800 NTU)

Le trouble observé après traitement acide des fractions AIM est dû à la présence du complexe chitosane-glucane, du chitosane et du glucane dans la suspension. Ce résultat a été obtenu dans les travaux de Nwe et Stevens (2002).

IV.5.3.3- Séparation des fractions solubles et insolubles dans le milieu acide

La séparation par centrifugation a produit un surnageant transparent et un précipité de couleur marron. Ce dernier a été lavé jusqu'à pH stable puis séché à 40°C et pesé. Le surnageant a subi un ajustement du pH jusqu'à 9-10 à l'aide de NaOH 2M, le précipité ainsi obtenu est lavé jusqu'à pH stable puis séché à 40°C et pesé. Les masses des deux précipités sont rapportées dans le tableau 17 :

Tableau 17 : Masse des précipités obtenus après centrifugation et ajustement du pH de surnageant

	Précipité obtenu après centrifugation	Précipité obtenu après l'ajustement du pH du surnageant
Masse (g)	0.007	0,025

IV.5.4- Conclusion sur l'extraction du chitosane total

Le traitement des biomasses avec NaOH 11M a permis d'obtenir des fractions AIM ayant une couleur claire, comparativement à ceux qui sont issus du traitement avec NaOH 1M. On constate donc que la solubilisation des protéines est meilleure dans un milieu alcalin concentré. Par la suite, le traitement acide des fractions AIM a donné une solution de turbidité importante (suspension stable), contrairement au premier cas où on a obtenu deux phases bien séparées. Ce résultat montre la présence du complexe chitosane/chitine glucane.

Conclusion générale

L'objectif de cette étude réside dans l'isolation du chitosane, sous forme libre et/oùlié à partir du mycélium d'un champignon comestible *Penicillium camemberti* cultivé pendant 6 jours sur milieu solide (milieu YPGA) à pH 5 par variation de la température de développement de 20°C à 28°C. Le meilleur rendement de biomasse a été obtenu pour cette souche développée à 20°C ainsi qu'à 25°C avec 11,73 g/l et 14,10 g/l respectivement, tandis qu'à 28°C, la concentration de la biomasse est de 9,77 g/l seulement.

Les rendements des fractions AIM obtenus après le traitement des biomasses avec la solution d'hydroxyde de sodium 1 M sont presque identiques. Néanmoins, la biomasse cultivée à T28°C a donné le meilleur rendement qui est de 16,33 %, suivi de la biomasse cultivée à T25°C avec 15,53% de AIM, le plus faible rendement est obtenue de la biomasse cultivée à T20°C avec 15,4% de AIM. Par la suite, la solubilisation des fractions AIM dans l'acide acétique 2% a permis de séparer les constituants de cette dernière en une fraction insoluble dans le milieu acide AAIM et une autre fraction soluble AcSM. La fraction AIM renferme 89,5% ; 89% et 88% de molécules insoluble dans l'acide acétique pour les températures de croissance T20°C, T25°C et T28°C respectivement. Les micrographies de la fraction AAIM obtenue par Microscope Electronique à Balayage sont semblables à celle de la fraction AIM, mais avec la présence d'une structure très spécifique de la chitine, cela démontre la présence de la chitine dans la paroi cellulaire du champignon *Penicillium camemberti* avec des quantités très importantes. Le rendement du précipité, qui est probablement du chitosane, obtenue par ajustement de pH de la fraction soluble dans l'acide acétique jusqu'à 9-12 par NaOH 2M est négligeable pour les températures optimales de croissance de *P.camemberti* T20°C et T25°C, et il est de 1% pour la température T28°C.

La caractérisation du chitosane récupéré par spectroscopie ATR et Microscope Electronique à Balayage MEB ainsi que le calcul du degré de désacétylation a été faite et comparée au chitosane commercial. Le spectre ATR ainsi que les micrographies MEB du chitosane extrait de la biomasse cultivée à T28°C sont différents de celles du chitosane commercial qui est d'origine marin. On a également remarqué que le chitosane qu'on a obtenu et le chitosane commercial représentent des degrés de désacétylation différents (54,46% et 76,68% respectivement), ils ont donc des propriétés différentes ce qui explique le résultat obtenu.

L'ensemble des résultats montre que la moisissure *Penicillium camemberti* cultivée à 28°C sur YPGA renferme de la chitine ainsi que du chitosane libre qui est présent en faible quantité.

Le traitement alcalin (NaOH 11M) a abouti à l'obtention des rendements de 8% ; 10,2% et 21,20% de fraction AIM pour les biomasses cultivées à T20°C, T25°C et T28°C respectivement qui ont une couleur claire par rapport à celles obtenus du traitement alcalin par NaOH 1M, cela indique la solubilisation totale des protéines et d'autres composants solubles en milieu basique et leur élimination durant l'étape de lavage. Les spectres ATR des différentes fractions AIM ainsi obtenues sont différents du spectre de la chitine commerciale ainsi que du chitosane commercial. Ce résultat montre que le traitement alcalin concentré et adopté à la biomasse fongique a permis de convertir la chitine en complexe de chitosane. En effet, il est observé l'existence d'une cristallinité dans les spectres des AIM. Le traitement acide a conduit à une suspension caractérisée par une forte turbidité (supérieure à 800NTU). Probablement, les fractions AIM issues du traitement alcalin 11M contiennent un complexe de chitosane. Selon Nwe et Stevens (2002), le traitement enzymatique est nécessaire pour rompre les liaisons glycosidiques α -(1,4) liant le chitosane au le glucane.

Dans les perspectives, une séparation du chitosane et du glucane est à envisager par traitement enzymatique. L'utilisation de l' α -amylase est préconisée par Nwe et Stevens (2002). À l'essor de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur la culture du mycélium permettant de produire des quantités plus élevées de biomasse, et les paramètres liés à la fermentation (physico-chimiques et nutritionnels) pour augmenter la quantité de fractions AIM riches en chitine/chitosane. L'optimisation par plan composite sera proposée afin de déterminer les rendements maximums, il serait également important de produire de l'enzyme α -amylase à partir du *Penicillium camemberti* afin de séparer le chitosane et le glucane du complexe formé par le traitement alcalin 11M.

Références bibliographiques

- Aiba, S., 1991.** Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. *Int J BiolMacromol.* 13 (1):40-4.
- Agrawal, K. G., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A., Saji, H., 2002.** Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiol. Bioch.* 40 (1): 1061-1069.
- Aguilar-Uscanga, B., & Francois, J.M., 2003.** *Letters in Applied Microbiology.* 37 (1): 268-274.
- Araki, Y., Ito, E., 1975.** A pathway of chitosan formation in *Mucorrouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.* 55 (1): 71-78.
- Azuma, M., Levinson, J.N., Page, N. & Bussey, H., 2002.** *Saccharomyces cerevisiae* Big1p, a putative endoplasmic reticulum membrane protein required for normal levels of cell wall β -(1, 6)-glucan. *Yeast.* 19(1): 783-793.
- Barreto-Bergter, E. & Gorin, P.A.J. (1983).** Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. In: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*; Tipson, R.S. & Horton, D., Eds.; Academic Press: New York; Vol. 41; pp. 67-103.
- Bartnicki-García, S., 1966.** Chemistry of hyphal walls of *Phytophthora*. *J. Gen. Microbiol.* 42 (1): 57-69.
- Bartnicki-García, S., 1968.** Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22:87-108.
- Bell, D.J. & Northcote, D.H., 1950.** The structure of a cell-wall polysaccharide of baker's yeast. *J. Chem. Soc.* 1944-1947.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C. & Fallik, E., 2003.** Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop. Prot.* 22: 285-290.
- Berth, G., Dautzenberg, H. & Peter, M.G., 1998.** Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation. *Carbohydrate polymers.* 36: 205-218.
- Billmeyer, F. W., 1971.** Solution viscosity and molecular size. In *text book of polymer Science.* Wiley-Interscience, New York, 84-89.
- Biserte, G., Boolanger, P., Mandel, P., Polonovski J. & Tayeau, F., 1977.** *Biochimie médicale* .Ed: Masson. 60-73.
- Bizet, C., Desobry, S., Fanni, J. & Hardy, J., 1997.** Composition and physical properties of the *Penicillium camemberti* mycelium. *Lait.* 77 : 461-466.
- Boiron, P., 1996.** *Organisation et Biologie des champignons.* Edition Nathan p.149.

Références bibliographiques

- Botton, B., Breton, A., Febre, M., Goutier, S., Gay, P.L., Larent J., Reymont, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y. & Veau P., 1990.** Moisissure utile et nuisibles, importance industrielle 2^{ème} édition. 419-35.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P., 1999.** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.
- Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. & Zucca J., 1989.** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. 216-244.
- Bowman, S. M., Free, S. J., 2006.** The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bio essays. 28:790-808.
- Bruneton, J., 1999.** Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes médicinales) 3^{ème} édition : Tec et Doc. Paris. 34-102.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J. & Rinaudo, M., 2001.** An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polym. 42(8): 3569-3580.
- Bulawa, C.E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W.L., Jr. & Robbins, P.W., 1986.** The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. Cell. 46: 213-225.
- Cabib, E., Roh, D.H., Schmidt, M., Crotti, L.B. & Varma, A., 2001.** The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. J Biol Chem. 276: 19679-19682
- Cerning J., Gripon, J.C., Lamberet, G. & Lenoir, J., 1987.** Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. Lait. 67(1): 3-39.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A. K., Chatterjee, B. P., 2004.** Chitosan from *Mucortouxii*: production and physico-chemical characterization. Process Biochem. 2004, in press.
- Chatterjee S, Adhya M, Guha, A. K. & Chaterjee, B. P., 2005.** Chitosan from *Mucorrouxii*: Production and physico-chemical characterization. Process Biochem. 40:395-400.
- Chen, R.H. & Tsaih, M.L., 1998.** Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosan in dilute HCl solution. Int. J. Bio. Macromol. 23: 135-141.
- Chen, J. L. & Zhao, Y., 2012.** Effect of Molecular Weight, Acid, and Plasticizer on the Physicochemical and Antibacterial Properties of β -Chitosan Based Films. J. Food Science. 77(5): 127-136.
- Choi, W.J., & Cabib, E., 1994.** The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthetases. Anal Biochem. 219 : 368-372.

Références bibliographiques

- Choisy, C., Gueguen, M., Lenoir J., Schmidt,J.L. &Tourneur, C., 1984.** L'affinage du fromage.1. Les phénomènes microbiens. In : *Le Fromage*, éd. A. Eck, Lavoisier Paris.259-290.
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. &Thireos, G., 1996.**Two sporulation-specific chitin deacetylaseencoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271: 31420-31425.
- Crini, G., Badot, P.M., Morin-Crini, N., 2009.**Traitement des eaux par du chitosane : intérêts, méthodes et perspectives, re126, 2.
- Crestini, C., Kovac, B., Giovannozzi-Sermanni,G., 1996.** Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinusedodes*. *Biotechnol. Bioeng.* 50 : 207-210.
- Davet, P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. 52-57.
- Dolezalek,J. &Minarik,R., 1968.** Influence de l'acidité du milieu et de la présure sur l'activité enzymatique de *Penicillium camemberti* et de *Penicillium nalgiovensis*. *Sb. Vys. Sk. Chem. Technol. pro Potrav*, t. XX. 66-67.
- Délattre Cédric.,2005.** Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de gluconate, pdf, 4-11
- Desmazeaud, M.J., Gripon,J.c., Le Bars, D.,Bergère, J.L., 1976.** Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. III. Influence des microorganismes.*Lait*.57: 379-396.
- Domszy, J. G., Roberts, G.A. F., 1985.** Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. *Makromol Chem.* 186:1671–7.
- Dugal, S., Gangawane, M.,2012.**Metal tolerance and potential of *Penicillium* species for use in mycoremediation.*J. Chemical and Pharmaceutical Research.* 4 (5):2362-2366.
- Ehrlich, H., Krautter, M., Hanke, T., Simon, P., Knieb, C., Heinemann, S. &Worch, H., 2007.**First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part II. Glass sponges (Hexactinellida: Porifera). *J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol.* 308: 473-483.
- Fogarty, W. M. & Kelly, C. T., 1994.** *Microbial Enzymes and Biotechnology .Applied Science*, London, New York. 43:71-132.
- Fontaine, T., Simene, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M. &Latge, J. P.,2000.***Biological Chemistry J.* 275(36): 27594-27607.
- Glaouth, E. A., Arul, J., Wilson, C.&Benhamor, N.,1997.** Biochemical and cytochemical

Références bibliographiques

aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. Postharvest Biol. Tec. 12: 183-194.

Grisaro, V., Sharon, N. & Barkai-Golan, R., 1986. General Microbiology. J. 51: p. 145-150.

Gooday, G. W., 1995. Cell walls, In: The growing fungus. Chapman and Hall. 3-62.

Gow, N. A., 2011. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. Nat Rev Microbiology.

Guigrard Jean. Louis., 1996. Biologie végétale, Centre Culturel Universitaire ALGER. 96-107

Hadwiger, L. A., Kendra, D. F., Fristensky, B. W. & Wagoner, W., 1986. Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In Chitin in nature and technology. Eds.: Plenum: New York. 209-214.

Hemambika, B., Johny Rani, M. & Rajesh Kannan, V., 2011. Journal of Ecology and the Natural Environment. 3(5): 168-175.

Jaepyoung, C., Heuzey, M. C., Bégin, A. & Pierre J. C., 2006a. « Chitosan and glycerophosphate concentration dependence of solution behaviour and gel point using small amplitude oscillatory rheometry ». Food Hydrocolloids. 20 : 936-945.

Jarvis, M., 2003. Cellulose stacks up. Nature. 426: 611-612.

Julien, R., 2002. Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention*. 25(4): 7-8.

Jaworska, M. M., Konieczna, E., 2001. The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 220-224.

Jaworska, M. M., 2003. Recent Research Developments in Applied Microbiology and Biotechnology. 1: 219-231.

Kafetzopoulos, D., Martinou, A. & Bouriotis, V., 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 2564-2568.

Kannan, M., Nesakumari, M., Rajarathinam, K. & Ranjit Singh, A. J. A., 2010. Production and characterization of mushroom chitosan under solid-state fermentation. Adv. Biol. Res. 4(1): 10-13.

Karahadian, C., Josephson, D. B., 1985. Contribution of *Penicillium* sp. to the flavors of Brie and Camembert cheese, J. Dairy Sci. 68: 1865-1877.

Références bibliographiques

- Khanafari, A., Marandi, R. & Sanatei S., 2008.** Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iran J Environ Health Sci Eng.* 19-24.
- Klis, F.M., Caro, L.H.P., Vossen, J.H., Kapteyn, J.C., Ram, A.F.J., Montijn, R.C., Van Berkel, M.A.A. & Van Den Ende, H., 1997.** Identification and characterization of a major building block in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Transactions.* 25: 856-860.
- Klis, F., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S., 2002.** Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 239-256.
- Klis, F.M., 2009.** Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence. *FEMS Yeast Res.* 9(7): 1013-28.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., & Cabib, E., 1997.** Architecture of the yeast cell wall. β -(1,6)-glucan interconnects mannoprotein, β -(1,3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* 272: 17762-17775.
- Kramer, K.J., 1998.** Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 27: 887-894.
- Kubota, N., Eguchi, Y., 1997.** Facile preparation of water-soluble N-acetylated chitosan and molecular weight dependence of its water-solubility. *Polym J.* 29: 123-7.
- Kurita, K., 2006.** Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology.* 8: 203-226.
- Lamberet, G., Lenoir J., 1976.** Les caractères du système lipolytique de l'espèce *P. camemberti*. Purification et propriétés de la lipase majeure. *Lait.* (56) : 622-644.
- Larpent-Gourgau, M., Sauglier, J.J., 1992.** Biotechnologie : principes et méthodes. Biosciences et techniques, Ed. Doin, Paris. 67-42.
- Latgé, J.P., 2010.** Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* 12: 863-872.
- Laurent Legentil., 2015.** Molecular Interactions of β -(1 $\rightarrow$ 3)-Glucans with Their Receptors. *Molecules.* 20 : 9745-9766.
- Lenoir, J., 1970.** L'activité protéasique dans les fromages à pâte molle de type Camembert. *Lait. Fr.* 275 : 231-243.
- Lenoir, J., Auberger, B. & Gripon, J. C., 1979.** Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. III. Caractérisation d'une protéase acide. *Lait* 59: 244-268.
- Leveau, S. B. & Bouix, M., 1993.** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. 110-163.
- Lipke, P.N., & Ovalle, R., 1998.** Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180: 3735-3740.

Références bibliographiques

- Lo, H.F., Lin, L.L., Chen, H.L., Hsu, H.H. & Chang C.T., 2001.** Enzymatic properties of a SDSresistant *Bacillus* sp. TS-23 α -amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. *ProcessBiochemistry*.36:743-750.
- Merzendorfer, H., 2006.** Insect chitin synthases: a review. *J. Comp Physiol B*. 176: 1-15
- Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S. & Mima, S., 1980.** I.R. spectroscopic determination of CONH content in highly deacylated chitosan. *Int J BiolMacromol*. 2: 323-4.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P. & Latgé, J. P., 2000.** Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanotransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem*. 275, 14882–14889.
- Molimard P., Vassal L., Bouvier, I. & Spinner, H.E., 1996.** Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties, 1. *DairySci*. 79: 169-184.
- Moreau, C., & Moreau, M., 1963.** Observations sur la nutrition carbonée du *Penicillium caseicolum* Bainier et sur quelques facteurs affectant sa sporulation. *Ann. Sei. nat., Bot.*, 12e sér., t. IV. 3241-250.
- Moreau, C., 1979.** Quelque problème posé par les moisissures dans les industries laitières in : la technique laitier. 975:37-40.
- Muzzarelli, R. A. A., 1977.** Depolymerization of chitins and chitosans with hemicellulase, lysozyme, papain and lipase In: Muzzarelli RAA, G PM, Eds. *Chitin Handbook*. Grottamore: Eur. Chitin Society. 153-165.
- Muzzarelli, R. A. A., Tanfani, F. & Scarpini, G., 1980.** Chelating, film-forming and coagulating ability of the chitosan–glucan complex from *Aspergillus niger* industrial wastes. *Biotechnology and Bioengineering*. 22: 885–96.
- Muzzarelli, R.A.A., 1985.** Chitin in: *The polysaccharides*. Aspinall Co, ed, London: Academic press 3. 417.
- Muzzarelli, R.A.A. & Peters, M.G., 1997.** *Chitin Handbook*, ed. M.G.P. R.A.A. Muzzarelli, Grottammare: European Chitin Society.
- Nathalie, J., Jean-Marc, B., 1993.** Comparison of Volatile Flavor Compounds Produced by Ten Strains of *Penicillium camemberti* and a Horn ed., *Biotechnologie*. Dijon, France. 148-157.
- Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Paget T. & Killington, R., 2000.** L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. 210-216.
- Nigam, p., Singh, D., 1995.** Enzymes and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb. Technol*. 17(9):770-778.

Références bibliographiques

- No, K. H., Park, Y. N. Lee, H. S. & Meyers, P. S., 2002.** Antimicrobial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 65-72.
- Nwe, N. & Stevens, W. F., 2002.** Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology Letters.* 24: 131-134.
- Nwe, N. & Stevens, W. F., 2002a.** Chitosan isolation from the chitosan-glucan complex of fungal cell wall using amylolytic enzymes. *Biotechnology Letters.* 24: 1461-1464.
- Nwe, N. & Stevens, W. F., 2008.** Production of chitin and chitosan and their applications in the medical and biological sector, In: *Recent Research in Biomedical Aspects of Chitin and Chitosan*, Tamura, H. (Ed.), Research Signpost, ISBN 978-81-308-0254-1, India. 161-176.
- Nwe, N. & Stevens, W. F., 2008a.** Preparation and characteristics of chitosan scaffolds for tissue engineering, In: *Recent Research in Biomedical Aspects of Chitin and Chitosan*, Tamura, H. (Ed.), Research Signpost, ISBN 978-81-308-0254-1, India. 57-68.
- Nwe, N., Furuike, T. & Tamura, H., 2010.** Chitin and chitosan from terrestrial organisms, In: *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*, Kim, S. K. (Ed), pp. 3-10, Taylor & Francis Group LLC, ISBN 978-14-398-1603-5, Florida.
- Orlowski, M., 1991.** *Mucordimorphism*. *Microbiol. Rev.* 55: 234-258.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R., 2000.** Advances in microbial amylases. *Biotechnology. Appl. Biochem.* 31: 135-152.
- Pitt, J.I., 1979.** The genus *Penicillium* and its teleomorphic states. *Eupenicillium Talaromyces*. Acad. Press., New York –Londre. 115-134.
- De Groot, P.W.J., Ram, A.F. & Klis, F.M., 2005.** *Fungal Genetics and Biology*. 42: 657-675.
- Pfohl-Leszkowicz, A., 2001.** Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Tec et Doc: 3-14.
- Pochanavanich, P. & Suntomsuk, W., 2002.** *Letters in Applied Microbiology*. 35: 17-21.
- Raper, K.B. & Thom, C., 1949.** A manual of the *Penicillia*. Hafner Publ, Co. New York – Londres. p.34.
- Rane, K.D. & Hoover, D.G., 1993.** *Food Biotechnology*. 7(1): 11-33.
- Rinaudo, M. & Domard, A., 1989.** Solution properties of chitosan. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P, editors. *Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*. London and New York: Elsevier. 71–86.
- Rinaudo, M., Pavlov, G. & Desbrières, J., 1999.** Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*. 40: 7029–32.

Références bibliographiques

- Rinaudo, M., 2008.** « Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials ». *Polymer International*. 57(3): 397-430.
- Rinaudo, M., 2007.** « Properties and degradation of selected polysaccharides: hyaluronan and chitosan ». *Corrosion engineering, science and technology*. 42(4): 324-334.
- Robson, G., 1999.** Hyphal cell biology, In: *Molecular fungal biology*, University Press, Cambridge. 84-164.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A. & Bussey, H., 1994.** Characterization of the yeast (1-6)- β -glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell. Biol.* 127: 567-579.
- Rueg, G. & Blanc, C., 1966.** In : *Les enzymes, production et utilisation industrielles*. Durand G., Monson P. Editions Gauthier. Villars, Paris. 110-180.
- Ruiz-Herrera, J., 1991.** Biosynthesis of β -glucans in fungi. *Antonie Leeuwenhoek*. 60: 72-81.
- Ruiz-Herrera, J., 1992.** *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis and Assembly*. Boca Raton, FL: CRC Press. 239-333.
- Ruiz-Herrera, J. & San-Blas, G., 2003.** Chitin synthesis as target for antifungal drugs.
- Samson, R.A., Eckalorolt, C. & Orthe, R., 1977.** The taxonomy of *Penicillium* species for fermented cheese. *Henkel et cie GmbH, dept of microbiology D- 4000 Düsseldorf*. 341-350.
- Seng, J.M., 1988.** Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie. *Biofutur*. 9: 40-44.
- Sentandreu, R., Mormeneo, S. & Ruiz-Herrera, J., 1994.** Biogenesis of fungal cell wall. In: *Wessels JGH. and Meinhardt F (Eds). The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality*. Berlin: Springer. 111-124.
- Shahinian, S. & Bussey, H., 2000.** β -1 $\rightarrow$ 6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35: 477-489.
- Shibuya, N. & Mimami, E., 2001.** Oligosaccharide signaling for defense responses in plant. *Physiol. Mol. Plant P.* 59: 223-233.
- Sicard, P., 1982.** Applications industrielles des enzymes ; In : *Les enzymes, production et utilisation industrielles*. Durand G., Monson P. Editions Gauthier. Villars, Paris. 110-180.
- Sietsma, J. H. & Wessels, J. G. H., 1977.** Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochim. Biophys. Acta*. 496: 225-239.
- Sudharshan, N. R., Hoover, D. G. & Knorr, D., 1992.** Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.* 6: 257-272.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N. A. A. Q., 1997.** Mycelia of *Mucor Rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chem.* 60 (4): 605-610.

Références bibliographiques

- Sun, X., Liu, Z., Qu, Y. & Li, X., 2007.** The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicillium decumbens*. Appl. Biochem. Biotech. 3: 119-128.
- Smits, G.J., Van den Ende, H., & Klis, F.M., 2001.** Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. Microbiology. 147: 781-794.
- Tan, S C., Tan, T.K., Wong, S.M. & Khor, E., 1996** Carbohydrate Polymers. 30: 239-242
- Taylor, F., 1995.** Blue cheese flavor production by submerged fermentation with monitoring by HPLC chromatography. Journal of Industrial Microbiology. 15: 71-74.
- Teng, W. L., Khor, E., Tan, T. K., Lim, L. Y. & Tan, S. L., 2001.** Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. Carbohydr. Res. 332: 305-316.
- Tiwari, K.L., Jadhav, S.K. & Fatima, A., 2007.** Culture condition for the production of thermostable amylase by *Penicillium rugulosum*. Global journal of Biotechnology and Biochemistry. 2(1): 21-24.
- Takamine, E.N., 1894.** In Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson, Paris. 41(48): 210-220.
- Taseli, B. K. & Gokcay, C. F., 1999.** Biological treatment of paper pulping effluents by using a fungal reactor. Water Sci Technol. 40: 93-9.
- Thanou, M., Junginger, H. E., 2005.** Pharmaceutical applications of chitosan and derivatives. In: Dumitriu S, editor. Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility. 2nd edition. New York: Marcel Dekker Publ. 661-77.
- Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. & Kaneda M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. Biol. Chem. 382: 1509-1513.
- Wagner, S. L., 1983.** Clinical toxicology of agricultural chemicals. Noyes Data Corporation.
- Wang, W. & Xu, D., 1994.** Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan and different degree of deacetylation. Int. J. Bio. Macromol. 16 (3).
- Wessels, J. G. H., 1994.** Developmental regulation of fungal cell wall information. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 413-437.
- Wessels J. G. H & Sietsma, J.H., 1981.** Fungal cell walls: a survey. In W Tanner and FA Loewus (Eds), Encyclopedia of Plant Physiology, New series. Plant Carbohydrates. Springer, Berlin, Germany. 138: 352-394.
- Wessels, J.G.H. & Sietsma, J.H., 1982.** Fungal cell walls: a survey. In: *Encyclopedia of plant physiology*; Pirson, A. & Zimmermann, M.H., Eds.; Springer Verlag: Berlin. 13: 352-394.

Références bibliographiques

Wessels, J.G.H., Mol, P. C., Sietsma, J.H. & C.A., 1990. Vermeulen, Wall structure, wall growth, and fungal cell morphogenesis, in Biochemistry of cell walls and membranes in fungi, A.P. J.T. P.J. Kuhn, M.J. Jung, M.W. Goosey, L.G. Copping, Editor. Springer-Verlag: Berlin. 81-95.

White, S. A.; Farina, P. R.; Fulton, I., 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. Appl. Environ. Microb. 38(2): 323-328.

Yihan, L., Fuping, L., Guanqun, C., Crystal, L., Snyder, J., Sun, Y. U. L., Jianling. W. & Jing, X., 2010. High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium temperature α -amylase from *Bacillus subtilis*. Biotechnology Letters. 32:119–124.

Résumé

Dans le cadre de notre étude, nous avons appliqué le procédé proposé par les auteurs Rane et Hoover (1993), Cristini et ses collaborateurs (1996), afin d'extraire la chitine et le chitosane libre du mycélium du champignon comestible *Penicillium camemberti*. Nous avons également appliqué le procédé de Nwe et Stevens (2002) pour la mise en évidence de la présence du complexe chitosane-Glucane dans la paroi cellulaire de cette espèce fongique. L'optimisation du paramètre de la température de croissance a été effectuée : 20°C, 25°C et 28°C. Les résultats ont montré que le meilleur rendement de fractions insolubles en milieu alcalin (NaOH 1M et 11M) est obtenu de la biomasse cultivée à 28°C où la croissance mycélienne n'est pas la plus élevée. La suspension stable obtenue après traitement acide des fractions insolubles AIM issues du traitement basique (NaOH 11M) a permis de démontrer la présence du complexe chitosane-glucane dans la paroi de l'espèce fongique *P. camemberti*. Le rendement le plus élevé du chitosane libre est obtenu de la biomasse cultivée à 28°C.

Mots clés : *Penicillium camemberti*, mycélium, extraction, chitosane-glucane, chitosane libre.

Abstract

The objective of this study was, in one hand, to extract free chitosan from the mycelium of the moisture *Penicillium camemberti* grown at different temperatures 20°C, 25°C and 28°C by using the procedure proposed by Rane and Hoover (1993), Cristini and its collaborator (1996). In other hand, the objective was to extract the chitosan bonded to β -glucan and the free chitosan from the same moisture by using the procedure of New and Stevens (2002). The results showed that the best yield of Alkaline Insoluble Material AIM was obtained from the treatment of the biomass grown at 28°C by NaOH (1M and 11M). The turbid suspension obtained after acid treatment of the AIM resulted in alkaline treatment with NaOH 11M showed the presence of the chitosan-glucan complex in the cell wall of *Penicillium camemberti*. According to our results, the best yield of free chitosan was obtained from *P. camemberti* which is growing at 28°C. While, the yield of this biopolymer was very low for both temperatures of growth 20°C and 25°C.

Keywords: *Penicillium camemberti*, mycelium, extraction, free chitosan, chitosan-glucan.