

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

THEME

**Optimisation de la production de la biomasse
fongique par le plan composite centre (P.C.C)**

Présenté par : M^{elle} LEFKI Ouerdia et M^{elle} NEZLOUI Fatma

Soutenu publiquement, le 09/07/2018, devant le Jury composé de :

M^{me} DERMECHE Samia MAA UMMTOPRESIDENTE

M^{me} ADOUR Lydia PROFESSEUR U.d'Alger 1PROMOTRICE

M^f LATEB Yacine

MAA UMMTO EXAMINATEUR



Remerciements

Avant tout, je remercie dieu tout puissant de nous avoir donné la volonté, le courage et la patience pour terminer ce travail.


Nous remercions notre promotrice M^{me} ADOUR Lydia, professeur à l'université d'Alger 1 de nous avoir permis de travailler sur ce thème ainsi que ses orientations et ses précieux conseils.

Nous remercions notre Co-promotrice M^{me} ALI Dilia, de nous avoir guidés et pour tous les conseils indispensables et surtout sa disponibilité permanente. Ce travail n'aurait pas été fait sans ses orientations.

Nous remercions M^{me} DERMECHE Samia (MAA à l'université de Mouloud MAMMERRI, Tizi-Ouzou) de nous avoir fait l'honneur d'être la présidente de notre jury.

Nous remercions Mr LATEB Yacine (MAA à l'université de Mouloud MAMMERRI, Tizi-Ouzou) pour avoir accepté de faire partie de notre jury.

Nous remercions les ingénieurs du laboratoire pédagogiques de chimie de l'environnement, pour nous avoir permis d'effectuer nos analyses, et d'avoir mis à notre disposition le matériels nécessaire et particulièrement pour leurs conseils et leur gentillesse tout au long de notre pratique



Dédicace

Je dédie ce travail à:

Celle qui tient le paradis sous ses pieds, à mon ange, à ma

chère **mère** qui m'a entouré avec sa tendresse,

Mon cher **père** qui m'a beaucoup aidé avec son soutien tout

au long de mes études,

A mes chères sœurs : ***Malika, Nadja, Hayat, Samia***

et **frères** ainsi qu'à toute ma famille.

A ***Mouloud*** qui m'a beaucoup soutenu

A mes amies, ***Hayat, Nadia B, Djohar, Nadia C, Kahina***

Et tous mes Amis sans exception.

FATMA

Dédicace

Je dédie ce travail à:

Celle qui tient le paradis sous ses pieds, à mon ange, à ma

chère **mère** qui m'a entouré avec sa tendresse,

Mon cher **père** qui m'a beaucoup aidé avec son soutien tout

au long de mes études,

A ma chère sœur : ***Kahina***

A mes chers **frères** : moumouh et digou

A ma chère tante : houria

A mes amies, ***Amira , Nouara , Sabrina, Jami O, Fatima, Rokia et***

Samira

Et tous mes Amis sans exception.

Dalila lefki

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1
PARTIE THEORIQUE	
Chapitre I : <i>Penicillium camembertii</i>	
I.1. Moisissures et <i>Penicillium camembertii</i>	3
I.2. Taxonomie et classification de <i>P. camembertii</i>	3
I.2.2. Classification du <i>Penicillium camembertii</i>	4
I.3. Structure et morphologiques du genre <i>Penicillium</i>	5
I.4. Les caractères physiologique de <i>P. camembertii</i>	6
I.4.1. Vitesse de croissance	6
I.4.3. pH de croissance du <i>Penicillium camembertii</i>	6
I.4.4. Humidité	7
I.4.5. Aération	7
I.4.6. Lumière	7
I.4.7. Exigences nutritionnelles	7
I.5. La toxicité de <i>P. camembertii</i>	8
Chapitre II : Polysaccharides fongiques	
II.1. Introduction	9
II.2. Chitine	9
II.2.1. Caractéristiques	9
II.3. Chitosane	9
II.3.1 Caractéristiques	10
II.4. Glucanes	10

II.4.1. Caractéristiques	11
II.5. Chitine-Glucane	11
II.6. Chitosane-Glucane	12
II.6.1 Caractéristiques	12
Chapitre III : Méthodes d'extractions des polysaccharides fongiques	
III.1. Description des procédés d'extraction	13
III.1.1. Procédé d'isolation du chitosane libre à partir d'une source fongique	13
III.1.2. Extraction de la chitine désacétylée	16
III.2. Les paramètres influant sur la qualité et la quantité des polysaccharides fongiques	17
III.2.1. Traitement alcalin	17
III.2.2. Traitement acide	17
III.2.3. Désacétylation de la chitine fongique	18
III.3. Application du chitosane fongiques	19
PARTIE EXPERIMENTALE	
Chapitre IV :	
IV.1. Matériel	21
IV.1.1. Matériel biologique	21
IV.1.2. Matériel de laboratoire	21
IV.1.3. Produits	21
IV.1.4. Appareillage	22
IV.2. Méthodes	22
IV.2.1. Production de la biomasses fongique par méthode de planification des expériences (P.C.C).....	22

IV.2.1.1 Présentation des plans composites centrés (P.C.C).....	22
IV.2.1.2 Production de la biomasse de <i>Penicillium camembertii</i> sur le milieu solide	23
IV.2.1.2.1. Choix des paramètres opératoires	23
IV.2.1.2.2. Culture sur milieu de <i>P. camembertii</i>	24
IV.2.2. Extraction des polysaccharides	27
IV.2.3. Etude de la désacétylation de la chitine brute	29
IV.2.4. Caractérisation des produits préparés	30
IV.2.4.1. Teste de solubilité des chitines	30
IV.2.4.2. Teste de production des billes du chitosane	30

Chapitre V : Résultat et discussion

V.1. Production des biomasses mycéliennes, des fraction (AIM, AcIM, AcSM).....	31
V.2. Production du chitosane par désacétylation de la chitine	35
V.3 : Caractérisation des produits préparés	36
V.3.1. Test de solubilité des chitines désacétylées	36
V.3.3 : Production des billes de chitosane	37

Conclusion générale

Perspectives

Références bibliographiques

Résumé

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie de <i>Penicillium camembertii</i>	6
Figure 2 : Chaîne linéaire de chitine (KARP, 1998)	9
Figure 3: Chaîne linéaire du chitosane (AIDER, 2007)	10
Figure 4: Liaison $\beta(1,3)$ et $\beta(1,6)$ d'un polysaccharide β -glucane (CHABOUD, 2012 et BADREDIN, 2008)	11
Figure 5: Complexe chitine glucane (YURY <i>et al.</i> , 2009)	12
Figure 6 : Complexe chitosane-glucane (YURY <i>et al.</i> , 2009)	12
Figure 7 : Schémade l'isolement de la chitine et du chitosane du <i>Mocur Rouxi</i> (SYNOWIECKI <i>et al.</i> , 1997).	14
Figure 8: Protocole utilisé pour la production de biomasse mycélienne de <i>P. camembertii</i> sur milieu solide (YPGA)	25
Figure 9 : Biomasse mycélienne récupérée et lavée (1 L de milieu YPGA)	27
Figure 10: Procédé adopté pour l'extraction de chitine et du chitosane libre (SYNOWIECKI <i>et al.</i> , 1997)	28
Figure 11: Schéma de la désacétylation de la chitine fongique avec et sans blanchiment Chitine DA : Chitine désacétylée.....	29
Figure 12 : Montage du chauffage à reflux pour la désacétylation de la chitine.....	30
Figure 14 : Développement de <i>P. camembertii</i> sur milieu YPGA à différentes températures : 27.5°C (a), 30 °C (b) et 32.5 °C (c)	31
Figure 15 : Biomasse séchée et broyée	31
Figure 16: Composition de la biomasse mycélienne.....	36
Figure 17 : Test de solubilité de la chitine (DA 2h) avec le blanchiment.....	37
Figure 18: Billes du chitosane fongique.....	37

Liste des tableaux

Tableaux 1 : Classification de <i>Penicilium camembertii</i> (Botton et al ;1990)	5
Tableaux 2 : Différents traitements alcalins	15
Tableaux 3 : Différents traitements acides	16
Tableaux 4 : Différents traitements désacétylation	17
Tableaux 5 : Domaines d'applications du chitosane (RINAUDO, 2006)	20
Tableaux 6 : Les paramètres opératoires étudiés ainsi que leurs domaines de variation	23
Tableaux 7 : Matrice des essais du plan Factoriel	26
Tableaux 8 : Matrice des essais au centre du domaine	26
Tableaux 9 : Les masses obtenues après les différents traitements des biomasses issues de chaque expérience de la matrice des essais du plan Factoriel.....	32
Tableaux 10 : Les masses obtenues après les différents traitements des biomasses issues de chaque expérience de la matrice des essais au centre du domaine	32
Tableaux 11 : Les rendements en chitine (AcIM) et en chitosane (AcSM) extraits des biomasses obtenues par la matrice des essais du plan factoriel	33
Tableaux 12 : Rendements en chitine et en chitosane extraits des biomasses obtenues par la matrice des essais au centre du domaine	33
Tableaux 13 : Production de la chitine désacétylée à différents temps avec et sans blanchiment	36
Tableaux 14 : Test de solubilité	36

Liste des abréviations

AcIM : Alcalin Acide Insoluble material

AcSM : Alcalin Acide soluble material

AIM: Alcalin Insoluble material

Chitine BI DA: Chitine blanchie puis désacétylée

Chitine DA : chitne désacétylée

DDA : Degrée de Désacétylation

KDa : Kilo-Dalton

O.E : Oligo-élément

P.C.C: Plan composite centre

P. camembertii : Pénicillium camembertii

PDA : Pomme de terre Glucose Agar

pH : POTONTIEL d'hydrogène

S.A : source azotée

t : Temps (durée)

T : Température

YPG : extrait de levure Peptone Glucose

YPGA : Extrait de levure Peptone Glucose Agar

Introduction Générale

La chitine est le polymère naturel le plus abondant après la cellulose, elle est composée de sous unité de N-acétyl-D-glucosamine. La chitine est principalement l'élément de structure de nombreux organismes tels que les crustacés, les insectes, les champignons et les levures. En 1859, Charles Rouget obtient une chitine modifiée, en 1894 le chimiste allemand FELIXHOPPE-SEYLER a nommé le produit par le chitosane, qui est un polysaccharide linéaire formé de plusieurs unités D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques, et de N-acétyl-D-glucosamine.

Au 19^{ème} siècle, ces deux polymères ont suscité beaucoup d'intérêt dans le monde oriental à cause de l'augmentation de leurs utilisations, en particulier dans le domaine de la protection de l'environnement. L'abondance et les propriétés intéressantes de ces derniers permettent leur utilisation dans une très grande variété d'applications (agro-alimentaire, cosmétique, biomédicale, pharmaceutique, agriculture) (MC GAHREN et al, 1984). Leurs propriétés dépendent directement de la nature des sources d'extraction.

Au cours de ces dernières années, la source fongique a gagné une attention particulière en raison du potentiel avantage par rapport aux sources marines et cela est dû à la non disponibilité des déchets de crustacés qui 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). Différents protocoles d'extraction du chitosane à partir des mycéliums fongiques ont été développés par différents chercheurs (MCGAHREN et al, 1984, ARCIDIACONO ET KAPLAN 1991, RANE ET HOOVER 1993 ; MUZZARELLI et al, 1994).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la production des polysaccharides (chitine, chitosane libre) à partir du mycélium d'un champignon choisi : *Penicillium camembertii* (moisissure non toxique, à usage comestible fréquemment utilisée dans la fabrication des fromages à pâte molle telles que: le Camembert).

Nous avons étudié l'influence des quatre paramètres variables tels que : la température, la durée, les oligo-éléments et la source azotée (rapport extrait de levure /peptone) par des plans composites centrés (PCC).

Ce mémoire s'articule autour de cinq chapitres :

Introduction Générale

- Le chapitre I est une synthèse bibliographique sur *Penicillium camembertii*.
- Le chapitre II est une synthèse bibliographique les polysaccharides fongiques
- Le chapitre III est consacré à l'étude des méthodes d'extraction des polysaccharides fongiques et les différentes applications.
- Le chapitre IV décrit l'ensemble d'appareillage utilisé et les modes opératoires suivis lors de cette étude.
- Le chapitre V sera consacré à la discussions de nos résultats

I.1. Moisissures et *Penicillium camembertii*

Les moisissures sont des micro-organismes filamenteux comportant environ 1850 genres et 15000 espèces (BOTTON *et al.*, 1990). Composées d'une cellule ou plus rarement d'une formation pluricellulaire reproductrice, elles sont disséminées par l'émission de spores et constituent une des étapes du cycle de vie de nombreuses bactéries, plantes, algues, champignons, voire de certains protozoaires.

La présence de certaines moisissures, de façon superficielle ou interne, constitue une caractéristique majeure de quelques variétés de fromage. C'est le cas de certaines espèces de *Penicillium* (TABUC., 2007). Les moisissures sont des organismes aérobies, cependant, certaines d'entre elles tolèrent des quantités relativement faibles d'oxygène et peuvent même se développer en anaérobiose (ROQUEBERT, 1997).

L'examen des spores et leur organisation est une étape importante dans l'identification fongique. Les spores peuvent être unicellulaires, de petites tailles (*Penicillium spp*, *Aspergillus spp*), bicellulaires (*Trichothecium spp*), pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria spp*) ou étroites, effilées, incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium spp*) (DIGUTA, 2010).

Au laboratoire, on estime qu'une seule spore germant à 25°C sur un milieu de culture gélosé, peut produire jusqu'à 100,000 spores dès le deuxième jour et 12 millions dans les 24 heures qui suivent. Sur un seul grain de blé, il a été dénombré jusqu'à 25 millions de spores de *P. verrucosum* (LARROCHE *et al.*, 1988).

1.2. Taxonomie et classification du *Penicillium camembertii*

1.2.1. Taxonomie

La taxonomie du genre *Penicillium* repose sur les travaux de Rapper et Thom (1949) et sur des mises au point plus récentes qui ont cherché à normaliser les diverses dénominations. Rappert et Thom ont classé le genre *Penicillium* en quatre sections

- La forme Neufchâtel à souches sauvages, vigoureuses, à croissance rapide, donnant un feutrage épais, blanc jaunâtre.
- La forme à «poils courts» à souches à croissance rapide, à thalles serrés, ras et élevés.
- La forme à «poils longs» à souches à croissance lente et thalles lâches.
- La forme à thalles floconneux, d'abord blancs, puis gris vert (variété *Camembertii sensu stricto*).

P. camembertii n'est pas la seule espèce formée à partir de thalles blancs; d'autres *Penicillium* ayant cet aspect. Par exemple *P. thomii*, *P. nalgiovensis*, *P. verrucosum* (Moreau, 1979). *P. roqueforti* appartient au groupe des velutina.

Le mycélium est en grande partie submergé; la partie aérienne est constituée de conidiophores partant directement du substrat; les pinceaux se trouvent au même niveau et donnent un aspect velouté à la colonie caractérisée par des conidiophores à parois rugueuses et verruqueuses (CHOISY et al., 1984).

En 1949 Rappert et Thom classent le genre *Penicillium* dont on détermine environ 150 espèces (PITT, 1979) en quatre sections. La section est déterminée sur la base de la structure de pénicilles et 277 espèces si l'on se réfère à Samson (1977).

Les souches de *Penicillium* utilisées en fromagerie appartiennent à la section des *Asymetrica* qui comporte cinq sous-sections. Jusqu'à ces dernières années, on distinguait deux espèces : *P. caseicolum* (anciennement *P. candidum*), dont les colonies restent blanches et *P. camembertii* (anciennement *P. album*) qui prend une teinte blanche ou vert pâle après une dizaine de jours d'incubation. Samson et al. (1977) ont estimé qu'une telle distinction n'était pas justifiée et qu'à l'heure actuelle ces espèces sont réunies sous le nom de *P. camembertii* Thom (PITT, 1979).

En 1906 Thom décrit sous le nom de *Penicillium camembertii*, un champignon qu'il avait isolé deux ans auparavant d'un camembert venant de France. La souche répertoriée semble stable. En culture, elle forme des thalles d'une texture assez lâche, d'abord d'un blanc pur puis devenant faiblement gris-vert pâle à verdâtre-glaucue après une semaine, au moment de la différenciation des spores (DAVID et al., 2009).

Les souches de *Penicillium candidum* ou *camembertii* est particulièrement utilisée à la surface des fromages de type pâtes molles comme par exemple : le Camembert ou le Bri.

1.2.2. Classification du *Penicillium camembertii*

La classification du *Penicillium camembertii* est représentée dans le tableau suivant :

Tableau I. Classification du *Penicillium camembertii* (BOTTON et al., 1990)

Classification	
Règne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Sous-division	<i>Pezizomycotina</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Sous-classe	<i>Eurotiomycetidae</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichocomaceae</i>
Genre	<i>Penicillium</i>

Cette classification est basée sur le caractère morphologique du *Penicillium* (structure du mycélium, les modes de reproduction ainsi que les caractéristiques des spores) par contre la nouvelle taxonomie emploie les systèmes d'analyse informatique basés sur l'étude phénotypique et protéomique (protéines, nucléotides, acides aminés) (LEVEAU et al., 1993 ; BOIRON, 1996) (tableau I).

I.3. Structure et morphologie de genre *Penicillium*

Les *Penicillium* présentent un groupe extrêmement cosmopolite et une polyphagie (LEVEAU et al., 1993) de thalle vert ou plus rarement blanc (Figure 1). Leurs conidiophores sont isolés, groupés en faisceau lâches ou agrégés encorémis bien définis (CERNING et al., 1987) ; les pénicilles sont constitués, suivant le cas, soit d'un simple verticille de phialides monoverticillées, soit d'un verticille de ramifications (métules) portant les phialides bivertricillées, soit de plusieurs verticilles successifs comportant des ramifications des métules et des phialides trivertricillées ou quadrivertricillées (SAMSON et al., 1977).

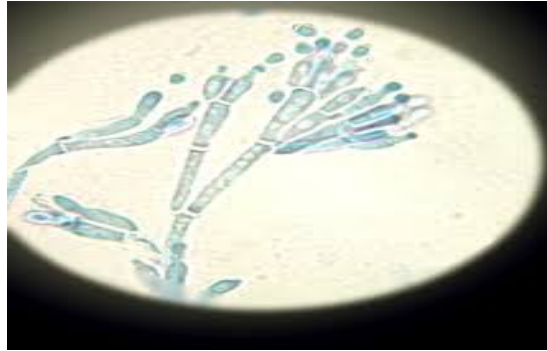


Figure 1 : Morphologie du *Penicillium camembertii* (LEVEAU et al., 1993)

I.4. Caractères physiologiques du *Penicillium camembertii*

1.4.1. Vitesse de croissance

Le *Penicillium camembertii* a une vitesse de croissance assez limitée, de 25 à 35 mm sur milieu à l'extrait de malt en deux semaines à 25° C (CHOISY et al., 1984). Dans l'ensemble, les *Penicillium*, au sens strict, ont une croissance plus importante et surtout plus rapide en début de culture. Pour les variétés blanches, le temps nécessaire à l'apparition d'une teinte verte pâle est très variable (de 4 à 14 jours à 22° C).

Température et temps de germination

La plupart des moisissures sont mésophiles, c'est-à-dire, qu'elles se développent autour de 15 à 37°C. En milieu à l'extrait de malt à 20 g/l et 22° C en culture agitée, le temps correspondant à 50% de spores germées varie de 15 min à 25 min et 30 min suivant les souches de *Penicillium* (PRESCOTT et al., 1987). Cette étape de germination doit être déterminée avec précision, des temps trop longs entraîneraient un développement important des tubes germinatifs et donc une grande fragilité de ceux-ci.

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne de *P. camembertii*. Elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (TIWARI et al., 2007). Chez certaines espèces, les spores survivent à de très basses températures (jusqu'à -190° C) et resteront aptes à germer lors du retour à des conditions normales (SUN et al., 2007). Le *P. camembertii* a une vitesse de croissance relativement faible par rapport à celles d'autres espèces de *Penicillium*, il peut se développer entre 4 et 40 °C avec une température optimum à 22° C (CHOISY et al., 1984).

1.4.3. pH de croissance du *Penicillium camembertii*

C'est un autre facteur intervenant dans le développement des moisissures et aussi dans la production de métabolites. Le pH optimum de croissance de *P. camembertii* se situe entre 4,0

et 6,0. Les variations de 3,0 et 8,0 ont peu d'influence sur le développement des souches commerciales (PANDEY et *al.*, 2000).

1.4.4. Humidité

La plupart des moisissures préfèrent une activité d'eau entre 0.85-0.99 (NGUYEN, 2007). La souche de *P. camembertii* préfère particulièrement les milieux humides à activité de l'eau élevée (aw), les rares mesures réalisées montrent que toutes les espèces de *Penicillium* se situent dans une gamme comprise entre 0,89 et 0,99 (RÜEGG et BLANC, 1966).

1.4.5. Aération

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important pour le développement (NATHALIE et *al.*, 1993). Le *P. camembertii* est une moisissure strictement aérobique (PITT, 1979). Comme la plupart des moisissures, les souches les plus exigeantes vivent dans des régions périphériques des substrats, les moins exigeantes peuvent se développer en profondeur, certaines peuvent même supporter une anaérobiose stricte. D'une façon générale, c'est l'oxygène dissous dans le milieu qui influe sur le développement plus que l'oxygène atmosphérique d'où l'intérêt d'une agitation vigoureuse (150 à 200 rpm) pour avoir une oxygénation adéquate et par conséquent un bon développement de la moisissure (PITT, 1979).

1.4.6. Lumière

Les radiations du spectre visible (380-720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leur spores (BOTTON et *al.*, 1999).

1.4.7. Exigences nutritionnelles

a) Source de carbone et d'azote

Les moisissures se comportent, généralement, en chimio-organotrophes hétérotrophes. La nature des substances carbonées conditionne le développement des spores qui sont présentes sur un substrat donné et sera à l'origine des successions des flores qui colonisent ce substrat (LAMBER et LENOIR, 1976).

La croissance la plus élevée est obtenue avec le lévulose et le maltose. Le meilleur taux de sporulation est obtenu avec des concentrations de 40 à 60 g/L pour le saccharose, le glucose, le lévulose, le galactose, le maltose et les polymères tels l'amidon (BOTTON et *al.*, 1990).

La source d'azote n'a pas seulement un effet sur la croissance des microorganismes, elle aussi est ajoutée particulièrement dans les cultures productrices de métabolites et d'enzymes. On utilise deux sources azotées, minérales ou organiques (KATHIRESAN et MANIVANNANA, 2006).

b) Les sels minéraux

Le genre *Penicillium* pourrait voir sa croissance légèrement stimulée aux faibles concentrations en sels, de 1 à 5% (LAMBERET et al., 1976) mais une concentration de 20 % est nécessaire pour entraîner une inhibition totale de la croissance (CHOISY et al., 1984). Pour le *P. camembertii*, la sensibilité au sel est assez faible mais variable selon les souches. Il a été observé que la présence dans le milieu de culture d'azote peptidique, de phosphates, de magnésium et de divers oligo-éléments minéraux était favorable à la croissance de *P. camembertii* (LENOIR et al., 1979).

c) Les exigences gazeuses

Les moisissures ont un besoin absolu d'oxygène pour se développer. Elles sont sensibles aux teneurs élevées en gaz carbonique. Plusieurs souches de *Penicillium* sont stimulées par des teneurs en CO₂ < 15% dans l'air. Elles sont cependant inhibées par des teneurs supérieures (LARPENT et SAUGLIER, 1992). Une limitation d'oxygène entraîne souvent une baisse importante de croissance et un phénomène de dimorphisme qui se traduit par un changement total d'aspect de la souche. Par ailleurs, une partie du CO₂, produit au cours de la respiration aérobie, est réutilisée par certains champignons pour la production de métabolites secondaires acides. *P. camembertii* est une moisissure aérobie, elle se cultive bien en présence d'un faible taux d'oxygène, voisin de 5% (LENOIR et al., 1979).

1.5. Toxicité du *Penicillium camembertii*

L'espèce *P. camembertii* est une moisissure non toxique mais, disposée dans certaines conditions, elle peut le devenir (LENOIR et al., 1979). C'est essentiellement en Allemagne qu'on s'est intéressé aux éventuelles mycotoxines produites par *P. camembertii*. Une publication de Gibel (1971) a donné lieu à l'hypothèse que l'espèce de *P. camembertii* (*P. candidum*) favorise le développement de tumeurs, ce soupçon a été examiné par French et ses collaborateurs en 1975 par des essais sur des truites et des rats. Cependant aucune manifestation n'a été observée (NATHALIE et al., 1993). Certaines souches de *P. camembertii* peuvent élaborer de l'acide cyclo-piazonique, une neurotoxine dont l'abus entraîne des diarrhées et des convulsions, (NATHALIE et al., 1993).

II.1.Introduction

Etant l'interface entre un champignon et son environnement, la paroi protège le corps fongique contre la lyse osmotique et agit comme un tamis moléculaire régulant le passage des grosses molécules à travers les ports. La paroi fongique est formée essentiellement de polysaccharides (80 à 90%) (NASRAOUI, 2015), mais aussi de faibles teneurs en protéines et de lipides. Les polysaccharides de la paroi sont différents d'un champignon à un autre. La majorité des vrais champignons, à l'exception des zygomycètes, ont des parois constituées essentiellement de chitine et de glucane (NASRAOUI, 2015).

II.2. Chitine

La chitine est le deuxième polysaccharide naturel rependu dans la nature après la cellulose (KUMARI et RATH, 2014). C'est un amino-polysaccharide ayant des groupements acétamide en position C-2 à la place des hydroxyles (figure 2). Sa structure chimique est un enchainement d'unités monomères constitutives N-acétyl- β -D-glucosamine reliées par une liaison glycosidique (1-4) (MEGAN et *al.*, 2010).

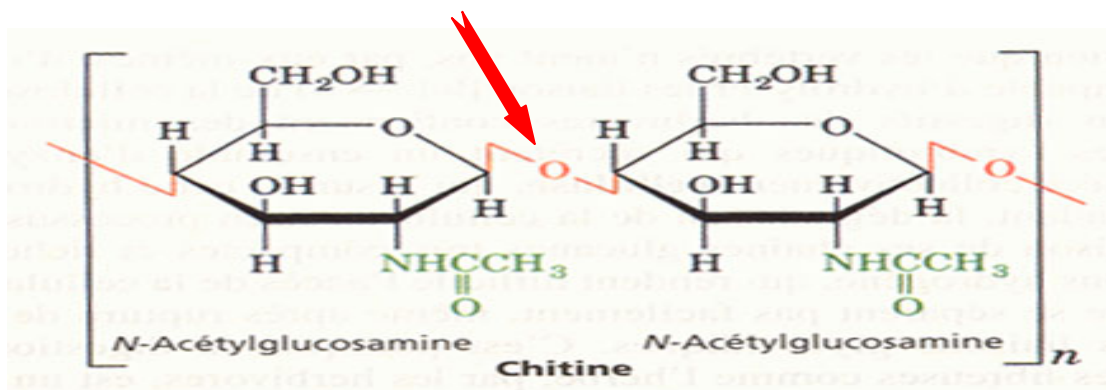


Figure 2: Chaîne linéaire de chitine (KARP, 1998).

L'unité N-acétylglucosamine, indiquée dans la figure 2, constitue l'unité répétitive de la chitine. Le groupement acétylé est en couleur verte. La flèche indique l'extrémité réductrice de la chaîne.

II.2.1. Caractéristique

La chitine est biodégradable (dégradation par les micro-organismes), elle est non toxique et présente des propriétés antibactériennes et antioxydantes (ZITOUNI, 2013). Les poids moléculaires moyens de α -chitine, de la β -chitine et de la χ -chitine calculés avec la viscosité relative, sont d'environ 701, 612 et 524 KDa respectivement (KYEONGJANG et *al.*, 2004).

II.3. Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes,

obtenu par désacétylation de la chitine. Le chitosane est un copolymère linéaire composé d'unité monomérique de D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine liées en β (1-4). Le chitosane possède trois groupements fonctionnels réactifs en positions C₂, C₃ et C₆, un groupement amine et deux groupements hydroxyles respectivement (figure 3). (FEDERICO, 2009).

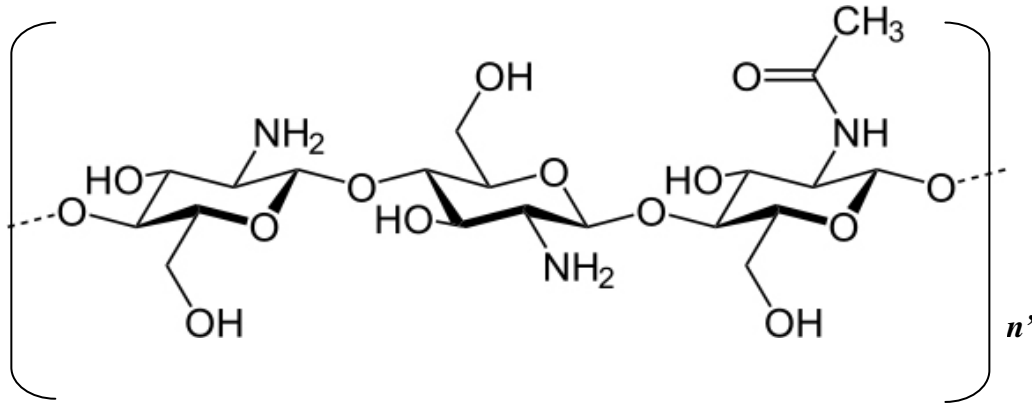


Figure 3: Chaîne linéaire du chitosane (AIDER, 2007)

II.3.1. Caractéristiques

Le chitosane est principalement d'origine végétale, non toxique, non allergène, 100 % biodégradable et possédant des propriétés antibactériennes (PAULS, 2013). Il est disponible sous forme de solution, granule, poudre et fibre. Il a une grande masse moléculaire qui varie entre 50 à 1000 KDa selon la source et le procédé de préparation. Le chitosane disponible sur le marché a un degré de désacétylation DDA de 70 à 90 % (ELIAS, 2006).

II.4. Glucane

Le glucane est un polysaccharide composé de monomères de D-glucose, reliés par des liaisons bêta. Ce dernier est le composant majeur de la paroi fongique (50 à 60 % du poids sec de la paroi). 69 % à 90 % du glucane de la paroi fongique est constitué par du bêta-1,3-glucane, mais d'autres glucanes peuvent être retrouvés, bêta-1,6-glucane (Figure 4) (CHABOUD, 2012)

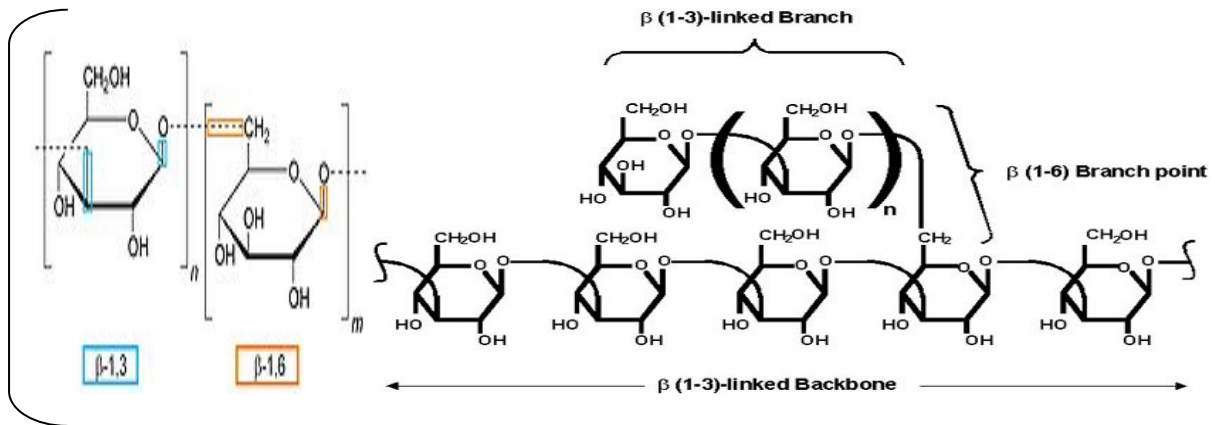


Figure 4: Liaison $\beta(1,3)$ et $\beta(1,6)$ d'un polysaccharide β -glucane (BADREDIN, 2008 ; CHABOUD, 2012)

La base de la structure de la paroi est le béta-1,3-glucane, les autres constituants sont liés à ce composant de manière covalente pour former un ensemble cellulaire fonctionnel.

II.4.1. Caractéristiques

Chez les champignons filamenteux, deux $\text{exo-}\beta(1,3)$ -glucanases et une $\text{endo-}\beta(1,3)$ -glucanase ont été détectées dans des autolysats de parois cellulaires d'*Aspergillus fumigatus* (FONTAINE et al., 1997). Du côté extérieur du réseau $\beta(1,3)$ -glucane, se pose $\beta(1,6)$ - chaîne du glucane permet une liaison avec d'autres composants des parois cellulaires, comprenant des mannoprotéines (LIPKE et OVALLE, 1998).

La synthèse des $\beta(1,3)$ -glucanes et leurs extrusions à travers la membrane plasmique sont effectuées par un complexe protéique membranaire. La glucane synthétase utilise comme substrat l'UDP-glucose présent dans le milieu intracellulaire (DOUGLAS, 2001). Ce complexe protéique contient deux sous-unités, une catalytique et l'autre régulatrice.

II.5. Chitine-Glucane

Le complexe chitine-glucane, d'origine fongique, est un copolymère naturel, constitué de polysaccharides chitine (unités de répétition N-acetyl-DGlucosamine) et de 1,3- β -glucane (unité de répétition D-glucose)(figure 5).

C'est le constituant principal des parois cellulaires d'*Aspergillus niger*, *Agaricus bisporus* et *Pleurotus ostreatus*.

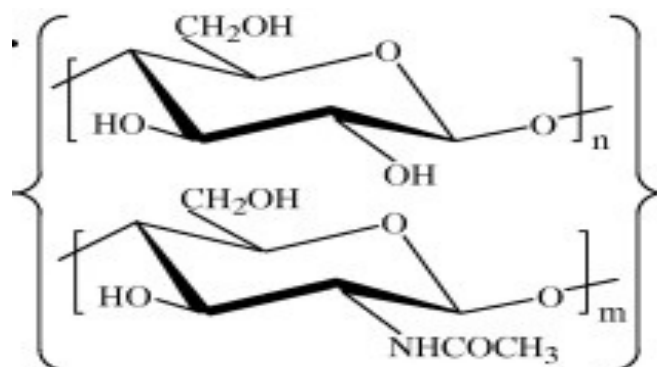


Figure 5: Complexe chitine glucane (YURY *et al.*, 2009)

II.5.1. Caractéristiques

Les polymères chitines-glucanes sont insolubles dans beaucoup de solvants mais sont capables de gonfler dans des milieux aqueux. Ils sont biodégradables en présence de certaines enzymes. Les chitines-glucanes possèdent les propriétés de la chitine.

II.6. Chitosane-Glucane

Le complexe chitosane-glucane est présent dans la paroi cellulaire des zygomycètes (*Gongronella butleri*). Dans les mycéliums fongiques, le chitosane et le glucane sont liés par des liaisons glycosidiques α (1-4) (NEW et STEVENS, 2002) (figure 6).

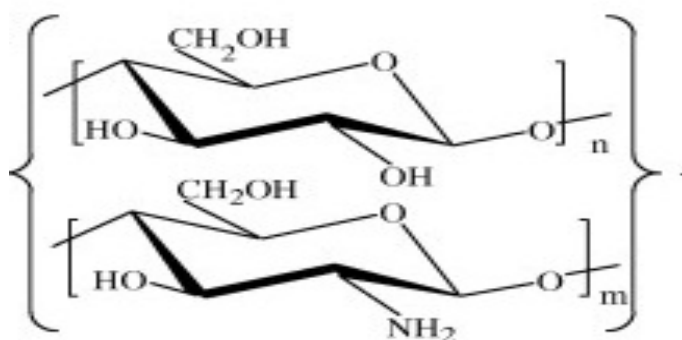


Figure 6 : Complexe chitosane-glucane (YURY *et al.*, 2009)

II.6.1. Caractéristiques

Le β -chitosane glycosidique est lié au β -glucane glycosidique par une liaison α (1-4) glycosidique (SEIICHI et HIROSHI, 2012). Seul le chitosane d'origine fongique possède, à la fois, une teneur en glucanes résiduels supérieure à 2%, une densité \geq à 0,7 g/cm³ (FEDERICO, 2009).

III.1. Description des procédés d'extraction

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 aux procédés industriels de son extraction à partir des crustacés (crevettes), excepté l'étape de déminéralisation, cela est dû aux faibles teneurs de mycéliums fongiques 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. Le processus d'extraction comporte quatre étapes, résumées dans la figure 7.

III.1.1. Procédé d'isolation du chitosane libre à partir d'une source fongique

La culture des champignons, destinés à l'extraction du chitosane, est effectuée sur des milieux liquides YPG (Extrait de levure Peptone Glucose), PDB (Pomme de terre Dextrose Bouillon) et MSM (Méthyl-sulfonyl-méthane) (CHATTERJEE et *al.*, 2004). L'extraction du chitosane passe par deux traitements, alcalin et acide.

D'après White et ses collaborateurs (1979), ils ont proposé une étape initiale de traitement alcalin (NaOH 1M avec 95% d'éthanol) impliquant l'homogénéisation de la biomasse, en mélangeant à grande vitesse. RANE et HOOVER ont optimisé le traitement alcalin (NaOH 1M). D'autres auteurs ont suivis le même procédé mais avec des variations de concentration de NaOH (tableau II).

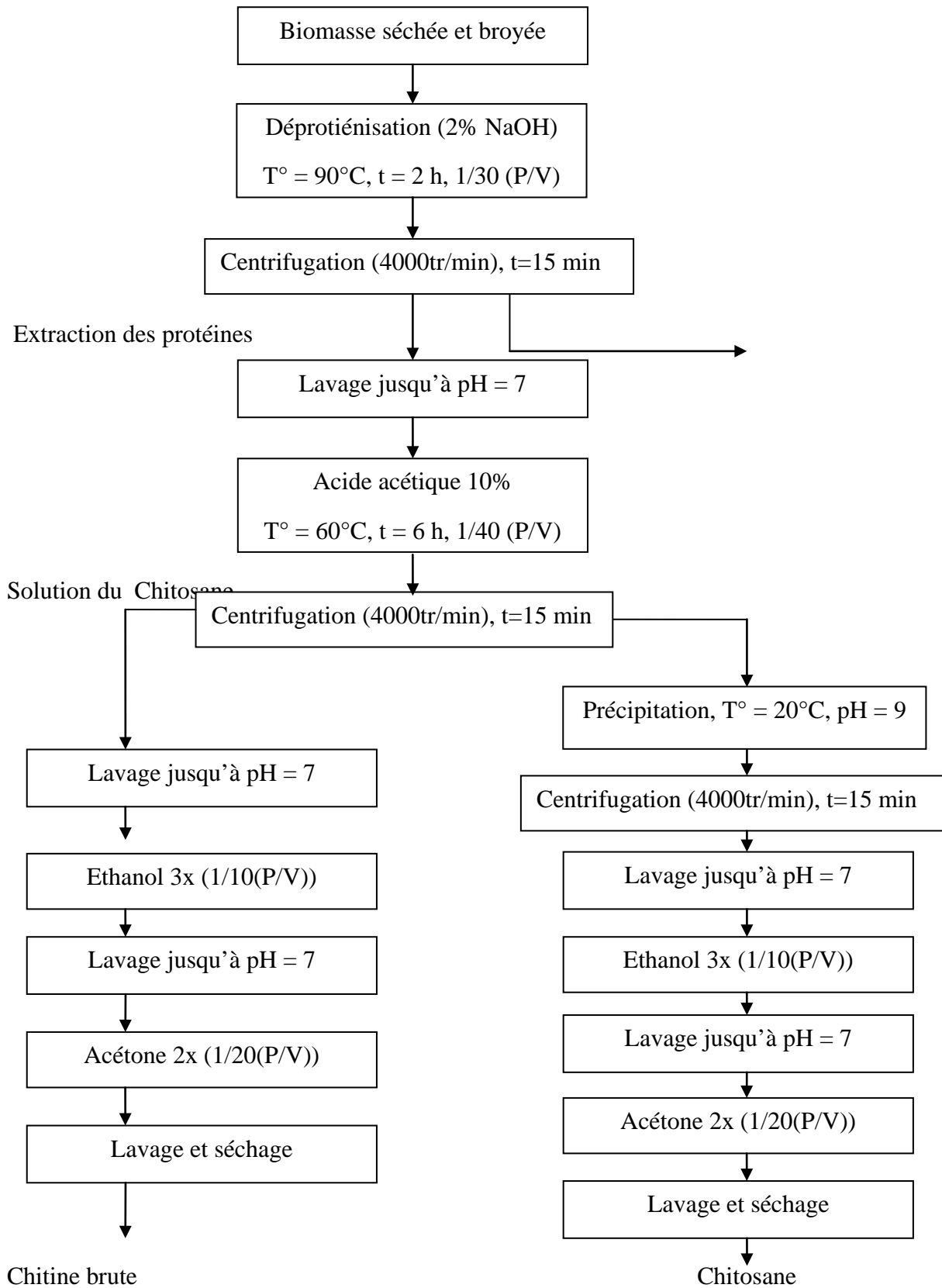


Figure 7 : Schémade l'isolement de la chitine et du chitosane du *Mocur Rouxi* (SYNOWIECKI *et al.*, 1997).

Tableau II. Différents traitements alcalins

Traitements alcalins	Conditions	Références
NaOH (1M) + éthanol 95%	Bain de vapeur t= 90 min un rapport de 1/10 (poids/ volume) de la biomasse sèche par rapport à un volume d'éthanol	(WHITE et <i>al.</i> , 1979)
NaOH (1M)	T°= 121 °C t= 15 min un rapport de 1/40 (poids / volume) de la masse cellulaire sèche à la solution alcaline	(RANE et HOOVER, 1993)
NaOH (2%)	Etuve T°= 90°C t= 6 h un rapport de 1/30 (P / V) de la biomasse sèche a la solution alcaline	(SYNOWEIECKI et <i>al.</i> , 1997)
NaOH(11M)	T°= 45°C t= 13 h	(NWE et <i>al.</i> , 2010)

Après le traitement alcalin, la fraction AIM est récupérée par centrifugation, elle est traitée avec une solution acide pour dissoudre la matière soluble dans l'acide acétique (AcSM) et la séparer de l'autre fraction qui est insoluble (AcIM), comme le montre le tableau III suivant.

Tableau III. Différents traitements acides

Traitements Acides	Conditions	Références
HCl 40 M	T° = 90 °C t = 12 h	FUKUSHIMA <i>et al.</i> , 2001
Acide acétique 20 %	T° = 80 °C t = 6 h	MOHAMED <i>et al.</i> , 2015
Acide acétique 2%-10%	T° = 90-121 °C t = 1-24 h rapport de (1/30) (poids/ volume)	SYNOWIECKI <i>et al.</i> , 1997
Acide acétique 0.35M	T° = 95°C t = 5h	NWE <i>et al.</i> , 2010

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, suivi d'une centrifugation et d'un lavage jusqu'à pH neutre (TAN *et al.*, 1996; SYNOWIECKI *et al.*, 1997 ; CHATTERJEE *et al.*, 2005 ; NWE *et al.*, 2010). Il faut signaler que le rendement du chitosane obtenu par ces étapes est très faible, car les conditions de traitement adoptées permettent seulement d'extraire le chitosane non lié (NWE et STEVENS, 2002).

Les conditions de traitement douces (1M NaOH) ne permettent pas de briser le complexe chitine/chitosane-glucane (MUZZARELLI *et al.*, 1980).

III.1.2. Extraction de la chitine désacétylée

La fraction (AcIM) est considérée riche en complexe chitine/chitosane-glucane (MUZZARELLI *et al.*, 1980), elle est constituée d'un assemblage rigide dans la paroi cellulaire (GOODAY, 1995; ROBSON, 1999). L'étape de blanchiment consiste à éliminer les pigments qui sont liés à la chitine. Généralement, l'agent de blanchiment utilisé est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), dont la concentration est comprise entre 0.1 et 33 %, ce dernier peut également être mélangé avec du HCl (TOLAIMATE *et al.*, 2003). D'autres agents de blanchiment peuvent être utilisés, il s'agit de l'hypochlorite de sodium (NaClO), le permanganate de potassium (KMnO₄), l'acétone, l'éthyle-acétate et l'acide oxalique (NO *et al.*, 1989 ; SYNOWIECKI et AL-KHATEEB, 2003 ; ABDU *et al.*, 2008 ; XU et WINTER, 2008). Après l'étape de blanchiment elle parvient à une dernière étape qui est la désacétylation.

De nombreuses combinaisons des conditions de désacétylation sont décrites dans la littérature (tableau IV).

Tableau IV. Différents traitements désacétylation

Traitements	Conditions	Références
NaOH 10M	T °= 105 °C t = 2 h rapport de 1/30 (Poids/Volume)	SYNWIESKI et al., (2003)
NaOH 50 %	Réacteur T °= 145 °C – 150 °C t = 5 min – 15 min	No et MEYERS, (2000)

III.2. Paramètres influant sur la qualité et la quantité des polysaccharides fongiques

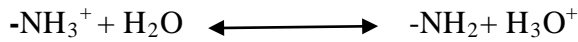
Une augmentation du rendement du chitosane peut être obtenue par l'augmentation du rendement de la biomasse ou l'augmentation de la teneur de la paroi cellulaire en chitine /chitosane (JAWORSKA et KONIECZNA, 2001). La solution d'hydroxyde de sodium est choisie dans la littérature pour cette étape de déprotéinisation parmi une large gamme de produits, cependant, la concentration, la température et la durée de traitement variant largement selon les auteurs (MUZZAR, 1997).

III.2.1 Traitement alcalin

A l'état naturel, la chitine se présente en association avec les protéines (chitino-protéines). Ces protéines sont éliminées par un traitement basique en utilisant des solutions à base de NaOH, Na₂CO₃, KOH, K₂CO, Ca(OH)₂ ou NaPO₄, dans des concentrations variables. La solution d'hydroxyde de sodium est la plus souvent utilisée pour solubiliser les protéines (MOHAMED et al., 2015).

III.2.2 Traitement acide

Grâce à ses groupements amines libres, le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques qui se distingue des autres polymères naturels et a un pKa proche de 6,3. Il se dissout en milieu acide par protonation de ses fonctions amine. En dessous de ce pKa le biopolymère est soluble dans l'eau acidifiée et a une charge positive (SHAHIDI et al., 1999 ; ABUZAYTOUN, 2005 ; KURITA, 2006).



$$K_a = \frac{[-\text{NH}_2] \times [\text{H}_3\text{O}^+]}{[-\text{NH}_3^+]}$$

III.2.3. Désacétylation de la chitine fongique

La désacétylation de la chitine donne lieu à du chitosane. La chitine et le chitosane sont considérés comme étant deux copolymères ayant des structures chimiques identiques. Ils sont constitués d'unités N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et glucosamine (GlcN), dont la proportion détermine le degré de désacétylation (DDA). Comme le traitement de désacétylation est presque toujours incomplet, le chitosane est considéré comme étant le dérivé partiellement désacétylé de la chitine.

Théoriquement, lorsque le rapport GlcNAc/GlcN est supérieur à 50 %, le copolymère en question est de la chitine, lorsque ce rapport est inférieur à 50 %, on a alors à faire à du chitosane. Mais en pratique, la distinction entre la chitine et le chitosane est basée sur la solubilité de ces deux matériaux dans une solution aqueuse d'acide acétique. Pour preuve, une chitine partiellement désacétylée à 50 % n'est pas systématiquement soluble dans une solution d'acide acétique et ne peut donc pas être considérée comme du chitosane. Par ailleurs, il a été établi que l'on peut parler du chitosane à partir d'un DDA de 60 % et non de 50 %. Une autre définition consiste donc à dire que si le matériau (chitine ou chitosane) est soluble dans de l'acide acétique (ex. 1 % v/v), on parle alors du chitosane (ARKOUN, 2017).

Le DDA et la répartition des fonctions amines désacétylées, influencent de façon drastique sur les propriétés macromoléculaires des chaînes polymériques ainsi que leur comportement en solution, à savoir la solubilité du chitosane, la flexibilité/rigidité des chaînes, la conformation des chaînes et la viscosité des solutions du chitosane.

Le DDA peut être déterminé par diverses techniques chimiques ou analytiques telles que le titrage potentiométrique, l'analyse élémentaire, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ou encore la résonance magnétique nucléaire (RMN) (ARKOUN, 2017).

L'agressivité et le peu de maîtrise de la désacétylation de la chitine par voie chimique ont motivé l'intérêt d'explorer et de développer d'autres alternatives telles que l'utilisation d'enzymes. Il est possible d'atteindre des degrés de désacétylation (DDA) par voies enzymatiques (en utilisant la chitine désacétylase ou l'acétylhexylane estérase) comparables

aux traitements basiques, soit près de 75 % de désacétylation en 28 heures (AYE et *al.*, 2006). Cette technique est intéressante mais ne permet pas pour l'instant le développement au niveau industriel. En effet, l'utilisation d'enzymes n'est pas viable car elle représente des quantités et des coûts trop élevés.

III.3. Applications du chitosane fongiques

Le chitosane et ses dérivées sont positivement chargés en milieu acide et par conséquent peuvent facilement adhérer aux sites portant des charges négatives. En raison du caractère cationique du chitosane et de ses dérivées, ces molécules ont été utilisées dans plusieurs applications telles que :

- Lanutrition (SHAHIDI et SYNOWIECKI, 1991 ; SHAHIDI et *al.*, 1999),
- Les produits de beauté (FELT et *al.*, 1998 ; MAJETI et KUMAR, 2000)
- L'agriculture (YAMADA et *al.*, 1993)
- La protection de l'environnement (PENICHE-COVAS et *al.*, 1987)
- Le traitement des eaux usagées (JEUNIAUX, 1986; MACCHI, 1996 ; KURITA, 1998; JEON et *al.*, 2000)
- L'abaissement de l'hypertension (GIUSTINA et VENTURA, 1995)
- Le traitement et le soulagement de douleurs arthritiques (LEE et *al.*, 2003)
- Le traitement de tumeurs (NISHIMURA et *al.*, 1984 ; NISHIMURA et *al.*, 1986)
- Protecteurs contre des infections (TOKORO et *al.*, 1989).

Rrinaudo a résumé ces applications dans le tableau V suivant.

Tableau V. Domaines d'applications du chitosane (RINAUDO, 2006)

Domaine d'exploitation	Application
Potentiel biomédical	Sutures chirurgicales Implants dentaires Peaux artificielles Reconstruction osseuses
Agriculture	Mécanisme défensive Stimule la croissance des plantes Libération de fertilisants et nutriments
Traitement des eaux	Polymère écologique Pouvoirs séquestrant (métaux lourds, colorants etc.....) Diminution de la turbidité Diminution des odeurs Bactéricides
Alimentaire	Non digestible (diète aux fibres) Hypocholestérolémiant Agent de conservation Stabilisateur Antimicrobien Enrobage protecteur (fruits)
Cosmétique	Crèmes Traitement de l'acné Produits hydratants Formulation de shampoings
Biopharmaceutique	Immunostimulants Antitumoraux Anticoagulants Bactériostatique Libérations contrôlées (matrices)

IV.1. Matériel

Le matériel utilisé au cours de l'expérimentation (laboratoire de chimie de l'environnement de la faculté des sciences et laboratoire LABAB de la faculté de Biologie) est constitué de matériel mycologique (microorganisme), de matériel de laboratoire, des produits chimiques et d'appareillages.

IV.1.1. Matériel biologique

Le matériel mycologique sous présente se forme de spores lyophilisées de *Penicillium camembertii* (*Pc TT033*), offertes gracieusement par l'ONALAIT de Drâa Ben Khedda, Tizi-ouzou, Algérie. Le microorganisme a été conservé à 0°C avant son utilisation.

IV.1.2. Matériel de laboratoire

- Verreries : fioles jaugées (50 mL, 100 mL, 500 mL et 1000 mL), éprouvettes (10 mL, 25 mL et 100 mL), entonnoir, béchers, burette, pipette de 10 mL.
- Mortier en céramique, ballon de 100 mL, verres de montre, cristallisoirs, spatules.
- Erlenmeyer, barreaux magnétiques.
- Thermomètre.
- Para film.
- Boîtes de Pétri
- Tamis (diamètre ≤ 1 mm)

IV.1.3. Produits

Différents produits ont été utilisés :

- Substances nutritive et milieu de culture
 - Yeast extract (CONDAprondisa. Madrid. Spain); Peptone M for Microbiology (BIOCHEMchemopharma. Quebec); D-(+) Glucose anhydrous Analytical Reagent (BIOCHEMchemopharma. Quebec); Agar for bacteriological use (LiofilchemITATY).
 - Potato Dextrose Agar (Annexe 1).
- Bases
 - Hydroxyde de sodium (NaOH) de marque SIGMA-ALDRICH, pureté 98-100.5 %
- Acides
 - Acide acétique (CH₃COOH) de marque SIGMA-ALDRICH, pureté 99-100 %
 - Acide chlorhydrique (HCl) de marque SIGMA-ALDRICH, pureté 36.5-38 %

- Solvants
 - Acétone (C₃H₆O), pureté 99 %
- Oligo-éléments (solution de trinci) (Annexe 3)
- Phosphates

Ces substances sont utilisées pour la production des milieux de culture pour la croissance mycélienne de *P. Camembertii* : YPG enrichi/ YPGA et PDA.

IV.1.4. Appareillage

- Autoclave de marque PB INTERNATIONAL
- Etuve de marque MEMMENT
- Balance de précision de marque AIP SYSTEMES, model THB-600
- Centrifugeuse de marque ZENTRIFUGEN, type Werk Nr
- Bain marie de marque MEMMENT
- Plaque chauffante et d'agitation de marque IKAR, model RHB2
- pH mètre de marque HANNA, model HI 2210

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Production de la biomasse fongique par méthode de planification des expériences (P.C.C)

IV.2.1.1. Présentation des plans composites centrés (P.C.C)

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (GOUPY, 2001). Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt y et des variables x . Avec les plans d'expériences, on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse (BOX et *al.*, 2005). Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur. Nous aborderons dans ce travail, la modélisation d'une réponse par la méthode de planification des expériences dans le plan composite centré (PCC).

IV.2.1.2. Production de la biomasse de *Penicillium camembertii* sur milieu solide

IV.2.1.2.1. Choix des paramètres opératoires

La culture solide (agar-agar) de l'espèce fongique *Penicillium camembertii* a été réalisée à partir des paramètres dont certains sont fixes et d'autres sont variables.

- Paramètres fixés sont :
 - Source de carbone (D-glucose) : 20 g/L
 - Les phosphates : KH_2PO_4 : 3,4g/L et $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$: 4g/L (Amrane et al, 1997).
 - pH ajusté à 5
- Les quatre paramètres variables choisis sont présentés dans le tableau 6 et représenté par :
 - Durée de culture (Z_1) : [8j-30j]
 - Température (Z_2) : [25°C-35°C]
 - Oligo-élément (Z_3) : [0mL/L-100mL/L]
 - Source azotée (Z_4) : extrait de levure / peptone = [0.2-1]
Extrait de levure [1-10g/L] et peptone [5-10g/L]

Ces intervalles ont été choisis à partir des travaux de Mohamed M et ses collaborateurs (2015). Qui ont montré une influence significative de la production de la chitine et du chitosane lors de la culture liquide de différentes espèces de la classe des zygomycètes (*Mucor rouxii*, *Cunningham ellaelegans* et *Rhizo pussp*).

Tableau 6 : Les paramètres opératoires étudiés ainsi que leurs domaines de variation

Variables	Niveau				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Z_1 : Durée (Jours)	8	13,5	19	24,5	30
Z_2 : Température (°C)	25	27.5	30	32.5	35
Z_3 : OE(mL/ L)	0	25	50	75	100
Z_4 : SA	0.2	0.4	0.6	0.8	1

$$N = 2^k \longrightarrow N = 16 \text{ expériences}$$

$$\alpha = N^{1/4} \longrightarrow \alpha = 2$$

Avec :

N : nombre d'expérience

k : nombre de paramètres variable

α : critère de rotatabilité

IV.2.1.2.2. Culture sur milieu solide de *P. camembertii*

La production de la biomasse de *P. camembertii* consiste à l'activation des spores du champignon, suivie de son inoculation sur milieu solide YPG afin de produire de la biomasse mycélienne destinée, éventuellement, à l'isolation des polysaccharides (chitine et chitosane) (figure 8).

a. Activation des spores avant inoculation

Trois étapes ont été adoptées

- 1^{er} étape : l'activation des spores est réalisée sur milieu PDA (Annexe 2).
- 2^{ème} étape : pour l'obtention d'une suspension de spores activées, la souche de *P. camembertii* est cultivée en boîte de pétri de 90 mm de diamètre sur milieu PDA. Ensuite les spores sont récupérées en introduisant 10 mL du milieu YPG enrichi d'Oglio éléments dans la boîte de pétri. A l'aide d'une spatule stérile, la surface de milieu est raclée.
- 3^{ème} étape : Dilution de la suspension de spores activées à $2-3 \cdot 10^8$ spores/ mL destinées à l'inoculation (AMRANE et al., 1999).

b. Inoculation des boîtes de Pétri

La préparation du milieu nutritif YPGA est faite dans des flacons de 1L. La composition du milieu nécessite de l'eau distillée, d'extrait de levure, de peptone, de glucose, les phosphates (KH_2PO_4 et $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), d'Oglio éléments (solution de Trinci) et 20g d'agar ; le pH est ajusté à 5.

1 L de milieu YPGA enrichi en Oglio éléments et en phosphates a été réparti dans les boîtes de pétri. Chaque boîte a été inoculée par la suspension de spores préparées précédemment.

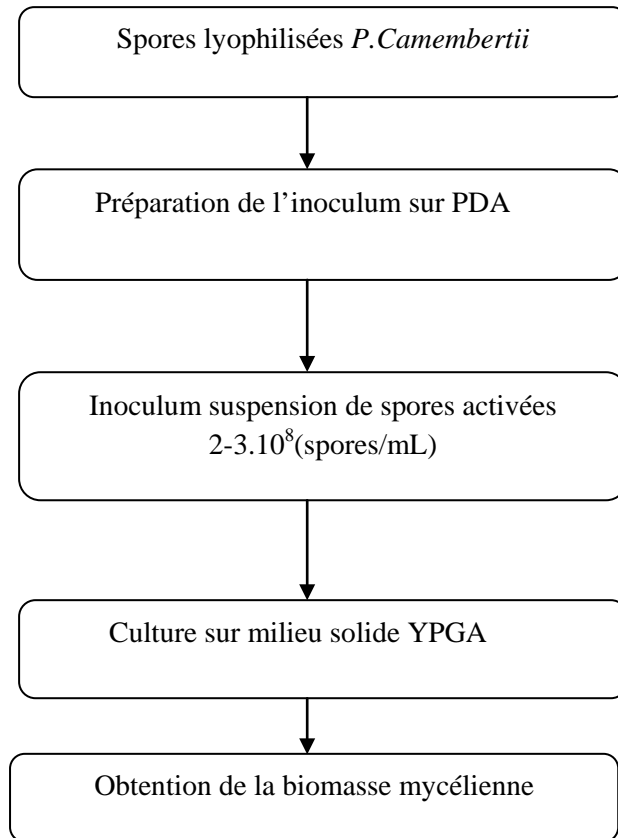


Figure 8: Protocole utilisé pour la production de biomasse mycélienne de *P. camembertii* sur milieu solide (YPGA)

c. Construction de la matrice des essais pour la production de la biomasse mycélienne

En vue de la production de la biomasse de *P. camembertii*, des matrices des essais ont été construites.

- La matrice des essais du plan factoriel : Ces plans possèdent un nombre de niveaux limité à deux pour chaque facteur. Toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation. Ces plans peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continues et pour les variables discrètes. Représentée dans le tableau VI
- La matrice des essais au centre du domaine .Représentée dans le tableau VII

Tableau VI .Matrice des essais du plan Factoriel

N° Essais	Variables réelles				Variables Codées			
	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄
1	13,5	27.5	25	0.4	-1	-1	-1	-1
2	13,5	27.5	25	0.8	-1	-1	-1	1
3	13,5	27.5	75	0.4	-1	-1	1	-1
4	13,5	27.5	75	0.8	-1	-1	1	1
5	13,5	32.5	25	0.4	-1	1	-1	-1
6	13,5	32.5	25	0.8	-1	1	-1	1
7	13,5	32.5	75	0.4	-1	1	1	-1
8	13,5	32.5	75	0.8	-1	1	1	1
9	24,5	27.5	25	0.4	1	-1	-1	-1
10	24,5	27.5	25	0.8	1	-1	-1	1
11	24,5	27.5	75	0.4	1	-1	1	-1
12	24,5	27.5	75	0.8	1	-1	1	1
13	24,5	32.5	25	0.4	1	1	-1	-1
14	24,5	32.5	25	0.8	1	1	-1	1
15	24,5	32.5	75	0.4	1	1	1	-1
16	24,5	32.5	75	0.8	1	1	1	1

Tableau VII . Matrice des essais au centre du domaine

N° Essais	Variables réelles				Variables Codées			
	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄
1	19	30	50	0.6	0	0	0	0
2	19	30	50	0.6	0	0	0	0
3	19	30	50	0.6	0	0	0	0
4	19	30	50	0.6	0	0	0	0

d. Récupération des différentes biomasses mycéliennes

Pour chaque essai, la biomasse totale fongique a été récupérée pour un volume de YPGA de 1 L (correspondant à 36 boîte de pétri) (figure 9).

Avant l'extraction des polysaccharides, la biomasse subit un lavage à l'eau distillée, un séchage dans l'étuve à 40°C jusqu'à la masse constante, pesée, puis un broyage en fines particules de diamètre inférieure à 1 mm.

Chaque biomasse produite sur milieu solide YPGA a fait l'objet d'une valorisation par isolation des polysaccharides (la chitine et du chitosane).



Figure 9 : Biomasse mycélienne récupérée et lavée (1 L de milieu YPGA)

IV.2.2.Extraction des polysaccharides

Pour 1 L de milieu YPGA, la masse mycélienne obtenue de chaque essai réalisé a subi des traitements chimiques (basique, acide) en vue de l'extraction de la chitine et du chitosane d'origine fongique. Les traitements sont décrits dans la figure 10 et tirés des travaux de SYNOWIECKI et ses collaborateurs (1997), lors de l'étude de l'isolement de la chitine et du chitosane du *Mocur Rouxii*.

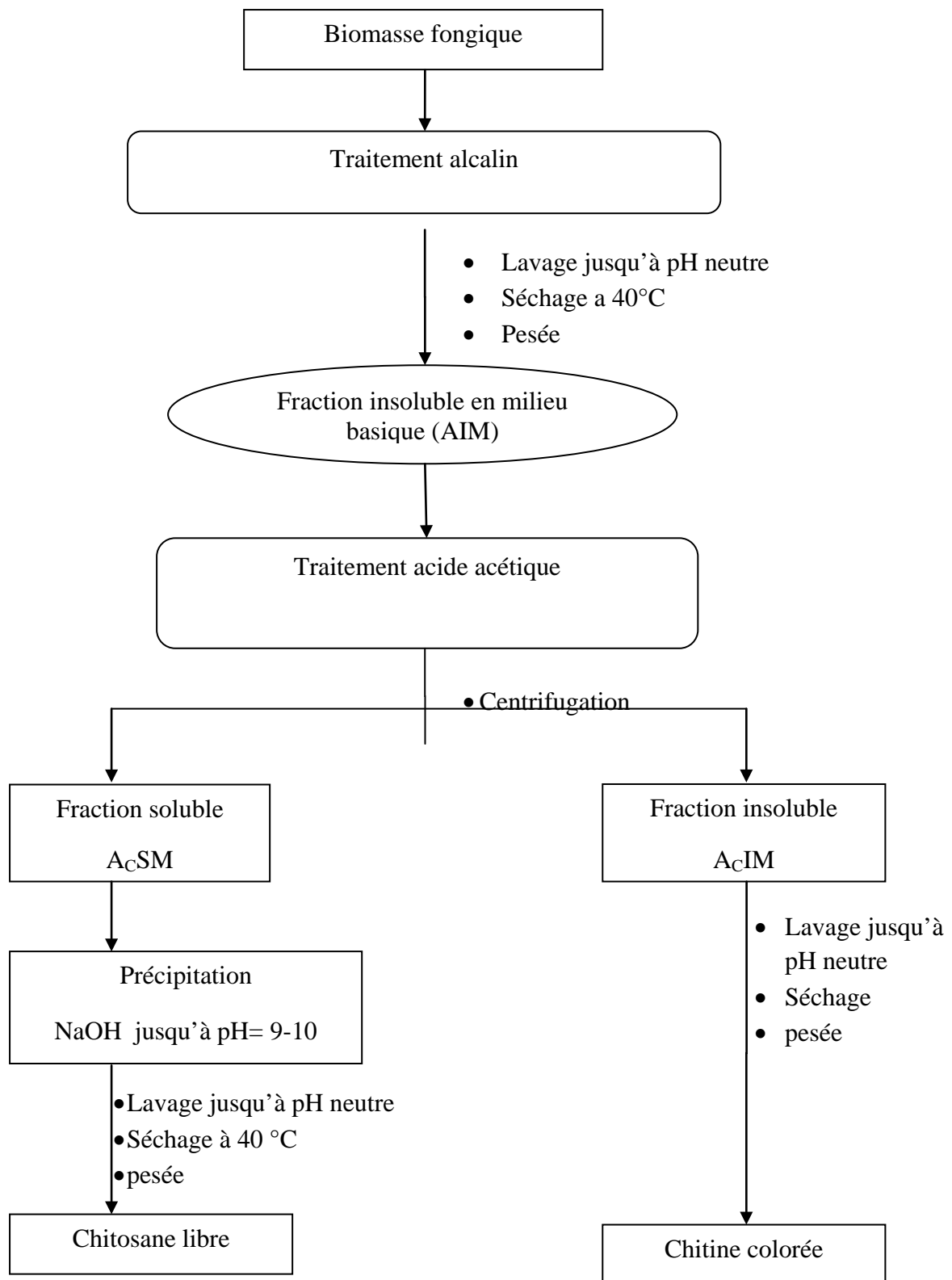


Figure 10: Procédé adopté pour l'extraction de chitine et du chitosane libre (SYNOWIECKI et al., 1997)

IV.2.3. Etude de la désacétylation de la chitine brute

La chitine obtenue de l'essai n° 2 de la matrice des essais du plan factoriel (tableau 6) a subi différents traitements

1^{er} traitement :

Blanchiment dans l'éthanol (3 fois) puis dans l'acétone (3 fois) suivi de la désacétylation basique à différents temps (1h, 2h et 4h) selon le montage décrit dans la figure 12.

2^{ème} traitement

Désacétylation basique pendant 2h (sans blanchiment). Selon le montage décrit dans la figure 12

Les conditions de désacétylation avec et sans blanchiment sont décrit dans la figure 11

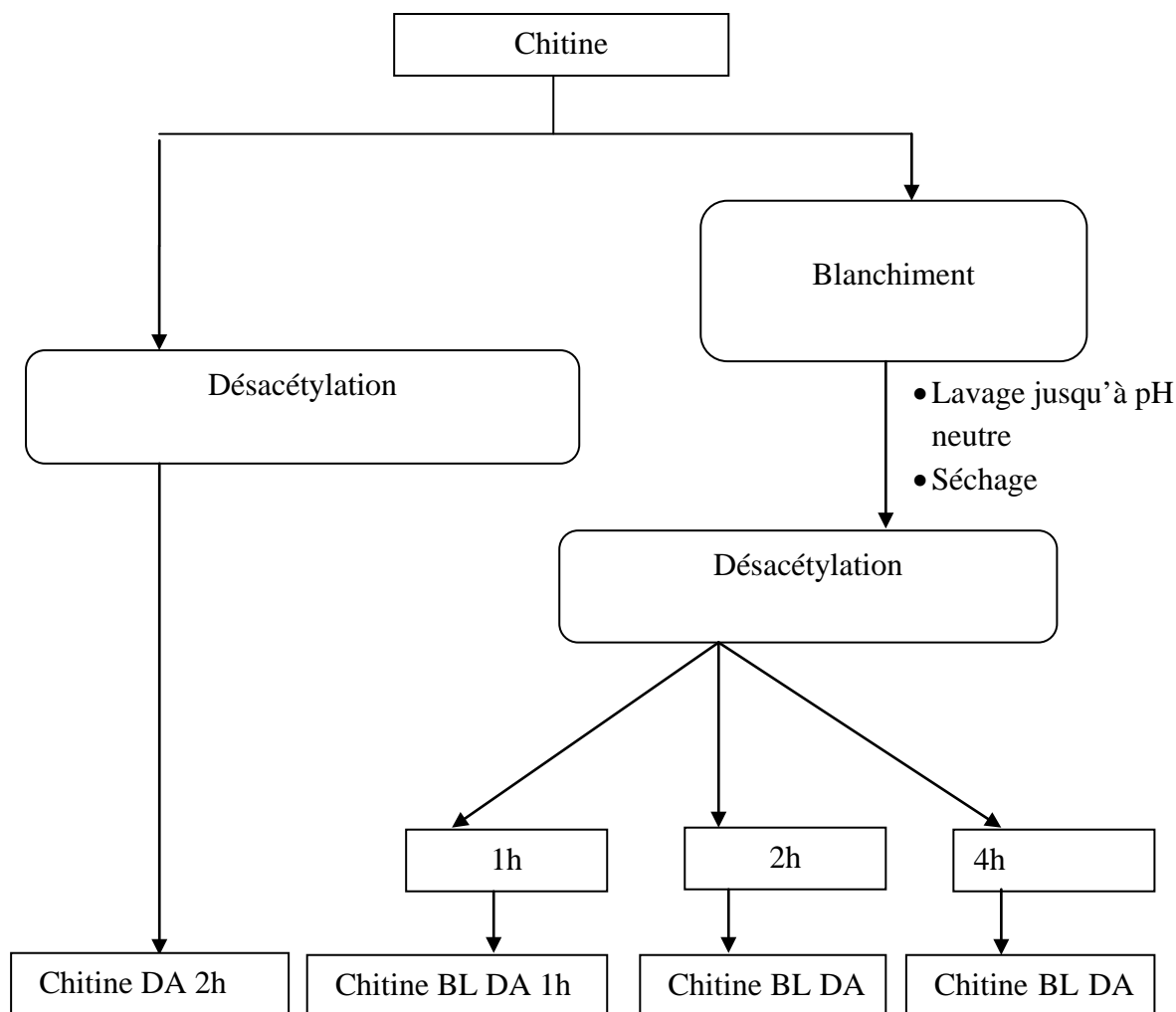


Figure 11: Schéma de la désacétylation de la chitine fongique avec et sans blanchiment

Chitine DA : Chitine désacétylée

Chitine BL DA : Chitine blanchie puis désacétylée



Figure 12 : Montage du chauffage à reflux pour la désacétylation de la chitine

IV.2.4. Caractérisations des produits préparés

IV.2.4 .1. Test de solubilité des chitines désacétylées

La solubilité est déterminée par l'ajout de 50 mg de chitine DA dans 50 mL d'acide acétique 1% sous agitation pendant 24h.

IV.2.4.2. Test de production des billes du chitosane

Pour préparer des billes du chitosane, on a pris une quantité de chitine DA (essai 2) dans 20 mL d'acide acétique 2N sous agitation jusqu'à solubilisation, le mélange est ensuite versé goutte à goutte dans une solution de NaOH 2N à travers une aiguille de seringue 21 G à débit relativement lent et sous agitation de sorte à obtenir des billes de gel. Les billes, ainsi obtenues, sont laissées reposer dans la solution toute la nuit. Ensuite, les billes sont filtrées et lavées avec de l'eau distillée plusieurs fois jusqu'à ce que le pH de l'eau de lavage soit neutre.

V.1. Production des biomasses mycéliennes, des fractions (AIM, AcIM et AcSM)

La figure 13 (a, b et c) représente le développement du champignon *P. camembertii* aux différentes températures 27.5°C, 30°C et 32.5°C, respectivement.



Figure 13: Développement de *P. camembertii* sur milieu YPGA à différentes températures : 27.5°C (a), 30 °C (b) et 32.5 °C (c)

Le recouvrement total des boîtes de pétri est plus marqué lorsque le *P.camembertii* se développe à 27.5°C(photo a), et 30°C (photo b). Par contre on observe aucun développement à la température 32,5°C(photo c), et pour une durée de culture de 24jours.

Les masses des différentes biomasses récupérées (figure 14), fractions (AIM, AcIM, AcSM) récupérées sont représentées dans les tableaux VIII, IX ,X et IX.



Figure 14:Biomasse séchée et broyée (Exp 2)

Tableau VIII. Les masses obtenues après les différents traitements des biomasses issues de chaque expérience de la matrice des essais du plan Factoriel.

Expériences	Biomasses (g/L)	AIM (g/L)	AcIM (g/L)	AcSM (mg/L)
Exp 1	5.27	3.42	3.07	13.3
Exp 2	7.35	4.56	4.48	3.6
Exp 3	5.08	2.74	2.59	13.8
Exp 4	6.82	2.94	2.91	16.2
Exp 5	0	0	0	0
Exp 6	0	0	0	0
Exp 7	0	0	0	0
Exp 8	0	0	0	0
Exp 9	1.30	0.62	0.45	1.7
Exp 10	0.73	0.09	0.07	2.9
Exp 11	0.94	0.01	0.01	0
Exp 12	3.55	0.85	0.8	1.7
Exp 13	0	0	0	0
Exp 14	0	0	0	0
Exp 15	0	0	0	0
Exp 16	0	0	0	0

Tableau IX. Les masses obtenues après les différents traitements des biomasses issues de chaque expérience de la matrice des essais au centre du domaine.

Expériences	Biomasses (g/L)	AIM (g/L)	AcIM (g/L)	AcSM (mg/L)
Exp 1'	7.26	2.63	2.47	0.9
Exp 2'	8.43	4.39	4.22	1.8
Exp 3'	6.47	2.69	2.49	2.6
Exp 4'	9.63	3.58	3.37	2.6

Tableau X. Les rendements en chitine (AcIM) et en chitosane (AcSM) extraits des biomasses obtenues par la matrice des essais du plan factoriel

N° Essais	Variables réelle				Variables Codées				Réponse		
	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Y ₁ g/L	Y ₂ (%)	Y ₃ (%)
1	13,5	27.5	25	0.4	-1	-1	-1	-1	5.27	58.24	0.25
2	13,5	27.5	25	0.8	-1	-1	-1	1	7.35	60.95	0.05
3	13,5	27.5	75	0.4	-1	-1	1	-1	5.08	50.98	0.27
4	13,5	27.5	75	0.8	-1	-1	1	1	6.82	44.47	0.24
5	13,5	32.5	25	0.4	-1	1	-1	-1	0	0	0
6	13,5	32.5	25	0.8	-1	1	-1	1	0	0	0
7	13,5	32.5	75	0.4	-1	1	1	-1	0	0	0
8	13,5	32.5	75	0.8	-1	1	1	1	0	0	0
9	24,5	27.5	25	0.4	1	-1	-1	-1	1.30	34.51	0.13
10	24,5	27.5	25	0.8	1	-1	-1	1	0.73	9.59	0.39
11	24,5	27.5	75	0.4	1	-1	1	-1	0.94	1.06	0
12	24,5	27.5	75	0.8	1	-1	1	1	3.55	22.53	0.048
13	24,5	32.5	25	0.4	1	1	-1	-1	0	0	0
14	24,5	32.5	25	0.8	1	1	-1	1	0	0	0
15	24,5	32.5	75	0.4	1	1	1	-1	0	0	0
16	24,5	32.5	75	0.8	1	1	1	1	0	0	0

Tableau XI. Rendements en chitine et en chitosane extraits des biomasses obtenues par la matrice des essais au centre du domaine.

N° Essais	Variables réelles				Variables Codées				Réponse		
	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Y ₁ (g/L)	Y ₂ (%)	Y ₃ (%)
1	19	30	50	0.6	0	0	0	0	7.26	34.02	0.01
2	19	30	50	0.6	0	0	0	0	8.43	50.06	0.02
3	19	30	50	0.6	0	0	0	0	6.47	38.49	0.04
4	19	30	50	0.6	0	0	0	0	9.63	34.99	0.03

Avec :

Y₁ : Biomasse (g/L)

Y₂ : AcIM (%)

Y₃ : AcSM (%)

- **A partir des essais du plan factoriel**

La récupération des biomasses mycéliennes et le calcul de leurs concentrations permet de mettre en évidence l'importance des paramètres opératoires : températures, durée, solution d'O.E et la source azotée.

- Les huit expériences (Exp : 5-8 ; Exp : 13-16) réalisées à $T = 32.5\text{ °C}$ ne produisent pas de la biomasse. Ce résultat montre que la température est le 1^{er} paramètre qui a une influence de manière très significative sur la production de la biomasse mycélienne de *P.camembertii* sur milieu YPGA.
- Les huit expériences (Exp : 1-4 et Exp 9-12) montrent que la température préconisée à la croissance de ce champignon est de 27.5 °C .
- A la température de 27.5 °C , l'augmentation de la durée de 13.5 jours (Exp 1, Exp 2, Exp 3 et Exp 4) à 24.5 jours (Exp 9, Exp 10, Exp 11 et Exp 12) réduit la croissance mycélienne, à 13.5j (5.27 ; 7.35 ; 5.08 et 6.82 g/L, respectivement) et à 24.5j (1.30 ; 0.73 ; 0.95 et 3.55 g/L, respectivement). Ce résultat peut être expliqué par la phase d'autolyse des cellules suite à l'épuisement des substrats carbonés ou azotés dans le milieu.

- **A partir des essais du domaine**

Ce centre de domaine représente une température de 30 °C et une durée de 19 jours (presque 3 semaines). La production de la biomasse semble être, aux erreurs expérimentales près, dans le même ordre de grandeurs que celle obtenue à la température de $27,5\text{ °C}$ et une durée de 13.5 jours (Exp 1-4). Signalons que le protocole de production de la biomasse mycélienne comporte un grand nombre d'étapes et que chaque étape conduit certainement à des erreurs.

En conclusion, nous pouvons dire que la production de *P.camembertii* sur milieu YPGA est favorable dans l'intervalle de :

- Température $27,5\text{ °C} - 30\text{ °C}$
- Durée : 13,5 jours - 19 jours
- Oligo-élément 25 mL/L – 50 mL/L
- Source Azotée : rapport Extrait de levure/ Peptone : 0,4 – 0,8.

Dans ces conditions, la production de la fraction AIM ou AcIM est de l'ordre de 3 - 4 g/L.

En culture solide YPGA, le champignon renferme des quantités négligeables de chitosane libre (fraction AcIM) alors que la chitine est de 40-50 % de biomasse.

V.2. Production du chitosane par désacétylation de la chitine

La chitine est généralement convertie en chitosane par désacétylation alcalin avec l'hydroxyde de sodium (Chang et al. 1997). En raison de la quantité élevée de chitine brute obtenue à partir du mycélium de l'expérience (Exp 2 de la matrice des essais du plan Factoriel), La désacétylation a été réalisée seulement pour cette fraction AcIM produite. Avec et sans blanchiment de la chitine, différents temps ont été testés pour la désacétylation.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XII suivant.

Tableau XII.: Production de la chitine désacétylée à différents temps avec et sans blanchiment

Biomasse	Chitine BL DA 1h	Chitine BL DA 2h	Chitine BL DA 4h	Chitine DA 2h
AcIM (g)	1			
Température (°C)	105			
Temps (h)	1	2	4	2
Chitine DA (g)	0,55	0,49	0,50	0,44

Après lavage à l'eau distillée plusieurs fois, les fractions récupérées ont été pesées. Les rendements des chitines désacétylées à 105°C pendant 1h, 2h et 4h atteignent 50%.

Selon les travaux de Di Mario F, et al. (2007), le rendement du chitosane préparé à partir de la désacétylation de la chitine entre 80°C et 150°C issues de différentes souches de *Pleurotus ostreatus* (SMR) et de *Pleurotus eryngii* (SMR) sont respectivement 30,7 % et 44,8 %. Comparativement à notre étude le rendement est plus élevé (≈50%).

Le rendement du chitosane préparé à partir de la chitine, dépend du type de la souche utilisée.

La biomasse *P.camembertii* est composée de (0,05%) du chitosane libre, (60,9%) de la chitine (fraction AcIM) et (27.89 %) de la chitine désacétylée de l'expérience (Exp 2), ces résultats sont représentés dans la figure 15.

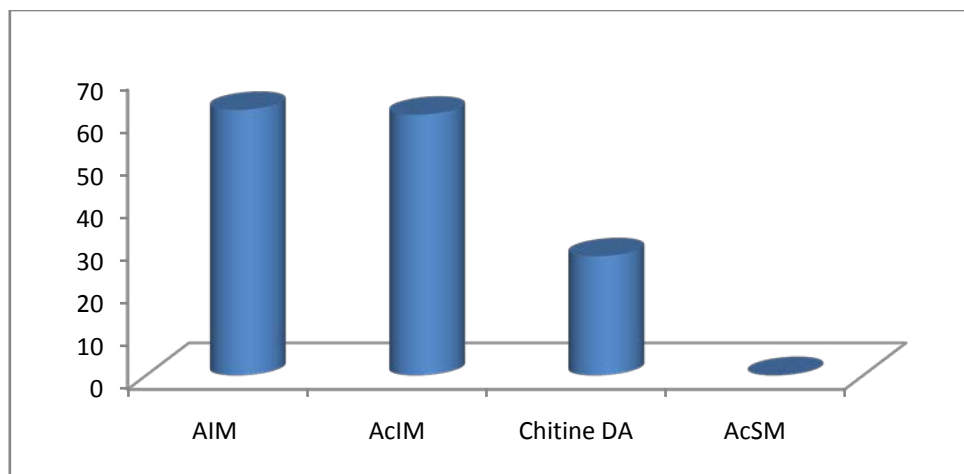


Figure 15: Composition de la biomasse mycélienne

V.3 : Caractérisation des produits préparés

V.3.1 : Test de solubilité des chitines désacétylée

Les échantillons obtenus ont été mis dans une solution d'acide acétique 1% afin de tester leurs solubilités en milieu acide dilué. Les résultats de test de solubilité sont donnés dans le tableau 14 suivant.

Tableau XIII: Test de solubilité

Produits	Chitine DA 1h avec Le blanchiment	Chitine DA 2h avec le blanchiment	Chitine DA 4h avec blanchiment	Chitine DA 2h sans blanchiment
Teste de solubilité	Insoluble	Soluble	Insoluble	Insoluble

La chitine blanchie puis désacétylée pendant 2h est soluble dans l'acide acétique 1% contrairement aux autres chitines DA (tableau 13). L'étape de blanchiment est donc nécessaire pour éliminer les pigments présents dans la chitine, et facilite l'étape de désacétylation pour une durée suffisante de 2heures (figure 16).

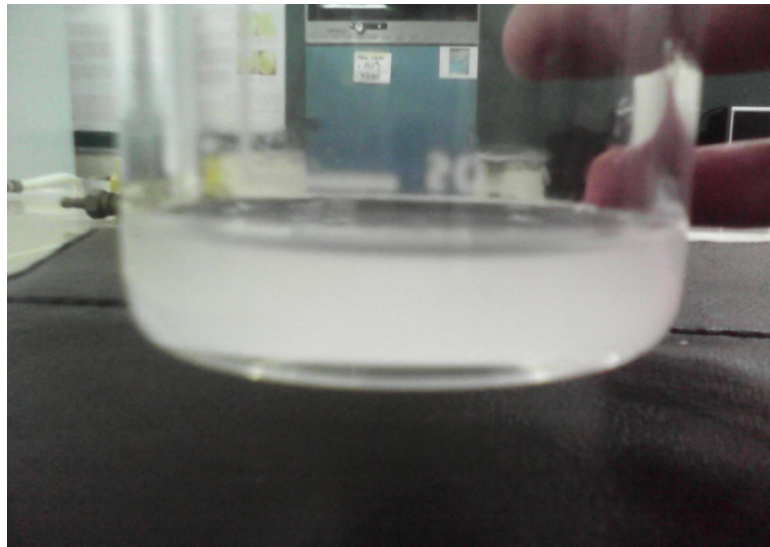


Figure 16 : Test de solubilité de la chitine (DA 2h) avec le blanchiment

V.3.3 : Production des billes du chitosane

Les billes humides préparées sont blanches et ne sont pas totalement sphériques, et elles sont remplies. Leurs tailles varient entre 1,5mm et 2 mm de diamètre (figure 17).

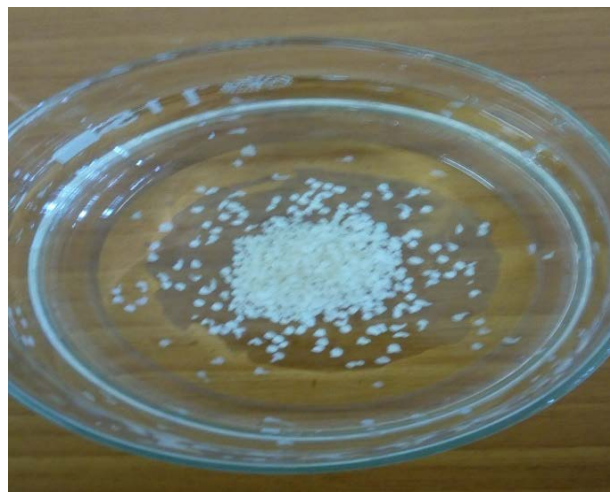


Figure 17 : Billes du chitosane fongique

Conclusion générale

Les polysaccharides forment une vaste classe de polymères naturels, parmi lesquels certains sont très importants dans les applications environnementales.

Cette étude originale a pour objectif principal l'isolement des biopolymères (chitine, chitosane libre) à partir du mycélium d'un champignon choisi : *Penicillium camembertii*. Une étude plus approfondie sur la culture du mycélium a été faite afin de produire des quantités plus élevée de biomasse et d'augmenter la quantité de fractions AIM riches en chitine/chitosane.

L'optimisation par plan composite a été proposée afin de déterminer les rendements maximums, en utilisant des conditions opératoires différentes, à savoir : la température, la durée, solution d'oligo-élément et la source d'azotée (rapport Extrait de levure/ Peptone).

D'après les résultats obtenus nous pouvons dire que la production de *P. camembertii* sur milieu YPGA est favorable dans l'intervalle de :

- Température 27,5°C - 30°C
- Durée : 13,5 jours - 19 jours
- Oligo-élément 25 mL/L – 50 mL/L
- Source Azotée : rapport Extrait de levure/ Peptone : 0,4 – 0,8.

En culture solide YPGA, le champignon renferme des quantités négligeables de chitosane libre (fraction AcIM) alors que la chitine est de 40-50 % de biomasse.

Le chitosane produit à partir de la désacétylation de la chitine à températures 105°C et à différents temps (1h, 2h et 4h), nous a permis de conclure que le rendement du chitosane préparé, dépend de type de la souche utilisée, la durée de traitement alcalin.

La production du chitosane avec désacétylation de la chitine à différentes conditions, nous montre que l'étape de blanchiment est nécessaire pour avoir un produit soluble dans une solution d'acide acétique 1%. Les meilleures conditions de désacétylation sont : une température de 105 °C, concentration en NaOH 10M et une durée de 2h.

En perspective

-Il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur la culture du mycélium, par plan composite centré en changeant l'intervalle de température en diminuant la durée de culture permettant de produire des quantités plus élevée de biomasse, et de la chitine et du chitosane.

-Application des chitosanes obtenus :

- Dans la décoloration des eaux avec les billes récupérées.
- Formation des bioplastiques

Références Bibliographiques

ABDOU E., NAGY K et ELSABEE M. (2008).Extraction and characterization of Chitin and Chitosan from local sources. *Bioresource Technology*. 99(5), 1359-1367.

AIDER M. (2006).Étude de la mobilité électrophorétique des Oligomères de Chitosane et leur fractionnement par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF).Thèse de doctorat, Québec, Université de Laval à Québec, 188 pages.

AMRANE A., FLORENCE P et YVES P. (1999). Proton transfer in relation to growth of *GeotrichumCandidum* and *Penicilliumcamemberti* in synthetic liquid media. *Enzyme and Microbial Technology*; 24,561-568

ARCIDIOCONOS S.,BALL D ., KAPLAN D., KRITH J., MAYER D., WALEY B., ZORFASS D.(1991). *Biotechnolog andBioengineering*; 38,557.

ASSAAD E. (2006). Etude du processus de Coagulation-Floculation du système montmorillonite Chitosane dans l'élimination de métaux de transition. Exigence partielle de la maîtrise en Chimie; Université du Québec Montréal ; Canada.

BADREDIN I. (2008).Etude des surfaces cellulaires *d'Aphanomyceseuteiches*. parasite majeur de légumineuses, thèse de doctorat ; l'Université Toulouse III - Paul Sabatier.

BOTTON B, BRETTON A, FEVRE M, GAUTHIER S, GUY PH, LARPENT JP, REYMOND P, SANGLIER JJ, VAYSSIER Y ET VEAU P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2^{ème} Edition : Masson, Paris, 512p.

BRUGNEROTTO J., LIZARDI J., GOYCOOLEA F.M., ARGUELLES M W., DESBRIERES J., RINAUDO M.(2001).An infrared investigation in relation with Chitin and Chitosan Characterization. *Polym*. 42 (8),3569-3580.

CASTELLUCCI FEDERICO. (2009).Certified in conformity Bucharest, The General Director of the OIV Secretary of the General Assembly

CERNING J., GRIPON J.C., LAMBERET G., LENOIR J. (1987).Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *Lait* ; 67(1), 3-39.

CHABAUD A. (2012). Le bon usage et le suivi thérapeutique pharmacologique du voriconazole, diplôme d'état de docteur en Pharmacie, deux établissements de sante de Rouen.

CHARTTERJEE S, MAJEE M, GHOSH S, MAJUMDER A. (2004). Open reading frame synechocystis PCC 6803, codes for l- myo- inositol 1 Phosphate synthase planta; 218(6),989, 98.

CHARTTERJEE S., ADHYA M., CHARTTERJEE B., GUHA A K.(2005).Chitosan form mucrorouxii :Production and Physico-Chemical characterization. *ProcessBiochemistrey*. 40(1), 395-400.

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, p.259-290.

DIGUTA C F. (2010).Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse de Doctorat en Sciences de l'Alimentation. Université de Bourgogne, Bourgogne, 193p.

FELT O., BURI P., GURNY R. (1998).A unique Polysaccharide for drug delivery, drug development and Industrial Pharmacy; 24, 979-993.

FONTAINE T., HARTLAND R P., DIAQUIN M., SIMENE C ET LATGE J.P. (1997).Differential patterns of activity displayed by two exo- -1, 3-Glucanases associated with the *Aspergillusfumigatus* cell wall. *Bacteriol*; 179, 3154–3163.

FRENCH D. ENAS N., DANIAL M. (1975).Chemistry and biochemistry of starch In p.309-321. MTP International review of science biochemistry of carbohydrates serie 1,5 Butterworth Park Press.

GERHARTZ W. (1990).General Production Methods In: *Enzymes in Industry*: VCH Publishers, New York (USA). p.67-72.

GIUSTINA A ET VENTURA P W. (1995).Effectsofa new dietary fiber integrator.*ActaToxicologicalTherapeutics*; 16, 199-214.

JEON, YJ., SHAHIDI F., KIM S.K.(2000).Preparation of Chitin and Chitosan Oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Reviews International*; 16(2), 159–176.

KARPCL, DONALDSON DD, NEBEN TY, SCHOFIELD B, XU X.(1998).Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*; 282, 2258-2261.

KLIS F M., BOORSMA A. (2006).Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*; 23,185–202.

KLONG L. (2002).Climate and other Environmental impact. p44.

KRASNIEWSKI I, PASCAL M, GILLES F., CATHERINE V., ALAIN D.D, JEAN F CA., PASCALE C. (2006).Impact of solid medium composition on the conidiation in *Penicillium camemberti*, *Process Biochimistry*; 46(6), 1318-1324.

LAMBERET G., LENOIR J. (1976).Les caractères du système Iipolytique de l'espèce *P. camemberti*. Purification et propriétés de la lipase majeure. *Lait*;(56), 622-644.

LARROCHE C., TALL U. B., GROS J.B. (1988). Aroma production by spores of *Penicilliumroquefortii* on a synthetic medium. J. Ind. Microbial. (13),1-8.

LATGE J P. (2007).A carbohydrate Armour for the fungal cell.MolMicrobiol.66,279–290.

LEE S H, SUHL S, KIM H S, LEE J O, SONGL S ,LEE S K.(2003).Evaluation of radiation Synovectomy of the knee by means of intra-articular injection of holmium-166-Chitosan complex in patients with rheumatoidarthritis, Korean Journal of Radiology; 4, 170-178.

LENOIR J., AUBERGER B., GRIPON J C. (1979). Les caractères du système protéolytiques de *P.caseicolum*III, le lait. (503) :138-157.

LIPKE P N ET OVALLE R. (1991).Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. J Bacteriology; 180(15), 3735-40.

MACCHI, G A. (1996).New approach to the treatment of obesity: Chitosan's Affects on body weight reduction and plasma cholesterol levels. Acta Toxicological Therapeutics; 27, 303-320.

MAJETI, N.V ET KUMAR, R. (2000).A review of chitin and chitosan Reactive and Functional Polymers; 46, 1-27.

MI-KYEONG J. (2004). Wiley Periodicals, Department of Polymer Chemical; 42, 3423–3432.

MOHAMED M., GHARIEB S M. EL-SABBAGH M A., SHALABY ET OSAMA M. (2015). Darwesh AIM Production of Chitosan from different species of *zygomycetes* and its Antimicrobial activity International Journal of Scientific & Engineering Research; 6- 4.

MOREAU C. (1979). Quelque problème posé par les moisissures dans les industries laitières in : la technique laitier .,(975) ,37-40.

MUNRO C A, GOW N A R. (2001).Chitin synthesis in human pathogenic fungi. Med Mycolg; 39 (1),41–53.

MUZZARELLI CET JEUNIAUX GW. (1986). Chitin in nature and technology. New York: Plenum Press, 551-570.

MUZZARELLI R A ET PETERS M G. (1997).Chitin Hand book, European Chitin Society.

MUZZARELLI R A., TANFANI F., SCARPINI G. (1980).Chelating film-forming and coagulating ability of the Chitosan–Glucan complex from *Aspergillusniger* industrial wastes. Biotechnology and Bioengineering; 22, 885–96.

NASRAOUI B.(2015).Les champignons et *Pseudo-champignons pathogenes* des plantes cultivées Biologique, Interaction Pathologique Publication de l’INAT ; Tunis.

NATHALIE J ET JEAN M B. (1993).Comparison of Volatile Flavor Compounds Produced by Ten Strains of *Penicillium camemberti* and a Horn ed., Biotechnologie. Dijon, France p.148-157.

NGUYEN MT. (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale de vietnam- étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de Doctorat en Génie des procédés et de l'environnement. Ecole doctorale : Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés Toulouse, 147p.

NISHIMURA K., NISHIMURA S., NISHI N., SAIKI L., TOKURA S., AZUMA.(1984).Immunological activity of Chitin and its derivatives N-acetylchito-oligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Bio-chemistry*; 57, 405-409.

NISHIMURA S., NISHI N., TOKURA S., NISHIMURA K., ET AZUMA.(1986).Bioactive Chitin derivatives Activation of mouse-peritoneal macrophages by (carboxymethyl) chitins. *Carbohydrate Research*; 146, 251-258.

NO K H., PARK Y., LEE H S ET MEYERS P. (2002).Antimicrobial activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with different molecular weights. *Int.J.Food Microbiology*; 74, 65-72.

NWE N, STEVENS W F. (2002).Chitosan isolation from the Chitosan-Glucan complex of fungal cell wall using amylolytic enzymes. *Biotechnology Letters*;24,1461-1464.

NWE N., FURUIKE T ET 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.

NWE, N STEVENS, W F, (2002).Production of fungal Chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology Letters*.24:131-134.

PANDEY A., NIGAM P., SOCCOL C R., SOCCOL V T., SINGH D., MOHAN R. (2000).Advances in Microbial Amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31, 135-152.

PAUL S. (2013). Conception de nouveaux systèmes de formulation d'actifs de pigmentant, en vue de leur utilisation par voie cutanée fonctionnelle. *Food Review International*, l'Université Toulouse III ;61, 159-176.

PITT J.I. (1979).The genus *Penicillium* and its teleomorphic states. *Eupenicillium Talaromyces*. Acad. Press., New York –Londre. p.115-134.

PRESCOTT S C., DUNN C G., REED G. (1987).Industrial microbiology. 4th ed. India: CBS Publishers and Distributors, p. 550-565.

RANE K.D ET HOOVER D.(1993).An evaluation of alcali and acide treatment for chitosan extraction form fungi, process Bichem; 28, 115-118.

RANE, K.D ET HOOVER,D.G.(1993).Food Biotechnology.7(1), 11-33.

RINAUDO M.(2006). Chitin and Chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science; 31,603-632.

ROQUEBERT M F. (1998). Taxonomie des moisissures. In :Cahagnier B et Molard DR. (Eds), Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés. Edition : Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp 40-84.

SAMSON R.A., ECKALOROLT C., ORTHE R. (1977). The taxonomy of *Penicillium* spies for fermented cheese Henkel etcieGmbH, dept of microbiology D- 4000 Düsseldorf p. 341-350.

SATOSHI O. (2013).la consommation d'extraits d'*Agaricussubrufescens*, champignon qui contiendrait Waseda (Japon).

SHAHIDI F ET SYNOWIECKI J.(1991).Isolation and characterization of nutrients and value added products from snow crab (*Chionoecetesopi/io*) and shrimp (*Pandalusborealis*) processing discards. Journal of Agricultural and Food Chemistry ; 39, 1527-1532.

SHAHIDI F, ABUZAYTOUN R.(2005). Chitin, Chitosan, and co-products: Chemistry, productions and applications health effects. Adv. Food Nutr. Res, 49: 93-135.

SHAHIDI F., ARACHCHI J. K. V., JEON Y. J.(1999).Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science & Technology, 10(2), pp. 37-51.

SUN X., LIU Z, QU Y., LI X. (2007).The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicilliumdecumbens*. Appl. Biochem. Biotech. (3), 119-128.

SYNOWIECKI, J., AL-KHATEEB, N. A. A. Q.(1997).Mycelia of *MucorRouxii* as a source of Chitin and Chitosan. Food Chem; 60 (4), 605-610.

TABUC C. (2007).Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de Doctorat en pathologie, mycologie, génétique et nutrition. Université de Bucarest, Institut National Polytechnique de Toulouse, 190 p.

TAN., WONG S M. ET KHOR E.(1996).Carbohydrate Polymers; 30,239-242.

THUZIN H., NITRAR N., TESTSUYA F., SEIICHI T., HISSHI T., (2012).Methode of N-acetylated Chitosane scaffolds and its invitro biodegradation by lysozyme.J.Biomed Science and Engineering; 5, 15-23.

- TIWARI K.L., JADHAV S.K., FATIMA A. (2007).**Culture condition for the production of thermostable amylase by *Penicilliumrugulosum*. Global journal of Biotechnology and Biochemistry.2(1),21-24.
- TOKORO A., KOBAYASHI M., TATEWAKI N., SUZUKI K., OKAWAY., MIKAMI, T. (1989).**Protective effect of N-acetyl Chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. Microbiology and Immunology; 33, 357-367.
- TOLAIMATE A., DESBRIERES J., RHAZI M., ALAGUI A.(2003).**Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties Polymer; 44(26),7939-7952.
- WHITE., FARINA P R; FULTON I. (1979).** Production and isolation of Chitosan from *Mucorrouxii*. Appl. Environ. Microbiology; 38(2), 323-328.
- XU Y., GALLERT C., WINTER J. (2008).** Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. Applied Microbiology and Biotechnology;79(4) ,687-697.
- YURYA S., YURY G Y. (2009).** Evaluation of various Chitin-Glucan derivatives from *Aspergillusniger* as transition metal adsorbents, BioresourceTechnology ;101 (6),1769-75.
- ZITOUNI M. (2013).** Sélection ET caractérisation d'une nouvelle Chitosanase thermostable, diplôme Doctorat Université Sherbrooke Canada.

Résumé :

Dans ce travail, nous nous sommes intéressées à la production des polysaccharides (chitine, chitosane libre) à partir du mycélium d'un champignon choisi : *penicillum camembertii*.

L'objectif de notre étude est d'optimiser la production de la chitine et du chitosane d'origine microbienne par la méthode des plans composites centrés. Les paramètres opérationnels variables étudiés sont : la température, la durée, les oligo-éléments et la source Azotée (rapport extrait de levure /peptone).

Les résultats montrent que la température et la durée sont les deux paramètres qui ont une influence significative sur la production de la chitine et du chitosane sur milieu solide YPGA. Dans ces conditions la production de la chitine est de l'ordre de 3-4 g/L, les quantités du chitosane libre sont négligeables.

Mots clés : plans composites centrés, *penicillum camembertii*, polysaccharides, chitine, chitosane.

Summary:

In this work, we were interested in the production of polysaccharides (chitin, chitosane free) starting from the mycelium of a selected mushroom: *penicillum camembertii*.

The objective of our study is to optimize the production of the chitin and the chitosan of microbial origin by the method of the centered composite plans. The studied variable operational parameters are: the temperature, duration, oligo-élément and the Nitrogenized source (report extracted from /peptone yeast).

The results show that the temperature and the duration are the two parameters which have a significant influence on the production of chitin and the chitosan on milieu solid YPGA.

Under these conditions the production of chitin is about 3-4 g/L, the quantities of the free chitosan are negligible.

Keywords: centered composite plans, *penicillum camembertii*, polysaccharides, chitin, chitosan.