



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A.MIRA-BEJAJA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire

Présenté par

M^r BOULAOUAD Ilyes

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : **Biologie**

Option : **Microbiologie Appliquée aux Substances Antimicrobiennes**

Thème

Isolement et sélection d'une moisissure cellulolytique locale et estimation de son potentiel cellulasique sur substrats solides

Soutenu le / / devant le jury composé de :

M ^r ZAIDI Farid	M. conférence A (UAM Bejaia)	Président
M ^r BENALLAOUA Said	Professeur (UAM Bejaia)	Rapporteur
Mme BEDJOU Fatiha	M. conférence A (UAM Bejaia)	Examinatrice
M ^r KECHA Mouloud	Professeur (UAM Bejaia)	Examineur
Mme BOUCHERBA Nawel	M. conférence B (UAM Bejaia)	Invitée

2012/2013

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu au Professeur Benallaoua S. directeur du laboratoire de biochimie microbienne pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et accepté de superviser ce travail ; mais également pour la confiance qu'il ma témoigné et la liberté qu'il m'a accordé tant dans le choix du sujet que dans la prise d'initiatives. Qu'il reçoive l'expression de ma vive gratitude.

Je souhaite remercier également Mlle Belhamiche N. pour m'avoir assisté et guidé durant les premières étapes de la réalisation de ce travail. Je ne saurai la remercier assez pour son soutien et son suivi scientifique.

Je remercie les membres de jury ; Mme Bedjou F. maitre de conférence A à l'université A.M. de Béjaia et Mr Kecha M. professeur à l'université A.M. de Béjaia, pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à lire et à juger ce travail en tant qu'examineurs. Egalement je remercie Mr Zaidi F. maitre de conférence A à l'université A.M de Béjaia qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie Mme Boucherba N. maitre de conférences B à l'université A.M. de Béjaia qui a bien voulu apporter une appréciation à ce mémoire et être parmi les membres du jury.

Je remercie également Mme Makhlouf Hassina responsable de la P.G de la FSNV ainsi que tous mes collègues de l'université A.M. pour l'aide qu'ils m'ont apporté et leur soutien pendant ces deux années de formation.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer mes remerciements au Dr Touati, chef de D. de microbiologie ainsi qu'au Dr Madani directeur du laboratoire BBBS pour m'avoir procuré leur aide matériel, également à Mr Duchiron Professeur à l'université de Reims pour ces judicieux conseils.

J'exprime toute ma sympathie à toutes les personnes du laboratoire de microbiologie appliquée(LMA) pour leur amitié, leur aide et l'excellente ambiance de travail qu'ils ont fournie. Ma profonde reconnaissance à Mr Bettach Azzedine et Mme Boucherba Nawal pour leurs précieux conseils et à Mlle Boufassa Louisa pour sa disponibilité.

Un immense merci également aux ingénieurs de laboratoire dont je citerai, Mme Guechtal, Mme Azil, Mme Galloul, Mlle Belhadi, Mr Zemouri, Mme Boudersa, Mr Bouchenoua, Mr Amrouche, Mme Rahmani et Mme Kharbachi.

Je finis par remercier toute personne que je n'ai pas cité, ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Merci à Dieu, à qui je dois tout, d'avoir guidé mes pas et de m'avoir donné la volonté pour achever ce travail.

Je dédie ce mémoire à...

Mes chers parents, leurs conseils, leurs encouragements et leur aide morale et financière, m'ont été précieux dans les moments importants de ma vie et mon permis d'atteindre mes objectifs. Nulles paroles ne peuvent exprimer ma reconnaissance.

Mes sœurs Salma et Rima et à mon frère Khalil aux quels je souhaite beaucoup de réussite.

Toute ma famille, en particulier mes cousins et cousines pour leurs affection au cours de mes études.

Mes chers collègues ou plutôt mes frères et sœurs de la promotion Magister 2011 ; Abdou Bousaa (Dr. Dark), Yazid Rahmoun (miskaren), Samer Shar3aby, Saadia Benfedala et Drifa Guellal, pour l'ambiance fraternelle et l'aide qu'ils m'ont apporté et avec qui j'ai partagé de bons moments. Je leur souhaite, à tous, une bonne continuation.

« ... *Et dís : Ô mon seigneur, accroît mes connaissances!* »

[Ta-Ha : 114]

Résumé

La présente étude consiste à isoler à partir des milieux naturels, des moisissures qui dégradent la cellulose. Des isolats capables de croître sur milieu gélosé en présence de CMC comme seule source de carbone et d'énergie sont soumis à un premier criblage semi-quantitatif par la méthode au Lugol. Cela a permis de les classer sur la base de leurs indices cellulolytiques. Un deuxième criblage quantitatif sur milieu liquide a permis de sélectionner les isolats les plus performants.

L'isolat **DK1**, identifié comme étant une souche appartenant au genre *Trichoderma*, a été sélectionné comme étant le meilleur producteur avec une activité PFase de **0,287** UI/ml et CMCase de **1,134** UI/ml sur milieu Mandels et Weber.

Le potentiel cellulolytique de cette souche a été estimé par fermentation solide sur deux coproduits de l'agriculture, les coques d'arachides et les noyaux de dattes. Les conditions de cultures sont les suivantes : température d'incubation 30°C, pH initial 6, taux d'inoculation 5.10^7 spore/g SPS, humidité initiale 65% et 50% respectivement pour les coques d'arachides et les noyaux de dattes.

Les cinétiques de certains paramètres de culture ; pH, matière sèche ainsi que celles de la production de cellulases ont été suivies tout au long de la fermentation.

Les résultats ont montré que la coque d'arachide est un bon inducteur de production de cellulases par rapport au noyau de datte avec un maximum d'activité PFase de **2,46** UI/g SPS au 7^{ème} jour de la fermentation contre **1,16** UI/g SPS pour les noyaux de dattes .

Mots clefs : Moisissures, Criblage, *Trichoderma sp.*, cellulose, cellulases, Fermentation Milieu Solide.

Liste des abréviations

- **Ø** : Diamètre.
- **AA**: acide aminé.
- **ACMCase**: Activité Carboxyméthylcellulase.
- **APFase**: Activité papier filtre.
- **BG** : β -Glucosidase.
- **BLC**: Biomasse lignocellulosique.
- **CA** : Coque d'arachide.
- **CMC**: Carboxyméthyl cellulose.
- **CBH** : Cellobiohydrolase.
- **CBM** : Domaine de liaison au substrat.
- **CD** : Domaine catalytique.
- **DNS**: 3,5- acide dinitrosalicylique.
- **DP**: Degré de polymérisation.
- **EC**: Enzyme commission.
- **EG** : Endoglucanase.
- **FML** : Fermentation en milieu liquide
- **FMS** : Fermentation en milieu solide.
- **gr** : Gramme.
- **Gr** : Grossissement.
- **IC** : Indice cellulolytique.
- **LC** : Lignocellulose.
- **MCC** : Cellulose micro-crosthalline.
- **MEA**: Malt- Extract- Agar.
- **mm** : Millimètre.
- **MS** : Matière sèche.
- **Milieu MW** : Mandels et Weber.
- **ND** : Noyaux de datte.
- **NRRL** : Northern Regional Research Center (USA).
- **N°** : Numéro.
- **PDA** : Potato- Dextrose- Agar.
- **sp.** : espèce
- **SPS** : Substrat poids sec.
- **T.** : *Trichoderma*
- **T. reesei** : *Trichoderma reesei*
- **UI** : Unité internationale.
- **UV-VIS** : Ultraviolet-Visible.
- **µg** : Microgramme.

Liste des tableaux

Tableau I : Principales espèces de moisissures productrices des cellulases.....	10
Tableau II : Applications courantes des cellulases.....	18
Tableau III : Composition chimique et production mondiale des principaux déchets L.C communément utilisé en FMS pour la production de cellulases.....	21
Tableau IV : Principaux avantages et inconvénients de la FMS.....	30
Tableau V : Comparaison entre la fermentation liquide et solide.....	31
Tableau VI : Activité de l'eau des microorganismes.....	32
Tableau VII : Principales enzymes produites par fermentation solide sur substrat L.C.	38
Tableau VIII : Informations relatives aux échantillons.....	39
Tableau IX : Différentes étapes du dosage de l'activité papier filtre.....	55
Tableau X : Différentes étapes du dosage de l'activité CMC _{Case}	56
Tableau XI : Isolats fongiques à partir des différents échantillons.....	58
Tableau XII : Principaux caractères cultureux des 6 isolats sélectionnés.....	64
Tableau XIII : Observation microscopique des 6 souches comparées à des schémas de références.....	68
Tableau XIV : Marque commerciales du matériel analytique.....	Annexe III
Tableau XV : Gamme étalon pour le dosage de l'AP _{Case} (solution mère de Gluc 10g/l)	Annexe IV
Tableau XVI : Gamme étalon pour le dosage de l'ACMC _{Case} (solution mère de glucose 2g/ l)	Annexe IV

Liste des figures

Figure 1 : Modes de formation des conidies.....	9
Figure 2 : Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux.....	9
Figure 3 : Structure moléculaire des endoglucanases.....	13
Figure 4 : Structure moléculaire des exodoglucanases.....	13
Figure 5 : Représentation schématique de la synergie entre les enzymes du système cellulase pour l'hydrolyse de la cellulose cristalline.....	16
Figure 6 : Importantes quantités de déchets agroalimentaires (épis de maïs)-Chine.....	20
Figure 7 : Noyaux de datte.....	22
Figure 8 : Coque d'arachide broyée.....	23
Figure 9 : Modèle de la structure moléculaire des principaux composants du matériel L.C.....	24
Figure 10 : Représentation moléculaire de la chaîne de cellulose.....	25
Figure 11 : Représentation schématique d'une microfibrille de cellulose montrant les régions cristallines et amorphes.....	25
Figure 12 : Les valeurs des DP typiques pour les différents types de celluloses et les cellodextrines solubles.....	26
Figure 13 : Structure d'un hémicellulose de xylane.....	27
Figure 14 : Schéma structural de la lignine.....	28
Figure 15 : Impact du prétraitement sur la matière lignocellulosique.....	35
Figure 16 : Etapes d'isolement des moisissures cellulolytiques sur milieu sélectif.....	41
Figure 17 : Etapes du criblage qualitatif sur milieu solide (Méthode au Lugol)	44
Figure 18 : Etapes du criblage quantitatif sur milieu liquide agité MW.....	46
Figure 19 : Représentation schématique de la technique de culture sur lamelle.....	49
Figure 20 : Inoculation aseptique du substrat solide sous haute à flux laminaire.....	51
Figure 21 : Traitements et analyses physico-chimiques des échantillons en FMS.....	53
Figure 22 : Réaction de réduction du DNS par le sucre réducteur.....	57
Figure 23 : Distribution des isolats en fonction des sites d'échantillonnage.....	59
Figure 24 : Photo du screening sur milieu gélosé représentant les zones d'hydrolyses	60
Figure 25 : Indices cellulolytiques des 20 isolats sur milieu CMC-Agar.....	60
Figure 26 : Cinétique des activités Pfases des 6 isolats en FML sur milieu MW.....	62
Figure 27 : Cinétique des activités CMCcase des 6 isolats en FML sur milieu MW	62
Figure 28 : Croissance fongique par la technique des lamelles.....	66
Figure 29 : Evolution de la MS au cours de la FMS sur la coque d'arachide.....	70
Figure 30 : Evolution de la MS au cours de la FMS sur les noyaux de datte.....	70
Figure 31 : Début de croissance mycélienne sur les deux substrats.....	71
Figure 32 : Formation de conidies de couleur vertes sur les noyaux de datte.....	72
Figure 33 : Evolution du pH au cours de la FMS de <i>Trichoderma sp.</i> sur les deux types de substrats solides.....	73
Figure 34 : Evolution des APfases au cours de la FMS de <i>Trichoderma sp.</i> sur les	

deux substrats.....	75
Figure 35 : Evolution de l'ACMCases de <i>Trichoderma sp.</i> par FMS sur les deux substrats.....	75
Figure 36 : Corrélation entre la production de cellulases et l'évolution du pH pour la CA.....	78
Figure 37 : Corrélation entre la production de cellulases et l'évolution du pH pour les ND.....	78
Figure 38 : Courbe d'étalonnage pour le dosage du Glucose (10g/l).....	Annexe IV
Figure 39 : Courbe d'étalonnage pour le dosage du Glucose (2g/l)	Annexe IV

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

SOMMAIRE

Introduction..... 1

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LES CELLULASES FONGIQUES

1.1. Les champignons filamenteux cellulolytiques.....	3
1.1.1. Caractères généraux.....	3
1.1.2. Ecologie	4
1.1.3. Taxonomie.....	5
1.2. Les cellulases.....	11
1.2.1. Structure.....	11
1.2.2. Classification.....	11
1.2.3. Mécanisme d'action.....	14
1.2.4. Applications industrielles.....	16

CHAPITRE 2 : LES COMPOSES LIGNOCELLULOSIQUES, SUBSTRATS DE FERMENTATION

2.1. Les substrats lignocellulosiques.....	19
2.1.1. Ressources en biomasse lignocellulosique.....	19
2.1.2. Valorisation de la biomasse L.C.....	21
2.1.3. Choix des substrats solides pour la fermentation.....	21
2.1.4. Composition du complexe lignocellulosique.....	23
2.2. La fermentation de substrats solides (FMS).....	28
2.2.1. Définition et Généralités.....	28
2.2.2. Principaux paramètres.....	31
2.2.3. Description des différentes étapes du processus.....	34
2.2.4. Application de la FMS pour la production d'enzymes sur substrat L.C.....	36

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES

1.1. Isolement des moisissures cellulolytiques.....	39
1.1.1. Echantillonnage.....	39
1.1.2. Isolement sur gélose sélective	40
1.2. Purification.....	42

1.3. Conservation des isolats.....	42
1.3.1. Milieu de conservation.....	42
1.3.2. Technique de conservation.....	42
1.4. Criblage des isolats cellulolytiques performants	43
1.4.1. Criblage en milieu gélosé « semi quantitatif »	43
1.4.2. Criblage en milieu liquide agité « quantitatif »	45
1.5. Croissance apicale.....	46
1.6. Identification des souches sélectionnées	47
1.6.1. Identification macroscopique	47
1.6.2. Identification microscopique.....	47
1.7. Mise en œuvre des FMS.....	49
1.7.1. Préparation des substrats solides.....	49
1.7.2. Préparation des suspensions de spores	50
1.7.3. Cultures en Erlenmeyer (Kang et <i>al.</i> , 2004).....	50
1.8. Prélèvement et traitement des échantillons en FMS.....	51
1.9. Méthodes d'analyse physico-chimiques.....	52
1.9.1. Mesure de la matière sèche	52
1.9.2. Mesure des activités cellulases.....	54
1.9.3. Dosage des sucres réducteurs.....	57
1.10. Analyses statistiques.....	57

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Isolement sur milieu sélectif	58
2.2. Criblage des isolats.....	59
2.2.1. Criblage sur milieu gélosé.....	59
2.2.2. Criblage sur milieu liquide	61
2.3. Etude Morphologique des isolats sélectionnés	63
2.3.1. Macromorphologie	63
2.3.2. Micromorphologie	65
2.4. Fermentation en milieu solide	69
2.4.1. Évolution de la matière sèche et du pH au cours de la fermentation	69
2.4.2. Evolution des activités cellulases.....	74
2.4.3. Etude comparative de la production d'enzymes de la souche <i>Trichoderma sp.</i> sur les deux substrats.....	79
Conclusion	81
Références bibliographiques	83

Annexes

L'épuisement à moyen terme des énergies fossiles, la consommation d'énergie qui ne cesse d'augmenter et l'augmentation des préoccupations environnementales, ont suscité un vif intérêt des pouvoirs publics pour le développement d'une technologie énergétique alternative. A ce titre, la biomasse lignocellulosique fut naturellement au centre des recherches pour la production des carburants de substitutions et même pour étudier de nouvelles filières de biotechnologie blanche (bioraffineries) étant présentée comme alternative à la pétrochimie **(Roussos, 1985)**.

La biomasse lignocellulosique se compose de trois types de polymères, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine qui sont fortement imbriquées les uns contre les autres et liées chimiquement par des forces covalentes et non covalentes. La cellulose représente 40 à 60% de cette biomasse, par conséquent, c'est le biomatériau renouvelable le plus abondant sur notre planète **(Dekker et Lindner, 1979)**. Les déchets lignocellulosique sont produits en grandes quantités par les différents secteurs d'activités tels que la foresterie, la papeterie, l'agriculture et l'industrie agroalimentaire, en plus des différents déchets solides municipaux. Dans le passé, ces matériaux potentiellement intéressants étaient traités comme déchets dans de nombreux pays, et encore aujourd'hui dans certains pays en développement, ce qui soulève de nombreuses préoccupations environnementales **(Palacios-Orueta et al., 2005)**. Ils sont utilisés pour l'alimentation du bétail, la fertilisation des sols et la production d'énergie par combustion. Toutefois, leur valorisation par voie fermentaire par des hydrolases (cellulases) permet une exploitation plus approfondie de l'énergie potentielle que représente cette biomasse **(Roussos et Hannibal, 1984)**. L'intérêt d'une telle orientation est d'autant plus important que les applications des cellulases sont très variées. Outre leur utilisation dans l'Industrie agroalimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie et des détergents, la voie la plus prometteuse, dans le contexte économique actuel, semble être la production de carburants de substitution. Les résidus cellulosiques hydrolysés par les cellulases, fournissent un mélange de sucres qui par fermentation, conduisent à des produits tels que l'acétone, le butanol, l'éthanol ou le méthane **(Kuhad et al., 2011)**.

Les cellulases sont essentiellement produites par des micro-organismes cellulolytiques, particulièrement les moisissures grâce à leur capacité incomparable à conquérir les substrats naturels avec une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé **(Breton, 1990)**.

Des progrès significatifs ont été réalisés dans la sélection des champignons hyper producteurs de cellulases ainsi que leurs conditions de culture. Toutefois, il faut noter que la

grande majorité de ces études sont réalisées en milieux liquides qui présentent plusieurs inconvénients. Les procédés de fermentation en milieu solide paraissent mieux adaptés à la culture des microorganismes sur de tels substrats insolubles et similaires à leur environnement naturel. Ces procédés sont de plus en plus impliqués en industrie vu leur simplicité et les faibles coûts d'investissement et d'exploitation et se présentent comme, une alternative intéressante pour la production de cellulases (**Roussos, 1985**).

En industrie, il ne s'agit pas seulement de sélectionner des souches productrices, mais il est également nécessaire de définir un milieu de production favorable et à faible coût. La valorisation des sous produits agricoles et agro-alimentaires par voie fermentaire constitue une approche biotechnologique très intéressante pour la production de cellulases vue leur abondance, leur disponibilité et leur faible coût.

L'objectif de notre travail s'inscrit dans cette optique et porte sur l'évaluation du potentiel cellulolytique d'une souche fongique isolée localement par fermentation solide. Deux sous-produits agricoles locaux, la coque d'arachide et les noyaux de datte sont utilisés.

Le protocole adopté est le suivant :

- Echantillonnage à partir de milieux naturels riches en matière organique végétale.
- Isolement sur un milieu sélectif CMC-Agar-Gentamycine pour les champignons producteurs des cellulases.
- Criblage qualitatif par la méthode au Lugol sur milieu gélosé.
- Criblage quantitatif sur milieu liquide agité MW.
- Identification phénotypique des isolats sélectionnés.
- Fermentation en milieu solide de la souche sélectionnée sur les deux types de substrats choisis.

Dans une première partie, une étude bibliographique présente l'essentiel de l'état des connaissances sur les moisissures cellulolytiques, la fermentation en milieu solide et ses exigences, l'impact écologique et le potentiel énergétique des déchets cellulosiques.

1.1. Les champignons filamenteux cellulolytiques

Dans la nature, un large groupe de microorganismes (bactéries, champignons, actinomycètes) participent à la dégradation de la matière organique végétale aussi bien dans les sols, les sédiments marins ou au niveau de l'appareil digestif des ruminants (**Bauchop, 1979**).

Les champignons filamenteux occupent une place importante sur le marché des cellulases, les principaux producteurs appartiennent aux Ascomycetes et aux Basidiomycetes. Leur rôle dans l'hydrolyse de la cellulose a été étudié et développé dans divers revues de synthèse (**Ghose, 1977 ; Dewel et Mandels, 1980**)

1.1.1. Caractères généraux

Les champignons filamenteux représentent un groupe de microorganismes aérobies physiologiquement divers qui sont caractérisés par un mode de nutrition saprophyte ou parasite. Ils ont en général, un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ($a_w = 0.65$). La plupart des champignons préfèrent un environnement acide mais tolèrent un large éventail de pH. La majorité des champignons sont mésophiles et se développent entre 5 et 37°C, avec une température optimale de 25-30°C (**Madan et Thind, 1998**).

Les champignons sont les principaux responsables de la dégradation de la matière organique végétale (lignine, cellulose, hémicellulose). Ils possèdent des équipements enzymatiques très importants, ce qui leur confère des facultés d'adaptation plus importantes que les bactéries et leur permet d'utiliser les substrats les plus complexes. Beaucoup de mycètes sont cellulolytiques, et la plupart produisent les cellulases une fois développés sur de la cellulose (**Mandels et Weber, 1969**).

Le mode de croissance des hyphes des moisissures leur permet de pénétrer et de coloniser les substrats solides ainsi que l'accès à tous nutriments disponibles dans les particules. L'accroissement des hyphes s'effectue par les extrémités (croissance apicale) dans toutes les directions et de façon identique ce qui se traduit par la mise en place de colonies circulaires caractéristiques des champignons sur milieu gélosé (**Cooke et Whipps, 1993 dans Duchiron et Copinet, 2011**).

Le métabolisme primaire des moisissures est le résultat de quelques réactions chimiques catalysées par des quantités élevées d'exoenzymes hydrolytiques (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) qui sont excrétés au niveau de l'apex des hyphes. Cette phase procure aux cellules l'énergie nécessaire pour la croissance et

la formation de macromolécules indispensables (protéines, polymères structuraux et ADN) (Lynd *et al.*, 2002).

Les voies métaboliques extrêmement diversifiées trouvées chez les champignons peuvent aboutir à la synthèse de nombreuses molécules utilisables d'un point de vue commercial et industriel comme l'éthanol, les acides organiques, différentes enzymes, des antibiotiques etc.... (Roussos et Raimbault 1982).

1.1.2. Ecologie

a) Habitat

Les moisissures cellulolytiques colonisent divers endroits dans lesquels la matière cellulosique est abondante. Cependant d'autres paramètres sont requis, entre autres ; l'eau, l'oxygène, la température et les nutriments.

Dans la nature la dégradation de la cellulose est le résultat de l'intervention de plusieurs organismes cellulolytiques (bactéries, champignons) qui coexistent ensemble dans le même écosystème et jouent un grand rôle dans les cycles et les équilibres biologiques (Lynd *et al.*, 2002).

Dans les sols, la cellulose est présente sous forme de litière végétale, cette dernière est persistante à cause de sa forte teneur en lignine difficilement dégradable. L'absence d'eau libre dans des écosystèmes pareils favorise essentiellement le développement des moisissures cellulolytiques capables de croître à de faibles teneurs en eau et de sécréter des cellulases extracellulaires dégradant efficacement les substrats. Parmi les genres producteurs de cellulases les plus répandus dans le sol on peut citer ; *Trichoderma*, sp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. et *Chaetomium* sp. (Makut et Godya, 2010).

La matière organique des sédiments aquatiques est dégradée préférentiellement par les bactéries cellulolytiques mieux adaptés à ce type d'environnement. Le bois présent dans les sédiments marins favorise la croissance des Ascomycètes appartenant à l'ordre des *Halosphaeriales* et aux *Loculoascomycetes*. Les moisissures *Arenicolous* marines sont un groupe de champignons vivant dans les sables marins riches en matière organique (Hyde *et al.*, 1998).

Les champignons cellulolytiques sont présents aussi avec une fréquence moindre au niveau du tractus intestinal des ruminants contribuant à côté des bactéries anaérobies du rumen à la digestion de la matière organique, les espèces les plus fréquentes ; *Anaeromyces mucronatus* et *Piromyces* sp (Bauchop, 1979).

b) Besoins nutritifs

Les champignons sont des hétérotrophes ; ils exigent des composés organiques comme source d'énergie et de carbone. Les molécules simples, monosaccharides, acides aminés, acides organiques traversent facilement la barrière membranaire alors que les polymères et les molécules complexes doivent être dégradés d'abord par des enzymes excrétées ou membranaires.

Le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, l'amidon et la cellulose sont les sucres les plus utilisés par les moisissures comme source de carbone et d'énergie. Par ailleurs tout les composés organiques semblent pouvoir être utilisés par au moins une espèce de champignons (**Breton, 1990**).

L'azote, composé majeur des protéines et des acides nucléiques, représente quant à lui, le second élément chimique le plus important du matériel cellulaire. Non assimilable sous forme d'azote atmosphérique par les moisissures, elles métabolisent le nitrate, l'ammonium, l'urée et les acides aminés (**Maheshwari et al., 2000**).

Les oligoéléments tels que le cuivre, le magnésium, le sodium, le zinc et le molybdène sont disponibles en grande quantité dans l'environnement des moisissures. Ils sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production de cytochromes, des pigments et d'acides organiques (**Breton, 1990**).

Diverses vitamines sont également d'une grande importance pour leur croissance, en particulier la thiamine, la biotine intervenant comme coenzyme lors des carboxylations (**Madan et Thind, 1998**).

1.1.3. Taxonomie

Les champignons sont des organismes eucaryotes qui constituent un groupe indépendant, égalant dans le rang celui des végétaux et des animaux. Ce sont des organismes thallophytes, dépourvus de tiges, de racines et de feuilles, sans chlorophylle. Le thalle peut être unicellulaire (levures) ou filamenteux (moisissures). Il est habituellement limité par une paroi rigide à l'exception du groupe Gymnomycète composé d'organismes à structure végétative nue et capables de se mouvoir à l'aide d'un pseudopode (**Andrianova et al., 2008**).

a) Classification générale**- Division I : Gymnomycota**

Appareil végétatif dépourvu de paroi avec la présence de myxamibes et de plasmodes.

- Division II : Mastigomycota

Reproduction asexuée typiquement par spores mobiles (zoospores).

- **Division III : Amastigomycota**

Pas de cellules mobiles, cette division renferme plusieurs classes :

➤ **Zygomycètes** : Mycélium sans cloisons avec reproduction asexuée le plus souvent, se manifestant par la production de plusieurs sporangiospores .

La forme sexuée plus rare, se produit par la fusion de deux gamètes multinuclées aboutissant à la formation d'une cellule caractérisée par sa paroi épaisse appelée zygospore (**Andrianova et al., 2008**).

Ce groupe englobe différents genres : *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum*.

➤ **Ascomycètes** : Cette classe représente 75% de tous les mycètes (**Pitt et Hocking, 2009**), caractérisée par :

- Un thalle à mycélium septé et haploïde (Samson *et al.*, 1981), ou unicellulaire (levures).
- Une reproduction sexuée par formation de spores méiotiques, ascospores portés dans des asques.
- Une reproduction asexuée par conidies.
- Une paroi cellulaire constituée essentiellement de chitine et de β -glucanes.

➤ **Basidiomycètes** : Unicellulaires ou multicellulaires, sexuels ou asexuels, terrestres ou aquatiques. En effet, ils sont si variables qu'il est pratiquement impossible d'identifier toutes les caractéristiques morphologiques spécifiques à ce groupe. Le dispositif le plus révélateur est la production de basides (basidium), cellules où la méiose se produit et sur lesquelles les basidiospores haploïdes se forment (**Pitt et Hocking, 2009**).

➤ **Deuteromycètes (ou champignons imparfaits)** : Caractérisés par :

- Un thalle à mycélium septé ou unicellulaire (levures).
- L'absence de reproduction sexuée connue.
- Une reproduction asexuée par conidies, parfois absente (mycélium stérile).

Ce groupe inclut d'importants contaminants alimentaires, un grand nombre d'espèces sont capables de produire des métabolites très toxiques (**Samson et al., 1981**).

b) Identification des moisissures

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques, rarement à des propriétés biochimiques. Elle nécessite souvent l'utilisation des milieux de culture standards favorisant la croissance ou la reproduction, permettant ainsi une expression correcte des caractères étudiés (**Breton, 1990**).

L'identification de l'espèce nécessite une étude plus délicate, basée sur différents tests (galeries biochimiques) afin de cerner les caractères physiologiques qui viennent s'allier aux caractères de l'appareil fructifère végétatif.

Evidemment, la confirmation du genre et de l'espèce nécessite l'intervention de la biologie moléculaire, qui permet de comparer les séquences d'ADN des souches étudiées à celles des souches répertoriées.

La combinaison de ces différentes techniques et tests représente en définitive le moyen le plus fiable d'aboutir à une identification juste et précise.

➤ Critères d'identification macroscopique

- L'aspect des colonies : Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien).
- Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).
- La taille des colonies: Elle peut-être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*).
- La couleur des colonies : est un élément très important d'identification. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffusés dans le milieu de culture (*Fusarium*).
- Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée ou asexuée est aussi un élément important de diagnostic (**Breton, 1990**).

➤ Critères d'identification microscopique

- Le thalle : Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ;

- *Le thalle siphonné*, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 μm), non cloisonné est caractéristique des *Zygomycètes*.
- *Le thalle septé ou cloisonné*, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 μm) et régulier, divisés par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* (**Andrianova et al., 2008**).
- **Les spores** : Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore), ou exogènes (conidies). Elles sont retrouvées chez les *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* et sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (**Breton, 1990**).

D'après la forme et les modalités de séptation, on distingue 5 groupes de spores

- ✓ *les amérospores* : spores unicellulaires de petite taille (*Penicillium*, *Aspergillus*)
- ✓ *les didymospores* : spores bicellulaires (*Trichothecium*) ;
- ✓ *les phragmospores* : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*) ;
- ✓ *les dictyospores* : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*) ;
- ✓ *les scolécospores* : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*).

Dans Le mode thalique, la formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle (**Figure N° 1**). Dans Le mode blastique, les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas (**Pitt et Hocking, 2009**). Les conidies sont en général regroupées à l'extrémité de la cellule conidiogène. L'organisation de ce regroupement est aussi un facteur d'identification. Les principaux types sont (**Figure N° 2**) :

- ✓ chaînes basipètes, ex. *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Penicillium*
- ✓ chaînes acropètes, ex. *Cladosporium*, *Alternaria* (**Breton, 1990**).

Les cellules conidiogènes sont différenciées. Elles peuvent alors être directement insérées sur les filaments végétatifs (ex: *Acremonium*, *Fusarium*) ou bien distinctes des filaments végétatifs et portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif (ex : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium*) (**Pitt et Hocking, 2009**).

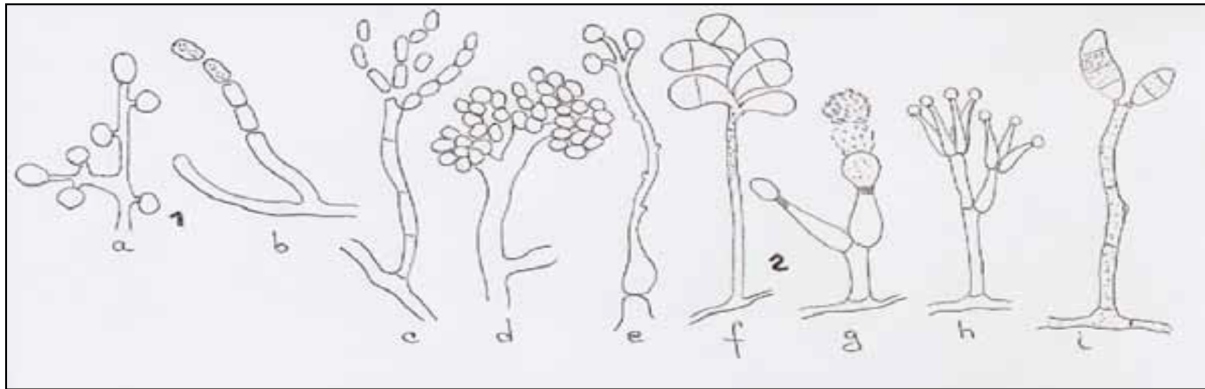


Figure 1 : Modes de formation des conidies (Breton, 1990)

1. Formation thallique : a : solitaire (*Chrysogenum*), b : arthritique (*Geotrichum*)
2. Formation blastique : c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodial (*Beauveria*), f : regressif (*Trichothecium*), g : annelidique (*Scopulariopsis*), h : phialidique (*Penicillium*), i : poric (*Curvularia*).

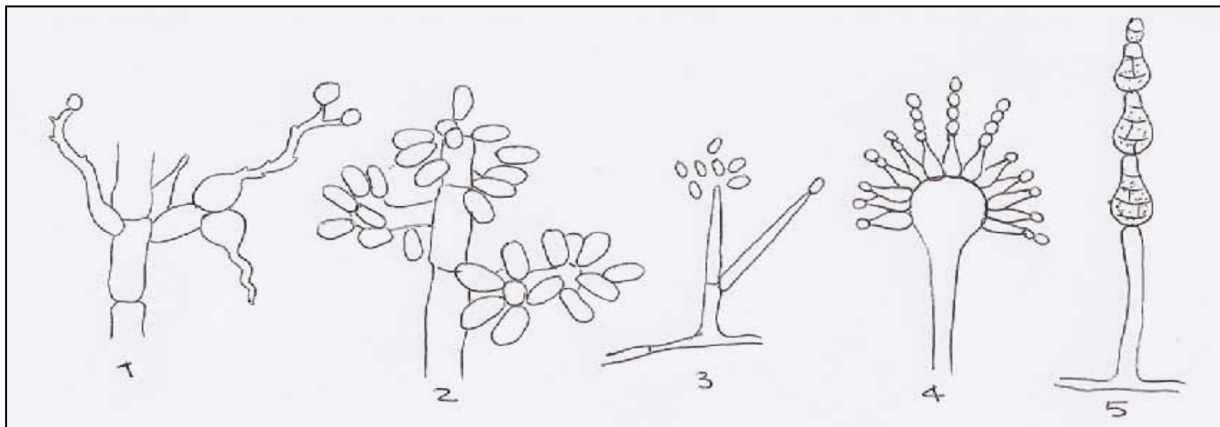


Figure 2: Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux (Breton, 1990)

1. grappes (*Beauveria*), 2. masses (*Botrytis*), 3. têtes (*Acremonium*), 4. chaînes basipètes (*Aspergillus*), 5. chaînes acropètes (*Alternaria*).

c) Principaux genres cellulolytiques

Les principales moisissures productrices de cellulases appartiennent au groupe des Ascomycètes et Basidiomycètes particulièrement ceux de la pourriture blanche. Les moisissures des genres *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* et *Phanerochaete* ont été rapportés comme étant les meilleurs producteurs de cellulases (**Tableaux N° 1**) et les enzymes brutes produites par ces micro-organismes sont commercialisées (**Dashtban et al., 2009**).

➤ **Le genre *Trichoderma***

Le genre *Trichoderma* appartient au grand groupe des champignons imparfaits. Les espèces de ce genre (**Tableau N° I**) produisent des quantités importantes d'exoenzymes capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose (**Makut et Godiya, 2010**).

L'espèce *Trichoderma reesei* et ses mutants ont été probablement les plus étudiés pour la production de cellulases. Les cellulases de *T. reesei* présentent l'avantage de posséder les trois classes d'enzymes, bien qu'elles présentent souvent un déficit en β -glucosidase. En plus des cellulases, elles produisent des hémicellulases qui participent aussi au processus d'hydrolyse des parois végétales. Des cellulases de *T. reesei* sont commercialisées par la firme NOVO ENZYME (**Ogier et al., 1999**).

➤ **Le genre *Aspergillus***

Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de produire des cellulases (**Tableau N° 1**). Cependant, ces cellulases sont généralement riches en EGs et β -glucosidases mais pauvres en CBHs, par conséquent une action limitée sur la cellulose microcristalline.

Tableau I: Principales espèces de moisissures productrices des cellulases (**Pandey et al., 1999; Howard et al., 2003; Doi, 2008; Dashtban et al., 2009; Sanchez, 2009**)

Groupe	Genre	Souche
Ascomycota	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> <i>A. ustus</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. fumigatus</i>
		<i>Trichoderma</i>
	<i>Penicillium</i>	
	<i>Fusarium</i>	<i>F. merismoides</i>
Basidiomycota	<i>Lentinus</i>	<i>L. edodus</i>
	<i>Sporotrichum</i>	<i>S. pulveritenum</i>
	<i>Pleurotus</i>	<i>P. ostreatus</i>
	<i>Fomitopsis</i>	<i>F. palustris</i>
Zygomycota	<i>Rizopus</i>	<i>R. stolonifer</i>

➤ **Les pourritures blanches**

Les pourritures fibreuses appelées aussi pourritures blanches, constituées principalement des *basidiomycètes*, font partie des champignons les plus efficaces pour dégrader les différents constituants du bois : cellulose, hémicelluloses et lignine. L'étude de l'action enzymatique de

la pourriture fibreuse sur la cellulose a été effectuée la première fois sur la pourriture blanche *Sporotrichum pulverulentum* (Hofrichter, 2002).

Trametes versicolor et *Phanerochaete chrysosporium* trouvés de façon ubiquitaire dans les forêts subtropicales et tempérées, ont fait aussi l'objet de nombreuses études pour leurs capacités de production d'enzymes actives dans la dégradation de la cellulose et de la lignine, (Enoki et al., 1988).

1.2. Les cellulases

1.2.1. Structure

Les Cellulases sont des enzymes modulaires qui sont composées d'unités structurellement et fonctionnellement distinctes, appelées domaines ou modules (Henrissat et al., 1998).

Le plus souvent, les cellulases sont constitués d'un domaine catalytique (CD) et d'un module de fixation au substrat (CBM), qui est généralement reliée au CD via un peptide de liaison relativement long souvent glycosylé (de 30 à 44 AA).

Les enzymes qui n'ont pas de CBM, c'est à dire avec un seul module (domaine catalytique), conservent leur capacité d'absorber la cellulose, mais souvent avec une affinité plus faible par rapport à l'enzyme complète (Karlsson et al., 2002).

Il a été suggéré que les linkers représentent des charnières flexibles entre les deux domaines facilitant leur fonction indépendante (Bushuev et al., 1989). Le rôle du peptide de liaison de *T. reesei* CBH I sur l'interaction et l'hydrolyse consécutive de cellulose cristalline a été étudié par Srisodsuk et al. (1993). Ils concluent que la séparation spatiale suffisante des deux domaines (CD et CBM) est nécessaire pour la fonction efficace de l'enzyme.

La tyrosine joue un rôle important dans la fixation du substrat par une interaction hydrophobe (Linker et Teeri, 1996).

1.2.2. Classification

En général, toutes les enzymes cellulolytiques appartiennent à la famille des glycosides hydrolases (CE 3.2.1.x), Un groupe d'enzymes qui hydrolysent la liaison glycosidique.

Traditionnellement, les cellulases sont classées en deux catégories distinctes: cellobiohydrolases (CBH), endoglucanases (EG), en fonction de leur affinité aux extrémités de la chaîne ou à l'intérieur de la chaîne de glucose, respectivement.

La troisième classe d'enzymes, β -glucosidases (BG) intervient en synergie avec CBH et EG. Elles ne sont pas souvent considérées comme des «vrais» cellulases du moment où elles

hydrolysent principalement les liaisons glycosidiques des cellooligosaccharides solubles et le cellobiose, n'agissant pas sur la cellulose elle-même.

a) Le système cellulolytique complet

La dégradation complète de la cellulose native nécessite une action coopérative du système multienzymatique, tels que celui du genre *Trichoderma*, composé de plusieurs enzymes endo et exo-glucanases et deux β -glucosidases (Chen et al., 1992). La combinaison de l'enzyme produite varie entre les espèces et dépend du micro-organisme qui les produit.

b) Endoglucanases ou 1,4- β -D- glucan glucanohydrolases (E.C 3.2.1.4)

Elle intervient sur des sites aléatoires des zones amorphes contenant des régions désordonnées, souples et hydratées à l'intérieur de la chaîne de cellulose, générant des cellooligosaccharides de différentes longueurs, du cellobiose et du glucose. Ils sont donc les premiers responsables de la diminution du degré de polymérisation des substrats cellulotiques. Par conséquent, de nouvelles extrémités susceptibles à l'attaque des exoglucanases sont générées (Boisset et al., 2000).

Cependant elles n'ont qu'une action extrêmement limitée sur la cellulose cristalline, la fibre de coton ou l'Avicel. Les substrats sur lesquels agit ce types d'enzymes sont les celluloses modifiés ou amorphes, solubles telles que la Carboxymethylcellulose (CMC), la swollen cellulose (acide ou basique). Le substrat d'essais le plus souvent préconisé, est la CMC. On parle alors d'activité CMCCase.

L'étude de la structure des EGs (Davies et Henrissat, 1995), révèle la présence de courtes lèvres formant une fente à l'intérieur de la quelle se place la chaîne de cellulose (Figure N° 3).

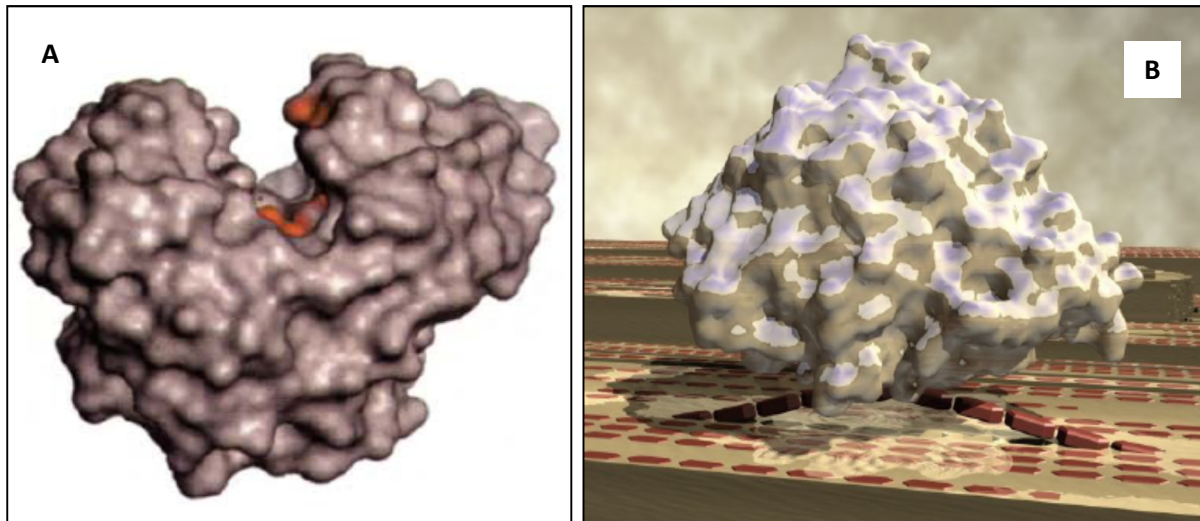


Figure 3 : Structure moléculaire des endoglucanases (Dvies et henrissat, 1995)
 (A) Site actif à l'intérieur de la fente caractéristique des endoglucanases (Diagramme de surface moléculaire de l'endoglucanase E2 de *T. fusca*). (B) Animation d'une EG active sur une chaîne de cellulose.

c) Exoglucanases ou $1,4\text{-}\beta\text{-D}$ glucan cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91)

Les CBHs agissent d'une manière processive à partir des extrémités des chaînes de celluloses, elles traitent le long de la chaîne libérant le cellobiose comme produit majeur. Parfois, le glucose et cellotriose sont également produits en petites quantités au cours des étapes initiales d'hydrolyse (Davies et Henrissat, 1995).

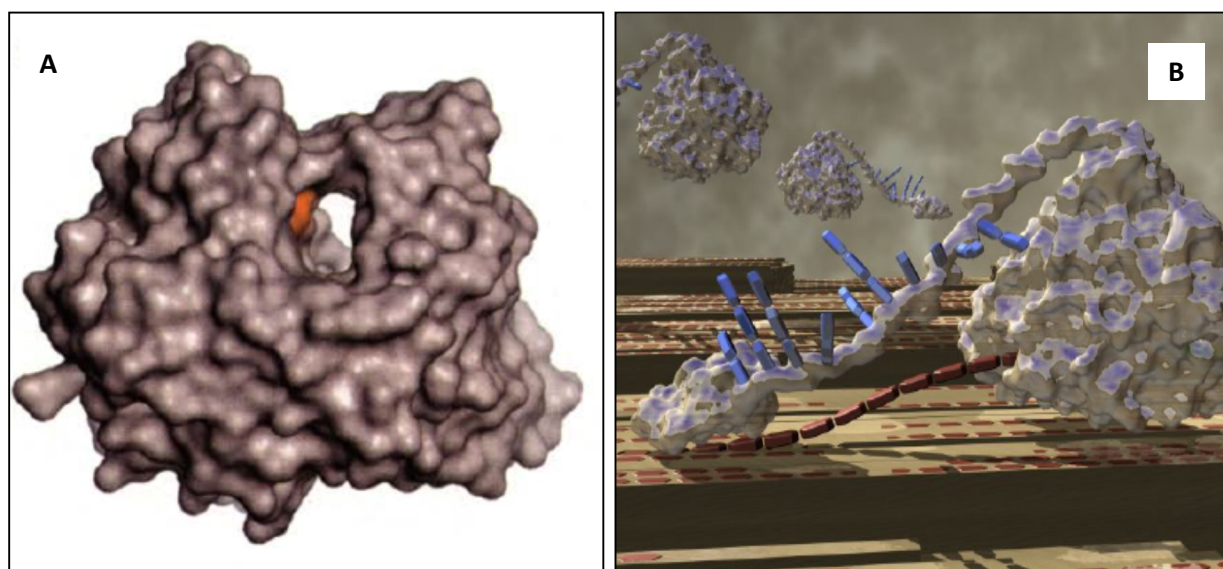


Figure 4 : Structure moléculaire des exoglucanases (Dvies et henrissat, 1995).
 (A) Site actif à l'intérieur du tunnel caractéristique des exoglucanases (Diagramme de surface moléculaire de l'exoglucanase II de *T. reesei*)
 (B) Animation d'une exoglucanase active à l'extrémité d'une chaîne de cellulose.

Une des caractéristiques importantes de toutes les cellobiohydrolases est qu'elles peuvent agir sur la cellulose microcristalline diminuant progressivement le degré de polymérisation (**Terri, 1997**).

L'Avicel est le substrat qui a permis de les mettre en évidence, et actuellement, l'avicelase est considérée comme synonyme de l'exoglucanase.

A la différence de la rainure ouverte présente dans les EGs, la structure tridimensionnelle des CBHs montre un site actif situé à l'intérieur d'un tunnel (**Figure N° 4**). La CBH I (Cel7A) de *T. reesei* possède un tunnel de 50 Å de long (**Divne et al., 1994**).

d) β -glucosidases ou β -D-glucoside glucohydrolase (EC 3.2.1.21)

Elles hydrolysent le cellobiose et les courts cellooligosaccharides solubles en glucose, la réaction d'hydrolyse est effectuée en phase liquide, plutôt que sur la surface des particules insolubles de cellulose, ce qui est le cas pour les cellulases «vraies» (EGs et CBHs).

Les EG et CBHS sont soumises à l'inhibition par le produit de l'hydrolyse (cellobiose et glucose). le Cellobiose est montrée pour son effet inhibiteur plus fort que le glucose (**Holtzapple et al., 1990**). Par conséquent, l'élimination du cellobiose est une étape importante du processus d'hydrolyse enzymatique.

Deux BGs ont été isolées à partir du surnageant de culture de *T. reesei*, cependant, les études sur plusieurs espèces de Trichoderma ont montré qu'une grande partie de ces enzymes restent fixées sur la paroi cellulaire, ce qui explique la forte concentration en glucose au voisinage de la paroi fongique (**Chen et al., 1992**).

Ces enzymes peuvent agir sur les xylanes et les xylooligosaccharides avec un taux d'hydrolyse plus faible (**Berry et dekker, 1986**).

Lorsque le cellobiose est le substrat d'essais on parle d'activité cellobiase. Cependant, on utilise le terme β -glucosidase étant donné qu'on utilise le plus souvent un substrat de synthèse le para-nitrophényl- β -D-glucoside (pNPG).

1.2.3. Mécanisme d'action

Les enzymes cellulolytiques hydrolysent les liaisons glycosidiques via le mécanisme de la catalyse acide-base, constitué d'un donneur de proton et d'une base nucléophile (**Sinnott, 1990**). Comme le nom l'indique, l'Hydrolyse, implique la rupture des liaisons par addition d'eau.

a) Adsorption au substrat

La première étape de la catalyse enzymatique c'est la phase d'adsorption durant la quelle l'enzyme reste fixée à la cellulose, le taux d'adsorption est d'autant plus élevé que la taille des particules du substrat est petite. L'adsorption est influencée par la nature, le degré de pureté, le prétraitement de la cellulose d'une part, et par l'affinité de l'enzyme envers le substrat d'autre part.

Ryu et al., (1984) rapportent que les EGs et CBHs de *T. reesei* MCG 77, possèdent des sites de fixation différents correspondant aux sites d'hydrolyse.

b) Synergie entre les enzymes cellulolytiques

L'action de coopération des différentes classes d'enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose cristalline (**Figure N° 5**), souvent désignée par synergie, est essentielle pour une hydrolyse efficace. La synergie entre les enzymes cellulolytiques se produit lorsque l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes conduit à un taux d'action supérieur à la somme de leurs actions individuelles (**Mansfield et al., 1999**).

Les différents types de synergies de l'hydrolyse de la cellulose proposés dans la littérature sont (**Zhang et Lynd, 2004**) ; endoglucanase – exoglucanase, exoglucanase – exoglucanase, endoglucanase – endoglucanase, exoglucanase ou endoglucanase et β -glucosidase, qui réduit l'effet inhibiteur du cellobiose, synergie intramoléculaire entre le CD et le CBD.

Les deux types de synergie le plus souvent rapportés sont (**Henrissat et al., 1985**):

➤ La synergie endo-glucanases (EG) et exo-glucanases (CBH)

L'action est initiée par une attaque des endoglucanases sur les régions amorphes de la fibre de cellulose libérant ainsi de multiples extrémités non réductrices. Ces terminaisons serviront de sites d'attaques pour les cellobiohydrolases qui continuent l'hydrolyse dans les régions cristallines de la fibre libérant des unités cellobioses.

➤ La synergie exo-exo, entre deux cellobiohydrolases complémentaires

L'une agissant sur l'extrémité non réductrice de la chaîne et l'autre à partir de l'extrémité réductrice. Dans leur rapport **Fagerstam et Petersson (1979)** rapporte une hydrolyse extensive de la cellulose par deux CBH (I et II) de *Trichoderma reesei*. Leur action synergique est deux fois plus importante par rapport à leur action séparée.

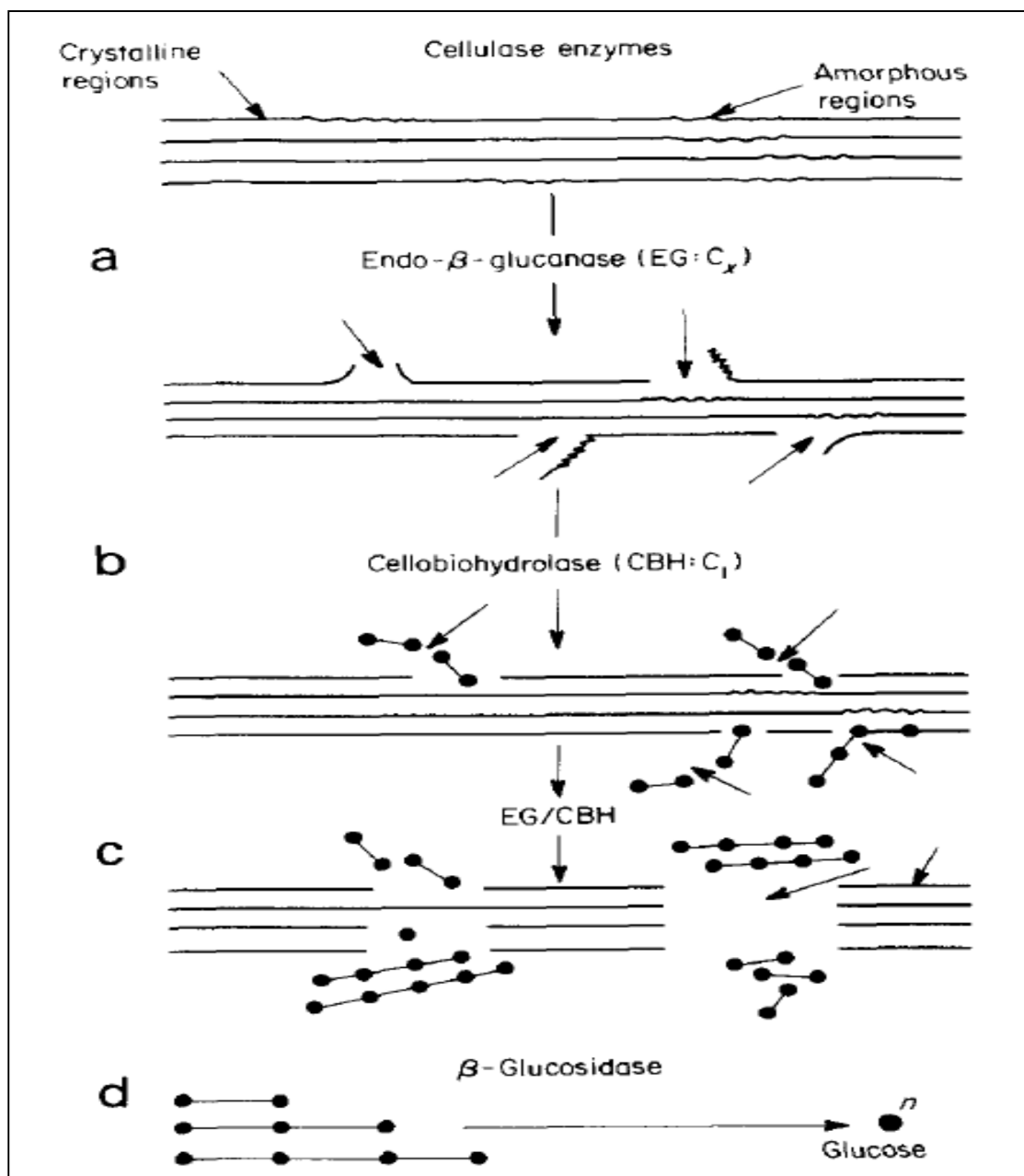


Figure 5 : Représentation schématique de la synergie entre les enzymes du système cellulase pour l'hydrolyse de la cellulose cristalline (Bisaria et Ghose, 1981)

1.2.4. Applications industrielles

Les domaines d'application des cellulases sont très nombreux. Cependant, à l'heure actuelle leur utilisation industrielle se limite à :

a) Industrie du bioéthanol

Actuellement, l'application la plus populaire à l'étude est la saccharification enzymatique par les cellulases, des coproduits lignocellulosiques (ex. la bagasse, la paille de céréale...etc.). Le

résultat de l'hydrolyse étant des sucres fermentescibles (pentoses et hexoses) utilisés par différents microorganismes, comme substrat de fermentation, pour la production de biocarburants de substitution (Schäfer et al., 2007).

Cette voie d'hydrolyse est plus intéressante du point de vue économique et écologique, du moment où elle est réalisée dans des conditions douces (pH 4-6 et température 45-50°C) évitant les problèmes de corrosion rencontrés lors de l'hydrolyse acide ou alcaline et le rejet d'effluents polluants (Karmakar et Rey, 2011).

Pour réduire le coût d'hydrolyse enzymatique dans la production d'éthanol-carburant à partir de biomasse L.C, deux aspects sont largement abordés: le développement d'un système de catalyse plus efficace et d'une stratégie pour la récupération et le recyclage des enzymes (Kuhad et al., 2011).

b) Alimentation animale

L'utilisation des cellulases dans l'alimentation animale a contribué d'une manière significative à améliorer les performances des animaux, notamment les rendements en lait et viande (Karmakar et Rey, 2011).

Le prétraitement de l'ensilage agricole et des céréales fourragères avec les cellulases, améliore leur digestibilité par l'hydrolyse partielle qui diminue le degré de cristallinité des microfibrilles de cellulose. D'autres applications consistent en un supplément direct de cellulases (le plus souvent en présence d'hémicellulases et de pectinases) dans la ration alimentaire pour hydrolyser in vivo des polysaccharides pariétaux du fourrage et aboutir à des molécules plus facilement métabolisées par l'animal (Kuhad et al., 2011).

c) Industrie alimentaire

Les cellulases présentent un large potentiel d'application dans le domaine de la technologie alimentaire. En effet le rendement d'extraction des jus de fruit est nettement amélioré par l'application d'une mixture d'enzyme (pectinase, cellulase, xylanase) dont le rôle est de solubiliser la paroi cellulaire qui emprisonne la phase liquide du fruit (Karmakar et Rey 2011).

D'autres applications des complexes enzymatiques de macération visent à améliorer les qualités organoleptiques des jus de fruits où l'occurrence de la texture et l'arôme.

Récemment les cellulases d'*Aspergillus aculeatus* ont été utilisées dans une préparation enzymatique en présence des pectinases pour améliorer l'extraction de l'huile d'olive, les enzymes provoquent la désintégration de la membrane des fruits d'olive (Kuhad et al., 2011).

D'autres applications courantes des cellulases sont résumées dans le **tableau II**.

Tableau II : Applications courantes des cellulases (Schäfer et al., 2007 ; Kuhad et al., 2011 ; Karmakar et Rey, 2011)

Domaine	Application
Agriculture	<ul style="list-style-type: none"> • Lutte biologique contre les champignons phytopathogène par dégradation de leur paroi cellulaire (ex. la β-1,3-Glucanase de <i>T. harzyanum</i> inhibe la germination des spores de <i>Botrytis cinerea</i>). • Amélioration de la germination des semences. • Préparation de protoplastes par solubilisation de la paroi de la cellule végétale. • Amélioration de la fertilité des sols en accélérant la décomposition de la fraction cellulosique des biofertilisants.
Fermentation	<ul style="list-style-type: none"> • Les cellulases de macération augmentent le rendement d'extraction du jus de raisin par solubilisation de la pellicule du fruit. • Libération des arômes et colorants naturels. • Clarification des moûts. • Diminution de la viscosité du mout ainsi facilité la filtration.
Textile	<ul style="list-style-type: none"> • Elimination de l'excès des teintures artificielles sur les tissus. • Restauration de la brillance des couleurs. • Recyclage des vêtements usés par déboulochage du coton.
Papeterie	<ul style="list-style-type: none"> • Le séchage de la pâte à papier par amélioration du drainage en éliminant la phase colloïdale à la surface des fibres, diminue le coût du séchage thermomécanique. • Le désencrage de la pâte à papier au cours du recyclage, évite les effluents polluants des traitements acides et alcalins.

2.1. Les substrats lignocellulosiques

2.1.1. Ressources en biomasse lignocellulosique

La production mondiale annuelle de biomasse est de 172 milliards de tonnes en matière sèche, soit 55900 millions de tonnes équivalent pétrole (1 TEP= 42 GJ, correspond environ au pouvoir calorifique d'une tonne de pétrole). Cette biomasse présente un intérêt important puisque elle permet la fixation du CO₂ atmosphérique à effet de serre (*International Energy Agency*, dans **Didderen et al., 2008**).

Les déchets ligno-cellulosiques sont produits en grandes quantités par les différents secteurs comme la foresterie, la papeterie, l'agriculture et l'agroalimentaire, en plus de divers déchets ménagers, et les déchets d'origine animale (**Tableau N° III**). L'accumulation de grandes quantités de cette biomasse dans la nature constitue une source de pollution organique qui nuit à l'environnement (**Howard et al., 2003**).

Selon **Knoll (2006)** cité par **Didderen et al., (2008)**, la biomasse lignocellulosique peut être répartie en 2 grandes catégories :

a) La biomasse sèche

Comprend le bois et ses sous produits mais également les sous produits de l'industrie papetière et les déchets ménagers.

➤ *Produits et co-produits forestiers*

Dans l'industrie forestière, et plus particulièrement au sein des scieries, de nombreux co-produits (écorces, sciures et copeaux) sont générés en quantités importantes. La plupart sont utilisés au niveau des industries de trituration pour la production de pâte à papier et de panneaux de bois ou comme source énergétique pour le chauffage (**Benabdallah et al., 1994** dans **Didderen et al., 2008**).

➤ *Sous produits de l'industrie papetière*

Les rognures de papier et le papier non conforme constituent une source de biomasse non négligeable dont la valorisation peut être intéressante du moment où elle ne nécessite pas de traitements spéciaux.

➤ *Déchets urbains*

Ils sont très variés, dans le cadre de la valorisation biologique, seuls les composés de type lignocellulose seront envisagés à savoir les journaux, le papier carton et les déchets ménagers compostables.

b) La biomasse humide

Regroupe les coproduits des industries agroalimentaires et les déchets d'origine agricole. Les principaux coproduits sont la paille des céréales, rafles et épis de maïs (**Figure N° 6**), balles de riz et d'avoine, son de blé et de riz, bagasse de canne à sucre, bagasse de manioc, différents tourteaux des graines et fruits oléagineux (tourteau de soja, d'arachide, de Coprah), pulpe de fruit, etc.... (**Mussatto et al., 2012**).



Figure 6 : Importantes quantités de déchets agroalimentaires (épis de maïs) -Chine.

D'autres produits peuvent être issus de l'activité agricole, notamment des élevages (litières animales). En effet environ 50% des coproduits agricoles ne sont pas utilisés dans le monde, ils constituent une source non négligeable de biomasse lignocellulosique (**Sanchez, 2009**).

Tableau III : Composition chimique et production mondiale des principaux déchets L.C communément utilisé en FMS pour la production de cellulases.

(Barreveld, 1993 ; Howard *et al.*, 2003 ; Sanchez, 2009 ; Dashtban *et al.*, 2009)

Résidus L.C	Composition					Production mondiale (tonne/an)
	Cellulose	Hémicellulose	Lignine	Matière azoté	Matière grasse	
Bagasse de canne sucre	32-44	27-32	19-24	/	/	317 – 380.10 ⁶ (2005)
Paille de blé	29-35	26-32	16-21	/	/	154 -185 .10 ⁶ (2006)
Paille d'orge	31-34	24-29	14-15	/	/	35 – 42 .10 ⁶ (2006)
Paille de riz	31	24	18	/	/	157 - 188 .10 ⁶ (2005)
Résidus de banane	13,2	14,8	14	/	/	13 - 15 .10 ⁶ (2007)
Rafle de maïs	45	35	15	/	/	159 – 191.10 ⁶ (2005)
Coque d'arachide	45-55	25	28-30	6	2,2	9,5. 10 ⁶ (2011)
Noyaux de datte	42	17,5	11	5,5-7,3	7	938 .10 ³ (2011)
Pulpe de café	40-55	25-40	18-30	/	/	/
Papier journal	35	46,3	18,8	/	/	/

2.1.2. Valorisation de la biomasse L.C.

Certains co-produits peuvent être utilisés comme complément en alimentation animale, la fertilisation des sols et la production d'énergie par combustion. Toutefois, leur valorisation pourrait être améliorée par de nouveaux procédés permettant une exploitation plus approfondie de l'énergie potentielle que représente cette biomasse cellulosique. Ceux-ci nécessitent la disponibilité des sucres simples obtenus par hydrolyse chimique ou enzymatique de la cellulose. Les cellulases capables de réaliser cette hydrolyse, peuvent être obtenues par la croissance de microorganismes sélectionnés, sur les substrats L.C (**Roussos et Hannibal, 1984 ; Howard *et al.*, 2003**).

L'utilisation du jus de canne à sucre et d'amidon de maïs comme principaux substrats pour la production industrielle des carburants de substitution de première génération comme l'éthanol a causé des problèmes de famine dans le monde (**Dashtban *et al.*, 2009**). A ce titre, la bioconversion de la cellulose offre une alternative intéressante pour fournir des carburants de substitution de deuxième génération, des protéines microbiennes ou des métabolites à haute valeur ajoutée tels que les enzymes et les antibiotiques. Cependant, la rentabilité économique de toutes ces transformations biologiques est étroitement liée à la production de cellulases

ainsi que les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose (Roussos, 1987).

2.1.3. Choix des substrats solides pour la fermentation

Dans notre étude de FMS pour la production des cellulases, nous avons visé la valorisation de deux coproduits L.C de l'industrie agro alimentaire, en l'occurrence la coque d'arachide et le noyau de datte. En Algérie, des quantités importantes de ces deux types de déchets sont générées annuellement au niveau local notamment dans la région sud du pays ou sont concentrées la plupart des cultures et des unités de transformation.

a) Noyaux de dattes

Les noyaux de dattes (**Figure N° 7**) sont considérés comme déchets dans différents processus de transformation des fruits de dattes (dattes dénoyautées, sirop, confitures) (Habibi Najafi, 2011).

Selon les statistiques de l'organisation mondiale de l'agriculture et de l'alimentation (FAOSTAT, 2011), la production mondiale de datte en 2011 est estimée à 7,5 millions de tonnes générant approximativement 938 milles tonnes de noyaux. L'Algérie produit près de 600 000 tonnes de dattes par an (ONS 2009) dont 45 000 tonnes sont des dattes molles destinées surtout à la transformation industrielle en pate de datte, en vinaigre et jus de datte.

Le noyau constitue entre 6 et 12% du poids total du fruit, par conséquent, il en ressort une quantité importante de noyaux comme déchet.

Généralement, les noyaux broyés à petite échelle sont utilisés traditionnellement comme supplément en alimentation de bétail (Boudechiche et al., 2009). En effet, les noyaux riches en cellulose (**Tableau N° 3**) offrent de nouvelles voies d'exploitation et de valorisation pour la production de substances à haute valeur ajoutée en l'occurrence les cellulases.



Figure 7: Noyaux de datte

b) Coque d'arachide

L'arachide est une des principales ressources agricoles de plusieurs pays en voie de développement. Après le décortiquage, des millions de tonnes (38 500 000 tonnes/ans) de ce produit agricole en provenance principalement d'Afrique et de Chine sont annuellement expédiées en Europe. En Algérie la production est concentrée principalement dans la région Sud-Est du pays avec une production annuelle dépassant les 3400 tonnes en 2011 générant approximativement 885 tonnes de coques (**FAOSTAT 2011**).

Comme sous produit de cette agriculture, les coques d'arachides (**Figure N° 8**) constituent 20 à 32 % du poids des gousses. Elles sont généralement brûlées comme combustible et leurs cendres sont retournés à la terre comme fertilisant. Les coques sont aussi écrasées en une farine qui utilisée en grande partie par les fabriques d'acier comme cire à acier (**Boureima, 1981**).

Une autre voie de valorisation consiste en leur utilisation dans la production de bois composite (**Guler et Buyuksari, 2011**)

Comme le montre sa composition chimique (**Tableau N° 3**), la coque d'arachide est un produit essentiellement cellulosique, par conséquent, son utilisation comme substrat solide pour la production de cellulases par voie fermentaire semble être une voie de valorisation très prometteuse (**Vyas et al., 2005 ; InuwaJa'afaru et EzekielFagade, 2007**)



Figure 8: Coque d'arachide broyée

2.1.4. Composition du complexe lignocellulosique

La lignocellulose est le nom collectif pour les trois principales composantes de la paroi cellulaire végétale, à savoir la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Dans la plante, les chaînes linéaires hautement ordonnées de cellulose contribuent à la résistance physique, tandis que la lignine hydrophobe amorphe est responsable de la résistance aux produits chimiques, en particulier la protection contre l'eau. L'hémicellulose assure la liaison entre la cellulose et la lignine (**Figure N° 9**). Les polysides structuraux constituent la forme essentielle de stockage de l'énergie des végétaux. Ils constituent de 50-70% de la matière sèche des parois (**Reguant et Rinaudo, 1999**).

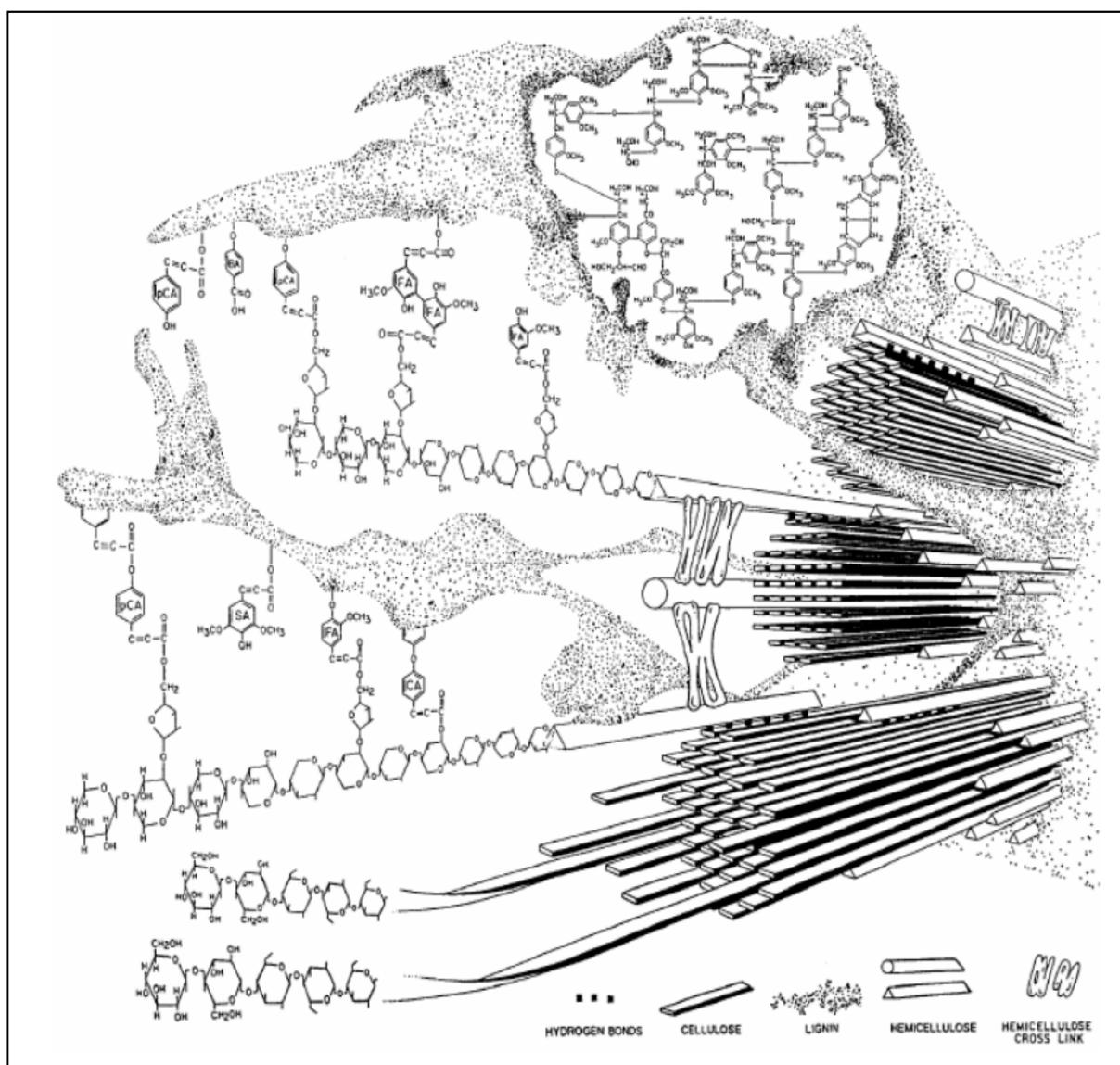


Figure 9: Modèle de la structure moléculaire des principaux composants du matériel Lignocellulosique proposé par Bidlak *et al.*, (1992) cité dans Martins *et al.*, (2011).

a) La cellulose

La cellulose est le polysaccharide structural de base des parois des cellules végétales, il peut représenter jusqu'à 50 % de la masse totale. Elle est la molécule organique la plus abondante sur terre.

C'est un homopolysaccharide composé de longues chaînes de *B* (1,4)-D glucose, basé sur la répétition d'unités de cellobiose. Les chaînes de celluloses sont fortement liées entre elles via des liaisons hydrogène établies entre les nombreux groupements hydroxyles, pour former une structure cristalline appelée la fibre élémentaire (≈ 40 chaînes). L'agrégation de plusieurs fibres forme ce qu'on appelle les microfibrilles de cellulose avec des régions cristallines hautement ordonnées et des régions amorphes (**Figure N°10,11**) (Wiley et Atalla, 1987 ; Perez et Samain, 2010).

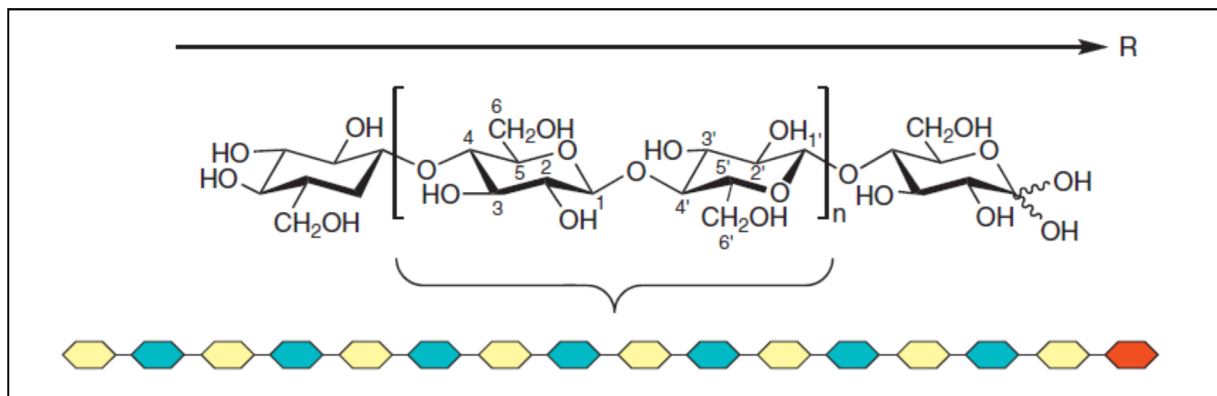


Figure 10 : Représentation moléculaire de la chaîne de cellulose (Perez et Samain, 2010).

le n indique le nombre d'unités cellobiose (β -1,4) répétées.
le R indique l'extrémité réductrice de la chaîne.

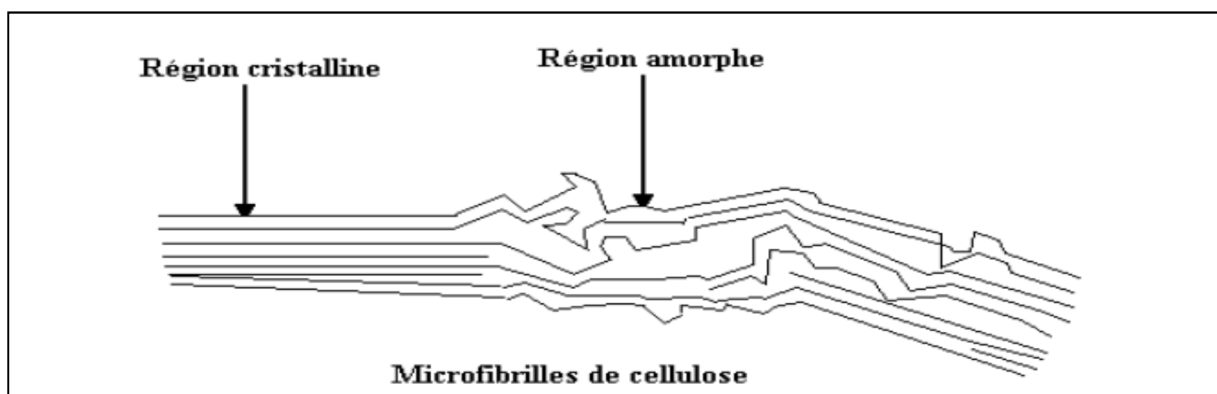
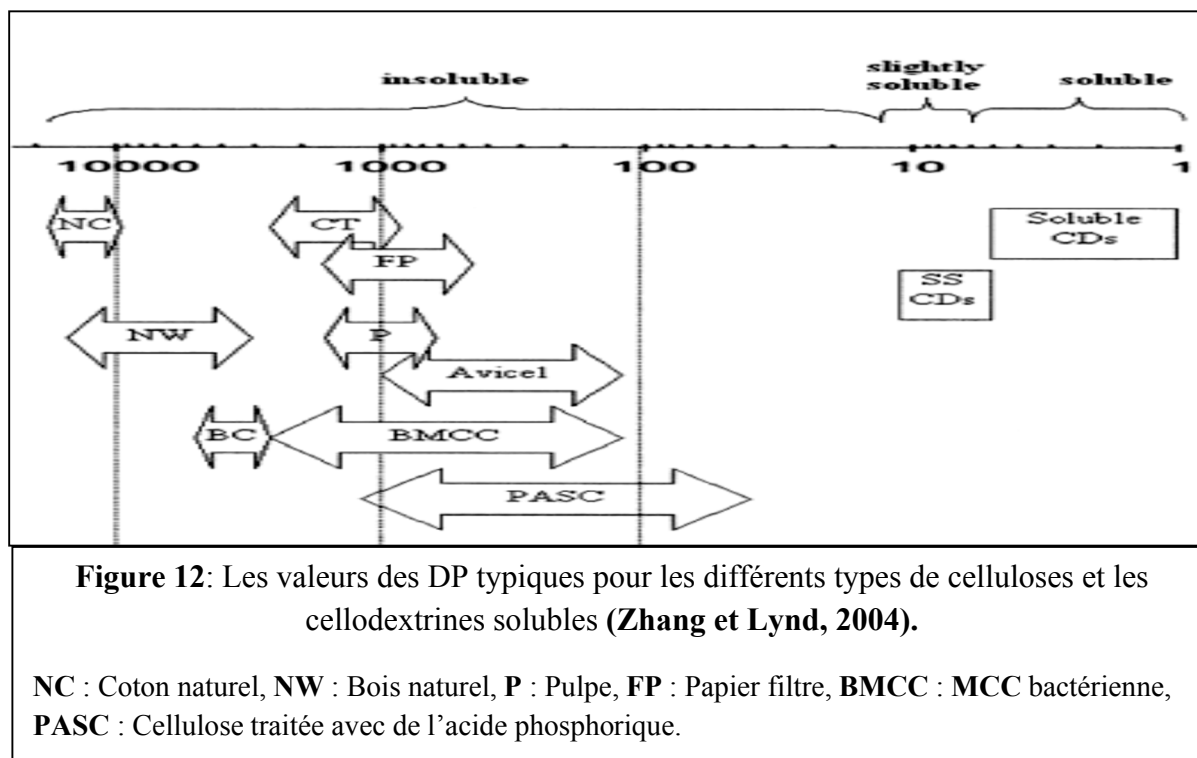


Figure 11 : Représentation schématique d'une microfibrille de cellulose montrant les régions cristallines et amorphes (Pouzet, 2010).

Le degré de polymérisation (DP) des substrats cellulosiques reflète l'abondance relative des liaisons β -glucosidiques terminales et internes. La Solubilité de la cellulose diminue considérablement avec l'augmentation de DP en raison de liaisons hydrogène intermoléculaires. Le DP de substrats cellulosiques varie considérablement, de <100 à > 15 000, en fonction de l'origine du substrat et de la technique de préparation, comme indiqué sur la **figure 12**.



La cellulose insoluble dans l'eau et les autres solvants usuels possède une grande inertie chimique. Afin de diversifier ses utilisations, la cellulose doit être convertie en ses dérivés, qui sont des produits plus ou moins solubles et dont certains sont utilisés dans l'alimentation. Il existe deux grandes familles de dérivés de la cellulose (Reguant et Rinaudo, 1999) :

- *Les éthers de cellulose*
- *Les esters de cellulose*

Les éthers formés par réaction de monochloroacétate en milieu sodique sont les carboxyméthylcelluloses (CMC) qui possèdent une très bonne solubilité dans l'eau. On les utilise comme additifs en industries alimentaires et pour le dosage des activités EGs (Perez et Samain, 2010).

b) Les hémicelluloses

Les polysaccharides non cellulosiques sont souvent appelés hémicelluloses. Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides constitués de divers monosaccharides incluant principalement des pentoses, des hexoses, des acides uroniques et des désoxy-hexoses (**Bisaria et Ghose, 1981**). Les hémicelluloses présentent un axe caractéristique linéaire qui est généralement formé d'un seul monomère. Elles portent des chaînes latérales courtes et flexibles formées de sucres simples ou de petites séquences de sucres (**Figure N°13**). Ces derniers sont liés entre eux par différents types de liaisons : β (1-4) ; β (1-3) ; α (1-4) ; α (1-3). Le nombre des ramifications, leur répartition le long de l'axe et la longueur des chaînes latérales conduisent à une grande variété de macromolécules, aux propriétés différentes (**Vincken et al., 1995**).

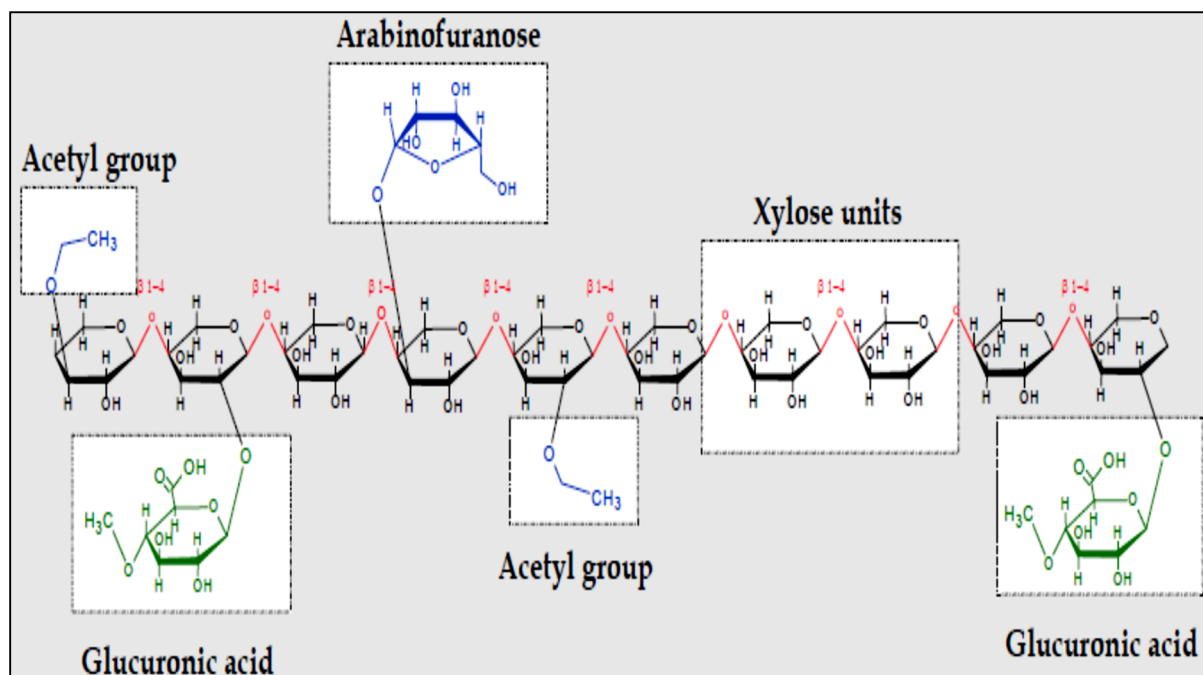


Figure 13 : Structure hypothétique d'un hémicellulose (**Mussatto et al., 2012**)

c) La lignine

La lignine est une macromolécule extrêmement hétérogène composée de polymères aromatiques (**Figure N° 14**). Elle représente, après la cellulose, le polymère naturel le plus abondant sur terre et représente 30% de la MS de la paroi végétale (**Leonowicz et al., 1999**). Les lignines sont des polymères hautement condensés, formés par la déshydrogénation et la polymérisation de

trois alcools à noyaux phénylpropane C6-C3 : les alcools *trans-p-coumarylique*, *trans-coniférylique* et *trans-sinapylique*.

Elle s'incruste dans tout l'espace disponible dans les parois en association étroite avec les différents polysaccharides et confère aux parois végétales des propriétés d'imperméabilité et de résistance aux attaques microbiennes. La lignine constitue le principal obstacle à la disponibilité des glucides pour les microorganismes (Kögel-Knabner, 2002).

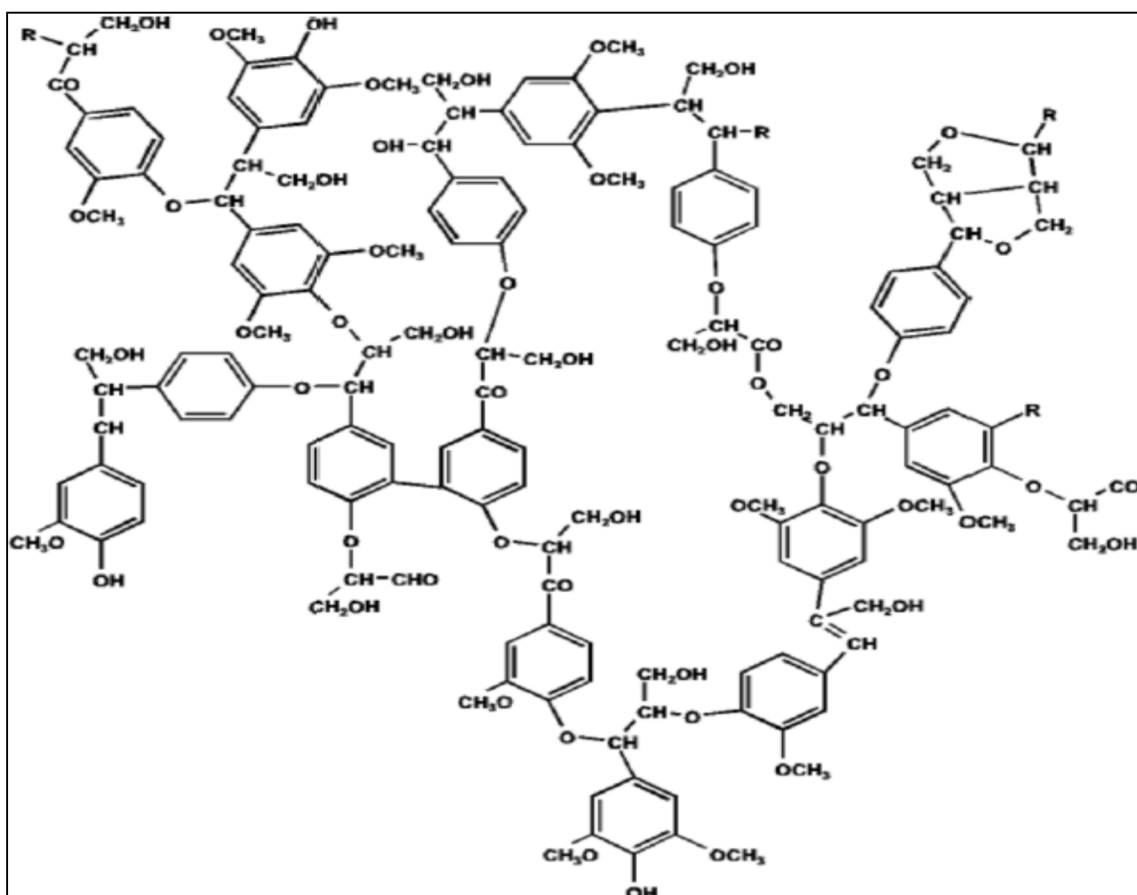


Figure 14 : Schéma structural de la lignine proposé par Adler (1977) dans Mussatto et al., (2012)

2.2. La fermentation de substrats solides (FMS)

2.2.1. Définition et Généralités

La fermentation solide, fermentation de milieu solide (FMS), fermentation humide, culture solide et *solid-state fermentation* ou *solid substrat fermentation (SSF)* en anglais ; est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides

en l'absence d'eau libre (**Durand, 2003 ; Gervais et al., 2003**). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases :

- Une matrice solide avec du matériel naturel hétérogène contenant des polymères complexes comme l'amidon, la lignocellulose, la pectine.
- Une phase liquide, eau ou solution nutritive.
- Une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci.

La transformation microbienne aérobie du matériel solide est définie avec les propriétés suivantes (**Raimbault, 1998**) :

- Une matrice poreuse et solide biodégradable ou non avec une large surface de contact par unité de volume.
- La matrice doit pouvoir absorber de l'eau avec un a_w élevée dans l'interface solide/gaz pour permettre une bonne croissance.
- L'air doit pouvoir circuler librement sous basse pression.
- L'interface solide/gaz doit être un milieu favorable pour la croissance rapide des microorganismes.
- La matrice doit être exempte d'inhibiteurs d'activité microbienne et doit contenir ou au moins capable d'absorber des sources de carbone, d'azote et des sels minéraux.

La FMS paraît avoir théoriquement plusieurs avantages en comparaison avec la fermentation liquide (**Tableau N° IV**) pour la production industrielle des produits à haute valeur ajoutée. Elle est moins coûteuse et plus écologique, une comparaison entre les deux types de fermentation est donnée dans le **tableau V**.

Tableau IV : Principaux avantages et inconvénients de la FMS (**Raimbault et al., 2008 ; Durand, 1983 ; Assamoi et al., 2008 ; Oriol, 1987 ; Mienda et al., 2011**).

Avantages	Inconvénients
<p>-La simplicité de cette technologie et les faibles couts d'investissement :</p> <ul style="list-style-type: none"> • l'autoclavage et remplacé par un simple traitement à la vapeur. • L'aération peut être assurée passivement (sans agitation) par passage de l'air à travers les espaces du substrat granuleux. <p>-La composition des milieux de culture est simple étant donné qu'ils procurent les nutriments nécessaires pour la croissance des microorganismes, souvent il suffit d'ajouter de l'eau au substrat lignocellulosique.</p> <p>-L'absence de phase liquide et la faible humidité du substrat permettent :</p> <ul style="list-style-type: none"> • d'éviter la production de mousses • de réduire le volume des fermenteurs • d'éviter les effluents pollués à traiter • d'éviter les contaminations bactériennes (les bactéries réclament des taux d'humidité élevés pour survivre). <p>-La nature solide des substrats simule le milieu naturel des moisissures d'où une meilleure croissance.</p>	<p>-Les microorganismes utilisés sont limités, seuls les microorganismes se développant bien aux basses humidités peuvent être utilisés.</p> <p>-La nature hétérogène solide des substrats empêche le bon transfert de chaleur, ce problème s'accroît lorsque les quantités de biomasse sont importantes (à large échelle) créant la surchauffe et l'assèchement.</p> <p>-Le mycélium étant inséparable du substrat, l'estimation de la biomasse est délicate.</p> <p>-Il est pratiquement difficile d'assurer une homogénéisation par agitation mécanique. Ce qui complique le suivi direct des paramètres de fermentation tels que le pH, l'humidité et la concentration des nutriments.</p> <p>-Étant donné la forte concentration des métabolites obtenus, des produits inhibiteurs générés par les microorganismes peuvent s'accumuler en concentration élevée dans le milieu de culture.</p> <p>-En absence d'eau libre, les sondes utilisées en fermentation liquide ne sont pas utilisables.</p>

Tableau V: Comparaison entre la fermentation liquide et solide (Raimbault, 1998)

Paramètre	FML	FMS
Substrat	Soluble	Polymères insolubles (Lignocellulose, pectines, amidon)
Eau	Consommation de gros volumes	Faible consommation
Chaleur métabolique	Diffusion facile	Transfert difficile
Aération	Aération active, solubilité limitée de l'O ₂ dans la phase liquide	Aération passive, large surface d'échange Air/substrat
pH	Contrôle facile	Substrat au pouvoir tampon
Contamination	Risque de contamination par des bactéries	Faible a _w , moindre risque de contamination
Consommation d'énergie	Elevée (aération, agitation mécanique)	Faible (condition statique)
Equipement	Gros volumes, cout élevé	Petit volume, faible cout
Effluents, pollution	Gros volumes polluants	Pas d'effluents
Concentration des produits	Faible concentration	Forte concentration

2.2.2. Principaux paramètres

A la différence de la FML ou le contrôle de paramètres de culture et relativement facile à cause de l'homogénéité de la suspension, les caractéristiques de la FMS rendent difficile la maîtrise et le suivi de ces facteurs, d'où la sélection de microorganismes tolérants à de larges variations des conditions de culture (Raimbault, 1998). Les principaux paramètres sont :

a) Humidité et activité de l'eau (a_w)

L'eau est essentielle pour la croissance cellulaire, les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, le transport des éléments nutritifs et des métabolites extracellulaires (Gervais *et al.*, 2003). L'a_w représente la disponibilité d'eau pour la réaction dans le substrat solide, elle varie en fonction du microorganisme (Tableau N° VI). Elle influe de façon directe la germination de l'inoculum et la croissance du mycélium. Un excès d'eau diminue la porosité ainsi que la diffusion de l'air dans la masse. Une réduction de l'a_w prolonge la phase de

latence, diminue le taux de croissance spécifique, ce qui aboutit à une faible production de biomasse.

L'eau présente dans le système FMS est soit sous forme complexe avec la matrice soit adsorbée à la surface des particules, l'eau libre apparaît une fois que le système est saturé. Le taux de saturation varie en fonction des substrats (12 et 90 %, soit 0,65 et 0,98 a_w) (**Raimbault, 1998**).

Les variations de la teneur en eau sont dues à l'évaporation causée par la chaleur métabolique, l'hydrolyse du substrat et à la production d'eau métabolique (phénomène de respiration).

Les valeurs optimales d'activité de l'eau ne sont pas forcément les mêmes lors de la phase végétative et lors de la phase reproductive. Chez *Trichoderma viride* et *Penicillium roquefortii*, les optima des valeurs de l' a_w pour la sporulation sont plus faibles que ceux de la croissance (**Duchiron et Copinet, 2011**). C'est pourquoi il est important de pouvoir maintenir l'activité de l'eau à une valeur optimale pour rester le plus longtemps possible dans une phase optimale de croissance et de production. Selon **Duchiron et Copinet (2011)** la teneur optimale pour les champignons filamenteux est comprise entre 40 et 70 %. Cependant, selon la capacité de rétention en eau du substrat utilisé, la teneur optimale en eau est très fluctuante. Selon **Bansal et al., (2012)** l'optimum d'H% pour les souches du genre *Trichoderma* sur substrat lignocellulosique se situe entre 65% et 70%.

La teneur en eau est habituellement déterminée après échantillonnage par les mesures de la matière sèche. Cependant, elle ne différencie pas l'eau disponible pour les activités microbiennes (a_w) de celle liée au substrat indisponible aux microorganismes (**Assamoi et al., 2009**).

À l'échelle du laboratoire, l'activité de l'eau est contrôlée en plaçant le bioréacteur dans une chambre de culture dont l'humidité de l'atmosphère est régulée. À grande échelle, le bioréacteur est généralement aéré avec de l'air saturé en eau (**Duchiron et Copinet, 2011**).

Tableau VI : Activité de l'eau des microorganismes (**Duchiron et Copinet, 2011**)

Microorganismes	a_w
Majorité des bactéries	0,9 à 0,98
Majorité des levures	0,85 à 0,95
Majorité des moisissures	0,75 à 0,85
Bactéries halophiles	0,7 à 0,75
Moisissures xérophiles	0,61
Levures osmophiles	0,6

b) Température et transfert de chaleur

L'équation globale Stœchiométrique de la respiration est fortement exothermique. La faible conductibilité thermique des substrats solides utilisés et leur faible teneur en eau réduisent le transfert de chaleur, qui lui-même dépend de la taille des particules de l'épaisseur de la couche solide (**Raimbault, 1998**). Une élévation de la température dans la masse fermentable peut atteindre des températures élevée (80°C). Ce problème de transfert de chaleur accroît considérablement à large échelle causant un assèchement de la culture par conséquent la baisse de disponibilité des nutriments. Cela peut entraîner aussi une dégradation des produits sécrétés dans le milieu et stopper la phase végétative de croissance, au profit de la phase reproductive au cours de laquelle se forment des conidies (**Duchiron et Copinet, 2011**).

Au laboratoire, la température du milieu de culture est généralement régulée par un bain d'eau thermostaté ou par une simple régulation de la température de la pièce où se trouvent les cultures. À l'échelle industrielle, elle est généralement régulée par l'injection d'air forcé chargé d'humidité, ou par l'agitation mécanique (**Krishna, 2005**). Lorsque l'on travaille avec une fine couche de substrat dans un milieu de culture solide, la chaleur se disperse plus facilement dans l'air (**Duchiron et Copinet, 2011**).

La température de production des cellulases varie entre 25°C et 30°C en fonction des souches fongiques (**Gautam et al., 2011**). Pour les espèces du genre *Trichoderma* qui sont des moisissures mésophiles, un optimum situé entre 29-30°C pour la production de cellulases est rapporté dans plusieurs travaux (**Roussos et Raimbault, 1982 ; Latifian et al., 2007**)

Une température plus élevée n'affecte pas significativement la croissance mycélienne mais inhibe la germination sporale (**Raimbault et Alazard, 1980**).

c) Le contrôle du pH

Le pH d'une culture peut changer en réponse aux activités métaboliques. La raison la plus évidente est la sécrétion des acides organiques tels que l'acide citrique, acétique ou lactique, qui provoquent la diminution du pH ainsi que la consommation des sels d'ammonium. Par ailleurs, la consommation des acides organiques, l'hydrolyse de l'urée et des protéines se traduisent par une alcalinisation (**Krishna 2005**).

Le pH acide augmente le temps de latence de la plupart des bactéries susceptibles de se développer, alors qu'il favorise la croissance des moisissures. De ce fait, celles-ci ont une probabilité plus élevée de prendre rapidement le dessus sur d'éventuelles contaminations bactériennes (**Duchiron et Copinet, 2011**)

La cinétique de la variation du pH dépend fortement du micro-organisme et de la composition du substrat due à l'effet tampon des matériaux lignocellulosiques. Avec *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, et *Rhizopus sp.* le pH peut chuter très rapidement au dessous de 3,0. Pour *Trichoderma sp.*, *Sporotrichum sp.*, *Pleurotus sp.* le pH est plus stable entre 4 et 5. **(Raimbault,1998).**

Un certain degré de contrôle du pH peut être obtenu en ajoutant dans le milieu de culture des solutions alcalines. L'emploi d'urée comme source d'azote plutôt que les sels d'ammonium est une des voies les plus efficaces du fait que l'hydrolyse de l'urée libère l'ammoniac, qui empêche l'acidification rapide **(Raimbault et Alazard, 1980).**

Un ajustement efficace du pH, lors d'une culture pilote de *Trichoderma viride* sur pulpe de betterave sucrière a été obtenu par pulvérisation de solutions d'urée. L'activité uréase du micro-organisme provoque une augmentation de pH par production d'ammoniac **(Durand et Chereau, 1988).**

En fermentation solide, il n'existe pas de capteurs permettant de mesurer le pH du milieu durant la fermentation à cause de l'absence d'eau libre. Certains auteurs utilisent une électrode à pH standard sur des extraits aqueux provenant des prélèvements réguliers ou après suspension de l'échantillon dans de l'eau distillée **(Roussos et al., 1994).**

Roussos (1985) a rapporté sur une souche de *Trichoderma*, que la production de cellulases est beaucoup plus élevée lorsque le pH initial est légèrement acide. **Gautam et al. (2011) et Bansal et al., (2011)** rapportent que la plus grande production de cellulases avec *A. niger* et *Trichoderma sp.* est à pH 6.

d) L'aération

L'aération des cultures solides joue quatre fonctions, à savoir **(Raimbault, 1998)** :

- Le maintien des conditions d'aérobies.
- L'élimination du dioxyde de carbone.
- La régulation de la température de culture par transfert de chaleur.
- La régulation de la teneur en eau.

En fermentation liquide, l'aération est souvent le facteur limitant de la croissance microbienne à cause de la faible solubilité de l'oxygène dans l'eau, en fermentation solide elle est plus facile à cause d'une part, de la diffusion rapide de l'oxygène dans le film humide entourant les particules de substrat, et d'autre part à cause des grandes surfaces de contact entre la phase gazeuse, le substrat et les mycelia aériens **(Assamoi et al., 2009 ; Raimbault, 1998).**

2.2.3. Description des différentes étapes du processus

La préparation d'un substrat poreux avec un pH et une humidité initiale adéquate est nécessaire pour assurer une bonne aération et une croissance rapide du mycélium. Le pH acide, la faible teneur en eau et la charge importante de l'inoculum sporal favorise cette croissance (**Raimbault et Alazard, 1980**).

a) La préparation du substrat carboné

La Préparation ou le prétraitement représente une étape importante pour convertir le substrat lignocellulosique brut en une forme appropriée pour la fermentation, sinon la fermentation

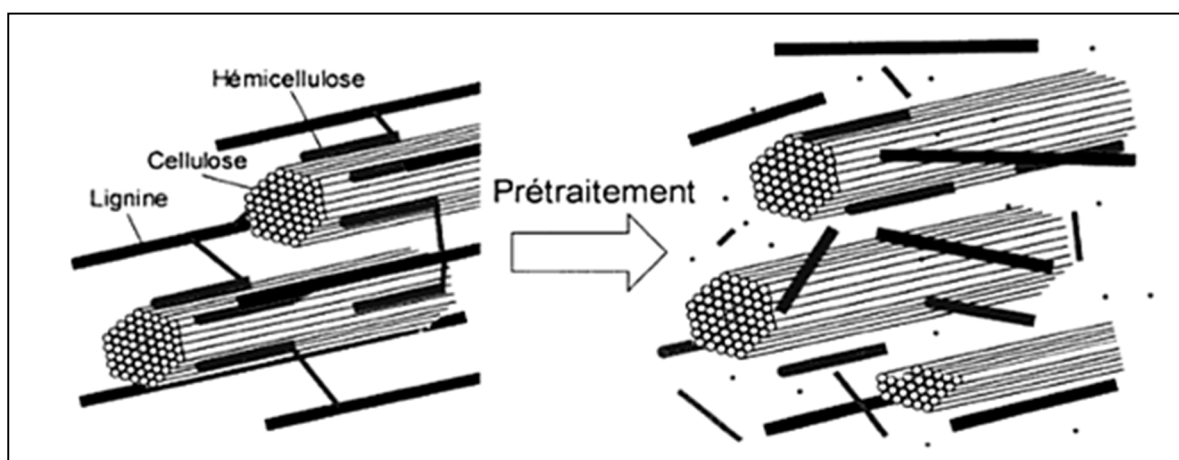


Figure 15 : Impact du prétraitement sur la matière lignocellulosique (**Didderen et al., 2008**)

sera très lente avec un faible rendement (**Didderen et al., 2008**) (**Figure N°15**).

Certains traitements réduisent le degré de cristallisation de la cellulose, d'autre rendent la cellulose plus accessible aux enzymes (**Mosier et al., 2005**).

Il existe différents types de traitements :

- **Physique** : en réduisant la taille par broyage, râpage ou hachage. La Cuisson, autoclavage ou traitement à la vapeur visent à ouvrir la structure compacte de la L.C (**Assamoi et al., 2009**).

La taille des particules constitue un facteur critique dans la fermentation solide. Le broyage des substrats à des particules d'une taille comprise entre 5–10 mm est un bon moyen d'améliorer l'accessibilité de la cellulose aux enzymes cellulolytiques ainsi qu'une bonne aération. **Vidaud et al., (1982)** rapporte que l'accessibilité aux enzymes cellulolytiques est nettement améliorée par le broyage.

- **Chimique** : par la voie des alcalis, acides, oxydants et solvants (**Assamoi et al., 2009**). Les méthodes utilisant les acides ciblent les hémicelluloses par contre les traitements alcalins ciblent la lignine. Le prétraitement acide semble être favorable du moment où les enzymes fongiques sont actives à pH relativement bas.
- **Enzymatique** : hydrolyse des polymères (ex. Lignine et hémicelluloses) afin de favoriser une grande accessibilité des autres constituants aux microorganismes.

b) Stérilisation

La mise en place d'un procédé de fermentation nécessite la stérilisation du milieu de culture avant l'apport du micro-organisme choisi. Néanmoins, il existe de nombreux cas en FMS où l'élimination de la flore autochtone n'est pas nécessaire. Lorsque le champignon filamenteux a suffisamment colonisé le substrat, il n'est plus nécessaire de travailler en condition stérile (**Duchiron et Copinet, 2011**).

c) L'inoculation du milieu de culture

L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores. Celles-ci restent viables plus longtemps que du mycélium. La quantité optimale de spores à inoculer diffère selon les cas. Un excès de spores peut parfois inhiber la germination. Des inocula spores + mycélium + substrat de production peuvent être utilisés également (**Assamoi et al., 2009**).

Plusieurs travaux réalisés sur des espèces du genre *Trichoderma* (**Roussos et Rimbault, 1982 ; Rimbault et Alazard, 1980**) rapportent que la quantité d'inoculum qui permet la germination de la totalité des conidiospores et pour laquelle la production de cellulases est optimale, se situe aux environs de **3** et **5.10⁷** spores/g de substrat poids sec. Par contre une forte concentration en spores limite leur croissance (un grand nombre de spores ne germe pas) de même si le taux d'inoculum est faible, la croissance de la moisissure sera lente et le temps de fermentation sera prolongé.

2.2.4. Application de la FMS pour la production d'enzymes sur substrat L.C

De manière générale, les applications de la fermentation solide concernent l'alimentation humaine (fromages, production de champignons comestibles, koji japonais) et l'alimentation animale par l'ensilage et l'enrichissement en protéines. D'autres applications concernent la production des métabolites spécifiques à valeur ajoutée tels, l'éthanol, les antibiotiques, acides organiques, arômes, etc...) (**Couto et Sanroman, 2006 ; Assamoi et al., 2009**). Dans

les dernières années, de nouvelles applications de la FMS vers des aspects écologiques ont été développés dont la bioremédiation et la détoxification des résidus agro-industriels (**Mienda et al., 2011**).

La FMS détient un énorme potentiel pour la production d'enzymes. Ce système offre de nombreux avantages par rapport à la fermentation submergée (FML) tel que le rendement et la concentration relativement élevés des produits et le faible niveau de répression catabolique. (**Mussatto et al., 2012**). De plus, Il peut être d'un intérêt particulier dans ces processus, où le produit brut fermenté peut être utilisé directement comme source d'enzyme, ce qui réduit de façon significative les coûts d'extraction et de récupération.

En plus des applications classiques qui occupent une grosse part du marché mondial d'enzyme, en l'occurrence l'industrie alimentaire, l'alimentation du bétail, l'industrie de la papeterie et le textile, les enzymes jouent un rôle important dans la bioremédiation et la production des biocarburants de substitution (**Mienda et al., 2011**).

Plusieurs travaux rapportent la production d'une grande variété d'enzymes à l'échelle industrielle utilisant différents microorganismes et une multitude de substrats L.C solides. Le **tableau VII** regroupe quelques exemples.

Tableau VII : Principales enzymes produites par fermentation solide sur substrat L.C.
(Pandey et al., 1999 ; Aguilar et al., 2008 ; Graminha et al., 2008 ; Mussatto et al., 2012)

Enzymes	Moisissures	Substrat solide	Références
Cellulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Paille de blé	(Chahal, 1985)
	<i>T. harzianum</i>	Paille et son de blé	(Sivan, 1984)
	<i>Aspergillus niger</i>	Bagasse de canne à sucre	(Sanchez et al., 2009)
	<i>A. ustus</i>	Son de blé, paille de riz	(Mussatto et al., 2012)
	<i>Penicillium citrinum</i>	Balle de riz	(Kuhar et singh 1993)
	<i>Ph. chrysosporium</i>	Tourteau de soja	(Jha et al., 1995)
Xylanases	<i>A. terreus</i>	Bagasse canne à sucre	(Gawande et al., 1999)
	<i>A. niger</i>	Paille de riz	(Gawande et al., 1999)
	<i>Penicillium canescens</i>	Bagasse de canne à sucre	(Bakri, 2003)
	<i>T. viride</i>	Peau de pomme	(Bhalla et al., 1993)
α -Amylases	<i>A. kawachii</i>	Son de blé	(Sudo et al., 1994)
	<i>A. oryzae</i>	Son de riz	(Thenawidjaja et al., 1994)
Pectinases	<i>A. niger</i>	Pulpe de café, bagasse canne à sucre	(Couto et Sanroman, 2006)
Chitinases	<i>P. aculeatum</i>	Son de blé + chitine brute	(Binod, 2005)
Tanases	<i>Aspergillus sp.</i>	Son de blé, son de riz, sciure de bois	(Kumar, 2007 ; Banerjee, 2007)
Phytases	<i>Aspergillus ficuum</i> , <i>A. carbonarius</i>	Son de blé	(Mussatto et al., 2012)
Lipases	<i>A. niger</i>	Son de blé, coque d'arachide	(Mussatto et al., 2012)
Ligninases	<i>Pleurotus sp.</i> <i>Ph. chrysosporium</i>	Bagasse, paille de blé	(Mussatto et al., 2012)
Proteases	<i>Penicillium sp.</i>	Tourteaux de soja	(Mussatto et al., 2012)

1.1. Isolement des moisissures cellulolytiques

1.1.1. Echantillonnage

Pour isoler des champignons producteurs de cellulases, plusieurs prélèvements sont réalisés dans différents sites de la région de Sétif et de Bejaïa (Algérie).

Les sols riches en matière organique, la matière végétale en décomposition et la litière animale sont ciblés. Les prélèvements sont réalisés à l'aide de dispositifs tubulaires métalliques de 6cm de diamètre, préalablement enveloppés dans du papier aluminium et stérilisés au four pasteur à 180°C pendant 30 min.

Les échantillons sont acheminés au laboratoire dans une glacière, puis stockés à 4°C. La durée entre l'échantillonnage et l'isolement varie entre quelques jours à une semaine (**Hart et al., 2002**).

Nous avons collecté 5 lots d'échantillons qui correspondent à 5 sites différents, chaque lot comprend au minimum 2 échantillons de 2 endroits différents sur le même site.

A chaque échantillon nous avons attribué un code en fonction du lieu pour les situer.

Les caractéristiques des échantillons prélevés des régions de Sétif et de Bejaïa sont consignées dans le **tableau VIII**.

Il est intéressant de noter que, l'ensemble des échantillons examinés appartiennent à des écosystèmes riches en matière organique lignocellulosique (litières animales, litières végétales, humus)

Tableau VIII : Informations relatives aux échantillons.

Echantillon	Date du prélèvement	Site du prélèvement	Description
A	07/01/2012	Ferme dans la région d'Ain Arnat, wilaya de Sétif.	Fumier riche en paille épandue sur un champ ensoleillé, la couche superficielle sèche, le mycélium de couleur blanche visible en profondeur.
B	07/01/2012	Oued dans la région d'Ain Abassa, wilaya de Sétif.	Sol humide riche en humus d'une couleur brune noirâtre.

Suite du tableau VIII : Informations relatives aux échantillons.

Echantillon	Date du prélèvement	Site du prélèvement	Description
C	02 /01/2012	Décharge public de Boulimat, wilaya de Bejaïa	Graines de céréales en voie de décomposition, de couleur verdâtre, entourées de mycélium.
D	18/01/2012	Forêt de chêne liège région Souk El Ténine, wilaya de Bejaïa	Litière végétale humide tapissant le sol d'une forêt de chêne liège.
E	10/01/2012	Huilerie dans la région d'Adekkar wilaya de Bejaïa	Grignon d'olive en voie de décomposition, le mycélium de couleur blanche visible.

1.1.2. Isolement sur gélose sélective

a) Milieu d'isolement

C'est un milieu gélosé à pH acide contenant un dérivé soluble de la cellulose. La carboxymethyl cellulose(CMC) en poudre comme seule source de carbone et d'énergie, et susceptible d'induire des cellulases. La composition de ce milieu est donnée en **annexe I**.

Après autoclavage, Le milieu en surfusion est additionné de 60ppm de gentamycine (**Breton, 1990**) dans le but d'inhiber la croissance des bactéries capables de dégrader la cellulose.

b) Méthode d'isolement

Dans cette première étape, nous réalisons directement un isolement sur un milieu sélectif CMC-agar-gentamycine ; ce milieu devrait permettre la croissance uniquement des champignons producteurs des cellulases pouvant dégrader la CMC (**Hart et al., 2002**).

Selon **Herculano et al., (2011)**, l'isolement consiste (**Figure N°16**) :

- 10g de chaque échantillon sont mis en suspension dans 90ml d'eau physiologique stérile, homogénéisés vigoureusement à la main pendant 10 minutes puis laissé décanter. Cette préparation représente la solution mère. Une série de dilutions décimales jusqu'à 10^{-6} est réalisée à partir de la solution mère dans de l'eau physiologique. Les dilutions permettent de diminuer la charge microbienne et d'éviter le chevauchement des colonies.

- 1ml de chaque dilution est transféré dans des boites de Pétri vides et stériles en duplicate pour augmenter les chances d'isoler le maximum d'espèces différentes.
- 12 ml du milieu sélectif en surfusion sont coulés par boite et homogénéisés par mouvement circulaire.
- Une fois le milieu solidifié, les boites de pétri sont incubées à 28°C et observées quotidiennement.

1.2. Purification

La purification est réalisée sur gélose PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) (**annexe I**) à raison de 15 ml par boîte.

Les colonies de moisissures caractérisées par leur aspect filamenteux sont repérées sur le milieu CMC-Agar-Gentamicine qui permet une croissance lente et graduelle. Les colonies d'aspects différents sont purifiées par repiquages successifs sur milieu PDA plus riche. La technique consiste à prendre un implant mycélien de la partie périphérique de la colonie et le déposer au centre de la gélose PDA, puis incubé à 28°C.

Les souches pures sont ensuite nommées et groupées en fonction de leurs sites de prélèvement (**Tableau N° 11**).

1.3. Conservation des isolats

1.3.1. Milieu de conservation

Les isolats sont conservés sur gélose PDA et MEA (gélose à l'extrait de malt) (**Annexe I**) en deux exemplaires.

Beaucoup de mycètes sporogènes survivent pendant plusieurs mois, néanmoins le stockage des mycètes aux températures ambiantes, à 10°C ou plus, sur une longue durée n'est pas recommandé à cause de l'assèchement du milieu gélosé surtout pour les moisissures asporogènes (**Nakasone et al., 2004**).

1.3.2. Technique de conservation

Nous avons opté pour deux techniques de conservation :

a) Stockage sur des agars de pente

C'est la méthode de conservation la plus communément utilisée ; elle consiste à repiquer les isolats purifiés en tube sur gélose inclinée, les cultures sont maintenues pendant 2 semaines à

28°C, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Breton, 1990).

b) Stockage des blocs d'agar dans l'eau

Une méthode simple et peu coûteuse de conservation fongique, les petits blocs d'agar (7-10 mm²) d'une jeune colonie fongique sont prélevés et placés dans de l'eau distillée stérile, dans un tube à essais bouchonné. Les tubes hermétiquement fermés sont ensuite stockés entre 1° et 10°C. Des cultures peuvent être rétablies en plaçant un bloc dans un milieu approprié de culture. Cette méthode permet de maintenir les caractéristiques de mycètes au moins 7 ans (Nakasone et al., 2004).

1.4. Criblage des isolats cellulolytiques performants

L'objectif de cette étape consiste à sélectionner les souches de moisissures les plus productrices de cellulases parmi les isolats de notre collection.

1.4.1. Criblage en milieu gélosé « Qualitatif »

Afin de sélectionner les souches cellulolytiques les plus performantes parmi les isolats de notre collection, nous évaluons dans un premier temps leur potentiel cellulolytique par la méthode au Lugol sur un milieu gélosé, la CMC étant l'unique source de carbone.

a) Milieu gélosés de criblage

Le milieu de culture utilisé pour le criblage est celui cité par Kasana et al., (2008). Il contient en plus des sels minéraux, une source d'azote minérale et une autre organique. D'après Mandels et al., (1976) cité dans Hankin et Anagnostakis, (1977) la CMC qui est un dérivé soluble de la cellulose constitue un substrat de choix pour la recherche des cellulases du fait qu'il est rapidement dégradé par les microorganismes. L'agar à raison de 17‰ permet une bonne diffusion des enzymes excrétées (Annexe I).

b) Protocole de criblage

Les isolats de notre collection sont testés pour leur capacité à produire des cellulases sur milieu solide contenant de la CMC (Herculano et al., 2011).

- À l'aide d'un emporte pièce circulaire d'un diamètre de 5mm et d'une aiguille stérile (Figure N° 17), un disque de gélose PDA est prélevé dans la partie périphérique de la colonie (culture de 7 jours) où le mycélium du champignon est le plus jeune, puis transféré au centre des géloses de criblage en boîtes (en triplicate).

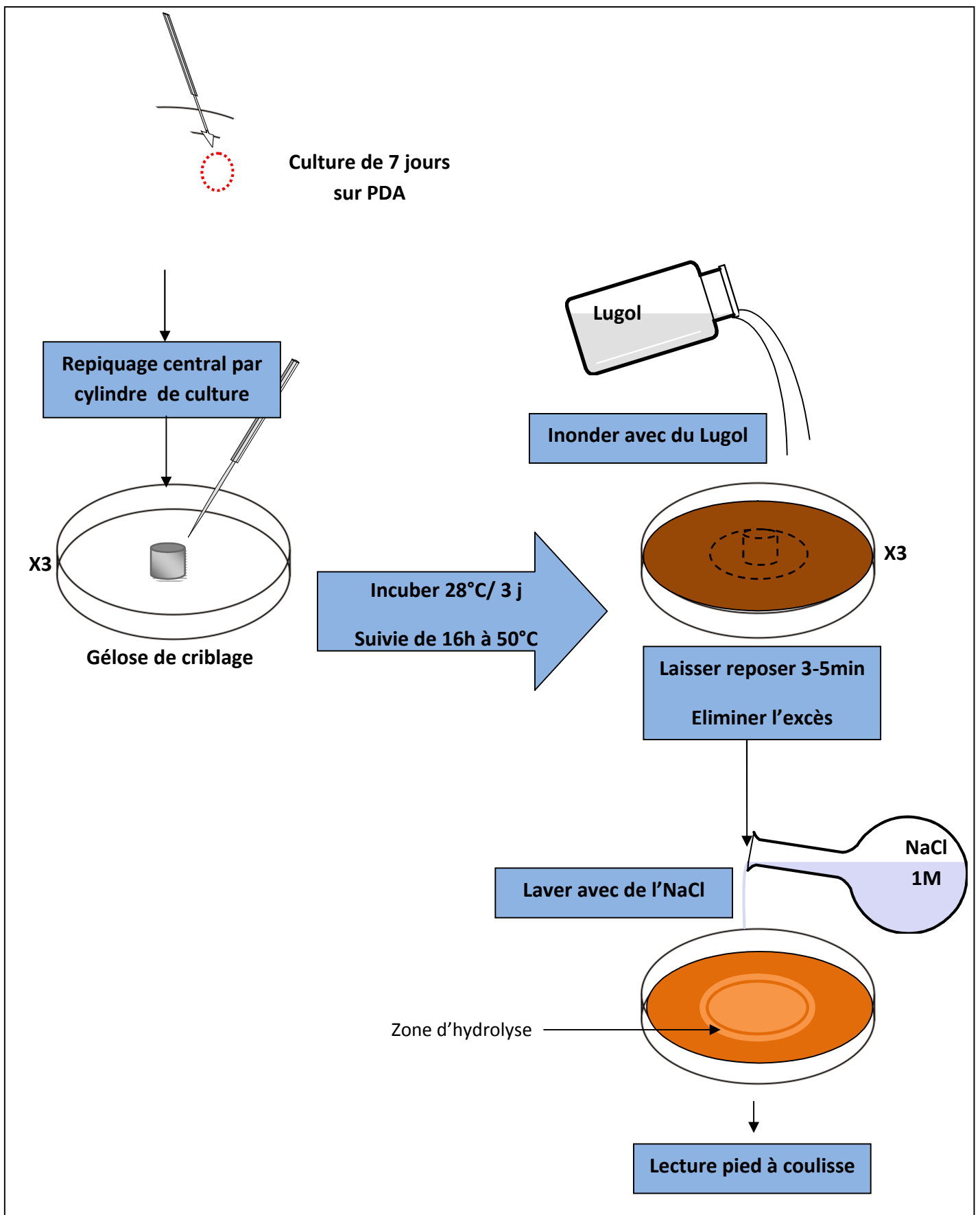


Figure 17 : Etapes du criblage qualitatif sur milieu solide (Méthode au Lugol)

- Après 3 jours d'incubation à 28°C, les boîtes sont incubées à 50°C pendant 16h. Selon **Herculano et al., (2011)** l'incubation à 50°C permet, en effet, l'inhibition de la croissance fongique et l'hydrolyse rapide de la cellulose aux bords des colonies.
- Les boîtes sont inondées avec une solution de Lugol bactériologique (Iodo iodure de potassium) (**annexe II**), pendant 3 à 5 min, suivi d'un lavage avec une solution d'NaCl 1M dans le but d'accentuer le contraste.
- Les diamètres des colonies et des zones d'hydrolyse sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.
- L'indice cellulolytique (IC) est exprimé par le rapport entre le diamètre de la zone d'hydrolyse sur le diamètre de la colonie fongique (**Hankin et Anagnostakis, 1977**).

1.4.2. Criblage en milieu liquide agité « quantitatif »

a) Bouillon de criblage

Le milieu de base adopté pour le screening est celui décrit par **Mandels et Weber (1969)** (**Annexe I**). Il est additionné de 1% (p/v) de CMC en tant qu'inducteur pour la production de cellulases. Le pH est ajusté à 5.

b) Mise en œuvre de la fermentation en milieu liquide

La production des cellulases extracellulaires est induite dans une culture submergée en milieu liquide et les isolats testés sont choisis sur la base des résultats du screening sur milieu solide. La souche de contrôle est une souche de référence productrice de cellulases, *Trichoderma reesei* RUT C30 qui nous a été aimablement fournie par le laboratoire de microbiologie industrielle de l'université de Reims champagne-Ardenne.

Toutes les expériences sont réalisées dans des flacons de 250 ml, contenant 30 ml du milieu Mandels et Weber (**Figure N° 18**) selon le protocole suivant (**Herculano al., 2011** modifier) :

- Les flacons sont fermés avec du coton cardé puis stérilisé à 121°C pendant 20 min.
- Après refroidissement, l'inoculation est effectuée avec 2 disques de 5 mm de diamètre prélevés dans la partie périphérique d'une culture de 7 jours sur milieu PDA (**Lakshmikant, 1990**).
- Les cultures sont incubées dans un bain Marie agité à 28°C pendant 14 jours.
- Les flacons sont prélevés tous les deux jours à partir du 8^{ème} jour d'incubation
- Les extraits enzymatiques bruts sont récupérés par centrifugation à 10 000 g (4°C) pendant 15 min puis conservés à 4°C jusqu'au dosage des activités enzymatiques.

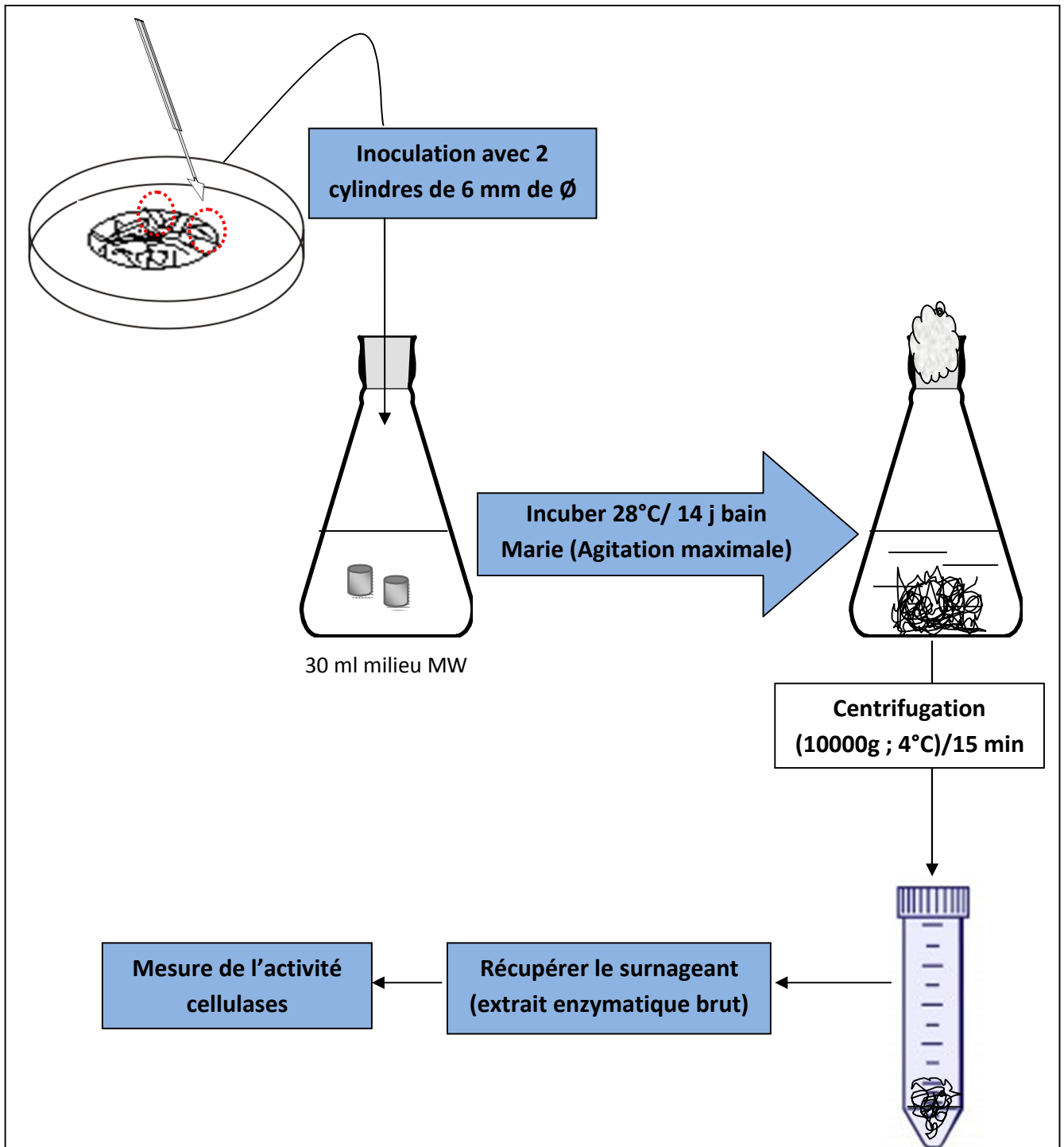


Figure 18: Etapes du criblage quantitatif sur milieu liquide agité MW

1.5. Croissance apicale

La croissance apicale correspond à l'élongation du mycélium cultivé en boîtes de Pétri sur des milieux gélosés.

Un cylindre de culture de 7 jours de 5mm de diamètre est déposé au centre d'une gélose PDA.

Les boîtes sont incubées dans les mêmes conditions à 28°C.

L'élongation est mesurée régulièrement à l'aide d'un pied à coulisse.

La croissance apicale est exprimée en millimètres par rapport au temps exprimé en heure.

$$V = (D \text{ max} - C) / T$$

V= Vitesse de croissance apicale (mm.h⁻¹).
Dmax= Diamètre de la colonie à l'arrêt du test (mm).
C = Diamètre du disque de gélose (mm).
T = Temps (h)

1.6. Identification des souches sélectionnées

L'identification des moisissures est basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les critères morphologiques sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, couleur du revers) et microscopiques (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...)

1.6.1. Identification macroscopique

Pour toutes les cultures obtenues après 5 à 7 jours sur milieu PDA, l'aspect de la colonie est examiné à l'œil nu ou sous une loupe binoculaire. La lumière réfléchie est habituellement plus efficace que la lumière transmise. Pour déterminer les couleurs des colonies, on les examine à la lumière du jour.

L'identification est fondée sur l'examen des caractères suivant :

- L'aspect des colonies
- Le relief des colonies
- La taille des colonies
- La couleur des colonies
- Les structures de fructification.

1.6.2. Identification microscopique

C'est l'observation microscopique de la morphologie du thalle et celle des structures sporifères par deux techniques :

a) Technique des frottis humides

Pour préparer un frottis humide, une aiguille d'inoculation est utilisée pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est

pas excessif. De plus, on prend les structures qui peuvent enfermer les spores, près du centre de la colonie, où la probabilité de trouver des spores à maturité est la plus grande (**Garg et al., 2010**).

Contrairement aux bactéries, le matériel fongique est observé, dans tout les cas, en milieu liquide entre lame et lamelle.

Le Lactophénol (**Annexe II**) comme liquide de mouillage donne de très bon résultats, il ne provoque ni gonflement ni contraction du thalle, peu volatil et permet une bonne conservation des préparations.

Les coupes d'échantillon posées sur une lame sont d'abord mouillées avec une goutte de Lactophénol puis une lamelle de couverture est posée. Le liquide en excès est épongé avec un papier absorbant. On procède ensuite à l'examen au microscope optique, généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (**Breton, 1990**).

b) Technique de culture sur lamelle

Cette technique est appliquée essentiellement aux champignons dont la structure est particulièrement fragile, qui subissent alors un examen microscopique spécial qui consiste à préparer une culture observable directement au microscope (**Garg et al., 2010**).

- Une lamelle stérile est insérée délicatement dans un milieu gélosé de manière à former un angle de 45° (**Figure N° 19**).
- Une goutte de l'inoculum (suspension de spores) est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu.
- Après 5-7 jours d'incubation à 28°C, la lamelle est retirée délicatement de la gélose entraînant avec elle des fragments du mycélium.
- La lamelle est ensuite déposée à l'envers sur une lame, puis examinée au microscope optique.

L'examen microscopique suivant ces manipulations permet d'examiner les caractères suivants:

- Le thalle siphonné ou septé
- Type et apparence du système sporal.

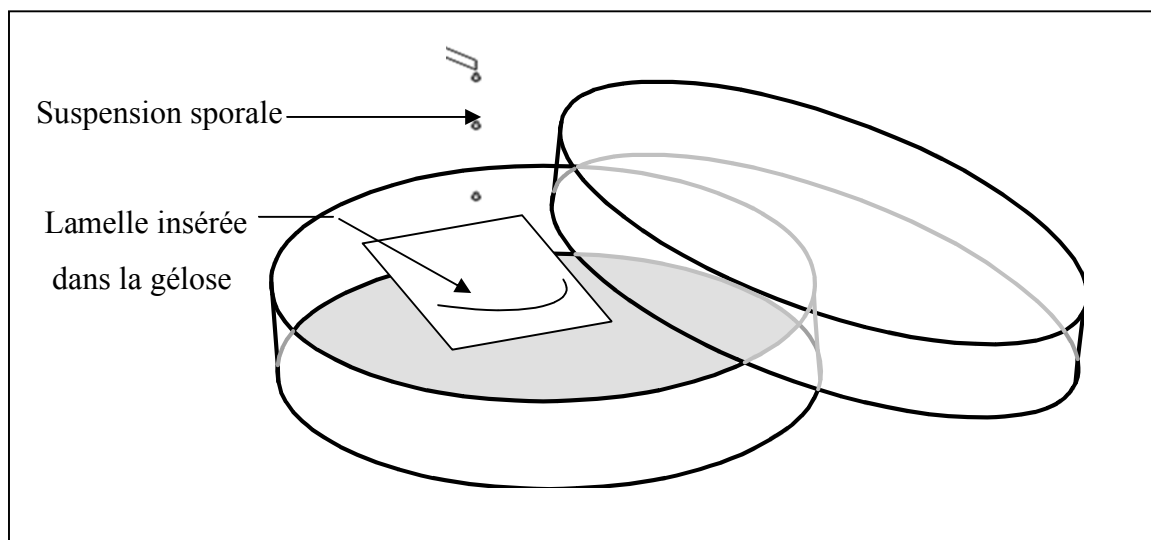


Figure 19 : Représentation schématique de la technique de culture sur lamelle

1.7. Mise en œuvre des FMS

1.7.1. Préparation des substrats solides

Les coques d'arachides et les noyaux de dattes sont utilisés dans cette étude pour des essais de fermentation sur substrats solide.

La coque d'arachide est récupérée à partir d'un lot d'arachide de commerce d'une variété locale cultivée dans la région saharienne de Oued-Souf.

Les noyaux de dattes sont considérés comme déchets dans différent processus de transformation des fruits de dattes (dattes dénoyautées, sirop, confitures). Les noyaux utilisés dans cette étude sont récupérées à partir d'un lot de commerce de la variété algérienne Déglat Nour.

Les coques d'arachide et les noyaux de dattes sont trempés dans de l'eau et lavés plusieurs fois pour éliminer tout type de débris ou de sucres résiduaire pouvant être présents sur le substrat, puis séché à 65°C dans un four pasteur.

La coque d'arachide est broyée à l'aide d'un broyeur électrique (**Elisashvili et al., 2008 ; Inuwa Ja'afaru et Ezekiel-Fagade, 2007**).

Les noyaux de dattes plus durs et rigides ont nécessité l'utilisation d'un moulin à meule plus puissant.

Un tamisage est réalisé de façon à avoir une granulométrie comprise entre 5 et 10 mm pour les deux substrats. La poudre fine est éliminée à fin d'éviter la formation de masse pâteuses après humidification.

La veille du lancement de la fermentation, le taux d'humidité des deux substrats est déterminé.

$$H (\%) = [(P_0 - P \text{ sec}) / P_0] \times 100$$

P_0 : Poids frais

$P \text{ sec}$: Poids sec

Le poids sec est déterminé après séchage des substrats au four Pasteur à 105°C jusqu'à poids constant.

1.7.2. Préparation des suspensions de spores

A partir des tubes de conservation, la souche *Trichoderma sp.* (DK1) a été repiquée sur plusieurs boîtes de gélose PDA. Après 10 jours d'incubation à 28-30°C, les boîtes serviront comme source de spores pour l'inoculation du substrat solide.

A l'aide d'un grattoir stérile, les spores sont grattées délicatement à la surface de la gélose sans détacher le mycélium puis remises en suspension dans de l'eau distillée stérile. Ces suspensions sporales denses sont récupérées dans un flacon stérile et stockées à 4°C.

La taille de l'inoculum est exprimée en quantité de spores par rapport à la masse du substrat solide. Le comptage est réalisé sous microscope optique à l'aide d'une cellule de Malassez pour préparer des dilutions de l'ordre de $5 \cdot 10^7$ spores/g de SPS.

1.7.3. Cultures en Erlenmeyer (Kang et al., 2004)

- Les milieux de culture de type solide sont répartis à raison de 20 g de substrat sec par fiole d'erenmeyer de 500 ml.
- L'humidité finale est ajustée avec de l'eau distillée à pH 6 à un taux de 65% pour la coque d'arachide et à 50% pour les noyaux de dattes.

- Coque d'arachide (65%):

MH.....100%

$$MS (20g).....100\% - 65\% \left. \vphantom{MS} \right\} MH = \frac{20 \cdot 100}{100 - 65} = 57,14g$$

$$MH = MF + V H_2O, \text{ donc, } V H_2O = MH - MF \\ = 57,5 - 22,5 = 35ml$$

- Noyau de datte (50%) :

$$V H_2O = 33,86 - 22,85 = 11ml$$

- Les fioles sont obturées avec du coton cardé puis stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 30 min.

MF : Matière fraîche

MH : Matière humide

$V H_2O$: volume de l'eau ajoutée

- d) Après refroidissement, les fioles sont inoculées avec une suspension sporale à raison de 5.10^7 spores/g de substrat poids sec, sous une hotte à flux laminaire (**Figure N°20**). L'ensemble est bien homogénéisé à l'aide d'une spatule stérile.
- e) Les fioles sont incubées à 30°C dans des conditions statiques.



Figure 20: Inoculation aseptique du substrat solide sous hotte à flux laminaire.

1.8. Prélèvement et traitement des échantillons en FMS

A la différence des cultures liquides, la prise d'échantillons homogènes au cours des FMS n'est pas aisée. En effet, pour que les échantillons soient homogènes, on récupère l'ensemble du produit fermenté d'un erlenmeyer pour le mélanger manuellement.

Pour établir les cinétiques de fermentation il est donc indispensable de préparer autant de fioles d'Erlen que de points souhaités (**Saucedo-Castaneda, 1991**).

La méthodologie suivie pour la préparation des échantillons est schématisée sur la **figure 21** (**Saucedo-Castaneda, 1991 ; Roussos et al., 1994**).

1. Après chaque prélèvement, les produits fermentés sont parfaitement homogénéisés manuellement à l'aide d'une spatule et les échantillons frais sont utilisés pour mesurer le poids sec et le pH.

2. Parallèlement 10 g du substrat fermenté sont mis en suspension dans 100 ml de tampon citrate (0.05M pH 4,8). A fin de récupérer le maximum d'enzymes l'homogénéisation est réalisée dans un mixeur pendant 2min par intermittence pour éviter l'augmentation de la température. L'action mécanique du mixeur est très importante pour récupérer le maximum de cellulases qui adhèrent fortement à la fraction cellulosique du substrat solide.
3. Le mélange est centrifugé à 10000g (4 °C) pendant 15 min. La filtration n'est pas nécessaire car le surnageant obtenu est clair en plus il est connu que les cellulases s'adsorbent fortement sur le papier filtre par conséquent occasionnent des pertes d'activité (**Gassara et al., 2010**). Une température basse (4°C) est fortement requise lors de la centrifugation pour éviter la dénaturation des enzymes
Le surnageant clair récupéré représente l'extrait enzymatique brut, il est conservé à 4°C (**Bansal et al., 2012**).
4. Pour traiter tous les échantillons dans les mêmes conditions, les extraits enzymatiques sont conservés à 4°C au fur et à mesure des prélèvements. La mesure des activités enzymatiques est répétée trois fois.

1.9. Méthodes d'analyse physico-chimiques

1.9.1. Mesure de la matière sèche

En fermentation solide, il est indispensable de suivre l'évolution de la matière sèche du substrat solide au cours de la fermentation. En effet, l'eau produite lors de la respiration, de même que la perte de poids due à la dégradation des substrats carbonés conduisent à des variations importantes de l'humidité au cours de la fermentation (**Saucedo-Castaneda, 1991**).

Le suivi de la perte en poids sec du substrat de fermentation permet de suivre l'évolution de la croissance du champignon, car ses deux paramètres sont fortement corrélés (**Terebiznik et Pilosof, 1999**)

5g d'échantillons de matière fraîche sont pesés (P_0) dans des creusets en porcelaine préalablement tarés, à l'aide d'une balance de précision. L'échantillon est mis à sécher à 105°C jusqu'à poids constant (P_{sec}). Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche.

$$H (\%) = [(P_0 - P_{sec}) / P_0] \times 100$$

P_0 : Poids frais

$$MS (\%) = 100 - H (\%)$$

P_{sec} : Poids sec

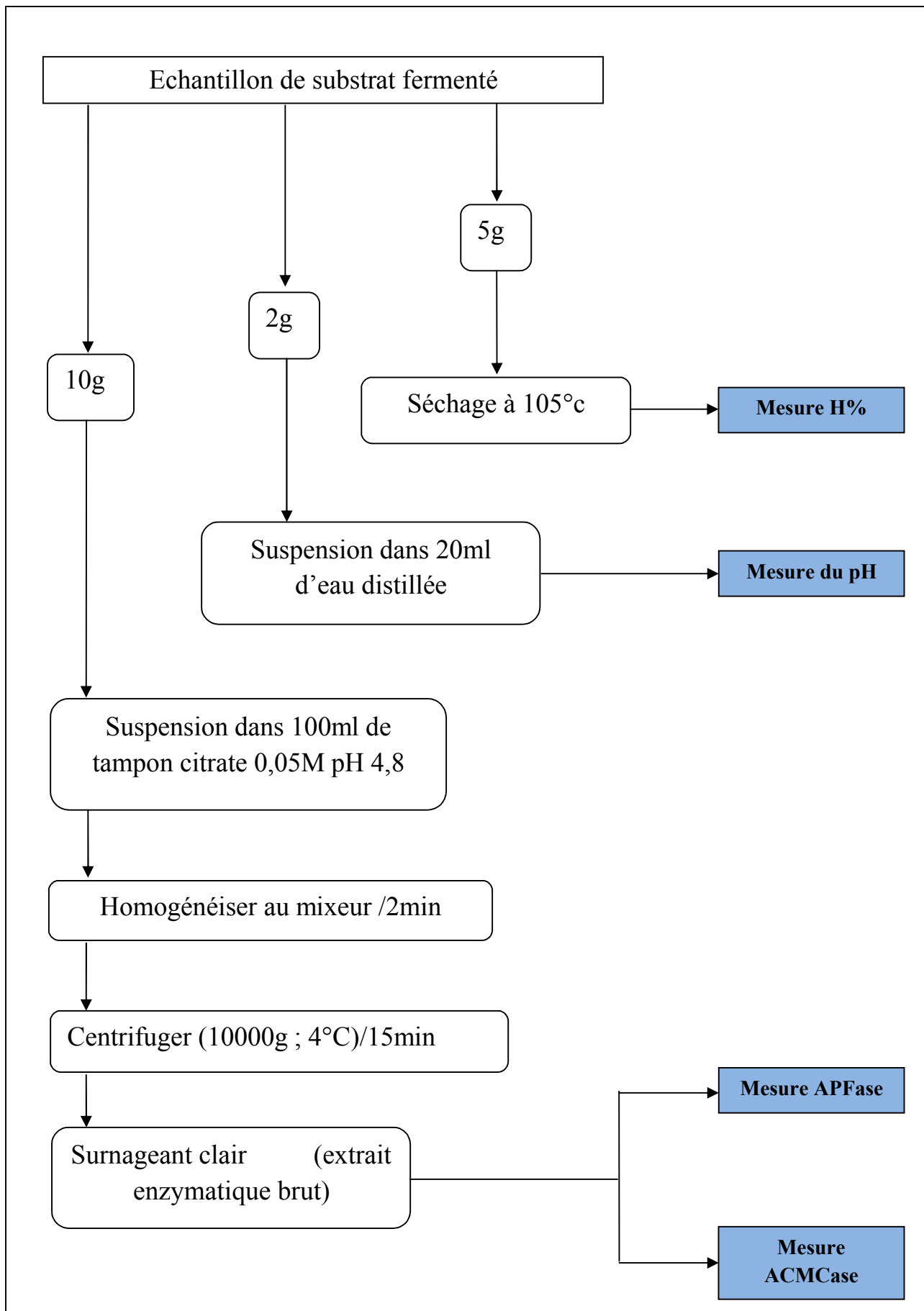


Figure 21: Traitements et analyses physico-chimiques des échantillons en FMS

1.9.2. Mesure des activités cellulases

L'évaluation de l'activité des enzymes cellulolytiques est réalisée en mettant en contact la solution enzymatique avec un substrat spécifique pendant un temps défini, et dans des conditions de température et de pH appropriées.

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme responsable de la libération d' 1 μ mole de sucres réducteurs équivalent glucose par min dans les conditions de l'essai.

a) Activité papier filtre

L'activité papier filtre (APF ou activité totale) est déterminée selon la méthode de **Ghose (1987) (Tableau N° IX)**

- Mettre une bandelette de papier Whatman N° 1 de (1cm x 3 cm soit 25 mg) dans un tube à hémolyse en verre.
- Ajouter 0,5 ml de la solution tampon citrate (50 mM ; pH 4,8).
- Equilibrer la température à 50°C dans un bain marie pendant 10 minutes.
- Ajouter 0,25 ml de l'extrait enzymatique brut.
- Incuber immédiatement à 50°C pendant 60 minutes.
- Arrêter la réaction en ajoutant 1,5 ml du réactif de DNS.
- Le mélange réactionnel est ensuite porté à ébullition à 100°C pendant 5 minutes puis refroidi dans un bain d'eau glacée.
- L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose contenu dans les extraits. Cette concentration est déterminée par référence à une courbe étalon (**Annexe IV, figure N° 39**) établie avec des concentrations variables en glucose de 1,1 à 8 mg/ml à partir d'une solution mère à 10 g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

Tableau IX : Différentes étapes du dosage de l'activité papier filtre selon **Ghose (1987)**.

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Papier filtre	/	/	1
Tampon (µl)	500	500	500
Equilibrer à 50°C pendant 10 min			
Glucose (µl)	250	/	/
Enzyme (µl)	/	250	250
Incuber pendant 60 min à 50 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
Placer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Attendre 20 min ou centrifuger afin d'éliminer les débris du papier filtre déchiqueté			
Prélever 500 µl de milieu réactionnel et ajouter 1.0 ml d'eau distillée.			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre de l'eau distillée (en triplicate).			

Les absorbances des échantillons sont convertis en concentration de glucose libéré par interpolation linéaire à partir de la courbe d'étalonnage.

$$\text{APFase} = (\text{mg de glucose libéré} / 0.18016 \text{ mg}/\mu\text{mol}) / (0.25 \text{ ml} * 60 \text{ min})$$

$$= \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

$$= \text{U /ml}$$

b) Activité carboxyméthylcellulase (CMCase)

L'activité CMCase est déterminée selon la méthode de **Ghose (1987) (Tableau N° X)**.

- Dans un tube à hémolyse, ajouter 0,25 ml d'une solution de CMC à 2% (p/v) [dans du tampon citrate (0,05 M - pH 4,8)].
- Equilibrer pendant 10 minutes à 50°C dans un bain marie.
- Additionner de 0,25 ml de l'extrait enzymatique brut.
- Incuber à 50°C pendant 30 minutes,
- Arrêter la réaction en ajoutant 1,5 ml du réactif de DNS, suivi d'un chauffage à 100°C pendant 5 minutes.

- l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose contenu dans les extraits. Cette concentration est déterminée par référence à une courbe étalon (**Annexe IV, figure N° 40**) établie avec des concentrations variables en glucose (0,33 à 2 mg/ml) à partir d'une solution mère à 2 g/l. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm.

Tableau X: Différentes étapes du dosage de l'activité CMCCase selon **Ghose (1987)**.

	Gamme	Témoin enzyme	Enzyme
Substrat (µl)	250	250	250
Equilibrer à 50°C pendant 10 min			
Enzyme (µl)	/	/	250
Incuber pendant 30 min à 50 °C			
Arrêter la réaction en ajoutant 1.5 ml de DNS			
Tampon (µl)	/	/	/
Glucose (µl)	250	/	/
Enzyme (µL)	/	250	/
Placer 5 min à 100 °C			
Refroidir dans un bain d'eau glacée			
Mesurer l'absorbance à 540 nm contre l'eau déminéralisée (en triplicate)			

Absorbance = Absorbance de l'enzyme – Absorbance témoin enzyme

Les absorbances des échantillons sont converties en concentration de glucose libéré par interpolation linéaire à partir de la courbe d'étalonnage.

ACMCCase = (mg de glucose libéré / 0.18016 mg/µmol) / (0.25 ml* 30 min)

$$= \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

$$= \text{U} / \text{ml}$$

1.9.3. Dosage des sucres réducteurs

L'estimation des sucres réducteurs est obtenue par la méthode au DNS (**Bernfeld, 1955**) avec le glucose comme référence.

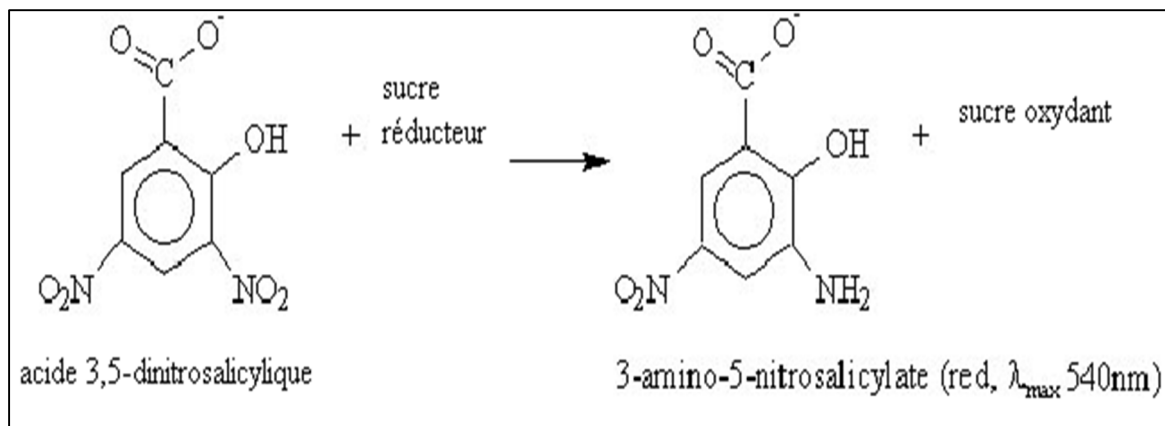


Figure 22: Réaction de réduction du DNS par le sucre réducteur et la formation du composé coloré.

Le principe de cette méthode est basé sur la coloration rouge développée suite à une réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique à chaud et en milieu alcalin. Le DNS joue le rôle d'oxydant et le glucose étant le réducteur. La **figure 22** illustre la réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (D.N.S.) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique. Le produit de la réaction présente une coloration rouge foncé présentant un maximum d'absorption à 540 nm.

La présence de fortes concentrations en protéines peut interférer dans la lecture.

1.10. Analyse statistique :

L'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test HSD sont utilisées pour déterminer les différences significatives à l'aide du logiciel statistique Excel STAT. Pour toute les analyses, la différence est considérée comme étant significative lorsque $p < 0,05$ pour un intervalle de confiance de 95%.

2.1. Isolement sur milieu sélectif

Malgré les précautions prises et la combinaison de ces différentes méthodes, nous remarquons la présence de quelques colonies bactériennes sèches ou visqueuses peu abondantes. Cela est dû probablement à la résistance de ces microorganismes aux conditions imposées. Cependant leur disparition est observée suite aux repiquages successifs nécessaires à la purification des souches fongiques.

A partir des 5 échantillons collectés, **20** champignons sont isolés en culture pure réparties en fonction des sites d'échantillonnage.

Nous observons une forte prépondérance de souches fongiques dans le sol des forêts (plus de 50% des souches sont isolées à partir de l'échantillon **D**). Ce résultat s'explique probablement par la richesse du sol de forêts en matière organique, apportée par les débris végétaux en décomposition (**Figure N° 23**). A l'inverse, les autres échantillons renferment beaucoup moins de souches fongiques cellulolytiques (**Tableau N° XI**).

Tableau XI: Isolats fongiques à partir des différents échantillons

Echantillon	Dilution	Isolat
A	10^{-2}	AM2
B	10^{-2}	SH2
	10^{-3}	SH3
	10^{-6}	SH6
C	10^{-1}	CB1
	10^{-3}	CB3
D	10^{-1}	DF
	10^{-2}	DH
	10^{-3}	DG1, DG2
	10^{-4}	DK1, DK2, DK3
	10^{-5}	DL1, DL2, DL3
	10^{-6}	DM1, DM3
E	10^{-1}	GA1
	10^{-3}	GA3

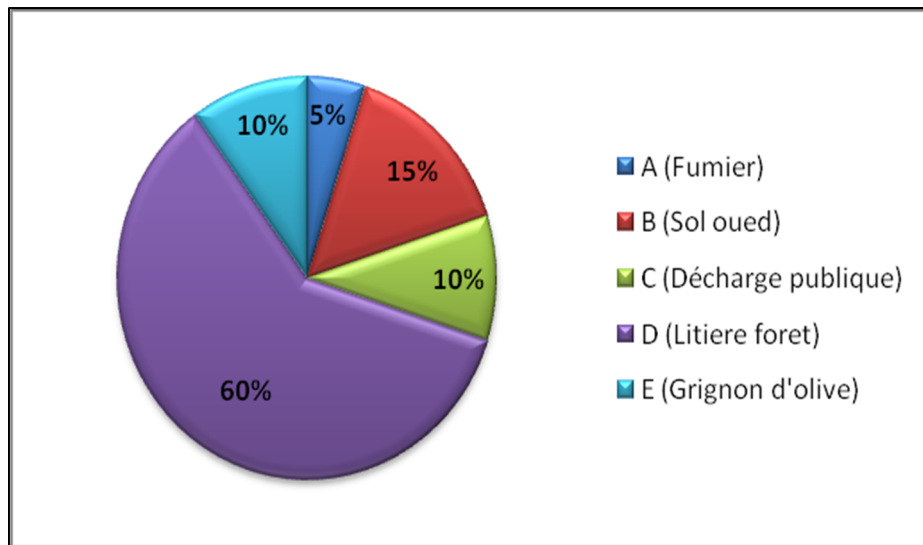


Figure 23 : Distribution des isolats en fonction des sites d'échantillonnages.

2.2. Criblage des isolats

2.2.1. Criblage sur milieu gélosé

Le Lugol interagit rapidement (3-5min) avec la cellulose native, formant un complexe marron foncé mais pas avec la cellulose hydrolysée. Ceci révèle une zone distincte (halo) de couleur claire autour des colonies fongiques productrices de cellulases, qui correspond à la zone d'hydrolyse de la cellulose (Yeoh et al., 1985). Après 3 jours d'incubation, les colonies apparaissent entourées d'une zone claire dont le diamètre est plus ou moins grand en fonction des isolats (Figure N° 24). Le ratio (IC) entre le \emptyset de l'halo et celui de la colonie est directement proportionnel à la quantité de cellulases extracellulaires secrétées par le champignon.

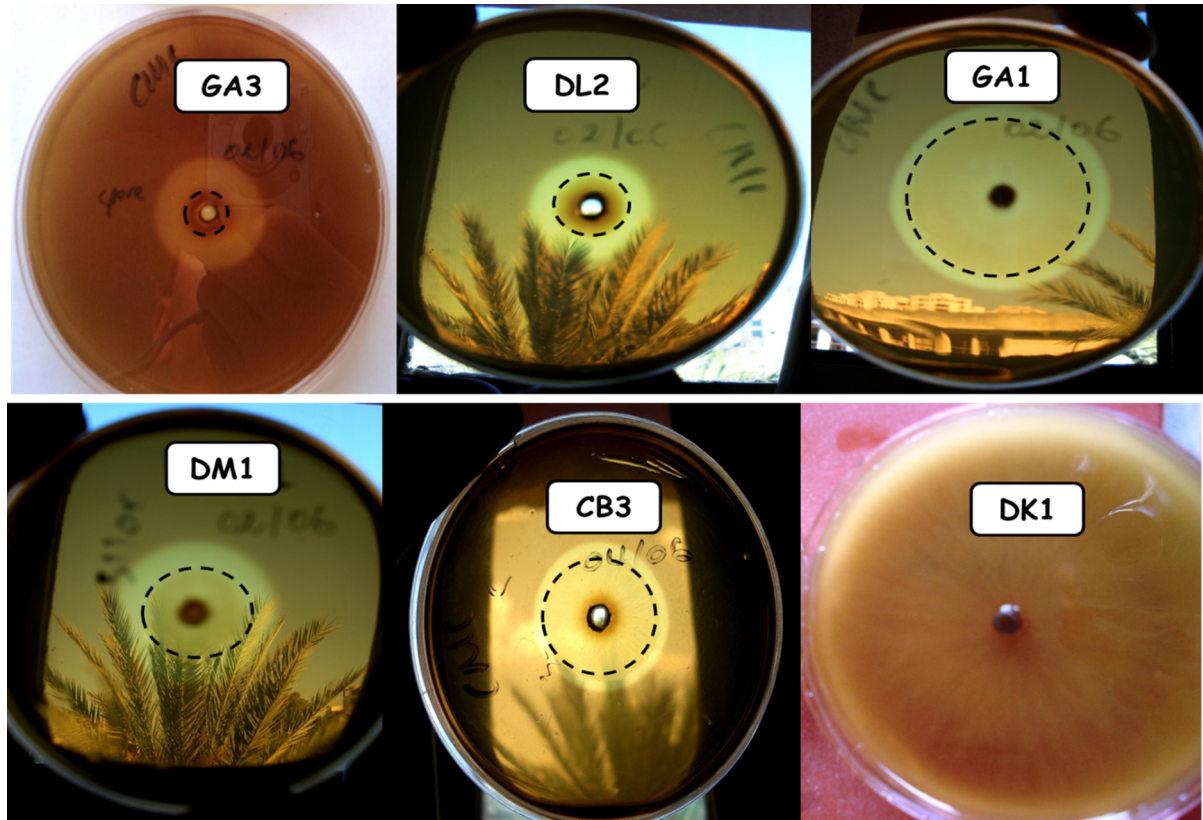


Figure 24 : Photos du screening sur milieu gélosé représentant les zones d'hydrolyses des 6 isolats sélectionnés

Parmi les 20 isolats testés, 17 montrent des indices cellulolytiques de **1,03** à **2,02**, alors que l'isolat **SH6** montre une zone d'hydrolyse à peine visible avec un IC de **1,007** (**Figure N° 25**).

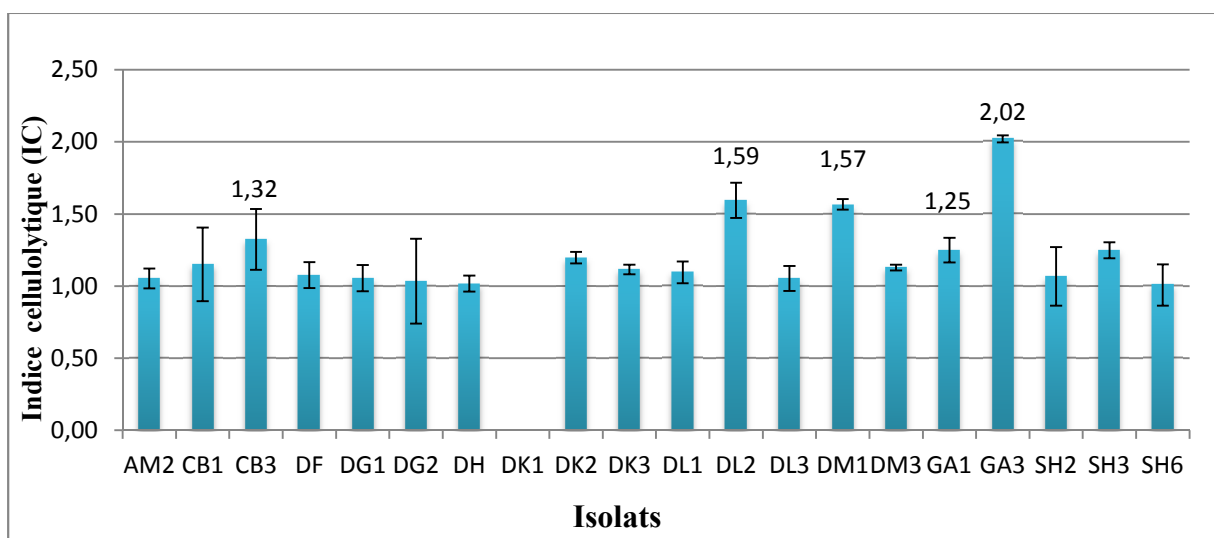


Figure 25 : Indices cellulolytiques des 20 isolats sur milieu CMC-Agar

La même remarque pour l'isolat **DH** qui montre une croissance très lente avec un diamètre de colonie ne dépassant pas 15 mm au 3^{ème} jour d'incubation et un IC de **1,016**. Les résultats de l'isolat **DK1** n'ont pas pu être déterminés à cause de son taux de croissance très élevé, la colonie envahit la totalité de la boîte (**Figure N° 24**) au bout du 2^{ème} jour (confirmation sur milieu liquide).

L'analyse statistique a montré que l'isolat **GA3** possède le plus grand IC parmi les 20 isolats de notre collection avec une moyenne de **2,02** avec une différence hautement significative ($p < 0,0001$).

2.2.2. Criblage sur milieu liquide

Le premier passage de la collection de champignons sur un milieu sélectif nous a permis de les classer en fonction de leur aptitude à former une zone d'hydrolyse mais cette évaluation reste toutefois semi-quantitative.

Dans un deuxième temps, nous mesurons donc quantitativement les activités cellulases de type APFase et ACMCase obtenues sur milieu liquide agité. Cinq isolats avec un IC supérieur ou égal à **1,25** sont sélectionnés pour une étude comparative de production de cellulases sur milieu liquide agité Mandels et Weber [1% CMC (p/v)], le sixième étant l'isolat DK1 qui ne se prête pas au premier test (croissance très rapide, moisissure envahissante).

La production des cellulases sur milieu liquide est suivie du 8^{ème} au 14^{ème} jour de la fermentation avec des prélèvements tout les 48h.

Les **figures 26** et **27** représentent les cinétiques des activités PFase et CMCase relatives aux 6 souches. Toutes les souches présentent une activité cellulasique inférieure à celle de la souche de référence *T. reesei* RUT C30 qui donne les meilleurs activités (APFase **0,356** UI/ml et ACMCase **1,586** UI/ml).

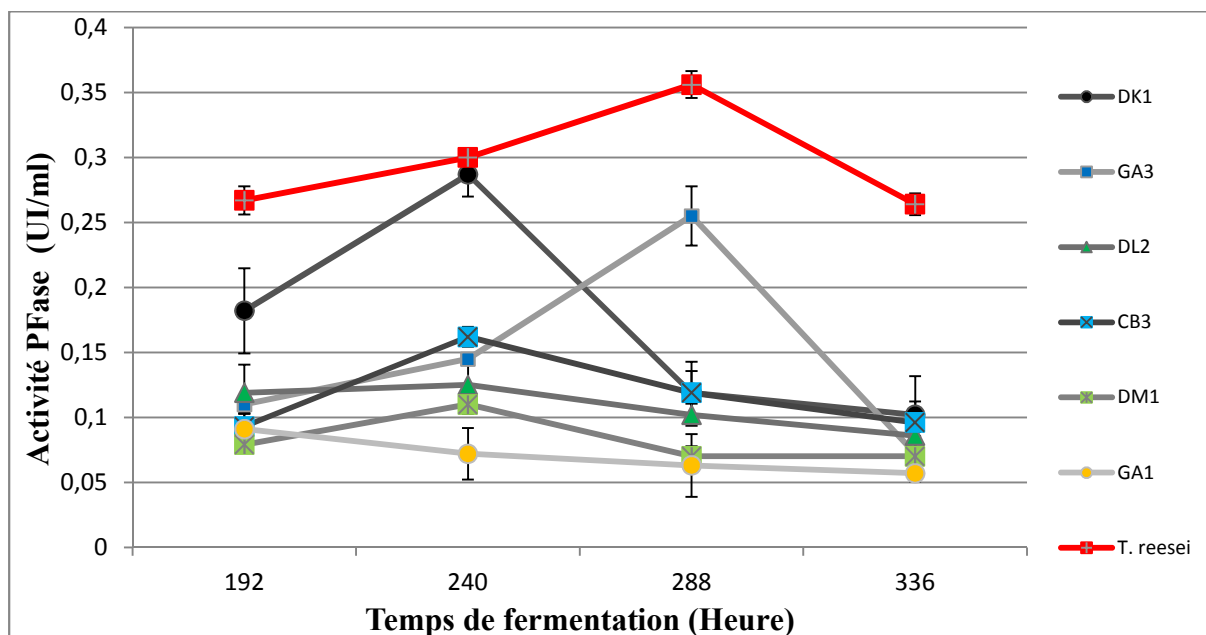


Figure 26 : Cinétique des activités Pfases des 6 isolats en fermentation liquide sur milieu MW.

Nous remarquons que le maximum de production pour les deux types d'activités correspond pour la plupart des souches au 10^{ème} jour de la fermentation.

Toutefois, l'activité Pfase ne corrèle pas toujours avec l'activité CMCCase ; c'est le cas de l'isolat GA3 et CB3, la même remarque a été rapportée par **Shahriarinour et al., (2011)**.

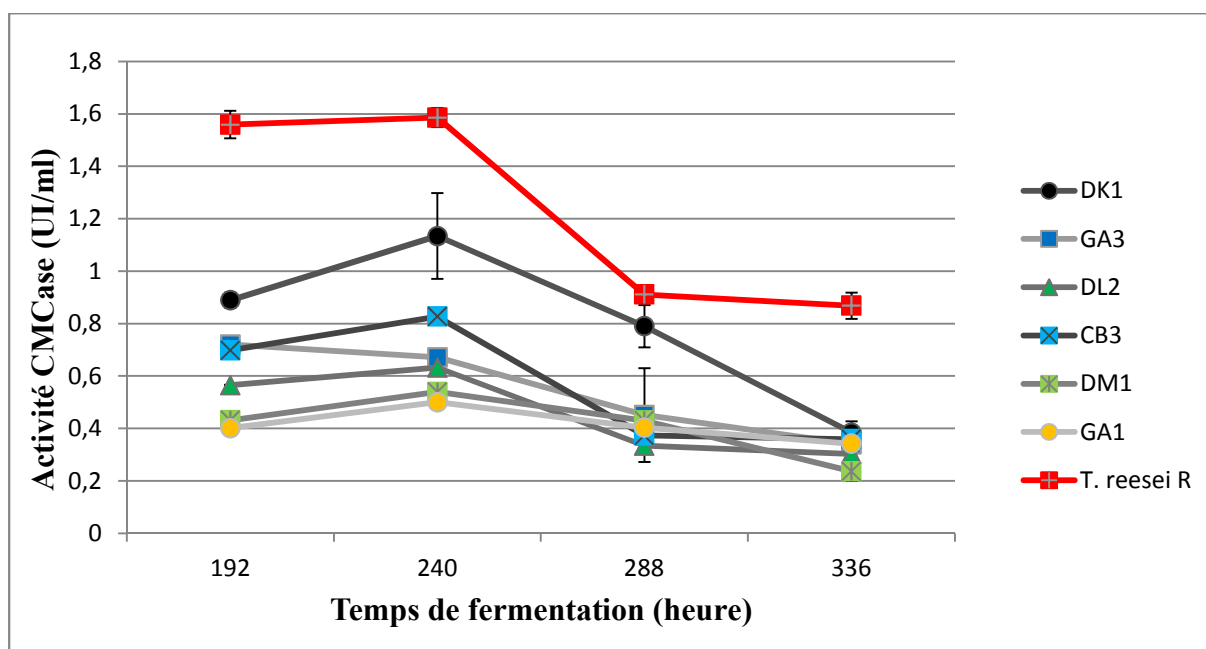


Figure 27: Cinétique des activités CMCCase des 6 isolats en fermentation liquide sur milieu MW.

L'analyse statistique a montré que l'isolat **DK1** est le mieux équipé en exoenzymes parmi les 6 souches testées (PFase **0,287** UI/ml et CMCCase **1,134** UI/ml) avec une différence hautement significative ($p < 0,0001$).

Ces résultats sont proches de ceux rapportés par **Roussos et Raimbault, (1982)** avec une souche de *Trichoderma reesei* sur milieu MW (**0,075** UI APfase/ml et **1,229** UI CMCCase/ml).

Dans une étude similaire, **Saradouni (1994)**, a sélectionné une souche locale appartenant au genre *Aspergillus*, avec une APfase maximale de **0.3** UI/ml sur milieu MW.

Notre résultat est proche aussi de celui enregistré par **Kader et al., (1999)** avec une souche locale de *Trichoderma sp* sur milieu Mandels (APfase **0.40** UI/ml et ACMCase **1.58** UI/ml).

Herculano et al., (2011) rapportent pour des souches de *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula aurantiaca* et *Eurotium chevaliere* cultivées en milieu liquide les activités CMCases respectives de 3,58 ; 2,36 ; 2,57 UI/ml. Ces souches présentaient des bons IC sur milieu gélosé.

Ces résultats n'ont toutefois qu'une valeur indicative car toutes les souches sont testées selon des conditions standards, les conditions optimales pour chacune d'elles n'ayant pas été déterminées (**Roussos et Raimbault, 1982**).

Ces résultats ont permis de choisir la souche **DK1** pour la production de cellulases par fermentation en milieu solide de substrats lignocellulosiques. Cependant L'étude morphologique qui suit est réalisée sur les 6 isolats sélectionnés à la base de leurs activités enzymatiques.

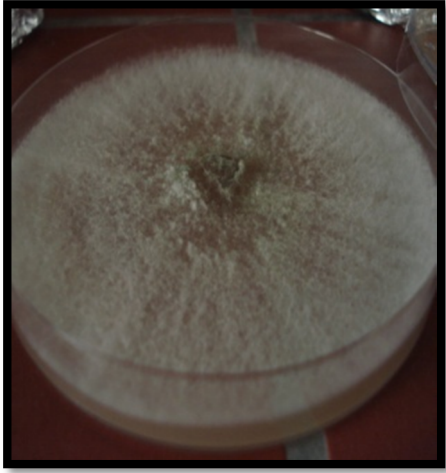
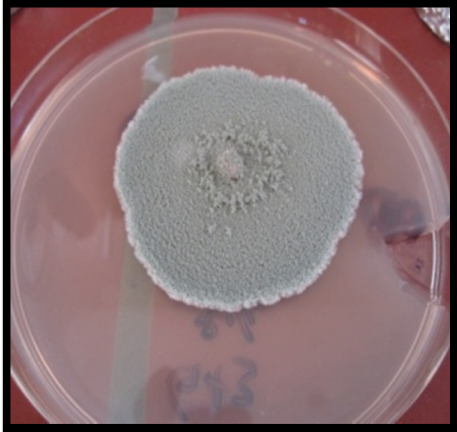

2.3. Etude Morphologique des isolats sélectionnés

L'étude des caractères morphologiques est réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de **Breton (1990)**, **Pitt et Hocking (2009)** et **Malloch, (1997)**.

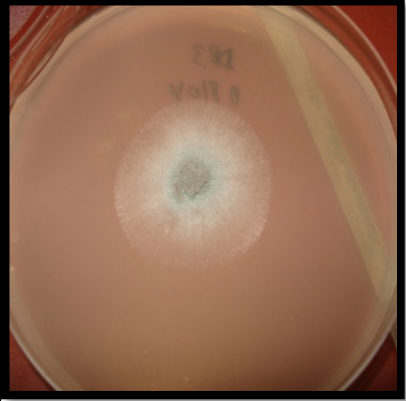

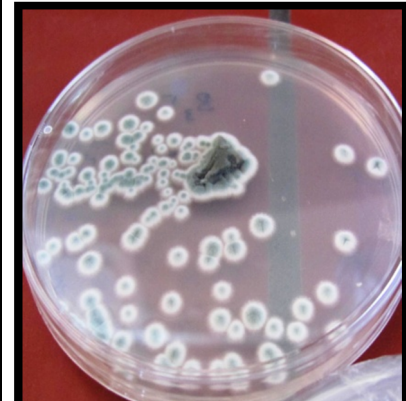
2.3.1. Macromorphologie

Les caractères cultureux des colonies des souches sélectionnées sont étudiés sur le milieu PDA. Le **tableau XII** résume les principaux caractères cultureux des colonies à savoir l'aspect du mycélium, la surface des colonies ainsi que la couleur de la pigmentation au revers des boîtes.

Tableau XII: Principaux caractères cultureux des six isolats sélectionnés.

Isolat	Mycélium aérien	Colonie et croissance	surface	Pigmentation	Photo
DK1	Beige clair puis vert après sporulation	Aplatie, Croissance très rapide	Duveteuse, glabre à maturité	Pas de pigment	
GA3	Mycélium immature courts filaments de couleur blanche, apparition rapide et abondante de conidies de couleur vertes.	Aplatie. Croissance moyenne	Aspect poudreux	Pas de pigment	
DL2	Mycélium immature de couleur blanche. A maturité les conidies sont de couleur rose claire.	Aplatie. Croissance moyenne	Cotonneuse puis poudreuse à maturité	Pas de pigment	

Suite Tableau XII: Principaux caractères cultureux des six isolats sélectionnés.

Isolat	Mycélium aérien	Colonie et croissance	surface	Pigmentation	Photo
CB3	Mycélium immature, courts filaments aériens de couleur blanche. A maturité (conidies) surface de couleur verte sombre.	Aplatie. croissance rapide.	Velouté, poudreuse à maturité	Pas de pigment	
GAI	Couleur beige, puis vert olive après sporulation	Aplatie. Croissance très rapide	Granuleuse à maturité	Pas de pigment	
DM1	Courts filaments aériens de couleur Blanche, conidies de couleur vert foncé au centre de la colonie.	Légèrement bombée, croissance lente.	Veloutée, poudreuse à maturité	Pas de pigment	

2.3.2. Micromorphologie

L'observation au microscope optique des cultures sur lamelles de 3 à 7 jours (**Figure N° 28**) à divers grossissements (x100, x400), permet d'examiner les mycelia et les organes de fructification sans en altérer leurs structures. Les photos sont présentées dans le **tableau XIII**.

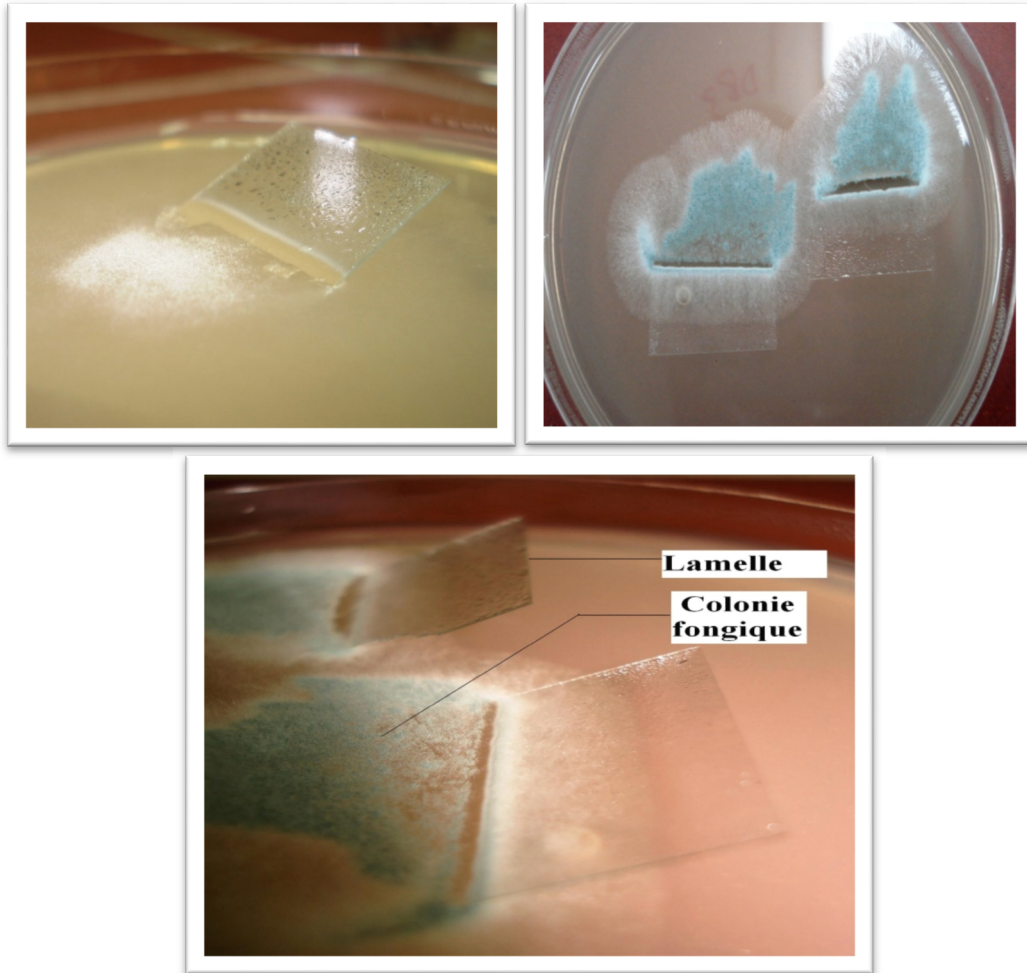


Figure 28: Croissance fongique par la technique des lamelles

a. Les isolats DK1 et GA1 présentent les caractères suivants :

- Hyphes cloisonnés
- Conidiophores très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit.
- Phialides isolées ou en grappes (3 le plus souvent).
- Phialides ovoïdes et ellipsoïdales atténués au sommet directement insérées sur le conidiophore.
- Conidies de couleur verte.

Ces critères rejoignent ceux du genre *Trichoderma*.

b. L'isolat GA3 présente les caractères suivants :

- Hyphes cloisonnés

- L'organe de fructification asexué est caractérisé par la présence des penicilli constituées de métules, et phialides.
- Phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophore surmontées par des chaînes de conidies

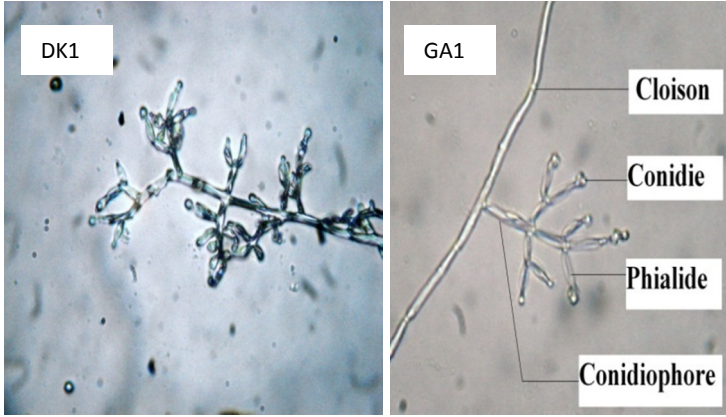
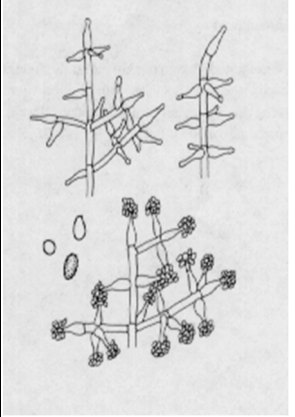
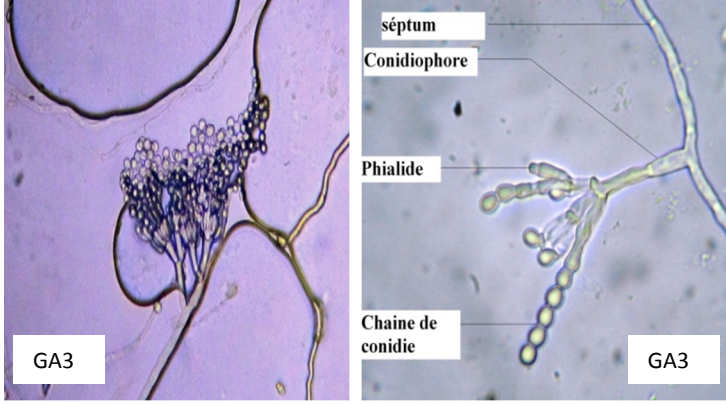
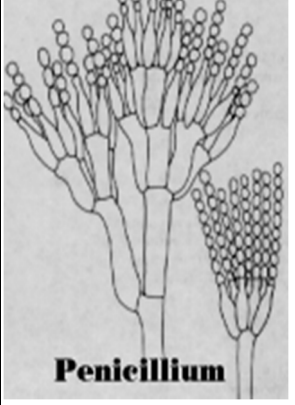
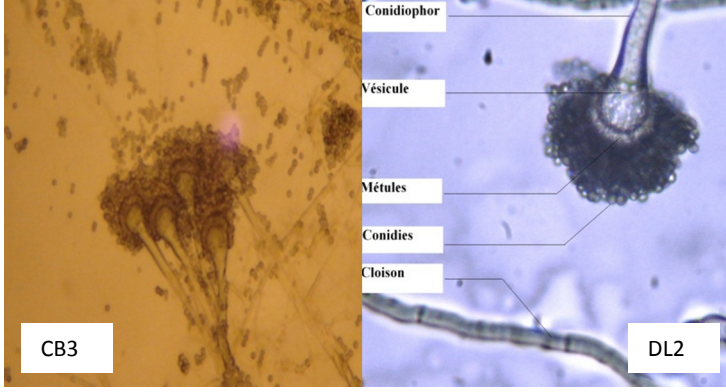
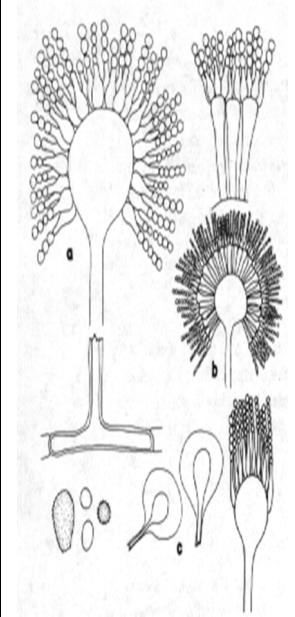
Cette souche appartient probablement au genre *Penicillium*.

c. L'isolat CB3, DL2, DM1 présentent les caractères suivants :

- Hyphes cloisonnés.
- Conidiophores à extrémité renflé en une vésicule recouverte de métules qui portent les phialides.
- Les chaînes de conidies sont portées par les phialides.
- Phialides formés directement sur la vésicule.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Aspergillus*.

Tableau XIII: Observation microscopique des six souches comparées à des schémas de références.

Isolat	Photos microscopiques	Photos standards (Malloche, 1997)
<p>DK1, GA1</p> <p>Trichoderma (Gx600)</p>	 <p>DK1</p> <p>GA1</p> <p>Cloison</p> <p>Conidie</p> <p>Phialide</p> <p>Conidiophore</p>	
<p>GA3</p> <p>Penicillium (Gx600)</p>	 <p>GA3</p> <p>GA3</p> <p>séptum</p> <p>Conidiophore</p> <p>Phialide</p> <p>Chaîne de conidie</p> <p>GA3</p>	 <p>Penicillium</p>
<p>CB3, DL2, DM1</p> <p>Aspergillus (Gx600)</p>	 <p>CB3</p> <p>DL2</p> <p>Conidiophor</p> <p>Vésicule</p> <p>Métules</p> <p>Conidies</p> <p>Cloison</p> <p>DM1</p>	

2.4. Fermentation en milieu solide

Notre culture en erlen est basée sur la distribution homogène des spores de *Trichoderma sp.* à l'intérieur des substrats lignocellulosiques (coque d'arachide et noyaux de datte).

La préparation d'un substrat poreux est nécessaire pour assurer une bonne aération et une croissance rapide du mycélium. Le pH acide, la faible teneur en eau et la charge importante de l'inoculum sporal favorise cette croissance.

2.4.1. Évolution de la matière sèche et du pH au cours de la FMS

a) la matière sèche

Avant humidification, l'humidité de nos substrats était 11,1 % pour la coque d'arachide et 12,4 % pour les noyaux de datte. Les deux substrats sont humidifiés uniquement avec de l'eau distillée sans ajout de sels minéraux (**Bansal et al., 2012**). Le taux d'humidité requis pour la CA (65%) est plus important que celui des noyaux datte (50%) à cause de la différence entre la capacité d'absorption des deux substrats qui est due probablement à la leur composition. Une H% supérieur à 50% entraîne l'apparition d'eau libre pour le noyau de datte.

En FMS avec les moisissures, il est difficile de déterminer directement la biomasse, car il est pratiquement impossible de séparer la biomasse du substrat de fermentation.

Terebiznik et Pilosof (1999) ont pu démontrer que la perte en poids sec du substrat de fermentation est hautement corrélée à la biomasse et que cette dernière peut être estimée par la détermination de la perte en poids sec.

L'évolution de la matière sèche pour les deux substrats est suivie tout au long de la fermentation, les résultats sont représentés sur les **figures 29 et 30**.

Dans le cas de la coque d'arachide, nous enregistrons au début de la fermentation (0-24h) une très faible diminution du taux de la MS, cela correspond probablement à la période d'incubation et de germination des spores. Cette période se prolonge jusqu'au 3^{ème} jour pour les noyaux de datte avec une très faible diminution de la MS. Selon **Leonowicz et al., (1999)**, la croissance des champignons pendant la période d'incubation se fait au départ au dépend des fractions facilement assimilables à faible masse moléculaire, il s'agit d'oligosaccharides présents naturellement dans le substrat ou libérés lors des différents traitements physiques tel que le broyage et la stérilisation. **Vidaud et al., (1982)** précisent que le broyage rompt une partie des molécules de cellulose, augmentant ainsi le nombre de fonctions réductrices libres,

et provoquant la formation de polysaccharides de faible poids moléculaire facilement hydrolysables. Dans une étude de **Hamaili et Benkerrou (2012)** avec une souche de référence *Trichoderma reesei* la croissance était plus importante dès le 1^{er} jour avec le son de blé ; cela est due probablement à la composition du son de blé qui est plus riche en vitamines, et sels minéraux (calcium, magnésium, phosphore).

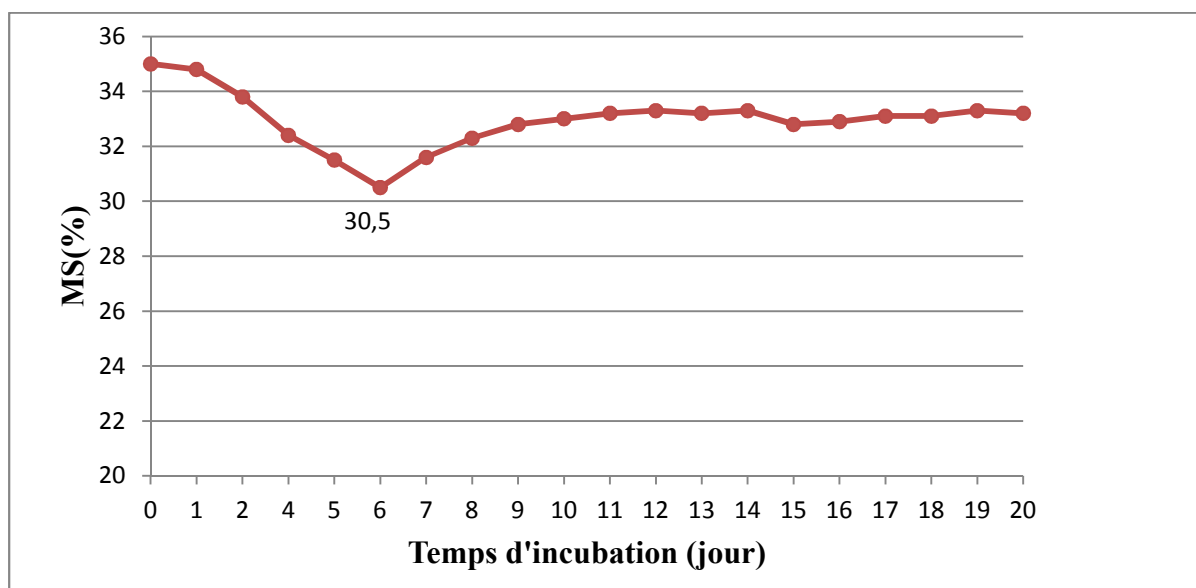


Figure 29: Evolution de la MS au cours de la FMS sur la coque d'arachide.

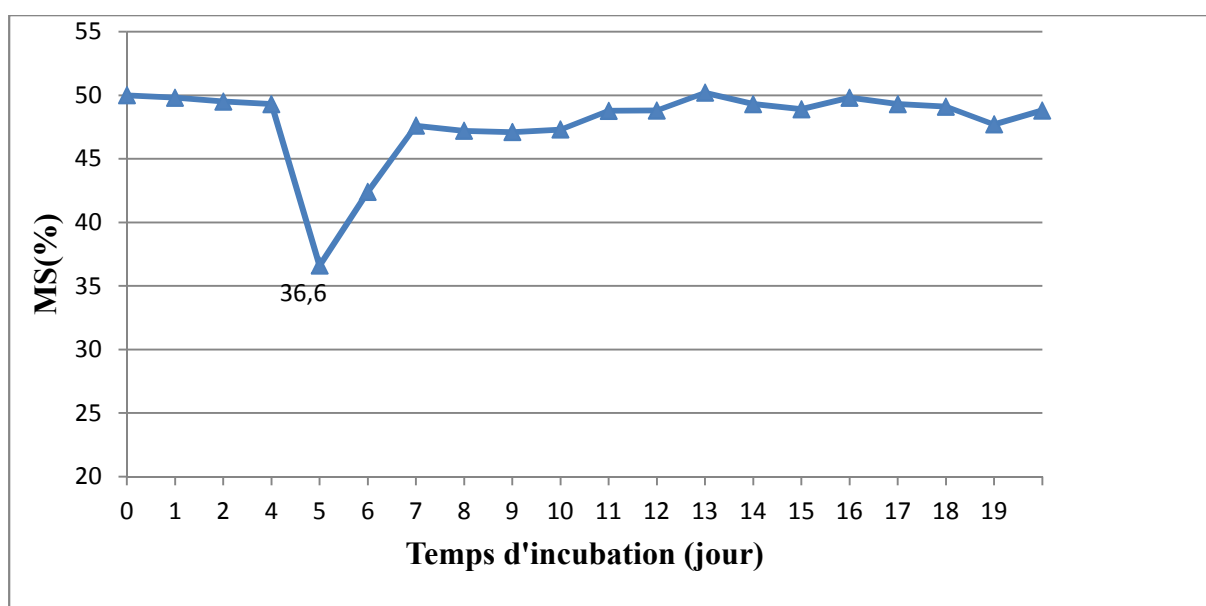


Figure 30: Evolution de la MS au cours de la FMS sur les noyaux de datte.

Dès le 2^{ème} jour, *T. reesei* croit rapidement sur CA résultant en une diminution rapide du taux de la MS atteignant un maximum de 30,5% au 6^{ème} jour, ce résultat est en accord avec **Weng et Sun, (2006)** et **Zhon-Tao et al., (2009)** qui rapportent une chute du taux de MS au cours de la phase exponentielle de croissance correspondant à une croissance rapide du champignon et une dégradation rapide du substrat de fermentation. Une diminution similaire est observée avec les ND mais plus tardivement, à partir du 4^{ème} jour pour atteindre un taux minimal de 36,6% au 5^{ème} jour.

La croissance visible de *Trichoderma sp.* débute après 48 h sur la CA, tandis qu'elle nécessite au moins 96 h sur les ND. Cela est confirmé par une observation microscopique du substrat fermenté. Au cours de la fermentation, les granules du substrat sont partiellement digérés et remplacés par une masse poreuse de mycélium avec des résidus du substrat, ainsi l'aération peut être maintenue le long de la fermentation (**Raimbault et Alazard, 1980**).

Après la phase de germination, les hyphes de couleur blanche sont visibles et entourent les granules de substrat qui se trouvent collés les uns aux autres dans une masse solide (**Figure N° 31**). En effet, la mesure de la vitesse d'élongation apicale de notre souche sur milieu gélosé démontre une valeur relativement élevée, de l'ordre de 1.02 mm/h. Cette caractéristique constitue un paramètre très important en FMS permettant une colonisation rapide et facile du substrat de fermentation. Ce résultat est comparable avec celui rapporté par **Roussos (1985)**, qui a remarqué une vitesse élevée pour les souches du genre *Trichoderma* voisine de 1mm/h, cinq fois plus élevée que celle des souches d'*Aspergillus* (0,2mm/h).

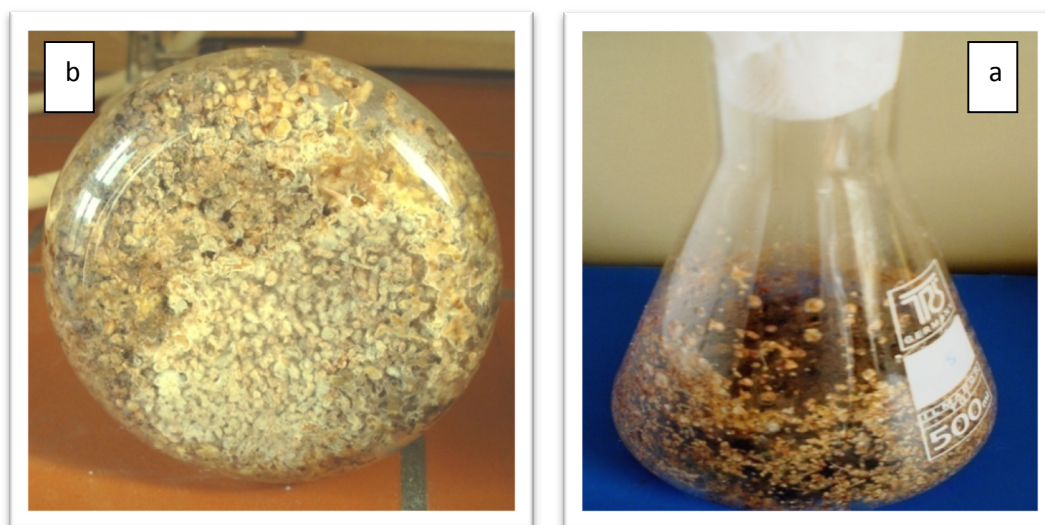


Figure 31 : Début de croissance mycélienne sur les deux substrats.

- a) Coque d'arachide
- b) noyaux de datte

Durant la 3^{ème} phase de la fermentation, on remarque une légère variation du taux de MS pour les deux substrats. Cette fluctuation pourrait être attribuée à la croissance mycélienne. Cette dernière semble ralentir à partir du 11^{ème} jour pour la CA, le ralentissement observé à partir du 7^{ème} jour s'avère précoce pour les ND. La dernière phase de la fermentation est caractérisée par un plateau qui correspond probablement à la phase stationnaire.

Contrairement à la CA qui reste plus au moins humide, les ND apparaissent secs et déshydratés à la fin de la culture, ce qui peut expliquer l'apparition précoce des spores de couleur verte couvrant la surface du substrat au 9^{ème} jour de la fermentation (**Figure N° 32**). Pour la CA la sporulation est plus tardive (13^{ème} jour).



Figure 32: Formation de conidies de couleur vertes sur les noyaux de datte

b) Le pH

Le suivi du pH au cours de la fermentation est réalisé après la mise en suspension du substrat fermenté dans de l'eau distillée.

Le pH d'une culture varie en fonction des activités métaboliques des micro-organismes. Il semble donc important de mesurer ce paramètre afin de suivre indirectement la croissance et de contrôler la production des cellulases en milieu solide (**Roussos et Annibal, 1984**). Les résultats obtenus sont illustrés dans la **figure 33**.

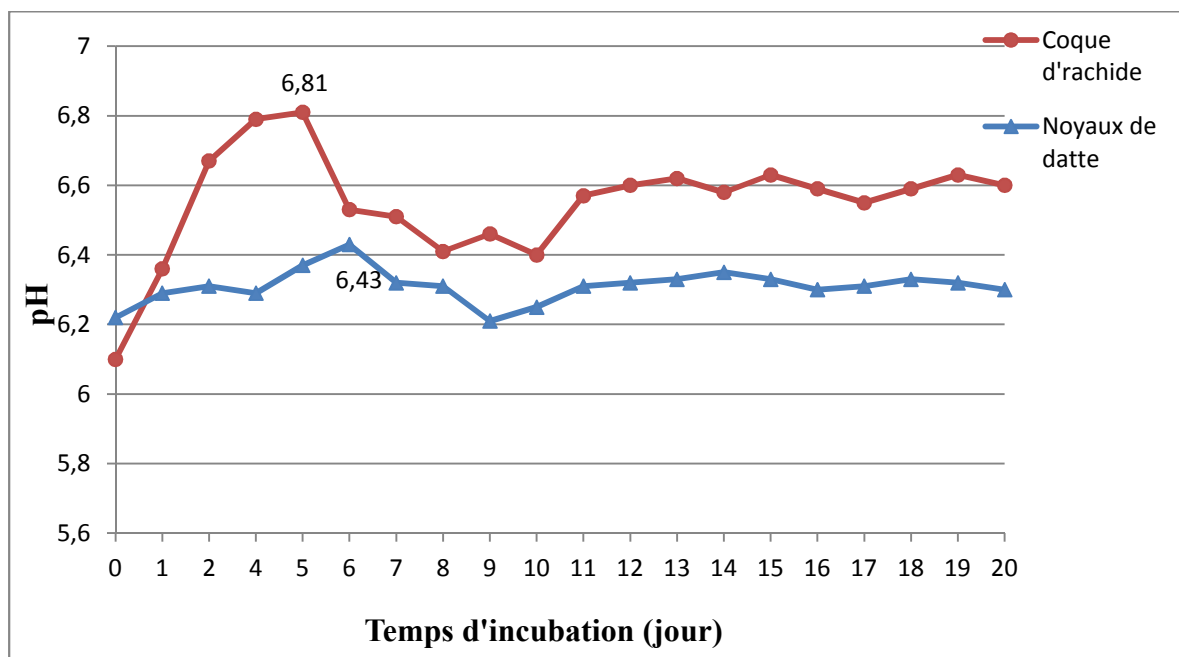


Figure 33 : Evolution du pH au cours de la FMS de *Trichoderma sp.* sur les deux types de substrats

Avec la souche *Trichoderma sp.* sur CA, on observe une augmentation progressive du pH dès le premier jour de la fermentation pour atteindre un maximum de 6,81 au 5^{ème} jour. Cette hausse est suivie d'une diminution jusqu'à atteindre une valeur de 6,40 au 10^{ème} jour. Au-delà le pH augmente légèrement puis se stabilise. Un profil similaire est remarqué pour le deuxième substrat avec un maximum de 6,43 au 6^{ème} jour et un minimum de 6,21 au 9^{ème} jour. A partir de 10^{ème} jour nous remarquons une légère alcalinisation du milieu.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Roussos et Rimbault (1982)**, qui ont distingué trois phases d'évolution du pH, lors de la culture de *T. harzianum* : une légère augmentation de 5 à 6,1 suivie d'une diminution rapide, la troisième phase est caractérisée par une alcalinisation du milieu. Selon ces auteurs, l'augmentation du pH au début de fermentation est due à la germination des spores et au début de la croissance du mycélium tandis que la diminution rapide du pH est liée à la croissance active du mycélium. Selon **Larpen (1990)**, la diminution du pH est peut être due à la production et la libération des métabolites acidogènes tels que l'acide citrique et acétique qui acidifient le milieu de culture.

Après l'arrêt de la croissance active du mycélium, dû à l'épuisement des nutriments du milieu, la troisième phase est caractérisée par une alcalinisation du milieu. Cette dernière phase correspond à l'autolyse du mycélium, au cours de laquelle les protéines sont

solubilisées et dégradées par des protéases. **Tang et al. (2004)** ont émis l'hypothèse que les ions ammonium NH_4^+ libérés durant cette étape contribueraient à l'augmentation du pH.

Dans le travail d'**Ouali et Tidjet (2012)**, une augmentation de pH a été constatée aussi pour une souche de *Trichoderma reesei* sur son d'orge, le pH atteignait une valeur de 8,55 au 8^{ème} jour de culture, au delà, le pH diminue. Le même profil a été rapporté par **Roussos (1987)**, lors de la culture d'une souche de *Trichoderma harzianum* sur le son de blé.

Selon **Raimbault (1998)**, la variation du pH du milieu dépend fortement du micro-organisme. En effet, le pH du milieu de culture d'*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* et *Rhizopus sp.* peut diminuer au dessous de 3,0 en particulier avec *A. niger* suite à une acidification du milieu. En revanche, d'autres types de mycètes, tels que *Trichoderma sp.* conduisent à une alcalinisation du milieu, c'est le cas aussi de *T. harzianum* (**Roussos (1987)**).

La nature du substrat également influence fortement la variation de pH, ceci est dû à l'effet tampon des matériaux lignocellulosiques. La diminution du pH au cours de la culture en milieu solide est compensée par le pouvoir tampon élevé du substrat, il n'est donc pas nécessaire de réguler le pH au cours de ce procédé (**Raimbault, 1998**).

2.4.2. Evolution des activités cellulaisiques

La **figure 34** illustre les cinétiques de l'activité papier filtre (cellulases totales) de *Trichoderma sp.* cultivée par fermentation solide sur les deux types de substrats. Pour les deux substrats, l'APfase commence à apparaître dans le milieu de culture après 24 heures d'incubation. Cette synthèse augmente progressivement pour atteindre un pic d'activité de **2,46 UI/g SPS** et **1,16 UI/g SPS** au bout du 7^{ème} jour de fermentation respectivement sur CA et ND, au delà, l'activité diminue pour les deux substrats.

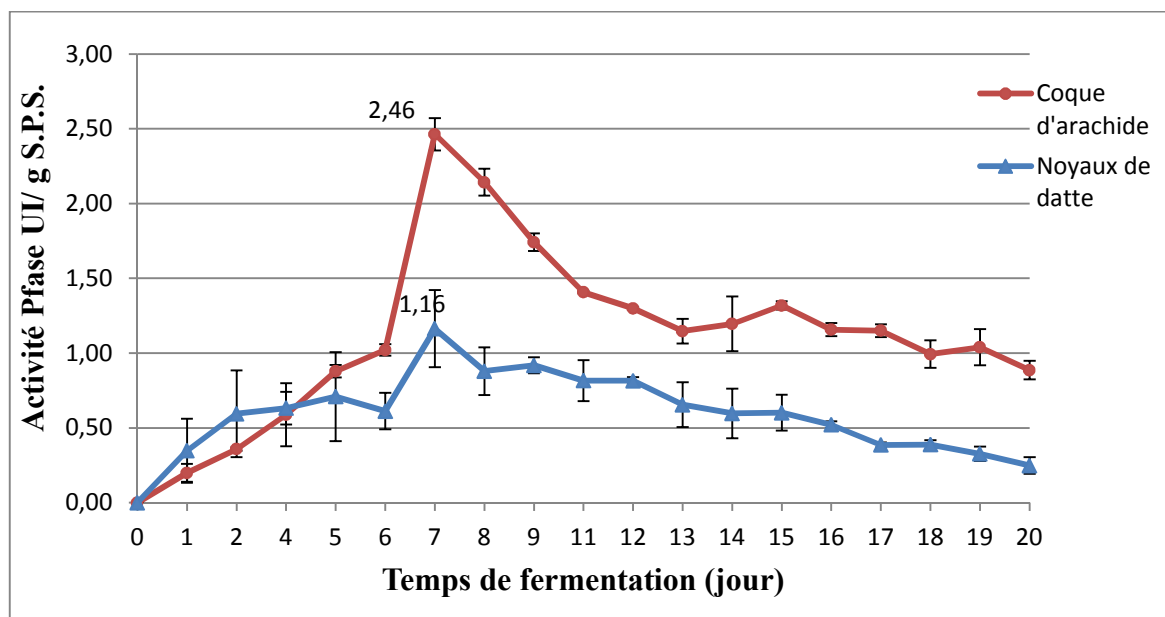


Figure 34 : Evolution des activités Pfases au cours de la FMS de *Trichoderma sp.* sur les deux substrats

La **figure 35**, montre que l'évolution de l'ACMCCase suit presque le même profil que celui de l'APfase pour les deux substrats. Le maximum d'activité est atteint au 7^{ème} jour de la fermentation avec respectivement **9,65** et **1,65** UI/g SPS pour la CA et ND.

On remarque que le maximum d'activités enzymatiques (CMCase et Pfase) sur les deux substrats est atteint au 7^{ème} jour. La même observation est faite par **Roussos (1998)** pour une souche de *T. harzianum* en FMS sur bagasse de canne à sucre.

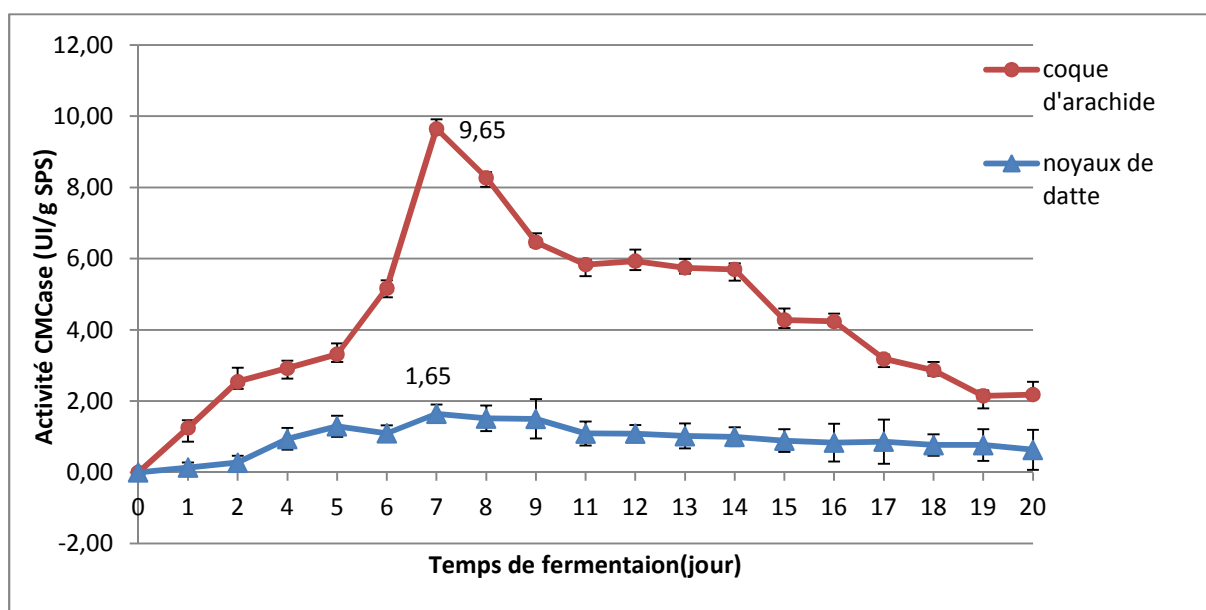


Figure 35 : Evolution de l'ACMCases de *Trichoderma sp.* par FMS sur les deux substrats.

Nos résultats sur coque d'arachide sont proches de ceux obtenus par **Bansal et al., (2012)** avec une souche d'*Aspergillus niger* sur 3 substrats lignocellulosique solides (bagasse, sciure de bois, paille de blé) non traités et en absence d'une source d'azote exogène. Les activités Pfases sont respectivement de **1,5 ; 2 et 2,8** UI/g SPS, alors que les activités CMCase **5 ; 1,8 ; 11,2** UI/g SPS.

De même pour une étude de **Santos et al., (2011)**, qui rapportent une activité Pphase maximale de **2.55** UI/g SPS après 4 jours de croissance, et une ACMCase de **7.26** UI/g SPS au 3ème jour de la croissance avec une souche d'*Aspergillus niger* sur déchets solides de mangue non traités, humidifiés uniquement avec de l'eau distillée sans rajout de source d'azote.

Quiroz-Castañeda (2009), en étudiant les cultures de pourritures blanches (*Bjerkandera adusta* et *Pycnoporus sanguineus*) sur la paille de blé ont montré des activités CMCases de **2.4** IU/mg SPS au 6^{ème} jour et de **1.4** IU/mg SPS au 8^{ème} jour respectivement.

Par ailleurs, il est difficile de comparer entre les résultats des activités cellulases rapportés par les différents auteurs en absence de conditions standards. En effet la production dépend de plusieurs facteurs, le microorganisme en question, les conditions de culture, les méthodes de dosage, etc...) (**Abo-State et al., 2010**).

Les valeurs obtenues dans notre étude sont relativement faibles par rapport à celles observées sur certains substrats celluloses qui ont subi un prétraitement et/ou une supplémentation en sources d'azote, qui semblent améliorer la production d'enzymes (**Shamala et Sreekantiah, 1986 ; Roussos, 1987**)

Le profil de production de cellulases de notre souche est similaire à celui rapporté par **Santos et al., (2011)** sur d'autres moisissures cellulolytiques. Ils notent une lente production au début de la fermentation suivie par une accélération jusqu'à atteindre l'activité maximale. La phase finale étant caractérisée par une diminution de la concentration du produit.

En effet, à la différence des cellulases bactériennes qui sont produites de manière constitutive, les cellulases fongiques sont induites en présence de cellulose comme seul source de carbone.

Il existe 3 étapes principales dans le mécanisme de régulation des cellulases (**Manabu et fusao, 2001**) :

- L'expression à bas niveau : la cellulose insoluble est incapable de provoquer une induction directe des cellulases, la synthèse de faibles quantités de cellulases libère des oligosaccharides solubles responsables du phénomène d'induction.
- Induction transrationnelle et sécrétion excessive : une fois les inducteurs internalisés, ils déclenchent une voie de médiation qui active la transcription des gènes cellulases.
- Répression catabolique : la dégradation de la cellulose libère du glucose facilement assimilable par le microorganisme, ce qui provoque une répression de la transcription. L'autre produit majeur de l'hydrolyse de la cellulose, le cellobiose, inhibe fortement la catalyse enzymatique par liaison aux cellulases provoquant un changement de conformation et un encombrement stérique (Zhao et al., 2003).

La diminution de l'activité cellulasiqye au-delà du pic, peut être due aussi à l'arrêt de la croissance et de la production en réponse de l'appauvrissement nutritif du milieu de culture (Shafique et al., 2009 cité dans Santos et al., 2011).

Selon Roussos et Raimbault (1982), la diminution de l'activité est due aussi à l'action des protéases libérées à la fin de la culture durant la phase d'autolyse du mycélium entraînant l'hydrolyse des cellulases par conséquent leur dénaturation.

Selon Roussos et Annibal (1984), l'évolution du pH est en relation avec la croissance du microorganisme et la production des cellulases.

Si nous représentons les cinétiques de l'évolution du pH des cellulases sur le même graphique (Figure N° 36 et 37) nous remarquons qu'il existe une corrélation entre les deux paramètres, par conséquent il semble important de suivre l'évolution du pH au cours de la FMS pour contrôler indirectement la production des cellulases.

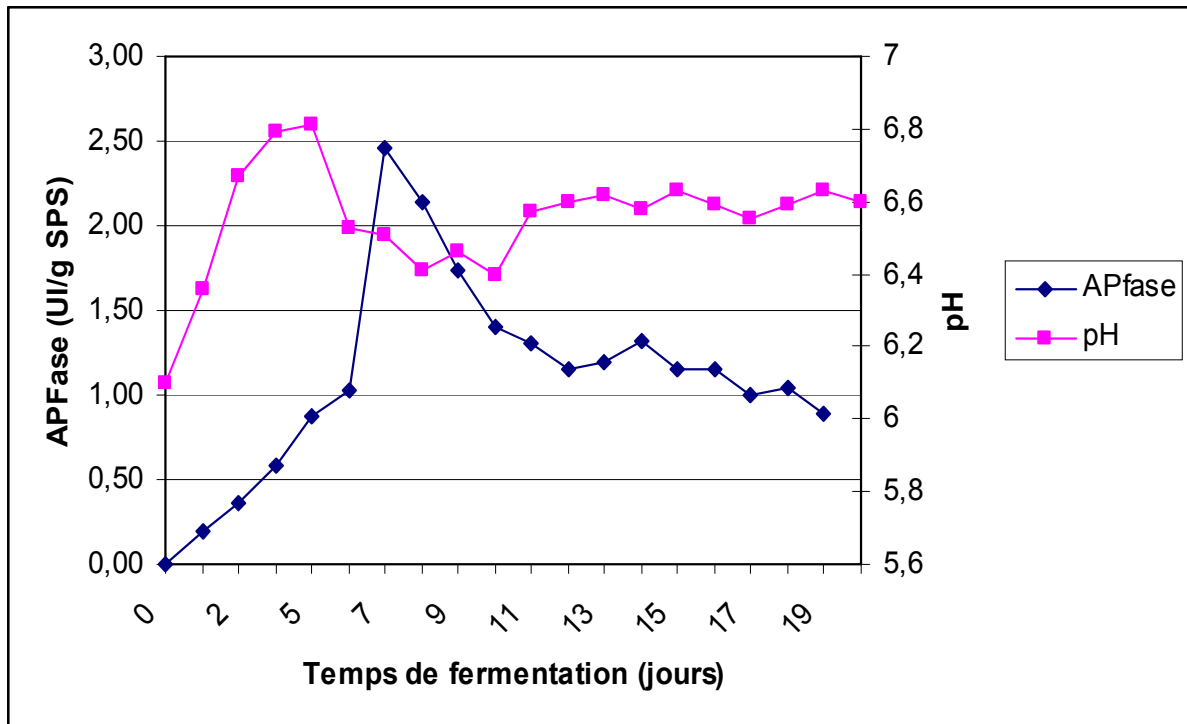


Figure 36 : Corrélation entre la production de cellulases et l'évolution du pH pour la CA

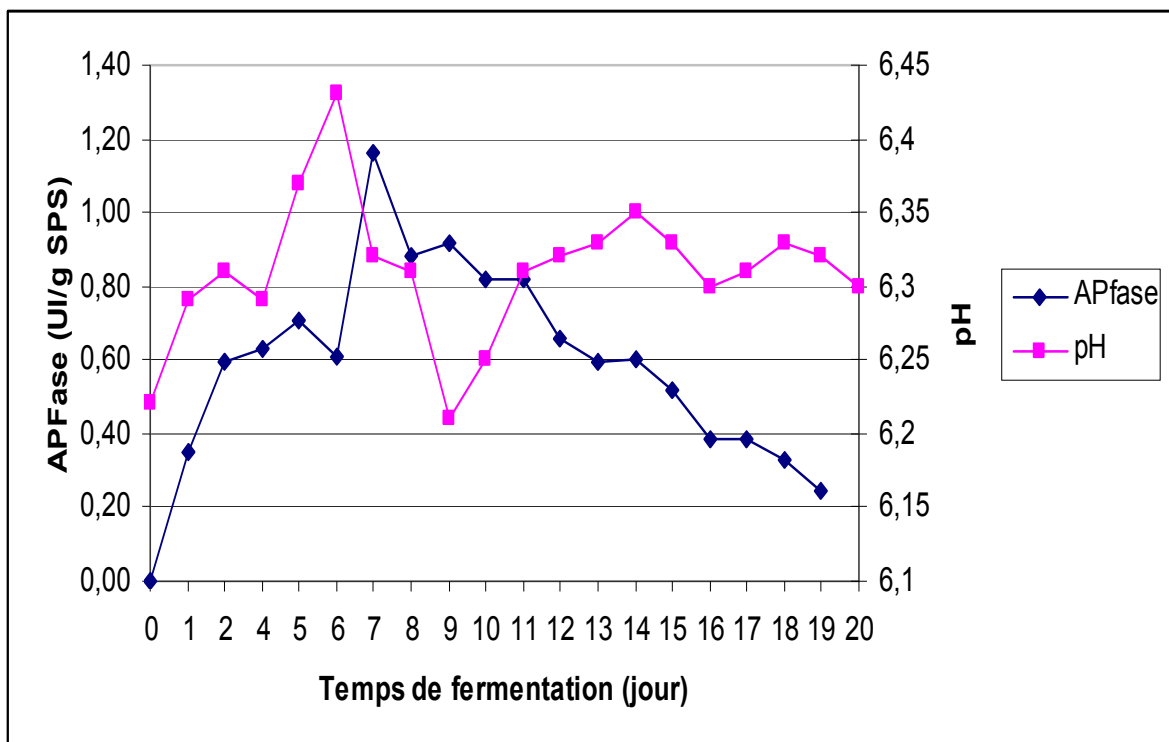


Figure 37 : Corrélation entre la production de cellulases et l'évolution du pH pour les ND

2.4.3. Etude comparative de la production de cellulases de la souche *Trichoderma sp.* sur les deux substrats

En comparant les résultats obtenus sur les deux types substrats, nous remarquons que notre souche présente une meilleure activité cellulosique (**2,46** UI PFase/g SPS) sur la CA par rapport aux ND (**1,16** UI PFase/g SPS).

L'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test HSD a montré une différence significative de production de cellulase sur les deux types de substrats.

D'après **Kang et al., (2004)**, la nature du substrat utilisé en fermentation solide s'avère inductrice et affecte d'une manière directe la synthèse des cellulases.

Kirk et Farrel (1987) cité dans **InuwaJa'afaru et Ezekiel Fagade (2007)** rapportent que les substrats complexes sont de faibles inducteurs de cellulases, probablement à cause de la présence de la lignine. Il est connu que la lignine protège physiquement la cellulose et la rend inaccessible à l'attaque des cellulase.

Selon **vyas et al., (2005)**, la coque d'arachide semble être un bon inducteur de la production des cellulases, probablement à cause de sa forte teneur en cellulose 55% (**Tableau N°3**). Dans leur étude **InuwaJa'afaru et EzekielFagade (2007)** ont remarqué que la coque d'arachide non traitée possède un meilleur pouvoir inducteur par comparaison avec le papier journal et la sciure de bois.

Les fibres de cellulose comportent aussi bien des régions cristallines qu'amorphes. L'adsorption de l'enzyme, principalement au niveau des régions amorphes et la formation du complexe (Enzyme-Substrat) est considérée comme étant une étape critique dans le processus d'hydrolyse de la cellulose (**Abo-State et al., 2010**). A noter néanmoins, que la proportion de cristallinité des microfibrilles est très variable chez les végétaux. Ainsi une meilleure production de cellulases sur la CA peut être expliquée par une adsorption efficace, elle peut être due aussi à sa richesse en régions amorphes.

Malgré sa faible teneur en lignine (11%), le noyau de datte semble être difficile à dégrader. Cela peut être du probablement sa la texture compacte et rigide remarquée principalement lors de son broyage. Cette rigidité reflète probablement un fort degré de cristallinité de la cellulose ce qui rend son attaque par les cellulases limité.

D'où l'intérêt du prétraitement pour ce type de substrats, qui vise à réduire le degré de cristallinité et à rompre les liaisons avec la lignine et les hémicelluloses qui empêchent l'accès des cellulases à la cellulose.

L'objectif de ce travail est d'isoler des souches de moisissures cellulolytiques performantes à partir des milieux naturels. La première étape a permis la sélection parmi les isolats d'une souche appartenant au genre *Trichoderma* qui présente une activité cellulasique appréciable sur milieu liquide (**0,287** UI PFase /ml et **1,134** UI CMCCase /ml). Cette souche présente une vitesse de croissance apicale relativement élevée de l'ordre de 1,02 mm/h ce qui constitue un avantage pour une colonisation rapide du substrat solide.

La deuxième étape consiste à cultiver la souche sur substrat solide dans le but de déterminer son potentiel enzymatique en fermentation solide et en même temps de sélectionner un milieu de production de cellulases en vue d'une valorisation à large échelle.

Le choix des substrats utilisés dans notre travail repose sur leur abondance, principalement dans la région sud du pays où sont localisées la majorité des cultures et des unités de transformation de dattes et d'arachides, par conséquent une disponibilité des déchets. Dans la littérature, peu de travaux traitent de la valorisation des noyaux de datte comme substrat en fermentation solide.

Les cultures en milieu solide présentent des avantages intéressants puisque les enzymes excrétées directement sur le substrat vont pouvoir l'hydrolyser avec plus d'efficacité. En retour les sucres réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse du substrat insoluble pourront être mobilisés rapidement par le microorganisme pour son développement.

Les résultats de la FMS sur les deux substrats montrent que la souche *Trichoderma sp.* (DK1) présente une meilleure production de cellulases sur la coque d'arachide par rapport aux noyaux de datte avec un ratio de **2** pour l'APfase et de **6** pour l'ACMCCase. Cela permet de conclure que la coque d'arachide peut éventuellement constituer un bon milieu de production, néanmoins, cette production peut être améliorée.

Dans le cas des substrats lignocellulosiques, les hémicelluloses et la lignine forment une matrice entourant la cellulose, la masquant ainsi des enzymes cellulolytiques. Un prétraitement des substrats solides semble ainsi être nécessaire pour rompre des liaisons lignine-cellulose-hémicelluloses. Cela aboutit à l'augmentation des zones amorphes (points d'attaque) de la chaîne glucidique, rend la cellulose plus accessible aux cellulases, et améliore les rendements.

Il est essentiel aussi de trouver un bon équilibre entre les qualités nutritionnelles et technologiques des matières premières, leurs prix et leurs disponibilités. Le substrat qui procure les nutriments nécessaires au développement du microorganisme est qualifié d'idéal, toutefois ces nutriments sont ajoutés dans le milieu en cas de déficience.

A l'issue de cette étude, il apparaît que la valorisation des coproduits de l'agriculture par une souche cellulolytique locale en FMS présente des avantages certains. A ce titre, d'autres investigations doivent être menées afin d'améliorer la production des cellulases. Il s'agit en occurrence de :

- L'optimisation des conditions de la fermentation solide : taux d'inoculation, humidité et pH initiaux, température d'incubation, pour un meilleur rendement de production.
- La réalisation du prétraitement des substrats pour déstructurer le complexe L.C.
- La recherche de facteurs de croissance, précurseurs et sources d'azote exogènes qui peuvent améliorer la croissance et la production.
- Rechercher d'autres activités enzymatiques du complexe lignocellulosique (hémicellulases et ligninases) parmi le reste des isolats de la collection.
- Le lancement d'une culture mixte de *Trichoderma sp.* avec une souche d'*Aspergillus* productrice de β -glucosidase pour un système enzymatique complet.

A

Abo-State M.A.M., Hammad A.I., Swelim M., Gannam R.B. (2010). Enhanced production of cellulase by *Aspergillus* spp. isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, **8**(4), 402-410.

Abu bakar N.K., Abd-Aziz S., Hassan M.A, Ghazali F.M. (2010). Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. *Biotechnology*, **9**(1), 73-78.

Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A. (2008). Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **4**(4), 354-366.

Andrianova T.V., Aproot A., Benny G.L., Berndt R., Kuyper T.W., Pando F., Roberts P.J., Vanky K. (2008). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. Edition: CAB international, Wallingford, UK, pp.29-36.

Assamoi A. A., Destain J., Thonart P. (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **13**(2), 281-294.

B

Bansal N., Tewari R., Soni R., Soni K.S. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*, **32**, 1341–1346.

Barreveld W.H. (1993). By-products of date packing and processing (chapitre4) dans: Date palm products, FAO agricultural services bulletin No.101, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Bauchop T. (1979). Rumen Anaerobic Fungi of Cattle and Sheep. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**(1), 148-158.

Bensmira S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebka de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt

industriel. Mémoire de magistère en biochimie–microbiologie appliquées. Université Mentouri-Constantine. Algerie,77p.

Bernfeld P. (1955). Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, **1**, 58-149.

Berry R.K., Dekker R.F.H. (1986). Fractionation of the cellulolytic enzymes produced by a species of *Monilia*; purification and properties of an extracellular B-D-glucosidase. *Carbohydrate research*, **157**, 1-12.

Bisaria V.S., Ghose T. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 90-104.

Boisset C., Frascini C., Schulein M., Henrissat B., Chanzy H. (2000). Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbio.*, **66**, 1444-1452.

Boudechiche L., Araba A., Tahar A., Ouzrout R. (2009). Etude de la composition chimique des noyaux de dattes en vue d'une incorporation en alimentation animale. *Livestock Research for Rural Development*, **21**(5), 111-120.

Boureima D. (1981). Effets des traitements chimiques sur la digestibilité in vitro de la matière sèche et de la matière organique des résidus de récolte. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur du développement rural, option élevage. Alabama agricultural and mechanical university, Alabama, U.S.A, 10p.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254.

Breton A. (1990). Principes et méthodes d'étude des moisissures, dans : Botton B. et *al.*, Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ème édition Masson. Collection Biotechnologies, Paris, pp.11-32.

Brijwani K., Oberoi H.S., Vadlani P.V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, **45**, 120–128.

Bushuev V.N., Gudkov A.T., Liljas A., Sepetov N.F. (1989). The flexible region of protein L12 from bacterial ribosomes studied by proton nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem.*, **264**, 4498-4505.

C

Calvet H. (1977). La coque d'arachide en alimentation animal, institut sénégalais de recherche agricole, *ISRA*, 1-5.

Chen H., Hayn M., Esterbauer H. (1992). Purification and characterization of two extracellular betaglucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1121**, 54-60.

Couto S.R., Sanroman M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, **76**, 291–302

D

Dashtban M., Schraft H., Qin W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, **5**(6), 578-595.

Davies G., Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, **3**(9), 853-859.

Dekker R.F.H., Lindner (1979). Bio-utilization of lignocellulosic waste materials- A review. *South african journal of science*, **75**, 56-71.

Didderen I., Destain J., Thonart P. (2008). Le bioéthanol de seconde génération : la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Edition: Les presses agronomiques de Gembloux. pp.18-20, 23p.

Doi R.H. (2008). Cellulases of Mesophilic Microorganisms Cellulosome and Noncellulosome Producers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1125**, 267–279.

Durand A. (1983). Les potentialités de la culture à l'état solide en vue de la production de microorganismes filamenteux. *Les Colloques de l'INRA*, **18**, 263-277.

Durand A et Chereau D. (1988). A new pilot reactor for solid state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnology and Bioengineering*. **31**, 476-486.

Durand A. (2003). Bioreactor designs for solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering journal*, **13**, 113-125.

Duchiron F., copinet E. (2011). Fermentation en milieu solide. Document (Doc. BIO 620) université de Reims,1-16.

E

Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. (2008). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition . *Bioresource Technology*, **99**, 457–462.

F

Fagerstam L.G., Petersson L.G. (1979). Cellulolytic complexe of *Trichoderma reesei* QM 9414. *FEBS letters*, (**98**)2, 363-367.

Feller C., Ganry F. (1982). Décomposition et humidification des résidus végétaux dans un agro-système tropical. III- Effet du compostage et de l'enfouissement de divers résidus de récolte sur la répartition de la matière organique dans différents compartiments d'un sol sableux. Document CNRA, Bambey, 13p.

G

Garg N., Garg K. L., Mukerji K. G. (2010). Microscopic examination of yeast and moulds, dans: Laboratory manual of food microbiology. Edition: I. K. International Publishing house pvt . New Delhi, India, pp.104-106.

Gassara F., Brar S.K., Tyagi R.D., Verma M., Surampalli R.Y. (2010). Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, **49**, 388–394.

Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Khan, J., Awasthi, M.K., Sarsaiya, S., (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnol. Res. Int.*, **1**, 1–8.

Gervais P., Molin P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13**, 85-101.

Ghose, T.K. (1977). Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulase substances. *Adv. Biochem. Eng.*, **6**, 39-76.

Ghose T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* **59**(2), 257–268.

Graminha E.B.N., Gonçalves A.Z.L., Pirota R.D.P.B., Balsalobre M.A.A., Da Silva R., Gomes E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, **144**, 1–22.

Guler C., Buyuksari U. (2011). Effect of production parameteres on the physical and mechanical properties of particale boards made from peanut hull. *Bioressources*, **6**(4), 5027-5036.

H

Habibi Najafi M. B. (2011). Date Seeds: A Novel and Inexpensive Source of Dietary Fiber. *IPCBE*, **9**, 323-326.

Hamaili K. Benkerrou F. (2012). Etude comparative de la croissance et production de cellulase par *Bjerkandera sp.* sur le son et la paille de blé. Mémoire d'ingénieur en génie biologique, faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Béjaia-Abd Rahman Mira, Algérie, 35p.

Hankin L., Anagnostakis S. L. (1977). Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro organisms. *Journal of General Microbiology*, **98**(1), 109–115.

Hart T.D., De Leij F.A.A.M., Kinsey G., Kelley J., Lynch J.M. (2002). Strategies for the isolation of cellulolytic fungi for composting of wheat straw. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18**, 471–480.

Henrissat B., Teeri T.T., Warren R.A.J. (1998). A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.*, **425**, 352-354.

Herculano P.N., Lim D. M. M., Fernandes M. J. S., Neves R. P., Souza-Motta C. M. (2011). Isolation of Cellulolytic Fungi from Waste of Castor (*Ricinus communis*). *Curr Microbiol.*, **62**, 1416–1422.

Hofrichter M. (2002). Lignin conversion by manganese peroxidase. *Enzy. Microbiol. Technol.*, **(30)4**, 454-466.

Holtzapple M., Cognata M., Shu Y., Hendrickson C. (1990). Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 275-287.

Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., Howard S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, **2(12)**, 602-619.

Hyde K.D., Jones E.B.G., Leano E., Pointing S.B., Poonith A.D., Vridjmoed L.L.P. (1998). Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and conservation*, **7**, 1147-1161.

I

InuwaJa’afaru M., EzekielFagade O. (2007). Cellulase production and enzymatic hydrolysis of some selected local lignocellulosic substrates by a strain of *A. niger*. *Research journal of biological sciences*, **2(1)**, 13-16.

K

Kader A. J., Omar O., Feng L. S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the Bario highlands, Sarawak. *Asean review of biodiversity and environmental conservation*, **3**, 20-28.

Kang S.W., Park Y.S., Lee J.S., Hong S.I., Kim S.W. (2004). Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillusniger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **91**, 153–156.

Karlsson J., Siika-aho M., Tenkanen M., Tjerneld F. (2002). Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.*, **99**, 63-78.

Karmakar M., Rey R.R. (2011). Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research journal of microbiology*, **6**(1), 41-53.

Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr Microbiol.*, **57**, 503–507.

Kim S., Dale B.E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, **26**, 361-375.

Kögel-Knabner, I. (2002). The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, **34**, 139-162.

Krishna C. (2005). Solid-state fermentation systems - an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, **25**, 1-30.

Kuhad R. C., Gupt R., Singh A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 1-9.

L

Lakshmikanth (1990). Cellulose degradation and cellulase activity of five cellulolytic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **6**, 64-66.

Larpent J.-P (1990). Moisissures utiles, dans : Botton B. et al., Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ème édition Masson. Collection Biotechnologies, Paris, pp.292-314.

Latifian M, Hamidi-Esfahani Z., Barzegar M. (2007). Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, **98**(18), 3634-3637.

Leonowicz A., Mastuszezwska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wojtas-wasaillewska M., Cho N., Hofrichter M., Rogalski J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology*, **27**, 175-185.

Linker M., Teeri T. (1996). The cellulose binding domain of the major cellobiohydrolase of

Trichoderma reesei exhibits true reversion and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proc.Nat. Acad. Sci.*, **93**, 12251-12255.

Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. (2002). Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**(3), 506-739.

M

Madan M., Thind K.S. (1998). Physiology of fungi. Edition : A.P.H publishing corporation, New Delhi, pp.57-99.

Maheshwari R. Bharadwaj G., Bhat M.K. (2000). Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**(3), 461-488.

Makut M. D., Godiya E. M. (2010). A survey of cellulolytic mesophilic fungi in the soil environment of Keffi Metropolis, Nasarawa State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, **4**(21), 2191-2195 .

Malloch D. (1997). Moulds isolation, cultivation and identification. University of Toronto. <http://labs.csb.utoronto.ca/moncalvo/malloch/Moulds/Identification.html>

Manabu S., Fusao T. (2001). Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**(4), 305–311.

Mandels M. et Weber J. (1969). The production of cellulases. dans Cellulases and Their Applications; Hajny G. et al.; Advances in Chemistry; American Chemical Society: Washington, 392p.

Martins D.A.B., Do prado H.F.A., Leite R.S.R., Ferreira H., De Sousa M.M. (2011). Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. *Integrated Waste Management*, **2**, 320-360.

Masenda E. (2004). Groundnut shells, Chapter 5: Substrate, dans Mushroom growers' handbook 1. Edition: Aidabase Technology, Zimbabwe, pp.120-122.

Mienda B.S., Idi A., Umar A. (2011). Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. *Research in Biotechnology*, **2**(6), 21-26.

Moloney A.P., Hachett T.J., Considine P.J., Coughlan J.P. (1983). Isolation of mutant of *talaromyces emersonii* CBS 814-70 with enhanced cellulose activity. *Enzym.Microbio.Technol.*, **5**, 260-264.

Mussatto S.I., Ballesteros L.F., Martins S., Teixeira J.A. (2012). Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. *Industrial Waste*, 6-27.

N

Nakasone K.K., Peterson S.W., Jong S-C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures, dans: Gregory M. Mueller *et al.*, Biodiversity of fungi – Inventory and Monitoring Methods. Edition: Elsevier Press, New York, pp.37-47

O

Office nationale des statistiques(2010). L'Algérie en quelques chiffres, Edition 2010, résultats 2007-2009. **40**, 32p.

Onsori H., Zamani M. R., Motallebi M., Zarghami N. (2005). Identification of over producer strain of endo-1,4- glucanase in *Aspergillus* Species: Characterization of crude carboxymethylcellulase. *African Journal of Biotechnology*, **4**(1), 26-30.

Ogier JC, Ballerini D, Leygue JP, Rigal L et Pourquoié J. (1999). Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil et Gas Science and Technology*, **54**(1), 67-94.

Oriol E. (1987). Croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu solide : importance de l'eau et de l'activité de l'eau. Thèse de doctorat en microbiologie. Institut national des sciences appliquées de Toulouse, France, 10p.

Ouali S., Tidjet S., (2012). Production de cellulases par *Bjerkandera sp* et *Trichoderma reesei* par fermentation en milieu solide. Mémoire d'ingénieur en génie biologique, faculté des sciences de la nature et de la vie, université -Abd Rahman Mira de Béjaia, Algérie, 30p.

P

Palacios-Orueta A., Chuvieco E., Parra A., Carmona-Moreno C. (2005). Biomass burning emissions: a review of models using remote-sensing data. *Environ Monit Assess.*, **104**, 189-209.

Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., Nigam P. (1999). Solid state fermentation of industrials inzymes. *Current science*, **77**(1), 149-163.

Perez S., Samain D. (2010). Structure and ingeeniring of cellulose. *Advences in carbohydrate chemistry and biochemistry*, **46**, 26-100.

Pouzet D. (2011). Production durable de biomasse : la lignocellulose des poacées. Edition Quae, Paris, p.108.

Pitt J.I., Hocking A.D. (2009). Fungi and food spoilage. 3ème Edition: Springer, New York, pp.53-353.

Q

Quiroz-Castañeda R.E, Balcázar-López E, Dantán-González E, Martinez A, Folch-Mallol J, Martínez Anaya C.(2009). Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnopus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, **12**(4), 1-8.

R

Rahardjo Y.S.P., Tramper J., Rinzema A. (2006). Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, **24**(2), 161-179.

Raimbault M., Alazard D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 199-209.

Raimbault M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, **1**(3), 1-15.

Reguant J, Rinaudo M (1999). Etude bibliographique sur les matériaux issus de la biomasse végétale. Rapport CNRS, pp.1-164.

Ridley B. L., O'Neill M. A. Mohnen D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, **57**, 929-967.

Ropars M., Marchal R., Pourquie J., Vandecasteele J.P. (1992). Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. *Bioresource Technology*, **42**, 197-204.

Roussos S. (1982). Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et nutritionnels des champignons imparfaits. *Cah. ORSTOM Sér. Biol.*, **45**, 25-34.

Roussos S., Raimbault M. (1982). Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. I- Screening des souches cellulolytiques. *Ann. Microbiol.*, **133(a)**, 455-464.

Roussos S., Raimbault M. (1982). Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. II- production de cellulases de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu liquide. *Ann. Microbiol.*, **133(b)**, 465-474.

Roussos S., Hannibal L. (1984). Valorisation biotechnologique de la bagasse par la production au niveau pilote d'enzymes de champignons filamenteux. Compte Rendu Final d'une Recherche, *Fonds documentaire ORSTOM*, 1-48.

Roussos, S. (1985). Croissance de *T. harzianum* par FMS: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de Doctorat en sciences naturelles, Université Provence, Marseille France, 18p., 67p.

Roussos S., Hannibal L., Durand A., Diez M., Saucedo G., Montet D. et Graille J. (1994). Enrichissement en protéines du tourteau de coprah : sélection de champignons filamenteux en FMS. *Oléagineux*, **49(5)**, 235-247.

Roussos S. (1998). Sugarcane used in solid state fermentation for cellulases production. In: Raimbault M., Soccol C.R., Chuzel G. (ed.), International training course on solid state fermentation. Montpellier : ORSTOM, pp.139-150.

Ryu D.D.Y., Kim C., Mandels M. (1984). Competitive adsorption of cellulases components and its significance in a synergistic mechanism. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 488-496.

S

Saint-Germain P.D.G. (2013). Identification des champignons d'importance médicale - stage de laboratoire. Institut national de santé publique, 1-55.

Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, **27**, 185–194.

Santos T.C. Cavalcanti Renata SI, Bonomo Nivio C.F, Marcelo Franco B.S. (2011). Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango as substrate. *Ciência Rural*, **41**(12), 2210-2216.

Saradouni N. (1994). Isolement et sélection d'une souche de moisissure lignocellulolytique thermophile performante : étude de son activité enzymatique. Mémoire magister en sciences biologiques. institut de biologie, Université de Tizi-ouzou, , Algérie, 84p.

Saucedo-Castaneda G. (1991). Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivé sur support solide. Thèse doctorat en Sciences des Aliment. sciences et techniques du Langued, Université Montpellier II, France, pp.50-52

Schäfer T., Borchert T.W., Nielsen V.S. (2007). Industrial Enzymes. *Adv Biochem Engin. Biotechnol*, **105**, 59–131.

Shahriarinour M., AbdWahab M.N., Ariff A., Mohamad R. (2011). Screening isolation and selection of cellulolytic fungi from oil palm empty fruit bunch fibre. *Biotechnology*, **10**(1), 108-113.

Shamala T.R., Sreekantiah K.R. (1986). Production of cellulases and D-xylanase by some selected fungal isolates. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 178–182.

Sobal M., Martínez-Carrera D., Rio B., Roussos S., (2002). Screening of edible mushrooms for polyphenol degradation and tannase production from coffee pulp and coffee husk. dans: Roussos, S., Soccol C.R., Pandey A., Augur C. Edition: New Horizons in Biotechnology, Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp.89-95.

Srisodsuk M., Rainikainen T., Panttila M., Teeri T.T. (1993). Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20756-20761.

T

Tang J.-C., Kanamori T., Inoue Y., Yasuta T., Yoshida S. Katayama A. (2004). Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Process Biochemistry*, **39**, 1999-2006.

Terebiznik M.R., Pilosof A.M.R. (1999). Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. *Biotechnology Techniques*, **(13) 3**, 215-219.

V

Vidaud C., Rousses S., Raimbault M., Deschamps F. (1982). Effet de divers prétraitements sur l'accessibilité de la cellulose de la paille de blé aux cellulases de *Trichoderma harzianum* *Cahier. O.R.S.T.O.M., sér. Biol.*, **46**, 17-23.

Vincken J-P., Keizer A., Beldman C., Voragen A.G.J. (1995). Fractionation of Xyloglucan Fragments and Their Interaction with Cellulose. *Plant Physiol.*, **108**, 1579-1585.

Vyas A., Vyas D., Vyas K.M. (2005). Production and optimization of cellulases on groundnut shell by *Aspergillus terreus* AV49. *Journal of scientific and industrial research*, **64**, 281-286.

W

Weng X-Y., Sun J-Y. (2006). Kinetics of biodegradation of free gossypol by *Candida tropicalis* in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **(32)3**, 226-232.

Wiley J.H., Atalla R.H. (1987). Band assignments in the raman spectra of cellulose. *Carbohydrate Research*, **160**, 113-429.

Wood T.H., McCrae S.I., Macfarlane C.C. (1980). The Isolation, Purification and Properties of the Cellobiohydrolase Component of *Penicillium funiculosum* Cellulase. *Biochem. J.*, **189**, 51-65.

Wood T.M., McCrae S.I., Macfarlane C.C. (1980). The isolation, purification and properties of the cellobiohydrolase component of *Penicillium funiculosum* cellulase. *Biochem. J.*, **189**, 51-65.

Z

Zhang Y.P., Lynd R.L. (2004). Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Non complexed Cellulase Systems. *Biotechnology and bioengineering*, **(88)**7, 797-824.

Zhang P.Y.H., Hong J., Ye X. (2009). Cellulase Assays, dans *Biofuels: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Edition: Jonathan R. Mielenz, vol. **581**, pp.213-231.

Zhao Y., Wu B., Yan B., Gao P. (2004). Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. *Science in China Ser. C Life Sciences*, **47**(1), 18-24.

Zhong-Tao S., Lin-Mao T., Cheng L., Jin-Hua D. (2009). Bioconversion of apple pomace into a multienzyme bio-feed by two mixed strains of *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, **12**(1), 1-13.

Annexe I : milieux de culture

1. Gélose à l'extrait de malt (MEA) (Saint-Germain, 2013)

Extrait de malt..... 20 g
Peptone..... 1 g
Glucose..... 20g
Agar..... 20 g
Eau distillée (qsp.) 1 litre
pH final 5,6.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Ne pas stériliser plus longtemps, car ce milieu deviendra doux sur le chauffage prolongé ou répété.

2. Gélose Pomme de terre, dextrose, agar (PDA) (Saint-Germain, 2013)

Pomme de terre.....250g
Glucose.....20g
Agar..... 20g
Eau distillée (qsp.) 1 litre
pH final 5.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

3. Gélose sélective d'isolement CMC-Agar (Abu bakar et al., 2010)

NaNO₃2g
KH₂PO₄1g
MgSO₄1g
KCl..... 0,5g
CuSO₄ 0,001g
MnCl₂..... 0,001g
ZnSO₄ 0,005
CMC..... 2,5g
Agar.....16g

Eau distillée (qsp.).....1 litre.

pH final 5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

4. Milieu gélosé de criblage (Kasana et al., 2008)

carboxymethylcellulose (CMC) sel de sodium..... 2g

NaNO₃2g

K₂HPO₄1g

MgSO₄0.5g

KCl.....0.5g

Peptone.....0.2g

Agar.....17g

Eau distillée (qsp.)..... 1 litre

pH final 5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

5. Milieu Mandels et Weber (Mandels et Weber, 1969)

K₂HPO₄2g

(NH₄)₂SO₄1.4g

Urée.....0.3g

MgSO₄ • 7H₂O..... 0.3g

CaCl₂0.3 g

FeSO₄ • 7 H₂O.....5.0mg

MnSO₄ • H₂O.....1.56mg

ZnSO₄ • 7 H₂O.....1.4mg

CoCl₂.....2.0mg

Eau distillée (qsp.).....1 litre.

La source de carbone étant 1% de CMC

Ajuster le pH à 5

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 min.

Annexe II : Réactifs et tampon

1. Lactophénol (Breton et *al.*, 1990)

Phénol cristallisé	10g
Acide lactique pure (qsp.).....	10 ml
Glycérol.....	20ml
Eau distillée.....	10ml

Dissoudre le phénol à chaud dans de l'eau, puis ajouter l'acide lactique et le glycerol.

Ce liquide de mouillage peu volatil empêche le dessèchement de la préparation microscopique pour plusieurs semaines.

2. Réactif DNS (Ghose, 1987)

DNS.....	10g
NaOH.....	16g
Tartrate double de sodium et de potassium.....	300g
Eau distillée (qsp.).....	1 litre

Le tartrate est ajouté par petites quantités avec un Léger chauffage (50°C) si nécessaire pour éviter la formation des grumeaux insolubles.

La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée à l'abri de la lumière dans un flacon couvert d'aluminium.

3. Tampon citrate de sodium (50 mM; pH 4.8) (Zhang et *al.*,2009)

- Tampon citrate (1 M, pH 4.5) :

Acide citrique monohydraté.....	21g
NaOH (pour ajuster le pH à 4,5).....	5 à 6g

Eau distillée (qsp.).....100 ml

- Tampon citrate (50 mM, pH 4.8):

Diluer le premier tampon (1 M, pH 4.5) par l'ajout de 19 fois le volume en eau distillé, ajuster le pH à 4,8 avec la soude si nécessaire.

4. Solution de Lugol bactériologique (Iodo-iodure de potassium)

I₂1g

KI.....2g

Eau distillée (qsp.).....300 ml

Annexe III : Matériels analytiques

Tableau 14 : Marque commerciales du matériels analytiques

Matériel	Marque
Balance analytique	OHOUS
Bain marie agitateur	Memmert
Balance	Scout pro
Centrifugeuse	Sigma
Etuve	Memmert
Four Pasteur	Heraeus
Loupe binoculaire	Carl ZEISS
Micropipettes	Biocontrol, Eppendorf
Microscope optique	Carl ZEISS
Mixeur	Moulinex
pH mètre	HANNA pH 210
Plaque agitatrice chauffante	VELP scientifica
Spectrophotomètre UV -visible	Shimadzu UV mini. 1240
Vortex	VELP scientifica
Haute à flux laminaire	Faster
Cellule de comptage	Malassez
Pied à coulisse	

Annexe IV : Courbes d'étalonnages

Tableau XV : Gamme étalon pour le dosage de l'APfase (solution mère de glucose 10g/ l).

Dilution	[Glu] mg/ml	Dilution 1/3	X1	X2	X3	ABS _{540 nm} Moyenne	Ecartype
1//9	1,111	0,37033333	0,23	0,214	0,217	0,22033333	0,0085049
1//7	1,428571	0,47619033	0,337	0,344	0,364	0,34833333	0,0140119
1//5	2	0,66666667	0,473	0,48	0,488	0,48033333	0,00750555
1//3	3,333	1,111	0,798	0,823	0,821	0,814	0,01389244
1//2	5	1,66666667	1,17	1,186	1,178	1,178	0,008
1//1,5	6,7	2,23333333	1,435	1,428	1,378	1,41366667	0,0310859
1//1,25	8	2,66666667	1,607	1,6	1,61	1,60566667	0,0051316

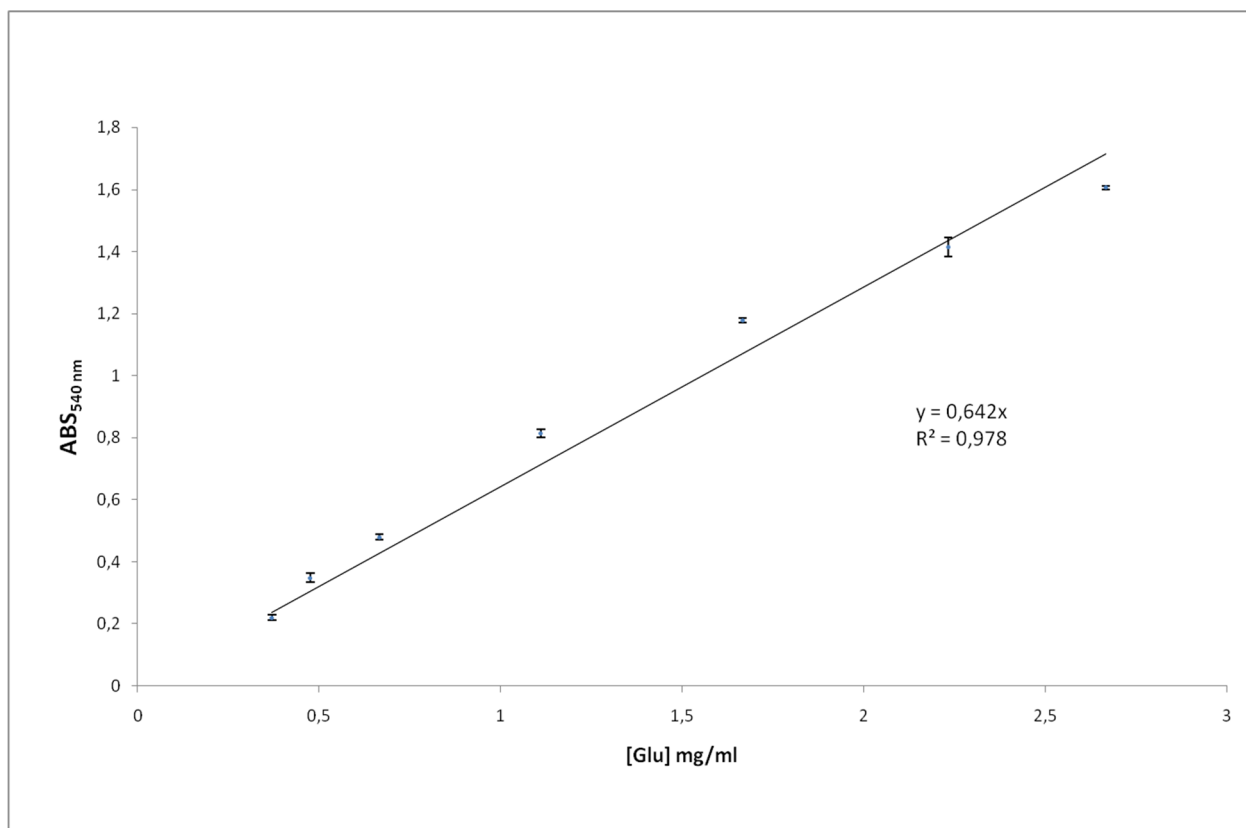
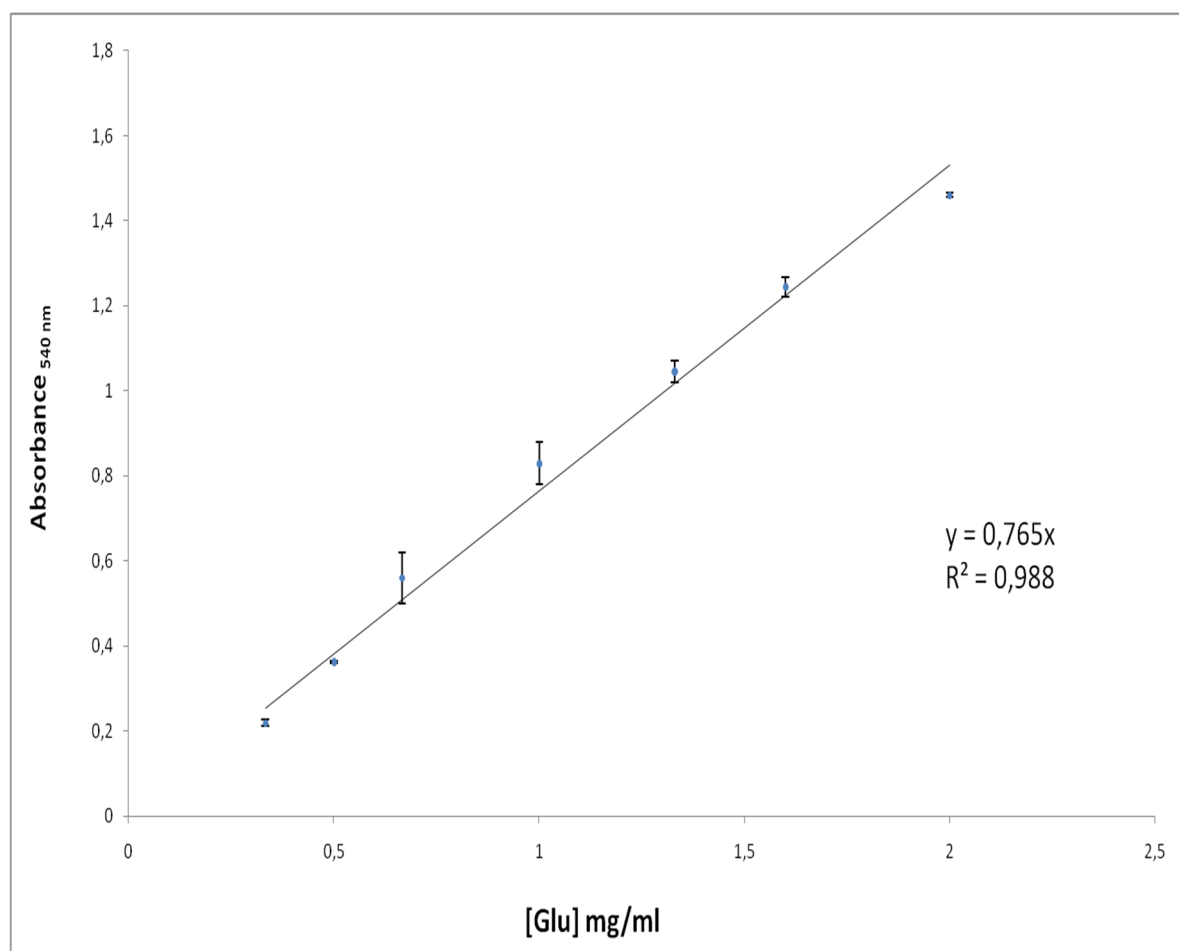


Figure 39 : Courbe d'étalonnage pour le dosage du Glucose (10g/ l).

Tableau XVI : Gamme étalon pour le dosage de l'ACMCase (solution mère de glucose 2g/

Dilution	[Glu] mg/ml	X1	X2	X3	Abs 540 nm Moyenne	Ecartype
1//6	0,333	0,214	0,228	0,217	0,220	0,007
1//4	0,500	0,360	0,366	0,363	0,363	0,003
1//3	0,666	0,516	0,628	0,536	0,560	0,060
1//2	1,000	0,887	0,800	0,802	0,830	0,050
1//1,5	1,330	1,031	1,032	1,075	1,046	0,025
1//1,25	1,600	1,240	1,270	1,225	1,245	0,023
1,0	2,000	1,465	1,455	1,459	1,460	0,005

**Figure 40 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage du Glucose (2g/l).

Abstract: In this study, molds which degrade cellulose, isolated from natural environment, were isolated. Isolates able to grow on agar medium in the presence of CMC as sole carbon source and energy were subjected to a first semi-quantitative screening using Lugol method. This helped to classify them on the basis of their cellulolytic index. A second quantitative screening on liquid medium was used to select the most efficient isolates.

Isolate DK1, identified as a strain belonging to the genus *Trichoderma*, was selected as the best producer with activities (PFase **0.287** IU/ml, CMCase **1.134** IU/ml) on Mandels and Weber medium.

The cellulolytic potential of this strain is estimated by solid fermentation on two agricultural wastes, peanut shells and date stones. Culture conditions were as follows: temperature of Incubation 30° C, initial pH 6, inoculation rate 5.10⁷ spore/g SDW, initial moisture 65% and 50% respectively for groundnut hulls and date stones.

Kinetics of some cultural parameters, pH, dry matter as well as the production of cellulases were followed all along the fermentation.

The results showed that peanut shell is a good inducer of cellulases production with a maximum of APfase **2.46** IU/g SDW at seventh day of fermentation against **1.16** IU/ g SDW for date stones.

Key words: Mold, Screening, *Trichoderma sp.*, Cellulose, Cellulases, Solid State Fermentation.

Résumé : La présente étude consiste à isoler à partir des milieux naturels, des moisissures qui dégradent la cellulose. Des isolats capables de croître sur milieu gélosé en présence de CMC comme seule source de carbone et d'énergie sont soumis à un premier criblage semi-quantitatif par la méthode au Lugol. Cela a permis de les classer sur la base de leurs indices cellulolytiques. Un deuxième criblage quantitatif sur milieu liquide a permis de sélectionner les isolats les plus performants.

L'isolat **DK1**, identifié comme étant une souche appartenant au genre *Trichoderma*, a été sélectionné comme étant le meilleur producteur avec une activité PFase de **0,287** UI/ml et CMCase de **1,134** UI/ml sur milieu Mandels et Weber.

Le potentiel cellulolytique de cette souche a été estimé par fermentation solide sur deux coproduits de l'agriculture, les coques d'arachides et les noyaux de dattes. Les conditions de cultures sont les suivantes : température d'incubation 30°C, pH initial 6, taux d'inoculation 5.10⁷ spore/g SPS, humidité initiale 65% et 50% respectivement pour les coques d'arachides et les noyaux de dattes.

Les cinétiques de certains paramètres de culture ; pH, matière sèche ainsi que celles de la production de cellulases ont été suivies tout au long de la fermentation.

Les résultats ont montré que la coque d'arachide est un bon inducteur de production de cellulases par rapport au noyau de datte avec un maximum d'activité PFase de **2,46** UI/g SPS au 7^{ème} jour de la fermentation contre **1,16** UI/g SPS pour les noyaux de dattes .

Mots clefs : Moisissures, Criblage, *Trichoderma sp.*, cellulose, cellulases, Fermentation Milieu Solide.

المخلص: في هذه الدراسة ، قمنا بعزل فطريات ليفية قادرة على تفكيك مادة السليلوز انطلاقا من أوساط طبيعية مختلفة.

الغريبة الأولية لفطريات المجموعة على وسط صلب سمح بترتيبهم انطلاقا من القدرة على تحليل مادة الكربوكسي ميثيل سليلوز. في

مرحلة ثانية من الدراسة تمكنا من انتقاء العزلة DK1 الأفضل انتاجا لإنزيم السليلاز على وسط سائل بفاعلية 0.287 و.ع/ملل.

أظهرت نتائج التصنيف أن هذه الأخيرة تنتمي إلى نوع *Trichoderma*

قمنا باختبار قدرها على انتاج انزيم السليلاز على نوعين من بقايا الصناعات الغذائية (قشور الفول السوداني، نواة التمر)

باستعمال طريقة التخمر على وسط صلب.

قمنا بتتبع تطور بعض إعدادات الزراعة مثل المادة الجافة، فعالية انزيم السليلاز، pH.

أظهرت النتائج أن قشور الفول السوداني هي أفضل محفز لإنتاج هذه الإنزيمات بفاعلية 2.46 و.ع/غ مادة جافة، بالمقارنة مع نواة

التمر 1.16 و.ع/غ مادة جافة.

كلمات مفاتيح : عزل، غريبة ، *Trichoderma* ، فطريات، سليلوز، إنزيمات السليلاز، تخمر على وسط صلب.