

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Béjaia**

*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Microbiologie*  
*Spécialité : Biotechnologie Microbienne*



**Réf :.....**

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

***Production d'enzymes lignocellulolytiques  
par les champignons filamenteux***

Présenté par :

**Bouchene Zina & Ramdani Amina**

Soutenu le : **22 septembre 2021**

Devant le jury composé de :

|                       |            |              |
|-----------------------|------------|--------------|
| Mr Djoudi Ferhat      | MCA        | Président    |
| Mr Bettache Azzedinne | MCA        | Encadreur    |
| Mme Boucherba Nawel   | Professeur | Examinatrice |

Année universitaire : 2021 / 2022

## REMERCIEMENTS

*En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.*

*Nous tenons à remercier sincèrement monsieur Mr BETTACHE AZZEDINE, qui en tant qu'encadreur, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nos remerciements vont à madame BOUCHERBA NAWEL et monsieur DJOUDI FERHAT qui nous ont fait l'honneur d'évaluer le présent mémoire.*

*Nos remerciements vont également à toute l'équipe de LMA en particulier à Nassima et Mounia.*

## DÉDICACES

*Je dédie ce modeste travail à*

*Mes très chers parents, source de vie, d'amour et d'affection. Je vous aime.*

*A ma chère sœur et mon cher frère, source de joie et de bonheur*

*A toutes mes tantes et oncles, source d'espairs et de motivation*

*A tous mes amis, particulièrement Yasmine.*

*A Zina, ma chère binôme.*

*Amina*

*Je dédie ce travail :*

*A ma chère mère*

*A mon cher père*

*Qui n'ont jamais cessé de m'épauler ainsi que pour leur soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études. Plus particulièrement à ma Maman qui m'a beaucoup encouragé tout au long de mon parcours, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*A mon adorable petite sœur*

*A mes chers amis qui m'ont aidé et soutenu dans tous les moments vécus.*

*A Toi chère Amina pour ton entente et ta sympathie.*

*Zina*

# **Sommaire**

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique .....</b>                 | <b>3</b>  |
| <b>1. La biomasse lignocellulosique.....</b>                       | <b>3</b>  |
| 1.1. La cellulose .....  | 3         |
| 1.1.1. Structure de la cellulose.....                              | 4         |
| 1.2. l'hémicellulose .....   | 6         |
| 1.3. La lignine .....  | 7         |
| 1.4. Les principaux déchets et co-produits lignocellulosiques..... | 8         |
| 1.5. Valorisation de la biomasse .....                             | 8         |
| <b>2. Les enzymes lignocellulolytiques .....</b>                   | <b>9</b>  |
| 2.1. Cellulase.....  | 9         |
| 2.1.1. Structure des cellulases.....                               | 10        |
| a. Les endoglucanases .....  | 11        |
| b. Les exoglucanases (cellobiohydrolasrs).....                     | 11        |
| c. Les $\beta$ -glucosidases (BGL) .....                           | 11        |
| 2.1.2. Synergie des cellulases .....                               | 12        |
| 2.2. Les xylanases .....   | 12        |
| 2.3. Les ligninases .....  | 13        |
| <b>3. Les champignons lignocellulolytiques .....</b>               | <b>14</b> |
| 3.1. Généralités sur les champignons .....                         | 14        |
| 3.2. Activité lignocellulolytique des champignons .....            | 14        |
| 3.2.1. Les cellulases fongiques .....                              | 15        |
| 3.2.2. Les hémicellulases fongiques .....                          | 15        |
| <b>4. Application industrielle des cellulases .....</b>            | <b>16</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>1. Origine et purification des souches fongiques.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2. Criblage des isolats .....</b>   | <b>17</b> |
| 2.1. Criblage sur milieu de culture solide (gélosé) à base de carboxymethylcellulose (Test qualitatif) ..... | 17        |
| 2.2. Criblage sur milieu de culture liquide (Test quantitatif).....  | 18        |
| <b>3. Mesure des activités hydrolytiques .....</b>   | <b>19</b> |
| 3.1. Activité CMC <sub>Case</sub> .....  | 19        |
| 3.2. Activité papier filtre (FPase) .....  | 20        |
| 3.3 Activité xylanolytique .....   | 21        |
| <b>4. Identification de la souche performante.....</b>   | <b>22</b> |
| 4.1. Observation macroscopique.....  | 22        |
| 4.2. Observation microscopique .....   | 22        |
| <b>5. Caractérisation enzymatique du surnageant brut de la souche performante .....</b>                      | <b>23</b> |
| 5.1. Effet de la température .....   | 23        |
| 5.2. Effet du pH.....  | 23        |
| 5.3. Effet des ions métalliques .....  | 23        |
| 5.4. Thermostabilité .....   | 23        |
| <b>Chapitre 3 : Résultats et discussion .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>1. Sélection des isolats cellulolytiques performants .....</b>  | <b>24</b> |
| 1.1. Sélection sur milieu gélosé (Test qualitatif) .....   | 24        |
| 1.2. Sélection sur milieu liquide agité (Test quantitatif) .....   | 26        |
| 1.2.1. Criblage quantitatif en milieu agité de type CMC <sub>Case</sub> et FPase.....                        | 26        |
| 1.2.2. Criblage quantitatif en milieu agité de type xylanolytique .....                                      | 29        |
| <b>2. Identification de la souche S49 .....</b>  | <b>30</b> |
| 2.1. Etude macroscopique et microscopique .....  | 30        |
| 2.1.1. Etude macroscopique.....  | 30        |
| 2.1.2. Etude microscopique .....   | 31        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3. Caractérisation de l'enzyme brut de la souche S49 .....</b>            | <b>34</b> |
| 3.1. Effet de la température sur l'activité endoglucanase .....              | 34        |
| 3.2. Effet du pH sur l'activité endoglucanase .....                          | 35        |
| 3.3. Effet des ions et réactifs chimiques sur l'activité endoglucanase ..... | 36        |
| 3.4. Thermostabilité en présence du substrat. ....                           | 38        |
| <b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....</b>                              | <b>40</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>                                     | <b>42</b> |
| <b>ANNEXES</b>   |           |

## Liste des abréviations

**ACMC** : Activité carboxyméthylcellulase.

**APFase** : Activité papier filtre.

**BGs** :  $\beta$ -glucosidase.

**CBD**: Cellulose Binding Domaine.

**CBH** : Cellobiohydrolase.

**CBM** : Domaine de liaison au substrat.

**CD** : Domaine catalytique.

**CMC** : Carboxyméthyl cellulose.

**DNS** : 3,5-acide dinitrosalicylique.

**DP** : Degré de polymérisation.

**h** : Heure.

**IC** : Indice cellulolytique

**PDA** : Potato-Dextrose-Agar.

**s** : Seconde.

**S** : Substrat.

**Sp** :Espèce.

**T (°C)** : Température en degré Celsius.

**U** : Unité enzymatique.

**UI** : Unité internationale.

## Listes des Figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Structure de la biomasse lignocellulosique (Van <i>et al.</i> , 2010).....                                       | 3  |
| <b>Figure 2</b> : La cellulose (Brown, 2004) .....   | 4  |
| <b>Figure 3</b> : Représentation schématique des zones cristallines et amorphes de la Cellulose (Pérez <i>et al.</i> , 2002) ..... | 5  |
| <b>Figure 4</b> : Organisation de la structure fibrillaire de la cellulose (Chávez Montes, 2008) .....                             | 5  |
| <b>Figure 5</b> : Les précurseurs de la lignine : (a) alcool coumarylique- (b) alcool coniférylique et (c) alcool sinapylique..... | 7  |
| <b>Figure 6</b> : Enzymes intervenant dans la dégradation de la cellulose (Lynd <i>et al.</i> , 2002).                             | 10 |
| <b>Figure 7</b> : Schéma explicatif des étapes du criblage sur milieu gélosé. ....   | 18 |
| <b>Figure 8</b> : Schéma explicatif des étapes du criblage sur milieu agité.....   | 19 |
| <b>Figure 9</b> : Images du screening sur milieu gélosé représentant les zones d'hydrolyses...                                     | 24 |
| <b>Figure 10</b> : Indices cellulolytiques de 55 isolats sur milieu CMC-agar. ....   | 25 |
| <b>Figure 11</b> : Comparaison activités CMCCase et FPase U/ml.....  | 28 |
| <b>Figure 12</b> : Aspect microscopique de la souche <i>Trichoderma</i> (Botton <i>et al.</i> , 1990) .....                        | 32 |
| <b>Figure 13</b> : Effet de la température sur l'Activité endoglucanase U/ml. ....   | 34 |
| <b>Figure 14</b> : Effet du pH sur l'activité endoglucanase U/ml. ....   | 35 |
| <b>Figure 15</b> : Profil de thermostabilité des endoglucanases de la souche S49.....  | 38 |
| <b>Figure 16</b> : Courbe d'étalonnage du dosage glucose (CMCase). ....Annexe III.1  |    |
| <b>Figure 17</b> : Courbe d'étalonnage du dosage glucose (FPase). ....Annexe III.2   |    |
| <b>Figure 18</b> : Courbe d'étalonnage du dosage xylose.....Annexe III.3   |    |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau 1</b> : Composition en biomasse de certaines matières lignocellulosiques (Sun and Cheng, 2002)..... | 8  |
| <b>Tableau 2</b> : Application industrielle des cellulases. ....   | 16 |
| <b>Tableau 3</b> : Les étapes du dosage de l'activité CMCCase (Ghose, 1987). ....                              | 19 |
| <b>Tableau 4</b> : Les étapes du dosage de l'activité FPase.....   | 20 |
| <b>Tableau 5</b> : Activités CMCases U/ml. ....  | 27 |
| <b>Tableau 6</b> : Activités FPases U/ml. ....   | 28 |
| <b>Tableau 7</b> : Activités xylanolytiques U/ml. ....   | 29 |
| <b>Tableau 8</b> : Performances cellulolytiques et xylanolytiques de la souche S49. ....                       | 29 |
| <b>Tableau 9</b> : Principaux caractères cultureux de l'isolat S49 sur PDA.....                                | 31 |
| <b>Tableau 10</b> : Caractères microscopiques de la souche S49. ....   | 32 |
| <b>Tableau 11</b> : Effet des ions métalliques et réactifs chimiques sur l'activité enzymatique.....           | 37 |

# **Introduction**

## INTRODUCTION

Au début du XXème siècle, l'essor de l'exploitation des ressources énergétiques fossiles a permis d'accéder à de nouvelles sources d'énergies bon marché, notamment pour la révolution industrielle. Tout au long de ce siècle, l'utilisation de ces énergies fossiles ont continué leur expansion provoquant une mutation dans nos sociétés et une amélioration considérable du niveau de vie des populations dites développées (**Prevot, 2013**). Cependant, la raréfaction prévisible et l'augmentation inéluctable des prix des combustibles fossiles et l'accumulation progressive de gaz à effet de serre persistant dans l'atmosphère provoquant un réchauffement climatique planétaire, donne naissance à une nouvelle révolution industrielle.

**Rifkin (2012)** proposa d'établir le concept d'une "économie décarbonée", c'est-à-dire l'utilisation d'une nouvelle énergie renouvelable dont la biomasse lignocellulosique. En effet, la biomasse lignocellulosique est la source de carbone renouvelable la plus abondante de la planète (**Ferreira, 2008**) ; sa richesse en cellulose, hémicellulose et lignine fait d'elle le parfait substitut. Son hydrolyse par les enzymes lignocellulotiques joue un rôle crucial pour la production de carburants de substitution.

Un grand nombre d'organismes vivants ont développé des capacités lignocellulolytiques comme les protozoaires ou certaines bactéries, mais les plus importants sont les champignons (**Ferreira, 2008**). 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 (**Roussos et Rimbault, 1982**). Parmi ces champignons, les champignons filamenteux des phylum ascomycètes et basidiomycètes offrent un vaste répertoire de gènes codant pour une grande combinaison de mécanismes enzymatiques impliqués dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique, donnant naissance à de nouveaux composés utilisés dans des applications

importantes tels que les domaines alimentaires, pharmaceutiques, cosmétique et des biocarburants. Leur rôle dans l'hydrolyse de la cellulose a été étudié et développé dans diverses revues de synthèse (**Ghose, 1977 ; Ryu et Mandels, M., 1980**).

Le but de notre travail consiste à étudier les enzymes lignocellulosiques produites par les champignons filamenteux et leur intérêt biotechnologique.

Le manuscrit rapporte principalement :

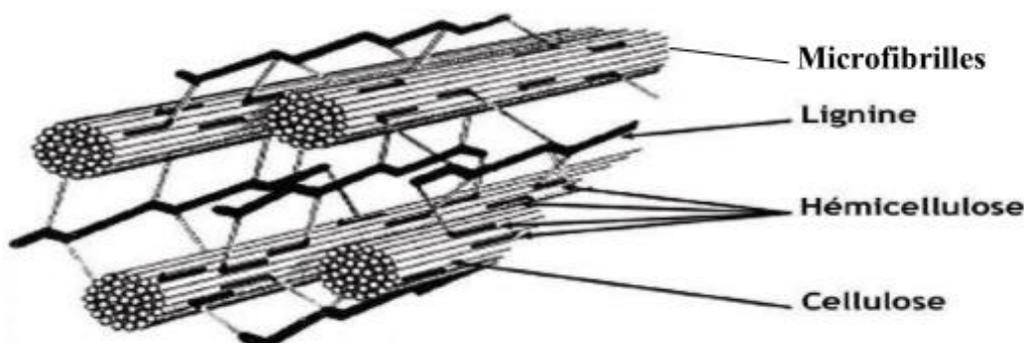
- Une synthèse bibliographique sur la biomasse lignocellulosique, les enzymes lignocellulolytiques et leurs applications, ainsi que quelques généralités sur les moisissures, sources d'enzymes cellulolytiques.
- Une partie expérimentale qui relate : **(1)** un criblage de souches productrices d'activités CMCases sur milieu solide et liquide, **(2)** les mesures des activités hydrolytiques (CMCase, FPAase et xylanolytique), **(3)** l'identification morphologique de la souche sélectionnée et **(4)** la caractérisation de l'enzyme brut.

# **Synthèse bibliographique**

# Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

## 1. La biomasse lignocellulosique

La lignocellulose est le composant majeur de la biomasse, comprenant environ la moitié de la matière végétale produite par photosynthèse (appelée également photo masse) et représentant la ressource organique renouvelable la plus abondante dans le sol (**Sánchez, 2009**). Elle se compose de trois types de polymères, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine qui sont fortement imbriquées et liés chimiquement par des forces non covalentes et par des réticulations covalentes (Figure 1) (**Pérez et al., 2002**). En moyenne, la biomasse lignocellulosique contient 40 à 60 % de cellulose, 20 à 40 % d'hémicellulose et 10 à 25 % de lignine (**Van parijs et al., 2010**). Ces derniers peuvent être hydrolysés en sucres monomères puis à leurs tours fermentés en éthanol (**Chandel et al., 2010**).

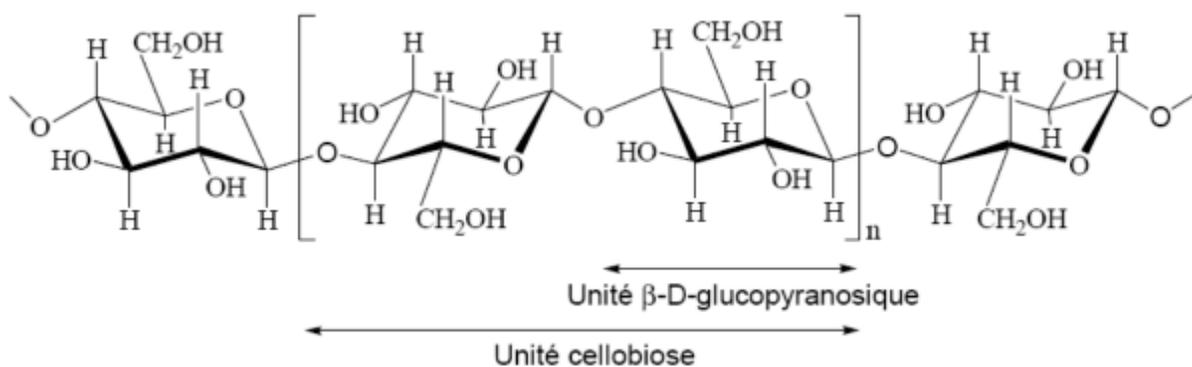


**Figure 1:** Structure de la biomasse lignocellulosique (**Van et al., 2010**).

### 1.1. La cellulose

La cellulose est le constituant structural des plantes. C'est la molécule organique et le polymère le plus abondant sur terre. Elle représente plus de la moitié de la biomasse. Chaque année la nature produit plus de  $10^{10}$  tonnes de cellulose. Cette macromolécule linéaire est constituée d'unités  $\beta$ -D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons  $\beta$ -1,4 glycosidiques, sa formule chimique est  $C_6H_{10}O_5$  (**Alarcón-Gutiérrez, 2007 ; Balat, 2011**).

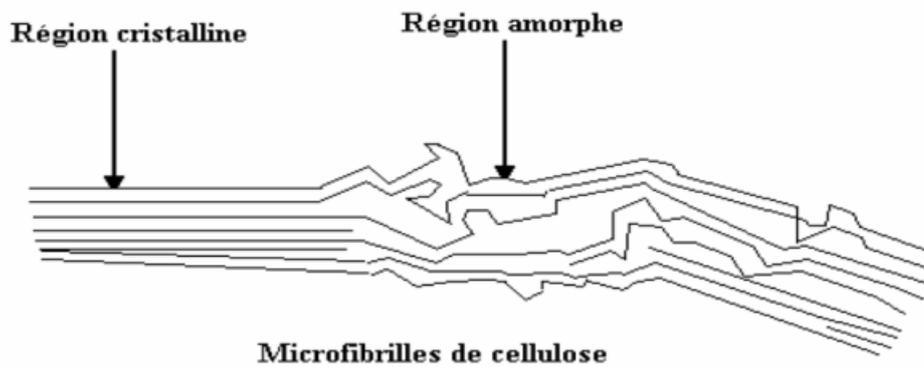
Le degré de polymérisation (DP) moyen de la cellulose, correspond au nombre de motifs de  $\beta$ -D-glucoypyranose, il varie de 8000 à 15000 unités de glucose (**Brown, 2004**). Sa structure cristalline a été déterminée par diffraction des rayons X et par des méthodes basées sur la polarisation du rayonnement infrarouge. Elle se présente sous la forme de microfibrilles de 2 à 6 nm de diamètre, agglomérées en fibrilles de diamètre compris entre 60 et 360 nm et de longueur infinie (Figure 2 ) (**Khelfa et al., 2008**).



**Figure 2 : la cellulose (Brown, 2004)**

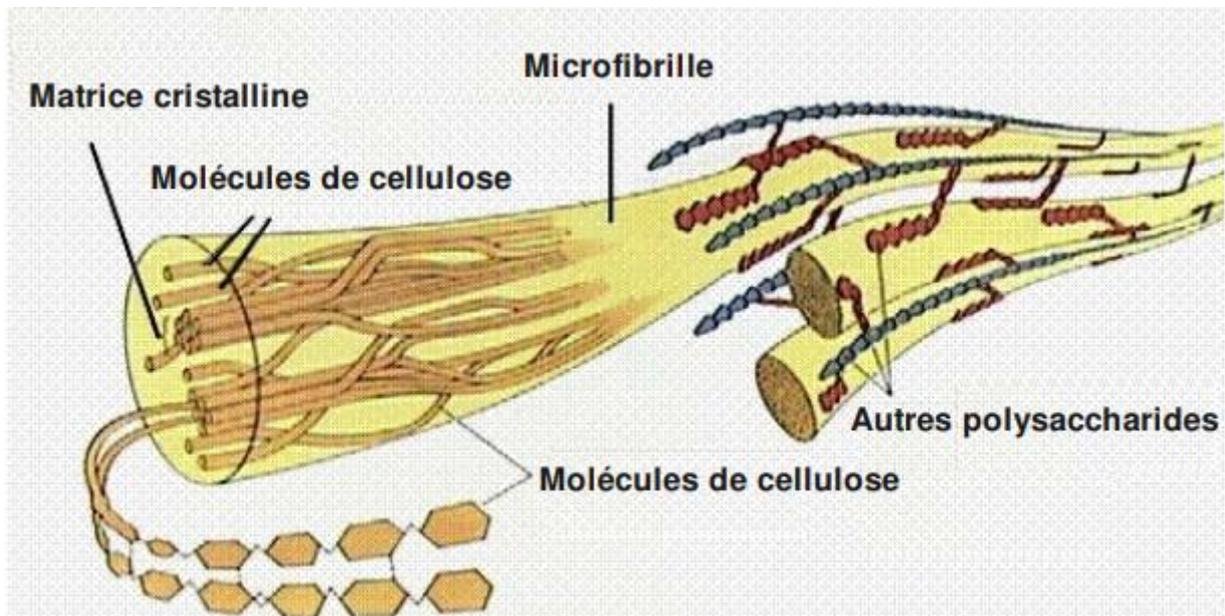
### 1.1.1. Structure de la cellulose

La cellulose est le constituant structural des plantes. Elle fournit la contribution majeure de la résistance mécanique des végétaux (**Newman, 1994**). Sa phase amorphe (Figure 3) possède un grand nombre de groupements hydroxyles susceptibles de former des liaisons hydrogènes avec d'autres molécules comme l'eau (**Yang et al., 2007**). Dans les régions cristallines, la formation d'un nombre important de liaisons hydrogène intra et intermoléculaires confère à la cellulose une résistance aux solvants et une stabilité à haute température qui empêche la fusion (**Cuissinat et Navard, 2006**).



**Figure 3:** Représentation schématique des zones cristallines et amorphes de la cellulose (Pérez *et al.*, 2002).

Cette structure naturelle de la cellulose consiste en des microfibrilles composées de 30 à 40 chaînes de cellulose dont l'agrégation forme des fibrilles puis des fibres rigides (Figure 4) (Chavez Montes, 2008).



**Figure 4 :** Organisation de la structure fibrillaire de la cellulose (Chavez Montes, 2008).

## 1.2. L'hémicellulose

Le deuxième composant de la lignocellulose est l'hémicellulose qui constitue 25 à 30% de la matière sèche totale (**Balat, 2011**). Les hémicelluloses sont des polysaccharides, composés de plusieurs oses simples et de résidus glycosyl liés en  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). La conformation identique de la cellulose et des hémicelluloses permet des liaisons fortes et non covalentes et se caractérisent par leur solubilité dans des solutions alcalines et leur insolubilité dans l'eau (**Wertz, 2011**).

Le rôle biologique le plus important des hémicelluloses est leur contribution au renforcement de la paroi cellulaire par interaction avec la cellulose, et dans certaines parois, avec la lignine. Ces macromolécules sont des polysaccharides qui présentent une grande diversité structurale. Ces derniers sont principalement composés de : D-xylose, D-mannose D-galactose, D-glucose, L-arabinose, acide 4-O-méthyl glucuronique, acide D-galacturonique et acide D-glucuronique. Ces différents sucres sont reliés par des liaisons 1 $\rightarrow$ 4 glycoside (**Pérez et al., 2002**). Pour la plupart des plantes, l'hémicellulose la plus importante est un xyloglucane (**Reiter et al., 1997**).

Les hémicelluloses peuvent être classées en plusieurs grands groupes :

- Les xyloglucanes qui ont un squelette de résidus glucose (Glc) sur lequel se greffent des résidus xylose (Xyl), galactose (Gal) et fucose (Fuc); trouvés dans de nombreuses parois primaires. Les xyloglucanes ont été particulièrement étudiés car ils sont essentiels pour déterminer l'expansibilité de la paroi primaire, et l'expansion des parois est un des sujets fondamentaux de la recherche sur les parois végétales (**Cosgrove, 2005**).

- Les xylanes qui incluent les glucuronoxylanes (GX), les arabinoxylanes (AX), les glucuronoarabinoxylanes (GAX), les homoxylanes.

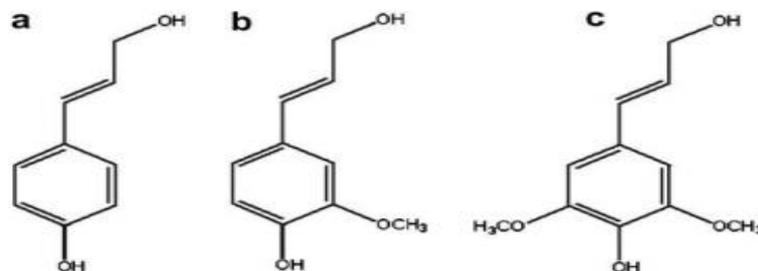
- Les mannanes peuvent avoir un squelette de D-mannose en  $\beta$  (1,4) ou un squelette de D-mannose et de D-glucose, également unis en  $\beta$  (1,4). Ils sont alors appelés glucomannanes. Ces deux types de mannanes peuvent être

substitués en  $\alpha$  (1,6) par des résidus de D-galactose, et on parle alors de galactomannanes ou galactoglucomannanes (Chavez Monte, 2008). Les mannanes sont particulièrement abondants dans les graines et sont supposés être des polysaccharides de réserve (Buckeridge *et al.*, 2000; Hoch, 2007).

### 1.3. La lignine

La lignine est le dernier composant principal de la lignocellulose, elle représente 15 à 30% de la matière organique. La lignine constitue la fraction non saccharidique la plus importante des fibres végétales. La molécule de la lignine est un complexe d'unités de phénylpropane, formant une structure amorphe non soluble dans l'eau (Taherzadeh et Karimi, 2008). Après les polysaccharides, la lignine est le biopolymère le plus abondant dans la nature et elle est un contributeur important aux résidus de la biomasse terrestre (Kögel-Knabner, 2002). Ce sont des polymères d'unités phénylpropène : unités gäiacyl (G) du précurseur alcool trans-coniférylique, unités de seringue (S) d'alcool trans-sinapyl et unités p-hydroxyphényl (H) du précurseur alcool trans-p-coumarylique (Figure 5) (Palonen *et al.*, 2004).

Ces polymères sont déposés principalement dans les parois secondaires des cellules, les rendant rigides et imperméables et leur confèrent une résistance aux attaques microbiennes (Kögel-Knabner, 2002).



**Figure 5 :** Les précurseurs de la lignine : (a) alcool coumarylique, (b) alcool coniférylique et (c) alcool sinapylique

#### 1.4. Les principaux déchets et coproduits lignocellulosiques

La biomasse lignocellulosique est une matière composite dont les principaux constituants sont la cellulose, les hémicelluloses et les lignines (O'donohue, 2008). La ressource de biomasse lignocellulosique provient aussi bien des résidus agricoles et forestiers ou des sous-produits de transformation du bois que de cultures dédiées, qu'il s'agisse de plantes ligneuses ou de plantes herbacées (Tableau 1). La proportion et la nature de chacune des macromolécules sont en fonction de l'origine botanique de la matière (O'donohue, 2008).

**Tableau 1 :** Composition en biomasse de certaines matières lignocellulosiques (Sun et Cheng, 2002)

|                    | <b>Cellulose</b> | <b>Hémi-cellulose</b> | <b>Lignine</b> |
|--------------------|------------------|-----------------------|----------------|
| <b>Bois dur</b>    | 40 - 55 %        | 24 - 40%              | 18 - 25%       |
| <b>Bois tendre</b> | 45 - 50%         | 25 - 35%              | 25 - 35%       |
| <b>Pailles</b>     | 30 - 43%         | 22 - 35%              | 15 - 23%       |
| <b>Herbes</b>      | 25 - 40 %        | 35 - 50%              | 10 - 30%       |

#### 1.5. Valorisation de la biomasse

La biomasse lignocellulosique est l'une des principales ressources renouvelables sur terre, et certainement une des moins coûteuse.

De grandes quantités de déchets lignocellulosiques sont générées par les pratiques forestières et agricoles, les industries de la pâte à papier, les industries du bois et de nombreuses agro-industries ; cependant, ces derniers posent un problème de pollution de l'environnement (Howard *et al.*, 2003).

Les propriétés chimiques des composants des lignocellulosiques en font un substrat d'une énorme valeur biotechnologique (Malherbe et Cloete, 2003). Ils peuvent être convertis en divers produits à valeur ajoutée différents, notamment des biocarburants, des produits chimiques, des sources d'énergie bon marché pour la fermentation, des aliments pour animaux améliorés et des nutriments humains (Howard *et al.*, 2003).

## 2. Les enzymes lignocellulolytiques

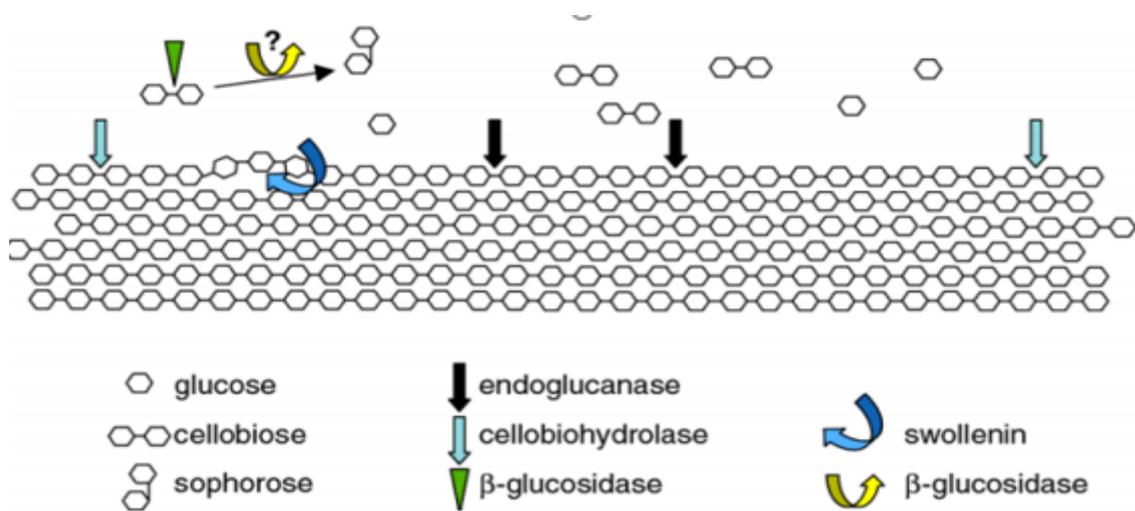
Les enzymes sont des macromolécules produites par des organismes vivants qui, lorsqu'elles sont introduites dans une réaction ou un système, peuvent aider à accélérer les réactions biologiques (**Chukwuma *et al.*, 2020**). Des études ont montré que les enzymes lignocellulolytiques peuvent être caractérisées comme un grand groupe de protéines principalement extracellulaires, qui comprennent les enzymes ligninolytiques (peroxydases et oxydases) et les enzymes hydrolytiques (cellulases, hémicellulases, pectinases, chitinases, amylases, protéases, estérases et mannanases). Elles aident et stimulent la conversion des substrats en produits finaux utiles car elles offrent des conditions appropriées pour que les réactions se produisent.

### 2.1. Les cellulases

Ce sont des enzymes produites principalement par des champignons et des bactéries qui catalysent le processus d'hydrolyse de la cellulose (**Subhedar *et al.*, 2014**). Les cellulases sont largement utilisées dans divers domaines tels que l'industrie des pâtes et papiers, l'industrie textile, l'industrie du bioéthanol, vinicole et brassicole, l'industrie agroalimentaire, l'alimentation animale, les industries agricoles, etc.

Ce sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glycosidiques de la cellulose pour produire principalement du glucose, du cellobiose et des cello-oligosaccharides (**Kuhad *et al.*, 2011**). Le potentiel des cellulases à convertir les déchets lignocellulosiques en produits finaux utiles en a fait l'objet de recherches récentes. Ils ont été examinés et considérés comme les enzymes les plus importantes impliquées dans la dégradation microbienne des déchets lignocellulosiques (**Halder, *et al.*, 2019**). L'hydrolyse de la cellulose nécessite l'action synergique de trois types de cellulases (**Lynd *et al.*, 2002**) (Figure 6) :

- **Les endoglucanases (EGs)** (EC 3.2.1.4) qui coupent aléatoirement les chaînes de cellulose majoritairement au niveau des zones amorphes générant de nouvelles extrémités de chaînes ;
- **Les cellobiohydrolases (CBHs)** ou exoglucanases (EC 3.2.1.91) qui agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du cellobiose ;
- **Les  $\beta$ -glucosidases (BGLs)** (EC 3.2.1.21) qui hydrolysent le cellobiose et dans une moindre mesure les cellodextrines solubles, en glucose.



**Figure 6 :** Enzyme intervenant dans la dégradation de la cellulose (Lynd *et al.*, 2002).

### 2.1.1. Structure des cellulases

La cellulase est composée d'unités de structure et de fonction. La différence entre ces dernières est appelée domaine ou module (Henrissat *et al.*, 1998). Le plus souvent, la cellulase est constituée d'un domaine catalytique (CD) et d'un module de liaison Substrat (CBM), généralement connecté au CD *via* un peptide de liaison relativement long, généralement glycosylée (de 30 à 44 aa). Les enzymes qui ne contiennent pas de CBM, c'est-à-dire qui ont un seul 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).

### **a- Les endoglucanases**

Les endoglucanases sont connus pour hydrolyser aléatoirement les liaisons osseuses, principalement dans la région amorphe. Par conséquent, ils sont principalement responsables de la diminution du degré de polymérisation du substrat cellulosique (**Boisset *et al.*, 2000**).

Le domaine catalytique des endoglucanases n'est pas en forme de tunnel, mais plutôt en forme de crevasse, ce qui lui permet d'attaquer les chaînes de cellulose en tout endroit et pas uniquement au niveau des extrémités (**Bettache *et al.*, 2013**).

### **b- Les exoglucanases (cellobiohydrolases )**

Les cellobiohydrolases (CBHs) agissent de façon progressive à partir des extrémités non réductrices ou réductrices des chaînes de cellulose, libérant des molécules de cellobiose.

Une propriété importante des enzymes cellulolytiques est leur organisation en domaines ayant des fonctions distinctes. Les cellobiohydrolases possèdent deux domaines fonctionnels : un site catalytique (CD) qui permet la réaction d'hydrolyse et un autre qui permet la liaison au substrat appelé 'Cellulose Binding Domain' (CBD) (**Henrissat *et al.*, 1998**). Ces deux modules sont reliés par une chaîne peptidique et sont de tailles différentes, 50 kDA pour le CD et 3 kDA pour le CBD. Les structures des domaines catalytiques des cellobiohydrolases sont résolues et se présentent sous la forme de tunnel. Le rôle du CBD permettrait de libérer l'accès aux chaînes de glucose de la cellulose en disloquant les liaisons hydrogènes entre les chaînes de polymères à la surface des structures de cellulose (**Ting *et al.*, 2009**).

### **c- Les $\beta$ -glucosidases (BGL)**

La cellobiase hydrolyse la liaison  $\beta$ -glucosidique du cellobiose et libère deux molécules de glucose. Selon sa spécificité, la cellobiase peut être active sur les  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) oligoglucosides, mais l'activité diminue rapidement quand la longueur de la chaîne augmente. De nombreux auteurs ont montré que la cellobiase est

fortement inhibée par son produit d'hydrolyse le glucose. Cette enzyme joue un rôle clé car elle permet de réduire l'inhibition des cellobiohydrolases et des endoglucanases par le cellobiose. Elle a donc le rôle majeur de régulateur de la vitesse d'hydrolyse (**Lynd *et al.*, 2002**).

### **2.1.2. Synergie des cellulases**

La synergie entre les cellulases est un processus essentiel lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Elle se produit lorsque l'action accumulée de deux ou plusieurs enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes séparées.

Le degré de synergie (DS) correspond au ratio de l'activité du mélange d'enzymes sur la somme des activités des enzymes utilisées séparément.

Les deux types de synergies mises en évidence dans la littérature sont les suivantes :

- Synergie Exo-Endo : La synergie entre les cellobiohydrolases et les endoglucanases.
- Synergie Exo-Exo : La synergie entre deux cellobiohydrolases (**Medve *et al.*, 1998**)

### **2.2. Les xylanases**

Les xylanases, en tant que membres glycoside hydrolases, sont capables de catalyser l'hydrolyse du xylane, en cassant les liaisons  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glycosidiques, afin de produire des composés plus simples tels que le xylose (**Burlacu *et al.*, 2016**). Le xylane n'est pas aléatoirement hydrolysé mais les liaisons sélectionnées pour l'hydrolyse dépendent de la nature du substrat tel que la longueur de la chaîne, le degré de ramification et la présence de substituant (**Li *et al.*, 2000**). Diverses formes de ces enzymes existent, présentant des replis, des mécanismes d'action, des spécificités de substrat, des activités hydrolytiques (rendements, taux et produits) et des caractéristiques physico-chimiques variables (**Collins *et al.*, 2005**).

### 2.3. Les ligninases

Les ligninases sont des enzymes qui catalysent la dégradation de la lignine par des oxydoréductases fongique extracellulaires. Ce sont généralement des métallo-enzymes qui oxydent les phénols composant les chaînes ramifiées des lignines. Elles sont classées en deux catégories:

#### **a- Les phénols oxydases ou laccases (Prevot, 2013).**

Ce sont des oxydoréductases glycosylées à cuivre qui utilisent l'O<sub>2</sub> pour oxyder divers composés aromatiques et non aromatiques.

#### **b- Les peroxydases à hème (Prevot, 2013).**

##### ***b-1. Les lignines peroxydases (LiP) ou diarylpropane peroxydases***

Ce sont des glycoprotéines contenant un groupement hème et qui jouent un rôle important dans la biodégradation de la lignine. Elles catalysent la réaction générale, dépendante du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de dépolymérisation oxydante de composés non phénoliques.

##### ***b-2. Les manganèse-peroxydases (MnP).***

Ce sont des glycoprotéines à groupe hémique qui dépolymérisent la lignine conjointement avec les lignines peroxydases. Elles catalysent la réaction, dépendante du manganèse.

##### ***b-3. Les peroxydases versatiles (VP)***

Elles constituent un groupe d'enzymes capables d'oxyder le Mn (II) en Mn (III), comme les manganèse-peroxydases, mais présentent aussi les activités des lignines peroxydases.

### **3. Les champignons lignocellulolytiques**

#### **3.1. Généralités sur les champignons**

Les champignons filamenteux sont parmi les organismes les plus fréquemment utilisés dans les procédés biotechnologiques industriels. La plupart d'entre eux appartiennent au groupe taxonomique des Ascomycota trouvés dans divers habitats naturels (**Abarca *et al.*, 1994**) Ce sont des microorganismes aérobies, hétérotrophes, saprophytes ou parasites. Favorisant un environnement acide, mésophile et se développent entre 5 et 37°C (**Madan et Thind, 1998**). Ils ont en général un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ( $a_w = 0.65$ ). Cependant, les champignons sont des agents bien connus de décomposition de la matière organique, en général et du substrat cellulosique en particulier (**Lynd *et al.*, 2002**).

Les cellulases, ainsi que d'autres enzymes, sont d'excellents produits microbiens pour la culture à l'état solide lorsqu'elles sont produites par des champignons filamenteux, car les hyphes ont la capacité naturelle de couvrir la surface nutritive solide du substrat et même d'entrer dans ses pores, et ainsi de s'attacher fortement au substrat (**Raimbault, 1998**). 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 ; Duchiron et Copinet, 2011**).

#### **3.2. Activité lignocellulolytique des champignons**

La capacité des champignons à dégrader les matériaux lignocellulosiques est due à leur système enzymatique très efficace. Ils sont capables de produire un grand nombre d'enzymes tel que cellulases, xylanases, chitinases, amylases, protéases, et autres (**Braaksma *et al.*, 2010**). Les champignons ont deux types de systèmes enzymatiques extracellulaires :

- Système hydrolytique qui produit des hydrolases responsables de la dégradation des polysaccharides.
- Système ligninolytique oxydatif et extracellulaire unique, qui dégrade la lignine et ouvre les cycles phényle (**Sánchez, 2009**).

Chez les champignons filamenteux, les enzymes cellulolytiques, notamment les endoglucanases, les cellobiohydrolases (exoglucanases) et les  $\beta$ -glucosidases, agissent efficacement sur les résidus cellulolytiques de manière synergique en plus des activités cellulolytiques/hémicellulolytiques (**Dashtban et al., 2009**).

### **3.2.1. Les cellulases fongiques**

La dégradation de la cellulose par les moisissures cellulolytiques est assurée par des cellulases extracellulaires de trois types qui sont nécessaires à l'hydrolyse totale de la cellulose : Endoglucanases, Exoglucanases et  $\beta$ -glucosidases (**Moularat et al., 2013**). Les cellulases fongiques sont fortement produites en extracellulaire et sont moins complexes que celles des bactéries. Le genre *Trichoderma* est connu pour ces cellulases à haute activité enzymatique par rapport à d'autres genres (**Tanveer et al., 2014**).

### **3.2.2. Les hémicellulases fongiques**

Plusieurs enzymes différentes sont nécessaires pour hydrolyser les hémicelluloses, en raison de leur hétérogénéité comme les cellulases, les hémicellulases sont généralement des protéines modulaires et contiennent d'autres modules fonctionnels, tels que le CBM, en plus de leurs domaines catalytiques. La plupart des hémicellulases sont des glycosides hydrolases (GH), les hémicellulases appartiennent aux glucides estérases (EC) qui hydrolysent les liaisons ester d'acétate ou férulique (**Dashtban et al., 2010**).

#### 4. Application industrielle des cellulases

En outre, les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentaient une cible pour les recherches académiques comme celles industrielles (**Singh, 1999**) Son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des gras volatiles, d'où l'importance écologique et industrielle considérable des cellulases (**Receveur et al., 2002**) ce qui revoie à différentes applications industrielles (Tableau 02).

**Tableau 2** : Les Applications industrielles de la cellulase.

| <b>Industries</b>                     | <b>Applications</b>   |
|---------------------------------------|---|
| <b>Alimentaires</b>                   | Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques ( <b>Scriban, 1993</b> ). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes.  |
| <b>des textiles et des détergents</b> | Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches ( <b>Gusakov et al., 2007</b> ). Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs ( <b>Cavako-Paulo, 1998</b> ). |
| <b>Papeterie</b>                      | Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau ( <b>Scriban, 1993</b> ).                               |
| <b>Nutrition animale</b>              | Elles sont utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréta) ( <b>Scriban, 1993 ; Gusakov et al., 2007</b> )                                 |
| <b>Thérapeutique</b>                  | L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive ( <b>Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993</b> ).   |

# **Matériel et Méthodes**

## Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

### 1. Origine et purification des souches fongiques

Les champignons producteurs d'enzymes lignocellulolytiques utilisés dans le cadre de cette étude appartiennent à la collection du laboratoire Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'université de Béjaia. Ils ont été isolés de différents sites de la région de Bejaia (El-kseur, lac noir et Amizour).

La purification de ces souches a été réalisée sur la gélose PDA, réparti dans des boîtes de Pétri.

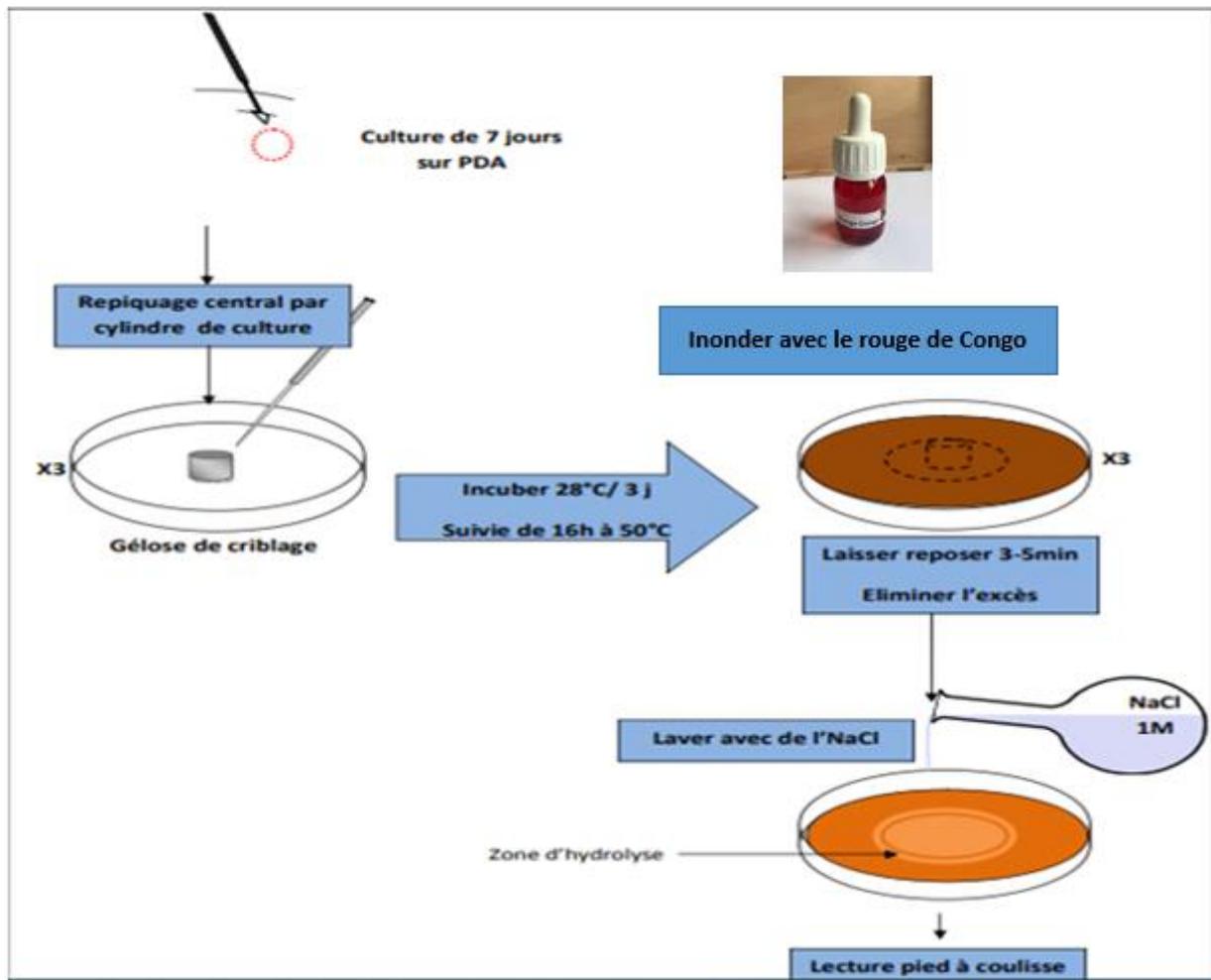
### 2. Criblage des isolats

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des souches isolées est réalisée sur deux types de milieux de culture.

#### 2.1. Criblage sur milieu de culture solide (gélisé) à base de carboxymethyl cellulose (Test qualitatif)

À l'aide d'un emporte-pièce circulaire d'un diamètre de 5 mm et d'une aiguille stérile, un disque de gélose PDA est prélevé dans la partie périphérique de la colonie où le mycélium du champignon est le plus jeune, puis déposé sur le milieu carboxymethylcellulose. Les boîtes de Petri sont incubées pendant 3 jours à 28°C.

La révélation de l'activité CMCcase est effectuée par inondation de la boîte de Petri avec une solution de rouge de Congo pendant 3 à 5 mn, suivi d'un lavage avec une solution de NaCl 1M (Figure 7) (**Ninranjane *et al.*, 2007**). 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**).

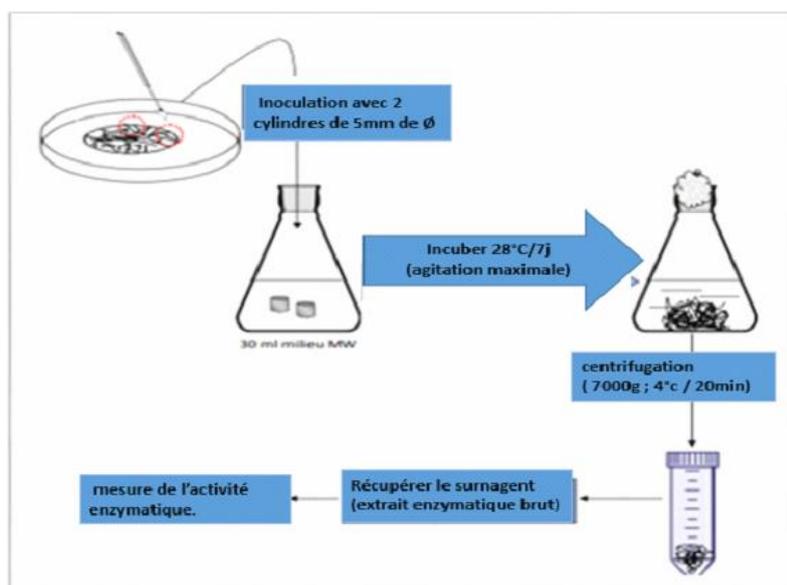


**Figure 7** : schéma explicatif des étapes du criblage sur milieu gélosé

## 2.2. Criblage sur milieu de culture liquide (Test quantitatif)

Le milieu liquide utilisé pour le criblage est celui décrit par (Mandels et Weber, 1969) dont la composition figure en Annexe I.3

L'expérience est réalisée dans des flacons de 250 ml, contenant 40 ml du milieu Mandels et Weber (Figure 8) selon le protocole modifié par **Herculano *et al.* (2011)**. L'inoculation est effectuée avec 2 disques de 5 mm de diamètre prélevés dans la partie périphérique d'une souche pure de 7 jours sur milieu PDA (**Lakshmikanth, 1990**). Les cultures sont incubées dans une plaque agitatrice à 28°C pendant 7 jours. Les extraits enzymatiques bruts sont récupérés par centrifugation à 7000g pendant 20 min puis conservés à 4°C jusqu'au dosage des activités enzymatiques.



**Figure 8** : schéma explicatif des étapes du criblage sur milieu agité

### 3. Mesure des activités hydrltyques

#### 3.1. Activité CMCCase

L'activité endoglucanase (CMCase) est déterminée selon la méthode de **Ghose (1987)** en présence de carboxyméthyl cellulose préparée dans un tampon citrate (50mM) à pH 4.8, à raison de 2% (m/v).

Le tableau 3 montre les étapes du dosage de l'activité CMCCase.

**Tableau 3** : Les étapes de dosage de l'activité CMCCase

|  | Gamme | Témoin enzyme | Enzyme |
|--|-------|---------------|--------|
| Substrat (µl)<br>Solution CMC 2% dans un tampon citrate<br>(50 mM-pH4.8) | 250   | 250           | 250    |
| Equilibrer à 50°C pendant 10minutes                                      |       |               |        |
| Enzyme (µl)  | /     | /             | 250    |
| Incuber 30 minutes à 50°C  |       |               |        |
| Arrêter la réaction en ajoutant 1.5ml de DNS                             |       |               |        |
| Tampon (µl)  | /     | /             | /      |
| Glucose (µl)   | 250   | /             | /      |
| Enzyme (µl)  | /     | 250           | /      |
| Placer 5minutes à 5°C  |       |               |        |
| Refroidir dans un bain d'eau glacée                                      |       |               |        |

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un photospectromètre à 540nm.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de glucose contenu dans les extraits, cette concentration est déterminée par référence à une courbe d'étalon à différente concentration en glucose à partir d'une solution mère à 2g/l (Figure 16, Annexe III.1).

### Calcul de l'activité CMCase

*Absorbance* = Abs enzyme - Abs témoin enzyme.

Les absorbances des échantillons sont convertis en quantité de glucose libéré.

*Activité enzymatique* (AE) = ((mg de glucose libéré/0.18016mg/ $\mu$ mol)/(0.25mL\*30mn)) =  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup> = U/MI

### 3.2. Activité papier filtre

L'activité papier filtre est déterminée selon la méthode de **Ghose (1987)**.

Le tableau 4 montre les étapes du dosage de l'activité papier filtre.

**Tableau 4** : Les étapes de dosage de l'activité FPAse

|   | <b>Gamme</b> | <b>Témoin enzyme</b> | <b>Enzyme</b> |
|---|--------------|----------------------|---------------|
| Papier filtre<br>Papier Whatman N° 1 de 1cm x 3 cm                            | /            | /                    | 1             |
| Tampon ( $\mu$ l)<br>Tampon citrate (50 mM, pH 4.8)                           | 500          | 500                  | 500           |
| Equilibrer à 50°C pendant 10minutes   |              |                      |               |
| Glucose ( $\mu$ l)  | 250          | /                    | /             |
| Enzyme ( $\mu$ l)   | /            | 250                  | 250           |
| Incuber 60 minutes à 50°C   |              |                      |               |
| Arrêter la réaction en ajoutant 1.5ml de DNS                                  |              |                      |               |
| Placer 5minutes à 100°C   |              |                      |               |
| Refroidir dans un bain d'eau glacée   |              |                      |               |
| Attendre 2à minutes ou centrifuger afin d'éliminer la pulpe                   |              |                      |               |
| Prélever 500 $\mu$ l du milieu réactionnel et ajouter 1ml d'eau déminéralisée |              |                      |               |

L'absorbance a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à 540nm.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de glucose contenue dans les extraits, cette concentration est déterminée par référence à une courbe d'étalon à différente concentration en glucose à partir d'une solution mère à 2g/l (Figure 17, Annexe III.2).

### **Calcul de l'activité FPase**

**Absorbance**= Abs enzyme-Abs témoin enzyme

Construire une droite d'étalonnage (AnnexeIII) en utilisant les quantités absolues de glucose libéré, ensuite les absorbances des échantillons seront convertis en quantité de glucose libéré.

**Activité enzymatique** (AE)=((mg de glucose libéré/0.18016mg/ $\mu$ mol)/(0.25ml\*30mn))=Umol min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>= U/ml

### **3.3. Activité xylanolytique**

L'activité xylanase est déterminée selon le même protocole de dosage d'activité CMCCase (**Ghose., 1987**).

Le substrat CMC est remplacé par le xylane de bouleau préparé dans une solution tampon citrate. Le xylane de bouleau est mis en suspension à raison de 2% (m/v) dans du tampon citrate de sodium phosphate (50Mm) à pH 4.8. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de xylose contenue dans les extraits. Cette concentration est déterminée par référence à une courbe d'étalon (Figure 18, Annexe III.3).

L'absorbance est mesurée à l'aide d'un photospectromètre à 540nm

Une unité (1U) d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une  $\mu$ mol de xylose à partir du substrat approprié par minute et par millilitre de filtrat brut (**Tao et al., 2010**).

## **4. Identification de la souche performante**

### **4.1. Observation macroscopique**

Les colonies de champignons obtenues sur milieu PDA ont fait objet d'une identification à l'œil nu, basée sur les critères morphologiques suivants :

#### **Texture**

- Laineuse : mycélium aérien abondant
- Duveteux : mycélium aérien court
- Poudreux : mycélium aérien produisant de nombreuses conidies créant une surface d'apparence poudreuse semblables à du sucre ou de la farine
- Glabre : mycélium aérien un peu abondant avec surface lisse.

#### **Couleur**

Surface, revers, pigment diffusible

Brun, gris, noir = champignon dématié

Blanc ou autre couleur (rouge, vert, jaune, mauve, ect.)= champignon hyalin

#### **Vitesse de croissance (diamètre de la colonie à 7 jours d'incubation)**

Rapide : > 3 cm

Modérée : entre 1 et 3 cm

Lente : < 1 cm

### **4.2. Observation microscopique**

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait par la réalisation d'un étalement entre lame et scotch, après coloration.

Un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants du champignon (**Chabasse, 2002**).

L'observation microscopique permet de détecter la présence du thalle, la présence ou absence du septum, la reproduction, les caractéristiques des fructifications et des spores.

## **5. Caractérisation enzymatique du surnageant brut de la souche performante**

### **5.1. Effet de la température**

La température optimale de l'activité enzymatique est réalisée à différentes températures : 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 et 80°C.

### **5.2. Effet du pH**

Le pH optimum a été obtenu en testant l'activité enzymatique à différents pH. Pour cela, 3 différents tampons à 50mM ont été utilisés à savoir :

- Tampon citrate dont le pH varie entre 4 à 6.
- Tampon phosphate dont le pH varie entre 6 à 8
- Tampon Tris-HCl dont le pH varie entre 8 à 10

### **5.3. Effet des ions métalliques**

Les ions métalliques Mn, Cl, Fe, SO<sub>4</sub>, K, Na, Zn, Ca ; Cu, Mg, EDTA , NH<sub>4</sub> sous forme de chlorure et de sulfate ont été testés à une concentration de 5mM, ces derniers ont été ajoutés au mélange réactionnel contenant la CMC à 2%.

### **5.4. Thermostabilité**

La thermostabilité a été effectuée avec le mélange réactionnel contenant l'ion métallique qui augmente l'activité enzymatique au pH et température optimale pendant 5h à un intervalle de 30 minutes.

## **Résultats et discussion**

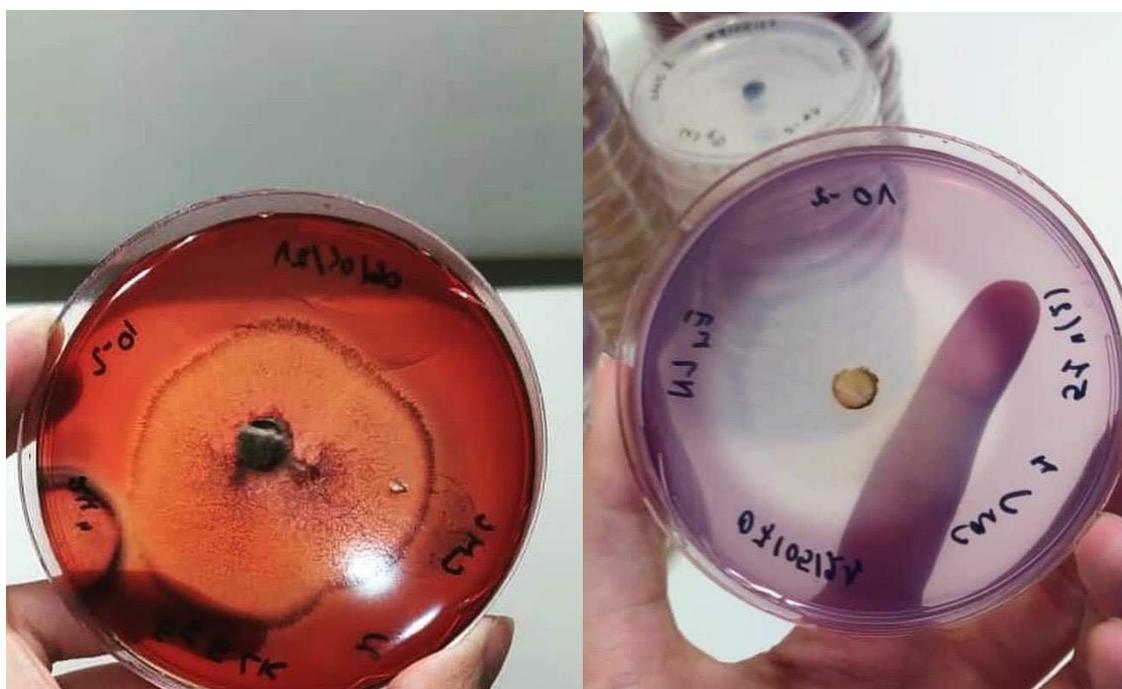
## Chapitre 3 : Résultats et discussions

### 1. Sélection des isolats cellulolytiques performants

La quantification et l'obtention des cellulases fongiques sont des objectifs difficiles à atteindre (Stephen *et al.*, 2003). De ce fait, deux criblages différents ont été mis au point pour permettre une sélection primaire des souches lignocellulosiques.

#### 1.1. Sélection sur milieu gélosé (Test qualitatif)

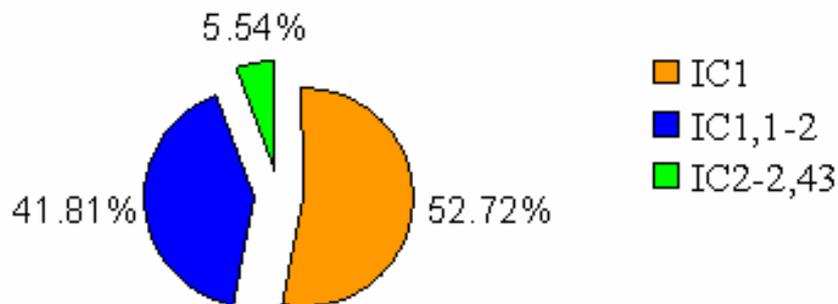
Pour la sélection de souches productrices d'enzymes cellulolytiques, soixante (60) souches ont été cultivées dans des boîtes de Petri contenant de la CMC comme substrat pendant 72h à 28°C. Après incubations des boîtes, les zones d'hydrolyse ont été révélées avec le réactif rouge de Congo. La formation d'un halo clair entourant la colonie indique une activité hydrolytique (Figure 9) (Goldbeck *et al.*, 2012).



**Figure 9 :** Images du screening sur milieu gélosé représentant les zones d'hydrolyses.

Sur les 60 souches cultivées, 55 présentent des zones claires avec différents diamètres, soit un pourcentage de 91.67%.

Les activités de CMCases ont été évaluées en fonction de l'étendue et des zones de défrichement hydrolytique, en d'autre terme par l'indice cellulolytique. Ce dernier a été établi sur la base du rapport entre le diamètre du halo et le diamètre de la colonie (Figure 10).



**Figure 10** : indice cellulolytiques des 55 isolats sur milieu CMC-agar.

Les souches sont réparties en 3 groupes, en fonction de leur IC :

- **52.72%** des souches ont un IC de 1.0 ; les colonies envahissent la totalité de la boîte, ce sont des moisissures à taux de croissance très élevé dites envahissantes.
- **41.81%** des souches ont un IC entre 1.1 et 2.
- **5.54%** des souches ont un IC entre 2 et 2.43.

Selon (**Ten et al., 2004**), le diamètre de la zone des halos est utile pour la sélection de souches capables de dégrader efficacement les polysaccharides tels que la cellulose. Les halos produits par l'hydrolyse de la cellulose sont directement liés à la région d'action des enzymes cellulolytiques, puisque le colorant ne reste attaché qu'aux régions où il y a des liaisons  $\beta$ 1,4-D-glucanohydrolas (**Lamb et Loy., 2005**).

Certains auteurs recommandent un IC de **2.5** pour considérer un microorganisme comme producteur d'enzymes en milieu solide (**Barbosa, 2006**) Cependant, dans nos conditions aucune souche n'a dépassé un IC de **2.43**. Cela peut s'expliquer en premier lieu du fait que le screening solide est assez sensible pour un screening primaire des micro-organismes cellulolytiques. En effet, la taille de la zone d'hydrolyse n'est pas toujours significative de l'activité cellulosique. Une étude a montré que, parmi 77 isolats microbiens cultivés sur milieu CMC, l'isolat à activité enzymatique la plus élevée était celui qui présente la zone claire la moins large (**Bettache, 2013**).

En second lieu, certaines substances chimiques présentent dans le milieu de culture peuvent interférer avec le colorant, et donc donner des résultats faussement positifs, voire provoquer sa précipitation ou inhiber sa liaison aux polysaccharides (**Neirotti et Azevedo, 1988**).

## **1.2. Sélection quantitatif en milieu liquide agité**

Certaines souches ont pu croître dans le milieu liquide, la croissance a été visualisée par la formation d'un voile mycélien à la limite liquide/air, s'expliquant probablement par le flottement des spores s'associant ainsi à la région enzymatique la plus proche ou bien à la recherche d'oxygène. Des dépôts de mycéliums en suspension ont été remarqués. Ce même constat a été déjà rapporté par **Leghlimi . (2013)**.

### **1.2.1 Criblage quantitatif en milieu agité de type CMC<sub>Case</sub> et FPase**

Le premier criblage nous a permis de classer les souches en fonction de leur formation d'un halo clair, signe de la formation d'une zone d'hydrolyse. Cependant cette technique reste qualitative.

Dans un second lieu, un criblage quantitatif de type CMC<sub>Case</sub> a été effectué sur les 55 isolats présentant un IC supérieur à 1, afin de déterminer la

souche la plus productrice d'enzymes lignocellulosiques. Ce criblage a été effectué sur milieu liquide de Mendels et Weber. Les activités CMCCase ont été obtenues en mesurant la production de sucres réducteurs, qui est considérée comme une indication de clivage de molécule de cellulose. Les résultats obtenus (Tableau 5) indiquent que, parmi les 55 souches testées, seules 6 souches ont présentées une activité cellulosique allant de 1.50U/ml à 8.97U/ml, alors que les autres souches présentent une activité enzymatique <1 U/ml.

**Tableau 5:** Activité CMCCase

| Souches | Activité (U/ml) |
|---------|-----------------|
| S3      | 5.21209795      |
| S7      | 1.50584689      |
| S24     | 1.91441         |
| S29     | 1.50584689      |
| S49     | 8.97671517      |
| S55     | 1.85604384      |

Pour la suite du travail, nous avons sélectionné 6 souches pour la production de cellulase de type FPAse.

Il y a lieu de remarquer que lors du dosage de l'activité cellulosique de type FPAase, nous avons observé un dégagement de fibres cellulosiques et cela peut s'expliquer par la sécrétion des enzymes cellulolytiques par les souches testées dans les milieux extracellulaires. Ce phénomène est caractérisé par la production de cellulases fongiques extracellulaires (**Niamke, 2003**).

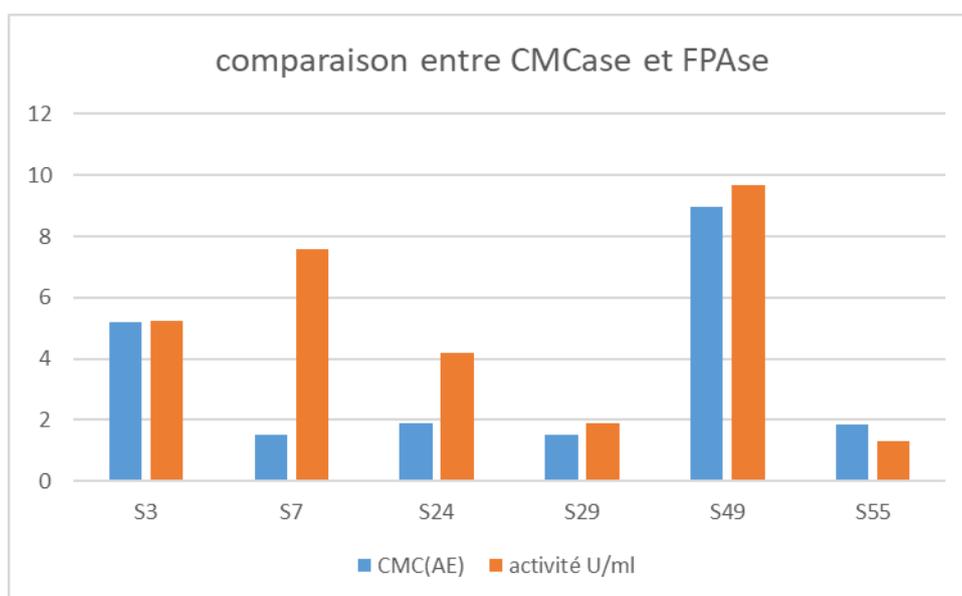
Les résultats obtenus de l'activité FPAse des 6 souches sélectionnées sont consignés dans le tableau 6.

**Tableau 6 : Activité FPase**

| Souches | Activité (U/ml) |
|---------|-----------------|
| S3      | 5.25787192      |
| S7      | 7.59130733      |
| S24     | 4.17776645      |
| S29     | 1.90546909      |
| S49     | 9.6598112       |
| S55     | 1.32465765      |

Les souches testées présentent des activités FPase allant de 1.32U /ml à 9.65U /ml. Nous remarquons que la souche S49 possède les meilleures activités CMCase et FPase de 8.97U/ml et 9.65U/ml respectivement, contrairement à la souche S7 qui présente une activité CMCase faible 1.50 U/ml et une activité FPase plus élevée 7.59U/ml.

La figure 11 montre la comparaison entre les activités enzymatiques CMCase et FPase



**Figure 11 : Comparaison activité CMCCase et FPase U/ml**

Nous percevons que l'activité FPase ne corrèle pas toujours avec l'activité CMC<sub>Case</sub>, la même remarque a été rapportée par **Shahriarinour *et al.* (2011)**.

### 1.2.2. Criblage quantitatif sur milieu agité de type xylanolytique

Les résultats de l'activité xylanolytique mesurée sur les 6 souches sélectionnées sont regroupés dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** Activité xylanolytique

| Souches | Activité (U/ml) |
|---------|-----------------|
| S3      | 7.434871        |
| S7      | 12.2429106      |
| S24     | 12.8996185      |
| S29     | 7.17687863      |
| S49     | 23.8056595      |
| S55     | 10.8591334      |

Ces résultats indiquent que les activités xylanolytiques des souches varient entre 7.17U/ml à 23.80U/ml. Nous remarquons que pour les 3 activités enzymatiques (cellulosiques, papier filtre et xylanolytiques) mesurées, la souche S49, avec un IC de 1 a montré les meilleures activités enzymatiques. Par conséquent, cette souche est considérée la plus performante en terme de production d'enzymes lignocellulosiques (Tableau 8).

**Tableau 8 :** Performance cellulolytique et xylanolytique de la souche S49

| Souches | IC | CMC <sub>Case</sub> | Xylanase  | FPase    |
|---------|----|---------------------|-----------|----------|
| S 49    | 1  | 8.97U/ml            | 23.80U/ml | 9.65U/ml |

Ces résultats nous ont permis de choisir la souche S49 pour son identification et la caractérisation de son enzyme brut. Toutefois, ces résultats n'ont aucune valeur indicative sur les performances, car les souches retenues à l'étude sont

testées selon des conditions standards et les conditions optimales pour chacune d'entre elles n'ayant pas été déterminées (**Roussos et Raimbault, 1982**).

## **2. Identification de la souche S49**

D'une façon générale, l'identification des genres fongiques est réalisée essentiellement selon les clefs de détermination préconisées par **Botton *et al.*, (1990)** et de **Chabasse *et al.*, (2002)**.

### **2.1. Etude macroscopique et microscopique**

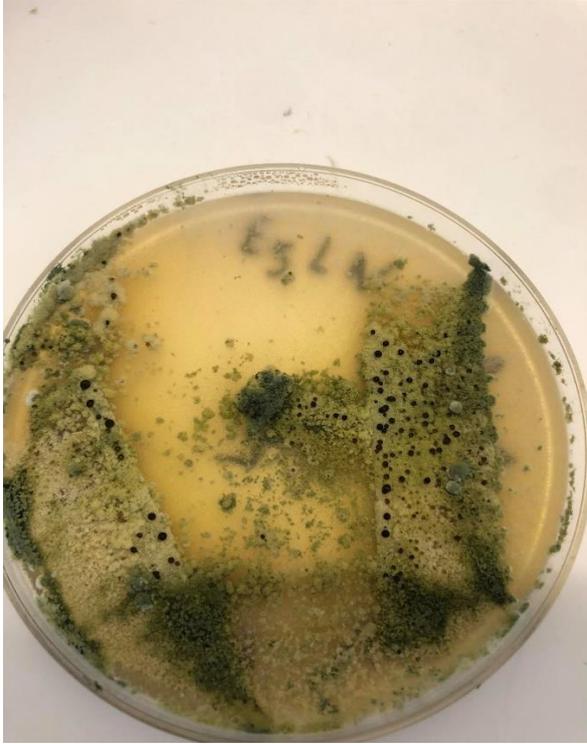
#### **2.1.1. Etude macroscopique**

Cette étude est faite principalement pour la détermination de l'espèce ou au moins de son degré de rapprochement à un genre.

Les caractères macroscopiques de la souche S49 sont étudiés sur le milieu PDA. Cet examen macroscopique permet de déterminer les principaux caractères cultureux suivants: la vitesse de croissance des colonies, la couleur des colonies, leur variation en fonction du temps, l'aspect de la surface, la couleur de l'envers des boîtes, l'odeur des colonies et le changement de la couleur du milieu utilisé (**Guiraud, 1998**).

Le tableau 9 résume les principaux caractères cultureux de la colonie à savoir : l'aspect du mycélium ainsi que la couleur de la pigmentation au revers des boîtes.

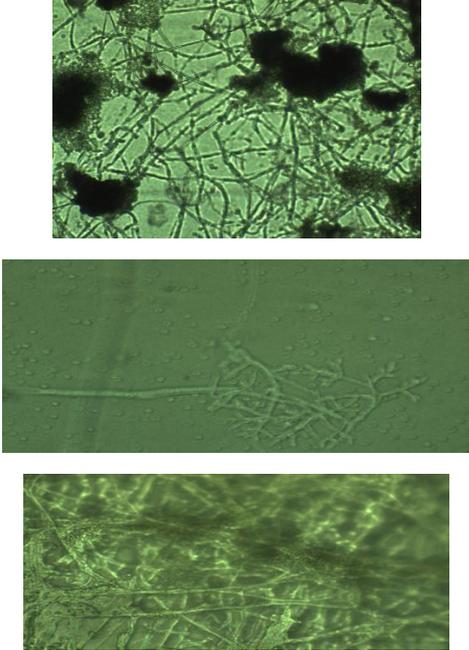
**Tableau 9 : Principaux caractères cultureux de l'isolat S49 sur PDA**

| <b>Caractères morphologiques</b>   | <b>Aspect sur la boîte</b>  |
|--|---|
| <p>-Le mycélium croit rapidement et envahit le milieu de culture au bout de 3 jours d'incubation.</p> <p>-Couleur vert olive, ensuite vert foncé après sporulation.</p> <p>-Présence de Pigment.</p> |  |

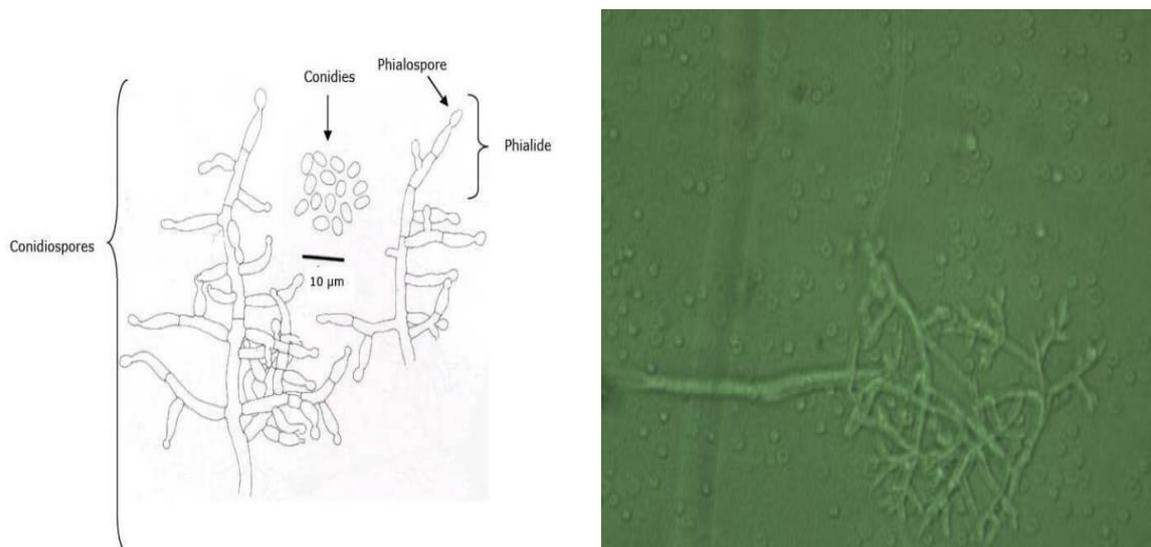
### **2.1.2. Etude microscopique**

L'étude microscopique a porté sur l'observation des structures caractéristiques des souches fongiques isolées (mycélium, conidiospore, conidies...) (Tableau 10).

**Tableau 10** : Caractères microscopiques de la souche S49

| Caractères microscopiques  | Photos   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphes cloisonnés</li> <br/> <li>- Thalle à croissance rapide</li> <br/> <li>- Conidiospores en touffes compactes, très ramifiées, irrégulièrement verticillées avec des ramifications à angle droit.</li> <br/> <li>- Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet.</li> <br/> <li>- Conidies de couleur verte réunies en glomérules au sommet des phialides.</li> </ul> |  |

D'après ces observations et sous réserve d'une caractérisation phylogénétique poussée, les caractéristiques morphologiques et microscopiques observées laissent indiquer que la souche S49 est apparentée au genre *Trichoderma* (Figure 12).



**Figure 12** : Aspect microscopique de *Trichoderma* (Botton *et al.*, 1990).

Il est bien établi que les espèces du genre *Trichoderma* ont une croissance très rapide et extensive sur milieu Sabouraud à 25°C. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Cinq jours après la germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle, puis deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour un feutrage épais se superpose à la culture (**Chabasse et al., 2002**).

Le genre *Trichoderma* est une moisissure imparfaite de type mésophile aérobie retrouvée dans les sols tropicaux. Ce genre vient à la 3<sup>ème</sup> position après les genre *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma sp.* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6.4% à 10.4%) (**Landreau, 2001**).

L'abondance des *Trichoderma sp.* dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (**Mohamed-Benkada, 2006**).

Les substances bioactives produites par *Trichoderma* peuvent être des métabolites volatiles (6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcool, aldéhyde) ou bien des métabolites non volatils diffusibles (antifongique, antibiotique), et enfin des métabolites polypeptidiques ciclosporines immunosuppresseurs anti-inflammatoire (**Landreau, 2001**).

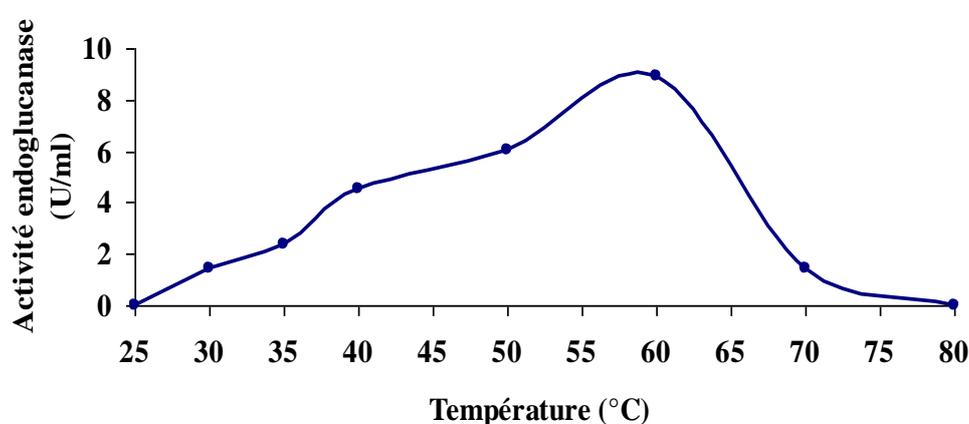
La production des enzymes au sein du genre *Trichoderma* est variable d'une souche à l'autre, principalement les xylanases et les cellulases (**Sandgren et al., 2005**). En effet, ils sont connus parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques et les mieux étudiées (**Saloheimo, et al., 1988**), par leur capacité à produire au moins 2 exoglucanases (**Shoemaker et al., 1983 ; Saloheimo et al., 1997**), 5 endoglucanases (**Pentilla et al., 1987**) et 2  $\beta$ -glucosidases (**Barnett**

*et al., 1991 ; Takashima et al., 1999 ; Nogawa et al., 2001*). Les fortes activités cellulolytiques (8.97 U/ml) et xylanolytiques (23.80U/ml) observées chez la souche S49 sont en accord avec la littérature déjà citée.

### 3. Caractérisation de l'enzyme brut de la souche S49

#### 3.1. Effet de la température sur l'activité endoglucanase

La figure 13 indique l'influence de la température sur l'activité enzymatique.



**Figure 13 :** Effet de la température sur l'Activité endoglucanase

Les activités endoglucanases enregistrées chez la souche S49 atteignent une valeur maximale de 8.91 U/ml à 60°C. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Busto et al., (1996)** qui ont montré une température optimale de 60°C pour l'activité CMCase produite par *Trichoderma reesei*.

A basse température (25°C à 30°C), la souche S49 perd 80 à 100% de son activité endoglucanase. Cela peut être dû au fait qu'à basse température le transport de substrat à travers la cellule est faible donc affecte le rendement de production (**Bettache., 2013**).

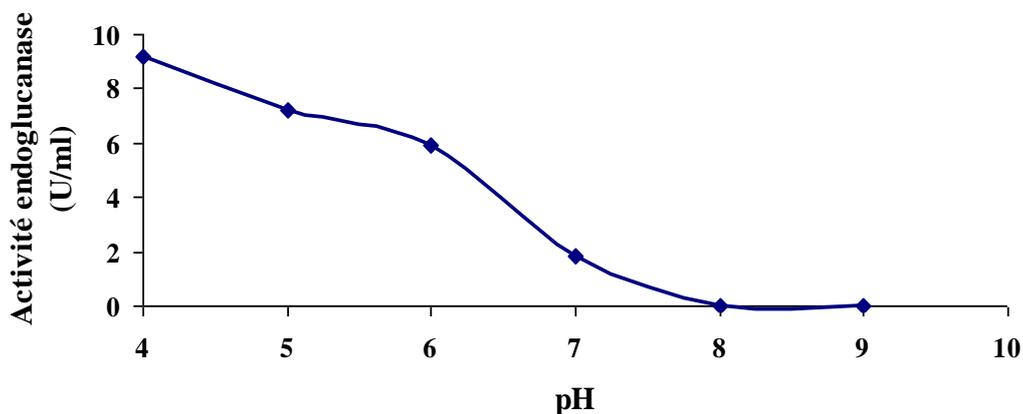
A 70°C la souche S49 perd 84% de son activité endoglucanase. Les besoins en énergie d'entretien de la croissance cellulaire sont élevés, cela est dû à la dénaturation thermique des enzymes de la voie métaboliques (**Aiba, 1973**).

Il y a lieu de noter que 60 à 70% de l'activité endoglucanase est préservée entre 40°C et 50°C. Notre souche maintient une activité plutôt bonne dans une gamme allant de (40°C à 60°C).

La température optimale des activités cellulosiques varie en fonction de l'espèce microbienne et de son biotope (**Leghlimi, 2013**). Les cellulases ont des températures optimales élevées par comparaison à d'autres systèmes enzymatiques (**Tong *et al.*, 1980**). En effet, la température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70°C (**Ando *et al.*, 2002**).

### 3.2. Effet du pH sur l'activité endoglucanase

La figure 14 indique l'influence du pH du milieu sur l'activité enzymatique.



**Figure 14 :** Effet du pH sur l'activité endoglucanase U/ml

Le pH du milieu influence fortement de nombreuses réactions enzymatiques en affectant le transport de certains minéraux et d'enzymes à travers la membrane cellulaire (**Liang *et al.*, 2009 ; Kapoor *et al.*, 2008**).

L'étude de la variation de l'activité endoglucanase en fonction du pH est effectuée à 60°C dans plusieurs tampons (tampon citrate, tampon phosphate, tampon Tris-HCl). L'activité endoglucanase est active sur une gamme allant de

pH 4 à 6, avec une valeur maximale enregistrée à pH4 dans le tampon citrate. La souche S49 a atteint un maximum d'activité endoglucanase à pH 4 avec une valeur de 9.21U/ml, soit 12.20% de plus que sur l'activité maximale mesurée à pH 4.8. Toutefois, à pH=7 la souche S49 perd près de 80% de son activité.

Selon **Raimbault (1998)**, la variation du pH du milieu dépend fortement du micro-organisme. Le pH optimum des enzymes cellulolytiques est souvent situé entre pH 4.0 et pH 6.0 (**Tong et al., 1980**). Cependant, les pH optimum de 4.0 et 5.0 sont très répandus chez les cellulases de divers microorganismes comme *Trichoderma reesei* (**Krishna et al., 2000**).

Une baisse de pH est souvent due à la libération d'acides organiques qui acidifient progressivement le milieu ; l'élévation du pH par contre est souvent imputable à la dégradation des protéines et des acides aminés qui libèrent de l'ammoniaque (**Botton et al., 1990 ; Leclecr et al.,1987**).

### **3.3. Effet des ions et réactifs chimiques sur l'activité endoglucanase**

L'étude de l'influence des ions métalliques et des réactifs chimiques est très importante pour les applications industrielles, car ils sont connus pour leurs effets sur la production de l'activité des enzymes (**Rani et al., 2004 ; Kotchoniet et al., 2006**).

Les résultats obtenus avec les composés chimiques testés dans les conditions optimales à savoir 60°C à pH 4, sont consignés dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Effet des ions métalliques et des réactifs chimiques sur l'activité endoglucanase

| Ions métalliques et réactifs chimiques | Activité endoglucanase (U/ml) | Activité relative |
|--|-------------------------------|-------------------|
| Aucun                                  | 7.14                          | 100%              |
| MnCl <sub>2</sub>                      | 14.21                         | 199.1%            |
| NH <sub>4</sub> Cl                     | 3.99                          | 56%               |
| FeSO <sub>4</sub>                      | 9.10                          | 127.5%            |
| KCl                                    | 7.03                          | 98.52%            |
| NaCl                                   | 5.92                          | 82.99%            |
| ZnSO <sub>4</sub>                      | 3.79                          | 53.14%            |
| CaCl <sub>2</sub>                      | 7.61                          | 106.7%            |
| CuSO <sub>4</sub>                      | 8.90                          | 124.96%           |
| MgSO <sub>4</sub>                      | 9.25                          | 129.59%           |
| EDTA                                   | 0                             | 0                 |

Nous notons l'absence totale d'activité endoglucanase après incubation de l'extrait enzymatique brute avec EDTA en tant qu'agent chélateur. Cela semble indiquer la présence d'une métallo enzyme (les cations sont impliqués dans le site catalytique actif de l'enzyme). En effet, l'inhibition des activités enzymatiques en présence de l'EDTA est probablement due à la chélation de certains ions métalliques indispensable pour l'activation et/ou la stabilisation de l'enzyme (**Roy et al., 1990**).

Par ailleurs, les résultats montrent que l'ion Mn<sup>2+</sup> stimule fortement l'activité endoglucanase avec une activité relative de 199.1%. Les travaux de **Gupta et al., (2012)** ont conclu que l'ion Mn<sup>2+</sup> interagit avec certains résidus d'acides aminés dans le site actif de la protéine, ce qui provoque un changement de conformation en faveur d'une activité plus élevées

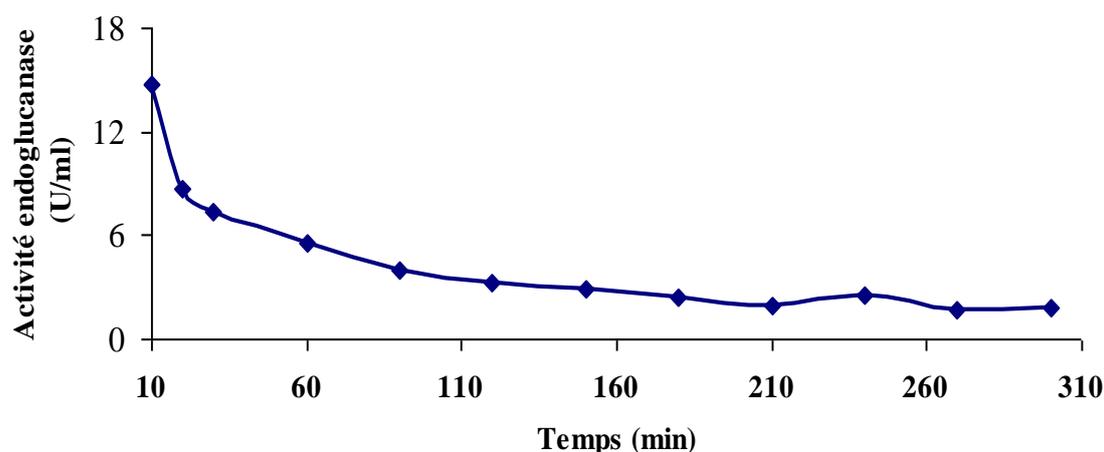
En accord avec les travaux de **Leghlimi (2013)**, l'activité endoglucanase n'a pas été influencée par l'addition d'ions tel que le potassium K<sup>+</sup> et le sodium

Na<sup>+</sup>, par contre une légère augmentation de l'activité a été enregistrée en présence du calcium Ca<sup>++</sup>.

L'ion Na<sup>+</sup> inhibe l'activité d'endoglucanase avec une diminution de 17.31%. Les ions NH<sub>4</sub> et Zn<sup>+</sup> inhibent l'activité d'endoglucanase avec une diminution de près de 50%. Les ions de Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>++</sup>et Mg<sup>2+</sup> provoquent une augmentation de près de 27% de l'activité endogulacanase de la souche S49.

### 3.4. Thermostabilité en présence du substrat

L'étude de la stabilité thermique des enzymes produites par notre souche S49 est testée après un traitement thermique d'une durée de 5 heures de l'extrait enzymatique, à une température de 60°C avec des intervalles de 30 minutes chacune (Figure 15).



**Figure 15 :** Profils de thermostabilité des endoglucanases de la souche S49.

Le maximum d'activité enzymatique a été observé après incubation de l'extrait enzymatique pendant 10 minutes avec une valeur de 14.71U/ml. A 30 minutes après l'incubation, nous remarquons que l'activité baisse considérablement jusqu'à atteindre une valeur de 7.4U/ml, soit une baisse de près de 50% de l'activité enzymatique. Cependant, même si l'activité des endoglucanases baisse au bout de 30minutes, nous constatons qu'elle présente toujours une activité endoglucanase même après 5h d'incubation.



**Conclusion générale  
&  
Perspectives**

## CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La présente étude a pour objectif essentiel la production et la mise en évidence des activités enzymatiques de type cellulase et xylanase produites par des champignons filamenteux appartenant au LMA. Ces enzymes présentent un intérêt biotechnologique extrêmement important. La décomposition de la cellulose et la xylose en sucres simples, constitue une solution pour les problèmes graves tel que : l'alimentation, l'énergie et la pollution de l'environnement.

Les résultats obtenus s'intègrent dans cette problématique où une première partie expérimentale a été consacrée, après criblage des souches fongiques lignocellulolytiques performantes. Un milieu sélectif, à base de CMC, a été utilisé pour étudier une collection de 60 souches de moisissures lignocellulolytiques, suivi d'un criblage qui a permis de sélectionner six souches performantes qui présentent des activités cellulosiques et xylanolytiques remarquables sur milieu liquide. Cependant, la souche S49 possède les activités cellulolytique et xylanolytique les plus importantes. L'étude des caractères cultureux et morphologiques ont permis le rattachement de la souche S49 au genre *Trichoderma*.

La caractérisation de l'enzyme brut de la souche S49 a révélé des optima de pH 4 et une température de 60°C.

L'activité de l'enzyme augmente de manière significative en présence des ions  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ .

L'activité endoglucanase est maintenue pendant 5heures de chauffage avec un pic d'activité enzymatique après 10minutes d'incubation en présence de la CMC à 2%.

Il serait souhaitable de compléter cette étude par la réalisation de plusieurs tests tels que : la stabilité de l'activité CMCcase en présence de détergents de

commerce, l'étude de l'effet d'autres ions et réactifs chimiques à différentes concentrations, le test de saccharification sur différents substrats.

Ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent en :

- L'optimisation des conditions de production d'enzyme lignocellulosiques (Température, pH) ;
- La recherche d'autres activités lignocellulosiques (ligninases) ;
- L'immobilisation des enzymes pour augmenter leur stabilité thermique ;
- La purification et la caractérisation des enzymes destinées surtout à un usage alimentaire ou pharmaceutique.

## **Références bibliographiques**

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abarca ML, Bragulat MR, Castella G, Cabanes FJ. (1994).** Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var *niger*. *Appl Environ Microbiol.* 60: 2650– 2652.
- Aiba, S., Humphrey, A. E., Millis, N. F. (1973).** *Biochemical engineering* (2nd Edition), Academic Press inc. New York.
- Alarcón-Gutiérrez, E. (2007).** Influence de facteurs abiotiques sur la régulation des paramètres microbiens impliqués dans la dégradation de la matière organique d'une litière forestière méditerranéenne. Thèse de doctorat, Aix-Marseille 3, France.
- Ando. S., Ishia. H., Kosugi. Y., Ishikawa. K. (2002).** Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Appl. Environn. Microbiol.* 68(1). 430–433.
- Balat, M. (2011).** Production de bioéthanol à partir de matériaux lignocellulosiques par voie biochimique : une revue. *Conversion et gestion de l'énergie*, 52(2), 858-875
- Barnett C C., Berka R M., Fowler T. (1991).** Cloning and amplification of the gene encoding an extra cellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio Technology.* 9: 562-567.
- Barbosa, I. V. M., Merquior, D. M., Peixoto, F. C. (2006).** Estimation of kinetic and mass-transfer parameters for cellulose nitration. *AIChE journal*, 52(10), 3549-3554.
- Bettache, A., Messis, A., Copinet, E., Kecha, M., Boucherba, N., Belhamiche, N., Duchiron, F., Benallaoua, S. (2013).** Optimization and partial characterization of endoglucanase produced by *Streptomyces* sp. B-PNG23. *Archives of Biological Sciences*, 65(2), 549-558.
- Botton. B., Breton. A., Fevre. M., Gauthier. S., Guy. P.H., Larpent. J.P., Reymond. P., Sanglier. J.J., Vayssier. Y., Veau. P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. *Collection Biotechnologies.* 34-428.
- Boisset, C., Frascini, C., Schulein, M., Henrissat, B., Chanzy, H. (2000).** Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1444-1452.

- Braaksma, M., Bijlsma, S., Coulier, L., Punt, P. J., van der Werf, M. J. (2011).** Metabolomics as a tool for target identification in strain improvement: the influence of phenotype definition. *Microbiology*, 157(1), 147-159.
- Brown Jr, RM (2004).** Structure et biosynthèse de la cellulose : que nous réserve le XXI<sup>e</sup> siècle? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(3), 487-495.
- Buckeridge, MS, Dietrich, SMC et De Lima, DU (2000).** Galactomannanes comme hydrate de carbone de réserve dans les graines de légumineuses. Dans *Développements en agronomie* (Vol. 26, pp. 283-316). Elsevier.
- Busto M D., Ortega N., Perez-Mateos M. (1996).** Location, Kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. *Bioresource Technology*. 57: 187-192.
- Burlacu, A., Cornea, C. P., Israel-Roming, F. (2016).** Microbial xylanase: a review. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 20, 335-342
- Cavaco-Paulo, A. (1998).** Processing textile fibers with enzymes. In : Erikson K.E., CvacoPaulo A., editors. Enzyme application in fiber processing. *ACS. Symp. Ser.* 687.p :180-189.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimen B., Penn P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Edition Bioforma. Paris. P. 11, 53, 55, 57, 59, 81, 85, 93, 102, 103, 109.
- Chandel, AK, Singh, OV, Venkateswar Rao, L., Chandrasekhar, G., Lakshmi Narasu, M. (2011).** Bioconversion du nouveau substrat *Saccharum spontaneum*, une mauvaise herbe, en éthanol par *Pichia stipitis* NCIM3498. *Technologie des bioressources*, 102 (2), 1709-1714
- Chavez Montes, R. A. (2008).** Caractérisation de mutants et transformants d'alpha-L-arabinofuranosidase chez *Arabidopsis thaliana* . Thèse de Doctorat, Université de Toulouse III-Paul Sabatier, France.
- Chukwuma, OB, Rafatullah, M., Tajarudin, HA et Ismail, N. (2020).** Enzymes lignocellulolytiques dans les procédés biotechnologiques et industriels : une revue. *Durabilité* , 12 (18), 7282.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. (2005).** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29 (1), 3-23.
- Cosgrove, DJ (2005).** Croissance de la paroi cellulaire végétale. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (11), 850-861
- Cooke, R. C., Whipps, J. M. (1993).** Constraints, limitations and extreme environments. *Ecophysiology of Fungi* (Cooke, RC, Whipps, JM, Eds.), 85-110.

- Cuissinat, C., Navard, P. (2006).** Gonflement et dissolution de la cellulose, partie 1 : fibres de coton et de bois flottant librement dans des mélanges de N-méthylmorpholine-N-oxyde-eau. Dans *Macromolecular Symposia* (Vol. 244, No. 1, pp. 1-18). Weinheim : WILEY-VCH Verlag.
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009).** Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International journal of biological sciences*, 5(6), 578.
- Ferreira, N. L. (2008).** Valorisation des ressources renouvelables: de la production d'éthanol au développement de nouveaux bioproduits. *Journal de La Société de Biologie*, 202(3), 191–199.
- Duchiron, F. ; Copinet, E. (2011).** Fermentation en milieu solide (FMS) BIO620 v1
- Ghose, TK (1977).** Biosynthèse de la cellulase et hydrolyse des substances cellulosiques. Dans *Advances in Biochemical Engineering, Volume 6* (pp. 39-76). Springer, Berlin, Heidelberg
- Ghose, T.K. (1987).** Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59(2). 257–268.
- Goldbeck, R., Andrade, C. C. P., Pereira, G. A. G., Maugeri Filho, F. (2012).** Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. *African Journal of Biotechnology*, 11(53), 11595-11603.
- Guiraud J. (1998).** Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris. P: 8-101.
- Gupta V., Prasanna R., Chaudhary V., Nain L (2012).** Biochemical, structural and functional characterization of two novel antifungal endoglucanases from *Anabaena laxa*. *Biocat. Agric. Biotechnol*,1: 338–347
- Gusakov, A.; Sinitsyn, A.; Berlin, A.; Markov, A.; Ankudimova, N.(2007).** Desing of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose, *Biotechnol. Bioeng*, 97, P: 1028–1038.
- Halder, P., Kundu, S., Patel, S., Setiawan, A., Atkin, R., Parthasarthy, R., Shah, K. (2019).** Progress on the pre-treatment of lignocellulosic biomass employing ionic liquids. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 105, 268-292.
- 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.
- 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
- Hoch, G. (2007).** Hémicelluloses de la paroi cellulaire en tant que réserves mobiles de carbone dans les tissus végétaux non reproducteurs. *Écologie fonctionnelle*, 21 (5), 823-834.
- Howard, RL, Abotsi, ELJR, Van Rensburg, EJ et Howard, S. (2003).** Biotechnologie lignocellulosique : enjeux de la bioconversion et de la production d'enzymes. *Journal africain de biotechnologie* , 2 (12), 602-619.
- Karlsson, J., Momcilovic, D., Wittgren, B., Schülein, M., Tjerneld, F., Brinkmalm, G. (2002).** Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45Acore from *Trichoderma reesei*. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 63(1), 32-40
- Kapoor, M., Nair, L. M., Kuhad, R. C. (2008).** Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochemical Engineering Journal*, 38(1), 88-97.
- Khelfa, A., Fingueneisel, G., Auber, M., Weber, JV (2008).** Influence de certains minéraux sur les mécanismes de dégradation thermique de la cellulose. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 92(3), 795-799.
- Kögel-Knabner, I. (2002).** La composition organique macromoléculaire des résidus végétaux et microbiens en tant qu'apports à la matière organique du sol. *Biologie et biochimie des sols*, 34(2), 139-162.
- Kotchoniet S.O., Gachomo E.W., Omafuvbe B.O., Shonukan O.O (2006).** Purification and biochemical characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from a catabolite repression insensitive mutant of *Bacillus pumilus*. *Int. J. Agri. Biol.* 8 (2): 286–292.
- Krishna S H., Rao K C., Babu J S., Reddy D S. (2000).** Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Biop. Eng.* 22: 467-470.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011).** Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 10 pages.
- Lamb, J., Loy, T. (2005).** Seeing red: the use of Congo Red dye to identify cooked and damaged starch grains in archaeological residues. *Journal of Archaeological Science*, 32(10), 1433-1440.
- Lakshmikant. D. (1990).** Cellulose degradation and cellulase activity of five cellulolytic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 6. 64-66.

- Landreau A. (2001).** Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Thèse de Doctorat: Pharmacie: Nantes, France. P: 201.
- Leclerc .H., Gaillard. J.L., Simonet. M. (1995).** Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. Edition *Doin*, Paris. 119-133-134-194.
- Leghlimi, H. (2013).** Cellulases de souches fongiques issues du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de Doctorat, Reims, France.
- Li. K.C., Azadi. P., Collins. R., Tolan. J., Kim .J.S., Eriksson. K.E.L. (2000).** Relation ships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme Microb Technol.* 27(2). 89–94.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002).** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577.
- Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J., Blackburn, J. W. (2010).** Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(6), 1841-1852
- Madan. M., Thind. K.S.(1998).** Physiology of fungi. Edition: A.P.H publishing corporation. New Delhi.57-99.
- Malherbe, S. et Cloete, T. E. (2003).** Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review. *Environ. Sci. Biotechnol.* 1: 105-114.
- Mandels, M., Weber, J. (1969).** The Production of Cellulases. *Cellulases and Their Applications*, Chapter 23, pp.391–414. doi:10.1021/ba-1969-0095.ch023
- Medve, J., Karlsson, J., Lee, D., Tjerneld, F. (1998).** Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and bioengineering*, 59(5), 621-634.
- Mohamed-benkada Mustapha. (2006).** Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse: Pharmacie: Nantes. P: 9, 10, 11, 12, 13.
- Moularat, S., Draghi, M., Lacaze, I., Moletta-Denat, M., Boust, F., Oriol, G., Robine, E. (2013).** Étude et compréhension de la dynamique de colonisation microbienne des supports?: vers l'élaboration de nouveaux traitements préventifs adaptés aux environnements intérieurs. *Rapport final du programme PRIMEQUAL Q*, 5-2100082987.

- Newman, R.H. (1994).** Crystalline forms of cellulose in softwoods and hardwoods. *J. Wood Chem. Technol.* 14: 451-466.
- Neirotti E, Azevedo JL (1988).** Técnicas semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em *Humicola* sp. *Rev Microbiol*, 19:78–81
- Niranjane A.P., Malhou P., Stevenson T.W (2007).** The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1464-1468.
- Nogawa M., Goto M., Okada H., Morikawa Y. (2001).** L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Genet.* 38: 329-334
- Niamke, J. N., & Wang, N. M. (2003).** Cellulose degradation by fungi. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. Arora, DK (ed). Marcel Dekker, Inc., NY, USA, 363-374.
- O'donohue, MJ (2008).** La production de carburants à partir de la biomasse lignocellulosique par voie biologique : état de l'art et perspectives. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* , 15 (3), 172-177
- Odier F., Rouau X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine p.199-214. In: Mouranche A., C. (ed), *Hydrolases et dépolymérase. Enzyme d'intérêt industriel*. Edition Gauthier-Villard, Paris.
- Palonen, H., Tjerneld, F., Zacchi, G. et Tenkanen, M. (2004).** Adsorption de *Trichoderma reesei* CBH I et EG II et de leurs domaines catalytiques sur bois résineux prétraité à la vapeur et lignine isolée. *Journal of Biotechnology*, 107(1), 65-72.
- Pentilla M E., Andre E L., Saloheimo M., Lehtovaara P., Knowles J K. (1987).** Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 3: 175-785.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002).** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.
- Prevot, V. (2013).** Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de Doctorat, Reims, France.
- Raimbault, M. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology.* 1(3). 1-15.
- Roussos, S., et Raimbault, M. (1982).** Hydrolysis of cellulose by fungi. II. Production of cellulases by *Trichoderma harzianum* by fermentation in liquid media. *Annales de microbiologie*, Vol. 133, No. 3, pp. 465-474).

- Rani D.S, Thirumade S.N.K (2004).** Production of cellulase by *Clostridium papyrosolvens* CFR-703. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 629-632.
- Receveur V., Czjzek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of a two-domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry.* 277(43), P: 40887-40892.
- Reiter WD, Chapple C, Somerville CR (1997).** Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. *Plant J.*, 12:335-345.
- Rifkin, J. (2012).** La troisième révolution industrielle : comment le pouvoir latéral va transformer l'énergie, l'économie et le monde ?. Paris (France) : Les Liens qui Libèrent. 380 p. ISBN : 978-2918597476.
- Roy S K., Dey S K., Raha S K., Chakrabarty S L. (1990).** Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). *Journal of General Microbiology.* 136: 1967-1971.
- Ryu, D. D., Mandels, M. (1980).** Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(2), 91-102.
- Sandgren M., Stahlberg J., Mitchinson C. (2005).** Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog Biophys Mol Bio.* 89: 246-291.
- Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T. T., Ståhlberg, J., Johansson, G., ... & Knowles, J. K. (1988).** EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene*, 63(1), 11-21.
- Sánchez, C. (2009).** Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*, 27(2), 185-194.
- Scriban R. (1993).** *Trichoderma reesei* exhibit true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Biotechnologie.* P : 32-690, 4<sup>ème</sup> édition.
- Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M., Gelfand D., Kwok S., Myamlo K., Innis M. (1983).** Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio Technology.* 1: 691-695.
- Saloheimo, M., Nakari-Setälä, T., Tenkanen, M., Penttilä, M. (1997).** cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 249(2), 584-591
- Shahriarinnour, M., Wahab, M. N. A., Mohamad, R., Mustafa, S., Ariff, A. B. (2011).** Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Biotechnology*, 10(38), 7459-7467.

- Singh.A. (1999).** Engineering enzyme properties. *Indian Journal of Microbiology*, vol. 39, no. 2, P: 65–77.
- Stephen, B., Parungao, M. M. (2003).** Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae. *Mycological Research*, 107(2), 231-235.
- Subhedar, P. B., Gogate, P. R. (2014).** Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101, 108-114.
- Sun, Y., et Cheng, J. (2002).** Hydrolyse des matériaux lignocellulosiques pour la production d'éthanol : une revue. *Technologie des bioressources* , 83 (1), 1-11.
- Taherzadeh, M. et Karimi, K. (2008).** Prétraitement des déchets lignocellulosiques pour améliorer la production d'éthanol et de biogaz : une revue. *Journal international des sciences moléculaires*, 9(9), 1621-1651.
- Takashima S., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., Uozumi T. (1999).** Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* 125: 728-736.
- Tanveer. P., Shashank. G., Joginder. S., Ashish. V., Manish. K., Naseem. G., Madhu. B., Reiaz. R., Aji.t V., Vivek. K., Manoj. K.(2014).** Characterization of *Actinomycetes* and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *Springer Open Journal*. 3(622).12.
- Tao, Y. M., Zhu, X. Z., Huang, J. Z., Ma, S. J., Wu, X. B., Long, M. N., Chen, Q. X. (2010).** Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6126-6130.
- Ting, C. L., Makarov, D. E., Wang, Z. G. (2009).** A kinetic model for the enzymatic action of cellulase. *The journal of physical chemistry B*, 113(14), 4970-4977
- Ten LN, Im WT, Kim MK, Kang MS, Lee ST. 2004.** Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *J Microbiol Methods*, 56: 375–382.
- Tong C C., Cole A L., Shephred M G. (1980).** Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochemica Journal*. 191: 83-94.
- van, J., Munoz-Dorado, J., De la Rubia, T. D. L. R., Martinez, J. (2002).** Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology*, 5(2), 53-63.

- van Parijs, FR, Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. et Merks, RM (2010).** Modélisation de la polymérisation de la lignine. I. Modèle de simulation de polymères de déshydrogénation. *Physiologie végétale* , 153 (3), 1332-1344.
- Wertz, Jean-Luc (2011).** Les hémicelluloses. Note de synthèse (15 novembre 2011). Document ValBiom – Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège. Document FARR-Wal – Avec le soutien de la Région Wallonne – DGO3/4 Réf.2011
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, DH et Zheng, C. (2007).** Caractéristiques de la pyrolyse de l'hémicellulose, de la cellulose et de la lignine. *Carburant*, 86(12-13), 1781-1788.
- Zhang . P.Y.H., Hong. J. , Ye. X. (2009).** Cellulase Assays in: Mielenz.J-R. Biofuels. Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*.581.213-231.

## **Annexes**

## ANNEXE I : milieux de culture :

### 1. Gélose pomme de terre, dextrose, agar (PDA)

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Pomme de terre.....      | 200g    |
| Glucose.....             | 20g     |
| Agar.....                | 20g     |
| Eau distillée (qsp)..... | 1 litre |
| pH final.....            | 5       |

### 2. Milieu gélosé de criblage CMC.

|   |         |
|---|---------|
| Carboxymethylcellulose (CMC).....           | 7g      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....       | 4g      |
| NaCl.....                                   | 2g      |
| MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) ..... | 1g      |
| MnSO <sub>4</sub> .....                     | 0.05g   |
| FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O) ..... | 0.05g   |
| CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O) ..... | 2g      |
| NH <sub>4</sub> Cl.....                     | 2g      |
| Agar.....                                   | 15g     |
| Eau distillée.....                          | 1 litre |

### 3. Milieu Mandels et Weber (Mandels et Weber, 1969)

|   |         |
|---|---------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                 | 2g      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | 1.4g    |
| Urée.....   | 0.3g    |
| MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....            | 0.3g    |
| CaCl <sub>2</sub> .....                               | 0.3g    |
| FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O).....            | 5mg     |
| MnSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O).....             | 1.56mg  |
| ZnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)°.....           | 1.4mg   |
| CoCl <sub>2</sub> .....                               | 2mg     |
| Eau distillée (qsp).....                              | 1 litre |
| La source de carbone étant.....                       | 1% CMC  |
| pH.....   | 5       |

Tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20minutes.

## ANNEXE II : Réactifs et tampons

### 1. Réactif DNS (Ghose, 1987)

|   |         |
|---|---------|
| DNS.....                                    | 10g     |
| NaOH.....                                   | 16g     |
| Tartrate double 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.

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

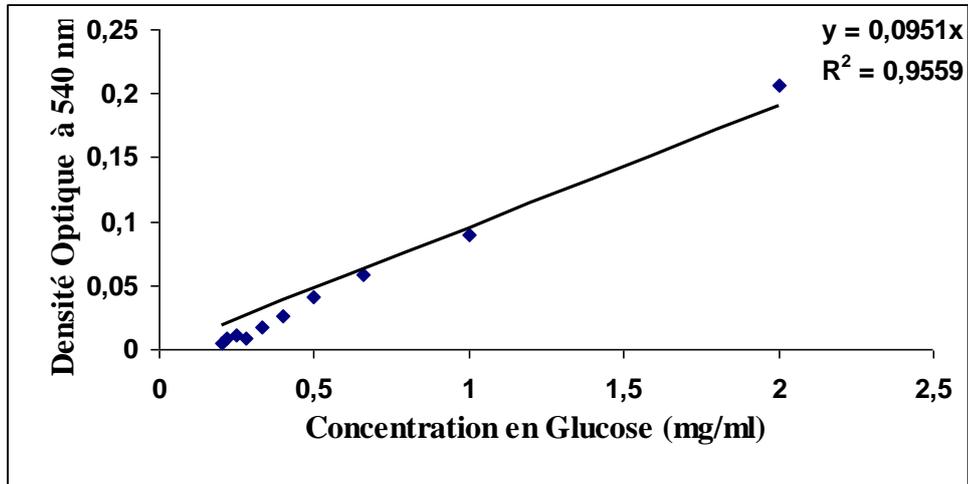
#### Tampon citrate (1M , pH 4.5)

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Acide citrique monohydraté..... | 21g    |
| NaOH.....                       | 5 à 6g |
| Eau distillée (qsp).....        | 100ml  |

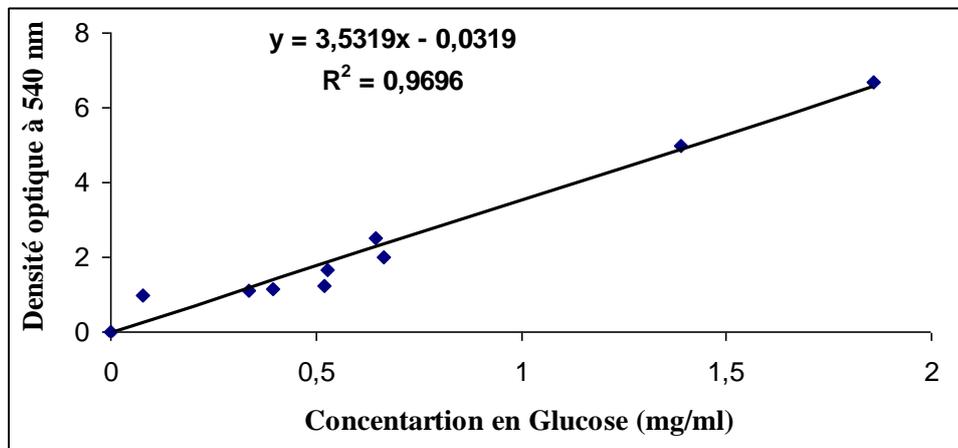
#### Tampon citrate (50mM, pH 4.8)

Diluer le premier tampon (1M, pH 4.5) par l'ajout de 19 fois le volume en eau distillée.

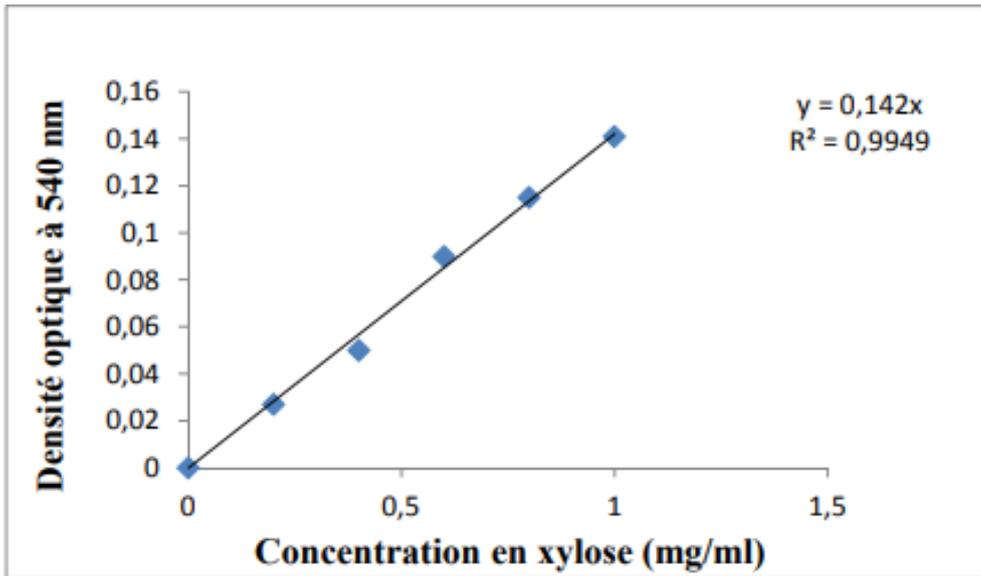
### Annexe III : Courbes d'étalonnages



**Figure16** : courbe d'étalonnage du dosage du glucose (CMCase)



**Figure 17**: courbe d'étalonnage du dosage du glucose (FPAse)



**Figure 18** : Courbe d'étalonnage du xylose

## Resumé

Ce travail s'intéresse à la mise en évidence des activités lignocellulolytiques chez des souches fongiques. Pour cela, la première partie de ces travaux de recherche a porté sur la sélection de la souche la plus performante dans la sécrétion d'enzymes lignocellulosiques. 60 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 qualitatif sur milieu gélosé (CMC-agar), cela a permis de les classer sur la base de leurs indices cellulolytiques. 55 isolats sont sélectionnés avec un IC supérieur ou égal à 1 à l'exception des moisissures envahissantes. Un deuxième criblage quantitatif sur milieu liquide a permis de sélectionner 6 isolats les plus performants. La souche S49 s'est révélée la plus performante, avec une activité enzymatique relativement importante. L'étude morphologique réalisée sur cette moisissure a permis de la rattacher au genre *Trichoderma*. Les résultats de la caractérisation partielle ont montré que les cellulases et les xylanases de la souche S49 atteignent des activités élevées à 60°C pendant 5 heures, avec un pH optimum à 4. L'ion métallique  $Mn^{+2}$  induit une augmentation et une amélioration des activités enzymatiques, ces caractéristiques de thermostabilité et de pH acide sont recherchées par les industriels.

**Mots clés :** Lignocellulose, champignons filamenteux, Cellulase, Xylanase, *Trichoderma*.

## Abstract

This work is interested in the demonstration of lignocellulolytic activities in fungal strains. For this, the first part of this research work focused on the selection of the best performing strain in the secretion of lignocellulosic enzymes. 60 isolates capable of growing on agar medium in the presence of CMC as the sole source of carbon and energy are subjected to a first qualitative screening on agar medium (CMC-agar), which allowed them to be classified on the basis of their cellulolytic indices. 55 isolates are selected with a CI greater than or equal to 1 with the exception of invasive molds. A second quantitative screening on liquid medium made it possible to select the 6 best performing isolates. Strain S49 shows relatively high enzymatic activity.

A morphological study is carried out on this mold which made it possible to attach it to the genus *Trichoderma*. The results of the partial characterization showed that the cellulases and xylanases of the S49 strain reach high activities at 60 ° C for 5 hours, with an optimum at pH 4.

The metal ion  $Mn^{2+}$  induces an increase and an improvement of the enzymatic activity, these characteristics of thermostability and of acid pH are sought after by the industrialists.

**Key words :** Lignocellulose, filamentous fungi, Cellulase, Xylanase, *Trichoderma*.