الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Dr. YAHIA FARES - MEDEA –

Présenté pour l'obtention du diplôme de master en Génie des procédés

Option: Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème

Effet de la composition du milieu de culture sur la quantité de chitine et de chitosane chez un champignon

Dirigé par :

Mme ARBIA.W

présenté par :

Kheldaoui Affaf

Bechene Anissa

Année universitaire:2013/2014

Remerciement

Dieu merci pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.

Nous tenons à remercier dans un premier temps, toute l'équipe pédagogique de l'université de Médéa et les intervenants professionnels responsables de la formation, toute l'équipe et les ingénieurs au niveau de hall technologique, le corps enseignants et les professionnels, pour avoir animés tout au long de nos études

Ensuite nous tenons à remercier nos chers parents et toute la famille pour leur patience et encouragement à finir un chemin commencé il y'a si longtemps et pour leur amour et leur soutien tout au long de nos études.

Nous tenons à remercier aussi nos enseignants de primaire jusqu'à l'université

Nous sommes très reconnaissants envers Mme Arbia.W non seulement pour avoir dirigé ce travail, mais pour la confiance qu'il nous a témoignée, en pour avoir proposé ce sujet, pour son support pédagogique, sa précieuse aide dans la conduite des expériences, ainsi que son aide morale pendant toute la durée de ce travail.

Nous remerciements Mme Tassist, MCB à l''université Dr Yahia Farés de Médéa qui m'a fait l'honneur d'exercer la fonction de président du jury de thème. Mes remerciements sont également aux membres de jury pour toute l'attention qu'ils portent à ce travail : Mme Zouambia .Y, MCB à l''université Dr Yahia Farés de Médéa, Melle Khaouane.L, MAB à l''université Dr Yahia Farés de Médéa.

Nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à Mme Karache, Mme Tassist, Mme Rebouh et Mme Seddari pour leurs encouragements.

Nous remerciements également Mr Hadidi le Chef de Département de Génie de Procédés & de Génie de l'environnement et à tous ceux qui ont participé au bon déroulement de ce travail..

Affaf & Anissa

.A TOUS UN

GRAND MERCI

Dédicace

Je dédie ce travail

A mon père.

Tu as toujours entouré ta famille d'amoure et réjouissais des réussites de tes enfants.

Tu m'as soutenu dans les différentes étapes de ma vie et m'as appris le sens des valeurs.

Chaque homme a besoin d'un modèle dans sa vie et te restera à jamais le mien.

A ma mère.

Je te remercie pour ton soutien, ton amour et ton courage.

Reçois ici témoignage de tout mon amour.

A mes chères sœurs

Karima, Hanene, surtout à ma sœur Nadia tu es la meilleure sœur qui existe je te

souhaite un avenir plein de joie

A mes chers frères

Hakim, Nourddi ne, Kamel, Mourad, mohamed et Zoubir, , je te souhaite un avenir

plein de réussite et de bonheur.

A Mohamed Mahdi, Lamiss, Ghofrane, Mohamed anass, Tahar, Yacine

A Nadjet, Soumia, Sarra, rajaa

Pour l'esprit de mes grand-mères et mes grand-pères

A le membres de la famille Azzoug et kheldaoui

A Mme Arbia pour la confiance qu'il nous a témoignée en pour avoir proposé ce sujet

Mme Karache pour leur encouragement

A tout mes collèges de promotion

Anissa,Lynda,Hadjer,Sabrina,Amina,Hania,Mounia,Lamia,Nabila,Karima,Hafidha,Sitan,Mohamadou

Ames chères amies

Anissa, Djamila, Mazoura, Abla, Khadija, Nadjet, Farida,Zineb, Naima.b, Naima Imene,

Houdda, Adila

A mes camarades et tous ceux de la faculté des Sciences et de la technologies de l'université de YAHYA FARES

A tous ceux que Jaime

Affaf

Dédicace

A mon père qui sein dieu.

A ma très chère maman qui a toujours été là pour moi, et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de perseverance

J'espère qu'elle trouvera dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

Ames chers sœurs: Samia, Meriem, Hadjer, Abla

Ames chers frères: Kheireddine, Aziz

A Nacereddine, Abde lhake, Ismail

A lamia, Nawel

A, nouralhoudda, Mohamed amine, cy rine, wissal, yosra, Abdelmalek, yacoub , youness, sarra, maroua,

A mes tantes et à mes oncles.

A chaque cousins ET cousines

A tous mes collèges de promotion

Affaf, Lynda, Hadjer, Sabrina, Amina ,Mounia, Lamia, Nabila, Karima

Ames chères amies

Affaf, Khadija, nadjet, Selma, Djazia, Lynda, Hadjer, Imene

Je dédie mon travail à M. Menacer

A mes camarades et tous ceux de la faculté des Sciences et de la technologies de l'université de YAHYA FARES

A tous ceux que Jaime

Anissa

الملخص

يتم الحصول على الكيتوزان من قبل التعديل الكيميائي للكيتين، المستخلص من الهيكل الخارجي للجمبري و مصادر أخرى مثل الكتلة الحيوية الفطرية. الكيتين والكيتوزان هي بيوليمرات مؤلفة من وحدات اسيتيل الجلوكوزامين.

في هذا العمل سوف ندرس تأثير الوسط المعيشي لفطريات الفيزاريوم على كمية الكيتين والكيتوزان المستخرجة من الكتلة الحيوية الفطرية بالإعتماد على تجارب مختلفة من حيث تركيب الوسط المعيشي.

Abstract:

Chitosan is obtained by deacetylation of chitin, the major component of the exoskeleton of crustacean shells and fungi. Both chitin and chitosan are linear biopolymers of *N*-acetylglycosamine and glucosamine. The extraction of biopolymers made from fungal source *Fusarium* using different medium composition for studying effects of this last on chitin and chitosan production by the fungi *Fusarium verticilloides.*

Résumé

Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine, composé principal de l'exosquelette des crustacés et de champignons. La chitine et le chitosane sont des biopolymères linéaires composés d'unités N- acétylglucosamine et glucosamine. Le procédé d'extraction des bio-polymères à partir de source fongique en utilisant le champignon *Fusarium verticilloides* ainsi que l'étude de l'effet de la composition du milieu de culture sur la production de la chitine et du chitosane.

Liste de figures

Chapitre I :

Figure. I.1 : Structure chimique de la chitine **…….…….....4**
Figure. I.2 : Structure chimique du chitosane **…….…….....5**
Figure. I.3 : Source marine **…….....6**

Chapitre III :

Figure. III.1: Paroi d'un champoing ……..……**17**
Figure. III.2: Méthode de production de la chitine et du chitosane……**18**

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Figure. IV.1. représente le matériel utilisé au niveau de laboratoire ……..…...**26**
Figure. IV.2. La poudre de carapace..…..……....**27**
Figure. IV.3. préparation de l'oligochitine à partir de la poudre de carapace …….....**28**
Figure. IV.4. préparation de milieu PDA ……..…...**28**
Figure. IV.5. les flacons contenants le PDB pour la stérilisation ……**29**
Figure. IV.6. La pesée des composants des milieux de culture……**29**
Figure. IV.7. milieu de culture pour une expérience réalisée au laboratoire ……...**30**
Figure. IV.8. L'agitation des milieux de culture ……..**31**
Figure. IV.9. La centrifugation.……...……**31**
Figure. IV.10. biomasse humide……...**32**
Figure IV. 11. biomasse sèche……..**32**
Figure.IV.12. Traitement de la biomasse……..**33**
Figure.IV.13. Traitement de la fraction insoluble pour la récupération de la chitine……...**34**
Figure.IV.14. Traitement du surnageant pour la précipitation du chitosane……**35**

Chapitre V : Résultats et discutions

Figure. V.1 Biomasses sèches récupérées à la fin de fermentation……..…**37**
Figure. V.2. Précipitation de chitosane par NaOH 30% **.....**……**38**

Figure. V.3. La biomasse fongique en fonction de N° d'expériences……**39**
Figure. V.4. La quantité de la chitine fongique en fonction de N° d'expériences…….**40**
Figure. V.5. La quantité du chitosane fongique en fonction de N° d'expériences……..**41**
Figure. V.6. Rendement de récupération de la chitine par apport à la biomasse sèche ….....**42**
Figure. V.7. Rendement du chitosane récupéré par apport à la biomasse sèche ……...**42**
Figure. V.8. Les spectres Infra- rouge des différentes biomasses fongiques……..…**43**
Figure. V.9. Les spectres Infra- rouge des différentes chitines fongiques……..**45**
Figure. V.10. Les spectres Infra- rouge de la chitine fongique (N°6,7, 11) et la chitine commerciale……..…**47**
Figure. V.11. Les spectres Infra- rouge des différentes chitines fongiques obtenues par Di Mario et al. (2007)…….…...**48**
Figure. V.12. Les spectres Infra- rouge des différents chitosanes fongiques……..…**49**
Figure. V.13. Les spectres Infra- rouge des chitosanes fongiques (N°3 et N°4) et le chitosane Commercial……..**50**
Figure .V.14. Les spectres Infra- rouge des différents chitosanes fongiques obtenues par Di Mario et al. (2007)……**52**

Liste des tableaux

Chapitre I :

Tableau. I.1: Les principales sources de chitine d'après Mathur et Narang (1990).……..…**7**

Chapitre III :

Tableau. III.1: Les différents rendements d'extraction de la chitine et du chitosane en fonction des conditions d'extraction ……**21**

Chapitre IV :

Tableau. IV.1: Les produits utilisés au laboratoire.……**26**

Tableau. IV.2. La matrice expérimentale présentant composition du milieu et les différentes compositions…….**30**

Chapitre V:

Tableau. V.1: Les concentrations de la masse sèche, chitine et chitosane……..…**39**

Tableau. V.2: Comparaison des biomasses fongiques obtenues avec la chitine commerciale…….**44**

Tableau. V.3: Comparaison des chitines fongiques extraites avec la chitine commerciale…**46**

Tableau. V.4: Comparaison des chitosane fongiques extraites avec la chitosane commerciale……..**51**

Tableau. V.5. Les résultats comparatives entre Chitine et Chitosane par le DA et DD. ……**53**

Listes des abbreviations

ARNm: L'acide ribonucléique messager

$CaCl_2$: chloride de Calcium

CaCO3: carbonate de Calcium

$CaHSO_3$: Calcium hydrogen sulphate

Ca (OH) $_2$: hydroxyde de Calcium

Cd^{2+}: ion de Cadmium

CH_3COOH: Acide acétique

Cu^{2+} : Ion de cuivre

DA: Degré d'acétylation.

DD: Degré de désacétylation.

DMAc: N- diméthylacétamide

FeSO4: Sulfate ferreux

FTIR : Infrarouge à transformation de Fourier

HCl: Chlorure de sodium.

HCOOH: Acide méthanoïque

HNO_3: acide nitrique

H_2SO_4: acide sulfurique

LiCl: Chlorure de lithium

LMPC: N-Lauryl- N- méthylène phosphonique chitosane

MDa: Micro Dalton.

MgSo4: Sulfate de magnesium

MTPC: Méthyl-thiopropyl chitosane

NaCl: Chlorure de sodium**.**

Na_2CO_3: Carbonate de sodium

$NaHCO_3$: carbonate hydrogen Sodium

$NaHSO_3$: Sodium hydrogen carbonate

NaOH: Hydroxyde de sodium

NAG: N-acétylglucosamine

NH_2 : Groupement amine

NH4Cl: chloride d'ammonium

$NHCOH_3$: Groupement acétylamine

NMP: N- méthylpyrrolidone

NMPC: N-méthylène phosphonique chitosane

OH: ion hydroxyde

PDA: Agar de pomme de terre dextrose

PDB: Bouillon de pomme de terre dextrose

PM: Poids moléculaire**.**

PMC: pyridyl- méthyl- chitosane

POU: Protéines d'Organismes Unicellulaires

K_2CO_3: Carbonate de potassium

K2HPO4: Phosphate d'hydrogène de potassium

KOH: L'hydroxyde de potassium

RMN: La résonance magnétique nucléaire

RPM: Tours par minute.

TMC: Thiényl-méthyl- chitosane

TNF*α*: Tumor Necrosis Factor

SOMMAIRE

	Introduction……..	**1**
	Chapitre I : Chitine et Chitosane	
I. 1.	Historique……	**3**
I. 2.	Définition de la chitine et du chitosane……	**4**
I. 2.1.	La chitine……..	**4**
I. 2.2.	Le chitosane……..	**4**
I. 3.	Origine de la chitine et du chitosane……	**5**
I. 4.	Propriétés de chitine et de chitosane ……..	**7**
I. 4.1.	Les propriétés biologiques……...	**7**
I. 4.2.	Les propriétés physico-chimiques……	**8**
	Chapitre II : Les applications de la chitine et chitosane	
II. 1.	En agriculture……...	**10**
II. 2.	Traitement des eaux usées et protection de l'environnement……..	**11**
II. 3.	Applications biomédicales et pharmaceutiques……...	**12**
II. 3.1.	En chirurgie……..	**12**
II. 3. 2.	En ingénierie tissulaire……	**12**
II. 3. 3.	En ophtalmologie…….	**12**
II. 3. 4.	Traitement du cancer……	**13**
II. 3. 5.	Contrôle de l'hypercholestérolémie et du surplus de poids……	**13**
II. 3. 6.	Activation du système immunitaire…….	**14**
II. 3. 7.	Activité anticoagulante……	**14**
II. 4.	Activité antimicrobienne ……	**14**
II. 5.	En industrie agro-alimentaire……..	**15**
II. 6.	En biotechnologie…….	**15**
II. 7.	Autres applications……...	**15**
	Chapitre III : Les méthodes d'extraction de la chitine et la chitosane	
III. 1.	La méthode chimique ……..	**17**
III. 2.	La méthode biologique…….	**19**
III. 3.	Les facteurs influençant l'extraction de chitine et le chitosane à partir des champignons……..	**20**
	Chapitre IV : Matériels et méthodes	
IV	Matériels et méthodes……...	**25**
IV. 1	Matériels ……..……	**25**
IV. 1.1	Objectif…….	**25**
IV. 1.2	Matériel biologique ...……	**25**
IV. 1.3	Matériel de laboratoire …...……	**25**
IV. 1.4	Les produits ……..…	**26**
IV. 2	Les méthodes ……...	**26**
IV. 2.1	Les oligochitines ……..…….	**27**
IV. 2.2	Préparation de milieu de culture …….....	**28**
IV. 3	Extraction de la chitine et le chitosane ……	**32**
IV. 3.1	Traitement de la biomasse ……..….	**32**
IV. 3.2	Traitement de la fraction insoluble pour la récupération de la chitine …	**34**
IV. 3.3	Traitement du surnageant pour la précipitation du chitosane ……..	**35**

VI. 4 Analyse spectroscopiques infrarouges …… **36**

Chapitre V : Résultats et discutions

V. 1. Résultats ……. **37**
V. 1.1 Récupération de la biomasse ……... **37**
V. 1.2. Précipitation du chitosane …..……...…… **37**
V. 1.3. Les concentrations de la biomasse, la chitine et le chitosane ……..… **38**
V. 2 Analyse par spectroscopie Infra- rouge ……..……..… **43**
V. 2. a. Analyse Infra- rouge de la biomasse fongique …… **43**
V. 2. b. Analyse Infra- rouge de la chitine fongique extraite...……. **45**
V. 2. c. Analyse Infra- rouge du chitosane fongique ……..…… **48**
V. 3 Caractérisation de la chitine et le chitosane obtenus ……...…… **52**

Conclusion ……... **54**
Annexe ……...…….. **56**
Références bibliographiques ……..……. **57**

Introduction

Les océans recouvrent plus de deux tiers de la surface du globe et une très grande diversité d'organismes y vivent et prolifèrent, Certains de ces organismes élaborent des composés biochimiques forts prometteurs pour l'humanité, Les travaux de ces composés communément appelés « biomolécules », ont débuté au cours des années 50 (Seng, 1988). L'une des recherches a permis la découverte de la chitine composante structurelle majeure de l'exosquelette d'invertébrés marins, principalement, des crustacés.

La chitine est le polymère le plus répandu dans la nature après la cellulose. Ce polymère hautement hydrophile est présent dans la cuticule ou exosquelette des insectes, dans la paroi des champignons et de certaines algues chlorophycées, mais surtout dans les carapaces d'invertébrés marins et d'eau douce comme les crevettes, crabes, homards, Krill. Les carapaces les plus exploitées sont celles des crevettes et des crabes à cause de leur teneur élevée en chitine qui représente 14%-27% et 13%-15% respectivement (No et *al*., 1989).

Dans certains pays (Japon, Etats-Unis, etc.), les résidus chitineux commencent à être revalorisés. Des usines d'extraction et de production de la chitine et du chitosane ont été mises au point. On utilise ces produits ou leurs dérivés notamment en agriculture, dans l'industrie des cosmétiques, dans l'alimentation, dans le domaine de la santé, dans le traitement des déchets, etc. (Leclerc, 1997).

L'extraction de la chitine passe par deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation. Cette isolation peut se faire par deux méthodes : chimique et biologique. La méthode chimique nécessite l'utilisation des acides et des bases, alors que la méthode biologique fait appel à des bactéries lactiques.

L'objectif de ce travail vise à extraire la chitine et le chitosane à partir de la paroi des champignons et étudier l'effet de la composition du milieu de culture sur le rendement de leur production. La réalisation de cette étude a nécessité :

- La culture du champignon sur différents milieux de culture ;
- Récupération de la chitine et du chitosane et leur quantification ;
- Caractérisation par spectroscopie infrarouge des biopolymères récupérés ;

Ce mémoire comporte deux grandes parties :

- Une partie bibliographique consacrée aux généralités sur la définition de la chitine et le chitosane et leurs propriétés (chapitre I), leurs différentes applications (chapitre II), les méthodes d'extraction à partir des différentes sources (chapitre III)
- Une partie expérimentale consacrée aux matériels et méthodes, à la discussion et l'interprétation des résultats.

I.1. Historique

La découverte de la chitine par le professeur Français H.Braconnot, spécialisé en Histoire de la nature, date du 18ème siècle. Les premiers brevets d'invention en Chitine furent obtenus en 1935 par Ricardo. A sous le titre, « Chitine ». Ce n'est que dans les années 1970 que ces polymères ont suscitées un réel intérêt (Mekahlia, (2007)) quand les gouvernements américains et japonais ont cherché à valoriser ces déchets et ont lancé les premiers programmes de recherche.

Actuellement, il est connu que la chitine et le chitosane (collectivement appelés les substances chitineuses), sont des sources renouvelables que l'on peut trouver en abondance dans la nature. Ce fait a attiré plus d'intérêt pour le développement durable. Du fait que la chitine et le chitosane sont deux biopolymères produits par certains animaux. Ils sont donc biodégradables et biorésorbables. Ces deux propriétés sont primordiales à notre époque où la protection de l'environnement joue un rôle important.

La Chitine et le chitosane sont deux polymères d'origine naturelle. Essences du milieu marin, ils sont par leur abondance et rôles dans le règne animal, l'équivalent de la cellulose dans le règne végétal.

En 1799, l'anglais Hachett se rendit compte qu'après déminéralisation des carapaces, on obtenait un matériau souple résistant à la dégradation chimique et qui gardait dans les moindres détails, la forme et les caractéristiques ornementaux de la carapace. Ce n'est que plus tard que cette matière fût identifiée comme haut polymère et baptisée chitine du terme grec "chiton", signifiant "côte de maille" ou tunique.

Le chitosane, dérivé désacétylé de la chitine, est décrit pour la première fois en 1811 par Braconnot, nommé ainsi en 1823 par Odier. En 1884, la chitine est isolée, mais ce n'est qu'en 1930 que sa structure chimique est établie par Zeichmeister et Zoth.

La chitine et le chitosane seront délaissés jusqu'aux années 1970, où des problèmes de pollutions en relanceront l'intérêt. En effet, le rejet massif de carapaces dans les régions industrielles utilisant les crustacés, incite le Massachusetts of Technology (USA) à entreprendre une étude sur les disponibilités de valorisation de la chitine. Parallèlement en Alaska, au Japon et en France, de nouvelles expériences débutent.

Ainsi, les différentes investigations conduisent à la découverte de nouveaux dérivés, et à la définition des caractéristiques et propriétés de la chitine et du chitosane. Leurs applications deviennent nombreuses et interviennent dans des domaines variés tel que l'agro-alimentaire, le textile, l'agriculture, mais aussi l'environnement, la santé...

I.2. Définition de la chitine et du chitosane

I.2.1. La chitine

La chitine, poly (b-(1-4)-N-acétyl-D-glucosamine), est un polysaccharide naturel d'une importance majeure(Figure I.1). Ce biopolymère est synthétisé par un très grand nombre d'organismes vivants; et compte tenu du montant de la chitine produite chaque année dans le monde, il est le polymère le plus abondant après la cellulose.

La chitine se produit dans la nature comme des microfibrilles cristallines ordonnées formant composants structurels dans l'exosquelette des arthropodes ou dans les parois cellulaires des champignons et des levures. Il est également produit par un certain nombre d'autres organismes vivants dans le règne végétal et animal inférieur (Arbia, 2007).

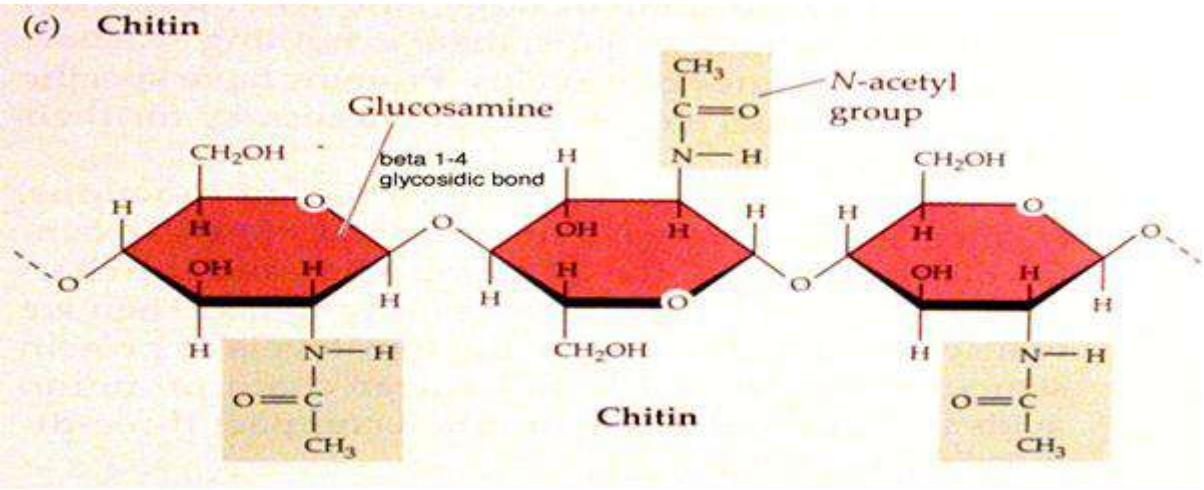


Figure I.1. Structure chimique de la chitine.

I.2.2. Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (Desbrières, 2002). Sa structure chimique idéale est un enchaînement de monomères β-D-glucosamine reliés par une liaison glycosidique (1→4).

Le terme chitosane est donné à copolymère dont le DA est inférieur à 50 % (Desbrières, 2002 ; Hudson, Jenkins (2003) ; Sandford, (2003)).

Le chitosane (Figure I.2), forme N-désacétylée de la chitine, est facilement soluble dans des solvants organiques dilués à pH acides (Peniston & Johnson, 1980).

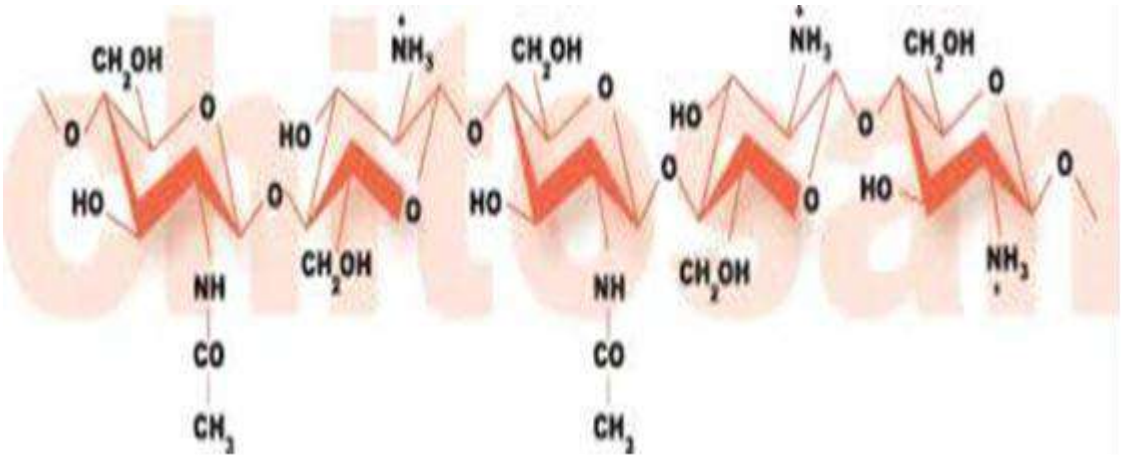


Figure I.2. Structure chimique du chitosane.

I.3. Origine de la chitine et du chitosane

La Chitine est après la cellulose, l'un des polymères les plus abondants sur terre (Sandford, 1989). Par contre le chitosane (dérivé désacétylé de la chitine) ne se trouve que rarement dans la nature. Il n'est présent que dans la paroi d'une classe particulière de champignons les *Zygomycètes*, et chez quelques insectes (Seng, 1988). La chitine est ainsi la source la plus abondante du chitosane.

Les principales sources de chitine sont les animaux marins et les insectes où la chitine entre dans la composition de la cuticule, et à un degré moindre au niveau de la paroi intestinale, du tube digestif, des trachées, des tendons musculaires et du squelette pour en assurer la tenue. En réalité, les structures chitineuses ne sont jamais constituées de chitine seule; elle est généralement complexée à des protéines sous la forme de glycoprotéines, ce qui confère des propriétés de rigidité (ou de souplesse) aux cuticules.

La chitine est actuellement obtenue à partir des carapaces de crevettes, d'os de seiche et de plumes de calmars. En France, la transformation de calmars et de seiche étant inexistante, les coproduits ne sont pas disponibles. De plus, la production de produits à haute valeur ajoutée est coûteuse et nécessite une gestion des déchets pointilleuse.



Figure. I.3: Source marine

La quantité en chitine varie suivant les espèces de crustacés et de mollusques, leurs exosquelettes (ou plumes pour le calmar) contiennent entre 15-40% de chitine, 20-40% de protéine et 20-50% de carbonate de calcium. On peut également noter l'existence de pigments, au niveau des carapaces de crustacés, de nature lipidique tels que des caroténoïdes. La plume de calamar a une particularité intéressante : elle ne contient quasiment pas de minéraux ($CaCO_3$).

La chitine existe sous trois formes : α (alpha), β (bêta), et γ (gamma) qui diffèrent suivant leur degré d'hydratation, la taille de leur maille élémentaire et le nombre de molécules de chitine par maille. La forme α se caractérise par sa structure cristalline comparable à un empilement de molécules antiparallèles avec des liens hydrogènes puissants. Dans la chitine β, les chaînes sont empilées dans la même direction. La chitine γ est une combinaison des 2 autres.

Tableau 1: Les principales sources de chitine d'après (Mathur et Narang, (1990))

Sources	Sites de présence	Teneur en chitine (%)
Arthropodes : • Crustacés • Insectes • Arachnides	Exosquelette cuticule	2-72
Mollusques • seiches • pieuvres/calamars	Coquille Dents Plumes	6-40
Pogonophores	Tubes	33
Cnidaires	Capsule d'œufs Membranes	3-30
Annélides • sangsue • lombric	Soies	0.2-38
Brachiopodes	Cuticules Coquilles	4-29
Champignons • levures • ascomycètes • pénicillium • blastocladiacés • chytridiacés	Paroi cellulaire Tige Spore	2.9-20.1
Algues Lichen	Paroi cellulaire	Faible

Le % de chitine est donné par rapport à la masse sèche.

I.4. Propriétés de chitine et de chitosane

La chitine est un polysaccharide azoté, basique, cationique, de couleur blanchâtre et non toxique. Elle est caractérisée par sa rigidité, sa faible réactivité chimique, ses propriétés biologiques et physico-chimiques (Majeti et *al*., 2000 ; Morimoto et *al*., 2002 ; Mrunal, 2004).

I. 4.1. Les propriétés biologiques

- **La biodégradabilité :** la dégradation biologique de la chitine est réalisée par une série d'enzymes : chitinases, lysozyme et glucanases (Shigemasa et *al*., 1994 ; Chih-Min et al., 2002 ; Yang et *al*., 2004). Parmi les chitinases, les endo-chitinases (Laura et *al*., 2006) hydrolysent le polymère de façon aléatoire pour produire des dimères et des trimères de N-acétylglucosamine (NAG), tandis que les exo-chitinases (Laura et *al*., 2006) hydrolysent la chitine de haut poids moléculaire en produisant uniquement des dimères de NAG. Finalement,

les N-acétylglucosaminidases aussi appelées chitobiases ou N-acétyl hexoaminidases hydrolysent les dimères de NAG et parfois le NAG des extrémités non-réductrices des chaînes de chitine pour produire des monomères de NAG (Plouffe, 1997).

- La biocompatibilité : sa présence dans l'organisme vivant n'induit aucun effet néfaste à la santé du receveur (Foscolo et Phillipon, 1997 ; Bal et *al*., 2006).

- Effets bactériostatique et bactéricide (Morimoto et *al*., 2002).

I. 4.2. Les propriétés physico-chimiques

Ces propriétés influencent l'utilisation industrielle de la chitine.

-Le degré d'acétylation (DA) : c'est un des plus importantes caractéristiques de la chitine (Muzzarelli et Riccardo, 1980). Il est défini comme étant le nombre de groupe N-acétylglucosamine présent sur le polymère par rapport au nombre total d'unités (Montserrat, 2002).

On parlera de chitine lorsque DA est supérieur à 70% (Kiefer, 1999). Cependant, une désacétylation peut avoir lieu au cours de l'extraction de la chitine, on parle alors du degré de désacétylation qui varie en fonction de l'origine et la méthode d'extraction de la chitine (Kurita, 2001).

Le degré de désacétylation (DD), défini comme étant le nombre de groupes D-glucosamine par rapport au nombre total d'unités, est relié au DA (DD= 100- DA). C'est un paramètre structural important qui influence les propriétés physico-chimiques de la chitine (poids moléculaire, viscosité, solubilité, l'activité physiologique, la réactivité chimique et la biodégradabilité,….) (Suzuki et *al*., 1990 ; Kittur et *al*., 2002).

Afin de déterminer le degré d'acétylation avec une plus grande précision, plusieurs techniques ont été testées. La technique qui semble la plus adaptée pour une caractérisation rapide est la spectroscopie infrarouge (Muzzarelli et *al*., 1980 ; Montserrat, 2002).

- La solubilité : malgré la similarité structurale, la chitine est insoluble dans les solvants usuellement utilisés pour la cellulose (solutions aqueuses d'hydroxyde de cuprammonium, de cupriethylènediamine et de cadoxen) (Poirier, 2000). Elle est fortement hydrophobe et insoluble dans les solvants organiques usuels à cause de sa structure cristalline (Morimoto et *al*., 2002). Elle se dissout dans quelques solvants corrosifs et toxiques tels que : hexafluoroisopropanol, hexafluoroacétone, chloroalcools en présence d'acides minéraux. Elle est également soluble dans l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique et l'acide phosphorique à 78-97% (Yang et *al*., 2004). Cependant, ces solvants provoquent sa dégradation (Gagné, 1993).

Les mélanges N, N- diméthylacétamide (DMAc)/ LiCl et N- méthylpyrrolidone (NMP)/ LiCl utilisés également pour la solubilisation de la chitine furent découverts en 1977. Rutherford et Austin comparèrent l'efficacité de ces deux systèmes de solvants à plus de 200 autres systèmes potentiels. Ils conclurent que DMAc/ LiCl et NMP/ LiCl présentaient des propriétés les plus intéressantes pour la solubilisation de la chitine. A température ambiante, ces systèmes engendrent ni dégradation ni modification chimique. Une solution de chitine dans DMAc/ LiCl 5% (poids/poids) peut conserver sa viscosité initiale pendant 48 jours. Plusieurs études par RMN démontrent qu'il n'y a pas de réaction entre la chitine et DMAc/ LiCl 5%, donc il s'agit d'un vrai solvant de la chitine. On peut utiliser DMAc/ LiCl (4-9%) pour différentes méthodes de mesure de masse moléculaire (viscosimétrie, chromatographie d'exclusion stérique et diffusion de la lumière), pour la synthèse de dérivés de chitine en conditions homogènes et aussi pour la préparation de fibres, de films (Poirier, 2000) et de membrane à base de chitine pour la microencapsulation (Roderick, 1998).

La solubilité de la chitine dans DMAc/ LiCl semble dépendre du degré d'acétylation. Plus le degré d'acétylation est élevé, plus le pourcentage de solubilité est élevé. Cela démontre l'importance du groupement N-acétyl dans le mécanisme de solubilisation.

- **Le poids moléculaire :** la définition du poids moléculaire des polysaccharides et la compréhension de ses conséquences sur les propriétés physico-chimiques, ont présenté un vrai défi aux chimistes pendant un certain nombre d'années. Dans le cas de la chitine, la connaissance de tel paramètre est très importante pour les usages industriels (Montserrat, 2002). Il varie entre 1,03 et 2,5 MDa (Fernandez-Kim., 2004).

La chitine et ses dérivés possèdent une grande valeur économique à cause de leurs activités biologiques et leurs applications industrielles et biomédicales (Pawadee et *al*., 2003). La production et l'utilisation industrielle de la chitine et ses dérivés augmentent continuellement depuis les années 1970. Actuellement, à cause de leurs caractéristiques telles que le poids moléculaire, la charge cationique, leur capacité à stocker la vapeur d'eau, la formation des films et l'adsorption des métaux lourds, la chitine et ses dérivés ont divers champs d'application qui s'étendent de l'agriculture, le traitement d'eau, la fabrication du papier et des produits de beauté, à l'industrie pharmaceutique et la biotechnologie (Harkness et *al*., 2003 ; Preyanat et *al*., 2003).

II. 1. En agriculture

La chitine, le chitosane et leurs oligomères ont des propriétés fortes intéressantes. Ils peuvent, en effet, agir comme éliciteurs des mécanismes de défense des plantes (Leclerc, 1997) et leur confère une résistance systémique face à certains agents phytopathogènes (Bouarab, 2000).

Il a été démontré que le chitosane et ses dérivés, appliqués sur les tissus des plantes provoquent :

1) l'induction de plusieurs mécanismes biologiques, similaires à ceux observés lors de l'infection par des pathogènes (Côté, 1999).
2) la synthèse de plusieurs protéinases telles les chitinases et de certaines protéases inhibitrices.
3) l'accumulation de phytoalexines (Muzzarelli et Riccardo, 1983; Bouarab, 2000; Lateur, 2002).
4) l'augmentation de la lignification dans les tissus.

Les propriétés antifongiques que confèrent la chitine et ses dérivés ont fait l'objet de plusieurs études. Leur mécanisme d'action est un relâchement des molécules de la paroi des champignons, une augmentation de la vacuolation et la désintégration des protoplasmes des hyphes. Ce qui explique pourquoi l'agent pathogène ne peut coloniser les tissus racinaires en présence de chitosane (Bell et *al*., 1998 ; Côté, 1999 ; Laflamme, 2000).

Le chitosane permet également de prolonger le temps de conservation des fraises, des poivrons, des concombres et des tomates (El-Ghaout et *al*., 1992), à cause de sa capacité à

former un enrobage semi-perméable (Ait Barka et *al*., 2004) qui modifie l'atmosphère interne des fruits en retardant le vieillissement rapide et le taux de respiration (Amilali, 1999).

Ali et *al* (1997) ont observé, suite à l'ajout de matière organique chitineuse, que les feuilles et les tiges de soja accumulent plus d'azote (Côté, 1999).

II. 2. Traitement des eaux usées et protection de l'environnement

Les rejets industriels colorés présentent un problème de résistance des polluants et constituent un impact pour l'environnement. En effet, la présence dans ces rejets des substances organiques ou minérales non biodégradables, voire toxiques, engendre un impact négatif sur le milieu récepteur (sol, cours d'eau, mer,…) (Gülbahar et *al*., 2007), ce qui impose leur traitement avant de les évacuer dans ce milieu. En particulier, les colorants contenus dans les effluents des textiles nécessitent des techniques physico-chimiques pour les dégrader telles que : la coagulation-floculation, oxydation, ultrafiltration, …). Cependant, l'utilisation de ces techniques reste limitée à cause du coût de traitement élevé ou des difficultés de gestion des boues qui en résultent. L'utilisation des substances chitineuses (chitine et chitosane) pour la décoloration des effluents par adsorption et par coagulation-floculation constitue une alternative aux différentes techniques de dépollution précédemment citées (Joseph et Laszlo, 1994 ; Elisane et *al*., 1998 ; Bribri et *al*., 2005).

La chitine, le chitosane et leurs dérivés sont également caractérisés par leur grande capacité d'adsorber des ions métalliques (Jaroslaw et *al*., 2005) tels que les ions Cd^{2+} (Benguella et Benaissa, 2002), et les ions Cu^{2+} (Bal et *al*., 2006; Taboada et *al*., 2003). Leur capacité à former des complexes avec des ions métalliques a été exploitée au Japon pour la purification des eaux (Shahidi et *al*., 1999).

Les dérivés du chitosane : N- 2-pyridyl- méthyl- chitosane (PMC), N- 2- thiényl-méthyl-chitosane (TMC) et N- 3- méthyl-thiopropyl chitosane (MTPC) peuvent sélectivement adsorber des métaux précieux tels que : l'or (III), palladium (II) et platinium (IV) dans l'acide chlorhydrique (Yoshinari et *al*., 1998). Le pouvoir chélateur de ces substances (Muzzarelli et Riccardo, 1970 ; Laurance et Mansur, 1980) est expliqué par la présence de groupement acétylamine ($NHCOH_3$) et le groupement amine ($-NH_2$) sur les polymères chitine et chitosane, respectivement (Mrunal, 2004).

Selon Bailey et ses collaborateurs (1999), le chitosane possède une affinité exceptionnelle pour l'adsorption des ions métalliques, avec une capacité supérieure à 1mmol de métal/g, pour la plupart des métaux lourds tels que l'arsenic.

En plus des métaux lourds, la chitine et ses dérivés peuvent être utilisés pour l'élimination des nitrates (Jaafari et *al*., 2001) et la pré-concentration du phénol et chlorophénol dans l'eau (Rhee Jae- Seong et *al*., 1998).

II. 3. Applications biomédicales et pharmaceutiques

II. 3. 1. En chirurgie

Les substances chitineuses ont la particularité de résister à la bile, aux jus pancréatiques et aux urines, ce qui justifie la fabrication des fils de suture en chitine (Wachter, 1998).

II. 3. 2. En ingénierie tissulaire

Le chitosane potentialise la différenciation des cellules ostéoprogenitrices et facilite la formation osseuse *in vitro* (Klokkevold, 1995). L'induction de la formation osseuse est aussi observée *in vivo*. Elle semble être favorisée par l'attraction des facteurs de croissance grâce aux propriétés poly cationiques du chitosane. Il constitue aussi un bon agent ostéoconducteur lors des chirurgies dentaires (Côté, 1999).

Dans un modèle de reconstitution tissulaire, Muzzarelli (1999) a montré que l'utilisation du chitosane active les macrophages et stimule les fibroblastes conduisant ainsi, à la formation de tissus vascularisés et physiologiquement normaux qui accélèrent la cicatrisation (Muzzarelli and Riccardo, 1983). Des analyses histologiques après implantation chez le rat, au niveau musculaire, ont montré une bonne tolérance des particules de chitosane par les tissus environnants (Côté, 1999). Il améliore également l'hémostase (Nettles, 2001).

II. 3. 3. En ophtalmologie

Les hydrogels sont de formes semi-solides susceptibles d'augmenter le temps de contact avec les tissus oculaires et d'améliorer la biodisponibilité des médicaments administrés localement comparativement aux collyres conventionnels. Le chitosane, utilisé jusqu'alors pour la fabrication de nombreuses formes pharmaceutiques (comprimés, injectables, formes nasales), a été choisi comme véhicule pour la mise au point d'hydrogels ophtalmiques (Felt, 1999 ; Morfin et *al*., 2002).

II. 3. 4. Traitement du cancer

Les chitosanes, seuls ou en complexe avec un polymère anionique, sont un excellent support pour le transport et le relarguage lent de principes actifs médicamenteux (Gogev et *al*., 2003 ; Jae-Young et *al*., 2006).

La biodégradabilité de ces biopolymères a permis de fabriquer des dispositifs plus précis, libérant des substances actives à la vitesse et à l'endroit choisis (Foscolo et Phillipon, 1997).

La bio adhésion est aussi une propriété d'utilité non négligeable dans l'utilisation du chitosane dans la libération d'agents thérapeutiques. Elle vise à augmenter le temps de résidence du système polymère/médicament et sa stabilité, par attachement du polymère à la surface ciblée et permettre ainsi une optimisation de l'assimilation médicamenteuse. Cette propriété est conférée par le caractère poly ionique. En fait, plus la densité de charge est importante, meilleure est l'adhésion du polymère (Côté, 1999).

Le chitosane a été abondamment utilisé comme excipient de base pour des formes injectables. La majorité des recherches dans ce domaine est axée sur l'utilisation du polysaccharide dans des formes galéniques de type microsphères ou conjugués macromoléculaires chargés en principes actifs appartenant à la classe des antinéoplasiques (mitoxantrone, 5-fluorourcile, ciplatine, cytrabine et paclitaxel) (Felt, 1999 ; Anand et Ramesh, 2004).

II. 3. 5. Contrôle de l'hypercholestérolémie et du surplus de poids

Le chitosane a des propriétés hypercholestérolémiantes dans le sérum et le foie (Ousamu et *al*., 1994 ; Kim Se-Jae et *al*., 1999), anti-ulcères, anti-arthriques et anti-uricémies. Le chitosane alimentaire réagit dans l'intestin et se lie avec les acides gras et autres lipides comme les triglycérides, les stérols, le cholestérol et les acides biliaires. Ces nouveaux composés chitosane-lipides sont fortement excrétés et réduisent d'autant la réabsorption intestinale (Muzzarelli et Riccardo, 1983 ; Muzzarelli, 1999).

Le chitosane est partiellement métabolisé par les bactéries de l'intestin et libère de la glucosamine et du N-acétyleglucosamine, deux produits reconnus pour soulager l'arthrose (Muzzarelli, 1999).

II. 3. 6. Activation du système immunitaire

Les chitosanes peuvent également déclencher la production du TNFα (Tumor Necrosis Factor) par les monocytes humains via les récepteurs lipopolysaccharidiques (Otterlei et *al*., 1994). En outre, il a été démontré qu'un chitosane partiellement désacétylé augmente l'activité cytolytique des macrophages péritonéaux. Enfin, il stimule également la production d'IL-1 (interleukine-1) par les macrophages péritonéaux chez la souris (Gogev et *al*., 2003).

L'efficacité du chitosane comme adjuvant (substance qui, lorsqu'elle est administrée en même temps qu'un antigène, augmente la réponse immunitaire à cet antigène) en vaccination est bien établie actuellement (Gogev et *al*., 2003). De plus, le chitosane a la capacité d'activer le complément qui intervient dans la défense immunitaire humorale non spécifique (Benesch, 2001).

Outre la formulation soluble de chitosane, de ses sels et dérivés, des nanoparticules et microparticules de chitosane ont été également administrés par voie intranasale (Soane et *al*., 2001). Il a été démontré que des nanoparticules faites de chitosane étaient efficaces pour augmenter l'absorption nasale d'insuline chez le lapin, le rat et le mouton (Gogev et *al*., 2003).

II. 3. 7. Activité anticoagulante

Au niveau sanguin, la chitine, le chitosane et leurs dérivés poly sulfatés ont des propriétés anticoagulantes, grâce à leurs structure proche de l'héparine, ils se comportent comme cette dernière en inhibant directement l'activité de la thrombine (Benesch, 2001 ; Preyanat et *al*., 2003 ; Jayakumar et *al*., 2006), et ne produisent ni hémolyse ni altération des lymphocytes et érythrocytes (Côté, 1999).

II. 4. Activité antimicrobienne

Le chitosane et ses dérivés inhibent la croissance d'une variété de microorganismes (bactéries et champignons). L'avantage que présente ces biopolymères par rapport aux autres désinfectants c'est qu'ils soient biodégradables et présentent une faible toxicité vis- à- vis des cellules des mammifères (Xiao et *al*., 2001).

Aujourd'hui, l'activité antimicrobienne du chitosane et ses dérivés est bien déterminée, mais leur mode d'action reste inconnu (Jae-Young et *al*., 2006). Plusieurs mécanismes ont été proposés :

1- Altération de la perméabilité cellulaire en se fixant sur la membrane de la cellule (El-Ghaouth et *al*., 1992).

2- Inhibition de la synthèse protéique par l'interaction du chitosane et l'ADN ce qui bloque la formation de l'ARNm (Xiao et *al*., 2001).

3- A cause de son pouvoir chélateur, le chitosane fixe les ions métalliques inhibant ainsi la production de toxines et la croissance cellulaire (Jae-Young et *al*., 2006).

4- Inhibition de l'activité enzymatique par l'absorption des molécules d'eau (Shahidi et *al*., 1999).

II. 5. En industrie agro-alimentaire

La chitine et ses dérivés : chitosane, N-méthylène phosphonique chitosane (NMPC) et N-Lauryl- N- méthylène phosphonique chitosane (LMPC) sont des biopolymères qui ont la capacité de former des films biodégradables, d'immobiliser les enzymes et préserver les aliments contre la détérioration microbienne (Shahidi et *al*., 1999). Ils sont également utilisés comme additif alimentaire (Agulló et *al*., 2003). Le chitosane a été proposé également dans la composition d'aliments à faible teneur en sucre et en sel.

II. 6. En biotechnologie

Faisant partie des polymères cationiques, le chitosane permettrait la complexation de l'ADN et a le potentiel d'être utilisé en tant que vecteur non viral pour délivrer des gènes (Côté, 1999 ; Suna Özbas-Turan et *al*., 2003). Il a été utilisé également pour l'immobilisation des enzymes (Muzzarelli et Riccardo, 1980) et l'encapsulation des cellules des mammifères (Jinjiang, 1996).

II. 7. Autres applications

Le chitosane peut être appliqué dans l'industrie papetière. Les chimistes ont remarqué que la molécule de chitosane ressemble étonnamment à la cellulose. Il suffit de remplacer les groupements amines (NH_2) du chitosane par des groupements hydroxyles (OH) pour obtenir la cellulose. Des industriels américains comptent bien utiliser les dérivés du chitosane pour la fabrication de pâte à papier (Dubrana, 1992).

Dans l'industrie photographique, le chitosane est utilisé pour récupérer les sels d'argent qui viennent se fixer sur le bio polymère.

En Microbiologie, la chitine peut être utilisée comme source de carbone dans les milieux de culture de bactéries chitinolytiques telles que *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* K-187. Par conséquent, elle induit la production des chitinases (Wang et *al*., 1995 ; Chang et *al*., 2006) qui peuvent être extraites du milieu pour être utilisées comme des biopesticides (Kramer et Muthukrishnan, 1997), des antibactériens et des fongicides (Huang et *al*., 2005).

En outre, les hydrolysats de chitine sont également utilisés comme source de carbone et d'azote pour la production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU) (Ferrer et *al*., 1996 ; Shin et *al*., 2000).

La chitine provenant des carapaces des crustacés se présente sous forme de complexes protéiques enchevêtrés dans un réseau de sels minéraux principalement constitué de carbonate de calcium. Les analyses biochimiques de la matrice protéique montre la présence de protéines acides et des glycoprotéines (Hirotoshi et al., 2004). Dans le cas des champignons, la chitine et le chitosane sont complexés avec d'autres polysaccharides acides ou de glucines. **(Figure III.1)**.

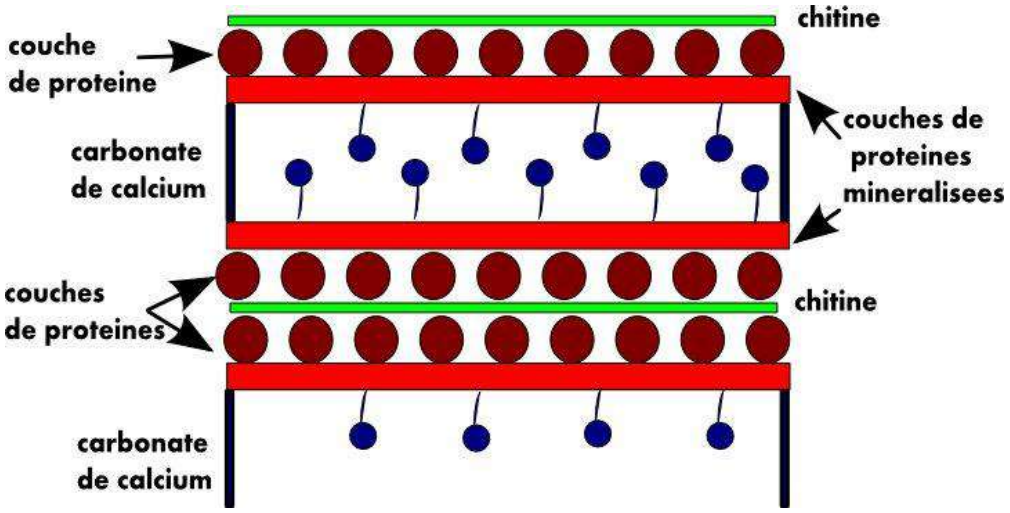


Figure III.1. Paroi d'un champignon.

La purification complète de la chitine native nécessite l'enlèvement de quatre ensembles de constituants principaux : protéines, minéraux, lipides et pigments caroténoïdes. La présence de liaisons covalentes chitine-protéines demande généralement des processus de déprotéinisation sévères qui peuvent affecter la masse moléculaire de la chitine résultante. Il en est de même pour les méthodes de déminéralisation en milieu acide.

L'isolation de la chitine passe par deux étapes : la déminéralisation et la déprotéinisation. Cette extraction peut se faire par deux méthodes : la méthode chimique et la méthode biologique.

III. 1. La méthode chimique

Elle fait appel à l'utilisation des acides et des bases. La solubilisation des minéraux nécessite l'utilisation d'une variété d'acides (HCl, HNO_3, H_2SO_4, CH_3COOH et HCOOH) (Jinjiang, 1996). Cependant, l'acide chlorhydrique (HCl) à température ambiante est le plus

utilisé afin de dissoudre $CaCO_3$. Ce dernier en réagissant avec HCl donne naissance à un composé soluble ($CaCl_2$) qui sera éliminé par un simple lavage (Fernandez-Kim, 2004) **(Fig. III.2)**.

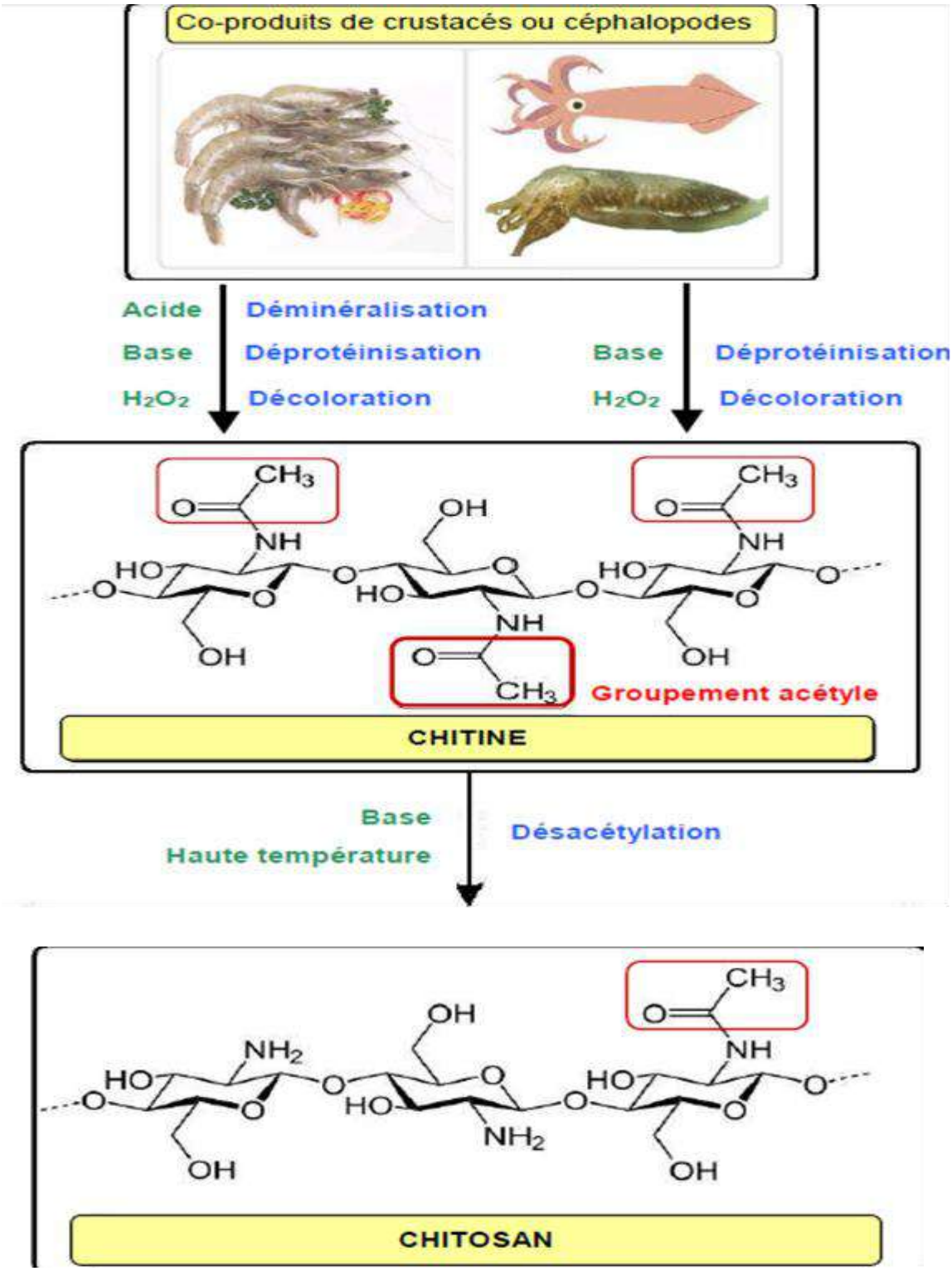


Figure III.2. Méthode de production de la chitine et du chitosane

Quant à la déprotéinisation, elle nécessite un traitement basique en utilisant une des bases suivantes : Na_2CO_3, $NaHCO_3$, KOH, K_2CO_3, $Ca(OH)_2$, $NaHSO_3$ et $CaHSO_3$ (Jinjiang, 1996).

La déprotéinisation par des solutions de NaOH et la déminéralisation par des solutions de HCl sont, toutefois, les méthodes les plus utilisées.

Cependant, cette méthode présente de nombreux inconvénients. Parmi eux, on cite la pollution chimique provoquée par les effluents d'acides et de bases produits lors de l'extraction de chitine ainsi que le coût élevé de leur traitement avant qu'ils soient évacués dans l'environnement (Yang et *al*., 2000 ; Shirai et *al*., 2001 ; Jung et *al*., 2005a). Ces traitements conduisent à l'augmentation de prix de revient de la chitine.

L'utilisation de HCl et NaOH à forte température conduit également à la dépolymérisation et désacétylation de la chitine donnant naissance à des produits de qualité variable, non reproductible et non homogène (Gagné, 1993 ; Yang et *al*., 2000 ; Shirai et *al*., 2002).

III. 2. La méthode biologique

C'est une nouvelle méthode qui a été mise en évidence pour remplacer la méthode chimique en raison de ces nombreux inconvénients cités précédemment (Evonne et Lee, 2002). Cette méthode est basée sur l'utilisation des bactéries lactiques et/ou des enzymes protéolytiques (Gagné, 1993). Elle conduit à la formation d'une fraction liquide riche en protéines, en minéraux et en pigments et une fraction solide : la chitine (Rao et *al*., 2000).

La déminéralisation biologique des carapaces de crevette fait intervenir l'acide lactique produit, par hydrolyse de la source de carbone présente dans le milieu de fermentation, par la bactérie lactique. Cette fermentation provoque un abaissement du pH, qui a pour effet d'éviter les contaminations et de déminéraliser les carapaces. La réaction de l'acide lactique avec le carbonate de calcium conduit à la formation du lactate de calcium qui peut être éliminé par un simple lavage. Quant à la déprotéinisation, elle est assurée par les protéases produites par les bactéries lactiques, les bactéries résiduelles et les protéases présentes dans les déchets de crevette (Rao et *al*., 2000).

Dans le cas des champignons, la valorisation des biomasses fongiques provenant des industries d'antibiotique ou agro-alimentaire semble très intéressante du fait qu'elle va contribuer à l'élimination d'un déchet riche en matière organique et d'autre part récupérer les substances de hautes valeurs telles que la chitine et le chitosane.

III.3. Les facteurs influençant l'extraction de chitine et le chitosane à partir des champignons

En vue d'améliorer la production microbienne, une attention a été accordée à la déterminer de l'effet des conditions de fermentation sur le rendement de production et sur les propriétés physico-chimiques de ces biopolymères.

Plusieurs travaux portant sur l'étude de l'influence de la composition des milieux de culture sur les taux de la chitine et du chitosane récupérés à partir des champignons.

L'extraction de la chitine et le chitosane à partir de différentes espèces de champignons à savoir *Agaricus bisporus*, *Auricularia auriculajudae*, *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Armillaria mellea*, *pleurotus Ostreatus*, *Pleurotus sajorcaju*, et Pleurote du panicaut (Pochanavanich et Suntrornsu, 2002; Yen et Mau, 2007b; Mario et al., 2008).

Le taux de croissance du champignon dépend des conditions de culture telles que la température, la teneur en humidité, la composition du milieu de culture, le temps de récolte et surtout des espèces du champignon. Une augmentation du taux de la chitine peut être obtenue soit par augmentation de rendement de la biomasse ou par une augmentation de la teneur de la paroi cellulaire en chitine/chitosane.

Afin d'étudier l'influence des conditions et des processus d'extraction, plusieurs études ont été réalisées. Crestini et al. (1996) et Pochanavanich et Suntornsuk (2002) ont utilisé NaOH 1M à 121°C pendant 0,25 heure pour la déprotéination et l'acide acétique à 2% à 95°C pendant 8-14h pour l'extraction du chitosane. Alors que Mario et al. (2008) et Yen et Mau (2007), ont utilisé de NaOH 1M à 40°C pendant 15-17h pour la déprotéinisation et l'acide acétique à 5% à 90°C pendant 3h pour l'extraction du chitosane. Le rendement total de la chitine obtenue varie entre 10 à 40 mg/g de biomasse sèche et celui du chitosane varie de 85 à 196 mg/g de biomasse sèche.

Le tableau suivant résume l'ensemble des résultats obtenus par les études précédemment citées.

Tableau III.1. Les différents rendements d'extraction de la chitine et du chitosane en fonction des conditions d'extraction

champignon espèces	**Optimale de récolte (jours)**	**Rendement en biomasse (g / l)**	**Rendement de la chitine ou du chitosane* (mg/g de biomasse)**
L. edodes (Crestini et al. 1996	12	3	*40
Abisporus (SMR 13) (Mario et al. 2008)	21	3.5	85
A.auricula-judae (SMR 54) (Mario et al. 2008)	21	6.8	196
A.auricula (SMR 90) (Mario et al.2008)	21	3.2	101
T.versicolor (SMR 117) (Mario et al.2008)	21	4.2	131
A.mellea (SMR439) (Mario et al.2008)	21	6.4	111
P. ostreatus (SMR684) (Mario et al.2008)	21	4.9	153
P.eryngii (SMR755) (Mario et al.2008)	21	4.6	87
L.edodes no.1(Pochanavanich and Suntornsuk 2002)	9	1.4	*33
P.sajor-caju no.2(Pochanavanich and Suntornsuk 2002)	21	10	*12

En outre, Crestini et al. (1996) ont rapporté que les rendements du chitosane, à savoir, 120 mg/l de milieu de fermentation dans des conditions de fermentation liquides et 6,18 g/kg de milieu de fermentation dans des conditions de fermentation à l'état solide sont produits à partir du champignon *L. edodes*. Sur la base de ces données, il peut être considéré que la culture du champignon de couche sur un support solide, ce qui est la méthode de culture de champignon naturel, pourrait être la meilleure méthode de culture pour la production de la chitine et du chitosane à partir des champignons.

Sur la base de la connaissance actuelle sur ce sujet, le mycélium des champignons peut être considéré comme une source alternative pour la production de chitine et le chitosane qui être utile pour certaines applications pratiques spécifiques. Les chitosanes des champignons ont un degré de désacétylation de 70% à 90% qui dépend de l'espèce de champignons et les conditions de traitement, et le poids moléculaire moyen d'environ 1-2 x10^5Da (Crestini et al., 1996 ; Pochanavanich et Suntornsuk, 2002 ; Yen et Mau, 2007a, Mario et al., 2008).

La production microbienne de la chitine et de chitosane a été largement étudiée, notamment, chez les *Zygomycètes* (Arciadiacono et Kaplan, 1992), qui sont connus pour contenir des quantités plus élevées en chitine et chitosane dans leurs parois cellulaires en comparaison avec d'autres classes de champignons (Shimahara et al., 1989 ; Campos-Takaki, 2005; Zamani et al., 2007). Beaucoup de recherches ont été faites à l'aide de ces souches comme *Absidia coerulea* (Davoust et Hansson, 1992 ; Muzzarelli et al., 1994 ; Niederhofer et Müller, 2004), *M. rouxii* (blanc et al. 1979 ; Chatterjee et al., 2005 ; Wu et al., 2005) et *R. oryzae* (suntornsuk et al., 2002 ; Yoshihara et al. 2003). Ces micro-organismes peuvent être facilement cultivés dans un milieu minimal et la chitine et le chitosane de la paroi cellulaire sont facilement récupérés.

Tan et al. (1996) ont étudié la production de chitosane par 13 souches de Zygomycètes. *Gongronella butleri* USDB 0201 a produit la plus grande quantité de chitosane extractible (93,4 mg/200 ml substrat).

La composition du milieu de culture joue un rôle très important sur la production de la chitine/chitosane. (Göksungur, 2004) a montré que la production de chitosane par fermentation *R. oryzae* dans un milieu à base de la mélasse peut être augmentée de 961 à 1109 mg/L par l'optimisation de la concentration initiale en sucre, le taux d'aération et la vitesse d'agitation.

En outre, l'étude statistique de l'influence de la nature et de la quantité des sources de carbone et d'azote à savoir le D-glucose, L-asparagine et la thiamine, réalisée par Andrade et al. (2003) en utilisant la souche *M. javanicus* a montré que la concentration en L-asparagine avait un effet très significatif sur la production de la chitine alors que le temps d'incubation présentait un effet non significatif.

Des résultats similaires, sur l'optimisation de la production de la chitine par *C. élégans* (IFM 46109) ont été rapporté par Andrade et al., 2000. Le rendement le plus élevé de la chitine 28,8% a été obtenue avec un milieu contenant 60 g/L de D-glucose, 3 g/L de L-asparagine, et de 0,008 mg/L de thiamine. Globalement, ces résultats sont en accord avec Stamford et al. (2007) qui ont déclaré que la production de chitosane par *C. élégans* (RUU 542) est fortement dépendante des conditions de culture, y compris les milieux de culture.

Ainsi, des études réalisées par Chatterjee et al. (2005) ont montré qu'il n'existe pas de différences significatives dans le rendement de chitosane obtenus par fermentation de *M. rouxii* sur différents milieux. Cependant, il ya des variations dans leur propriétés physico-

chimiques tel que la cristallinité. Ils ont constaté que le chitosane extrait à partir d'un champignon cultivé dans un milieu à base de mélasse et des sels était plus cristallin par rapport à celui extrait à partir d'un milieu à base d'extrait de levure, peptone, glucose et le bouillon de pomme de terre dextrose (PDB).

De même, Nadarajah et al. (2001) ont montré qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative observée dans le niveau de chitosane extractible obtenu à partir du mycélium de *Rhizopus* sp. cultivé dans des milieux contenant différentes concentrations de glucose dans la gamme de 1% à 5%.

Chatterjee et al., (2008) ont rapporté que les hormones de croissance des plantes améliorent la production de chitosane par *R. oryzae*. De même, l'urée est la source d'azote la plus utilisée pour induire la production de chitosane par des champignons filamenteux. La production de chitosane par *G. butleri* USDB 0201 a été stimulée lorsque de l'urée a été ajoutée au substrat solide (Arbia, 2007).

En outre, (Jaworska et Konieczna, 2001) ont étudié l'influence des ions ferreux, des ions manganèse, des ions de cobalt, de la trypsine et de la chitine, en tant que suppléments dans le milieu de culture, sur la production de chitosane par *Absidia orchidis*. Ils ont montré que le manganèse et les ions ferreux donnent les résultats les plus significatifs alors que les ions cobalt inhibent complètement la croissance des champignons. Il semble que la production de chitosane, formé par l'action de complexes de chitine-synthétase et de la chitine déacétylase, pouvait être régulée par la présence d'ions manganèse et ferreux dans le milieu de croissance.

Rungsardthong et al. (2006) ont montré que l'augmentation de la vitesse d'agitation améliore à la fois la croissance et la production du chitosane par *Abisidia glauca*. Une production maximale du chitosane (1,28 g/L) à 200 tours par minute contre 0,6 g/L avec une vitesse d'agitation de 100 tours par minute.

En outre, il semble qu'une bonne grande aération et agitation peuvent stimuler la production du chitosane par *A. Coerulea* en culture discontinue (Kim et al., 2001). Ceci indique que le mélange doit être suffisant pour éviter la limitation diffusionnelle des nutriments et de l'oxygène

Le pH est également un facteur important à considérer pour la production du chitosane par plusieurs champignons. Rane et Hoover (1993) ont rapporté que le pH de la culture influence le rendement et le degré de N-acétylation du chitosane de *A. coerulea,* probablement

en raison du pH optimal de la chitine déacétylase. Selon Kafetzopoulos et al. (1993), un pH de 4,5 est optimal pour l'activité de la chitine déacétylase de *M. rouxii*. Les résultats sont en accord avec l'étude de Kim et al. (2001), qui ont rapporté que le taux de la croissance cellulaire et la production du chitosane par *A. coerulea* ont été significativement améliorés en contrôlant le pH à 4,5, indiquant que le pH affecte à la fois la morphologie fongique et l'activité de la chitine désacétylase. De même, Amorim et al. (2001) ont rapporté que des rendements plus élevés de chitosane ont été atteints dans les 24 h de culture de *M. racemosus* et *C*. élégants à pH 3,5.

La période recommandée de fermentation varie de 1 à 21 jours selon le type de culture utilisé pour la production de chitine/chitosane et les conditions de culture (Amorim et al., 2001; Mario et al.2008). Le champignon atteint généralement leur croissance optimale au bout de 48 à72h d'incubation, tandis que la production maximale du chitosane se produit au début de la phase de croissance (Chatterjee et al., 2005 ; Tan et al., 1996). Par exemple, Synowiecki et AI-Khatib (1997) ont obtenu des rendements de chitine et du chitosane dans le mycélium de *M. rouxii*, culture vieille de deux jours, de 8,9% et 7,3%, respectivement. Ce résultat est tout à fait différent de celle rapportée par Wu et al. (2005) qui a déterminé que la teneur totale en glucosamine dans la biomasse sèche de *M. rouxii* était 14,2% au $4^{ème}$ jour et est augmentée jusqu'à 20,1% au $21^{ème}$ jour à 28°C sans agitation.

La cinétique de croissance des micro-organismes et la production de chitine/chitosane sont également étudiés en utilisant d'autres champignons Mucorales cultivés par fermentation submergée. *Cunninghamella élégans* (UCP 542) semblaient atteindre la phase de croissance exponentielle tardive après seulement 48h, produisant 24.3g de biomasse sèche /L de milieu. Les meilleurs rendements en polysaccharides sont obtenus avec 48 h de culture pour le chitosane (66 mg/g) et de 72h pour la chitine (440 mg/g) (Stamford et al., 2007).

IV. Matériels et méthodes

IV. 1. Matériels

IV .1.1. Objectif

Le but de ce travail est la récupération de la chitine et du chitosane qui se trouvent au niveau de la paroi du champignon *Fusarium Verticillioides* en jouant sur la composition du milieu de culture utilisé pour chaque expérience.

IV.1.2. Matériel biologique

Le champignon utilisé, dans ce travail est *Fusarium verticillioides* fournit gracieusement par l'institut de phytopathologie de l'institut National Supérieur d'agronomie d'Alger.

VI. 1.3. Matériel de laboratoire



agitateur de paillasse.



pH mètre.



Etuve.



Plaque chauffante



Centrifugeuse.



Autoclave

Figure. IV.1. représente le matériel utilisé au niveau de laboratoire

IV.1.4. Les produits

Les produits utilisés au cours de ces expériences cités dans le tableau IV.1

Tableau IV.1. Les produits utilisés au laboratoire.

Les produits	La Marque
Agar	Fluka
Glucose	Riedel-de Haën
Cacl2	Riedel-de Haën
MgSo4	Riedel-de Haën
FeSO4	Riedel-de Haën
Ethanol	Theralab
Acétone	Carlo erba

VI. 2. Les méthodes

Préparation de la poudre de carapace :

La poudre de carapace des crevettes est préparée suivant le procédé cité par **Mukherjee, 2001 :**

- Débarrasser la carapace de la chaine, des antennes et des pattes ;

- Faire bouillir la carapace dans de l'eau pendant 1h pour enlever le maximum de tissus ;
- Séchage dans l'étuve ;
- Laisser refroidir ;
- Débarrasser d'éventuels tissus encore présents, par frottement ;
- Faire subir les carapaces un choc thermique qui permet de casser la structure cristalline qui caractérise la carapace et de les rendre plus faciles à broyer ;
- Mettre les carapaces ainsi chaudes dans un récipient puis l'ensemble est rapidement plongé dans un bain d'acétone contenant de la glace ;
- Broyer les carapaces à l'aide d'un broyeur pour obtenir une poudre de granulométrie variable de 1 à 3 mm (choisi arbitrairement dans notre travail).



Figure. IV.2. La poudre de carapace.

IV.2.1. Les oligochitines

Les oligochitines utilisées dans ce travail sont produits par hydrolyse de la carapace des crevettes *Parapenaeus longirostris*.

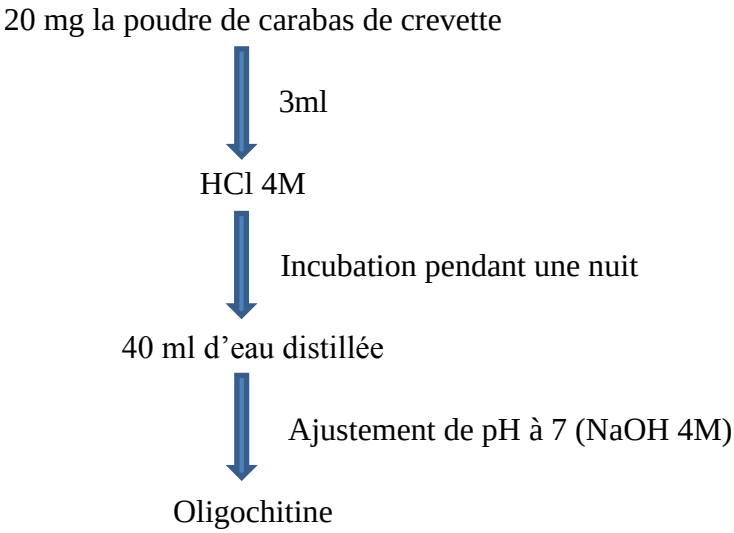


Figure. IV.3. préparation de l'oligochitine à partir de la poudre de carapace

IV.2.2. Préparation de milieu de culture

Les milieux de culture sont réalisés au laboratoire. Le milieu de base est le PDB (potato dextrose bouillon) ensuite il sera modifié en ajoutant des éléments nutritifs en fonction des conditions de chaque expérience selon la matrice expérimentale (voir matériel et méthodes).

- **Protocole expérimentale**

- Mettez 250 g de pomme de terre, épluchée et couper en morceau, dans un bêcher.
- Ajoutez de l'eau distillée et laissez Bouillir pendant 20 min
- Filtrez



Figure. IV.4: préparation de milieu PDA.

L'agitation et l'incubation se fait à l'aide d'un agitateur de paillasse à température ambiante.

- Ajoutez la quantité du glucose selon les conditions de chaque expérience.
- Ajustez le volume final avec de l'eau distillée toujours selon les conditions de chaque expérience.
- Remarque: lorsqu'on a besoin du milieu solide, on ajoute de l'agar 20 ml.
- Versez dans des flacons (**Fig.IV.4**) et stérilisez à 120°C pendant 20 min.



Figure IV. 5. les flacons contenants le PDB pour la stérilisation.

Ensuite, on ajoute les différents composants suivant la matrice utilisé de chaque milieu de culture en fonction des conditions de chaque expérience (voir tableau des expériences. **Tableau 4.2**).



Figure IV.6. La pesée des composants des milieux de culture.

Tableau. IV.2. La matrice expérimentale présentant composition du milieu et les différentes compositions.

N° experiences	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
1	3	100	3	1.4	2	0	0	0	1	0
2	3	500	1	1.4	2	1.4	0	0	0	0.1
3	1	300	3	0	2	1.4	0.1	0	0	0
4	3	100	3	1.4	0	1.4	0.1	0.1	0	0
5	1	500	1	1.4	2	0	0.1	0.1	1	0
6	1	100	3	0	2	1.4	0	0.1	1	0.1
7	1	100	1	1.4	0	1.4	0.1	0	1	0.1
8	3	100	1	0	2	0	0.1	0.1	0	0.1
9	3	500	1	0	0	1.4	0	0.1	1	0
10	3	500	3	0	0	0	0.1	0	1	0.1
11	1	500	3	1.4	0	0	0	0.1	0	0.1
12	1	100	1	0	0	0	0	0	0	0
13	2	300	2	0.7	1	0.07	0.05	0.05	0.5	0.05
14	2	300	2	0.7	1	0.07	0.05	0.05	0.5	0.05
15	2	300	2	0.7	1	0.07	0.05	0.05	0.5	0.05
16	2	300	2	0.7	1	0.07	0.05	0.05	0.5	0.05

Les variables

X1: arginine [1 2 3g].
X2: volume du milieu de culture [100 300 500ml].
X3: temps d'incubation [1 semaines 2 semaines 3semaines].
X4: NH4Cl [0 0.7 1.4g].
X5: oligochitine [0 1 2ml].
X6: FeSO4 [0 0.07 1.4g].
X7: K2HPO4 [0 0.05 0.1g].
X8: NaCl [0 0.05 0.1g].
X9: MgSO4 [0 0.5 1g].
X10: CaCl2 [0 0.05 0.1g].



Figure. IV.7. milieu de culture pour une expérience réalisée au laboratoire.

- ces composants de chaque milieu de culture sont ensuite ajoutés, sous agitation, stérilement aux milieux de culture **(Figure IV.7).**

-On ferme les erlenmeyer ou les fioles avec du coton cardé et du papier aliminium et on les

place sur l'agitateur du paillasse pendant le temps nécessaire pour chaque expérience **(Figure IV.8).**

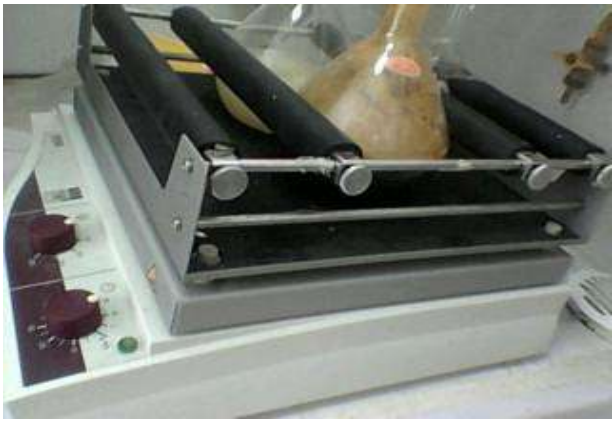


Figure IV.8. L'agitation des milieux de culture

- A la fin de la fermentation, on faite une centrifugation (60 RPM*100 pondant 10 min).

- On récupère le culot (biomasse humide) par centrifugation, on sèche à température ambiante.

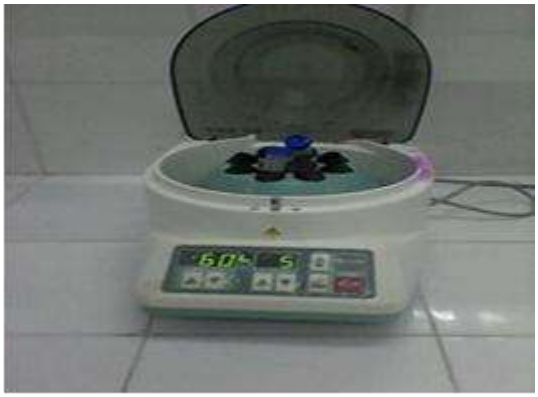


Figure IV.9. La centrifugation.



Figure. IV.10. biomasse humide

- On fait un broyage manuel de la biomasse sèche en utilisant un mortier pour obtenir une poudre.



Figure IV. 11. biomasse sèche

VI.3. Extraction de la chitine et le chitosane (Synowiecki et AI-Khateeb, 1997)

VI.3.1. Traitement de la biomasse : le traitement réalisé sur la biomasse sèche est présenté dans la figure ci-dessous.

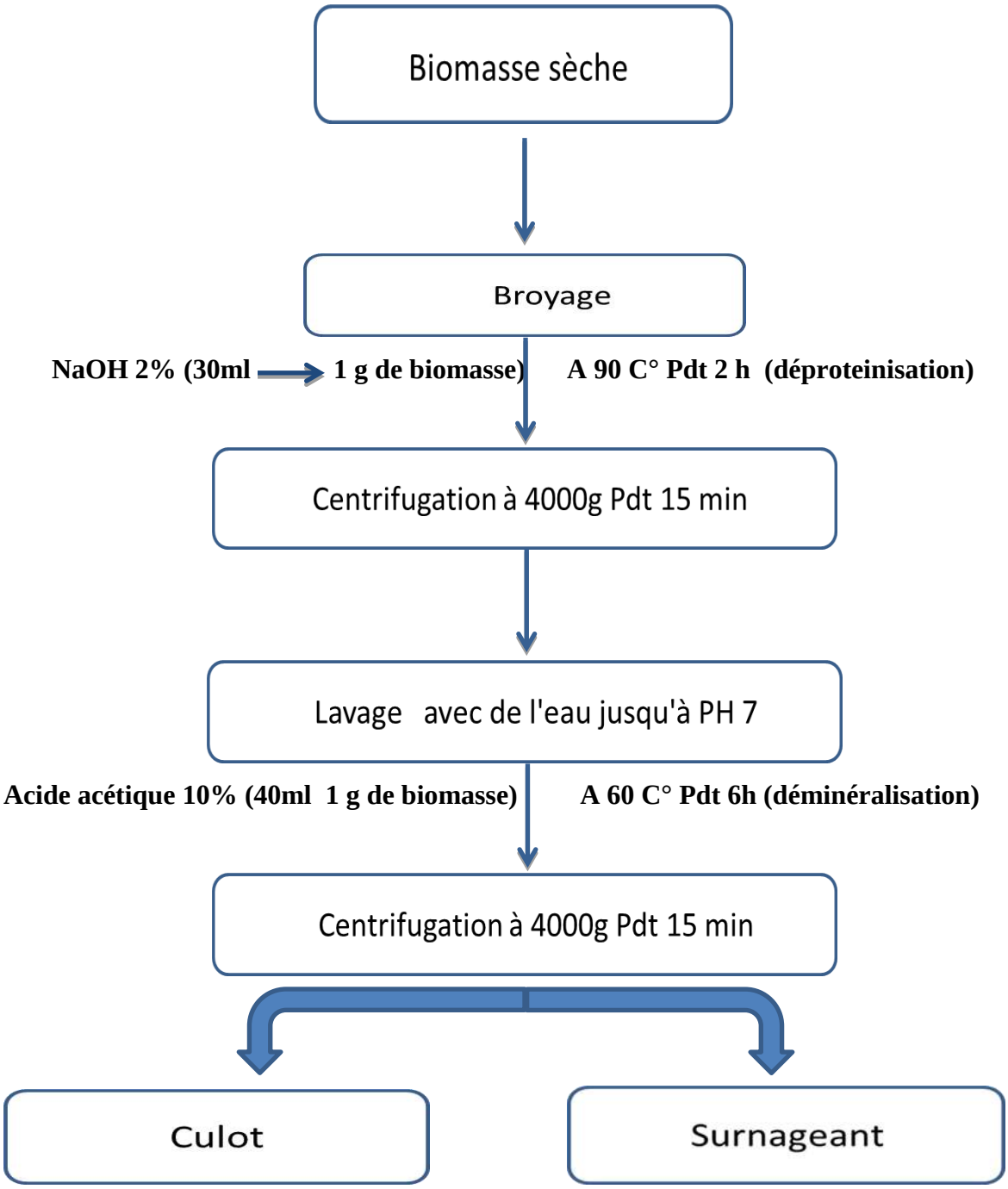


Figure.IV.12. Traitement de la biomasse

VI.3.2. Traitement de la fraction insoluble pour la récupération de la chitine

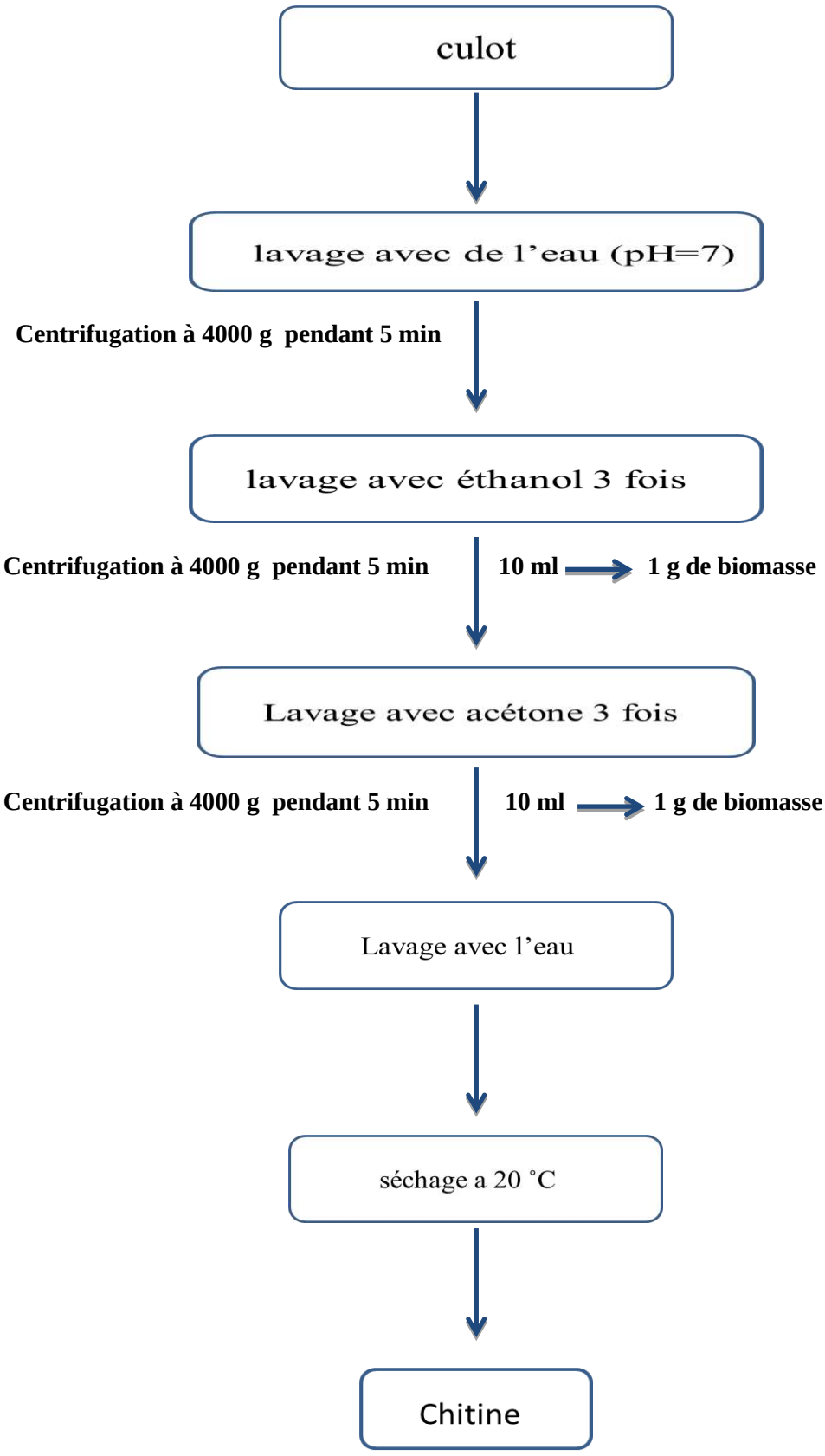


Figure.IV.13. Traitement de la fraction insoluble pour la récupération de la chitine

VI.3. 3.Traitement du surnageant pour la précipitation du chitosane

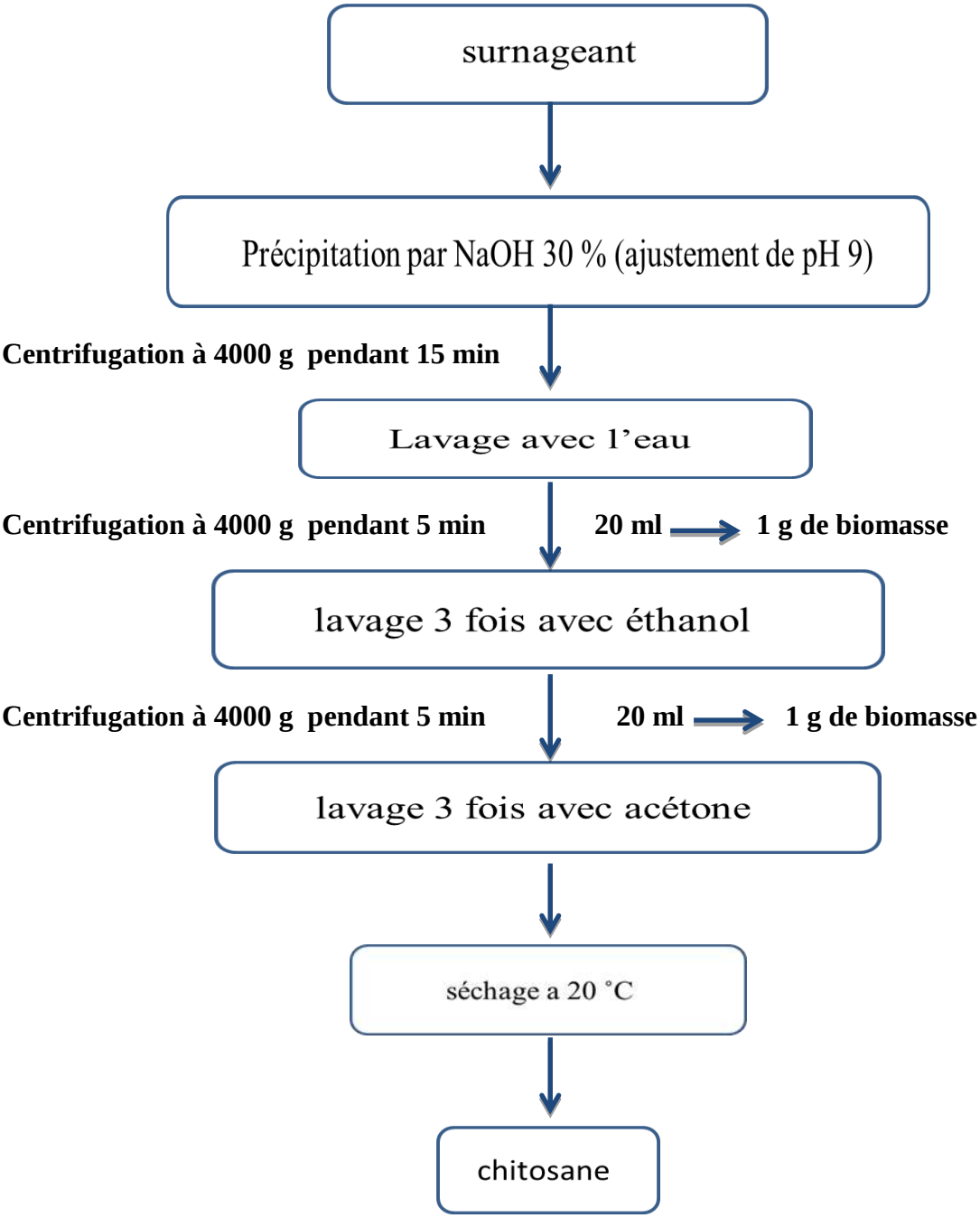


Figure.IV.14. Traitement du surnageant pour la précipitation du chitosane

VI.4. Analyse spectroscopiques infrarouges

La Spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier (FTIR) permet d'identifier la présence de groupements chimiques spécifiques. Les liaisons entre atomes vibrent selon une fréquence qui dépend de la masse des atomes engagés et de la rigidité relative de la liaison .Ces liaisons absorbent des ondes infrarouges d'énergie spécifique selon la fréquence de leur vibration. L'analye spectroscopique infrarouge permet d'identifier les plages de fréquence d'absorption des infrarouges d'un échantillon et de déterminer par la suite les groupes chimiques conséquents.

- **Détermination de la DA et DD**

$$DA = [100 - \frac{A1560}{A3450} \text{x } 115]$$

$$DA = [100 - \frac{\frac{A1320}{A1420} - 0{,}38}{0{,}03233}]$$

V.1. Résultats

V. 1.1. Récupération de la biomasse

La figure ci-dessous présente les différentes biomasses obtenues après séchage (biomasse sèche).

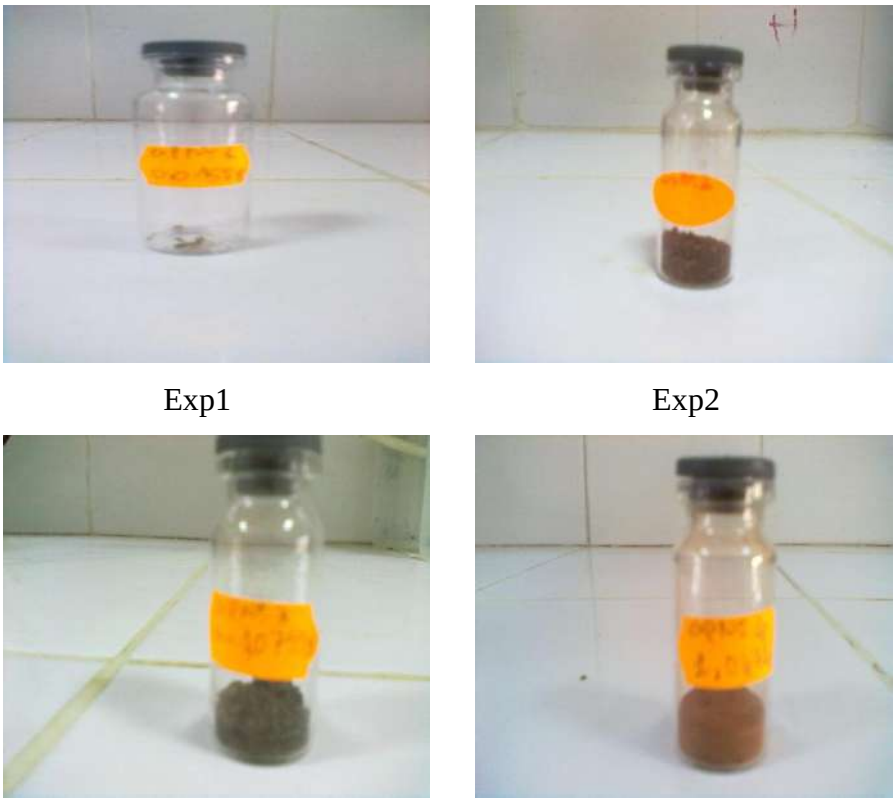


Figure. V.1. Biomasses sèches récupérées à la fin de fermentation.

On remarque que la couleur de chaque biomasse est différente par rapport aux autres (rouge brique, noire, blanc) à cause de la différence de composition de chaque milieu utilisé.

V. 1.2. Précipitation du chitosane

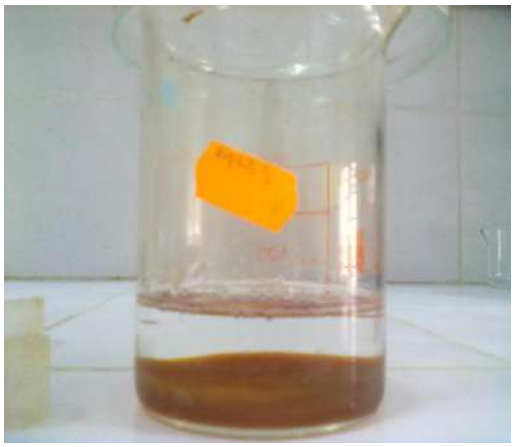
Le traitement de la biomasse fongique avec de l'acide acétique nous a permis, d'obtenir une fraction solide non soluble dans l'acide, constituée principalement par la chitine, et une fraction soluble dans l'acide, le chitosane. La précipitation de ce dernier (Fig. V.2) peut se faire en utilisant du NaOH à 30% pendant une nuit



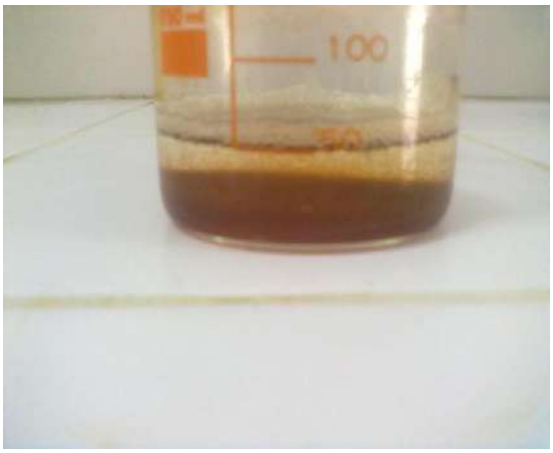
Exp 4



Exp 6



Exp 9



Exp 11

Figure. V.2. Précipitation de chitosane par NaOH 30%

La figure V.2 montre la formation d'un précipité de couleur jaunâtre. Il faut signaler que selon le protocole le temps de la précipitation est 2h, mais dans le cas de notre travail il nous a fallut une nuit pour qu'on a pu récupérer de faibles quantités en chitosane.

V. 1. 3. Les concentration de la biomasse, la chitine et le chitosane

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau V.1. Les concentrations de la masse sèche, chitine et chitosane

N° d'expérience	Biomasse sèche en (g)	Chitine en (g)	Chitosane en (g)	Rendement Chitine %	Rendement Chitosane %
-1-	0,016	0	0	0	0
-2-	1,39	0,84205	0,036	60,58	2,59
-3-	1,06	0,3	0,0766	28,3	7,22
-4-	1,24	0,54	0,0234	43,54	1,88
-5-	0,985	0,058	0,0001	5,88	0,01
-6-	1,316	0,5644	0,0341	42,88	2,59
-7-	0,4	0,2250	0,0203	56,25	0,051
-8-	0,097	0,0009	0,027	0,92	27,83
-9-	1,55	0,783	0,0538	50,51	3,47
-10-	1,395	0,1154	0,001	8,27	0,071
-11-	1,53	0,1885	0,002	12,32	0,13
-12-	0,751	0,00318	0,000033	0,42	0,0044
-13-	0,687	0,0172	0,004701	2,5	0,68
-14-	0,801	0,055	0,0015	6,86	0,18

Le tableau V.1 montre que les concentrations de la biomasse, de la chitine et du chitosane varient en fonction de la composition du milieu de culture. La figure V.1 montre que l'expérience N°6 a donné la plus grande quantité de biomasse (1,316 g) suivi par l'expérience N°4 (1,24 g) et l'expérience N°12 (0,751 g). L'expérience N°14 a donné 0,801 g.

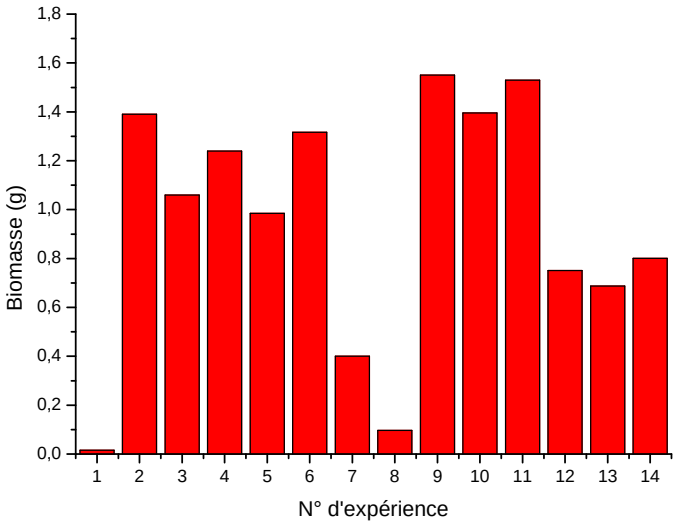


Figure. V.3. La biomasse fongique en fonction du N° d'expériences.

On remarque également que l'expérience N° 2, 3, 6, 10 ont donné presque les mêmes quantités de biomasse 1,39 g, 1,06 g, 1,316 g, 1,395 g, respectivement. Ces résultats sont peut-être dû à l'influence de la composition du milieu de culture (Di Mario et al., 2007) mais l'expérience N°9 qui a favorisé la production de la biomasse à cause de son volume (500ml), le temps d'incubation (3 semaines) ainsi que sa composition de milieu (Arginine, K_2HPO_4, MgSo4, CaCl2).

La figure V.4 présente la quantité de la chitine fongique obtenue en fonction de numéro d'expériences.

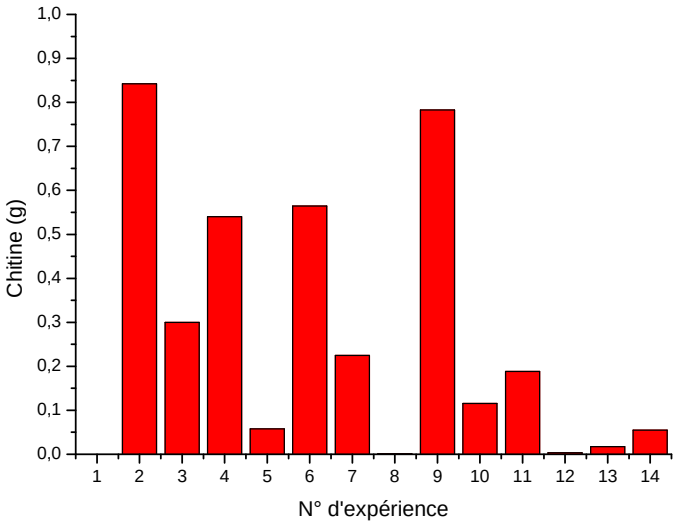


Figure. V.4. La quantité de la chitine fongique en fonction du N° d'expériences.

On remarque que les expériences N° 2 et N° 9 ont donné les quantités les plus élevés de chitine fongique par rapport aux autres expériences et presque la même quantité récupéré de 84,205 mg et 78,3 mg, respectivement. On remarque également que les expériences N°4 et N°6 ont donné 54 mg et 56,44 mg, respectivement. Une quantité appréciable de 22,5 mg a été obtenue dans les conditions de l'expérience N°2 et 18,85 mg dans les conditions de l'expérience N°11 (Fig. V.4).

La quantité du chitosane précipitée à partir de la solution d'acide acétique en utilisant du NaOH à 30%, nous a permis de tracer l'histogramme présenté sur la figure V.5.

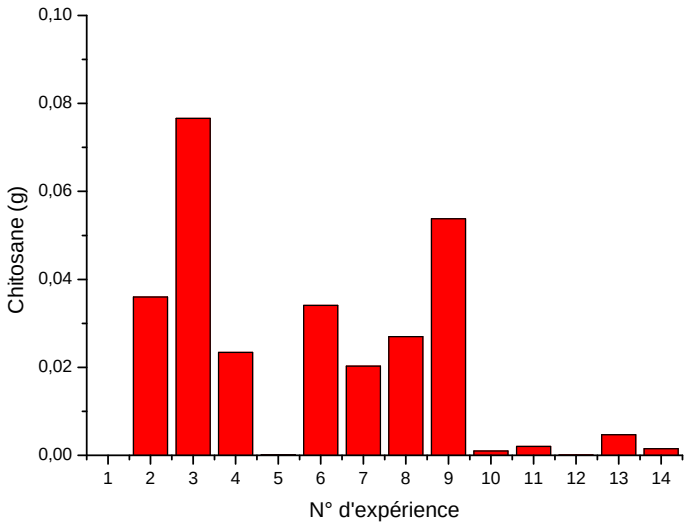


Figure. V.5. La quantité du chitosane fongique en fonction du N° d'expériences

Cette figure montre que l'expérience N°3 (Arginine, NH_4Cl, FeSo4, K_2HPO_4, NaCl) et un long temps d'incubation (3semaines) a donné une importante quantité en chitosane de l'ordre de 7,66 mg, suivi par les expériences N° 9, 2, 6, 8, 4 et 7 qui ont donné 5,38 mg, 3,6 mg, 3,41 mg, 2,7 mg, 2,34 mg et 2,03 mg, respectivement .

Nos résultats corroborent avec ceux de Hu et al. (2004) qui ont obtenu des quantités du chitosane allant de 8 mg/l en utilisant le champignon *Ashbya gossypii* jusqu'à 646 mg/l en utilisant *A. glauca* (+).

Selon Jaworska et al. (2001), il y a peu de composants qui peuvent influencer l'activité de la chitine synthétase et de la chitine désacétylase. Parmi eux on cite les ions manganèse, ferreux.

Dans notre travail, la plus grande quantité du chitosane est obtenue dans les conditions de l'expérience N°3 qui contient 1.4g de FeSO4, 1.4 g de NH_4Cl avec un temps d'incubation de 3 semaines ce qui a permis l'augmentation de la biomasse et par conséquent l'augmentation de la quantité du chitosane récupéré dans le milieu.

Le calcul du rendement de récupération de la chitine par apport à la quantité de biomasse obtenue nous a permis d'obtenir le résultat présenté dans la figure V.6.

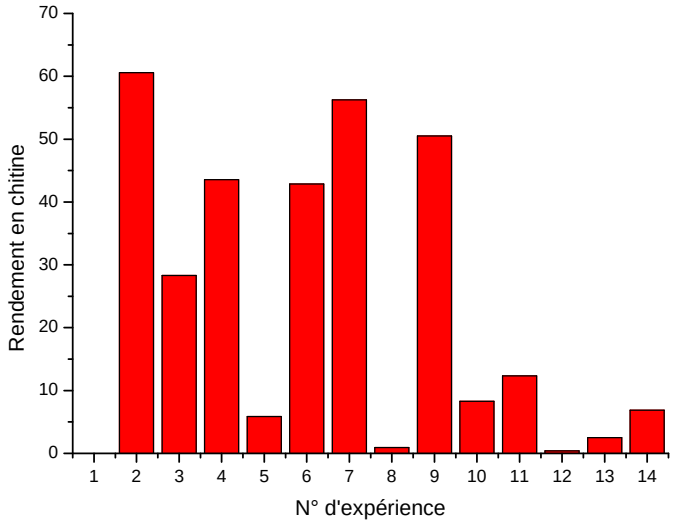


Figure V.6 Rendement de récupération de la chitine par apport à la biomasse sèche

Cette figure montre qu'en terme de rentabilité l'expérience N°2 est plus rentable avec un taux de 60,58% de chitine suivi par les expériences N° 7, 9, 4, 6 et 3 qui ont donné respectivement, 56,25%, 50,51%, 43,54%, 42,88% et 28,3%.

De même, le calcul de rendement de récupération du chitosane par apport à la biomasse sèche, nous a permis de tracer l'histogramme présenté dans la figure V.6.

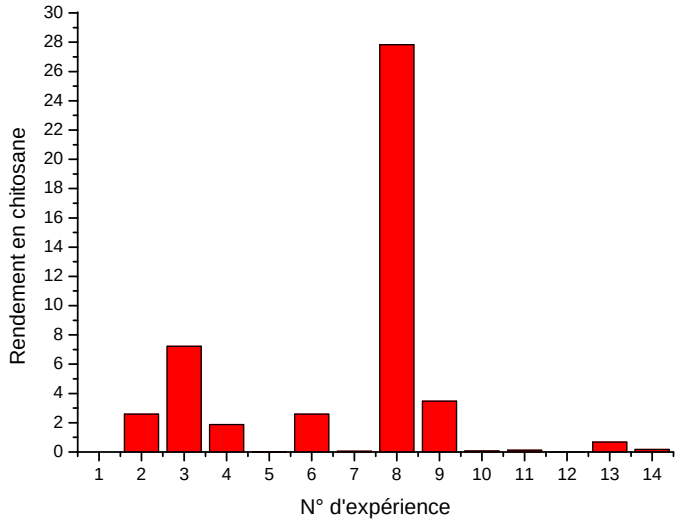


Figure V.7 Rendement du chitosane récupéré par apport à la biomasse sèche

La figure V.7 montre que l'expérience N°8 a donné le rendement le plus élevé de l'ordre de 27,83%.

V.2. Analyse par spectroscopie Infra- rouge

Les spectres obtenus sont présentés ci-dessous.

V. 2. a. Analyse Infra- rouge de la biomasse fongique

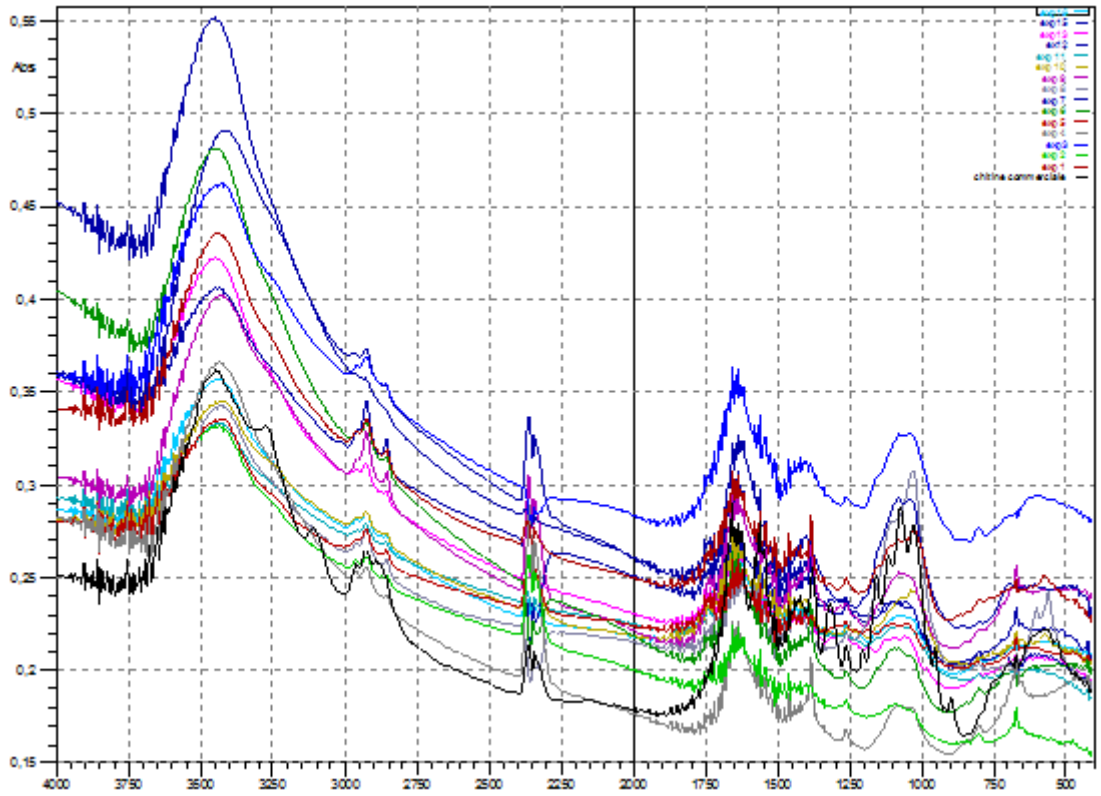


Figure. V.8. Les spectres Infra- rouge des différentes biomasses fongiques.

La comparaison des spectres infrarouge des biomasses fongiques (Fig. V. 8) montre l'existence de fluctuations et des différences au niveau des pics d'absorption. Ceci est dû à la différence de composition des milieux de culture.

Ainsi la comparaison du différent spectre précédemment cité avec celui de la chitine commerciale (des crabes) (Fig. V.8) nous a permis d'obtenir les résultats présentés sur le tableau V. 2.

Tableau V. 2. Comparaison des biomasses fongiques obtenues avec la chitine commerciale

Chitine commercial	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	Ex 8	Ex 9	Ex 10	Ex 11	Ex 12	Ex 13	Ex 14	Ex 15	Ex 16	Ex témoin
3414.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3275.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3109.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2928.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2893.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2534.55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2362.88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2345.52	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1654.98	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
1647.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1624.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1560.46	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1465.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1445.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1419.66	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1377.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1315.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1261.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1205.55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1157.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1114.89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1072.46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1028.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
952.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
896.93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
688.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
669.32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
528.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pour nos échantillons, on remarque l'apparition d'une bande à 1654,98 cm-1, pour toutes les biomasses sauf N° 1, 9, 12, 14, qui correspond à la liaison (C=O) caractéristique de la bande I des amides et un pic à environ 1560,46 cm-1, au niveau de biomasse N° 6, qui correspond à la liaison (N-H) caractéristique de la bande II des amides.

On note, également, l'apparition d'un pic à 2928 cm-1, dans toutes les biomasses, qui correspondent à une liaison C-H

L'étude par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de la carapace de la crevette *Parapenaeus longirostris* montre la présence des bandes caractéristiques de la calcite à 2522,7 cm-1, 1458,1 cm-1, 875,6 cm-1 et 709,8 cm-1 (Arbia, 2007).

Ce résultat montre bien l'importance de l'utilisation de la biomasse fongique car l'absence de calcite nous permet d'éliminer l'étape de déminéralisation qui nécessite un traitement acide du matériau brut en utilisant de grands volume et de forte concentration d'acide tel que HCl qui peut être nuisible pour l'environnement ainsi qu'il contribue à l'augmentation du prix de reviens de la chitine.

V. 2. b. Analyse Infra- rouge de la chitine fongique extraite :

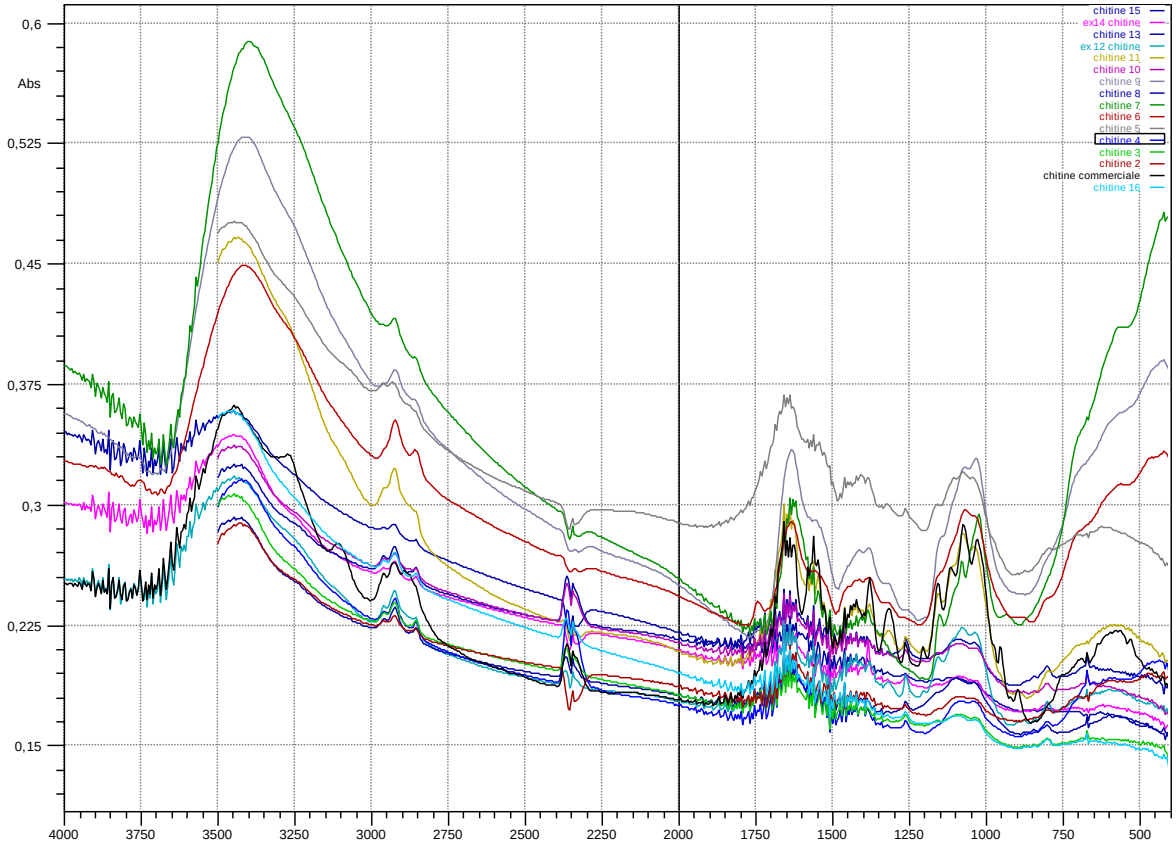


Figure. V.9. Les spectres Infra- rouge des différentes chitines fongiques.

L'analyse spectroscopique des chitines récupérées à partir des biomasses cultivées sur les différents milieux de culture montre la présence de différence entre les chitines obtenues.

Tableau V. 3. Comparaison des chitines fongiques extraites avec la chitine commerciale.

Chitine commercial	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	Ex 8	Ex 9	Ex 10	Ex 11	Ex 12	Ex 13	Ex 14	Ex 15	Ex 16	Ex témoin
3414.12	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3275.24	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3109.35	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2928.04	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2893.32	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2534.55	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2362.88	/	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2345.52	/	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
1654.98	/	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
1647.26	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
1624.12	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1560.46	/	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
1465.95	/	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1445.03	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1419.66	/	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
1377.22	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1315.50	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1261.49	/	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
1205.55	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1157.33	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1114.89	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1072.46	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1028.09	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
952.87	/	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
896.93	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
688.61	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
669.32	/	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
528.51	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) ; Les bandes qui sont les même, (-) ; les bande qui ne sont pas les mêmes

Selon la bibliographie, les pics caractéristiques de l'α-chitine sont, amide I 1660 cm-1 [C=O], amide II : 1550 cm-1 [NH].

La différence entre l'α-chitine et la β-chitine réside dans la bande correspondante à l'amide I, qui est divisée soit en deux pics à 1654 et 1627 cm-1 pour l'α-chitine (Lavall et al., 2007), soit en un seul pic à 1654 cm-1 pour la β-chitine. La bande de l'amide II est unique est à 1556 cm-1 pour l'α-chitine et à 1560 cm-1 pour la β-chitine (Rinaudo, 2006).

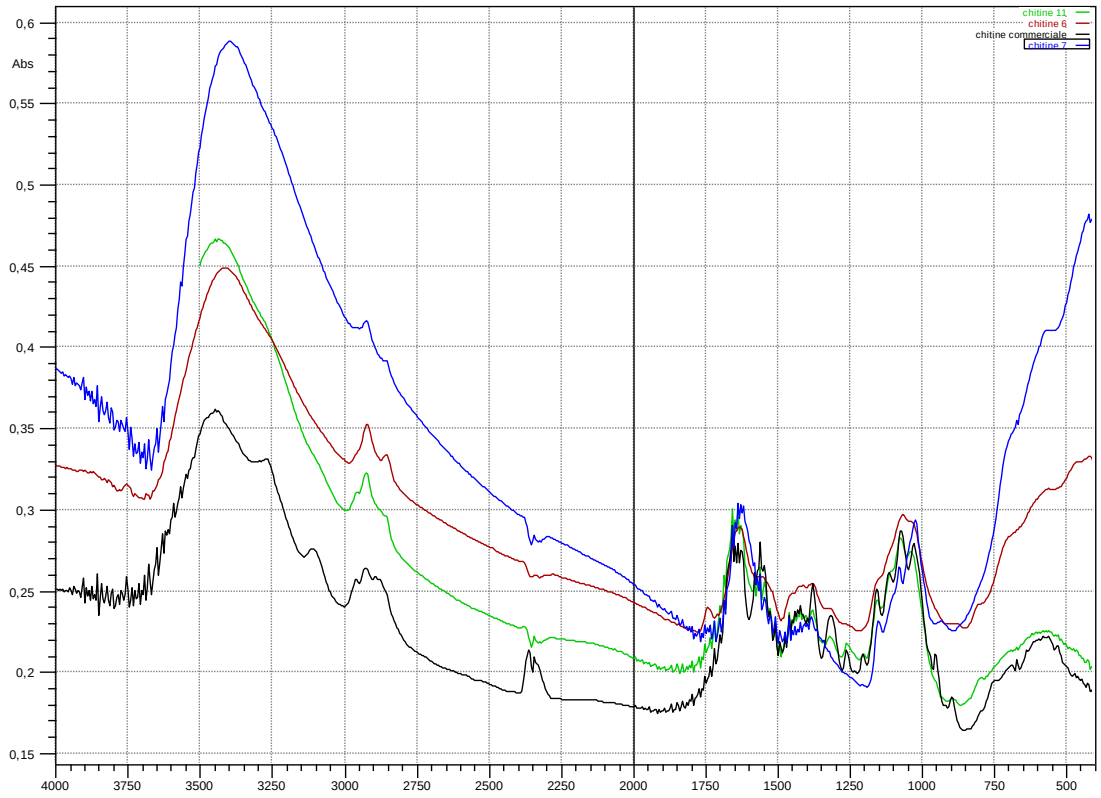


Figure. V.10. Le spectres Infra- rouge de la chitine fongique (N°6,7, 11) et la chitine commerciale.

La comparaison des spectres infrarouge de différentes chitines fongiques montre une similarité avec le spectre de la chitine commerciale (Fig. V. 10). On remarque que les spectres des chitines N°3, N°4, N°8, N°12 et N°14 est caractérisés par la bande d'absorption à 1654 et les expériences N° 2, N°3, N°8, N°11, N° ,12 et N°16 à1560cm-1. On remarque également l'absence des deux pics caractéristiques de l'α-chitine à 3275 et 3109 (liaison amide NH) chez toutes les chitines fongiques (β-chitine).

Selon Crini et al. 2009, l'absence de pic à 1540 cm-1 montre l'absence des impuretés protéiques ce qui représente la grande pureté de la chitine récupérée.

Ainsi les chitines obtenues dans notre travail présentent une similarité avec les résultats obtenus par Di Mario et coll. 2007 (Fig. V. 11).

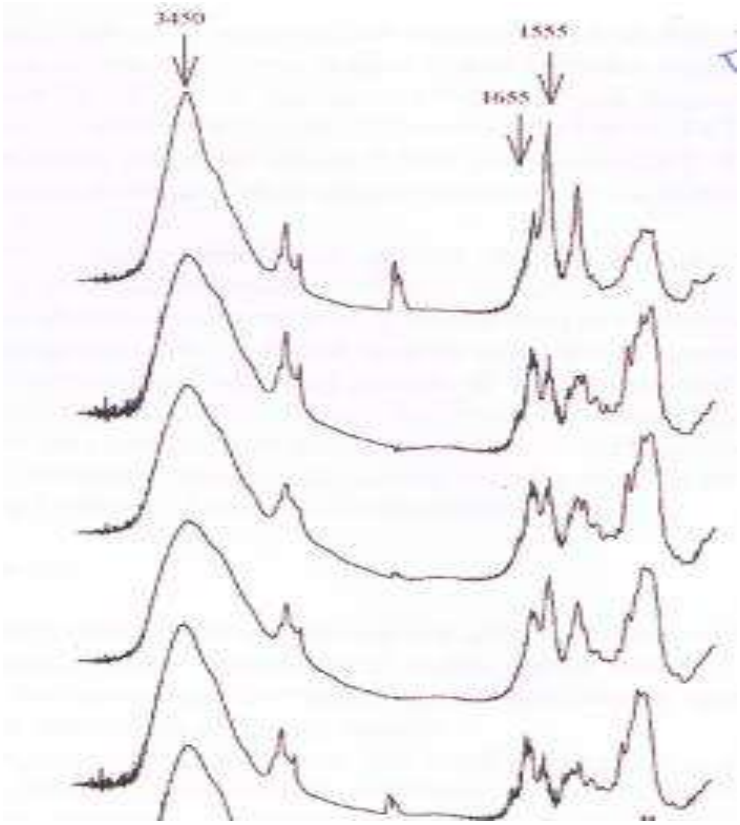


Figure. V. 11. Les spectres Infra- rouge des différentes chitines fongiques obtenues par Di Mario et al. (2007)

V. 2. c. Analyse Infra- rouge du chitosane fongique :

L'analyse par spectroscopie infrarouge des chitosanes récupérés à partir des biomasses fongiques cultivées au cours de notre travail nous a permis d'obtenir la figure V. 12.

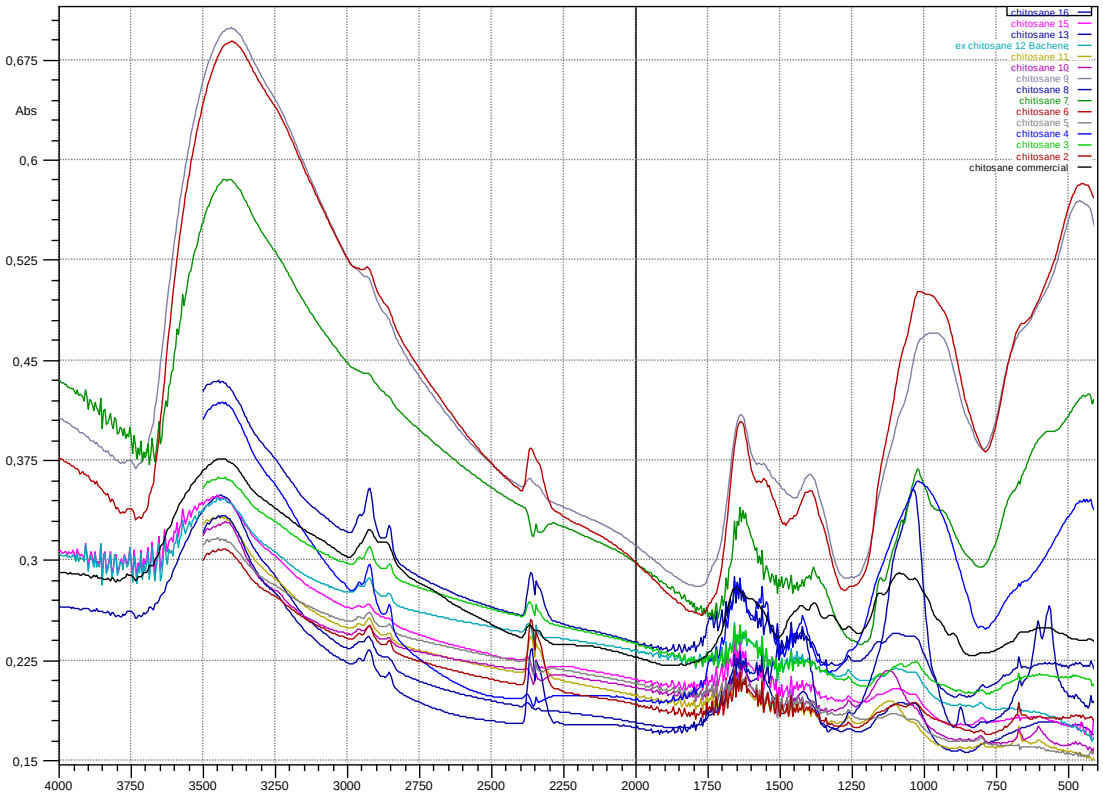


Figure. V. 12. Les spectres Infra- rouge des différents chitosanes fongiques.

La comparaison de ces spectres avec celui du chitosane commerciale a montré une similarité plus importante entre le chitosane commerciale et la chitosane obtenu à partir des biomasses N° 3 et N° 4 (Fig.V.12).

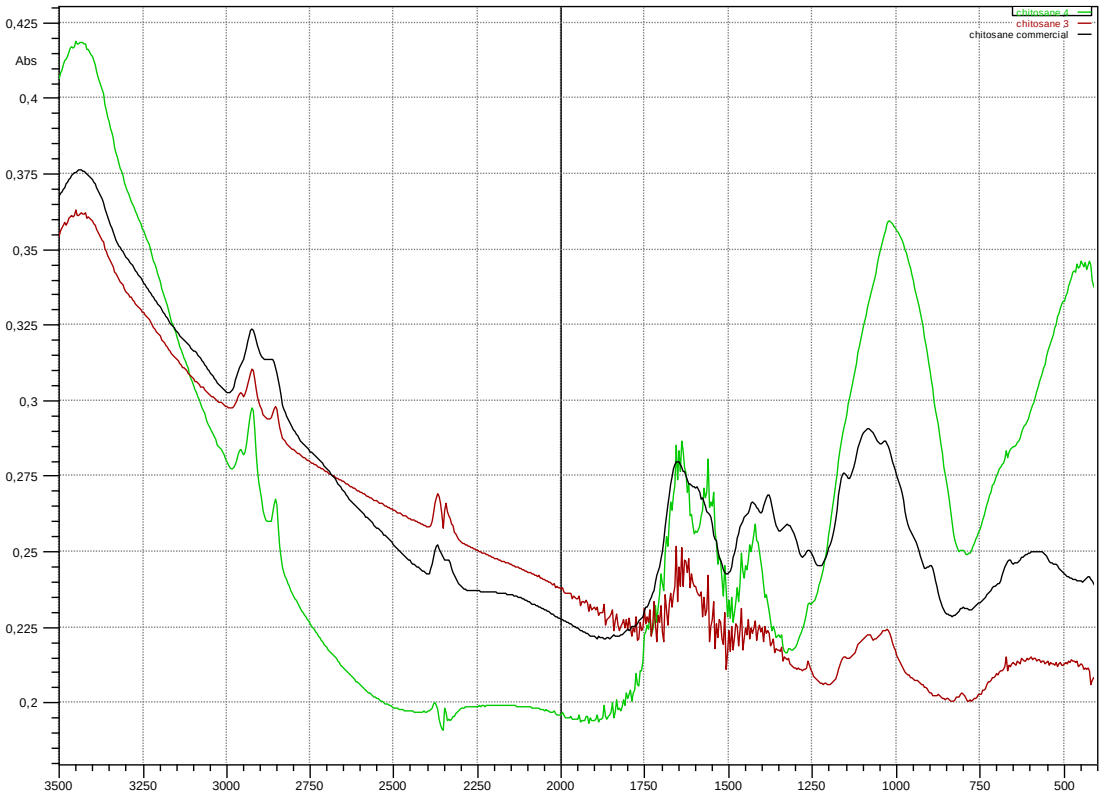


Figure. V. 13. Les spectres Infra- rouge des chitosanes fongiques (N°3 et N°4) et le chitosane Commercial.

Tableau V. 4. Comparaison des chitosane fongiques extraites avec la chitosane commerciale.

Chitosane commercial	Ex 1	Ex 2	Ex 3	Ex 4	Ex 5	Ex 6	Ex 7	Ex 8	Ex 9	Ex 10	Ex 11	Ex 12	Ex 13	Ex 14	Ex 15	Ex 16	Ex témoin
3414.12	/	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	/	-	-	-
3275.24	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
3109.35	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
2928.04	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
2893.32	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
2534.55	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
2362.88	/	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	/	-	-	-
2345.52	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	/	-	-	+
1654.98	/	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	/	-	-	-
1647.26	/	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1624.12	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1560.46	/	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	/	-	-	-
1465.95	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1445.03	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1419.66	/	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	/	+	-	+
1377.22	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1315.50	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1261.49	/	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	/	-	-	+
1205.55	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1157.33	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1114.89	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1072.46	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
1028.09	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
952.87	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
896.93	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
688.61	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-
669.32	/	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	/	-	-	+
528.51	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-

On remarque que les chitosanes obtenus lors de ce travail ressemblent à ceux obtenus par Di Mario et son équipe (Fig. V. 14).

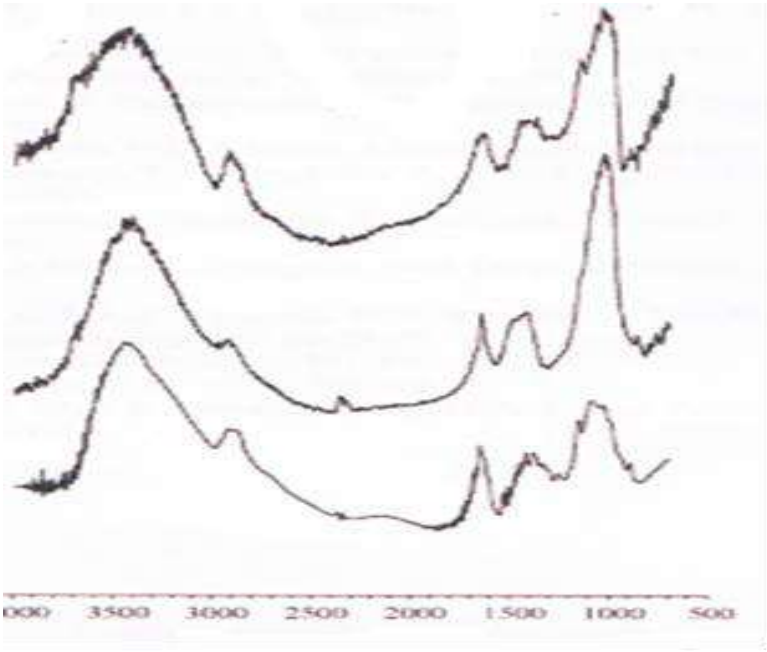


Figure .V. 14. Les spectres Infra- rouge des différents chitosanes fongiques obtenues par Di Mario et al. (2007).

V. 3. Caractérisation de la chitine et le chitosane obtenus :

Les principales caractéristiques de la chitine et le chitosane sont le degré d'acétylation (DA) pour la chitine, le degré de désacétylation (DD) pour le chitosane, le poids moléculaire (PM) et le degré de cristallinité. Dans notre travail, on a basé seulement sur le DA et le DD.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau. V.5. Les résultats comparatives entre Chitine et Chitosane par le DA et DD.

chitine	DA	Chitosane	DD
3	47.69	3	82.43
5	89.05	5	82.45
6	72.63	6	84.90
7	60.04	7	88.47
9	70.4	9	84.57
10	83.75	10	82.16
11	74.26	11	82.65
12	82.96	12	82.60
13	87.85	13	83.69
14	75.65	14	/
15	68.37	15	82.69
16	68.37	16	84.98
Chitine commerciale	DA 92,38		
Chitosane commercial	DD 81,69		

On remarque que le DA des β-chitines obtenus varie entre 47.69 et 89.05% (Ex N°5), alors que celui de l'α-chitine (commerciale) est de l'ordre de 92.38%. Ceci est dû peut être au degré de pureté des β-chitines obtenues qui peuvent être liés au des polysaccharides acides et qui représente la fraction insoluble dans NaOH (Di Mario et al., 2007). Ce qui nécessite peut être un autre traitement pour bien purifier la chitine.

Concernant le chitosane, on remarque que le DD varie entre 82.43% et 88.47% (Ex N°7) alors que celui du chitosane commercial est de l'ordre de 81.69%.

Le taux élevé de DD obtenu avec le chitosane récupéré à partir de la biomasse N°7, est peut être dû à la présence des ions manganèse qui ont joué le rôle d'activateur de l'enzyme chitine désacétylase (1g MgSO4). Ce résultat nous laisse suggérer que l'augmentation du taux du chitosane est dû non seulement à l'augmentation de la biomasse favorisée par la composition du milieu et le temps d'incubation mais aussi à la présence des ions activateur de la chitine désacétylase qui peut conduire à l'augmentation du taux de chitosane au niveau de la paroi cellulaire du champignon.

Conclusion

L'objectif de ce travail porte sur l'étude de l'effet de la composition du milieu de culture sur le rendement de production de la chitine et du chitosane à partir du champignon *Fusarium Verticillioide.*

L'utilisation du PDB (bouillon à base de pomme de terre) modifier nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- Le rendement le plus élevé en biomasse (13.16g/l et 12.4g/l) a été obtenu avec l'expérience N°6 et N°4.
- Le rendement le plus élevé en chitine 5644 mg/l et 5400 mg/l est obtenu avec les expériences N° 6 et N°4, respectivement.
- Le rendement le plus élevé en chitosane (270mg/l et 234mg/l) est obtenu avec l'expérience N°8 et N°4.

Ces résultats sont peut-être dû à la composition du milieu de culture de l'expérience N°6 (Arginine, Oligochitine, $FeSO_4$, $MgSO_4$, NaCl, $CaCl_2$) qui a favorisé la production de la biomasse, grâce à la présence des ions Mg^{2+} et Fe^{2+}.

L'analyse de la biomasse, de la chitine et du chitosane fongiques obtenus lors de notre travail a montré que :

- Comparant avec la biomasse marine provenant des crustacés, la biomasse fongique ne contient pas beaucoup de minéraux ce qui réduit les étapes d'extraction de la chitine en éliminant la déminéralisation par un acide fort ce qui peut réduire le prix de reviens de l'extraction.
- La comparaison du spectre de la chitine fongique (β-chitine) avec celui de la chitine commerciale des crabes (α-chitine), nous a permis d'observer une grande similarité entre les deux surtout qu'on a pu remarquer l'apparition des pics caractéristiques de la chitine à 1654 et 1560cm-1. Comme on a noté l'absence des deux pics caractéristiques de l'α-chitine à 3275 et 3109 (liaison amide NH) chez toutes les chitines fongiques (β-chitine).
- En ce qui concerne le chitosane, la comparaison de ce dernier avec le chitosane commercial a montré une grande similarité entre les deux.

La caractérisation physico-chimique de la chitine et du chitosane obtenus a montré que DA des β-chitines obtenus varie entre 47.69 et 89.05%(Ex N°5), alors que celui de l'α-chitine (commerciale) est de l'ordre de 92.38%.

Concernant le chitosane, on remarque que le DD varie entre 82.16% et 88.47% (Ex N°7) alors que celui du chitosane commercial est de l'ordre de 81.69%.

Le taux élevé de DD obtenu avec le chitosane récupéré à partir de la biomasse N°7, est peut être dû à la présence des ions manganèse qui ont joué le rôle d'activateur de l'enzyme chitine désacétylase.

Ce résultat nous laisse suggérer que l'augmentation du taux du chitosane est dû non seulement à l'augmentation de la biomasse favorisée par la composition du milieu et le temps d'incubation mais aussi à la présence des ions activateur de la chitine désacétylase qui peut conduire à l'augmentation du taux de chitosane au niveau de la paroi cellulaire du champignon.

En perspective on propose :

- de faire des études plus approfondies afin de bien comprendre l'effet réelle de la composition du milieu de culture sur les rendements de la chitine et du chitosane au niveau de la paroi des champignons ;
- faire une modélisation et optimisation de la production de chitine et du chitosane ;
- faire une application simple pour comparer l'efficacité du chitosane fongique par apport au chitosane des crustacés.



Figure. 1. Préparation d'un nouvelle champignon



Figure. 2. Milieu du culture après stérilisation



Figure. 3. L'ajout des ingrédients nécessaire pour chaque milieu de culture



Figure. 4. Milieux PDA

- **Ait Barka E., Eullaffroy P., Clément C. and Vernet G. 2004**.Chitosan improves development, and protects*Vitisvinifera L.* against*Botryticscinerea*. Plant Cell. Rep. 22, 608-614.
- **Amilali M., 1999**.Caractérisation des films de chitosane par la perméabilité à la vapeur d'eau et aux gaz (CO_2, O_2). Mémoire de maîtrise en sciences. Faculté d'agriculture, Alimentation et consommation, Université de Laval, Canada.
- **Amorim, Rosa Valéria da Silva; DE Souza, Wanderley; Fukushima, Kazutaka and CAMPOS-TAKAKI, Galba Maria de.** Fasterchitosan production by Mucoraleanstrains in submerged culture. Brazilian Journal of Microbiology, January-March **2001,** vol. 32, no. 1, p. 20-23.
- **Anand B. D. and Ramesh P., 2004.** Developement and characterization of biodegradablechitosan films for local delivery of paclitaxel. The AAPS J., 6 (3) article 27.

- **Agulló E., Rodriguez M. S., Ramos V. and Albertengo L., 2003**. Present and future role of chitin and chitosan in food.Macromol. Biosci., 3, 521-530.
- **Arbia W,** Mémoire Magister ; Production de la chitine par voiefermentaire à partird'unebiomasse marine (**2007**)
- **Arcidiacono, S. and D.L. Kaplan, 1992.** Molecular weight distribution of chitosan isolated from Mucorrouxii under different culture and processing conditions. Biotechnol. andBioeng., 39: 281–6.
- **Bal Y., Bal K. E., Laarabi- Bouamrane O. and Lallam A., 2006.** Copper (II) uptake by Pleurotusmutilus biomass, chitin and chitosan. Mineral Eng., 19 (14), 1456- 1458.
- **Bell A. A., Hubbard J. C. And Li L., 1998**.Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of Fusarium Yellows of Celery. Plant Disease. 82 (3), 322-328.
- **Benguella B., Benaissa H., 2002**. Effects of competing cations on cadmium biosorption by chitin. Colloids Surf Part A. Physicochem. Eng. Aspects, 201, 143-150.
- **Benesch J., 2001**.Null Ellipsometry and protein adsorption to model biomaterials. Linköping studies in Science and Technology**.**
- **Bouarab K., 2000**.Bases biochimiques et cellulaires des interactions plante- pathogène dans le système ChondruscrispusAcrochaeteoperculata. Thèse de Doctorat de l'University Paris 6.

- **Bribri A., Hafad H., El- Krati M. and Lançar I. T., 2005**.Valorisation de certaines substances naturelles pour la décoloration des rejets liquides. 3ème Journée Internationale des Géosciences de l'environnement, El- Jadida.
- **Chang Wen- Teish, Yu- Chung Chen and Chia-Ling Jao, 2006**.Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish
- **Blanc-Vernet L, Clairefond P and Orsolini P (1979).**Les Foraminiferes. Annales de 1'Université de Provence, 6: 171-209chitin wastes. Bioures. Technol., 98 (6), 1224-1230.
- **Campos-Takaki, Galba Maria**. The fungalversatility on the copolymerschitin and chitosan production. In: DUTTA, P.K. ed. Chitin and chitosanopportunities and challenges, India, SSM: International Publication, **2005**, p. 69-94
- **Chatterjee,A. et al. (2005)** Binomial distribution based τ -leap accelerated stochastic simulation. J. Chem. Phys., 122, 024112.
- **Chih- Min Wen, Chien- Sheng Tseng, Chih- Yu Cheng and Yaw- Kuen Li, 2002**. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. Biotechnol. Appl. Biochem. 35, 213-219.
- **Côté N., 1999**.Impact agronomique de l'application de composts à base de résidus chitineux. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.
- **Crestini, C., B. Kovac and G. Giovannozzi–Sermanni, 1996.** Production and isolation of chitosan by submerged and solid–state fermentation fromLentinusedodes. Biotechnol. and Bioeng., 50: 207–10.
- **DesbrièresJ**.ActuChim 11/12 (**2002**) 39.
- **Dubrana D., 1992.**Chimie industrielle : Les industriels se mettent au homard.Sciences et vie. Davoust, N. and Hansson, G. 1992. Identifying the conditions for development of beneficialmyceliummorphology for chitosan-producingAbsidiaspp. in submersed cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 618-620.

- **El- Ghaout A., Arul J., Asselin A., Benhamou N, 1992.** Antifungal activity of chitosan on two post- harvest pathogen of strawberry fruits. Phytopath ; 82, 398-402.
- **ElisaneLonghinotti, Fada Pozza, Ligia Furlan, Maria de nazaré de M. Sanchez, MarileneKlug, Mauro C. M. Laranjeira and Valfredo T. Favere, 1998**.Adsorption of anionic dyes on the biopolymer chitin. J. Braz. Chem. Soc., 9 (5), 435-440.
- **Evonne Wai Yan Tan and Vern Ru Lee, 2002**. Enzymatichydrolysis of prawnshellwaste for the purification of chitin. Department of Chemical Engineering. LoughboroughUniversity.
- **Felt O., 1999.** Evaluation d'un polysaccharide cationique comme véhicule pour la voie ophtalmique. Thèse de doctorat d'état. Université de Genève.
- **Fernandez- Kim S. O., 2004**.Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols. Thesis of the Louisiana State University.
- **Ferrer J., Paez G, Marmol Z., Ramones E., Garcia H. and C. F. Forster, 1996**.Acid hydrolysis of shrimp shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. Biores. Techno., 57, 55-6.
- **Foscolo J. and Phillipon P., 1997**.Des molécules qui miment le vivant. Biofutur 171, 14-17**.**
- **Gagné Nellie, 1993**.Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their **use as** a food processing aid. Master of Sciences. McGill University, Montreal**.**
- **Giuseppe Laterza, 1980.** The degree of acetylation of chitin by gas chromatography and infrared spectroscopy. J. of Biochem. andBiophy. Methods, 2, 299-306.
- **Gogev S., Versali M. - F.andThiry E., 2003.**Les chitosanes- nouveaux adjuvants pour la vaccination par voie muqueuse chez les animaux. Ann. Méd. Vét., 147, 343-350.
- **GÖksungur Y, UÇan A, GÜvenÇ U (2004).** Production of PullulanFromBeet Molasses and Modified Medium by AureobasidiumPullulans. Turk. J. Biol. 28: 23-30.
- **GülbaharAkkaya, IlhanUzun and FuatGüzel, 2007**.Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitin. Dyes and pigments 73, 168- 177.
- **Harkness M., Farnum R., Weesner B., Foti D., Wilke W. And Smith D., 2003**.The Case for Chitin. GE Global Research. Technical information Series.

- **Hirotoshi E., Yasuaki T., Noriaki O., Toshihiro K. and Toshiki W., 2004**. A crustacean Ca2+ - binding protein with a glutamate- rich sequence promotes CaCO3 crystalization. Biochem. J., 384, 159-167.
- **Huang C-J., Wang T-K., Chung S-C. and Chen C-Y., 2005**.Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28- 9. J. of Biochem. and Mol. Biolo., 38 (1), 82-88.
- **Hudson SM, Jenkins DW**.Chitin and Chitosan in: EPST.Mark HF, ed.New York: Wiley (**2003**) 569.
- **Jaafari K., Elmaleh S., Coma J. and Benkhouja K., 2001**. Equilibrium and kinetics of nitrate removal by protonated cross-linkedchitosan. Water SA. 27 (1).
- **Jae- Young Je and Se- Kwon Kim, 2006**.Antimicrobial action of novel chitin derivative. Biochimia et Biophysica Acta, 1760, 104-109.
- **Jaroslaw M. W., Hiroshi M., Noriaki S., Masao T. and Fumio Y., 2005**.Metal ions adsorption by cross- linked carboxymethylchitin and carboxymethylchitosan hydrogels. Proceedings of the 8th Polymers for Advanced Techno. Intern. Symposium, Budapest, Hungary.
- **Jaworska, M. M. &Konieczna, E. (2001).** The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by fungus Absidiaorchidis. Apply Microbiology and Biotechnology, 56, 220-224.
- **Jayakumar R., Nwe N., Tokura S. and Tamura H., 2006.** Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. International Journal of biological macromolecules. Int. J. Biol. Macromol., 40 (3), 175- 181.
- **Jinjiang L., 1996**.The colloidal and liquid crystal properties of surface modified chitin crystallites. Thesis of Doctor of Philosophy. Mc Gill University. Montreal, Quebec, Canada.
- **Joseph A. Laszlo, 1994**.Removing acid dyes from textile wastewater using biomass for decolorization. American Dyestuff Reporter.
- **Jung W. J., Kuk J. H., Kim K. Y. and Park R. D., 2005a**. Demineralization of redcrabshellwaste by lacticacidbacteria fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67 (6), 851-854.
- **Kiefer, 1999**.Le chitosane : http://www.France.com/kiefer/Es.htm.

- **Kim, J.M.; Lim, W.J. and Suh, H.J.** Feather-degrading Bacillus speciesfrompoultrywaste. ProcessBiochemistry, November**2001**, vol. 37, no. 3, p. 287-291
- **Kittur F. S., Harish P. K. V., Udaya S. K., Tharanathan R. N., 2002**. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning colorimetry carbohydrate polymers. 49, 185-193.
- **Klokkevold P. R., 1995**.The effet of Poly-N-Acetyl Glucosaminoglycan (chitosan) on osteogenesis in-vitro. Master of Science in Oral Biology, University of California, Los Angeles.
- **Kramer K. J. and Muthukrishnan S., 1997**.Insect chitinase : Molecular biology
- and potential use as biopesticides. Insect. Biochem. Molecular. Biol., 27, 887-900
- **Kurita K., 2001**. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin.
- **Laura Ramírez- Coutiño, Maríadel Carmen Marín- Cervantes, Sergio Huerta, Sergio Revah and Keiko Shirai, 2006**.Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicilliumfungicola*chitinases. ProcessBiochemistry, 41, 1106-1110.
- **Laflamme Ph., 2000**.Evaluation de potentiel du chitosane pour lutter contre la pourriture racinaire causée par Cylindrocladiumfloridanum, chez l'épinette noire. Mémoire de Maîtrise en Science. Université de Laval, Canada.
- **Lateur M., 2000**.Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 6 (2), 67- 77.
- **Laurance D. Hall and Mansur Yalpani, 1980**.Enhancement of the metal- chelating properties of chitin and chitosan. Preliminary Communication Carbohydrate Research, 83, C_5-C_7.
- **LavallR.L ., Assis O. B.G.,Sérgio P. et Campana-Filho,2007**.β-Chitin from the pens of Loligosp : Extraction and characterisation. Bioresource Technology 98 (2007).
- **Leclerc Ph., 1997**.Caractérisation microbiologique des composts à base de résidus chitineux. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.
- **Legros W., Straus A- M., Bultot H. and Versali M- F., 2001**. Kitozyme : Le nouveau spin off de biotechnologie de l'Université de Liège. Conférence de Presse, Château de Colonster.

- **Majeti N. V. Ravi Kumar, 2000**. A review of chitin and chitosan applications. React. &Func. Poly. 46, 1-27.
- **Mario F. Di, P. Rapan'a, U. Tomati, E. Galli, 2007.** Chitin and chitosanfromBasidiomycetes. International Journal of BiologicalMacromolecules Vol 43 ? N°1 ?8-12.
- **Mekahlia S. (2007).** Le complexe chitosane-cuivre (II) : Synthèse, caractérisation et étude de l'effet de sa structure sur son activité antibactérienne. Mémoire de Magister, Département de Chimie,
- **Montserrat R. P., 2002**.Developpement of techniques based on natural polymers for the recovery of precious metals. Memdriapresentadaperoptaralgraudedoctor en cienciesquimiques- MeniciodoctorEuropeu.
- **Morfin I., Hazot P., Guillot F., Soler C., Korwin-Zmijowska C., Tahiri K., Chevalier X., Corvol M. and Domard A., 2002**.Percolating hydrogels for tissue engineering. Europ. Cells and Materials, 4. suppl., 55- 56.
- **Morimoto M., Saimoto H. and Yoshihiro S., 2002.** Control of functions of chitin and chitosan by chemical modification. Trends in Glycosc. andGlycotechno., 14 (78), 205-222.
- **Mrunal R. T., 2004**. Synthesis and antibacterial assessment of water- soluble hydrophobic chitosan derivatives bearing quaternary ammonium functionality. Doctor of philosophy. Louisiana State University.
- **Muzzarelli A. and A. Riccardo, 1970**.Uptake of Nitrosyl 106- Ruthenium on chitin and chitosan from waste solutions and polluted sea- water. Wat. Resea. Pergamon Press, 4, 451-455.
- **Muzzarelli A. A. Riccardo, 1980**. Immobilzation of enzymes on chitin and chitosan. Enzyme Microb. Technol., 2, 177- 184.
- **Muzzarelli A. and A. Riccardo, 1983**. Chitin an dits derivatives: New trends of applied research. Carbohy. Polym., (3), 53- 75.
- **Muzzarelli et al., 1994 R.A.A. Muzzarelli, P. Ilari, R. Tarsi, B. Dubini, W.** Xia Chitosan from AbsidiacoeruleaCarbohydrPolym, 25 (1994), pp. 45–50
- **Muzzarelli R. A. A., 1999**. Clinical and biochemical evaluation of chitosan for hypercholesterolemia and overweight control. Chitin andchitosanases. Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland.

- **Muzzarelli A. A. Riccardo, Fabio Tanfani, Gianfranco Scarpini and Poirier Martin, 2000**. Fractionnement et caractérisation de la chitine dans le système N,N-Diméthylacétamide/ chlorure de lithium. Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université Laval, Canada.
- **Nettles D. L., 2001.**Evaluation of chitosan as a cell scaffolding material for cartilage tissue engineering. Master of Science. Mississipi State University.
- **Niederhofer, A. and B.W. Muller, 2004**. A method for direct preparation of chitosan with low molecular weight from fungi. Eur. J. Pharm. Biopharm., 57: 101-105.
- **No H. K., Meyers S. P. and Lee K. S., 1989**. Isolation and characterization of chitinfromcrawfishshellwaste. Journal of agricultural and foodchemistry. 37 (3), 575-579.
- **Pawadee M., Malinee P., ThanawitP.andJunya P., 2003**.Heterogenous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. Carbohy. Polym. 52, 119-123.
- **Pochanavanich, P. and W. Suntornsuk, 2002.** Fungal chitosan production and its characterization. Lett. in Appl. Microbiol., 35: 17–21.
- **Preyanat V., Warayut S., Watchara K., Damrus S. and Prachya K., 2003.** Anticoagulant activities of the chitosan plysulfate synthesized from marine crab shell by semi- heterogenous conditions. Science Asia, 29, 115-120.
- **Plouffe B., 1997**.Production de chitosanases modulaires munies d'un site d'attachement à la cellulose et étude de leur activité en bioréacteur. Mémoire de Maîtrise en Sciences (M. Sc.). Université de Sherbrooke, Canada.
- **Rao M. S., Munoz J. and Stevens W. F., 2000.**Criticalfactors in chitin production by fermentation of shrimpbiowaste. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 808- 813.
- **Rhee J-S., Jung M-W. andPaeng K-J., 1998.** Evaluation of chitin and chitosan as a sorbent for the preconcentration of phenol and chlorophenols in water. Analytical sciences. 14, 1089- 1092.
- **Rinaudo M.**,2006.Chitin and chitosan :Properties and application.Prog.Polym.Sci.31 (2006) 603-632.

- **Roderick Bain, 1998**. Microencapsulation of prawn feed using chitin. Undergraduate thesis. University of Queensland.

- **Sandford PA** .Chitosan:commercial uses and potentials in: Chitin and Chitosan. Sourses, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. Skjak-Braek G, Anthonsen, Sandford PA, eds .London and New York: Elsevier (**1989**) 51
- **SandfordPA**.Commercial sources of chitin and chitosan and their utilization in: Advances in chitin science.Vårum KM, DomardA,SmidsrødO,eds.Trondheim:NTNU 6 **(2003)** 35.
- **Seng J. M, 1998**. Chitine,Chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie.P.40-44
- **Shahidi F., Janak K. V. A. and Jeon Y-J., 1999**.Food applications of chitin and chitosans. Tends in Food Sci. and Techno., (10), 37-51.
- **Shigemasa Y., Saito K., Sashiwa H. and Saimoto H., 1994**. Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. Int. J. Biol. Macromol., 16 (1) : 43-49.
- **Shimahara, K., Y. Takiguchi, T. Kobayashi, K. Uda and T. Sannan, 1989**. Screening of mucoraceae strains suitable for chitosan production. In: Skjak–Brack, G., T. Anthonsen and P. Sanford (eds.), Chitin and Chitosan. pp: 171–8. London, Elsevier Applied Science.
- **Shin H. P., Lee J-H. and Hong K. L., 2000**. Purification and characterization of chitinase from a Marine Bacterium, *Vibrio sp. 98CJ11027*. The J. of Microbiol., 38 (4), 224- 229.
- **Shirai K. S., Guerrero I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A., Gonzalez R. O. and Hall M. G., 2001.** Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. Enz. and Microbial Technol., 28, 446-452.
- **Stamford, N. P.; Ribeiro, M. R.; Freitas, A. D. S.; Cunha, K. P. V.; Santos, C. E. R. S.; Dias, S. H. L.** Effectiveness of sulfur with Acidithiobacillus and gypsum in chemical attributes of a Brazilian sodic soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 23, n. 10, p. 1433-1439**, 2007**.
- **SunaÖ- T., Cenk A., Levent K., Meral K- U. and Jülide A., 2003**.Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non- viral gene delivery vehicle. J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 6 (1), 27-32.
- **Suntornsuk L, Kritsanapun W, Nilkamhank S and Paochom A (2002)**Quantitation of Vitamin C content in herbal Juice using direct titration. Journal of pharmaceutical and BiochemicalAnalysis 28: 849-855.

- **Suzuki S., Watanabe T., Mikami T. and Suzuki M., 1990.**Proccedings of the 5th International Conference on chitin and chitosan, USA, 96- 105.
- **Synowiecki Joseph and Nadia Ali Abdul Quawi Al Khateeb, 1997**.Food Chemistry, 60, 605.
- **Taboada E., Gustavo C. and Galo C., 2003**.Retention capacity of chitosan for copper and mercury ions. J. Chil. Chem. Soc. 48 (1).
- **Tan LH, Hoosain R, Siok WT. 1996.**Activation of phonological codes before access tocharactermeaning in written Chinese. J ExpPsychol: Learn Mem Cogn 22:865–882.
- **Yang Y- P., Xu X- H., Chen H- F., 2004**.Treatment of chitin-producing wastewater by micro- electrolysis- contact oxidization. Journal of Zhejiang University Science. 5 (4): 436- 440.
- **Yoshihara, M., Adolfsen, B. and Littleton, T. J. (2003).** Is synaptotagmin the calcium sensor? Curr. Opin. Neurobiol. 13, 315-323
- **Wachter R., 1998**.Chitosan- more than just skin protection. Abriged version of a paper presented at the "Seminar der arbeitsgemeinschaftfürpharmazeutischeverfahrenstechnik (APV) in Marburg from 30th september to 1st october.
- **Wang SL., Chang WT. and Lu M. C., 1995**.Production of chitinase by *Pseudomonas aeruginosa K- 187* using shrimp and crab shell powder as a carbon source. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B, (2), 105-112.
- **Wu, P., Wood, R., Stott, P., 2005**. Human influence on increasing Arctic river discharges. Geophysical Research Letters 32, L02703. doi:10.1029/2004GL 02157.
- **Xiao F. L., Yun L. G., Dong Z. Y., Zhi L. and Kang D. Y., 2001**.Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. Journal of applied polymer science, 79, 1324- 1335.
- **Yang J-K., Shih I-L., Tzeng Y-M. and Wang S-L., 2000**. Production and purification of protease from a Bacillus subtilis that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme and microbial technology, 26, 406- 413.
- **Yang Y- P., Xu X- H., Chen H- F., 2004**. Treatment of chitin-producing wastewater by micro- electrolysis- contact oxidization. Journal of Zhejiang University Science. 5 (4): 436- 440.
- **Yen, M.-T., & Mau, J.-L. (2007a).**Physico-chemical characterization of fungal

- chitosan from shiitake stipes. LWT – Food Science and Technology, 40, 472–479.

- **Yen, M.-T., & Mau, J.-L. (2007b).** Selected physical properties of chitin prepared from shiitake stipes. LWT – Food Science and Technology, 40, 558–563.
- **Yoshinari B., Naohiko M., Kohishiro S. and Yoshinobu K., 1998.** Selective adsorption of mercury (II) on chitosan derivatives from hydrochloric acid. Analytical sciences, 14, 687- 690.
- **Zamani Z, Sarkhosh A, Fatahi R, Ebadi A (2007).** Genetic relationships among pomegranate genotypes studied by fruit characteristics and RAPD markers. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 82: 11-18.