



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Département De Biologie Appliquée

Thèse

Présentée en vue de l'obtention
du diplôme de Doctorat troisième cycle LMD
En Biotechnologie Microbienne et Bioprocédés

N° d'ordre : 21/D3C/2023
N° de série : 01/B.Ap/2023

Intitulé :

**Recherche et isolement de microorganismes des milieux
extrêmes algériens producteurs de métabolites d'intérêt
sur différents substrats agro-industriels pertinents**

Présentée par : **Djelid Hadjer**

Devant le jury :

Président : HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid

Directeur de thèse : KACEM CHAOUCHE Noredine

Co-directeur de thèse : FLAHAUT Sigrid

Examineur : SIFOUR Mohamed

Examineur : BENHAMDI Asma

Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1

Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1

Pr. Université Libre de Bruxelles

Pr. Université Mohamed Seddik Ben Yahia Jijel

MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire 2022-2023

*À mes parents, à qui, je dois ma réussite,
À la mémoire de mon frère Raouf.*

Remerciements

Ce travail symbolise à la fois la fin de mon cursus universitaire, mais également le début d'une future carrière. C'est pour moi la fin d'une mue personnelle riche en événements, en rencontres, une véritable période de construction intérieure.

Je tiens tout d'abord à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la grande patience d'accomplir ce modeste travail.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans le cadre d'un projet de coopération Wallonie-Bruxelles-Algérie, entre le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) de l'université de Constantine 1, l'unité 3BioTech de l'Université Libre de Bruxelles (ULB) et le Laboratoire de microbiologie appliquée de l'école interfacultaire de Bioingénieurs à l'université Libre de Bruxelles. Je tiens donc à remercier le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique algérien, ainsi que la Wallonie-Bruxelles International (WBI), pour leur implication dans le domaine des énergies renouvelables et le développement durable. Merci d'avoir soutenu le sujet de ma thèse et d'avoir financé celle-ci pour permettre son déroulement dans les meilleures conditions.

Je tiens particulièrement à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur Noredine Kacem Chaouche, Professeur à l'université de Constantine 1 et directeur de cette thèse, de m'avoir impliqué dans un projet aussi intéressant. Merci aussi pour votre aide, orientation, compréhension, et pour vos précieux conseils durant toutes ces années, ainsi que pour vos compétences scientifiques qui m'ont permis d'évoluer dans la réalisation de cette thèse.

Je remercie du fond du cœur ma Co-encadrante Madame Sigrid Flahaut, Professeur à l'université Libre de Bruxelles, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, de son encadrement, de ses précieux conseils scientifiques et d'avoir accepté de prolonger mon stage après la fermeture des frontières algériennes à cause de la pandémie. Ses qualités humaines, sa modestie, sa patience et son dévouement pour accomplir ses objectifs m'ont été salutaires, et par son savoir, sa droiture et son sérieux, elle a su me communiquer une méthodologie et une rigueur de travail.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, en particulier le président de jury Professeur Hamidechi Mohamed Abdelhafid ainsi que les examinateurs ; Professeur Sifour Mohamed et Docteur Benhamdi Asma.

Je remercie également toute l'équipe de l'unité 3BioTech de l'université libre de Bruxelles, en particulier, Dr. Serge Hiligsmann qui a encadré mes travaux durant mon premier stage, merci pour votre aide, encadrement et pour vos précieux conseils. Merci à Danielle aussi, pour ses précieux coups de main et sa bonne humeur.

Je remercie du fond du cœur mon amie Dr. Corinne Vander Wauven pour sa contribution à la réalisation de ce travail. Tu as pleinement joué ton rôle et tu as répondu présente à chaque étape clé malgré tes multiples fonctions et occupations. Merci pour tes encouragements permanents, tes conseils aussi bien scientifiques que personnels et pour ton soutien sans faille, à la pailasse comme pour la rédaction. C'était un vrai plaisir de t'avoir à mes côtés au cours de cette aventure, durant laquelle j'ai su apprécier tes qualités humaines de communication, d'écoute, et de souci. Merci aussi de m'avoir transmis ta passion pour le monde fascinant d'ornithologie, pour toutes les sorties qu'on a fait ensemble et pour tes cadeaux. Je te souhaite une agréable retraite !

J'adresse un grand merci à mon amie Yamina Oudjama. Ces mots sont pour t'exprimer la reconnaissance que j'ai à ton égard que ce soit sur le plan professionnel ou personnel, merci pour ta disponibilité permanente, et d'avoir consacré beaucoup de ton temps pour me transmettre tes connaissances dans le domaine de la purification des protéines qui m'ont énormément aidé à réorienter mes recherches, c'était un grand plaisir de collaborer avec une scientifique comme toi. Merci également pour toutes nos sorties et pour tes beaux cadeaux qui resteront pour moi un bon souvenir de toi.

Je remercie vivement toute l'équipe de l'institut de recherche LABIRIS pour leur support technique, à sa tête le directeur Mr. Alain Durieux de m'avoir permis de mener ce travail jusqu'à son terme dans de bonnes conditions. Un grand merci à Bertrand, non seulement pour m'avoir aidée à mettre en place des méthodes de manipulations, mais aussi pour sa gentillesse, ses qualités humaines et d'avoir toujours ajouté un sourire à nos longues journées au labo. Merci à Elisabeth aussi pour son travail de qualité en matière d'analyses HPLC et à Sandra, Nathalie, Raphael et Martine pour leur précieux coups de main.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne LaMyBAM, pour leur collaboration et serviabilité.

Ma plus profonde reconnaissance et mon plus grand remerciement s'adresse à mes chers parents pour leurs sacrifices, encouragements, patience, leur présence à mes côtés à chaque étape de ma vie et pour leur grande contribution à l'élaboration de ce manuscrit. Cette thèse est la vôtre aussi, le fruit d'un soutien indéfectible.

Je remercie mes frères et mes sœurs de m'avoir soutenue et d'avoir toujours été présents pour moi, en particulier, mon défunt frère Raouf Djelid, merci pour ta bonté, ta bonne humeur, et pour ton éternel optimisme, qui resteront à jamais gravés dans ma mémoire. Je garde toujours tes messages vocaux, pleins de Douaa et d'encouragements, que tu m'envoyais durant mon séjour en Belgique et j'imagine quelle serait ta joie aujourd'hui, j'aurai voulu que tu assistes à l'aboutissement de ces années de dur labeur. Qu'Allah t'accueille dans son vaste paradis.

Je voudrais aussi exprimer ma profonde reconnaissance à mes amis de Belgique Adel, Mirko, Meheni, Souleef et Chahrazed pour les bons moments qu'on a passé ensemble, pour tous nos fous rires, pour leur soutien permanent, leur serviabilité et pour leur présence précieuse aux moments durs que j'ai vécu en Belgique.

Je souhaite particulièrement remercier mon amie Dr. Roumaissa Zenzen, pour toute l'aide qu'elle m'a apporté, merci chère Maïssa de m'avoir accueilli chez toi pendant la période de préparation de mes dossiers de bourse et de visa, merci encore à toi, à ton frère et aux propriétaires des huileries de Jijel de m'avoir fourni les grignons d'olives.

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

1. Introduction	1
2. Revue bibliographique	4
2.1. La biomasse lignocellulosique	4
2.1.1. Quels gisements ?	4
2.1.2. Définition	4
2.1.3. Composition et structure	5
2.1.3.1. La cellulose	6
2.1.3.2. Les hémicelluloses	6
2.1.3.3. La lignine	8
2.1.4. Résidus agricole des grignons d'olives	8
2.1.4.1. Origine	8
2.1.4.2. Composition chimique des grignons d'olives	9
2.1.4.3. Différentes filières de valorisation des grignons d'olives	9
2.2. Valorisation de la biomasse lignocellulosique	10
2.2.1. Bactéries cellulolytiques impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique	12
2.2.1.1. Bactéries halotolérantes cellulolytiques	13
2.2.2. Les cellulases	14
2.2.2.1. Différents modes d'actions des cellulases	15
2.2.2.1.1. Les endoglucanases	15
2.2.2.1.2. Les exoglucanases	16
2.2.2.1.3. Les β -glucosidases	16
2.2.2.2. Application industrielle des cellulases halotolérantes	17
2.3. Les biosurfactants	18
2.3.1. Définition	18
2.3.2. Bactéries productrices de biosurfactants	19
2.3.3. Les lipopeptides de <i>Bacillus</i>	20

2.3.3.1. Les surfactines	20
2.3.3.2. Les fengycines	20
3.2.3.3. Domaines d'application des surfactines et des fengycines	21
3. Matériel et méthodes	23
3.1. Préparation de grignons d'olives	23
3.1.1. Prélèvement, séchage et broyage	23
3.1.2. Dosage partiel des constituants de grignons d'olives	23
3.1.2.1. Dosage des lipides	24
3.1.2.2. Détermination de la teneur en constituants pariétaux	24
3.1.2.3. Détermination de la teneur en azote total et en protéines	25
3.2. Isolement de bactéries cellulolytiques	26
3.2.1. Sites d'étude et d'échantillonnage.....	26
3.2.2. Isolement et purification des isolats bactériens	27
3.2.3. Conservation des isolats bactériens	27
3.2.4. Criblage des isolats cellulolytiques	27
3.3. Identification de l'isolat cellulolytique performant.....	28
3.3.1. Identification moléculaire.....	28
3.4. Etude des caractéristiques extrêmotolérants de l'isolat H1.....	29
3.4.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne.....	29
3.4.2. Effet de NaCl sur la croissance bactérienne.....	29
3.5. Sélection du milieu de la production de l'endo-1,4- β -glucanase par fermentation submergée	30
3.5.1. Effet de la source d'azote	30
3.5.2. Effet de la durée d'incubation	30
3.6. Production simultanée d'endo-1,4- β -glucanase et de biosurfactants sur milieu sélectionné	30
3.6.1. Préparation de l'inoculum et conditions de culture.....	30
3.6.2. Méthodes analytiques.....	31
3.6.2.1. Dosage de l'activité enzymatique avec le substrat chromogénique.....	31
3.6.2.2. Dosage de l'activité endo-1,4- β -glucanase	32
3.6.1.3. Détermination de la production de biosurfactants	32
3.6.1.4. Estimation de la biomasse par dosage des protéines totales intracellulaire	32
3.6.1.5. Dosage des protéines avec la méthode de Bradford	33
3.7. Etude de la corrélation de la production d'endo-1,4- β -glucanase et de biosurfactants..	33

3.8. Purification d'endo-1,4- β -glucanase	34
3.8.1. Préparation du surnageant de culture	34
3.8.2. Concentration des protéines par ultrafiltration	34
3.8.3. Dialyse	34
3.8.4. Purification d'endo-1,4- β -glucanase par chromatographie échangeuse d'ions...	34
3.8.5. Evaluation du processus de purification par électrophorèse sur gel: SDS-PAGE..	35
3.9. Identification de l'enzyme par chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS)	35
3.10. Caractérisation physico-chimique de l'endo-1,4- β -glucanase	36
3.10.1. Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	36
3.10.2. Effet de la température sur l'activité enzymatique	36
3.10.3. Activité enzymatique résiduelle	36
3.10.4. Effet de NaCl sur l'activité enzymatique	37
3.10.5. Etude de la spécificité de l'activité hydrolasique de l'endo-1,4- β -glucanase	37
3.11. Caractérisation biophysique de l'endo-1,4- β -glucanase	37
3.11.1. Balayage spectrophotométrique	37
3.11.2. Effet de NaCl sur la thermostabilité de l'endo-1,4- β -glucanase (Thermal Shift Assay)	38
3.12. Identification des produits de saccharification des polysaccharides par HPLC...	38
3.12.1. Hydrolyse des grignons d'olives et de β -glucane d'orge par le surnageant de culture (cocktail enzymatique)	38
3.12.2. Hydrolyse des cello-oligosaccharides par l'endo-1,4- β -glucanase purifiée.....	39
3.13. Etude de la cinétique enzymatique	39
3.14. Purification partielle et concentration de lipopeptides	39
3.15. Identification de lipopeptides par HPLC	40
3.16. Test du potentiel surfactant : l'effondrement de la goutte (Drop Collapse)	40
4. Résultats et discussion	43
4.1.Préparation et dosage partiel des constituants de grignons d'olives	43
4.2. Isolement et sélection des bactéries cellulolytiques	44
4.3. Identification de l'isolat cellulolytique performant	45
4.4. Etude des caractéristiques extrêmotolérants de l'isolat H1	46
4.5. Détermination des conditions optimales de la production d'endo-1,4- β -glucanase par <i>B. velezensis</i> H1	47
4.5.1.Effet de la source d'azote	47

4.5.2. Effet de la durée d'incubation	48
4.6. Production simultanée d'endo-1,4- β -glucanase et de biosurfactants sur milieu sélectionné	49
4.7. Corrélation de la production d'endo-1,4- β -glucanase et de biosurfactants	51
4.8. Purification de l'endo-1,4- β -glucanase	52
4.9. Identification de l'endo-1,4- β -glucanase	53
4.10. Caractérisation physico-chimique de l'endo-1,4- β -glucanase	54
4.10.1. Effet du pH sur l'activité enzymatique	54
4.10.2. Effet de la température sur l'activité de l'endo-1,4- β -glucanase	55
4.10.3. Activité enzymatique résiduelle	55
4.10.4. Effet de NaCl sur l'activité enzymatique	56
4.10.5. Etude de la spécificité de l'activité hydrolasique de l'endo-1,4- β -glucanase	57
4.11. Caractérisation biophysique de l'endo-1,4- β -glucanase	58
4.11.1. Balayage spectrophotométrique de l'endo-1,4- β -glucanase purifiée	58
4.11.1. Effet de NaCl sur la thermostabilité de l'endo-1,4- β -glucanase	58
4.12. Identification des produits de saccharification des polysaccharides par HPLC	59
4.13. Etude de la cinétique enzymatique	60
4.14. Purification partielle et concentration de lipopeptides	61
4.15. Identification de lipopeptides par HPLC	62
4.16. Potentiel biosurfactant : l'effondrement de la goutte (Drop Collapse)	64
5. Conclusion et perspectives	67
Références bibliographiques	70
Annexes	96
Productions scientifiques	98

Résumé

Dans ce travail, l'activité cellulolytique a été explorée chez des isolats bactériens obtenus de divers sites d'un écosystème extrême algérien, en l'occurrence le lac salé d'El M'Ghair (l'eau du lac salé principal, le sol situé à sa proximité et le sol de la palmeraie située à proximité du lac). En effet, 43 isolats bactériens ont été isolés dont 9 ont montré une capacité à dégrader la carboxyméthyl-cellulose (CMC) avec différentes valeurs des indices cellulolytiques. Le criblage a montré que l'isolat H1, isolé à partir du sol de la palmeraie située à proximité du lac, possède le meilleur potentiel cellulolytique avec une valeur d'indice cellulolytique de 5.5. L'identification moléculaire de cet isolat a montré qu'il s'agit de l'espèce *Bacillus velezensis* dont les numéros d'accension aux GenBank (NCBI) sont : OM510337 pour l'ARNr 16S et OM523097 pour la *gyrA*. Cette souche exhibe une croissance optimale à 37 °C sur le bouillon 863 dépourvu de NaCl, cependant, elle se développait sur le même milieu contenant 10% de NaCl à 55 °C, ce qui lui procure les caractéristiques de thermotolérance et d'halotolérance. Pour tester sa capacité à dégrader la matière lignocellulosique et à produire des lipopeptides à activité biosurfactante, la souche a été ensemencée sur un milieu constitué de 5% de grignons d'olives supplémenté par 0.5% d'extrait de levure et incubée à 37°C sous agitation de 150 rpm. Effectivement, durant les 72 h de fermentation la souche a hydrolysé les grignons d'olives en libérant différents oligosaccharides grâce à sa production d'une cellulase (CelH1). Cette dégradation a permis, en outre, de produire des lipopeptides à activité tensioactive et émulsifiante, avec une importante corrélation positive de production de l'enzyme et de biosurfactants de 77%. L'enzyme CelH1 a été, ensuite, purifiée 44.9 fois et récupérée avec un rendement de 80% et une activité spécifique de 453.04 U/mg de protéine, en utilisant, seulement, deux étapes successives : une ultrafiltration et une chromatographie échangeuse d'ions. En effet, la masse moléculaire de l'enzyme a été estimée à 26 kDa par SDS-PAGE, et son identification, par analyse LC-ESI-MS/MS, a montré qu'elle couvre 40% de la séquence d'une endo-1,3-1,4- β -glucanase qui appartient à la famille 16 des glycosydes hydrolases. L'activité enzymatique optimale a été obtenue à pH 6.0-6.5 et à 60-65 °C, l'enzyme demeurerait stable après 48 h d'incubation dans les conditions du test. L'activité CelH1 la plus élevée a été mesurée sur le substrat β -glucane d'orge (604,5 U/mL) suivi du lichénane et de CMC, confirmant que l'enzyme étudiée est une endo-1,4- β -glucanase. La CelH1 est hautement thermotolérante et halotolérante conservant 77% de son activité à 70 °C et 70% en présence de 4 M NaCl. L'enzyme a un V_{max} de 625 U/min/mL et une haute affinité avec le β -glucane d'orge avec un K_m de 0.69 mg/mL. Elle a également montré une capacité significative à libérer des cello-oligosaccharides en hydrolysant le cellopentaose. Les lipopeptides produits par *B. velezensis* H1 sont partiellement purifiés en utilisant une colonne C18. L'analyse par HPLC de l'extrait lipopeptidique a montré que la souche de *B. velezensis* H1 a la capacité de produire au moins deux lipopeptides : la surfactine et la fengycine, sur le milieu à base de GO. Le potentiel biosurfactant et tensioactif de ces produits a été démontré par un test de Drop Collapse en utilisant l'huile d'olive et de paraffine comme substrats hydrophobes, un effondrement complet de ces derniers a été observé, dû à la réduction de la tension superficielle de la surface des substrats hydrophobes sous l'effet de l'extrait lipopeptidique.

Mots clés : Matière lignocellulosique, grignons d'olives, *Bacillus velezensis*, biodégradation, endo-1,4- β -glucanase, halotolérance, thermotolérance, biosurfactants.

Abstract

In this study, the cellulolytic activity of bacteria isolated from various locations in an extreme algerian ecosystem was investigated. The salt lake of El M'Ghair was specifically examined (along with its nearby soil and water, as well as a nearby palmeraie). In fact, 9 of the 43 bacterial isolates were able to degrade carboxymethyl-cellulose (CMC) with varying cellulolytic index values. The analysis has shown that the bacterial isolate H1, which was isolated from the soil of a palmeraie near a lake, has the best cellulolytic potential, with a value of 5.5 of CI. The isolate's molecular analysis revealed that it belongs to the species *Bacillus velezensis*, whose accession numbers to GenBank (NCBI) are OM510337 for the 16S ARN and OM523097 for the *gyrA*. This strain exhibits optimal growth at 37 °C in 863 broth without NaCl, however, it resisted at 55 °C in the same medium with 10% NaCl, giving rise to its thermotolerance and halotolerance characteristics. The strain was inoculated on a medium containing 5% olive mill wastes (GO), 0.5% yeast extract, and 150 rpm stirring to test its capacity to hydrolyse lignocellulosic material and produce lipopeptides with biosurfactant activity. Indeed, during the 72 hours of fermentation, the olive mill wastes was hydrolyzed by the release of various oligosaccharides due to strain ability to produce a cellulase (CelH1). This degradation also made it possible to produce lipopeptides with surfactant and emulsifying activity. A significant positive correlation of the cellulase and biosurfactants production was observed (77%). The CelH1 enzyme was, then, purified 44.9 folds and recovered with a yield of 80% and a specific activity of 453.04 U/mg of protein, using only two successive steps: ultrafiltration and ion exchange chromatography. Indeed, the molecular mass of the enzyme was estimated at 26 kDa by SDS-PAGE, and its identification by LC-ESI-MS/MS analysis, showed that it covers 40% of the sequence of an endo-1,3-1,4- β -glucanase from family 16 of glycosyl hydrolases. After 48 hours of incubation under test conditions, the enzyme remained stable and displayed optimal enzymatic activity at pH 6.0-6.5 and at 60-65°C. The highest CelH1 activity was measured on barley β -glucan substrate (604.5 U/mL) followed by lichenan and CMC, confirming that the studied enzyme is an endo-1,4- β -glucanase. CelH1 is highly thermotolerant and halotolerant retaining 77% of its activity at 70°C and 70% in the presence of 4 M NaCl. The enzyme has a V_{max} of 625 U/min/mL and a high affinity with barley β -glucan with a K_m of 0.69 mg/mL. It has also shown a significant ability to release cello-oligosaccharides by hydrolyzing cellopentaose. Lipopeptides produced by *B. velezensis* H1 are partially purified using a C18 column. HPLC analysis of the lipopeptide extract showed that the *B. velezensis* H1 strain has the ability to produce at least two lipopeptides: surfactin and fengycin, on the GO-based medium. The biosurfactant and tensioactive potential of these products was demonstrated by a Drop Collapse test using olive oil and paraffin as hydrophobic substrates, a complete collapse of the lipopeptides drop was observed, due to the reduction of surface tension of the hydrophobic substrates under the effect of the lipopeptide extract.

Keywords : Lignocellulosic material, olive mill wastes, *Bacillus velezensis*, biodegradation, endo-1,4- β -glucanase, halotolerance, thermotolerance, biosurfactants.

ملخص

في هذا العمل، تم استكشاف نشاط انحلال السيلولوز في عزلات بكتيرية تم الحصول عليها من مواقع مختلفة من نظام بيئي قاسي و هو بحيرة الملح المتواجدة في منطقة المغير (مياه البحيرة المالحة الرئيسية ، التربة الواقعة بالقرب منها وأرضية بستان النخيل الواقع بالقرب من البحيرة). في الواقع ، تم عزل 43 عزلة بكتيرية ، 9 منها أظهرت قدرة على تحليل الكربوكسي ميثيل السيلولوز (CMC) بقيم مختلفة لمؤشر السيلولوز. أظهر الفحص أن العزلة H1 المعزولة من تربة بستان النخيل الواقع بالقرب من البحيرة ، لديها أفضل إمكانات لتحليل السيلولوز مع أعلى قيمة لمؤشر السيلولوز التي بلغت 5.5. أظهر التحديد الجزيئي لهذه العزلة أنها من نوع *Bacillus velezensis* مع أرقام الانضمام لـ OM510337 (NCBI)GenBank و ARNr 16S و OM523097 لـ *gyrA* أظهرت هذه السلالة نموًا مثاليًا عند 37 درجة مئوية في وسط 863 الخالي من كلوريد الصوديوم ، ومع ذلك ، قاومت السلالة على نفس الوسط الذي يحتوي على 10 ٪ كلوريد الصوديوم عند 55 درجة مئوية ، مما يمنحها خصائص التحمل الحراري والملحي. لا اختبار قدرتها على تحليل مادة الليجنو سيلولوز وإنتاج بيتيدات دهنية ذات نشاط خافض للتوتر الحيوي ، تم زرع السلالة على وسط يتكون من 5 ٪ من ثقل الزيتون و 0.5 ٪ من مستخلص الخميرة وحضنت عند 37 درجة مئوية مع التقلب عند 150 دورة في الدقيقة. في الواقع ، خلال 72 ساعة من التخمير ، قامت السلالة بتحليل ثقل الزيتون عن طريق إطلاق سكريات قليلة مختلفة وذلك بفضل إنتاجها للإنزيم السليولاز (CelH1) هذا التحلل امكناها أيضًا من إنتاج بيتيدات دهنية مع نشاط سطحي واستحلاب ، مع ارتباط إيجابي كبير بين إنتاج الإنزيم والفاعل الحيوي بنسبة 77 ٪. تم بعد ذلك تنقية الإنزيم 44.9 مرة واستعادته بعائد 80 ٪ ونشاط محدد 453.04 وحدة / ملجم من البروتين ، باستخدام خطوتين متتاليتين فقط: الترشيح الفائق وكروماتوجرافيا التبادل الأيوني. في الواقع ، تم تقدير الكتلة الجزيئية للإنزيم بـ 26 كيلو دالتون بواسطة SDS-PAGE ، وأظهر تحديدها ، عن طريق تحليل LC-ESI-MS / MS ، أنها تغطي 40 ٪ من تسلسل الأحماض الأمينية لإنزيم endo-1,3-1,4-β-glucanase الذي ينتمي إلى العائلة 16 من هيدرولازات الجليكوزيل. تم الحصول على النشاط الأنزيمي الأمثل عند درجة الحموضة 6.0-6.5 وعند 60-65 درجة مئوية ، ظل الإنزيم مستقرًا بعد 48 ساعة من الحضانة تحت ظروف الاختبار. تم قياس أعلى نشاط لـ CelH1 على ركيزة الشعير β-glucan

(604.5 U / mL) متبوعًا بـ lichenan و CMC ، مما يؤكد أن الإنزيم المدروس هو endo-1,4-β-glucanase يعتبر CelH1 شديد التحمل للحرارة ومقاوم للملوحة حيث احتفظ بنسبة 77 ٪ من نشاطه عند 70 درجة مئوية و 70 ٪ في وجود 4 مولات من كلوريد الصوديوم. يحتوي الإنزيم على V_{max} 625 U / min / mL وتقارب عالٍ مع الشعير β-glucan بمقدار 0.69 مجم / مل. وقد أظهر أيضًا قدرة كبيرة على إطلاق السكريات عن طريق تحليل السليوبنتوز. تم تنقية البيتيدات الدهنية التي أنتجتها *B. velezensis* H1 جزئيًا باستخدام عمود C18. أظهر تحليل HPLC لمستخلص البيتيد الدهني أن سلالة *B. velezensis* H1 لديها القدرة على إنتاج اثنين على الأقل من البيتيدات الدهنية: سيرفاكتين وفينجيسين ، على الوسط المعتمد على GO تم إثبات قدرة تخفيض التوتر السطحي لهذه المنتجات من خلال اختبار انهيار القطرة باستخدام زيت الزيتون والبارافين كركائز كارهة للماء ، وقد لوحظ انهيار كامل لقطرة البيتيدات المثبتة فوق سطح الزيوت المجربة ، و ذلك بسبب انخفاض التوتر السطحي تحت تأثير مستخلص البيتيدات الدهنية.

الكلمات المفتاحية: مادة الليجنوسيلولوز ، ثقل الزيتون ، *Bacillus velezensis* ، التحلل الحيوي،

Endo-1,4-β-glucanase مقاومة الملوحة ، مقاومة حرارية ، مواد خافضة للتوتر الحيوي

Liste des figures

Figure 1	Structure et modèle d'organisation du complexe lignocellulosique	5
Figure 2	Structure du polymère de cellulose	6
Figure 3	Structure des différentes hémicelluloses trouvées dans la paroi cellulaire des plantes terrestres	7
Figure 4	Structure Chimique de la lignine	8
Figure 5	Différentes filières de valorisation des GO	10
Figure 6	Exemples de structure 3D de cellulases	15
Figure 7	Représentation schématique de l'action des cellulases sur la cellulose	16
Figure 8	Structures générales des tensioactifs	18
Figure 9	Structure primaire de la surfatine	20
Figure 10	Structure primaire de la fengycine	21
Figure 11	Broyage des grignons d'olives dans un micro-broyeur	23
Figure 12	Extraction des lipides par Soxhlet	24
Figure 13	Vue générale des deux sites d'échantillonnage. A: Lac salé d'El M'Ghair; B: palmeraies distantes de 20 mètres du lac. C: Carte du grand lac salé d'EL M'Ghair (source : Google Maps).....	27
Figure 14	Principe de dosage par l'azo β -glucane d'orge	31
Figure 15	Screening des isolats cellulolytiques sur gélose à base de CMC. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 5 jours, ensuite colorées avec une solution rouge Congo à 0.1% (p/v) et décolorées avec 1 M NaCl. Les zones claires autour des colonies montrent la dégradation de la CMC par les isolats. Les isolats H1, H2 et H3 possèdent les meilleurs IC.....	45
Figure 16	Aspect microscopique de l'isolat H1 sélectionné pour son potentiel cellulolytique. (a) Forme végétative (en forme de bâtonnets) à un grossissement de 1000X. (b) Résultat de la coloration de Gram (violet).....	45
Figure 17	Identification moléculaire de l'isolat cellulolytique H1 (a) Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène <i>ARNr 16S</i> de <i>B. velezensis</i> H1. La barre d'échelle indique une substitution de 0,002 nucléotide par position de nucléotide ; (b) Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène <i>gyrA</i> de <i>B. velezensis</i> H1. Les deux arbres ont été générés par l'algorithme Maximum-Likelihood	46

Figure 18	Etude de la thermotolérance et l'halotolérance de <i>B.velezensis</i> H1. (a) Taux de croissance maximal et temps de génération de <i>B.velezensis</i> H1 à différentes températures d'incubation. (b) Taux de croissance maximal et temps de générations des cultures avec différentes concentrations de NaCl...	47
Figure 19	Optimisation de la production de la CelH1 par <i>B. velezensis</i> H1. (a) Activité enzymatique après 24 h d'incubation sur GO supplémentées de plusieurs sources d'azote ajoutées. (b) Activité enzymatique à différents temps d'incubation.....	48
Figure 20	Co-production de la CelH1 et de biosurfactants par <i>B. velezensis</i> H1	50
Figure 21	Corrélation de la production de la CelH1 avec l'activité émulsifiante (AE) des lipopeptides produits par <i>B. velezensis</i> H1 sur les grignons d'olives	52
Figure 22	Profil d'élution de la CelH1 par chromatographie échangeuse d'ions : la colonne est lavée avec du tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5.0, à un débit de 0.7 mL/min, puis éluée à 100 mM de NaCl avec un gradient de 0-500 mM de NaCl	53
Figure 23	Purification et analyse LC-MS de la CelH1. (a) Analyse des étapes de purification par SDS-PAGE sur gel 12%. Piste 1 : Marqueurs de poids moléculaire. Piste 2 : Surnageant après ultrafiltration et dialyse. Piste 3 : protéines éluées de la colonne CM-sépharose pendant l'étape de lavage avec un tampon d'acétate de sodium 50 mM pH 5.0 (NaCl 0 mM). Piste 4 : Fractions contenant la CelH1 (26 kDa) éluées à 100 mM de NaCl. (b) Analyse de recherche MASCOT sur la base de données NCBI de séquences partielles d'acides aminés de la bande de 26 kDa. Les séquences de couleur rouge correspondent aux acides aminés correspondants à l'endo- β -1,3-1,4-glucanase homologue	54
Figure 24	Propriétés de la CelH1 sécrétée par <i>B. velezensis</i> H1. (a) Activité sur une gamme de pH; (b) Activité sur une gamme de températures; (c) Activité enzymatique résiduelle (d) Activité en présence de concentrations croissantes de NaCl. Dans les graphiques (a) et (b), l'activité la plus élevée correspond à 100 %; dans le graphique (c) l'activité de la CelH1 non pré-incubée est prise comme 100%, dans le graphique (c) l'activité en l'absence de NaCl est prise comme 100 %.....	54
Figure 25	Spectre d'absorption UV-VIS de la CelH1 purifié, avec balayage de longueur d'onde de 220 à 350 nm.....	58
Figure 26	Etude de thermostabilité de la CelH1 par fluorescence (a) Les dérivées de l'émission de fluorescence en fonction de la température (-dF/dT) créées par le logiciel LightCycler, qui montrent un T_m de 60 °C sur la partie la plus basse de la courbe (le test est réalisé en triple exemplaire en présence de différentes concentrations de NaCl); (b) Les T_m de la CelH1 en présence de concentrations croissantes de NaCl (de 0 à 2,5 M) ...	59

Figure 27	Analyse HPLC des produits d'hydrolyse de différents polysaccharides par la CelH1 et par le surnageant de culture de <i>B. velezensis</i> H1 sur GO. (a) Hydrolyse du β -glucane d'orge par le surnageant de culture. (b) Hydrolyse de GO par le surnageant de culture. (c) Hydrolyse du cellopentaose par la CelH1 purifiée.....	60
Figure 28	Activité de la CelH1 en fonction de différentes concentrations de β -glucane d'orge. Graphique inséré : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de l'influence de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel sur l'activité de la CelH1.....	61
Figure 29	Spectres de l'UV visible des lipopeptides (210 nm) synthétisés par <i>B. velezensis</i> H1 montrant l'absorbance de l'échantillon avant et après la purification et la concentration sur colonne C18	62
Figure 30	Chromatogramme HPLC des lipopeptides synthétisés par <i>B. velezensis</i> H1. (a) Standard de la surfactine à 1 mg/mL élue en mode isocratique (b) Echantillon du mélange de lipopeptides purifiés et concentrés élués en mode isocratique (pics de surfactine détectés) (c) Standard de la fengycine à 1 mg/mL élue en mode gradient (d) Echantillon du mélange de lipopeptides purifiés et concentrés élués en mode gradient (pics de fengycine détectés)	64
Figure 31	Test qualitatif d'effondrement des gouttes (Drop Collapse test) en utilisant l'échantillon de lipopeptides extraits et concentrés. (a) Témoin (eau) sur l'huile d'olive (goutte stable) (b) Témoin (eau) sur l'huile de paraffine (c) Extrait de lipopeptides sur l'huile d'olive (goutte effondrée) (d) Extrait de lipopeptides sur l'huile de paraffine (goutte effondrée)	65

Liste des tableaux

Tableau 1 Récapitulatif des différents gisements de biomasses lignocellulosiques.....	5
Tableau 2 Principaux composés chimiques des GO données par différents auteurs	9
Tableau 3 Principales bactéries productrices de cellulase à partir de la biomasse lignocellulosique	13
Tableau 4 Cellulases halotolérantes produites par différentes bactéries halotolérantes ...	14
Tableau 5 Principales classes de biosurfactants produits par différentes bactéries	20
Tableau 6 Composition des grignons d'olives	44
Tableau 7 Valeurs des IC de différentes bactéries à activité cellulolytique, isolées à partir des environnements extrêmes de l'Est d'Algérie (lac salé d'El M'Ghair, Sol du lac salé et le sol d'une palmeraie située à proximité du même lac salé).....	44
Tableau 8 Périodes d'incubation nécessaires pour la production maximale d'endoglucanase, par plusieurs espèces de <i>Bacillus</i> cultivées sur différents substrats lignocellulosiques	49
Tableau 9 Bilan global de purification de la CelH1 produite par <i>B. velezensis</i> H1	53
Tableau 10 Activité hydrolytique de la CelH1 sur différents polysaccharides	58
Tableau 11 Différents résidus utilisés dans la production de biosurfactants par différents microorganismes	63

Liste des abréviations

ADF	Acid Detergent Fiber
ADL	Acid Detergent Lignin
AE	Activité Emulsifiante
AIE	Agence Internationale de l'Energie
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
B-PER	Bacterial Protein Extraction Reagent
BSA	Bovine Serum Albumine
CAZy	Carbohydrate-Active enZymes
CelH1	Endo-1,4- β -glucanase
CMC	Carboxyméthyl-Cellulose
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
DO	Densité optique
DP	Degrés de Polymérisation
FAO	Food and Agriculture Organisation
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
G	Temps de Génération
GC	Gomme de caroube
GO	Grignons d'olives
H₂SO₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
IC	Indice Cellulolytique
KCl	Chlorure de Potassium
K_m	Constante de Michaelis-Menten

KNO₃	Nitrate de potassium
LC-ESI-MS/MS	Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric
MCC	Cellulose microcrystalline
MgSO₄	Sulfate de magnésium
Na₂SO₃	Sulfite de sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDF	Neutral Detergent Fiber
NH₃	Ammoniac
NH⁴⁺	Formule brute de l'ion ammonium
PCR	Polymerase Chain Reaction
R	Coefficient de corrélation
R²	Coefficient de détermination
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Smf	Fermentation submergée
T_m	Température de fusion
Tris-HCl	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol hydrochlorique
TSA	Thermal Shift Assay
V_{max}	Vitesse de réaction maximale
p-NPG	4-Nitrophenyl β-D glucopyranoside
(NH₄)₂SO₄	Sulfate d'ammonium
μ_{max}	Taux de croissance maximal

Introduction

1. Introduction

De nos jours, la dégradation de l'environnement et le réchauffement climatiques, deviennent un sujet de préoccupation majeure dans un contexte d'explosion démographique et de dépendance continue aux ressources énergétiques fossiles, qui sont en voie d'épuisement. Face à cette situation, la protection de l'environnement et la maîtrise des ressources alternatives de l'énergie sont l'un des piliers du développement durable, qui constitue un enjeu majeur pour l'avenir de l'homme et de la planète (Mensah 2019; Sangwan et Bhatia 2020). Parmi les différentes formes des énergies renouvelables, on cite la biomasse végétale, communément, appelée matière lignocellulosique (Nahak et al., 2022), qui apparaît comme une ressource susceptible d'être valorisée comme bio-produits à haute valeur ajoutée respectueux de l'environnement (Liu et al., 2019). Cette matière lignocellulosique peut provenir de cultures énergétiques, de sous-produits de l'industrie du bois, de l'agriculture ou encore de déchets ménagers (Anwar et al., 2014).

Durant la dernière décade, les études sur la biomasse lignocellulosique ont été renforcées en vue de son utilisation comme une source alternative dans le proche avenir (Roth et al., 2020) et, plus récemment, pour sa contribution dans la reprise économique durant la phase post-pandémique (Andiappan et al., 2021). Plusieurs études ont confirmé que les investissements dans le domaine de la biomasse lignocellulosique peuvent stimuler la croissance économique et créer des systèmes énergétiques plus propres, non seulement pour la reprise post-pandémique, mais aussi pour accélérer l'approvisionnement durable en carbone (Kulisic et al., 2021; Rodríguez et al., 2020; Tian et al., 2022).

La biomasse lignocellulosique est majoritairement composée de cellulose, d'hémicellulose, et de lignine dans des proportions différentes, la cellulose étant le composant majeur avec 38 à 50% de sa masse totale, représente de ce fait le polysaccharide le plus abondant de la biosphère. Ce polysaccharide peut être fractionné et transformé en sucres simple fermentescibles par voie chimique ou biotechnologique (Bayer et al., 2007; Khandeparker et Numan 2008). La voie chimique est, comme son nom l'indique est basée sur l'utilisation de produits chimiques pour attaquer les parois végétales, malgré ses rendements élevés, ce procédé est très coûteux et a une empreinte écologique indésirable. La voie biotechnologique quant à elle, utilise des cultures microbiennes ou des cocktails d'enzymes cellulolytiques pour dégrader la cellulose avec un faible impact environnemental (Jørgensen et al., 2007). Dans ce contexte, et face au problème crucial des coûts élevés de production des cellulases en utilisant des substrats commerciaux, la biomasse issue des déchets agricoles accumulés s'est révélée attractive (Pham et al., 2022). Par conséquent, de nombreuses études se sont focalisées sur l'amélioration de l'efficacité de la

INTRODUCTION

production de cellulase par la recherche et l'isolement de microorganismes capables de sécréter une quantité élevée d'enzymes en utilisant comme substrat les déchets agricoles.

En plus de la libération des cello-oligosaccharides de la biomasse végétale durant la fermentation afin de synthétiser des métabolites secondaires, la récupération et la purification des cellulases microbiennes à la fin des fermentations a une grande importance car, elles peuvent avoir un grand potentiel biotechnologique dans plusieurs domaines (Dawood et Ma, 2020). De plus, des caractéristiques extrêmophiles supplémentaires, telles que leur tolérance aux sels et à la chaleur, favorisent leurs applications industrielles vues, leur rôle concluant en biotechnologie. Ces avantages ont entraîné une augmentation de la demande pour ces enzymes extrêmophiles et davantage de publications sur le sujet afin de comprendre les processus de leur purification, leur caractérisation physico-chimique et leurs mécanismes catalytiques (Song et al., 2017).

Les cello-oligosaccharides libérés par les cellulases à partir de la biomasse végétale sont, actuellement, une thématique de recherche importante, tant dans l'aspect fondamental qu'appliqué, pour les industries du monde pharmaceutique, alimentaire, cosmétique ou de décontamination, car ils constituent une source de biomolécules à haute valeur ajoutée et sont, particulièrement, étudiés comme précurseurs de molécules plateformes, de bio-tensioactifs, de bioplastiques et de biocarburants (Sharma et al., 2016).

La synthèse de lipopeptides à activité biosurfactante (bio-tensioactive) par bioconversion microbienne de la biomasse lignocellulosique a fait l'objet de la seconde partie de ce travail. En 2021, la consommation annuelle mondiale en agents tensioactifs (surfactants) a généré un chiffre d'affaires estimé à 57 milliards de dollars, en sachant que 75 à 80% de ces composés amphiphiles étaient issus de la pétrochimie (Roelants et Soetaert 2021). Dans ce contexte de développement durable et de prise de conscience de l'impact environnemental de l'usage des ressources fossiles, des tensioactifs issus des ressources renouvelables voient le jour. Les prévisions de leur consommation étant à la hausse, il convient de développer de nouvelles molécules amphiphiles correspondant aux exigences et aux besoins à la fois, des industriels et des consommateurs (produits performants à coût de production réduit, éco-compatibles à faible impact environnemental). Il existe plusieurs tensioactifs synthétisés par voie biologique par des bactéries. La surfactine, comme son nom l'indique est connue pour son activité surfactante très puissante. Le *Bacillus velezensis* produit cette molécule lipopeptidique avec d'autres lipopeptides tel que la fengycine. Ces bio-tensioactifs dont les propriétés de surface, la biodégradabilité et l'innocuité vis-à-vis de la peau leur offrent de nombreuses applications dans les domaines de la bioremédiation, de détergence, de la cosmétique et de l'alimentaire

(Rajkhowa et Sarma 2022). Mis à part leur caractère tensioactif, ces molécules possèdent un large panel d'activités biologiques recherchées.

En Algérie, la biomasse lignocellulosique générée annuellement par l'oliveraie, considérée comme une source énergétique renouvelable, est très considérable. Une tonne d'huile d'olive peut générer entre 2 à 4 tonnes de sous-produits solides (grignons) et liquide (margines) (Akbi et al., 2017), leur accumulation peut causer de graves problèmes de pollution pour l'environnement, et leur élimination par incinération n'est pas une solution idéale puisqu'ils causeront les mêmes problèmes que les combustibles fossiles. De ce fait, leur bio-valorisation représente un défi tant scientifique que socio-économique.

C'est dans l'optique de bio-valorisation de grignons d'olives que s'inscrit le travail présenté. En effet, l'objectif principal de cette thèse consiste en l'isolement d'une bactérie capable à la fois, de sécréter une cellulase comme métabolite primaire indispensable à sa croissance en dégradant les grignons d'olives pour libérer plusieurs cello-oligosaccharides et de les utiliser dans la synthèse des lipopeptides bio-tensioactifs. L'étude se puise de la littérature pour fournir, à travers une synthèse bibliographique approfondie, un état de l'art de la recherche dans le domaine investi. La première partie de l'étude expérimentale repose sur l'isolement et la purification des bactéries isolées à partir de différents sites du lac salé d'El M'Ghair, et le screening des isolats possédant une activité cellulolytique. La deuxième partie s'intéresse à l'identification moléculaire de l'isolat sélectionné et l'évaluation de ses potentialités extrêmophiles. La troisième partie est consacrée à l'utilisation des grignons d'olives pour la co-production et l'étude de corrélation entre une cellulase de la famille des endo-1,4- β -glucanase et un mélange de lipopeptides. Ensuite, dans la quatrième partie, l'étude approfondie de caractéristiques biotechnologiques et industrielles de l'endo-1,4- β -glucanase produite et purifiée est réalisée à savoir : sa haute halotolérance, thermotolérance, thermostabilité et sa capacité à libérer plusieurs cello-oligosaccharides. Enfin, la dernière partie décrit la caractérisation des lipopeptides produits qui sont aussi partiellement purifiés, concentrés, identifiés par HPLC, et évalués par rapport à leurs potentialités tensioactives vis-à-vis de certaines huiles.

Revue bibliographique

2. Revue bibliographique

2.1. La biomasse lignocellulosique

2.1.1. Quels gisements ?

Aujourd'hui, le gisement mondial de biomasse est suffisamment important pour permettre, sans problème, une utilisation énergétique à grande échelle, en substitution de combustibles fossiles. On estime qu'à l'échelle mondiale, 140 Gt de résidus agricoles sont générés chaque année, soit un potentiel énergétique mondial de 61,3 Gtep (Hills et al., 2020). Selon Lal (2005), la quantité annuelle totale de résidus de culture produite dans le monde est estimée à 2,8 Gt pour les cultures céréalières, 3,1 Gt pour 17 céréales et légumineuses majeures et 3,8 Gt pour 27 cultures vivrières courantes. L'agence internationale de l'énergie (AIE) a rapporté en 2015 que la ressource mondiale de résidus de cultures céréalières non exploités s'élève à 517 Mt (AIE 2015). En 2002, l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a prévu que de 1999 à 2030, le secteur agricole des pays en développement augmentera de 13% soit 120 Mha (FAO 2002). L'intensification de l'agriculture et l'augmentation du rendement des cultures augmenteront sans aucun doute la production de résidus de cultures, car il existe une corrélation positive entre la disponibilité des résidus de cultures et leur production (Bentsen et Felby, 2010). Les ressources de résidus lignocellulosiques sont généralement répertoriées selon les secteurs économiques qui les produisent, tels que l'agriculture, la sylviculture, la consommation des ménages ou l'industrie agro-alimentaire (tableau 1), en Algérie, les résidus issus de cette dernière pourraient fournir jusqu'à 0,67 Mtep (Gares et al., 2020). Malgré les récentes études, les estimations de la production totale algérienne de résidus lignocellulosiques sont encore peu précises.

2.1.2. Définition

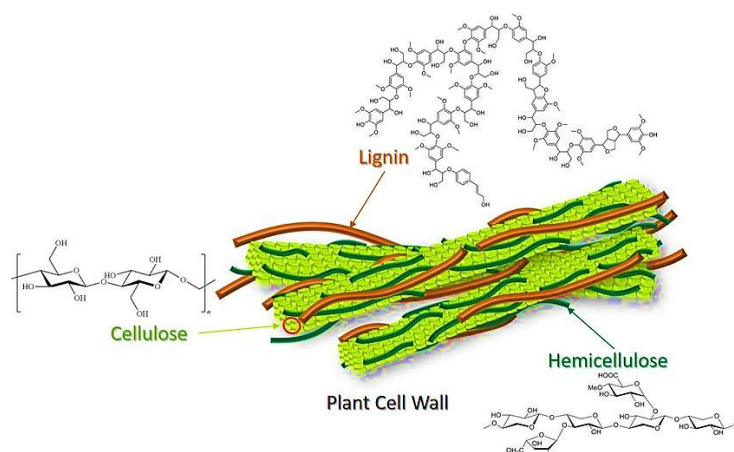
Le terme biomasse signifie au sens large la masse totale des organismes vivants présents dans un milieu naturel donné (Anwar et al., 2014). Depuis le premier choc pétrolier, en 1973, ce concept s'applique aux produits organiques végétaux et animaux utilisés à des fins énergétiques ou agronomiques, en somme, il s'agit de l'ensemble de la matière organique d'origine végétale, animale ainsi que ses produits issus de différentes transformations (les déchets organiques) (Bielski et al., 2021). La biomasse est reconnue comme une source d'énergie propre et renouvelable possédant un potentiel important pour remplacer, sur le marché de l'énergie, les combustibles fossiles conventionnels, elle est en abondance et se place comme troisième source d'énergie après le pétrole et le charbon (Pereira et al., 2012).

Tableau 1 Récapitulatif des différents gisements de biomasses lignocellulosiques.

Catégories	Ressources	Références
Fraction organique des déchets ménagers	Bio-déchets alimentaires (principalement d'origine végétale)	(Andersen et al., 2010)
Déchets cellulositiques	Déchets d'emballage en papiers ou carton Papiers (journaux, magazines, papier de bureau).	(Kuo et al., 2021)
Déchets de transformation de produits agricoles	Mélasses, tourteaux, grignons, pulpes, marcs, coques...	(Sarker et al., 2021)
Déchets de fabrication de produits alimentaires	Déchets de production	(Mirabella et al., 2014)
Résidus de culture	Parties des plantes laissées non cultivées et laissées sur place : pailles, cannes...	(Sarker et al., 2021)
Résidus d'exploitation forestière	Tout le bois coupé et laissé sur place: houppiers, branchages, cônes de pin.	(Picchio et al., 2020)
Déchets de l'industrie du bois	Sciures, chutes de bois, copeaux d'usinage, poussières de ponçage	(Vallejos et al., 2017)

2.1.3. Composition et structure

La biomasse est constituée majoritairement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène (Kirubakaran et al., 2009). (Raveendran et al., 1995) ont rapporté que la formule chimique générale de chaque biomasse végétale est représentée comme suit : $C_xH_yO_z$, dont les coefficients x, y et z sont calculés pour chaque biomasse. La matière inorganique (cendres) fait aussi partie de la composition de la biomasse, avec un pourcentage variant de moins de 1% dans le bois à 15% dans la biomasse herbacée (Agblevor et al., 2002) et plus de 25% dans certains résidus agricoles (Blasi et al., 1999). En ce qui concerne les principaux constituants organiques de la biomasse : cellulose, hémicellulose et lignine (figure 1), leurs proportions peuvent être extrêmement variables en fonction de l'espèce végétale, de l'âge et des conditions de croissance (McKendry, 2002). Dans la biomasse, la cellulose constitue la fraction la plus large, suivie de l'hémicellulose, la lignine et les cendres (Alokika et al., 2021).

**Figure 1** Structure et modèle d'organisation du complexe lignocellulosique d'après Jensen et al., (2017)

2.1.3.1. La cellulose

La cellulose est le composé structural majoritaire de la paroi des cellules végétales, et leur assure leur résistance mécanique et leur stabilité chimique (Harmsen et al., 2010). C'est d'ailleurs le composé organique le plus abondant de la biosphère. La cellulose, décrite dans la Figure 2 et dont la formule chimique est $(C_5H_{10}O_5)_n$, est un polymère d'unités dimères de cellobiose (Ponnaiyan, 2016). La cellobiose est constituée de deux sous unités de glucose (D-glucopyranose) associées entre elles à 180° l'une de l'autre par un pont glycosidique (β -1,4) (Mohapatra et al., 2020). Le polymère cellulose se présente sous la forme d'une très longue chaîne sans ramification. Son degré de polymérisation (DP) varie selon l'origine de la plante, de 700 à 15 000 unités de glucose (mais plus communément entre 800 et 10 000), conduisant à des molécules de très hauts poids moléculaires, pouvant atteindre la valeur de 500 000 unités (Fengel et Wegener, 2011; Palonen et Viikari, 2004). La structure cristalline de la cellulose a été déterminée par diffraction des rayons X et par des méthodes basées sur la polarisation du rayonnement infrarouge (Chowdhury et al., 2017).

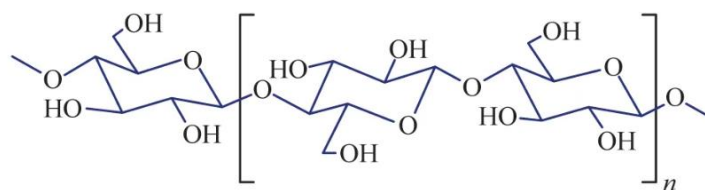


Figure 2 Structure du polymère de cellulose d'après Harmsen et al. (2010).

Les principaux groupes fonctionnels de la cellulose sont les fonctions hydroxyl $-OH$. Distribués de manière homogènes, les fonctions $-OH$ ont la propriété de former des liaisons hydrogènes avec les atomes $-O$, $-N$, et $-S$, et également avec les fonctions $-OH$ d'autres chaînes de cellulose, la chaîne polymérique linéaire présente une fonction aldéhyde à l'une de ses extrémités, qui lui confère des propriétés réductrices (Heinze et Liebert 2001).

2.1.3.2. Les hémicelluloses

La dénomination «hémicelluloses» réunit les polymères hydrocarbonés constitués d'unités monomériques sucres associés entre eux par plusieurs types de liaisons glycosidiques. Les monosaccharides incluent les pentoses C5 (xylose, rhamnose et arabinose), les hexoses C6 (glucose, mannose et galactose) et les acides uroniques (tels que l'acide 4-O-méthyl-glucuronique, l'acide D-glucuronique et l'acide D-galacturonique) (Deshavath et al., 2019). Les xyloses et les mannoses sont les monomères les plus abondants. Il s'agit donc

d'hétéropolymères constitués de chaînes principales généralement de anhydro- β -(1-4)-D-xylopyranose, mannopyranose, glucopyranose et galactopyranose avec de nombreuses substitutions et ramifications (Omisore et al., 2022). Les hémicelluloses sont une grande famille de polysaccharides de paroi cellulaire comprenant les xylanes, les mannanes, les 1,3-1,4- β -glucanes (glucanes à liaison mixte) et les xyloglucanes (Scheller et Ulvskov, 2010) (Figure 3). Les hémicelluloses sont chimiquement associés à d'autres polysaccharides, aux protéines et à la lignine. Si la structure chimique de la cellulose est la même dans les différentes espèces, les hémicelluloses varient considérablement selon l'espèce, et notamment entre les bois durs et les bois tendres. Les hémicelluloses de feuillus sont généralement plus riches en pentoses, tandis que les hémicelluloses de résineux contiennent habituellement davantage d'hexoses (Steinbach et al., 2017). Les hémicelluloses se distinguent également de la cellulose par leurs masses molaires nettement plus faible et par la présence de chaînes latérales courtes branchées sur la chaîne polymérique principale (Berglund et al., 2020).

La diversité des hémicelluloses se traduit par des propriétés bio-physico-chimiques très variables selon l'espèce végétale considérée. Par contraste avec la cellulose, les hémicelluloses sont des polymères facilement hydrolysables par voie enzymatique (Kumar et al., 2009).

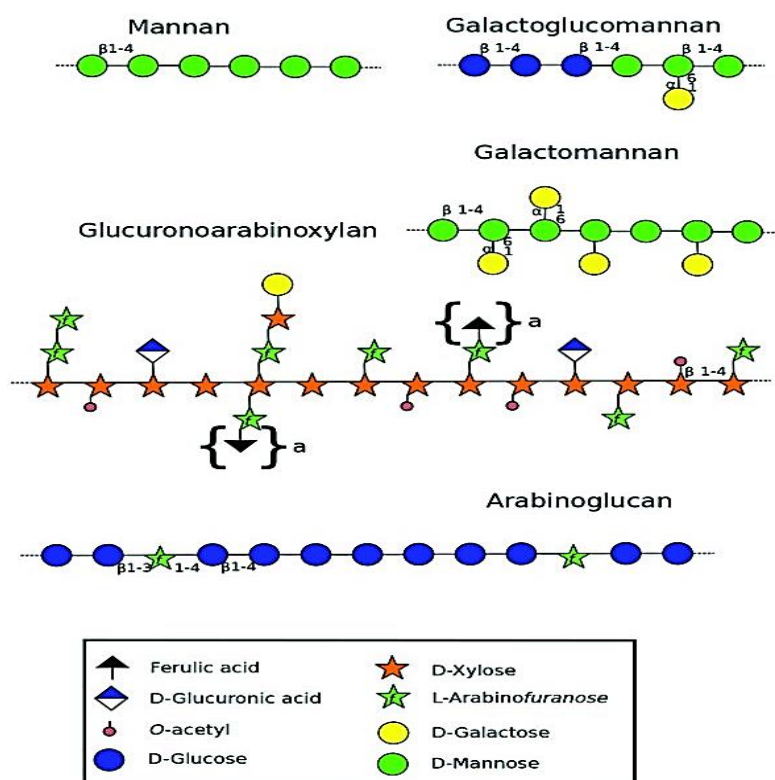


Figure 3 Structure des différentes hémicelluloses trouvées dans la paroi cellulaire des plantes terrestres (Scheller et Ulvskov 2010)

2.1.3.3. La lignine

La lignine est l'un des principaux constituants des biomasses lignocellulosiques. Elle représente 10 à 30% du carbone de la biomasse végétale. La lignine est un nom générique pour désigner un ensemble de polymères phénoliques tridimensionnels, de masses moléculaires élevées, ramifiés, de compositions et de structures variables et complexes. Localisé dans la paroi primaire des cellules végétales, elle leur confère imperméabilité, rigidité et inextensibilité (Wang et al., 2013). La lignine se présente comme un réseau structural tridimensionnel insoluble dans l'eau et très résistant aux attaques chimiques et enzymatiques. La très grande stabilité de la lignine associée à celle de la cellulose explique son rôle significatif dans la résistance chimique et biologique de la grande majorité des biomasses lignocellulosiques (Fengel et Wegener 2011). La complexité des lignines et la diversité de leurs structure proviennent de l'association des trois monolignols par différentes liaisons chimiques sans caractère ordonné ni répétitif pour former un polymère amorphe et hydrophobe (Mottiar et al., 2016) (Figure 4).

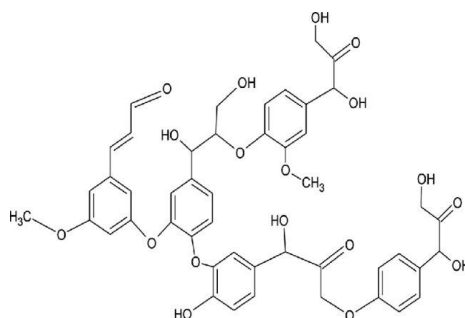


Figure 4 Structure Chimique de la lignine d'après Mahmood et al. (2018)

2.1.4. Résidus agricole des grignons d'olives

2.1.4.1. Origine

98% de l'huile d'olive consommée dans le monde est produite dans la région méditerranéenne (Ducom et al., 2019). Depuis très longtemps, l'huile d'olive est demeurée la base de la cuisine méditerranéenne. L'extraction de l'huile d'olive à partir du fruit de l'olivier est majoritairement réalisée dans cette région où le climat est favorable à la culture de l'olivier (Christoforou et Fokaidès, 2016; Dermeche et al., 2013; Kolokassidou et al., 2009). L'Algérie est l'un des principaux pays méditerranéens producteurs d'huile d'olive avec une production d'environ 44320 tonnes par un an, la plus importante quantité a été enregistrée en 2013 avec près de 64700 tonnes et les données provisoires ont établi une hausse de production d'huile d'olive en 2017-2018 (environ 80 000 tonnes) (Toumi et al., 2019). Cette production génère une quantité importante de sous-produits, dénommé le grignon d'olive (GO) ou bien le résidu d'olive. La production annuelle mondiale des grignons d'olives est estimée de 2 881 500 tonnes/an (Nunes

et al., 2016). Ils se composent de la peau, des morceaux de noyaux, et de la pulpe des olives et une petite quantité d'huile d'olive.

2.1.4.2. Composition chimique des grignons d'olives

Les GO sont des matériaux lignocellulosiques constitués de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine (Anwar et al., 2014; Demirbas 2009; Rangabhashiyam et al., 2013). Ces trois principaux composants ont des poids moléculaires élevés et constituent le pourcentage le plus élevé de la masse totale, suivis d'une importante teneur en matière grasse (lipides) provenant de l'huile d'olive résiduelle, ils contiennent également des constituants extractifs dans une moindre mesure tels que les protéines, les sucres simples et divers autres composés (Roig et al., 2006; Vlyssides et al., 2004). Le type d'olives utilisées et leur maturité influent sur la composition chimique des GO, mais le procédé d'extraction utilisé a également une influence (Ducom et al., 2019). Le tableau 2 récapitule la teneur en cellulose, en hémicelluloses en lignine, et en matière grasse retrouvés par plusieurs auteurs.

Tableau 2 Principaux composés chimiques des GO données par différents auteurs

Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)	Matière grasse (%)	Référence
33.8	16.3	15.8	14	(Ducom et al., 2019)
33.7	15.3	19.8	10.9	(Vlyssides et al., 2004)
27.7	13.0	13.3	14	(Ducom et al., 2019)

2.1.4.3. Différentes filières de valorisation des grignons d'olives

Différentes filières de valorisation des GO sont possibles. Les données de la littérature qui décrivent les principales possibilités de valorisation des GO sont nombreuses, la figure 5 récapitule ces filières. Parmi les quelles, il est possible de citer le compostage, l'extraction de produits à forte valeur ajoutée, l'alimentation du bétail, la fertilisation des sols agricoles, l'élaboration de mélanges à matrice polymère ou l'utilisation comme biosorbants pour l'adsorption de métaux lourds ou de colorants des effluents industriels (Sebban et al., 2004 ; Chouchene, 2010 ; Khemakhem, 2017). Plus récemment, des procédés de biovalorisation énergétique ont suscité un intérêt croissant (Christoforou et Fokaides, 2016). En effet, les GO sont une source d'énergie renouvelable qui contribue de manière significative à la réduction de la consommation de combustibles fossiles et des impacts environnementaux associés. La bioconversion des GO est considérée comme une option respectueuse de l'environnement et du climat en raison d'un bilan quasi neutre en termes d'émissions de gaz à effet de serre si la

ressource est renouvelée. C'est une option encore meilleure car elle permet d'éviter les impacts potentiels des cultures énergétiques dédiées. La valorisation des GO par fermentation en milieu solide en utilisant des microorganismes extrêmophiles peut fournir une panoplie de biocomposés d'intérêt dans les domaines agroalimentaire, cosmétique et même pharmaceutique (Kademi et al., 2003). Tandis que la fermentation anaérobie des lisiers de vaches avec des grignons d'olives produit du méthane à 57-65% du biogaz produit. Ce méthane est utilisé comme une source d'énergie pour le chauffage de l'eau ou en production de l'électricité à usage domestique (Hammad et al., 1999).

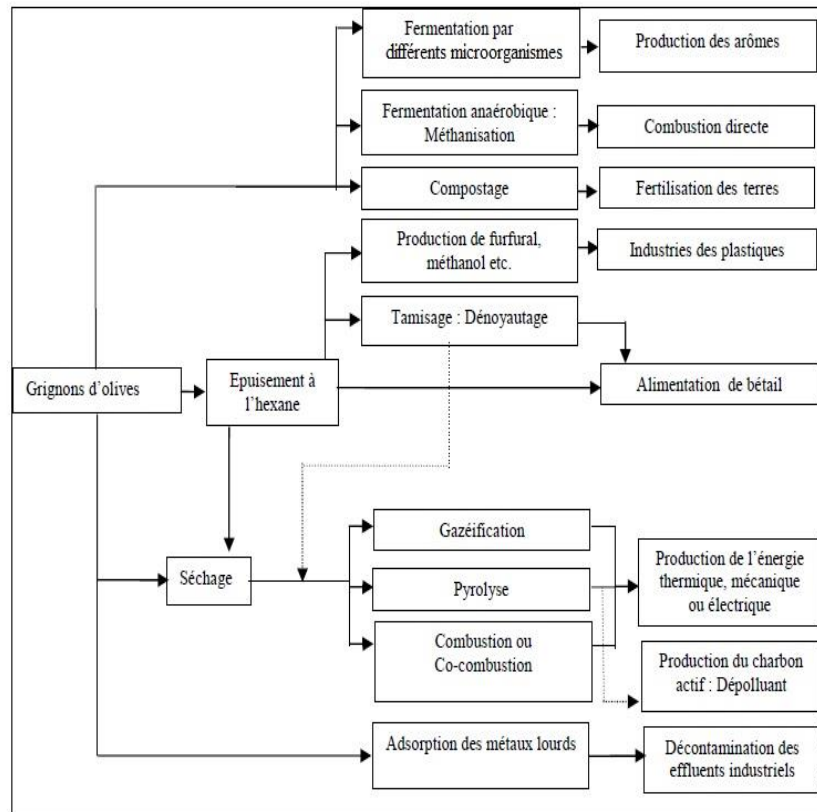


Figure 5 Différentes filières de valorisation des GO selon Chouchene (2010)

2.2. Valorisation de la biomasse lignocellulosique

Le fractionnement de la biomasse lignocellulosique, afin de libérer les sucres fermentescibles, peut se faire par voie chimique ou biochimique, la voie chimique est, comme son nom l'indique, basée sur l'utilisation de produits chimiques pour attaquer les parois végétales. Malgré ses rendements élevés, ce procédé est très coûteux et a une empreinte écologique considérable. La voie biochimique, quant à elle, utilise des cultures microbiennes ou des cocktails d'enzymes cellulolytiques pour dégrader la cellulose avec un faible impact environnemental (Jørgensen et al., 2007).

L'utilisation de microorganismes cellulolytiques dans la dégradation de la matière lignocellulosique est considérée comme un processus de prétraitement biologique intégral qui rassemble en un seul processus la production des enzymes cellulolytiques, l'hydrolyse de la cellulose et la production de biocommodités à haute valeur ajoutée. Ce processus est largement acceptée car il permet de casser le complexe cellulosique en réduisant les impacts environnementaux comparés aux prétraitements acide ou alcalin (Alfenore et Molina-Jouve 2016). Le processus d'hydrolyse est l'une des étapes clés de la dégradation de la cellulose. Elle implique la dépolymérisation de la cellulose à l'aide des cellulases en plusieurs oligosaccharides fermentescibles (sucres réducteurs) qui pourront être métabolisés par des levures, des bactéries ou des champignons lors de la fermentation afin de synthétiser plusieurs métabolites secondaires à haute valeur ajoutée (Alfenore et Molina-Jouve 2016).

L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique par ces microorganismes dépend de l'activité des enzymes sélectionnées. Plusieurs études ont tenté d'améliorer cette efficacité par : (1) une meilleure caractérisation et compréhension de la liaison de l'enzyme à la cellulose ou à l'hémicellulose ; (2) le screening de nouvelles cellulases robustes et à hautes performances ; (3) l'amélioration de la stabilité et de l'efficacité des enzymes vis-à-vis du pH, du sel et de la température (Cobucci-Ponzano et al. 2015; Dumon et al. 2012). De plus, le broyage des résidus permet d'accroître la surface accessible et la porosité des fibrilles de cellulose, il peut aussi augmenter l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. Par ailleurs, l'utilisation d'un matériau lignocellulosique broyé offre l'avantage de diminuer l'indice de cristallinité de la cellulose (Dale et al., 1996; Vlasenko et al., 1997).

La flore cellulolytiques est très variée, elle se retrouve dans des écosystèmes divers et appartient à des groupes taxonomiques très variés pouvant être groupés suivant leur appartenance au groupe eucaryotes ou procaryotes, et leurs conditions de croissance qui permettent de distinguer les microorganismes mésophiles, thermophiles, et halophiles des autres microorganismes (Tchunden 1990). Les microorganismes dégradant la lignocellulose sécrètent des cocktails de composants enzymatiques individuels, qui agissent de manière synergique sur la cellulose. Les systèmes d'enzymes libres les plus étudiés sont ceux des champignons aérobies et mésophiles *Trichoderma reesei* (Schuster et Schmoll 2010). Les souches industrielles de *T. reesei* sont des producteurs d'enzymes hémicellulolytiques hautement efficaces, ce qui est la principale raison pour laquelle les cellulases de ce champignon dominant encore aujourd'hui les marchés de la cellulase et d'hémicellulases.

2.2.1. Bactéries cellulolytiques impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique

Bien que les champignons sont connus pour leur capacité à produire de grandes quantités d'enzymes cellulolytiques et sont principalement exploités pour produire de la cellulase (Sun et Cheng 2002). Cependant, les cellulases de souches bactériennes, telles que *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellomonas*, *Rumminococcus*, *Alteromonas*, *Acetovibrio*, *Bacterioides* et *Marinimicrobium* sp (Plecha et al., 2013; Sharma et Bajaj 2014; Zhao et al., 2012), sont également intéressantes, en raison de la capacité de ces souches à se développer dans des conditions extrêmes de température, de salinité et de pH. En plus de leur croissance rapide et leur faible temps de génération par rapport aux champignons, ainsi que leur capacité à produire une large gamme de métabolites à intérêt. Ces caractéristiques sont souvent requises pour les applications biotechnologiques (Gabani et al. 2012; Silva et al. 2018). Les principales bactéries productrices de cellulase à partir de la matière lignocellulosique sont mentionnées dans le tableau 3.

La dégradation bactérienne de la matière lignocellulosique peut se réaliser par voie aérobie ou anaérobie. En 1985, (Ljungdahl et Eriksson 1985) ont beaucoup écrit sur les bactéries cellulolytiques et ont observé un regain d'intérêt pour la recherche sur les bactéries cellulolytiques anaérobies, principalement en raison de leur utilisation industrielle potentielle et du fait qu'elles constituent une source précieuse de protéines cellulaires. Le système anaérobie des bactéries cellulolytiques dans le rumen est bien étudié, principalement en raison du fait que la cellulose constitue une partie importante de l'alimentation d'un animal (Chukwuma et al. 2021). *Clostridium* appartient à un groupe de bactéries cellulolytiques qui décomposent la lignocellulose dans des conditions anaérobies, ils produisent des complexes multienzymatiques et sont de bons producteurs de l'enzyme cellulase (Chukwuma et al., 2021).

La biodégradation bactérienne aérobie désigne la dégradation de la matière organique par des bactéries en présence d'oxygène, généralement dans un environnement humide et chaud (Mohee et al., 2008). Les bactéries aérobies décomposent la cellulose en libérant des enzymes cellulolytiques libres qui agissent sur la biomasse (Singhvi et Gokhale 2019). Principalement, les bactéries hydrolysent la cellulose et la convertissent en cellobiose, puis la fermentation, qui fait référence à l'hydrolyse du cellobiose, se produit et cela produit du dioxyde de carbone, de l'hydrogène et des acides organiques (Hassan et al., 2019). Après cette étape, les bactéries dominantes utilisent ces produits secondaires pour produire divers produits utiles (Beaton et al., 2019). Le genre *Bacillus* est largement étudié pour ses capacités à hydrolyser la cellulose. Par exemple, la séquence complète du génome de *Bacillus velezensis* ZY-1-1 a montré des gènes

capables de produire de la xylanase et de la cellulase en utilisant des substrats hémicellulosiques et celluloses (Zhang et al., 2018). Une autre analyse du génome de la souche *Bacillus velezensis* a identifié des gènes distincts d'enzymes lignocellulolytiques et prédit le potentiel de dégradation de la lignocellulose (Chen et al., 2018).

Tableau 3 Principales bactéries productrices de cellulase à partir de la biomasse lignocellulosique

Souche bactérienne	Substrat (biomasse)	Enzyme détectée	Référence
<i>Proteobacteria</i>	Pailles de blé et de riz, canne à sucre	Cellulase et xylanase	(Taha et al., 2015)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Pailles de blé et de riz, canne à sucre	Cellulase	(Taha et al., 2015)
<i>Streptomyces</i>	Sciure	Cellulase	(Buraimoh et al., 2015)
<i>Streptomyces sp. MDS</i>	Résidus du riz, paille de bois, poudre d'herbe locale et bagasse de canne à sucre	Endoglucanase, exoglucanase, cellobiases, amylase et xylanase	(Saratale et al., 2017)
<i>Bacillus sp. BS-5</i>	Épi de maïs	Endoglucanase, xylanase	(Xu et al., 2017)
<i>Bacillus velezensis</i> 157	résidus agro-industriels (farine de soja, son de blé, bagasse de canne à sucre, paille de blé, balle de riz, farine de maïs et paille de maïs)	Cellulase, xylanase, α -amylase, et pectinase	(Chen et al., 2018)
<i>B. velezensis</i> A-68	Coques de riz	Endoglucanase	(Kim et al., 2013)
<i>Clostridium</i>	Paille de riz	Endoglucanase	(Zheng et al., 2020)

2.2.1.1. Bactéries halotolérantes cellulolytiques

Selon Rahman et al. (2017), tout microorganisme capable de croître en absence ou en présence de sels est qualifié d'halotolérant. Ces microorganismes ont la capacité de produire des biocatalyseurs fonctionnels dans des conditions extrêmes. Leur survie dans les habitats hypersalins est liée à leur capacité à maintenir l'équilibre osmotique. Ils accumulent des sels tels que le chlorure de sodium ou de potassium (NaCl ou KCl), jusqu'à des concentrations isotoniques avec l'environnement. En conséquence, les protéines des bactéries halotolérantes doivent faire face à des concentrations de sel très élevées (par exemple, des concentrations de KCl de 4 M et des concentrations de NaCl > 5 M) (Danson et Hough 1997; Demirjian et al., 2001). Par conséquent, ces bactéries halotolérantes pourraient représenter une nouvelle source d'enzymes extracellulaires avec un potentiel catalytique plus élevé (Dalmaso et al., 2015), elles sont métaboliquement plus actives que les archées, et leurs activités enzymatiques sont plus diversifiées (lipases, protéases, amylases, cellulases, nucléases...) (Oren, 2002). Les cellulases de ces bactéries peuvent s'adapter à cette pression environnementale en acquérant un nombre relativement important de résidus d'acides aminés chargés négativement sur leurs surfaces pour empêcher la précipitation (Zhang et al., 2015). Ces enzymes sont donc de bons candidats pour

des applications industrielles du fait de leur capacité d'activité en présence de fortes concentrations en sel, de tolérer des températures relativement élevées et des variations de pH, etc. (Amoozegar et al., 2019). L'utilisation de ces molécules est particulièrement importante, car elles sont caractérisées par des propriétés structurales spécifiques, une activité élevée, une spécificité de substrat et surtout une stabilité et une résistance à la dénaturation exceptionnelle conduisant à un maintien de leur fonctionnalité dans des conditions même défavorables. De plus, ces enzymes halotolérantes sont actives dans des milieux organiques et peuvent être utilisées comme biocatalyseurs en présence de solvants organiques (van den Burg 2003). Jusqu'à présent, plusieurs cellulases présentant des caractéristiques thermostables, stables aux solvants organiques, stables aux liquides ioniques et aux alcalis ont été signalées par des microbes marins (Gupta et al., 2015; Li et Yu 2012; Trivedi et al., 2011). Le tableau 4 résume diverses cellulases récemment étudiées à partir de bactéries halotolérantes.

Tableau 4 Cellulases halotolérantes produites par différentes bactéries halotolérantes

Bactérie	Milieu d'isolement	Référence
<i>Gracilibacillus</i> sp. SK1	Lac salin	(Amoozegar et al., 2019)
<i>Aureobasidium pullulans</i> 98	Sel de mer	(Chi et al., 2009)
<i>Bacillus cereus</i> JD0404	Sédiments boueux	(Barzkar et Sohail 2020)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Algues détériorées	(Behera et al., 2017)
<i>Bacillus</i> sp. H1666	Eau de mer	(Barzkar et Sohail 2020)
<i>Bacillus</i> sp. L1	Lac salin	(Li et Yu 2012)

2.2.2. Les cellulases

Les cellulases sont un groupe d'enzymes responsables de la dégradation de la cellulose dans la nature. La dégradation complète de la cellulose en glucose nécessite le clivage de toutes les liaisons glycosidiques β -(1 $\rightarrow$ 4), ce qui fait appel à trois types d'activités complémentaires, qui se répartissent chez les microorganismes dans 7 familles de glycosydes-hydrolases (Couturier et Berrin 2013). Le mode d'action des différentes cellulases est lié à leur structure tridimensionnelle (figure 6). Les cellulases sont fréquemment liées à des modules de liaisons aux carbohydrates qui leur permettent d'approcher le module catalytique de son substrat grâce à des interactions avec les résidus hydrophobes qu'ils portent (Gilbert et al., 2013; Himmel et al., 2010). Grâce à leurs différences de spécificité, les différents types d'enzymes agissent de manière synergique sur la cellulose. Les cellulases sont produites principalement par des microorganismes (bactéries et champignons) (Lynd et al., 2002), mais aussi par des organismes

représentant le règne animal, y compris des insectes, des mollusques, des nématodes et des protozoaires (Watanabe et Tokuda 2001).

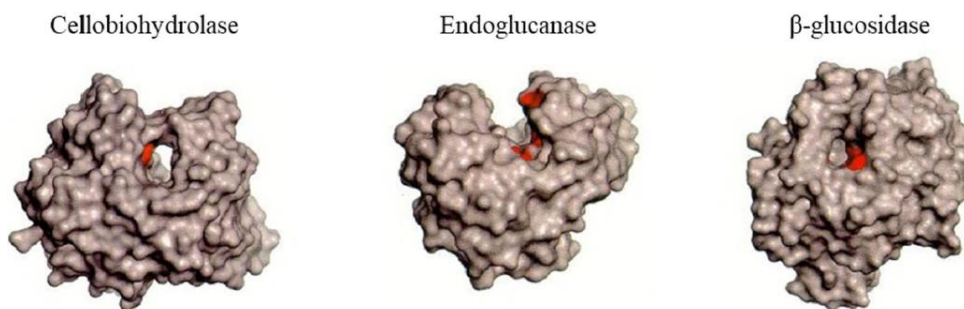


Figure 6 Exemples de structure 3D de cellulases (Wu, 2013)

2.2.2.1. Différents modes d'actions des cellulases

Les micro-organismes capables de dégrader la cellulose produisent un groupe d'enzymes aux spécificités différentes. Les cellulases hydrolysent les liaisons β -1,4-glycosidiques de la cellulose. Généralement, elles sont divisées en trois classes appelées endoglucanases, cellobiohydrolases et β -1,4-glucosidases. Les trois enzymes peuvent dégrader la cellulose amorphe mais, à quelques exceptions près. Les produits de l'hydrolyse de la cellulose sont disponibles en tant que sources de carbone et d'énergie pour les microorganismes cellulolytiques ou d'autres microorganismes dans l'environnement où la cellulose est dégradée (Pérez et al., 2002). En fait, cette libération de sucres à partir de la cellulose est la base principale des interactions microbiennes se produisant dans de tels environnements (Pérez et al., 2002). Pour fonctionner correctement, les endoglucanases, les exoglucanases et les β -glycosidases doivent être stables dans le milieu exocellulaire et peuvent former un complexe ternaire avec le substrat (Pérez et al., 2002). Toutes les enzymes actives sur carbohydrates, y compris les cellulases sont recensées dans la base de données CAZy (www.cazy.org).

2.2.2.1.1. Les endoglucanases

Les endoglucanases (endo-1,4- β -glucanases) peuvent hydrolyser les liaisons internes (principalement dans les régions amorphes de la cellulose) libérant de nouvelles extrémités terminales (Liu et al., 2011). Elles diminuent le degré de polymérisation de la cellulose en attaquant aléatoirement les chaînes de cellulose et permettent de libérer de nouveaux cello-oligosaccharides (cellotriose, le cellotetraose et le cellopentaose) pour l'attaque par les cellobiohydrolases (Pérez et al., 2002). Les attaques par les endoglucanases sont généralement réalisées dans les régions présentant des défauts de cristallinité (Liu et al., 2011). Toutes les endoglucanases sont capables de s'adsorber sur la cellulose, elles possèdent également une bonne activité d'hydrolyse sur les oligosaccharides solubles ayant un degré de polymérisation

supérieur à 3 tels que le cellotetraose et le cellopentaose, cependant, elles ont une très faible activité d'hydrolyse sur le cellobiose (Liu et al., 2011).

2.2.2.1.2. Les *exo-1,4-β-glucanases*

Les *exo-1,4-β-glucanases* (cellobiohydrolases) agissent sur les extrémités non réductrices ou réductrices de chaînes existantes ou générées par des endoglucanases libérant des molécules de cellobiose. Les *exo-1,4-β-glucanases* sont les seules enzymes qui dégradent efficacement la cellulose cristalline (Yan et al., 2016). Il a été démontré que les cellobiohydrolases agissent de façon processive libérant majoritairement du cellobiose. Cependant, des traces de glucose et de cellotriose ont été détectées lors de l'hydrolyse de la cellulose par les *exo-1,4-β-glucanases*. Nidetzky et al., (1994) ont trouvé que l'hydrolyse produit 94% de cellobiose, 5% de glucose et 1% de cellotriose.

2.2.2.1.3. Les *β-1,4-glucosidases*

Les *β-1,4-glucosidases* hydrolysent le cellobiose pour libérer du glucose (Liu et al., 2011). Une hydrolyse efficace de la cellulose nécessite également les *β-glucosidases*, qui décomposent le cellobiose en libérant deux molécules de glucose (Pérez et al., 2002) (Figure 7). 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.

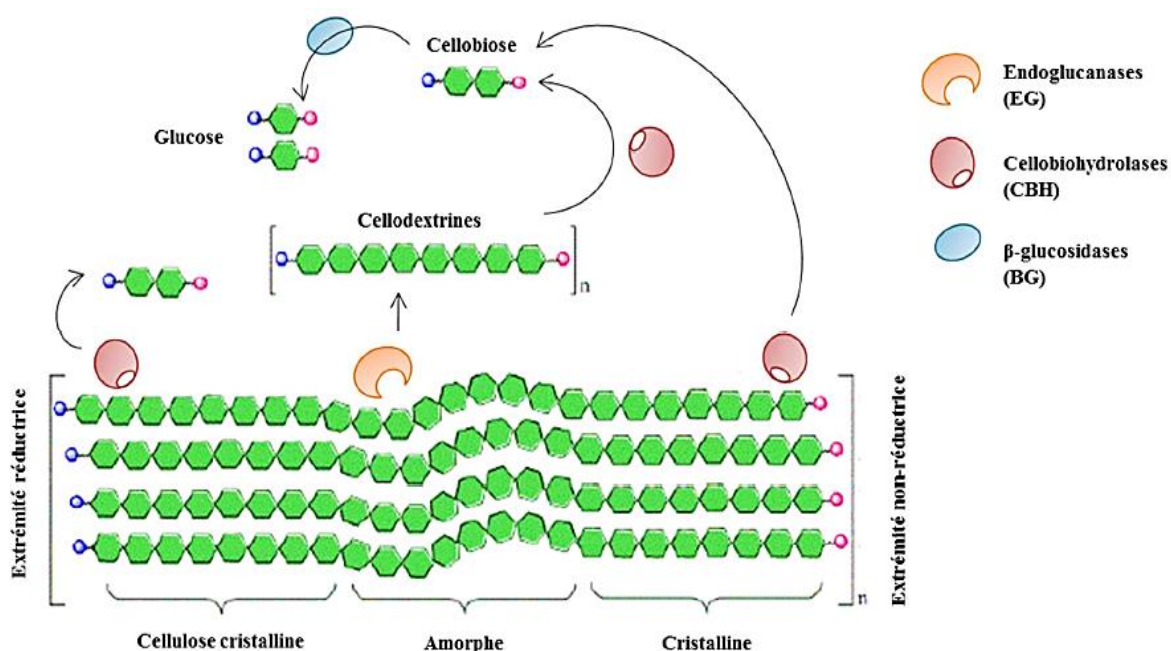


Figure 7 Représentation schématique de l'action des cellulases sur la cellulose (Singh et al., 2021)

2.2.2.2. Application industrielle des cellulases halotolérantes

Les cellulases extrêmophiles sont des extrêmozymes qui ont développé des mécanismes moléculaires d'adaptation à des conditions physico-chimiques extrêmes telles que la salinité, la chaleur, et le pH. Ces enzymes ont des applications pertinentes en tant que biocatalyseurs dans les processus industriels de biotransformation (Hough et Danson 1999). Il a été démontré que les enzymes produites par les psychrophiles présentent une efficacité catalytique élevée dans les industries des détergents et alimentaires et pour la production de produits chimiques fins (Cavicchioli et al., 2011). Karan et al., (2013) ont rapporté la purification et la caractérisation de la β -galactosidase à partir de l'haloarchéon adapté au froid *Halorubrum lacusprofundi*. Cette enzyme a été surexprimée dans *Halobacterium* sp. NRC-1, et s'est avéré actif dans des environnements à forte salinité (avec une activité maximale dans du NaCl 4 M ou du KCl) et sur une large gamme de températures (de -5 à 60 °C). Son activité est conservée en présence de 10 à 20% (v/v) de solvants organiques, dont le méthanol, l'éthanol, le n-butanol et l'alcool isoamylique, ce qui suggère son aptitude à la synthèse d'oligosaccharides sous une faible activité de l'eau et à des températures froides.

Le potentiel industriel des cellulases halophiles réside dans leur capacité à être actives et stables sous une faible activité de l'eau et en présence de plusieurs solvants organiques (Datta et al., 2010; Raddadi et al., 2013). Plusieurs études ont rapportées des extrêmozymes hydrolysant la cellulose, (Delgado-García et al., 2012; Garg et al., 2016; Raddadi et al., 2013). Par exemple, les cellulases extrêmotolérantes produites par *Paenibacillus tarimensis* L88, un isolat obtenu du désert du Sahara dans le sud de la Tunisie, se sont avérées avoir une fonctionnalité élevée sur une large gamme de pH (3.0 à 10.5), à des températures élevées (80 °C) et fortes concentrations de sel (jusqu'à 5 M NaCl) (Raddadi et al., 2013). L'activité de la carboxyméthyl-cellulase a été détectée en présence de 40% (v/v) de chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium ou de 20% (p/v) de liquides ioniques d'acétate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium et s'est maintenue après exposition à des solvants organiques, des détergents, des métaux lourds et même sous forte alcalinité. *Paenibacillus tarimensis* est un candidat optimal pour la production de cellulases avec des applications prometteuses dans les industries des détergents, du textile et des pâtes et papiers. Il a également un potentiel pour la saccharification de la lignocellulose dans les processus de bioraffinerie (Raddadi et al., 2013).

2.3. Les biosurfactants

2.3.1. Définition

Les biosurfactants, encore appelés biotensioactifs ou agents de surface (émulsifiant), font partie de notre quotidien. L'ambivalence de leur structure et la diversité de leurs propriétés sont mises à profit dans de nombreux produits de la vie courante, notamment dans les détergents ménagers et industriels et dans les formulations cosmétiques. Ce sont un groupe hétérogène de molécules naturelles tensioactives synthétisées par certains microorganismes et constituées de deux parties d'affinité opposée (Figure 8) : une partie hydrophobe, lipophile ou queue apolaire constituée d'une longue chaîne d'acide gras ou d'hydroxy acide gras de différentes longueurs, et une partie hydrophile ou tête polaire constituée d'un oligosaccharide, d'un acide carboxylique, de phosphate, d'un acide aminé ou d'un alcool (Healy et al., 1996; Henkel et al., 2017; Rajkhowa et Sarma 2022). Cette double polarité confère à ces substances dites amphiphiles la capacité de s'adsorber aux surfaces ou aux interfaces et ainsi d'abaisser la tension superficielle entre deux milieux non miscibles (Henkel et al., 2017; Rajkhowa et Sarma 2022).

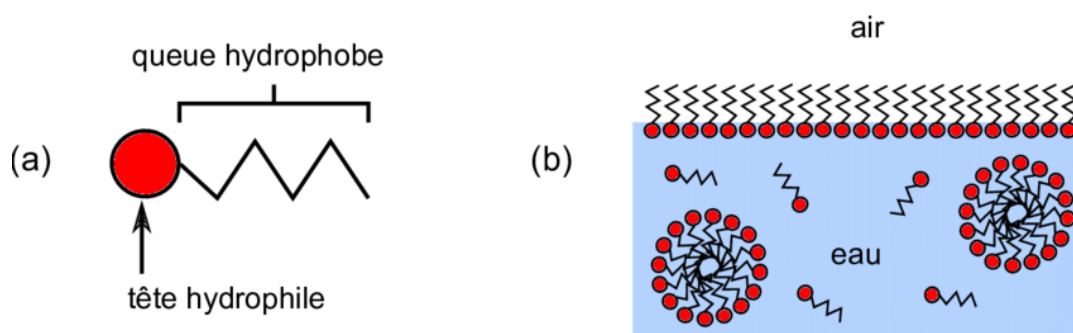


Figure 8 Structures générales des tensioactifs (Champougny 2015)

Leurs propriétés ont été largement étudiées (Kashif et al., 2022). Les préoccupations croissantes en matière d'environnement, l'avancement des biotechnologies et l'émergence de lois plus strictes ont amené le biosurfactant à être une alternative potentielle aux surfactants chimiques disponibles sur le marché (Henkel et al., 2012). L'intérêt pour les biosurfactants a débuté à la fin des années 60 quand on a voulu utiliser des hydrocarbures comme substrat économique pour produire des protéines d'origine unicellulaire (Kitamoto et al., 2002). Il a été remarqué que la productivité maximale était obtenue quand la surface interfaciale entre l'eau et l'huile était maximale, i.e. par émulsion. Il a été ainsi découvert que la plupart des microorganismes utilisant les alcanes produisaient des substances émulsifiantes (Hommel 1991). Les biosurfactants peuvent présenter certains avantages par rapport aux surfactants d'origine pétrochimique, comme une agressivité réduite vis à vis de l'épiderme, une meilleure biodégradabilité et

biocompatibilité (avec les boues et les plantes), une plurifonctionnalité et une bonne image marketing (Ludot 2013).

Bien que les biosurfactants ont une utilisation prometteuse dans les domaines de bioremédiation, leur production à l'échelle industrielle est actuellement difficile en raison des coûts élevés des matières brutes, des coûts de traitement élevés et de la faible production manufacturière (Henkel et al., 2012). En conséquence, les défis de recherche actuels consistent à augmenter le rendement et à réduire le coût des matières premières en les substituant avec la biomasse lignocellulosique (Mukherjee et al., 2006).

2.3.2. Bactéries productrices de biosurfactants

Différents genres de bactéries ont été employés par de nombreux chercheurs dans la production de biosurfactants en utilisant plusieurs milieux de culture. La plupart de ces bactéries sont isolées de sites contaminés contenant généralement des sous-produits d'hydrocarbures pétroliers et/ou des déchets industriels. Le tableau 5 montre une liste de différentes classes de biosurfactants produits par plusieurs souches bactériennes.

Les bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont les plus rapportés dans la littérature comme grands producteurs de biosurfactants (Silva et al., 2014). Diverses souches de *B. subtilis* et de *B. velezensis* sécrètent une gamme de lipopeptides à activité tensioactive et émulsifiante. Les iturines, les surfactines et les fengycines représentent les trois principales familles de lipopeptides produits par ces espèces (Bonmatin et al., 2003; Liu et al., 2020). La structure cyclique de la partie peptidique protège les lipopeptides du clivage enzymatique et maintient leur stabilité générale, de sorte qu'elles sont généralement résistantes aux peptidases et aux protéases (Nagórska et al., 2007). La synthèse des lipopeptides est effectuée par un cocktail de protéines appelé peptides synthétases non ribosomiques, ces systèmes de biosynthèse permettent d'avoir une diversification dans les produits lipopeptidiques générés par *Bacillus* notamment la classe, la séquence des résidus d'acides aminés, la nature de la cyclisation du peptide et la longueur et la ramification de la chaîne des acides gras. Ces variations permettent de diviser les lipopeptides en trois groupes : la surfactine (Peypoux et al., 1999; Mulligan, 2005), l'iturine (Tsuge et al., 2001) et la fengycine (Ongena et al., 2005).

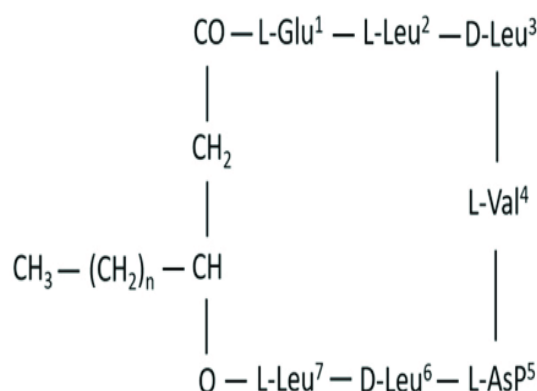
Tableau 5 Principales classes de biosurfactants produits par différentes bactéries (Healy et al., 1996; Kashif et al., 2022).

Classe de biosurfactant	Souche bactérienne
Glycolipides	
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i>
Lipopeptides	
Surfactine/iturine/fengycine/mycosubtiline/ bacillomycine	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus velezensis</i>
Ochratoxine	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Lichenysine	<i>Bacillus lichenformis</i>
Phospholipides	<i>Acinetobacter</i> sp.

2.3.3. Les lipopeptides de *Bacillus*

2.3.3.1. Les surfactines

La surfactine, comme son nom l'indique, est considérée comme le plus puissant tensioactif (biosurfactant) connu avec une grande capacité de réduire la tension de surface de l'eau (Grangemard et al., 2001). Ce sont des heptapeptides cycliques reliés par une liaison ester à une chaîne d'acide gras β -hydroxylée dont la longueur varie de 13 à 16 carbones. La chaîne peptidique est composée de la séquence d'acides aminés suivante : Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu (Figure 9). Les acides aminés L-Glu et L-Asp renforce le caractère amphiphile responsable de ses propriétés tensioactives. Cette molécule est généralement produite en fin de la phase exponentielle de la croissance. Des études menées par (Razafindralambo et al., 1998) sur la capacité des lipopeptides à former des mousses, ont montré que la surfactine est capable de former une mousse plus dense que celle formée par l'iturine A. Les surfactines ont des propriétés comparables au SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), mais elles ont l'avantage sur ce composé synthétique, d'être non toxiques et biodégradables (Li et al., 2005).

**Figure 9** Structure primaire de la surfactine

2.3.3.2. Les fengycines

Les fengycines sont des lipopeptides composés d'un décapeptide. Les fengycines ont été isolés de *Bacillus velezensis* par (Liang 2022) comme des agents antifongiques. Le cycle octapeptidique de la fengycine est formé à partir d'un décapeptide par liaison ester interne entre la fonction hydroxyle de l'acide α -aminé C-terminal, la D-Tyr, et la fonction carboxyle de la L-Ile (Deleu et al., 1999). La chaîne peptidique est composée de la séquence d'acides aminés suivante : Glu-D-Orn-D-Tyr-D-Ala-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-Tyr-Ile (Figure 10). Les fengycines ont une activité antifongique contre les champignons filamenteux. Ces molécules agissent en synergie avec les surfactines dans plusieurs activités y compris dans la lutte contre les phytopathogènes (Ongena et al., 2007; Ongena et Jacques 2008).

En plus de leur potentiel tensioactif, ces molécules possèdent d'autres propriétés biologiques dont antibactériennes, antitumorales, antivirales et elles induisent le mécanisme de résistance des plantes contre les phytopathogènes (Deleu et Paquot 2004).

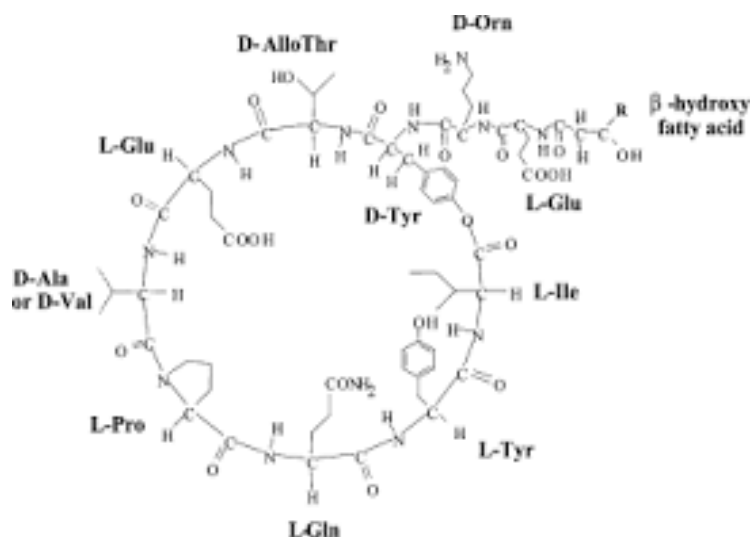


Figure 10 Structure primaire de la fengycine (Deleu et al. 1999)

2.3.3.3. Domaines d'application des surfactines et des fengycines

Grace à leurs effets aux interfaces et à la diversité des structures qu'ils prennent, les tensioactifs présentent différentes propriétés techno-fonctionnelles leur permettant d'être utilisés pour des applications dans de nombreux domaines. 40% des tensioactifs sont destinés à des applications industrielles allant du nettoyage et de détergence à la formulation des produits agro-chimiques (Bhardwaj et al., 2016). Les biosurfactants comme les surfactines présentent plusieurs avantages par rapport aux surfactants chimiques. Ces molécules sont étudiées pour des applications de bioremédiation des sols et la dispersion des déversements de pétrole (Mulligan 2005). Leurs propriétés tensioactives permettent de favoriser le décrochage des polluants

industriels fixés sur des matrices solides (Pekin et al., 2005). De plus, les surfactines et les fengycines possèdent respectivement des propriétés antibactériennes et antifongiques leur permettant d'être utilisés dans la composition des produits cosmétiques pour en améliorer la conservation (Deleu et al., 1999; Deleu et Paquot 2004). Presque tous les tensioactifs utilisés de nos jours sont des dérivés chimiques du pétrole. Cependant, un grand intérêt est porté sur les tensioactifs d'origine microbienne notamment la surfactine et la fengycine, connues pour leur biodégradabilité et leur non toxicité (Healy et al., 1996). Ces molécules en font des molécules de choix pour les industries agroalimentaires, pétrochimiques, cosmétiques, et des applications environnementales et agronomiques.

Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Préparation des grignons d'olives

3.1.1. Prélèvement, séchage et broyage

Dans cette étude, les grignons d'olives (GO), non prétraités chimiquement, ont été utilisés comme substrat de croissance pour la co-production d'endo-1,4- β -glucanase (CelH1) et de biosurfactants par le microorganisme sélectionné (isolat H1). Les échantillons utilisés ont été prélevés en 2019 à partir d'une huilerie artisanale située dans la région de Sidi Abdelaziz, Wilaya de Jijel (Algérie). Le pressage et l'extraction de l'huile sont réalisés à l'aide d'un système traditionnel discontinu qui consiste à presser la pâte à l'aide de presses hydrauliques. Ce procédé nécessite l'ajout d'eau chaude.

Les grignons ont été séchés dans une étuve pendant 4 jours à 40 °C. Les échantillons ont été conservés dans des sacs, ensuite, ils ont été finement broyés à l'aide d'un micro-broyeur (IKA, MF 10, Argentine) et tamisés en utilisant un tamis dont les pores sont de 0.25 mm de diamètre, afin d'avoir une poudre homogène (figure 11).

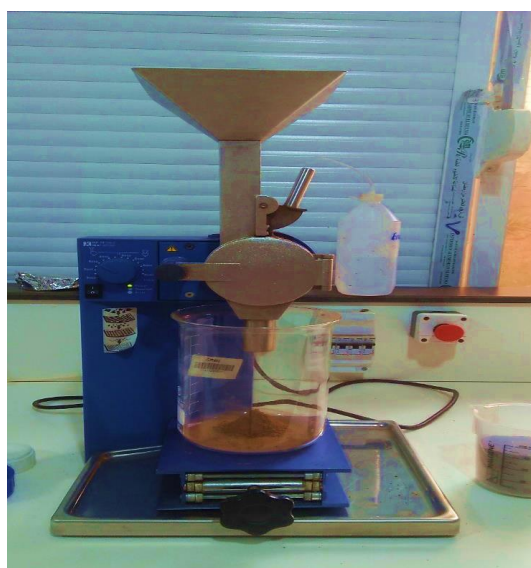


Figure 11 Broyage des grignons d'olives dans un micro-broyeur (IKA, MF 10, Argentine)

3.1.2. Dosage partiel des constituants de grignons d'olives

Etant donné que les différences dans la composition des GO, dépendent des variétés des olives et de la technologie utilisée pour l'extraction, dans la présente, c'est la variété utilisée qui a été effectivement étudiée sur le plan dosage des différents constituants.

3.1.2.1 . Dosage des lipides

Cette étape permet à la fois de déterminer le taux des lipides présents dans l'échantillon et d'éliminer les graisses (huile résiduelle entre autres) afin de préparer l'échantillon aux analyses ultérieures. La teneur en matières grasses a été déterminée par la méthode normalisée de Soxhlet (AOAC, 1990) avec de l'hexane comme solvant d'extraction. Pour ce faire, 3 g de GO ont été introduits dans une cartouche en cellulose. Cette cartouche a été placée dans le soxhlet comme le montre la figure 12. Au-dessous du soxhlet est placé le ballon contenant l'hexane, pesé à vide au préalable, le ballon a été chauffé à 100°C par un chauffe-ballon. L'hexane évaporé est condensé dans le réfrigérant placé au-dessus du soxhlet, est récupéré dans le soxhlet, solubilisant ainsi les lipides se trouvant dans la cartouche de cellulose. Une fois l'extraction est terminée, le ballon a été récupéré et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, et le ballon contenant les lipides a été pesé de nouveau. La masse des lipides a été calculée par la différence de la masse du ballon vide et celle du ballon contenant les lipides post-extraction. La concentration de lipides dans l'échantillon a été exprimée en % massique de matière sèche.

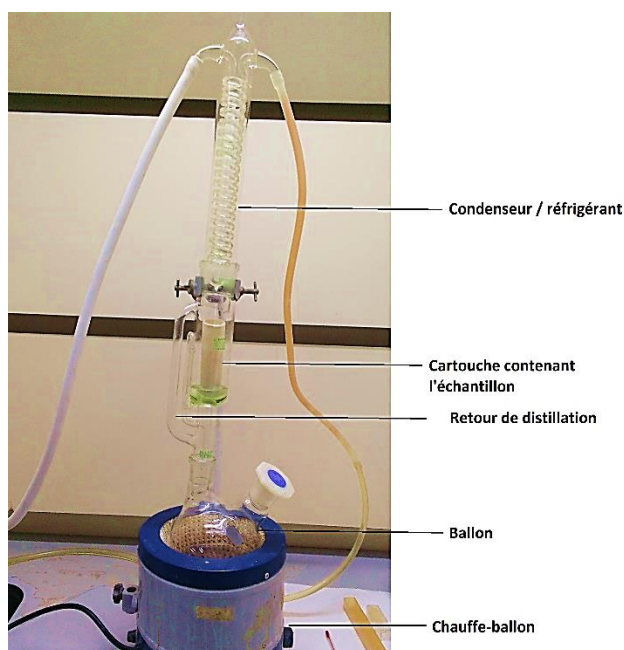


Figure 12 Extraction des lipides par Soxhlet

3.1.2.2. Détermination de la teneur en constituants pariétaux

La teneur en fibres a été déterminée, sous hotte chimique aspirante, en trois étapes d'extractions successives par des solvants appropriés (Van Soest 1994). La méthode se base sur des traitements chimiques de l'échantillon afin de solubiliser les composants non fibreux et à la fin, l'obtention d'un résidu qui détermine la teneur en fibre.

Après une extraction préliminaire avec de l'hexane, éliminant les huiles résiduelles des GO, une quantité de 100 mL de solution de détergent neutre (annexe 4) a été ajoutée à 1 g d'échantillon de GO avec 0.5 g de sulfite de sodium anhydre (Na_2SO_3). Après un chauffage à reflux jusqu'à ébullition pendant 60 minutes, la filtration est réalisée dans des verres frittés N°3, suivi par trois lavages successives avec de l'eau bouillante et deux fois avec de l'acétone froid. Ensuite, le solide résiduel a été séché pendant 8 heures à 105°C et pesé dans une balance de précision. Il constitue la fraction NDF (de l'anglais Neutral Detergent Fiber). Cette fraction est principalement composée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine.

La fraction NDF est, ensuite, traitée de la même manière par une solution de détergent acide dilué (annexe 5). Cette étape permet l'hydrolyse des hémicelluloses qui sont donc séparées de la fraction solide appelée ADF (Acid Detergent Fiber) qui contient seulement la cellulose et la lignine. La fraction ADF est ensuite traitée par une solution d'acide sulfurique concentré pour hydrolyser la cellulose. 50 mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 96% est ajoutée à la fraction ADF, le tout a été homogénéisé avec une baguette en verre. Après 3 heures de traitement un rinçage abondant à l'eau distillée chaude a été effectué, puis, le solide résiduel a été séché pendant 8 heures à 105°C et pesé par une balance de précision. Le solide restant constitue la fraction ADL (Acid Detergent Lignin) et est considéré comme contenant principalement de la lignine.

Les différentes fractions solides (NDF, ADF et ADL) permettent de déterminer les teneurs en composés facilement solubles, en hémicelluloses, cellulose et lignine, exprimées en % massique de matière sèche comme suit (Ducom et al., 2019):

- Solubles = (masse sèche initiale - masse sèche de la fraction NDF) / masse sèche initiale
- Hémicelluloses = (NDF - ADF) / masse sèche initiale
- Cellulose = (ADF - ADL) / masse sèche initiale
- Lignine = ADL / masse sèche initiale.

3.1.2.3. Détermination de la teneur en azote total et en protéines

Un échantillon de GO a été envoyé au laboratoire de développement de procédés et caractérisation de produits alimentaires et brassicoles à l'institut de recherche LABIRIS (Belgique), afin d'analyser la teneur en azote total et en protéines.

Le dosage est effectué en trois étapes avec la méthode Kjeldahl (Dotsenko et Lange, 2017).

Une minéralisation de la matière organique a été effectuée dans un minéralisateur rapide BÜCHI K-437 afin de transformer les radicaux azotés en ions ammonium (NH_4^+) par macération dans l'acide sulfurique concentré (96%) à haute température (450 °C) et en présence d'un catalyseur (pastilles de Kjeldahl). Ensuite, une distillation et un piégeage ont été effectuées dans un distillateur BÜCHI K-355 en milieu basique pour libérer les ions NH_4^+ sous forme ammoniac (NH_3). Cet ammoniac est entraîné dans une solution d'acide borique dans laquelle il reprend sa forme NH_4^+ et neutralise une partie de l'acide. Après, l'acide borique neutralisé est titré par HCl 0.01 M, en présence d'une solution d'indicateur mixte (400 mg d'indicateur rouge de méthyle, 200 mg d'indicateur bleu de méthyle dans 300 mL d'éthanol à 95 %). La teneur totale en azote selon Kjeldahl a été convertie en teneur totale en protéines brutes en multipliant par le coefficient empirique de 6.25.

3.2. Isolement de bactéries cellulolytiques

3.2.1. Sites d'étude et d'échantillonnage

Les échantillons explorés dans cette étude, ont été prélevés aseptiquement, à partir des sols et des eaux du lac salé d'El M'Ghair (latitude : 34° 15' 00" N, 6° 19' 00" E) (Figure13). Le site est caractérisé par un climat saharien et considéré comme un écosystème extrême avec une salinité très élevée qui varie entre 53 et 375 g/L selon la saison (Zatout et al., 2020), et des températures élevées qui dépassent les 50 °C en période estivale (Hacini, 2006).

Deux différents sites de prélèvements ont été ciblés pour cette étude (Figure 13) à savoir :

- L'eau du lac principal et le sol salin situé à sa proximité.
- Le sol salin des palmeraies distantes de 20 mètres du lac principal à une profondeur d'environ 15 centimètres.

Les échantillons ont été déposés dans des flacons en verre stériles et transportés au laboratoire dans une glacière pour être analysés dans les 24 heures suivantes (stockés à 4°C).



Figure 13 Vue générale des deux sites d'échantillonnage. **A** : Lac salé d'El M'Ghair ; **B** : palmeraies distantes de 20 mètres du lac. **C**: Carte du grand lac salé d'EL M'Ghair (source : Google Maps)

3.2.2. Isolement et purification des isolats bactériens

Un gramme de chaque échantillon du sol et 1 ml d'eau, est suspendu dans 9 mL d'eau physiologique stérile et homogénéisé pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur vortex. Cette dilution représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions décimales ont été préparées jusqu'à 10^{-7} . Chaque dilution fera guise d'un échantillon et sera étalée à la surface du milieu gélosé 863 (annexe 1) additionné de 0.05 mg/mL d'un antifongique (Fungizone) afin de limiter la croissance des moisissures. Les boîtes ont, ensuite, été incubées à 37 °C pendant 48 h jusqu'à apparition des colonies. Les isolats bactériens ont été purifiés par repiquage sur le même milieu (863) dans les mêmes conditions citées précédemment.

3.2.3. Conservation des isolats bactériens

Une colonie fraîche est prélevée, aseptiquement, à partir des boîtes contenant les isolats bactériens purifiés, et déposée sur un microtube Eppendorf contenant 1 mL d'une solution

stérile de glycérol (20%). Plusieurs copies ont été réalisées pour chaque isolat. Les isolats sont, conservés, ensuite, à -20 °C jusqu'à utilisation.

3.2.4. Criblage des isolats bactériens cellulolytiques

Les isolats bactériens purifiés sont criblés pour leur potentiel cellulolytique suivant la méthode de (Teather et Wood 1982). La production des cellulases est examinée sur milieu gélosé de base (annexe 2) contenant 10 g/L de Carboxyméthyl-cellulose (CMC) comme seule source de carbone. Les boîtes ont été inoculées par piqûre centrale par l'isolat. Après incubation durant 5 jours à 30 °C, permettant le développement de la colonie, les surfaces des boîtes ont été recouvertes par 15 mL d'une solution aqueuse au rouge Congo à 1 g/L. Après incubation à température ambiante pendant 30 minutes, la solution a été éliminée délicatement et remplacée par 20 mL d'une solution de NaCl 1 M. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'apparition de zones claires (halo) sur la gélose autour des colonies, indique la présence de cellulases. L'indice cellulolytique (IC), défini comme le rapport du diamètre de la zone claire sur le diamètre de la colonie, a été calculé afin de sélectionner les isolats les plus performants (Ibrahim et al., 2018). Le test est réalisé en triple exemplaire pour chaque isolat.

3.3. Identification de l'isolat cellulolytique performant

L'isolat sélectionné (H1) a été observé microscopiquement après la coloration de Gram pour développer une idée sur sa morphologie. L'identification effective dudit isolat a été réalisée par voie moléculaire.

3.3.1. Identification moléculaire

L'identification moléculaire de l'isolat H1 a été réalisée par séquençage des gènes *ARNr 16S* presque complet (1461 nucléotides) et de la séquence partielle du gène de la *gyrase A* (977 nucléotides). L'amplification a été réalisée dans un mélange réactionnel de 20 µL contenant 10 µL de 2X PCR Master Mix (Thermo Scientific, Belgique), et 2 µL des amorces universelles suivantes : Forward 10-27F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) et reverse endoRV (AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA) pour l'amplification de l'*ARNr 16S*, ou *gyr-A-f* (CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT) et *gyr-A-r* (CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT) pour l'amplification de la *gyrA*. Le volume final a été complété jusqu'à 20 µL avec de l'eau sans nucléase. Ensuite, quelques cellules ont été transférées avec une pointe stérile d'une colonie isolée fraîche au tube PCR (Kai et al., 2019).

Un programme PCR de 30 cycles (Thermocycler T100, Bio Rad) a été utilisé pour l'amplification de l'*ARNr 16S* comme suit : 1 minute de dénaturation à 95 °C, 1 minute d'hybridation à 55 °C et 2 minutes d'élongation à 72 °C, précédés d'une étape initiale à 95 °C

pendant 5 minutes, suivi d'une étape d'extension finale à 72 ° C pendant 5 minutes. Le programme PCR pour l'amplification de *gyrA* était : 35 cycles à 95 °C pendant 1 minute, 55 °C pendant 1 minute et 2 minutes à 72 °C, précédés de 5 minutes à 95 °C, et une étape finale de 5 minutes à 72 °C. Après vérification par électrophorèse sur gels d'agarose 1%, les réactions PCR ont été traitées avec de la phosphatase alcaline et de l'exonucléase avant d'être envoyées pour séquençage (Institut flamand de biotechnologie, Université d'Anvers). L'analyse phylogénétique est réalisée avec des séquences continues de 1461 nucléotides pour l'ARNr 16S et de 977 nucléotides pour *gyrA*. Le genre bactérien est déduit à partir de séquences apparentées obtenues par une analyse BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) par rapport à la base de données GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Le logiciel MEGA7 a été utilisé pour les analyses phylogénétiques. L'algorithme MUSCLE a été utilisé pour l'alignement des séquences de l'isolat H1 avec des séquences des souches types du genre (pour l'ARNr 16S) et des séquences de souches apparentées (pour la *gyrA*). La qualité de l'alignement a été vérifiée manuellement et les arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide de l'algorithme de Maximum-Likelihood.

3.4. Etude des caractéristiques extrêmotolérants de l'isolat H1

3.4.1. Effet de la température sur la croissance bactérienne

Afin de déterminer les températures optimales de croissance, l'isolat H1 a été cultivé dans des fioles de 250 mL contenant 100 mL de milieu liquide 863 dont le pH initial a été ajusté à 7.0. Les fioles ont été incubées pendant 5 jours à différentes températures (28, 30, 37, 45 et 55 °C) sous agitation de 150 rpm. Des échantillons ont été prélevés quotidiennement et aseptiquement à des intervalles de 2 heures durant la période d'incubation. Des dilutions de la suspension bactérienne ont été réalisées dans de l'eau peptonée stérile (annexe 3) et leur concentration a été estimée par la cellule de Bürker. 100 µL des trois dilutions appropriées ont été inoculés dans des boîtes, contenant du milieu 863 gélosé et incubées à 37 °C pendant 24 h. Les boîtes sur lesquelles sont comptées 20 à 150 colonies sont prises en considération pour le calcul de la concentration de cellules par millilitre de milieu. Des courbes de croissances ont été tracées afin d'extrapoler graphiquement la relation logarithmique $\ln([x]) = f(t)$, ce qui permet, d'obtenir le taux de croissance maximal (μ_{max}) (Menert et al., 2004) et ensuite le temps de génération (G) de l'isolat H1 en exploitant l'équation 1 (Franzmann et al., 2005). Cette expérience a été réalisée en trois répétitions.

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (1)$$

3.4.2. Effet de NaCl sur la croissance bactérienne

L'analyse de la tolérance à la salinité de l'isolat H1 a été réalisée en cultivant l'isolat dans des fioles de 250 mL contenant 100 mL de milieu liquide de 863 additionné de 5 concentrations croissantes de chlorure de sodium : 0, 2.5, 5, 10, et 15%. Le pH initial a été ajusté à 7.0 et les fioles ont été incubées pendant 5 jours à 37 °C sous agitation de 150 rpm. Des échantillons ont été prélevés et aseptiquement à des intervalles égale de 2 heures durant la période d'incubation. La détermination des μ_{max} et des G a été réalisé comme décrit dans la section précédente.

3.5. Sélection du milieu de la production de l'endo-1,4- β -glucanase par fermentation submergée

3.5.1. Effet de la source d'azote

La richesse des GO en cellulose permet leur utilisation comme substrat de fermentation pour la production de la CelH1 par l'isolat cellulolytique H1. Cependant, leur utilisation comme milieu de culture nécessite un enrichissement en facteurs de croissance qui peuvent avoir un effet significatif aussi bien sur la production de l'enzyme étudiée que sur la croissance de la souche utilisée, et par conséquent, sur la production de lipopeptides. Parmi ces facteurs l'azote est l'un des constituants majeurs des acides aminés composants de base des protéines et des acides nucléiques composant les ADN et ARN. La production enzymatique a été effectuée en fermentation submergée (Smf) sur GO avec l'ajout de différentes sources d'azote.

Pour ce faire, des fioles de 250 mL remplies de 100 mL de milieu de fermentation ont été utilisées. Le milieu se constitue de 5% (p/v) de GO et de 0,5% de l'une des sources d'azote organique suivantes : peptone, extrait de levure ou extrait mixte de peptone-levure (0,25 - 0,25%). Le nitrate de potassium (KNO_3) et le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ ont été également testés comme sources d'azote inorganiques avec une concentration finale de 10 mM. Le pH initial du milieu a été ajusté à 7.0 avant stérilisation. Les cultures ont été inoculées avec une concentration bactérienne de 17×10^6 UFC/mL et incubées à 37 °C sous agitation de 150 rpm. L'activité endo-1,4- β -glucanase a été mesurée après 24 h d'incubation.

3.5.2. Effet de la durée d'incubation

La période d'incubation optimale pour la production maximale de la CelH1 a été déterminée dans les mêmes conditions évoquées dans la section précédente avec l'ajout de 0.5% de la source d'azote appropriée. La production de la CelH1 a été mesurée à 24, 48, 72 et 100 heures d'incubation. Les échantillons prélevés ont été centrifugés à $14500 \times g$ pendant 20 minutes à 4

°C. Ensuite, les surnageants sont filtrés à travers une membrane de 0.22 µm et conservés à -20°C pour le dosage de l'activité enzymatique.

3.6. Production simultanée d'endo-1,4-β-glucanase et de biosurfactants sur milieu sélectionné

3.6.1. Préparation de l'inoculum et conditions de culture

Pour la préparation de l'inoculum, des colonies jeunes de l'isolat H1 ont été transférées dans une fiole de 100 mL contenant 20 mL du milieu 863 et incubé pendant 18 heures à 37 °C sous agitation de 150 rpm. La production de la CelH1 et de lipopeptides est réalisée par une Smf dans un ballon fond plat de 3 L contenant 1 L de milieu de fermentation sélectionné composé de 5% de GO et de 0.5% d'extrait de levure. Le pH est ajusté à 7.0. Après stérilisation et refroidissement, le milieu est inoculé, dans des conditions aseptiques, avec une suspension bactérienne de 3×10^6 UFC/mL. Ensuite, le ballon est incubé à 37 °C sous agitation de 150 rpm, pendant 72 heures. Afin de tracer la courbe de croissance complète (jusqu'à la phase de déclin), une culture est réalisée en parallèle avec une période d'incubation prolongée jusqu'à 115 h. Des échantillons ont été prélevés aseptiquement durant la période d'incubation, afin d'étudier la production de la biomasse bactérienne, de la CelH1 et de biosurfactants.

3.6.2. Méthodes analytiques

3.6.2.1. Dosage de l'activité enzymatique avec le substrat chromogénique

❖ principe

L'activité endo-1,4-β-glucanase est dosée en présence d'azo β-glucane d'orge. Ce substrat coloré soluble trouve une application répandue dans la standardisation des préparations enzymatiques industrielles et dans la recherche de traces d'enzymes dans les bouillons de fermentation, ainsi que dans les cocktails des glycosidases qui peuvent se produire en mélange avec les sucres réducteurs, ce qui rend la mesure spécifique de l'enzyme assez difficile. Dans de tels cas, des substrats spécifiques et sensibles tels que les substrats marqués par des colorants solubles peuvent être utilisés (McCleary et McGeough, 2015). Lors de l'incubation du substrat coloré avec de la cellulase, il est dépolymérisé pour libérer des fragments colorés de faible poids moléculaire qui restent en solution lors de l'addition d'une solution de précipitation au mélange réactionnel. Les polymères de poids moléculaire élevés (non hydrolysés) sont éliminés par centrifugation et la couleur du surnageant est mesurée à 590 nm, la figure 14 représente un schéma qui décrit le principe de la méthode.

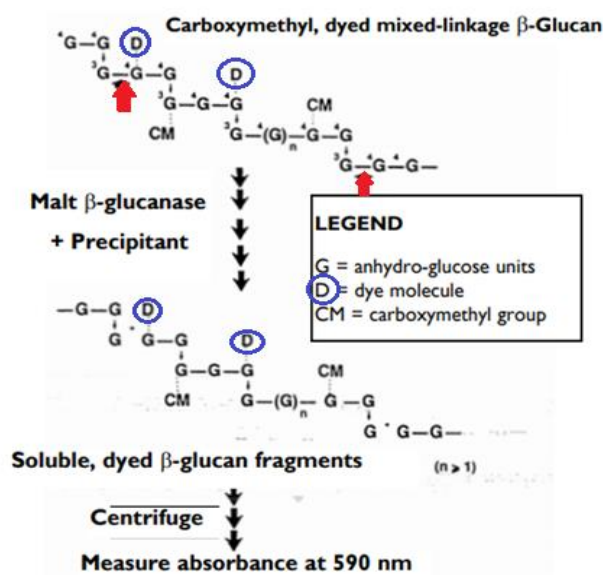


Figure 14 Principe de dosage par l'azo β -glucane d'orge

3.6.2.2. Dosage de l'activité endo-1,4- β -glucanase

100 μ L de mélange réactionnel contenant 5 μ L du surnageant de culture, ou de la CelH1 pure, 45 μ L de tampon acétate de sodium préparé à 100 mM, pH 6.0 et 50 μ L d'azo β -glucane d'orge à 1% (p/v) ont été incubé à 60 °C pendant 10 minutes dans un bloc chauffant (Eppendorf, France), ensuite, la réaction est arrêtée en ajoutant 250 μ L d'une solution de précipitation (annexe 6) sous agitation vigoureuse pendant 10 seconds. Le précipité formé dans les microtubes Eppendorf a été éliminé par centrifugation pendant 5 min à 1000 $\times g$. La Densité optique (DO) du surnageant, contenant les oligosaccharides liés au colorant libérés, a été mesurée à 595 nm (DeNovix DS-11). L'activité enzymatique a été calculée au moyen d'une courbe standard corrélant la libération d'oligosaccharides liés au colorant (DO à 595 nm) avec la libération de sucres réducteurs en utilisant la méthode de L'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Miller, 1959) avec le glucose comme standard. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme libérant 1 μ mol de sucres réducteurs par minute.

3.6.2.3. Détermination de la production de biosurfactants

La synthèse de lipopeptides par l'isolat H1 durant la fermentation des GO est estimée selon la méthode de Joo et Kim (2013). Cette méthode repose sur l'évaluation directe des taux de turbidité qui représente l'activité émulsifiante (AE) des biosurfactants (lipopeptides) présents dans un échantillon. 500 μ L de surnageant de chaque échantillon prélevé pendant la fermentation ont été placés dans des tubes à essai avec 7.5 mL de tampon Tris-HCl (20 mM, pH 7.0) contenant 10 mM de $MgSO_4$. Ensuite, 100 μ L d'huile d'olive sont ajoutés comme

substrat hydrophobe. Le mélange a été vortexé vigoureusement pendant 2 minutes. L'absorbance de l'émulsion résultante est mesurée à 540 nm après une heure d'incubation à température ambiante pour la stabilité de l'émulsion. Le témoin est réalisé en remplaçant le surnageant de culture par le milieu de culture stérile. Une unité d'AE est définie comme étant la quantité d'agent émulsifiant qui résulte à une absorbance à 540 nm de 1.0. Le test est réalisé en triple exemplaires pour chaque échantillon.

3.6.2.4. Estimation de la biomasse par dosage des protéines totales intracellulaire

La méthode consiste à utiliser un réactif d'extraction complète de protéines bactériennes B-PER (de l'anglais Bacterial Protein Extraction Reagent) (Thermo Scientific), afin d'estimer la concentration cellulaire dans un échantillon de culture bactérienne. Il s'agit d'une solution à base de détergent non ionique qui perturbe efficacement les cellules et solubilise les protéines sans dénaturation, ainsi que du lysozyme et du nucléase universelle qui permettent une extraction des protéines des bactéries à Gram négatives et à Gram positives (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89821>).

Un volume de 1 mL de culture sur GO est centrifugé à $14,500 \times g$, 4 °C pendant 20 minutes. Le culot bactérien récupéré ainsi que la fraction résiduelle de GO sont lavés 3 fois avec l'eau ultra pure stérile et centrifugés de nouveau. Ensuite, 200 µL de réactif B-PER sont ajoutés et la suspension est pipetée de haut en bas à l'aide d'une micropipette munie d'un embout stérile jusqu'à ce qu'elle soit homogène. La suspension est ensuite incubée pendant 15 minutes à température ambiante. Après, le lysat est centrifugé à $14,500 \times g$, 4 °C pendant 5 minutes pour séparer les protéines solubles des fractions insolubles (GO et protéines insolubles). Le surnageant récupéré a, ensuite, été utilisé pour le dosage des protéines avec la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Ce dosage a été réalisé en triple exemplaires sur tous les échantillons prélevés au cours de la fermentation ainsi que le blanc préparé avec le milieu de fermentation stérile.

3.6.2.5. Dosage des protéines avec la méthode de Bradford

L'estimation de la quantité de protéines totales produites a été réalisée avec la méthode de Bradford. Cette méthode colorimétrique se base sur le changement des absorbances qui se manifestent par le changement de la couleur du bleu de Coomassie G-250 après la liaison avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Le réactif de Bradford (Bio Rad) est dilué 5 fois avec de l'eau distillée stérile, ensuite, 5 mL de cette préparation diluée est mélangé avec 100 µL de chaque échantillon et incubés à température ambiante pendant 30 minutes, la lecture des DO a

été réalisée à 595 nm. La calibration est effectuée avec l'albumine provenant du sérum bovin (BSA) comme substance de référence de 0 à 1 mg/mL.

3.7. Etude de la corrélation de la production d'endo-1,4- β -glucanase et de biosurfactants

Dans cette étude, une production simultanée d'une endo-1,4- β -glucanase et de biosurfactants a été réalisée par l'isolat H1 en utilisant les GO comme substrat de fermentation. L'évaluation de la relation entre la production de ces deux biomolécules a été effectuée par une analyse graphique afin de révéler une éventuelle corrélation entre la production des deux biomolécules. Le coefficient de corrélation R entre les activités enzymatiques et le taux de biosurfactants dosés durant la fermentation ainsi que le R^2 qui représente le coefficient de détermination de la régression linéaire sont montrés graphiquement.

3.8. Purification d'endo-1,4- β -glucanase

3.8.2. Préparation du surnageant de culture

Après 72 h d'incubation, la culture est arrêtée et le surnageant a été récupéré par centrifugation à $14500 \times g$ pendant 20 minutes à 4 °C. Ensuite, le surnageant a été obtenu par filtration à l'aide d'un filtre à flacon stérile de 1 L muni d'une membrane de 0.22 μ m. L'activité enzymatique ainsi que la concentration des protéines ont été recherchés dans le surnageant.

3.8.3. Concentration des protéines par ultrafiltration

Le surnageant de culture a été concentré 20 fois (jusqu'à 50 mL) à l'aide d'un système d'ultrafiltration tangentielle sur une membrane Vivaflow 200 avec un seuil de coupure de 5 kDa (Vivascience, Hanovre, Allemagne). La méthode sert à éliminer le maximum d'eau ainsi que toutes les protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 5 kDa (filtrat). Le filtrat est récupéré et stocké à -20 °C afin de l'utiliser pour la purification de lipopeptides. La cassette est mise en route à l'aide d'une pompe péristaltique. L'activité enzymatique ainsi que la concentration des protéines totales sont vérifiées avant la concentration ainsi que dans le retentât récupéré.

3.8.4. Dialyse

Une dialyse a été réalisée pour la solution protéique concentrée afin de modifier sa concentration en sels. Une membrane de dialyse tubulaire (Cellu-Sep) avec un seuil de coupure

de 3 kDa a été utilisée pour former un boudin qui contient l'échantillon protéique. Ce boudin est introduit dans une éprouvette en verre contenant 1000 mL de tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5.0. Ensuite, l'éprouvette a été faiblement agitée à l'aide d'un barreau et agitateur magnétiques pendant 2 heures à 4 °C. Afin d'accélérer le processus, le tampon est renouvelé chaque 30 minutes. Par un phénomène de diffusion, les sels ont équilibré leur concentration de part et d'autre de la membrane poreuse. Le grand volume du tampon de dialyse par rapport à celui de la solution protéique, a aidé à changer rapidement la teneur en sels de celle-ci en la même que celle du tampon de dialyse. L'activité enzymatique ainsi que la concentration des protéines totales ont été mesurées après la dialyse.

3.8.5. Purification d'endo-1,4- β -glucanase par chromatographie échangeuse d'ions

La purification de la CelH1 a été réalisée par chromatographie liquide FPLC (pour FastProteinLiquidChromatography). La solution protéique, dialysée et filtrée sur membrane en acétate de cellulose 0,22 μ m (Millipore, Belgique), a été chargée à un débit de 0.7 mL/min sur une colonne cationique de carboxymethylsépharose (1,6 cm $\times$ 20 cm), préalablement, équilibrée avec un tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5.0. Les protéines accrochées sur la colonne sont éluées à un débit de 1 mL/min avec un gradient linéaire de NaCl (de 0 à 500 mM) préparé dans le tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5.0. Les fractions contenant l'activité endo-1,4- β -glucanase sont récupérées et rassemblées. Toutes les protéines contaminantes qui ne sont pas accrochées sur la colonne sont récupérées dans le lavage. Toutes les étapes chromatographiques sont réalisées avec un système de chromatographie ÄKTA (GE Healthcare Life-Science, Etats-Unis). La détection des protéines éluées est réalisée en ligne à l'aide d'un détecteur UV à 280 nm et 230 nm. Les concentrations de protéines ainsi que l'activité endo-1,4- β -glucanase ont été dosées durant toutes les étapes de purification, c'est-à-dire, avant et après le chargement de la colonne et dans toutes les fractions obtenues.

3.8.6. Evaluation du processus de purification par électrophorèse sur gel : SDS-PAGE

L'estimation de la taille moléculaire des protéines présentes dans les fractions avec l'activité endo-1,4- β -glucanase ainsi que sa pureté ont été déterminées par électrophorèse sur gel de polyacrilamide en présence de dodécyl sulfate de sodium SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées à travers un gel de polymère sous l'influence d'un champ électrique. Le SDS dissocie les protéines et les chaînes peptidiques déployées résultantes en des rapports charge/masse identiques. La distance et la vitesse de migration est donc uniquement en fonction de la masse molaire. Le gel utilisé pour la séparation est un gel de polyacrilamide à 12% NuPAGE Novex (Invitrogen, ThermoFisher, Belgique). Avant l'électrophorèse, des microtubes Eppendorf

contenant 5 µL de colorant de charge (ThermoFisher, Belgique) et 15 µL de chaque échantillon sont chauffés pendant 10 minutes à 80 °C, ensuite, déposés dans les puits du gel, ainsi qu'un étalon de poids moléculaire Novex Mark12 (ThermoFisher, Belgique). La migration a été réalisée avec un système BioRadAddis Mini Protean TGX. Le tampon NuPAGE MES-SDS pH 7.3 (ThermoFisher, Belgique) dilué 20 fois est utilisé comme tampon d'élution. Le gel est coloré avec une solution de coloration PageBlueProtein (Thermo Fisher Scientific) et décoloré avec de l'eau distillée.

3.9. Identification de l'enzyme par chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-ESI-MS/MS)

La recherche de l'enzyme homologue proche au CelH1 purifiée est réalisée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse au laboratoire GIGA Proteomics Facility (Université de Liège). L'analyse est réalisée sur un spectromètre de masse Orbitrap quadripolaire LC (Acquity M-CLass-Waters)-ESI (Q-Exactive Plus-Thermo Scientific), en mode ions positifs. Des petits échantillons sont excisés de la bande colorée au bleu de Coomassie correspondante à la bande de la CelH1 purifiée et soumis à une digestion en gel avec de la trypsine. Les spectres de masse des peptides ont été générés à l'aide du logiciel ProteomeDiscover vs 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Les recherches des données sont effectuées à l'aide des serveurs Mascot vs 2.2.06 et Protein Scape vs.3.0 (Burker), sur la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) en incluant toutes les taxonomies.

3.10. Caractérisation physico-chimique de l'endo-1,4-β-glucanase

Toutes les expériences de caractérisation enzymatique ont été réalisées en triples exemplaires.

3.10.1. Effet du pH sur l'activité enzymatique

L'influence du pH sur l'activité de la CelH1 a été étudiée dans la gamme de pH 4.0 à 9.0. Le tampon acétate de sodium 100 mM a été utilisé pour la gamme de pH 4.0 à 6.5, et le Tris-HCl 100 mM pour la gamme de pH 7.0 à 9.0. Le mélange réactionnel est préparé dans un volume final de 100 µL composé de 45 µL de tampons aux différents pH, 5 µL d'enzyme pure et 50 µL d'azo β-glucane d'orge préparé à 1% dans le tampon correspondant. L'incubation a été réalisée pendant 10 minutes à 60 °C.

3.10.2. Effet de la température sur l'activité enzymatique

La température optimale de l'activité enzymatique a été déterminée par la mesure de l'activité de la CelH1 à des températures allant de 30 jusqu'à 90 °C. Le mélange réactionnel, composé de 5 µL d'enzyme, de 45 µL de tampon acétate de sodium 100 mM, pH 6.0 et de 50 µL d'azo β -glucane d'orge à 1% a été incubé à chaque température. L'activité est déterminée après une incubation de 10 minutes dans un bloc chauffant.

3.10.3. Activité enzymatique résiduelle

Certains processus industriels nécessitent des réactions enzymatiques de longues durées. La stabilité de l'enzyme dans les conditions optimales définies, a été étudiée par une pré-incubation de 50 µL de la CelH1 à 20 µM avec 50 µL de tampon acétate de sodium 100 mM, pH 6.0 à 60 °C et en absence du substrat. L'incubation a été réalisée pendant 48 h. Des aliquotes de 5 µL ont été prélevées par intervalles de temps, puis transférés dans une solution de réaction enzymatique préparée dans les conditions optimales afin de doser l'activité résiduelle de l'enzyme pré-incubée. L'activité enzymatique est déterminée en pourcentage rapportant à l'activité de l'enzyme non incubée.

3.10.4. Effet de NaCl sur l'activité enzymatique

La souche H1 a été isolée à partir d'un sol salin. Ces environnements sont riches en sels dessous dans l'eau, principalement, du NaCl (Jacoby et al., 2011). Afin d'étudier l'influence du sel sur la CelH1, l'activité enzymatique est dosée en présence de concentrations croissantes de NaCl (de 0 à 4 M). Le β -glucane d'orge à 1% a été utilisé comme substrat pour le dosage enzymatique en raison de la précipitation des substrats chromogène (avec colorant Azo) en présence de concentrations élevées de NaCl. La méthode de DNS a été appliquée pour le dosage enzymatique. L'incubation a été réalisée dans les conditions optimales et l'activité enzymatique est exprimée en pourcentage en rapport à l'activité de l'enzyme en absence du NaCl.

3.10.5. Etude de la spécificité de l'activité hydrolasique de l'endo-1,4- β -glucanase

L'activité hydrolasique de la CelH1 est testée sur plusieurs polysaccharides préparés à 1% dans le tampon acétate de sodium 45mM, pH 6.0. Les substrats testés sont ; le lichenane, le β -glucan d'orge, la CMC, la gomme de caroube (GC), le 4-Nitrophenyl β -D glucopyranoside (p-NPG) et la cellulose microcrystalline (MCC).

Le dosage enzymatique a été réalisé dans un volume final de 100 µL contenant : 50 µL de chaque substrat à 1% (p/v), de 45 µL de tampon acétate de sodium 100 mM pH 6.0 et de 5 µL d'enzyme pure préalablement diluée dans le tampon correspondant. Des témoins sans enzyme sont inclus dans les dosages. Le mélange réactionnel a été incubé à 60 °C. La durée d'incubation

était 10 minutes pour les substrats solubles et 1 heure pour les substrats insoluble. L'activité enzymatique a été déterminée par le dosage de la quantité de sucres réducteurs libérés avec la méthode de DNS. Pour le test ρ -NPG, 100 μ L de Tris-HCl 1 M, pH 9.0 ont été ajoutés pour arrêter la réaction après 1 h d'incubation et l'absorbance a été mesurée à 400 nm. Un standard a été réalisé avec du 2-chloro-4-nitrophénol.

3.11. Caractérisation biophysique de l'endo-1,4- β -glucanase

3.11.1. Balayage spectrophotométrique

Un échantillon de la CelH1 purifiée est concentré jusqu'à 2 mg/mL de protéines dans un tampon acétate de sodium (100 mM, pH 6.0) à l'aide d'un filtre centrifuge Amicon avec un seuil de coupure de la membrane de 10 kDa (Merck Millipore, Belgique). Les spectres d'absorption de la CelH1 sont mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-DeNovix DS-11. Toutes les mesures de spectres sont effectuées dans une gamme de longueurs d'onde allant de 220 à 350 nm en déposant 2 μ L de l'échantillon protéique pure. Les spectres d'absorption UV-Vis sont établis dans le même spectrophotomètre.

3.11.2. Effet de NaCl sur la thermostabilité de CelH1 (Thermal Shift Assay)

La stabilité d'une protéine est liée à la composition du milieu dans lequel elle se trouve, mais aussi aux paramètres physiques tels que la température et la pression. La technique biophysique appelée Thermostabilité des Protéines par Fluorescence (TPF) ou Fluorescence-based Thermal Shift Assay (TSA), repose sur la mesure de l'émission d'un agent fluorescent interagissant de façon non sélective avec la protéine d'intérêt pour déterminer sa température de fusion (T_m), c'est-à-dire la température dans laquelle 50% de la protéine existe à l'état dénaturé (Cimpmperman et al., 2008; Bhayani et Ballicora, 2022). L'approche est couramment utilisée pour la caractérisation de la stabilité thermique des protéines dans diverses solutions et en présence de divers excipients (NaCl pour notre étude), ainsi que pour découvrir de nouveaux ligands potentiels pour les protéines cibles.

Pour ce faire, le mélange réactionnel a été préparé à l'obscurité, dans une plaque de PCR à paroi mince de 96 puits comme suit : 4 μ L d'enzyme purifiée avec une concentration de 20 μ M, 2,5 μ L de colorant fluorescent pour TSA (Thermo Scientific, Belgique) à une concentration finale de 1/2000, et différents volumes d'une solution de NaCl 4 M afin d'atteindre une gamme de concentrations finales de NaCl allant de 0 à 2,5 M. Le volume a été ajusté à 20 μ L avec le tampon acétate de sodium 45 mM, pH 6.0. Les mesures ont été réalisées en triple exemplaire. Dans les réactions témoins, le volume de l'enzyme a été remplacé par le tampon. La plaque

PCR a été, ensuite, scellée avec un film d'étanchéité de qualité optique de Bio-Rad et le mélange a été homogénéisé dans une centrifugeuse à plaques PCR pendant 10 secondes. L'incubation a été réalisée dans un système de PCR en temps réel LightCycler 96 (Roche, Suisse). La fluorescence a été mesurée lors d'un changement de température de 37° à 95°C, avec des incréments progressifs de 0,5°C/10 sec, suivi de la lecture de la fluorescence avec des longueurs d'onde d'excitation/émission à 490/530 nm. L'évaluation des données et la détermination de T_m ont été effectuées à l'aide du logiciel LightCycler96.

3.12. Identification des produits de saccharification des polysaccharides par HPLC

3.12.1. Hydrolyse des grignons d'olives et de β -glucan d'orge par le surnageant de culture (cocktail enzymatique)

La structure variable et l'organisation de la cellulose et des hémicelluloses dans les résidus lignocellulosiques nécessitent l'action concertée de nombreuses enzymes hémi(cellulolytiques) pour atteindre leur dégradation complète. La recherche de l'effet de tous le cocktail enzymatique présent dans le surnageant de culture de l'isolat H1 sur le GO, a été effectuée sur les GO ainsi que sur le β -glucan d'orge comme substrats. Le test a été réalisé sur un mélange réactionnel de 100 μ L contenant 5 μ L de surnageant de culture concentré 20 fois, 45 μ L de tampon acétate de sodium 100 mM, pH 6.0 et 50 μ L d'une solution stérile de GO préparée à 3 % (p/v) ou de β -glucan d'orge préparé à 1%. L'incubation a été réalisée à 60 °C sous agitation de 150 rpm pendant 24 h pour les GO et 10 minutes sans agitation pour le β -glucan d'orge. Le volume de surnageant a été remplacé par le même tampon dans les réactions témoins. Les produits des réactions enzymatiques sont séparés par HPLC sur une colonne Prevail Carbohydrate ES (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Grace Davison Discovery Sciences, Bannockburn, IL, Etats-Unis) avec de l'acétonitrile à 75% comme éluant, à un débit de 1 mL/min. Du glucose, de cellobiose, de cellotriose, de cellotétraose, de xylose, de mannose, de rhamnose, de galactose et de l'arabinose sont injectés à 1 g/L comme standards.

3.12.2. Hydrolyse des cello-oligosaccharides par l'endo-1,4- β -glucanase purifiée

Afin de comprendre le mode d'action de la CelH1, une identification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) des produits libérés par l'hydrolyse de différents cello-oligosaccharides a été réalisée. Pour ce faire, 5 μ L de la CelH1 purifiée et 45 μ L de tampon acétate de sodium 100 mM pH 6.0 ont été incubés à 60 °C pendant 1 h, avec 50 μ L d'une solution de 1% (p/v) de l'un des cello-oligosaccharides suivants : le cellobiose, le cellotriose,

le cellotétraose et le cellopentaose. Les produits libérés sont séparés par HPLC comme décrit dans la rubrique précédente. En plus du glucose, tous les cello-oligosaccharides testés ont été injectés comme standards à une concentration de 1 g/L.

3.13. Etude de la cinétique enzymatique

Les différents paramètres cinétiques caractérisant le système E(CelH1)-S(β -glucane d'orge) ont été déterminées par le dosage de l'activité de la CelH1, en utilisant différentes concentrations d'azo β -glucane d'orge comme substrat (de 0,05 à 5 mg/mL) dans du tampon acétate de sodium 45 mM, pH 6.0 et sous les conditions standards. La constante de Michaelis-Menten (K_m , mg/mL) et la vitesse de réaction maximale (V_{max} , $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$) ont été exprimées graphiquement par la représentation des tracés de régression linéaire de Lineweaver-Burk (Lineweaver et Burk, 1934).

3.14. Purification partielle et concentration de lipopeptides

Le filtrat récupéré après la concentration du surnageant issu de la fermentation (section 3.8.3) a été utilisé pour la purification de lipopeptides. Des cartouches d'extraction en phase solide contenant une colonne C18 immobilisée (SPE-C18, Waters) ont été utilisés pour l'extraction. Les cartouches ont été d'abord conditionnées avec 20 mL de méthanol 100% puis rincées avec 10 mL d'eau ultra pure. Ensuite, 1 mL du filtrat récupéré a été chargé sur la cartouche et les cartouches ont été lavées avec 8 mL d'eau ultra pure. Enfin, les lipopeptides retenus sont élués avec 8 mL de méthanol 100%. L'éluât est évaporé à l'air sous une hotte chimique jusqu'à l'obtention d'un dépôt sec. Ce dépôt a été repris (concentré) dans 200 μL de méthanol de qualité HPLC. Le pic maximal d'absorption des longueurs d'onde UV visible ($\cong 210 \text{ nm}$) a été déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre UV-DeNovix DS-11.

3.15. Identification de lipopeptides par HPLC

Les échantillons concentrés ont été identifiés grâce à un système HPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA), la colonne utilisée était une C18. En effet, 10 μL d'échantillon concentré ont été injectés à un débit de 0.6 mL/min. Pour chaque échantillon, deux injections ont été effectuées, la première pour les surfactines, et la deuxième pour les fengycines. Pour la première, l'élution de la surfactine a été réalisée pendant 20 minutes en mode isocratique par un mélange de solvant composé d'acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique 80/20/0.1 (v/v/v). Les résultats obtenus ont été comparés aux standards de la surfactine et de la fengycine injectés à 1 mg/mL (fourni par Pr. Sigrid Flahaut). Pour la deuxième, l'élution des fengycines a été faite par le même mélange avec un gradient de 45/55/0.1 jusqu'à 55/45/0.1 pendant 30 minutes ensuite, en isocratique à 55/45/0.1 pendant 10 minutes. Le temps de rétention ainsi que le spectre à une

absorbance de 210 nm de chaque pique ont été, automatiquement, analysés à l'aide du logiciel Empower pour permettre l'identification des molécules éluées.

3.16. Test du potentiel surfactant : l'effondrement de la goutte (Drop Collapse)

Ce test permet d'évaluer la présence de molécules aux propriétés surfactantes produites par un microorganisme dans le milieu de culture (Plaza et al., 2006). Une goutte de 5 µL de lipopeptides extraits et concentrés a été placée sur 50 µL de l'huile de paraffine ou de l'huile d'olive, déposés sur une lame de microscope, l'huile d'olive et de paraffine représentent la surface hydrophobe, la présence de molécules tensioactives engendre l'effondrement ou l'étalement visible à l'œil de la goutte de lipopeptides, évalué par rapport à un témoin négatif, constitué d'eau ultra pure. Cette méthode qualitative permet d'avoir une évaluation rapide de la production de surfactant par les microorganismes en culture.

Résultats et discussion

4. Résultats et discussion

Ce travail porte sur la recherche d'isolats bactériens, à partir d'un environnement extrême, en l'occurrence, le lac salé d'El M'Ghair (Algérie), susceptibles, à la fois, de dégrader les grignons d'olives en produisant des enzymes cellulolytiques avec des caractéristiques industriels (résistance aux différentes conditions physico-chimiques), et d'utiliser ce substrat afin de produire différents lipopeptides à activité biosurfactante.

4.1. Préparation et dosage partiel des constituants de grignons d'olives

Les GO sont réduits en poudre par un broyage fin afin d'altérer leur nature fibreuse et d'augmenter leur fluidité. Selon Kumar et al., (2020), le broyage peut être utilisé pour augmenter la surface spécifique disponible et réduire la granulométrie des matériaux lignocellulosiques, de plus, il réduit le degré de polymérisation et la cristallinité des matières cellulosiques. Par conséquent, le broyage peut augmenter la vitesse de l'hydrolyse et de la saccharification de la lignocellulose. Les résultats d'analyse des GO broyés, utilisés comme substrat de fermentation dans cette étude, sont présentés dans le tableau 6. Aussi, la fraction principale de cette biomasse lignocellulosique est la cellulose (32.8%), suivie par l'hémicellulose (20.3%) et la lignine (13.6%). Ces résultats corroborent ceux obtenus par d'autres travaux antérieurs qui ont notifiés la dominance de la fraction cellulosique dans les GO avec une part de 27 à 33% de leur masse totale (Roig et al., 2006; Ducom et al., 2019). La fraction soluble (29.2%) représente l'ensemble des sucres (glucides) dessous, des protéines, et des composés phénoliques. La teneur élevée en lipides (12.13%), dosés par la méthode de Soxhlet, est due aux résidus d'huile d'olives récupérés après l'extraction, leur présence constitue un inducteur pour la production des lipopeptides (De Oliveira et al., 2021). Cette variété de GO a montré une faible teneur en azote (0.8%), cependant, cette valeur se trouve dans la gamme des valeurs de la teneur en azote publiées pour différentes variétés de GO (entre 0.6 et 2.7%) (García et al., 2014; Volpe et al., 2015; Buratti et al., 2016). En effet, ces résultats indiquent que cette variété de GO pourrait servir comme source adéquate pour la production d'oligosaccharides à partir de ses fractions cellulosiques et hémicellulosiques. Il est à signaler que les grignons d'olives sont un produit très disponible en Algérie, étant un pays producteur d'huile d'olive. Cette pertinence justifie largement leur choix comme substrat de fermentation dans cette étude.

Tableau 6 Composition des grignons d'olives

Composition	% matière sèche
Cellulose	32.8
Hemicellulose	20.3
Lignine	13.6
Solubles	29.2
Lipides	12.13
Azote	0.8
Protéines	4.95

4.2. Isolement et sélection des bactéries cellulolytiques

La recherche des isolats bactériens, par l'exploration des échantillons, a abouti à l'obtention de 43 isolats repartis sur les différents sites investis. Treize isolats sont isolées de l'eau du lac salé principal d'El M'Ghair (30.2%), dix à partir du sol situé à sa proximité (23.2%) et vingt isolats à partir du sol de la palmeraie mitoyenne du lac (46.5%). La richesse du sol de la palmeraie en bactéries cellulolytiques par rapport au lac salin peut être interprétée par la présence de fibres végétales cellulosiques et la richesse du sol en matière organique qui constitue une source d'énergie importante pour le développement des microorganismes hétéro-organotrophes du sol. Les bactéries purifiées sont testées pour leur potentiel cellulolytique. Les résultats obtenus ont révélé que 9 isolats, dont deux isolés de l'eau du lac salé, deux du sol situé à sa proximité et cinq à partir du sol de la palmeraie, ont montré une capacité à dégrader la CMC avec différentes variations dans les valeurs des indices cellulolytiques (IC) (tableau 7). Les trois meilleurs isolats, avec les valeurs les plus élevées des IC, provenaient de l'échantillon du sol de la palmeraie. L'isolat H1 avait le meilleur potentiel cellulolytique avec une valeur d'IC de 5.5, suivi de l'isolat H2 (4.3) et H3 (3.8). Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 7 et représentés par la figure 15. En conséquence à ces résultats l'isolat H1 a fait l'objet du présent travail.

Tableau 7 Valeurs des IC de différentes bactéries à activité cellulolytique, isolées à partir des environnements extrêmes de l'Est d'Algérie (lac salé d'El M'Ghair, Sol du lac salé et le sol d'une palmeraie située à proximité du même lac salé)

Site d'échantillonnage	Valeur d'IC	Code de l'isolat
Sol de palmeraie	5.5	H1
Sol de palmeraie	4.3	H2
Sol de palmeraie	3.8	H3
Sol de palmeraie	3.1	H4
Sol de palmeraie	2.4	H5
Eau du lac salé	2.4	H6
Sol du lac salé	2.1	H7
Eau du lac salé	1.8	H8
Sol du lac salé	1.2	H9



Figure 15 Screening des isolats cellulolytiques sur gélose à base de CMC. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 5 jours, ensuite colorées avec une solution rouge Congo à 0.1% (p/v) et décolorées avec 1 M NaCl. Les zones claires autour des colonies montrent la dégradation de la CMC par les isolats. Les isolats H1, H2 et H3 possèdent les meilleurs IC

4.3. Identification de l'isolat cellulolytique performant

Les tests d'identification préliminaires reposés sur l'étude morphologique et physiologique ont montré que l'isolat H1 supposé appartenir au genre *Bacillus*. En effet, il apparaît au microscope optique sous forme de bâtonnets (Figure 16a) caractérisé par une coloration Gram positive (Figure 16b)

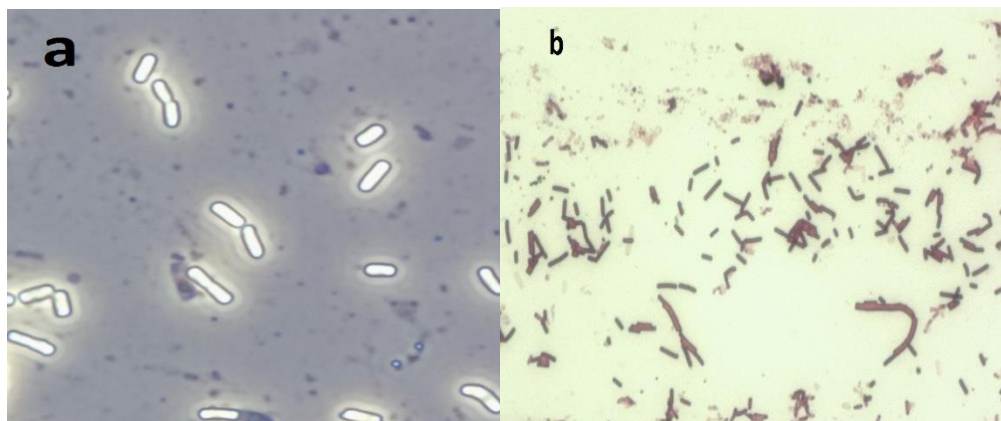


Figure 16 Aspect microscopique de l'isolat H1 sélectionné pour son potentiel cellulolytique : **(a)** Forme végétative (en forme de bâtonnets) au grossissement de 1000X. **(b)** Résultat de la coloration de Gram (violet).

L'analyse Blast de la séquence d'*ARNr 16S* a montré que l'isolat H1 appartient effectivement au genre *Bacillus*. Des arbres phylogénétiques sont construits à partir de l'alignement de la séquence de l'isolat H1 avec celles des souches de référence pour les espèces du genre *Bacillus*, en utilisant la méthode Maximum-Likelihood. D'après cette analyse phylogénétique, la souche H1 apparaissait appartenir au groupe de *B. subtilis* et au sous-groupe *B. amyloliquefaciens*, et plus proche de l'espèce de *B. velezensis*, avec une identité de 99.73% avec la souche *B. velezensis* WGB10 (numéro d'accession GenBank : KY962335.1) (Figure 17a). Selon Fox et

al. (1992), une identité élevée des séquences d'ARNr 16S n'est pas nécessairement un critère suffisant pour garantir l'identité d'une espèce bactérienne. Afin d'affiner les résultats de l'analyse de l'ARNr 16S, la séquence du gène *gyrA*, qui a été reconnue comme un marqueur approprié pour le groupe *B. subtilis* (Singh et al., 2013), est incluse dans l'analyse phylogénétique. La séquence *gyrA* de la souche H1 était identique à 99.89% à celle de *B. velezensis* BY6 (numéro d'accèsion GenBank : CP051011.1) (Figure 17b), confirmant l'identification initiale basée sur le gène de l'ARNr 16S. Les séquences d'ARNr 16S et *gyrA* de la souche H1 sont, ensuite, déposées dans GenBank (NCBI) avec les numéros d'accèsion aux nucléotides (OM510337 pour l'ARNr 16S et OM523097 pour la *gyrA*).

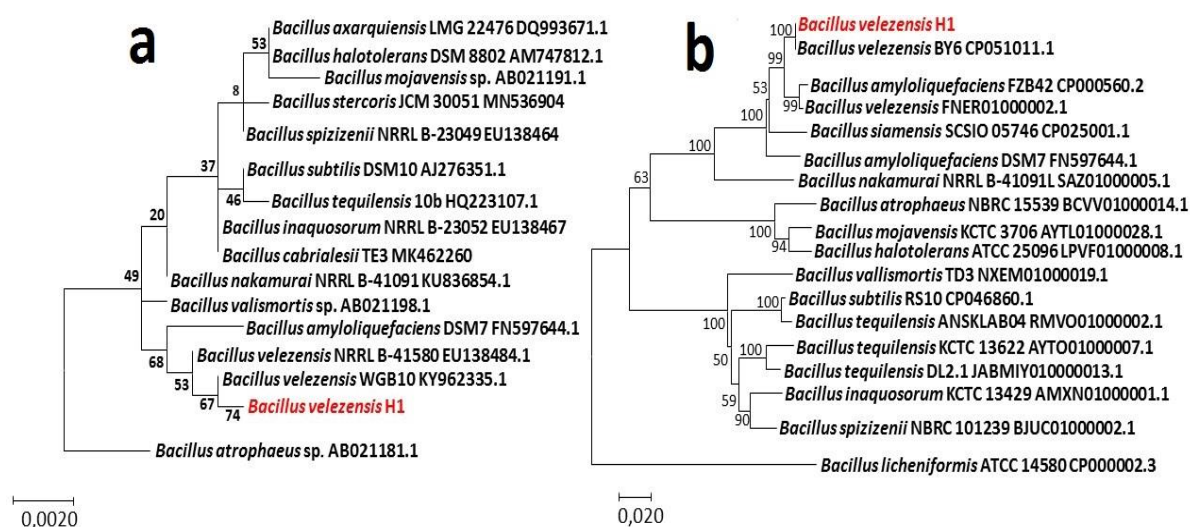


Figure 17 Identification moléculaire de l'isolat cellulolytique H1 : **(a)** Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène ARNr 16S de *B. velezensis* H1. La barre d'échelle indique une substitution de 0,002 nucléotide par position de nucléotide ; **(b)** Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène *gyrA* de *B. velezensis* H1. Les deux arbres sont générés par l'algorithme Maximum-Likelihood

4.4. Etude des caractéristiques extrêmotolérants de l'isolat H1

Les résultats du test de l'effet de la température sur la croissance de *B. velezensis* H1 ont montré que pour la gamme de températures testées ; le meilleur taux de croissance maximal (μ_{max}) est obtenu à une température d'incubation de 37 °C avec une valeur de 1.7 et un temps de génération (G) minimal de 0.45 h. A 45 °C la souche a continué à se développer avec un μ_{max} de 1.05 et un G de 0.75 h. Tandis qu'à 55 °C la souche a montré une valeur de μ_{max} de 0.5 et un G de 1.3 h (figure 18a). Ces résultats confirment que 37 °C est la température optimale de croissance de la souche étudiée mais, demeure en croissance jusqu'à des températures de 45°C à 55°C. Aussi, la souche *B. velezensis* H1 peut être considérée comme étant thermotolérante,

selon Ghilamical et al. (2018), les bactéries thermotolérantes sont des bactéries qui peuvent résister à des températures au-delà de 40°C.

La souche de *B. velezensis* H1 est testée pour sa capacité à se développer en présence de concentrations élevées de sel. Aucune halophilie n'est détectée chez la souche mais, elle avait la capacité de se développer dans une gamme de concentrations de NaCl de 0 à 10%, avec une croissance optimale en absence de NaCl (0%) traduit par un μ_{max} de 1.55 et un G de 0.45 h (figure 18b). De ce fait, la souche de *B. velezensis* H1 peut être classée comme une souche halotolérante, suivant la définition de Rahman et al. (2017) qui ont précisé que tout microorganisme capable de croître en l'absence ou en présence de sels est qualifié d'halotolérant. Ces microorganismes ont la capacité de produire des biocatalyseurs fonctionnels dans des conditions extrêmes. Les propriétés uniques de ces biocatalyseurs ont donné lieu à plusieurs nouvelles applications d'enzymes dans les procédés industriels (Van den Burg, 2003).

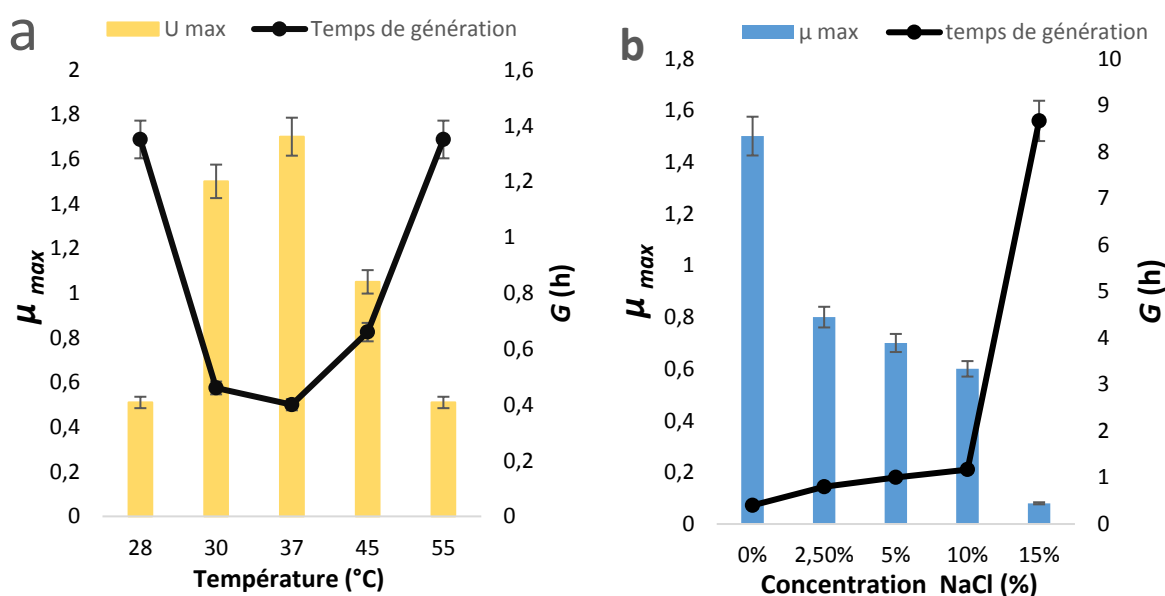


Figure 18 Etude de la thermotolérance et de l'halotolérance de *B.velezensis* H1. **(a)** Taux de croissance maximal et temps de génération de *B.velezensis* H1 à différentes températures d'incubation. **(b)** Taux de croissance maximal et temps de générations des cultures avec différentes concentrations de NaCl.

4.5. Détermination des conditions optimales de la production de l'endo-1,4-glucanase par *B. velezensis* H1

4.5.1. Effet de la source d'azote

Lors de la croissance bactérienne sur la biomasse lignocellulosique, plusieurs paramètres physico-chimiques tels que le temps d'incubation et la source d'azote pourraient fortement

influencer la croissance et par conséquent la production de métabolites primaires et secondaires. Plusieurs sources d'azote organique et inorganique sont testées afin d'optimiser la production d'endo-1,4- β -glucanase (CelH1) par *B. velezensis* H1 sur les GO. Comme le montre la figure 19a, parmi les différentes sources d'azote testées, l'activité enzymatique la plus élevée est obtenue en présence de sources d'azote organiques. Ce résultat est en accord avec plusieurs études, où les sources d'azote organiques se sont révélées essentielles, à la fois, pour la croissance des espèces de *Bacillus* et pour la production de cellulase (Kim et al., 2013; Thomas et al., 2017). La production maximale de la CelH1 est obtenue dans les cultures supplémentées de 0.5% (p/v) d'extrait de levure (4.3 U/mL), suivi de la peptone (4.2 U/mL) (Figure 19a). Des résultats similaires sont déjà rapportés pour la production de cellulase de *B. velezensis* A-68 en utilisant les coques de riz comme source de carbone en fermentation submergée (Thomas et al., 2017), ainsi que la cellulase de *B. pseudomycoïdes* qui a été produit sur la bagasse de canne à sucre comme substrat (Pramanik et al., 2021). Cela peut s'interpréter par la composition de l'extrait de levure riche en composés azotés tel que les acides aminés libre nécessaires pour la synthèse des protéines, en soufre, en oligo-éléments, en complexe de vitamines B et en plusieurs autres facteurs de croissance importants (Zarei et al., 2016).

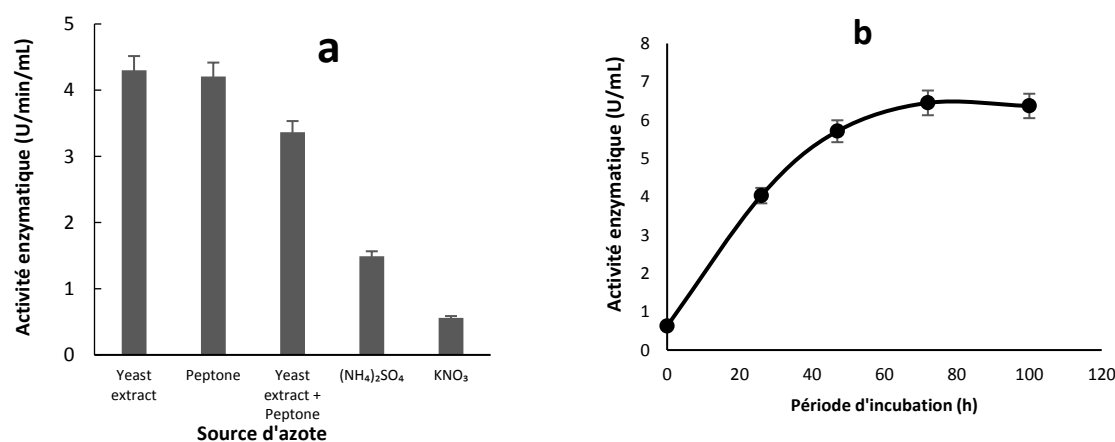


Figure 19 Production de la CelH1 par *B. velezensis* H1. **(a)** Activité enzymatique après 24 h d'incubation sur GO supplémentées de plusieurs sources d'azote ajoutées. **(b)** Activité enzymatique à différents temps d'incubation.

4.5.2. Effet de la durée d'incubation

La figure 19b montre que la production de la CelH1 par *B. velezensis* H1 atteint son maximum après 72 h d'incubation. Après avoir atteint son maximum, l'activité enzymatique est restée stable jusqu'à 100 h d'incubation. Cette période d'incubation est rapportée pour une production maximale de différentes cellulases par d'autres espèces de *Bacillus* cultivées sur divers

matériaux lignocellulosiques non traités chimiquement (tableau 8). Ces résultats confirment l'efficacité des souches bactériennes pour une production maximale de cellulases en courte période de croissance en comparaison aux espèces fongiques qui prennent généralement de 7 à 10 jours (Kang et al., 2004). Certaines autres espèces de *Bacillus* ont, également, développé une activité enzymatique maximale après 48 à 72 h d'incubation en utilisant différents substrats lignocellulosiques (tableau 8). Les différentes conditions de fermentation, telles que l'agitation (Ibrahim et al., 2021), ou la nature et la composition chimique des résidus végétaux utilisés et s'ils sont prétraités ou non, pourraient expliquer une partie de la différence dans la période d'incubation optimales pour la production maximale de cellulase.

Tableau 8 Périodes d'incubation nécessaires pour la production maximale d'endoglucanase, par plusieurs espèces de *Bacillus* cultivées sur différents substrats lignocellulosiques

Organisme	Source de carbone	Prétraité/ non traité	Période d'incubation	Référence
<i>B. velezensis</i> H1	GO	Non traité	72 h	Présente étude
<i>B. velezensis</i> ASN1	Déchets de papier	Prétraité	24 h	(Nair et al., 2018)
<i>B. velezensis</i> A-68	Coques de riz	Non traité	72 h	(Kim et al., 2013)
<i>B. amyloliquefaciens</i> S1	Mélange de son, tourteau de soja et de CMC	Non traité	72 h	(Ye et al., 2017)
<i>B. pseudomycoloides</i>	Bagasse de la canne à sucre	Non traité	72 h	(Pramanik et al., 2021)
<i>B. subtilis</i>	Déchets de papier	Non traité	60 h	(Rathnan et al., 2013)
<i>B. licheniformis</i> K-3	Son de blé	Non traité	48 h	(Gupta et al., 2015)

4.6. Production simultanée d'endo-1,4- β -glucanase et de biosurfactants sur milieu sélectionné

Un scale-up est réalisé dans 1 L de milieu de fermentation sélectionné (5% GO, 0.5% extrait de levure, à 37 °C pendant 72 h). La période d'incubation est prolongée dans une deuxième culture préparée dans les mêmes conditions afin d'étudier la cinétique de croissance (figure 20). Dans l'impossibilité de déterminer la croissance cellulaire par la méthode de dénombrement, à cause de la contamination des échantillons prélevés par la fraction solide de GO, l'utilisation de la méthode d'extraction et de dosage des protéines bactériennes semble être une bonne méthode pour l'estimation de la croissance bactérienne dans les cas d'utilisation de matière lignocellulosiques comme substrats de fermentations (figure 20). En effet, les graphiques montrent que la production de la biomasse bactérienne et de la CelH1 est étroitement corrélée et ce, depuis les premières heures d'incubation. La production maximale de la CelH1 est atteinte après 72 h d'incubation (6.45 U/min/mL). La production de la CelH1 pendant les premières phases de croissance est expliquée par le fait que l'enzyme est un métabolite primaire nécessaire

RESULTATS ET DISCUSSION

à la croissance de *B. velezensis* H1. Le dosage de l'activité émulsifiante (AE) est réalisé afin de déterminer la présence de lipopeptides. La synthèse des lipopeptides a commencé en fin de la phase exponentielle et s'est accélérée et s'est accumulée rapidement pendant la phase stationnaire de la croissance de *B. velezensis* H1 (30-72h) pour atteindre une activité émulsifiante de 2.6 U/mL après 72 h d'incubation et une activité maximale de 2.8 U/mL à 96 h d'incubation. La production des lipopeptides pendant la phase stationnaire de croissance (après l'atteinte d'une concentration maximale de biomasse) est rapportée par plusieurs auteurs (Suryanti et al., 2013; Yuliani et al., 2018; Singh et Sharma, 2020). Plusieurs d'autres études (Ramawat, 2007; Kumar et al., 2021), ont expliqué que la production de chaque métabolite secondaire est accélérée et accumulée en phase stationnaire de fermentation. Dans cette étude, le milieu de fermentation à base de GO est optimisé pour une production maximale de la CelH1 chez *B. velezensis* H1, et par conséquent, sa production de lipopeptides. En effet, durant le développement, le *B. velezensis* H1 décompose le complexe carboné des GO grâce à l'action de la CelH1 ainsi que d'autres enzymes. Les produits finaux de cette décomposition sont, utilisés dans différentes voie métaboliques nécessaires à la croissance et à l'activité de ladite bactérie.

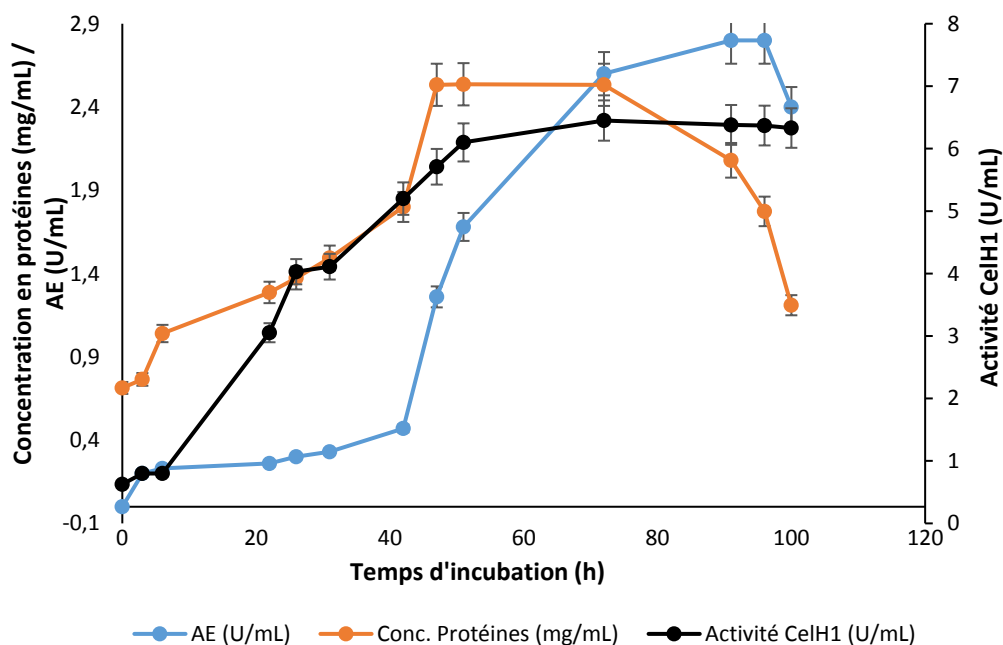


Figure 20 Production simultanée de la CelH1 et de lipopeptides par *B. velezensis* H1

4.7. Corrélation de la production de l'endo-1,4- β -glucanase et de biosurfactants

Les résultats de l'étude de la relation entre la production de la CelH1 et de lipopeptides par *B. velezensis* H1 montrent que l'activité émulsifiante de lipopeptides est corrélée avec la production de la CelH1 pendant la fermentation. La figure 21 révèle que l'activité émulsifiante (AE) avait une forte corrélation polynomiale avec l'activité de la CelH1, le coefficient de corrélation (R) est de 77% et le coefficient de détermination (R^2) est de 0.97. Ces résultats suggèrent que la production concomitante de ces deux métabolites est réalisée avec succès sur les GO. Plusieurs études ont signalé l'effet positif de la présence de lipopeptides sur l'activité des cellulases (Wang et al., 2011; Abdelli et al., 2019; Oliva-Taravilla et al., 2020). Selon Perfumo et al. (2018), la synthèse de biosurfactants est associée à la production d'enzymes extracellulaires et ils supposent que le rôle écologique des biosurfactants, principalement dans les environnements extrêmes, est de soutenir la capacité des communautés microbiennes à métaboliser les matières d'origine végétale, telles que la cellulose et l'hémicellulose. Ces molécules sont susceptibles d'agir en synergie avec les enzymes extracellulaires en augmentant la solubilisation, la mobilisation, ainsi que la biodisponibilité des résidus hydrophobes issus de l'hydrolyse de biopolymères complexes (Agrawal et al., 2017). Pourtant, la plupart des lipopeptides, qui sont utilisés ces dernières années comme additifs pour améliorer l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, sont des substances synthétiques qui ne sont pas biodégradables, et donc, polluant pour l'environnement (Zhang et al., 2009). L'utilisation de biosurfactants produits sur des ressources renouvelables, souvent d'origine microbienne, a moins d'impact sur l'environnement, présentant, par conséquent, une approche plus durable que l'utilisation de tensioactifs synthétiques conventionnels (Henkel et al., 2017). L'étude d'Oliva-Taravilla et al. (2020) a montré que l'ajout de certains biosurfactants d'origine végétale ou microbienne améliore l'hydrolyse enzymatique de la fraction cellulosique dans les matériaux lignocellulosiques, cette amélioration constatée est attribuée à la nature amphiphile des biosurfactants ajoutés, dont leur groupes hydrophiles se solubilisent dans la phase liquide aqueuse, tandis que les groupes hydrophobes s'adsorbent à la lignine exposée à la surface de ces matériaux. Par conséquent, les interactions non productives lignine-cellulase sont obstruées et réduites. De plus, les groupements hydrophobes et hydrophiles des biosurfactants ont la capacité d'agir entre les fluides de différentes polarités (huile-eau et eau-huile), provoquant une réduction de la tension superficielle, une augmentation de la zone de contact des composés cellulosiques et une amélioration de la biodisponibilité et de la biodégradation de ces composés (Dzięgielewska et Adamczak, 2013). Dans le présent travail, la souche *B. velezensis* H1,

présente le potentiel de la production simultanée de ces deux biomolécules à savoir : la CelH1 ; une glycoside hydrolase de la famille 16, qui présente une activité endo- β -1,4-glucanase halotolérante, thermotolérante et thermostable, capable d'hydrolyser la fraction cellulosique de la biomasse lignocellulosique, ainsi qu'un mélange de lipopeptides (au moins deux : la surfactine et la fengycine), présentant des activités émulsifiantes et tensioactives, dont leur production est étroitement corrélée avec la production de la CelH1.

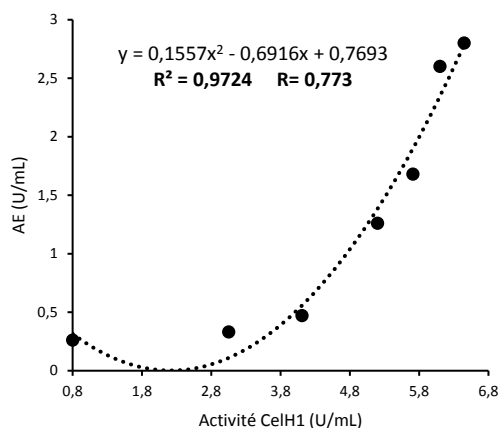


Figure 21 Corrélation de la production de la CelH1 avec l'activité émulsifiante (AE) des lipopeptides produits par *B. velezensis* H1 sur les grignons d'olives

4.8. Purification de l'endo-1,4- β -glucanase

Afin de caractériser la CelH1 sécrétée par *B. velezensis* H1, une purification de cette enzyme est réalisée. Le surnageant concentré par ultrafiltration et dialysé, est chargé dans une chromatographie échangeuse d'ions sur une colonne CM-Sepharose, préalablement équilibrée par du tampon acétate de sodium 50 mM. pH 5.0. Aucune activité n'est détectée dans l'écoulement continu et de lavage de la colonne avec le tampon d'acétate de sodium 50 mM pH 5.0, ce qui a confirmé que la totalité des unités enzymatiques est retenue par la colonne (Figure 22). La CelH1 est éluée à 100 mM de NaCl avec un gradient linéaire de 0 à 500 mM de NaCl. Un résumé du processus de purification est présenté dans le tableau 9 et la figure 23a. La CelH1 purifiée, récupérée, après l'étape de CM-Sepharose avait une activité spécifique de 453.04 U/mg de protéines, correspondant à une amélioration de rendement de 44.9 fois par rapport au surnageant. Une cellulase produite par *Aspergillus niger* sur les coquilles d'*Arachis hypogaea* avait une activité spécifique similaire (484.30 U/mg de protéines) (Sulyman et al., 2020). Cependant, les endoglucanases produites par certaines espèces de *Bacillus* tels que *B. halodurans* TSLV1 (16.88 U/mg) et *Bacillus* sp. (68.1 U/mg), avaient des activités spécifiques plus faibles (Sadhu et al., 2013; Rattu et al., 2016). La technique de purification rapide

appliquée dans cette étude a permis la récupération efficace de la CelH1 avec un rendement final de 80%. Cette valeur est supérieure à de nombreux rendements de purifications des endoglucanases précédemment rapportés pour des espèces de *Bacillus*, tels que *B. tequilensis* G9 (10%) (Dar et al., 2019), *B. halodurans* TSLV1 (69%) (Rattu et al., 2016), *B. licheniformis* HI-08 (32.33%) (Afzal et al., 2019) et *B. velezensis* A4 (67.8%) (Liu et al., 2019).

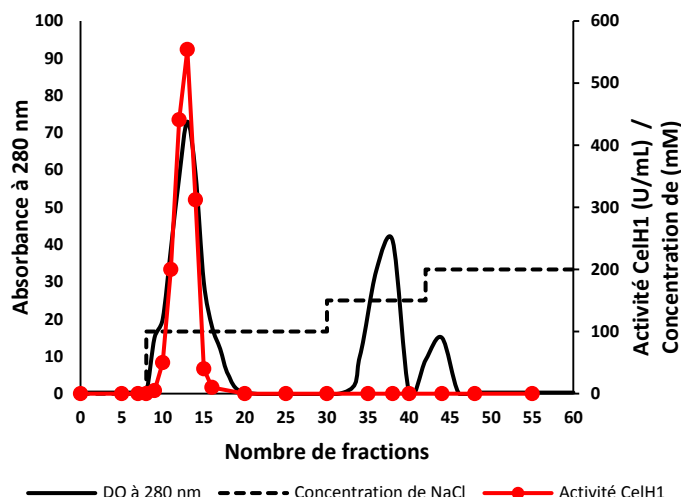


Figure 22 Profil d'élution de la CelH1 par chromatographie échangeuse d'ions : la colonne est lavée avec du tampon acétate de sodium 50 mM, pH 5.0, à un débit de 0.7 mL/min, puis élue à 100 mM de NaCl avec un gradient de 0-500 mM de NaCl.

Tableau 9 Bilan global de purification de la CelH1 produite par *B. velezensis* H1

Etape de Purification	Volume (mL)	Proteins totales (mg)	Activité CelH1 totale (U)	Rendement (%)	Activité spécifique (U/mg protéine)	Facteur de Purification
Surnageant	1000	550	5549,93	100	10.01	1
Ultrafiltration+ Dialyse	50	257,5	5053	91.0	21.05	2.09
Colonne de CM-Sepharose	14	9,8	4439,82	80.0	453.04	44.9

4.9. Identification de l'endo-1,4- β -glucanase

Le gel d'électrophorèse de l'enzyme purifiée a montré une bande majeure avec une masse moléculaire apparente de 26 kDa (Figure 23a). L'analyse LC-ESI-MS/MS effectuée sur la CelH1 purifiée a donné une correspondance avec une endo- β -1,3-1,4-glucanase non caractérisée de *Bacillus* sp. 289 (numéro d'accension GenBank : ACH85242), avec une couverture de 40% (Figure 23b). Cette endo- β -1,3-1,4-glucanase homologue devrait appartenir à la base de données

CAZy(<http://www.cazy.org/search?page=recherche&lang=en&recherche=ACH85242&tag=4>) et est classée comme un membre de la famille 16 des glycosydes hydrolases qui ont des masses moléculaires allant de 25 à 30 kDa (Planas, 2000). Dans les répertoires CAZy, il existe 15 entrées pour les glycosides hydrolases du genre *Bacillus* dans la famille des glycosydes hydrolases 16 (http://www.cazy.org/GH16_21_characterized.html), dont quelques-unes sont au moins partiellement caractérisées. Des endoglucanases de masses moléculaires allant de 25 à 30 kDa sont purifiées à partir de *B. velezensis* ZJ20 (27,3 kDa) (Xu et al., 2016), *B. halodurans* C-125 (26,7 kDa) (Akita et al., 2005) et *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350 (26 kDa) (Sun et al., 2012), ainsi que de souches fongiques tels que *Gloeophyllum trabeum* (26,2 kDa) (Miotto et al., 2014) et *Trichoderma koningii* ZJU-T (26,5 kDa) (Wang et al., 2007). D'autres endoglucanases sécrétées par des souches de *Bacillus velezensis*, ont des masses moléculaires plus élevées et sont classées dans la famille des glycosyl hydrolases 5, comme l'endoglucanase de *B. velezensis* A4 (55 kDa) (Liu et al., 2018) et *B. velezensis* Y1 (52,31 kDa) (Khalid et al., 2021).

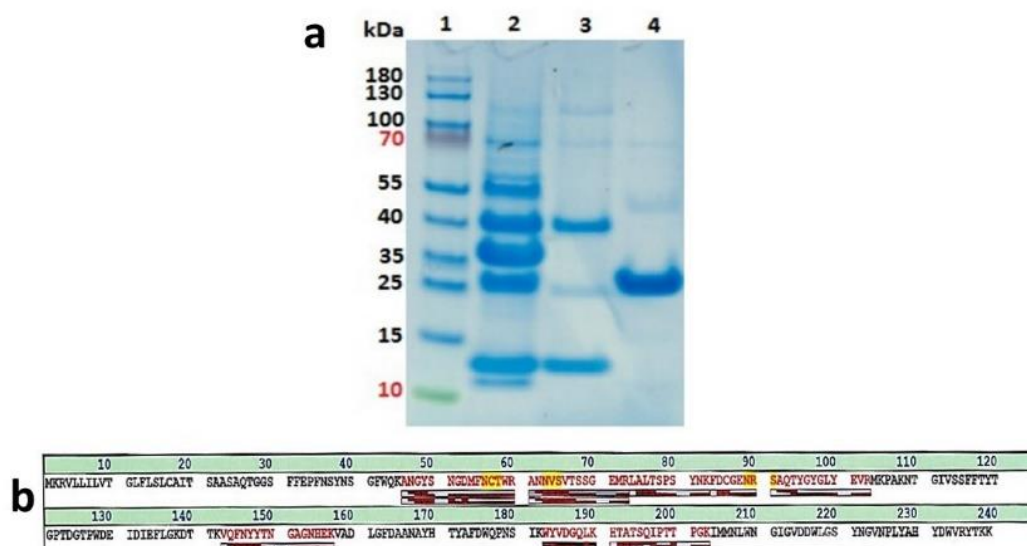


Figure 23 Purification et analyse LC-MS de la CelH1. **(a)** Analyse des étapes de purification par SDS-PAGE sur gel 12%. Piste 1 : Marqueurs de poids moléculaire. Piste 2 : Surnageant après ultrafiltration et dialyse. Piste 3 : protéines éluées de la colonne CM-sépharose pendant l'étape de lavage avec un tampon d'acétate de sodium 50 mM pH 5.0 (NaCl 0 mM). Piste 4 : Fractions contenant la CelH1 (26 kDa) éluées à 100 mM de NaCl. **(b)** Analyse de recherche MASCOT sur la base de données NCBI de séquences partielles d'acides aminés de la bande de 26 kDa. Les séquences de couleur rouge correspondent aux acides aminés correspondants à l'endo- β -1,3-1,4-glucanase homologue

4.10. Caractérisation physico-chimique de l'endo-1,4- β -glucanase

4.10.1. Effet du pH sur l'activité enzymatique

L'enzyme purifiée a montré une activité sur une large gamme de pH (de 5.0 à 8.0), avec un optimum entre pH 6.0 et 6.5 dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM (Figure 24a). Cette

valeur est supérieure au pH optimal pour la β -1,3-1,4-glucanase de *B. velezensis* ZJ20 (pH 5.0) (Xu et al., 2016), et légèrement supérieure à l'endoglucanase de *B. velezensis* A4 (pH 5.0-6.0) (Liu et al., 2018). L'activité de la CelH1 a enregistré une légère perte d'activité à pH 5.5, cependant, elle garde 85% de son activité, ainsi qu'à pH 7.0 (70%) et à 7.5 (50%). Ces résultats sont similaires à ceux d'autres travaux réalisés sur les endoglucanases des bactéries du genre *Bacillus*, où il a été constaté que l'optimal de l'activité enzymatique a été enregistré à pH 6.0 mais cette activité a été presque perdue à pH 6.5 (Akita et al., 2005; Sun et al., 2012; Huang et al., 2021). Par ailleurs, l'endo-1,4- β -glucanase commerciale de *B. amyloliquefaciens* est active de manière optimale à pH 6.0 (<https://www.megazyme.com/cellulase-endo-1-4-beta-d-glucanase-bacillus-amyoliquefaciens>).

4.10.2. Effet de la température sur l'activité de l'endo-1,4- β -glucanase

L'activité de l'enzyme purifiée sur le substrat β -glucane d'orge est testée sur une gamme de températures d'incubation allant de 30 à 90 °C, à pH 6.0. La figure 24b montre une progression de l'activité entre 30 et 65 °C, avec un optimum enregistré entre 60 et 65 °C, cette activité est similaire à celle obtenue, dans les mêmes conditions, par les cellulases des bactéries du genre *Bacillus* (Akita et al., 2005; Gaur et Tiwari, 2015), et supérieure à l'activité obtenue dans d'autres travaux (Hakamada et al., 2002; Gaur et Tiwari, 2015; Xu et al., 2016). Malgré la diminution progressive de l'activité avec l'augmentation de la température, l'enzyme H1 gardait encore 77% de son activité à 70 °C. Cette thermotolérance est particulièrement intéressante car, elle offre un avantage dans certains bioprocédés industriels qui nécessitent des températures élevées comme l'hydrolyse des matériaux lignocellulosiques.

4.10.3. Activité enzymatique résiduelle

L'incubation de la CelH1 dans les conditions optimales de pH (6.0) et de température (60 °C), avait pour but de tester la stabilité et la résistance de cette enzyme dans ces conditions. L'enzyme est apparue très robuste car, presque aucune activité n'est perdue après 48 h d'incubation à 60 °C (Figure 24c). De ce fait, il semble qu'elle est adaptée à une utilisation dans des processus industriels de longue durée. Sa robustesse est meilleure que celle de l'endoglucanase de *B. subtilis* qui a perdue 30% de son activité après 48 h d'incubation (Ibrahim et al., 2021).

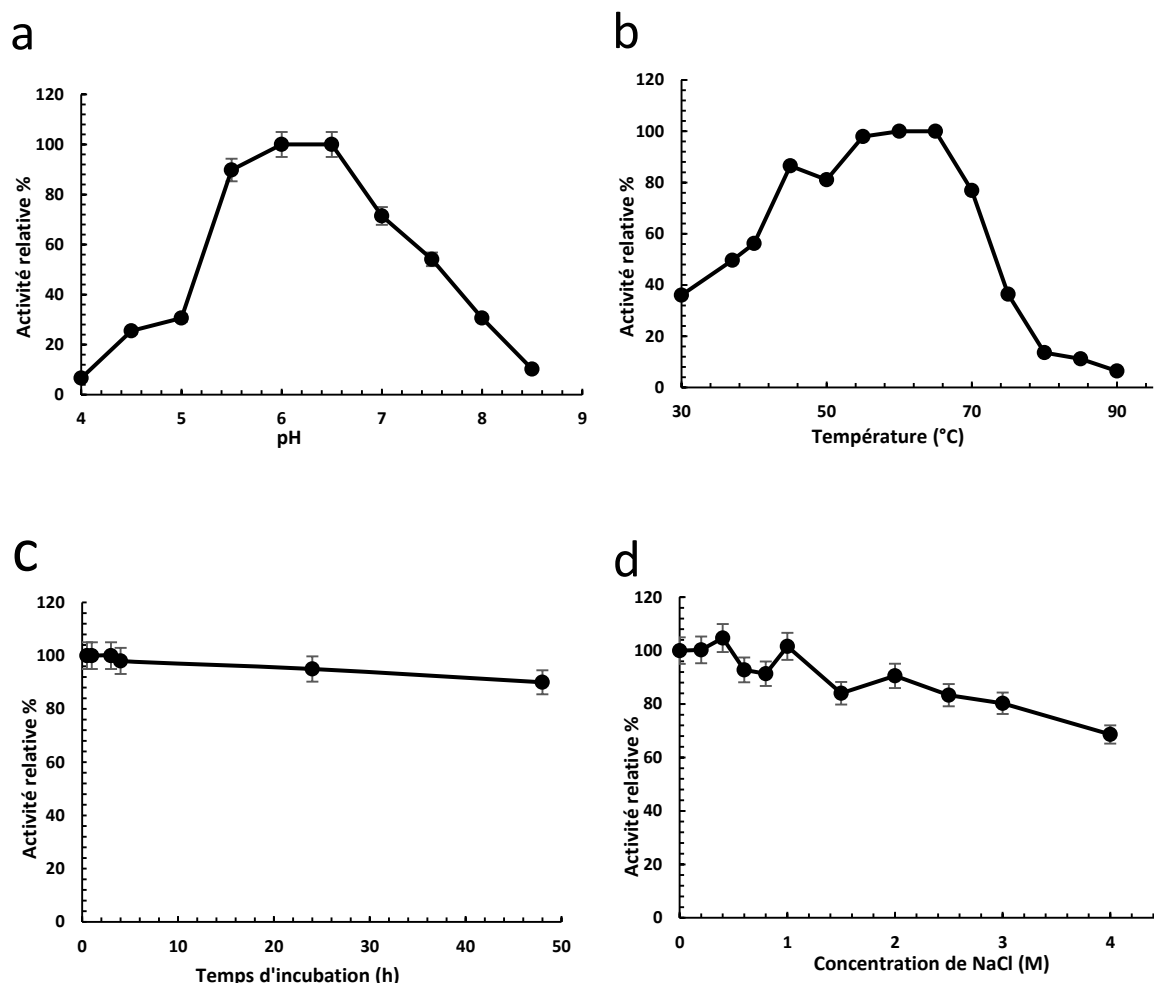


Figure 24 Caractérisation physico-chimique de la CelH1 sécrétée par *B. velezensis* H1. **(a)** Effet du pH sur l'activité enzymatique ; **(b)** Effet de de températures sur l'activité enzymatique ; **(c)** Activité enzymatique résiduelle **(d)** Effet du NaCl sur l'activité enzymatique. Dans les graphiques **(a)** et **(b)**, l'activité la plus élevée correspond à 100 %; dans le graphique **(c)** l'activité de la CelH1 non pré-incubée est prise comme 100%, dans le graphique **(c)**, l'activité en l'absence de NaCl est prise comme 100 %

4.10.4. Effet du NaCl sur l'activité enzymatique

L'effet de NaCl sur l'activité de la CelH1 est étudié comme décrit dans la section, matériel et méthodes. L'enzyme a conservé son activité sur une large gamme de concentrations de NaCl (de 0.2 à 4 M), indiquant son halotolérance. Comme le montre la figure 24d, l'activité enzymatique en présence de 4 M de NaCl demeure active en gardant 68.6% de son activité à 0 M de NaCl. Selon Xu et al. (2014), les endoglucanases dites halotolérantes montrent une activité dans les deux conditions, avec et sans NaCl, contrairement aux enzymes halophiles qui sont inactivées en l'absence de NaCl. L'halotolérance pourrait améliorer l'utilité industrielle de l'enzyme dans des conditions extrêmes (Trivedi et al., 2011). Différents microorganismes produisent des endoglucanases halotolérantes, notamment, les bactéries du genre *Bacillus* (dos Santos et al., 2018), ainsi que des souches fongiques tels que *Aspergillus fumigatus* (Gu et al., 2021). A notre connaissance, c'est la première fois qu'une endo-1,4- β -glucanase halotolérante

de faible masse moléculaire (26 kDa) est décrite chez les bactéries du groupe *B. subtilis*.

4.10.5. Etude de la spécificité de l'activité hydrolasique de l'endo-1,4- β -glucanase

L'activité de l'enzyme sur différents polysaccharides à savoir ; le lichénane, le β -glucane d'orge, la CMC, le LBG, le ρ -NPG et la MCC, est étudiée. Comme la montre le tableau 10, l'activité la plus élevée est obtenue avec le β -glucane d'orge (604.5 U/mL) et avec le lichénane (50% de l'activité avec le β -glucane d'orge), ce résultat indique la grande spécificité de cette enzyme pour les polysaccharides à liaisons β -1,3-1,4. Les enzymes avec une stricte préférence pour le β -glucane et le lichénane de l'orge comme substrat sont définies comme des endo-1,3-1,4- β -glucanases (ou lichénases) (Schimming et al., 1991; Planas 2000; Wang et al., 2007). Sun et al. (2012) ont expliqué que, la meilleure activité enzymatique sur le β -glucane d'orge par rapport au lichénane est due à la différence dans les proportions de liaisons β -1,4 à β -1,3 entre les deux substrats ; 3:1 dans le β -glucane d'orge et 2:1 dans le lichénane. Les endo-1,3-1,4- β -glucanases sont capables de cliver les liaisons β -1,4-glycosidiques dans une unité de glucopyranosyle à liaison mixte, libérant des bi-, tri- et tétrasaccharides comme produits finaux (Planas, 2000; Yoo et al., 2007). Aucune activité enzymatique n'est détectée sur le cellobiose, le cellotriose, le cellotétraose, le ρ -NPG et le LBG. Cependant, l'enzyme purifiée est, également, capable d'hydrolyser des substrats avec une liaison exclusivement β -1,4-glycosidique, tels que la CMC (30,76% d'activité sur le β -glucane d'orge) et la MCC (7,4%). Par conséquent, il est plus approprié de classer la CelH1 comme une endo-1,4- β glucanase, en raison de sa capacité à dégrader, à la fois, les polysaccharides avec un mélange de liaisons β -1,3-1,4 ainsi que ceux avec seulement la liaison β -1,4, contrairement à l'endo-1,3-1,4- β -glucanase (lichénase), qui agit sur une gamme très restreinte de substrats (Hrmova et Fincher, 2001; Boyce et Walsh, 2007). Ainsi, l'enzyme étudiée est la première endo-1,4- β -glucanase de faible masse moléculaire (26 kDa) produite par l'espèce de *B. velezensis*. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par Huang et al. (2021) qui a confirmé que la celA1805 (53 kDa) de *B. subtilis* B111 est une endo-1,4- β -glucanase et non une lichénase en raison de son activité la plus élevée sur le β -glucane d'orge, le lichénane, la CMC, le papier filtre, et l'Avicel. Par ailleurs, Hakamada et al. (2002) ont révélé que l'enzyme Egl-257 de *B. circulans* KSM-N257 était capable d'hydrolyser le lichénane et la CMC et est classée comme une véritable endo-1,4-glucanase, malgré sa similitude de 76.3% avec une lichénase de *B. circulans* WL-12. Il est opportun de signaler que la CelH1 obtenue dans cette étude est différente de l'endoglucanase obtenues dans d'autres études au moins pour deux considérations à savoir, le poids moléculaire et la nature du substrat spécifique. En effet, la présente enzyme (26 kDa) développe une activité maximale sur le β -

glucane d'orge or l'endoglucanase de *B. velezensis* A4 (55 kDa) est active spécifiquement sur la CMC, le papier filtre et l'avicel (Liu et al., 2018), et l'endoglucanase de *B. amyliquefaciens* DL-3 (54 kDa) dégrade tous les substrats testés dans notre étude, mais, avec une activité plus élevée sur la CMC (Yoo et al., 2007).

Tableau 10 Activité hydrolytique de la CelH1 sur différents polysaccharides

Substrat (0.5%, p/v)	Liaison (monomère)	Activité CelH1 (U/mL)	Activité relative (%)
β-glucan d'orge	β-1,3-1,4-(glucose)	604.5	100
Lichénane	β-1,3-1,4-(glucose)	301.8	50
CMC	β-1,4-(glucose)	185.94	30.76
MCC	β-1,4-(glucose)	44.73	7.4

4.11. Caractérisation biophysique de l'endo-1,4-β-glucanase

4.11.1. Balayage spectrophotométrique de l'endo-1,4-β-glucanase purifiée

Afin de confirmer la pureté de la CelH1 et d'examiner sa structure protéique tertiaire, un balayage d'absorbance UV-VIS est réalisé. La figure 25 montre le spectre d'absorption UV-VIS obtenu. Un seul pic à la longueur d'ondes de 280 nm est observé, ce qui confirme la présence d'une seule protéine (CelH1). Cette protéine semble être repliée, en sa structure tridimensionnelle, dans l'échantillon analysé (Ali et al., 2022). En effet, l'enzyme purifiée a montré un spectre typique de différentes cellulases qui absorbent à 280 (Liu et al., 2011).

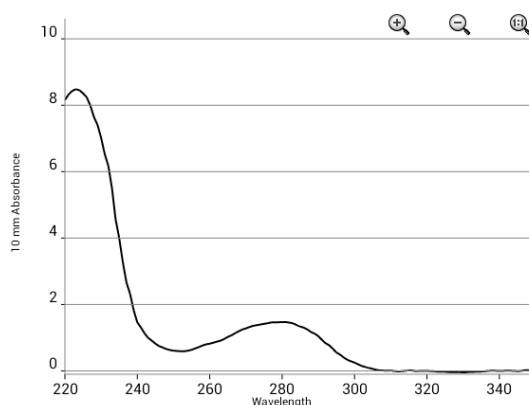


Figure 25 Spectres d'absorption UV-VIS de la CelH1 purifié, avec balayage de longueur d'onde de 220 à 350 nm.

4.11.2. Effet de NaCl sur la thermostabilité de l'endo-1,4-β-glucanase

L'effet du NaCl sur la stabilité thermique de la CelH1 est testé en mesurant sa température de fusion (T_m) à travers un test de thermostabilité des protéines par fluorescence. Les valeurs de T_m sont mesurées dans un tampon d'acétate de sodium 50 mM, pH 6.0, avec des concentrations croissantes de NaCl. En l'absence de NaCl, la T_m initiale était 60 °C (Figure 26a) et demeurait

stable jusqu'à 2 M où il est légèrement augmentée (T_m : 61.5 °C) avec l'augmentation de NaCl jusqu'à 2.5 M (Figure 26b). Ce résultat permet de suggérer que l'enzyme est stable et résistante à la dénaturation thermique en présence de fortes concentrations de sel. Il est conclu, en outre, que l'enzyme CelH1 de *B. velezensis* H1 est halotolérante. Il convient de rappeler que la T_m est un indice de la stabilité d'une protéine (Huyghues-Despointes et al., 2001), plus la T_m est élevée, plus la protéine est stable (Miotto et al., 2019).

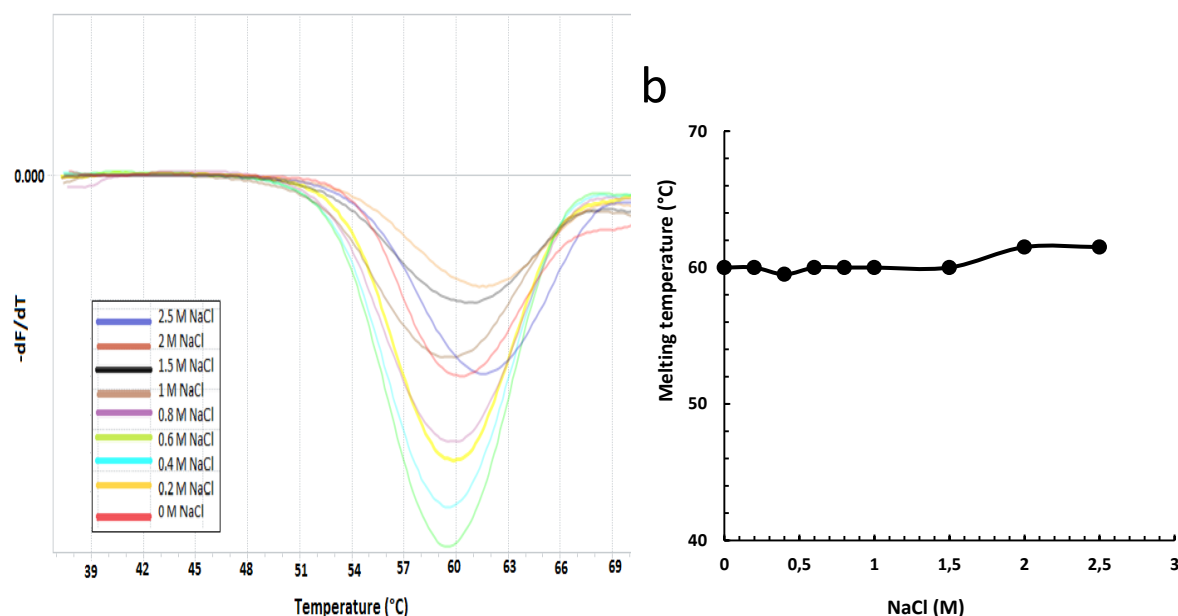


Figure 26 Etude de thermostabilité de la CelH1 par fluorescence **(a)** Les dérivées de l'émission de fluorescence en fonction de la température ($-dF/dT$) créées par le logiciel LightCycler, qui montrent un T_m de 60 °C sur la partie la plus basse de la courbe (le test est réalisé en triple exemplaire en présence de différentes concentrations de NaCl); **(b)** Les T_m de la CelH1 en présence de concentrations croissantes de NaCl (de 0 à 2,5 M).

4.12. Identification des produits de saccharification des polysaccharides par HPLC

L'hydrolyse du β -glucane d'orge et de GO sous l'action du cocktail enzymatique existant dans le surnageant de la culture de la bactérie sélectionnée a permis de libérer plusieurs oligosaccharides (Figure 27). Aussi, les produits obtenus de l'hydrolyse du β -glucane d'orge étaient, le fructose, le xylose, le saccharose, ainsi que certains cello-oligosaccharides tels que le glucose, le cellobiose, le cellotriose, et le cellotetraose (Figure 27a). Tandis que les produits obtenus de l'hydrolyse de GO étaient ; le glucose, le cellobiose, et le cellotriose, ainsi que le fructose (Figure 27b).

Une analyse HPLC des produits formés lors de l'hydrolyse des différents cello-oligosaccharides par la CelH1 purifiée est réalisée. L'enzyme n'a pas hydrolysée le cellobiose et le cellotriose,

ce qui indique que la CelH1 n'a pas une activité β -glucosidase qui peut hydrolyser les liaisons β -glucosidiques présentes dans les di-, et les trisaccharides pour libérer le glucose (Chen et al., 2019). L'enzyme n'a pas, aussi, hydrolysé le cellotetraose, cependant, une importante hydrolyse du cellopentaose est observée par la libération du cellobiose et du cellotriose (Figure 27c). L'absence de glucose indique que l'enzyme ne peut pas cliver un monosaccharide de l'extrémité d'une chaîne glucidique. Selon Zhang et al., (2009), la formation de di- et de trisaccharides lors de l'hydrolyse des pentoses peut résulter de la transglycosylation. Ces résultats confirment l'identité de la CelH1 en tant qu'endo-1,4- β -glucanase et non pas une β -glucosidase.

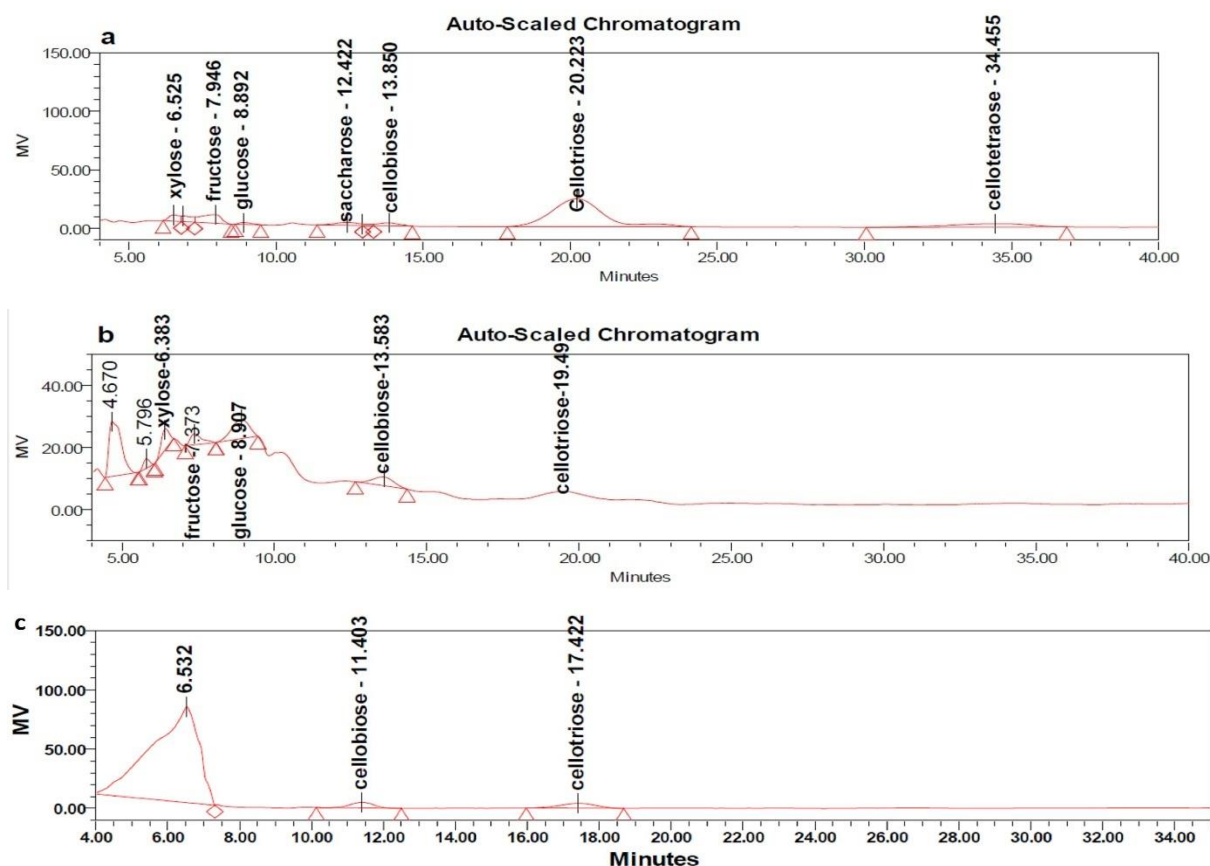


Figure 27 Analyse par HPLC des produits d'hydrolyse de différents polysaccharides par la CelH1 et par le surnageant de culture de *B. velezensis* H1 en GO. **(a)** Hydrolyse du β -glucane d'orge par le surnageant de culture. **(b)** Hydrolyse de GO par le surnageant de culture. **(c)** hydrolyse du cellopentaose par la CelH1 purifiée.

4.13. Etude de la cinétique enzymatique

Les paramètres cinétiques de la CelH1 sont tracés en utilisant la méthode de Lineweaver et Burk. Où l'azo- β -glucane d'orge a été utilisé comme substrat. Le graphique de Lineweaver-Burk représenté dans la figure 28 montre que les valeurs de K_m et de V_{max} sont 0.69 mg/mL et 625 μ mol/min/mL, respectivement. La faible valeur du K_m obtenue dans le présent travail, indique la grande affinité de la CelH1 avec le β -glucane d'orge. Cette valeur est inférieure à plusieurs

K_m des endoglucanases étudiées telles que la Cel12A de *Gloeophyllum trabeum* (3.2 ± 0.5 mg/mL) (Sun et al., 2012) et la Cel8Pa de *Paenibacillus xylanivorans* A59 (6.41 ± 0.93 mg/mL) (Ghio et al., 2020).

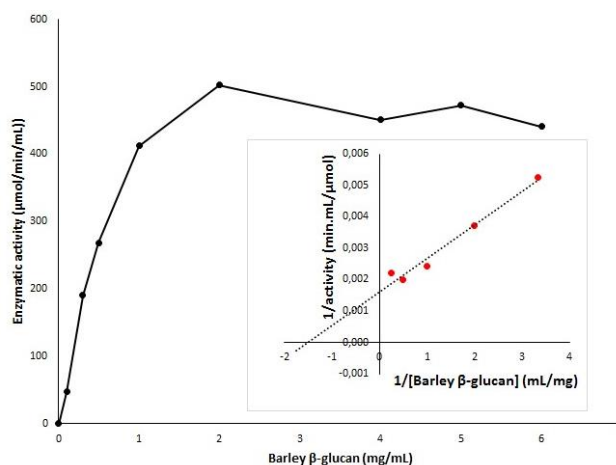


Figure 28 Activité de la CelH1 en fonction de différentes concentrations de β -glucane d'orge. Graphique inséré : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de l'influence de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel sur l'activité de la CelH1.

4.14. Purification partielle et concentration de lipopeptides

Comme cela a été décrit dans la partie « Matériel et Méthodes » les lipopeptides récupérés dans le filtrat issue de l'ultrafiltration du surnageant de culture de *B. velezensis* H1 sur GO sont purifiés et concentrés sur une colonne C18 et élués avec le méthanol avant de les analyser. Une absorption des longueurs d'onde UV-visible est réalisée avant et après la purification, les spectres représentés par la figure 29 (de 200 à 600 nm) montrent un pic maximal représentant les lipopeptides à 210 nm. La valeur d'absorbance de l'échantillon avant l'utilisation de la colonne C18 était à 25, après la purification et la concentration l'absorbance a augmenté quatre fois (100), indiquant l'efficacité du processus de purification utilisé dans cette étude. Plusieurs études ont confirmé l'efficacité de la méthode d'adsorption d'un mélange de lipopeptides par la colonne C18 et l'élution par le méthanol pour les purifier et les récupérer, en comparaison à d'autres méthodes telles que l'extraction par solvants et l'exclusion stérique (Rangarajan et Clarke, 2016). L'utilisation de la présente méthode a été empruntée par, Snook et al. (2009) pour l'isolement de la surfactine à partir du surnageant de culture de *Bacillus mojavensis*, et par Razafindralambo et al. (1993) pour retenir sélectivement l'iturine et la surfactine.

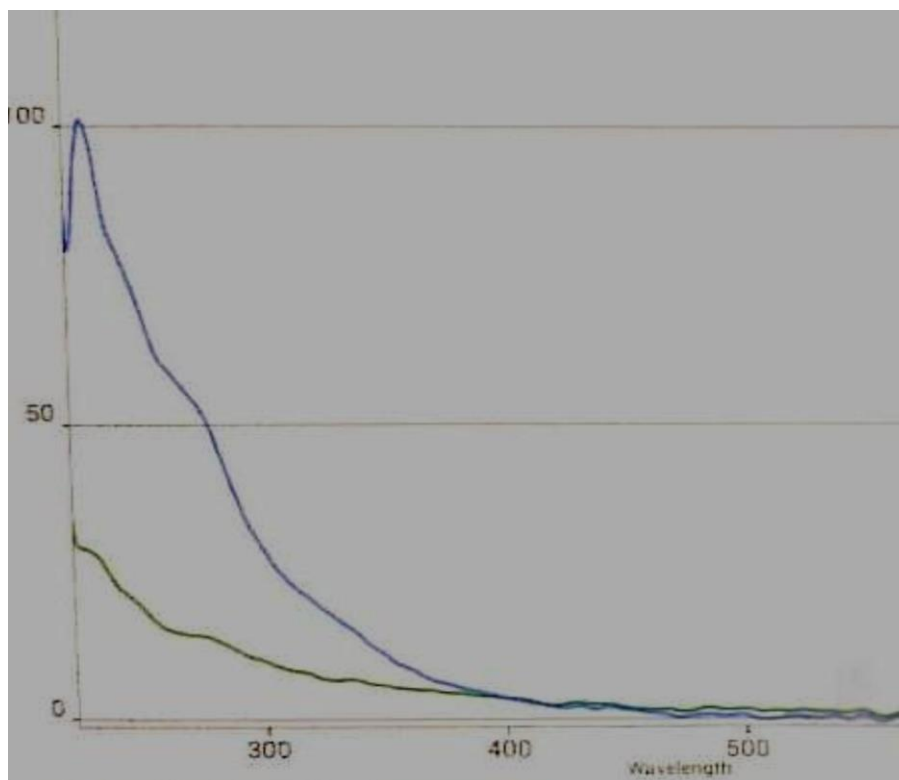


Figure 29 Spectre UV visible (210 nm) des lipopeptides synthétisés par *B. velezensis* H1 montrant l'absorbance de l'échantillon avant et après la purification et la concentration sur colonne C18

4.15. Identification de lipopeptides par HPLC

L'identification du mélange de lipopeptides, purifiés et concentrés, est réalisée par HPLC selon les conditions décrites précédemment (section Matériel et méthodes). L'analyse de la figure 30 montre que la souche de *B. velezensis* H1 a la capacité de produire la surfactine ainsi que la fengycine en utilisant les GO comme source de carbone. Deux principaux pics du correspondant à la surfactine standard (Figure 30a) sont détectés dans l'échantillon de lipopeptides concentrés (Figure 30b) pendant l'élution en mode isocratique. Aussi, l'élution en gradient a permis de détecter deux pics qui représentent la fengycine (Figure 30c et d). D'autres travaux ont pu produire ces deux lipopeptides en utilisant la bactérie *B. velezensis* HC6 (Liu et al., 2020) et l'étude de leur activité biologique a montré leur potentiel antimicrobien et leur capacité de réduire la production d'aflatoxine et d'ochratoxine par certains champignons. Dans une autre étude il a été révélé, qu'une surfactine produite par *B. velezensis* KLP2016 avait le potentiel de dégrader l'huile des moteurs (Meena et al., 2021). La nature des lipopeptides produits dans cette étude n'a pas été déterminée complètement car, plusieurs pics inconnus, qui ne correspondent pas aux deux standards injectés (surfactine et fengycine), sont détectés pendant l'analyse HPLC (Figure 16d). En effet, la bactérie *B. velezensis* est connue pour sa production de différents lipopeptides tel que l'iturine, la mycosubtilisine, la bacillomycine, la difficine et la macrolactine (Rabbee et Baek, 2020). En 2005, cette souche a été différenciée de *B. amyloliquefaciens* par

sa grande capacité à produire de quantités énormes de différents lipopeptides en présence ou en absence des inducteurs dans le milieu de culture (Ruiz-García et al., 2005; Liu et al., 2010). Il est à signaler que le présent travail a montré la capacité de la souche sélectionnée en l'occurrence *B. velezensis* H1 de produire simultanément ces lipopeptides en utilisant la biomasse lignocellulosique, non-prétraitée chimiquement, comme matière première et source d'énergie. Cette production simultanée est probablement liée à l'importante fraction lipidique composant les GO (12.13%), utilisée par la souche comme substrat hydrophobe et inducteur naturel de la production de lipopeptides. La teneur en huile pourrait donc être un facteur qui a amélioré la production de biosurfactant par la souche *B. velezensis* H1. Cette fraction lipidique est provenue fort probablement de l'huile résiduelle non extraite pendant le processus de broyage et d'essorage des olives. De ce fait, l'utilisation des GO comme substrat de production de lipopeptides s'avère économique et ami de l'environnement car, le processus utilise un déchet des huileries et qui peut être compétitif industriellement dans la production de lipopeptides. Le tableau 11 récapitule les différentes études réalisées sur l'utilisation de différents résidus pour la production de biosurfactants par différentes souches bactériennes.

Tableau 11 Différents résidus utilisés dans la production de biosurfactants par différents micro-organismes

Résidu	Microorganisme	Type de biosurfactant	Référence
Lactosérum	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2	Rhamnolipides	(Banat et al., 2014)
	<i>Bacillus</i> spp.	Lipopeptides	(Dubey et Juwarkar, 2001)
Mélasses	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GS3	Rhamnolipides	(Patel et Desai, 1997)
	<i>Bacillus</i> spp.	Lipopeptides	(Ndlovu et al., 2017)
	<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	Lipopeptides	(De Graeve et al., 2018; Liepins et al., 2021)
Effluents de transformation de pommes de terre et eaux usées de manioc	<i>Bacillus subtilis</i>	Lipopeptides	(Ndlovu et al., 2017)
Huile de friture	<i>Bacillus pseudomycoïdes</i> BS6	Lipopeptides	(Li et al., 2016)
Liqueur de maïs	<i>Candida lipolytica</i>	Glycolipides	(Diniz et al., 2014)
Jus de datte	<i>Bacillus mojavensis</i> BI2	Lipopeptides	(Mnif et al., 2021)
Résidus du papier	<i>Bacillus velezensis</i> ASN1	Lipopeptides	(Nair et al., 2020)
Sous-produits de plumes	<i>Bacillus velezensis</i> P45	Lipopeptides	(Da Rosa et al., 2022)

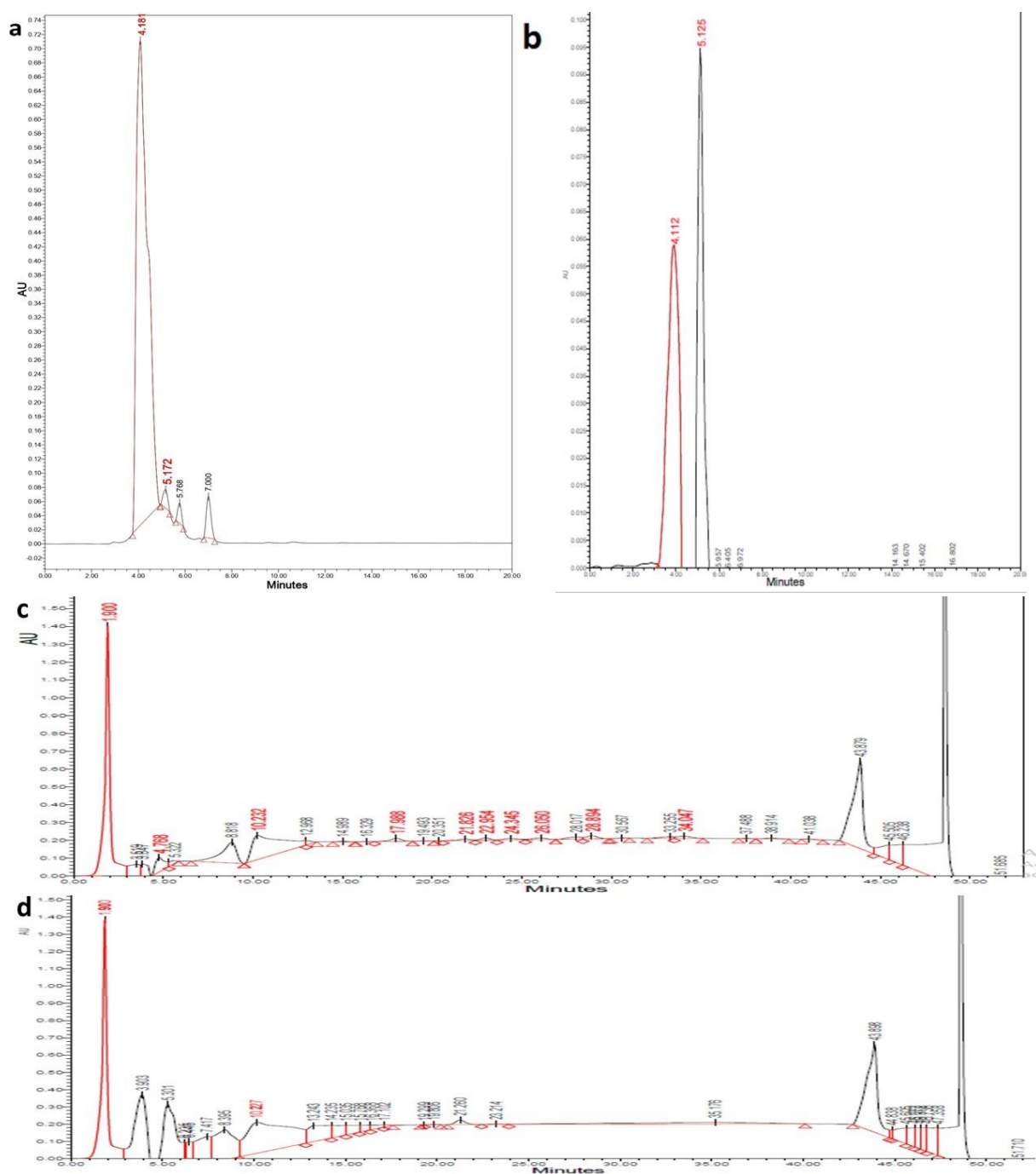


Figure 30 Chromatogramme HPLC des lipopeptides synthétisés par *B. velezensis* H1. **(a)** Standard de la surfactine à 1 mg/mL éluée en mode isocratique **(b)** Echantillon du mélange de lipopeptides purifiés et concentrés élués en mode isocratique (pics de surfactine détectés) **(c)** Standard de la fengycine à 1 mg/mL éluée en mode gradient **(d)** Echantillon du mélange de lipopeptides purifiés et concentrés élués en mode gradient (pics de fengycine détectés)

4.16. Potentiel biosurfactant : l'effondrement de la goutte (Drop Collapse)

Le résultat du « Drop Collapse test » effectué avec de l'huile d'olive et de paraffine dans une lame de verre a montré une réaction positive entre la goutte de l'extrait concentré de

RESULTATS ET DISCUSSION

lipopeptides tensioactifs et la surface des deux huiles testées, et ce, par l'aplatissement de la surface de l'huile (Figure 31). En une minute, un effondrement complet est observé en raison de la réduction de la tension superficielle entre la goutte de l'extrait de lipopeptides et la surface hydrophobe, tandis qu'avec l'échantillon qui ne contient pas de molécules biotensioactifs (l'eau), les gouttes sont restées stables (Nor et al., 2022). Ces résultats confirment l'efficacité du potentiel tensioactif (biosurfactant) et émulsifiant des lipopeptides produits dans cette étude. L'utilisation de mélange de lipopeptides comme agents dispersants et émulsifiants pourrait avoir un grand intérêt dans la bioremédiation (Barakat et al., 2017).

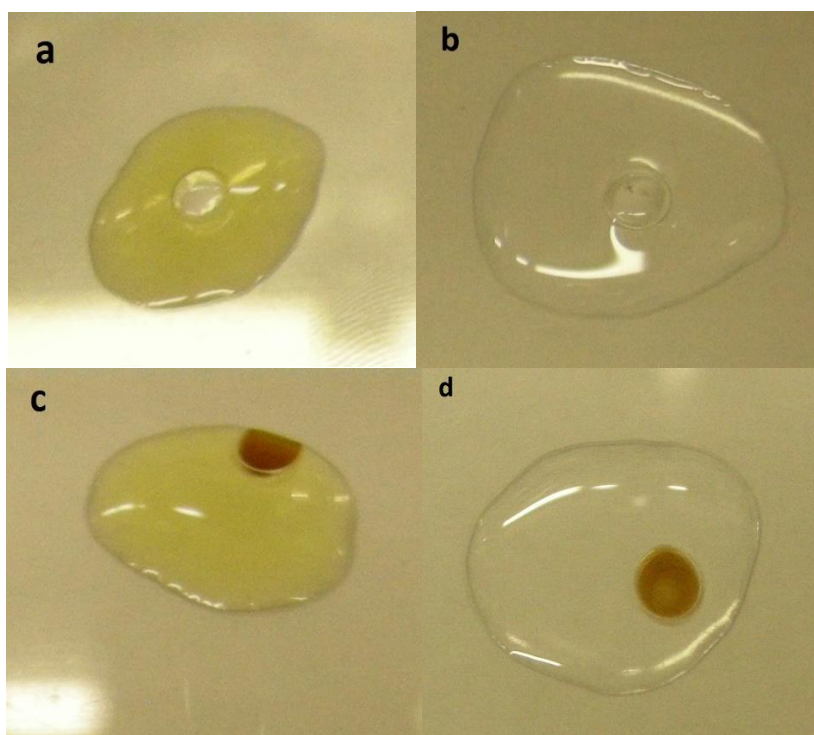


Figure 31 Test qualitatif d'effondrement des gouttes (Drop Collapse test) en utilisant l'échantillon de lipopeptides extraits et concentrés : **(a)** Témoin (eau) sur l'huile d'olive (goutte stable) **(b)** Témoin (eau) sur l'huile de paraffine **(c)** Extrait de lipopeptides sur l'huile d'olive (goutte effondrée) **(d)** Extrait de lipopeptides sur l'huile de paraffine (goutte effondrée)

Conclusion et perspectives

5. Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail consiste en l'isolement, à partir d'un milieu extrême, des bactéries susceptibles d'hydrolyser la biomasse lignocellulosique, principalement, la fraction cellulosique. Pour ce faire, les grignons d'olives (GO), ont servi comme substrat de sélection et de production d'une cellulase. En effet, les 43 isolats bactériens criblés pour leur capacité à dégrader la carboxyméthyl-cellulose, utilisés comme substrat cellulosique synthétique, sont obtenus d'un écosystème extrême en l'occurrence le lac salé d'El M'Ghair et son enfouissement immédiat. Il est conclu, de cet isolement, que les milieux salins sont une source importante pour le criblage de bactéries d'utilité biotechnologique. En conséquence, l'isolat le plus performant H1, identifiée comme étant *Bacillus velezensis* est obtenu à partir du sol d'une palmeraie située à proximité du lac salé. Cette souche a été sélectionnée pour sa résistance comme étant thermotolérante et halotolérante et pour sa capacité à produire des métabolites primaires et secondaires résistants et robustes contre diverses conditions environnementales extrêmes tel que ; la salinité et la chaleur.

Les grignons d'olives (GO) ont été utilisés comme substrat lignocellulosique dans cette étude. La composition chimique de ce substrat a révélé qu'il est plus riche en cellulose suivi d'hémicellulose et en lignine cependant, sa teneur en azote. De ce fait, il a été conclu que l'utilisation de GO comme milieu de fermentation a nécessité sa supplémentation en source d'azote. Durant la fermentation submergée, il a été conclu que la bactérie sélectionnée *Bacillus velezensis* H1 a la capacité de dégrader la biomasse lignocellulosique grâce à la sécrétion d'une endo-1,4- β -glucanase (CelH1) et d'autres glycosides hydrolases, ainsi que la production des lipopeptide à activité émulsifiante. Il a, en effet, été confirmé qu'il y a un important coefficient de corrélation polynomiale entre ces deux bio-composés ce qui signifie leur co-production.

La disponibilité de grignons d'olives en Algérie, en tant que pays producteur d'huile d'olive, procure à ce substrat un intérêt grandissant au niveau local, pour leur valorisation dans la production à bon prix des métabolites d'intérêt en utilisant la bactérie sélectionnée.

Dans le but de caractériser les deux biomolécules produites par *Bacillus velezensis* H1 ; la CelH1 et le mélange de lipopeptides ont été purifiés. Les méthodes appliquées pour cette purification s'avèrent très efficaces permettant de récupérer l'enzyme CelH1 avec un grand rendement. L'enzyme purifiée est active dans une large gamme de pH, de températures et de concentrations de NaCl, montrant des caractéristiques de tolérance et de stabilité thermique, d'halotolérance et de pouvoir saccharifiant. De ce fait, elle est apparue comme une enzyme précieuse pour des utilisations industrielles et biotechnologiques, notamment dans la

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

saccharification de la biomasse lignocellulosique pour libérer les sucres fermentescibles nécessaires à la production de lipopeptides. Ces derniers ont été partiellement purifiés et leur identification par HPLC a confirmé que la souche *B. velezensis* H1 a la capacité de produire une surfactine et une fengycine. Plusieurs d'autres pics inconnus ont été détectés dans les chromatogrammes indiquant la probabilité de présence d'autres lipopeptides. Le test de « Drop Collapse » a confirmé le potentiel biosurfactant et tensioactif de ce mélange lipopeptidique, en utilisant deux huiles (l'huile de paraffine et l'huile d'olive). Il a été conclu que ces lipopeptides pourraient constituer une alternative intéressante aux surfactants synthétiques, et leur utilisation mérite une plus grande attention en tant qu'agents bio-émulsifiants et tensioactifs notamment dans le domaine de la bioremédiation (traitement des contaminants huileux, et hydrocarbures) et de l'industrie de bio-détergents.

Les résultats obtenus dans cette étude sont pertinents car, ils montrent qu'en un seul bioprocédé une production simultanée de deux biocomposés aux larges applications industrielles (endo-1,4- β -glucanase et lipopeptides) a été obtenue par l'ensemencement de la bactérie sélectionnée sur un milieu de fermentation à base de grignons d'olives.

Les résultats obtenus dans cette recherche sont plus que concluants et promoteurs, cependant, certaines observations constatées peuvent constituer des points de départ pour d'autres recherches pour aller au terme de cette thématique :

- 1- Compréhension du mécanisme d'interaction CelH1-lipopeptides afin d'élucider le rôle des lipopeptides dans la stabilité de la CelH1 et dans la biodégradation de la cellulose ;
- 2- Production de la bactérie sélectionnée en *scaling-up* et l'obtention de la biomasse bactérienne à grande échelle ;
- 3- Utilisation de la bactérie comme agent de bioremédiation pour l'élimination de contaminants huileux comme le diesel et l'huile des moteurs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdelli, Faten, Rigane Ghayth, Ridha Salem, Arbi Mahdi, Aifa Sami, et Slim Cherif. 2019. « Use of Surfactants and Biosurfactants in Oil Recovery Processing and Cellulose Hydrolysis ». 6:1114-18.
- Afzal, Muhammad, Muhammad Qureshi, Shabbir Ahmed, Muhammad Khan, Humna Ikram, Asma Ashraf, et Naveeda Qureshi. 2019. « INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY Production, Purification and Optimization of Cellulase by *Bacillus licheniformis* HI-08 Isolated from the Hindgut of Wood-feeding Termite ». *International Journal of Agriculture and Biology* 00:000-000. doi: 10.17957/IJAB/15.0872.
- Agblevor, F. A., S. Besler, et A. E. Wiselogle. 2002. « Fast Pyrolysis of Stored Biomass Feedstocks ». *ACS Publications*. Consulté 5 novembre 2022 (<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ef00052a010>).
- Agrawal, Ruchi, Alok Satlewal, Manali Kapoor, Sujit Mondal, et Biswajit Basu. 2017. « Investigating the Enzyme-Lignin Binding with Surfactants for Improved Saccharification of Pilot Scale Pretreated Wheat Straw ». *Bioresource Technology* 224:411-18. doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.026.
- AIE, International Energy Agency, World Energy Outlook 2015, Executive summary. Paris, Francia.http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WEB_WorldEnergyOutlook2015ExecutiveSummaryEnglishFinal.pdf
- Akbi, Amine, Meryem Saber, Majda Aziza, et Noureddine Yassaa. 2017. « An Overview of Sustainable Bioenergy Potential in Algeria ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 72:240-45. doi: 10.1016/j.rser.2017.01.072.
- Akita, Masatake, Kinya Kayatama, Yuji Hatada, Susumu Ito, et Koki Horikoshi. 2005. « A Novel β -Glucanase Gene from *Bacillus Halodurans* C-125 ». *FEMS Microbiology Letters* 248(1):9-15. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.009.
- Alfenore, Sandrine, et Carole Molina-Jouve. 2016. « De la conversion microbienne des ressources lignocellulosiques pour la production de molécules énergétiques : verrous et perspectives ».
- Ali, Nabeel, Ayesha Aiman, Anas Shamsi, Imtaiyaz Hassan, Mohammad Shahid, Naseem A. Gaur, et Asimul Islam. 2022. « Identification of Thermostable Xylose Reductase from *Thermothelomyces thermophilus*: A Biochemical Characterization Approach to Meet Biofuel Challenges ». *ACS Omega* 7(48):44241-50. doi: 10.1021/acsomega.2c05690.
- Alokika, Anu, Anil Kumar, Vinod Kumar, et Bijender Singh. 2021. « Cellulosic and Hemicellulosic Fractions of Sugarcane Bagasse: Potential, Challenges and Future Perspective ». *International Journal of Biological Macromolecules* 169:564-82. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.175.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amoozegar, Mohammad Ali, Atefeh Safarpour, Kambiz Akbari Noghabi, Tala Bakhtiary, et Antonio Ventosa. 2019. « Halophiles and Their Vast Potential in Biofuel Production ». *Frontiers in Microbiology* 10.
- Andersen, J. K., A. Boldrin, T. H. Christensen, et C. Scheutz. 2010. « Greenhouse Gas Emissions from Home Composting of Organic Household Waste ». *Waste Management* 30(12):2475-82. doi: 10.1016/j.wasman.2010.07.004.
- Andiappan, Viknesh, Bing Shen How, et Sue Lin Ngan. 2021. « A Perspective on Post-Pandemic Biomass Supply Chains: Opportunities and Challenges for the New Norm ». *Process Integration and Optimization for Sustainability* 5(4):1003-10. doi: 10.1007/s41660-021-00176-5.
- Ramawat, K.G. 2007. *Factors Affecting the Production of Secondary Metabolites*. CRC Press.
- Singh, A.K., Sharma, Prakriti. 2020. « Disinfectant-like Activity of Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Bacillus Tequilensis* Strain SDS21 ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 185:110514. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110514.
- Anwar, Zahid, Muhammad Gulfray, et Muhammad Irshad. 2014. « Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review ». *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2):163-73. doi: 10.1016/j.jrras.2014.02.003.
- Banat, Ibrahim M., Surekha K. Satpute, Swaranjit S. Cameotra, Rajendra Patil, et Narendra V. Nyayanit. 2014. « Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production ». *Frontiers in Microbiology* 5.
- Barakat, Khoulood M., Sahar W. M. Hassan, et Osama M. Darwesh. 2017. « Biosurfactant Production by Haloalkaliphilic *Bacillus* Strains Isolated from Red Sea, Egypt ». *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 43(3):205-11. doi: 10.1016/j.ejar.2017.09.001.
- Barzkar, Noora, et Muhammad Sohail. 2020. « An Overview on Marine Cellulolytic Enzymes and Their Potential Applications ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(16):6873-92. doi: 10.1007/s00253-020-10692-y.
- Bayer, Edward A., Raphael Lamed, et Michael E. Himmel. 2007. « The Potential of Cellulases and Cellulosomes for Cellulosic Waste Management ». *Current Opinion in Biotechnology* 18(3):237-45. doi: 10.1016/j.copbio.2007.04.004.
- Beaton, Danielle, Phillip Pelletier, et Richard R. Goulet. 2019. « Microbial Degradation of Cellulosic Material and Gas Generation: Implications for the Management of Low- and Intermediate-Level Radioactive Waste ». *Frontiers in Microbiology* 10.
- Behera, B. C., B. K. Sethi, R. R. Mishra, S. K. Dutta, et H. N. Thatoi. 2017. « Microbial Cellulases – Diversity & Biotechnology with Reference to Mangrove Environment: A

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Review ». *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15(1):197-210. doi: 10.1016/j.jgeb.2016.12.001.
- Bentsen, N. S., et C. Felby. 2010. « Technical Potentials of Biomass for Energy Services from Current Agriculture and Forestry in Selected Countries in Europe, the Americas and Asia. » *Forest & Landscape Working Papers* (No.55).
- Berglund, Jennie, Deirdre Mikkelsen, Bernadine M. Flanagan, Sushil Dhital, Stefan Gaunitz, Gunnar Henriksson, Mikael E. Lindström, Gleb E. Yakubov, Michael J. Gidley, et Francisco Vilaplana. 2020. « Wood Hemicelluloses Exert Distinct Biomechanical Contributions to Cellulose Fibrillar Networks ». *Nature Communications* 11(1):4692. doi: 10.1038/s41467-020-18390-z.
- Bhardwaj, Garima, Swaranjit Singh Cameotra, et Harish Kumar Chopra. 2016. « Biosurfactant from *Lysinibacillus Chungkukjangi* from Rice Bran Oil Sludge and Potential Applications ». *Journal of Surfactants and Detergents* 19(5):957-65. doi: 10.1007/s11743-016-1857-0.
- Bhayani, Jaina A., et Miguel A. Ballicora. 2022. « Determination of Dissociation Constants of Protein Ligands by Thermal Shift Assay ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 590:1-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.041.
- Bielski, Stanisław, Renata Marks-Bielska, Anna Zielińska-Chmielewska, Kęstutis Romaneckas, et Egidijus Šarauskis. 2021. « Importance of Agriculture in Creating Energy Security—A Case Study of Poland ». *Energies* 14(9):2465. doi: 10.3390/en14092465.
- Bonmatin, Jean-Marc, Olivier Laprevote, et Francoise Peypoux. 2003. « Diversity Among Microbial Cyclic Lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to Design New Bioactive Agents ». *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 6(6):541-56. doi: 10.2174/138620703106298716.
- Boyce, A., et G. Walsh. 2007. « Production, Purification and Application-Relevant Characterisation of an Endo-1,3(4)-Beta-Glucanase from *Rhizomucor Miehei* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(4):835-41. doi: 10.1007/s00253-007-1058-x.
- Bradford, Marion M. 1976. « A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding ». *Analytical Biochemistry* 7.
- Buraimoh, Olanike M., Matthew O. Ilori, Olukayode O. Amund, Frederick C. Michel, et Sukhbir K. Grewal. 2015. « Assessment of Bacterial Degradation of Lignocellulosic Residues (Sawdust) in a Tropical Estuarine Microcosm Using Improvised Floating Raft Equipment ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 104:186-93. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.06.010.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Buratti, C., S. Mousavi, M. Barbanera, E. Lascaro, F. Cotana, et M. Bufacchi. 2016. « Thermal Behaviour and Kinetic Study of the Olive Oil Production Chain Residues and Their Mixtures during Co-Combustion ». *Bioresource Technology* 214:266-75. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.097.
- Cavicchioli, R., T. Charlton, H. Ertan, S. Mohd Omar, K. S. Siddiqui, et T. J. Williams. 2011. « Biotechnological Uses of Enzymes from Psychrophiles ». *Microbial Biotechnology* 4(4):449-60. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00258.x.
- Champougny, Lorène. 2015. « Génération et rupture de films liquides minces ». phdthesis, Université Paris Saclay (COMUE).
- Chen, Chun-Hsu, Jyun-Yu Yao, Barbara Yang, Hsiao-Lin Lee, Shuo-Fu Yuan, Han-Yu Hsieh, et Po-Huang Liang. 2019. « Engineer Multi-Functional Cellulase/Xylanase/ β -Glucosidase with Improved Efficacy to Degrade Rice Straw ». *Bioresource Technology Reports* 5:170-77. doi: 10.1016/j.biteb.2019.01.008.
- Chen, Long, Wei Gu, Hai-yan Xu, Gui-Lian Yang, Xiao-Feng Shan, Guang Chen, Yuan-huan Kang, Chun-Feng Wang, et Ai-Dong Qian. 2018. « Comparative Genome Analysis of *Bacillus Velezensis* Reveals a Potential for Degrading Lignocellulosic Biomass ». 3 *Biotech* 8(5):253. doi: 10.1007/s13205-018-1270-7.
- Chen, Long, Wei Gu, Hai-yan Xu, Gui-Lian Yang, Xiao-Feng Shan, Guang Chen, Chun-Feng Wang, et Ai-Dong Qian. 2018. « Complete Genome Sequence of *Bacillus Velezensis* 157 Isolated from *Eucommia Ulmoides* with Pathogenic Bacteria Inhibiting and Lignocellulolytic Enzymes Production by SSF ». 3 *Biotech* 8(2):114. doi: 10.1007/s13205-018-1125-2.
- Chi, Zhenming, Fang Wang, Zhe Chi, Lixi Yue, Guanglei Liu, et Tong Zhang. 2009. « Bioproducts from *Aureobasidium Pullulans*, a Biotechnologically Important Yeast ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(5):793-804. doi: 10.1007/s00253-009-1882-2.
- Chouchene, Ajmia. 2010. « Etude expérimentale et théorique de procédés de valorisation de sous-produits oléicoles par voies thermique et physico-chimique ». phdthesis, Université de Haute Alsace - Mulhouse.
- Chowdhury, Reaz A., Shane X. Peng, et Jeffrey Youngblood. 2017. « Improved Order Parameter (Alignment) Determination in Cellulose Nanocrystal (CNC) Films by a Simple Optical Birefringence Method ». *Cellulose* 24(5):1957-70. doi: 10.1007/s10570-017-1250-9.
- Christoforou, Elias, et Paris A. Fokaides. 2016. « A Review of Olive Mill Solid Wastes to Energy Utilization Techniques ». *Waste Management* 49:346-63. doi: 10.1016/j.wasman.2016.01.012.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chukwuma, Ogechukwu Bose, Mohd Rafatullah, Husnul Azan Tajarudin, et Norli Ismail. 2021. « A Review on Bacterial Contribution to Lignocellulose Breakdown into Useful Bio-Products ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(11):6001. doi: 10.3390/ijerph18116001.
- Cimpmperman, Piotras, Lina Baranauskiene, Simona Jachimoviciūte, Jelena Jachno, Jolanta Torresan, Vilma Michailoviene, Jurgita Matulienė, Jolanta Sereikaite, Vladas Bumelis, et Daumantas Matulis. 2008. « A Quantitative Model of Thermal Stabilization and Destabilization of Proteins by Ligands ». *Biophysical journal* 95:3222-31. doi: 10.1529/biophysj.108.134973.
- Cobucci-Ponzano, Beatrice, Andrea Strazzulli, Roberta Iacono, Giuseppe Masturzo, Rosa Giglio, Mosè Rossi, et Marco Moracci. 2015. « Novel Thermophilic Hemicellulases for the Conversion of Lignocellulose for Second Generation Biorefineries ». *Enzyme and Microbial Technology* 78:63-73. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.014.
- Couturier, Marie, et Jean-Guy Berrin. 2013. « The Saccharification Step: The Main Enzymatic Components ». P. 93-110 in *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*, édité par V. Faraco. Berlin, Heidelberg: Springer.
- da Rosa, Carolini Esmeriz, Cristian Mauricio Barreto Pinilla, Paolo Stincone, Jamile Queiroz Pereira, Ana Paula Muterle Varela, Fabiana Quoos Mayer, et Adriano Brandelli. 2022. « Genomic Characterization and Production of Antimicrobial Lipopeptides by *Bacillus Velezensis* P45 Growing on Feather By-Products ». *Journal of Applied Microbiology* 132(3):2067-79. doi: 10.1111/jam.15363.
- Dale, B. E., C. K. Leong, T. K. Pham, V. M. Esquivel, I. Rios, et V. M. Latimer. 1996. « Hydrolysis of Lignocellulosics at Low Enzyme Levels: Application of the AFEX Process ». *Bioresource Technology* 56(1):111-16. doi: 10.1016/0960-8524(95)00183-2.
- Dalmaso, Gabriel Zamith Leal, Davis Ferreira, et Alane Beatriz Vermelho. 2015. « Marine Extremophiles: A Source of Hydrolases for Biotechnological Applications ». *Marine Drugs* 13(4):1925-65. doi: 10.3390/md13041925.
- Danson, Michael J., et David W. Hough. 1997. « The Structural Basis of Protein Halophilicity ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 117(3):307-12. doi: 10.1016/S0300-9629(96)00268-X.
- Dar, Mudasir A., Kiran D. Pawar, Bharati P. Rajput, Praveen Rahi, et Radhakrishna S. Pandit. 2019. « Purification of a Cellulase from Cellulolytic Gut Bacterium, *Bacillus Tequilensis* G9 and Its Evaluation for Valorization of Agro-Wastes into Added Value Byproducts ». *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 20:101219. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101219.
- Datta, Supratim, Bradley Holmes, Joshua I. Park, Zhiwei Chen, Dean C. Dibble, Masood Hadi, Harvey W. Blanch, Blake A. Simmons, et Rajat Sapra. 2010. « Ionic Liquid Tolerant

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hyperthermophilic Cellulases for Biomass Pretreatment and Hydrolysis ». *Green Chemistry* 12(2):338-45. doi: 10.1039/B916564A.
- Dawood, Aneesa, et Kesen Ma. 2020. « Applications of Microbial β -Mannanases ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:598630. doi: 10.3389/fbioe.2020.598630.
- De Graeve, Marilyn, Sofie L. De Maeseneire, Sophie L. K. W. Roelants, et Wim Soetaert. 2018. « *Starmerella bombicola*, an industrially relevant, yet fundamentally underexplored yeast ». *FEMS Yeast Research* 18(7):foy072. doi: 10.1093/femsyr/foy072.
- de Oliveira Schmidt, Vanessa Kristine, Jackelyne de Souza Carvalho, Débora de Oliveira, et Cristiano José de Andrade. 2021. « Biosurfactant Inducers for Enhanced Production of Surfactin and Rhamnolipids: An Overview ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37(2):21. doi: 10.1007/s11274-020-02970-8.
- Deleu, M., H. Razafindralambo, Y. Popineau, P. Jacques, P. Thonart, et M. Paquot. 1999. « Interfacial and Emulsifying Properties of Lipopeptides from *Bacillus Subtilis* ». *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 152(1):3-10. doi: 10.1016/S0927-7757(98)00627-X.
- Deleu, Magali, et Michel Paquot. 2004. « From Renewable Vegetables Resources to Microorganisms: New Trends in Surfactants ». *Comptes Rendus Chimie* 7(6):641-46. doi: 10.1016/j.crci.2004.04.002.
- Delgado-García, Mariana, Blanca Valdivia-Urdiales, Cristóbal Noe Aguilar-González, Juan Carlos Contreras-Esquivel, et Raúl Rodríguez-Herrera. 2012. « Halophilic Hydrolases as a New Tool for the Biotechnological Industries ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(13):2575-80. doi: 10.1002/jsfa.5860.
- Demirbas, Ayhan. 2009. « Agricultural Based Activated Carbons for the Removal of Dyes from Aqueous Solutions: A Review ». *Journal of Hazardous Materials* 167(1):1-9. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.12.114.
- Demirjian, David C., Francisco Morís-Varas, et Constance S. Cassidy. 2001. « Enzymes from Extremophiles ». *Current Opinion in Chemical Biology* 5(2):144-51. doi: 10.1016/S1367-5931(00)00183-6.
- Dermeche, S., M. Nadour, C. Larroche, F. Moulti-Mati, et P. Michaud. 2013. « Olive Mill Wastes: Biochemical Characterizations and Valorization Strategies ». *Process Biochemistry* 48(10):1532-52. doi: 10.1016/j.procbio.2013.07.010.
- Deshavath, Narendra Naik, Venkata Dasu Veeranki, et Vaibhav V. Goud. 2019. « Chapter 1 - Lignocellulosic Feedstocks for the Production of Bioethanol: Availability, Structure, and Composition ». P. 1-19 in *Sustainable Bioenergy*, édité par M. Rai et A. P. Ingle. Elsevier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Di Blasi, Colomba, Gabriella Signorelli, Carlo Di Russo, et Gennaro Rea. 1999. « Product Distribution from Pyrolysis of Wood and Agricultural Residues ». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 38(6):2216-24. doi: 10.1021/ie980711u.
- Diniz Rufino, Raquel, Juliana Moura de Luna, Galba Maria de Campos Takaki, et Leonie Asfora Sarubbo. 2014. « Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 ». *Electronic Journal of Biotechnology* 17(1):6-6.
- dos Santos, Yago Queiroz, Bruno Oliveira de Veras, Anderson Felipe Jacome de Franca, Krystyna Gorlach-Lira, Jannaina Velasques, Ludovico Migliolo, et Elizeu Antunes dos Santos. 2018. « A New Salt-Tolerant Thermostable Cellulase from a Marine *Bacillus* Sp. Strain ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(7):1078-85. doi: 10.4014/jmb.1802.02037.
- Dotsenko, Gleb, et Lene Lange. 2017. « Enzyme Enhanced Protein Recovery from Green Biomass Pulp ». *Waste and Biomass Valorization* 8(4):1257-64. doi: 10.1007/s12649-016-9718-7.
- Dubey, Kirti, et Asha Juwarkar. 2001. « Distillery and Curd Whey Wastes as Viable Alternative Sources for Biosurfactant Production ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17(1):61-69. doi: 10.1023/A:1016606509385.
- Ducom, Gaëlle, Mathieu Gautier, Matteo Pietraccini, Jean-Philippe Tagutchou, David Lebouil, Nathalie Dumont, et Rémy Gourdon. 2019. « Caractérisation de grignons d'olives en vue d'une valorisation thermochimique par gazéification ». *Déchets Sciences et Techniques* 82:41-54. doi: 10.4267/dechets-sciences-techniques.4227.
- Ducom, Gaëlle, Mathieu Gautier, Matteo Pietraccini, Jean-Philippe Tagutchou, David Lebouil, Nathalie Dumont, et Rémy Gourdon. 2019. « Caractérisation de grignons d'olives en vue d'une valorisation thermochimique par gazéification ». *Déchets Sciences et Techniques* 82:41-54. doi: 10.4267/dechets-sciences-techniques.4227.
- Dumon, Claire, Letian Song, Sophie Bozonnet, Régis Fauré, et Michael J. O'Donohue. 2012. « Progress and Future Prospects for Pentose-Specific Biocatalysts in Biorefining ». *Process Biochemistry* 47(3):346-57. doi: 10.1016/j.procbio.2011.06.017.
- Dzięgielewska, Ewelina, et Marek Adamczak. 2013. « Evaluation of Waste Products in the Synthesis of Surfactants by Yeasts ». *Chemical Papers* 67(9):1113-22. doi: 10.2478/s11696-013-0349-1.
- FAO, 2002. FAOSTAT. URL <https://www.fao.org/documents/card/en/c/Y6000EN> .
- Fengel, Dietrich, et Gerd Wegener. 2011. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, et P. Jurtshuk. 1992. « How Close Is Close: 16S RRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient to Guarantee Species Identity ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(1):166-70. doi: 10.1099/00207713-42-1-166.
- Franzmann, P. D., C. M. Haddad, R. B. Hawkes, W. J. Robertson, et J. J. Plumb. 2005. « Effects of Temperature on the Rates of Iron and Sulfur Oxidation by Selected Bioleaching Bacteria and Archaea: Application of the Ratkowsky Equation ». *Minerals Engineering* 18(13):1304-14. doi: 10.1016/j.mineng.2005.04.006.
- Gabani, Prashant, Erin Copeland, Anuj K. Chandel, et Om V. Singh. 2012. « Ultraviolet-Radiation-Resistant Isolates Revealed Cellulose-Degrading Species of *Cellulosimicrobium Cellulans* (UVP1) and *Bacillus Pumilus* (UVP4) ». *Biotechnology and Applied Biochemistry* 59(5):395-404. doi: 10.1002/bab.1038.
- García, Gabriel Blázquez, Mónica Calero de Hoces, Carmen Martínez García, María Teresa Cotes Palomino, Alicia Ronda Gálvez, et María Ángeles Martín-Lara. 2014. « Characterization and Modeling of Pyrolysis of the Two-Phase Olive Mill Solid Waste ». *Fuel Processing Technology* 126:104-11. doi: 10.1016/j.fuproc.2014.04.020.
- Gares, Maroua, Serge Hiligsmann, et Noredine Kacem Chaouche. 2020. « Lignocellulosic Biomass and Industrial Bioprocesses for the Production of Second Generation Bio-Ethanol, Does It Have a Future in Algeria? » *SN Applied Sciences* 2(10):1680. doi: 10.1007/s42452-020-03442-2.
- Garg, Roma, Ritika Srivastava, Vijaya Brahma, Lata Verma, Subramanian Karthikeyan, et Girish Sahni. 2016. « Biochemical and Structural Characterization of a Novel Halotolerant Cellulase from Soil Metagenome ». *Scientific Reports* 6(1):39634. doi: 10.1038/srep39634.
- Gaur, Rajeeva, et Soni Tiwari. 2015. « Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07 ». *BMC Biotechnology* 15(1):19. doi: 10.1186/s12896-015-0129-9.
- Ghilamical, Amanuel M., Nancy Budambula, Sylvester E. Anami, Tadesse Mehari, et Hamadi Iddi Boga. 2018. « Thermotolerant Bacteria of Biotechnological Potential from Hot Springs in Eritrea ». doi: 10.5897/AJMR2017.8626.
- Ghio, Silvina, María B. Bradanini, Mercedes M. Garrido, Ornella M. Ontañón, Florencia E. Piccinni, Ruben Marrero Diaz de Villegas, Paola M. Talia, et Eleonora Campos. 2020. « Synergic Activity of Cel8Pa β -1,4 Endoglucanase and Bg1Pa β -Glucosidase from *Paenibacillus Xylanivorans* A59 in Beta-Glucan Conversion ». *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)* 28:e00526. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00526.
- Gilbert, Harry J., J. Paul Knox, et Alisdair B. Boraston. 2013. « Advances in Understanding the Molecular Basis of Plant Cell Wall Polysaccharide Recognition by Carbohydrate-Binding Modules ». *Current Opinion in Structural Biology* 23(5):669-77. doi: 10.1016/j.sbi.2013.05.005.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Grangemard, Isabelle, Jean Wallach, Regine Maget-Dana, et Françoise Peypoux. 2001. « Lichenysin ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 90(3):199-210. doi: 10.1385/ABAB:90:3:199.
- Gu, Xinxi, Haiqiang Lu, Lijuan Zhang, et Xiangchen Meng. 2021. « A Thermophilic GH5 Endoglucanase from *Aspergillus Fumigatus* and Its Synergistic Hydrolysis of Mannan-Containing Polysaccharides ». *Catalysts* 11(7):862. doi: 10.3390/catal11070862.
- Gupta, Mahak, Mukul Sharma, Satbir Singh, Puneet Gupta, et Bijender Kumar Bajaj. 2015. « Enhanced Production of Cellulase from *Bacillus Licheniformis* K-3 with Potential for Saccharification of Rice Straw ». *Energy Technology* 3(3):216-24. doi: 10.1002/ente.201402137.
- Hacini, Messaoud. 2006. « Géochimie des sels et des saumures du chott mérouane et calcul des vitesses de précipitation de quelque minéraux évaporitiques. » Annaba.
- Hakamada, Yoshihiro, Keiji Endo, Shuichi Takizawa, Tohru Kobayashi, Tsuyoshi Shirai, Takashi Yamane, et Susumu Ito. 2002. « Enzymatic Properties, Crystallization, and Deduced Amino Acid Sequence of an Alkaline Endoglucanase from *Bacillus Circulans* ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1570(3):174-80. doi: 10.1016/S0304-4165(02)00194-0.
- Harmsen, P. F. H., W. Huijgen, L. Bermudez, et R. Bakker. 2010. *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*. 1184. Wageningen: Wageningen UR - Food & Biobased Research.
- Hassan, Shady S., Gwilym A. Williams, et Amit K. Jaiswal. 2019. « Moving towards the Second Generation of Lignocellulosic Biorefineries in the EU: Drivers, Challenges, and Opportunities ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 101:590-99. doi: 10.1016/j.rser.2018.11.041.
- Healy, M. G., C. M. Devine, et R. Murphy. 1996. « Microbial Production of Biosurfactants ». *Resources, Conservation and Recycling* 18(1):41-57. doi: 10.1016/S0921-3449(96)01167-6.
- Heinze, T., et T. Liebert. 2001. « Unconventional Methods in Cellulose Functionalization ». *Progress in Polymer Science* 26(9):1689-1762. doi: 10.1016/S0079-6700(01)00022-3.
- Henkel, Marius, Mareen Geissler, Fabiola Weggenmann, et Rudolf Hausmann. 2017. « Production of Microbial Biosurfactants: Status Quo of Rhamnolipid and Surfactin towards Large-Scale Production ». *Biotechnology Journal* 12(7):1600561. doi: 10.1002/biot.201600561.
- Henkel, Marius, Markus M. Müller, Johannes H. Kügler, Roberta B. Lovaglio, Jonas Contiero, Christoph Syltatk, et Rudolf Hausmann. 2012. « Rhamnolipids as Biosurfactants from Renewable Resources: Concepts for next-Generation Rhamnolipid Production ». *Process Biochemistry* 47(8):1207-19. doi: 10.1016/j.procbio.2012.04.018.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hills, Colin D., Nimisha Tripathi, Raj S. Singh, Paula J. Carey, et Florence Lowry. 2020. « Valorisation of agricultural biomass-ash with CO₂ ». *Scientific Reports* 10:13801. doi: 10.1038/s41598-020-70504-1.
- Himmel, Michael E., Qi Xu, Yonghua Luo, Shi-You Ding, Raphael Lamed, et Edward A. Bayer. 2010. « Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms ». *Biofuels* 1(2):323-41. doi: 10.4155/bfs.09.25.
- Hommel, Rolf K. 1991. « Formation and Physiological Role of Biosurfactants Produced by Hydrocarbon-Utilizing Microorganisms ». P. 107-19 in *Physiology of Biodegradative Microorganisms*, édité par C. Ratledge. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Hough, David W., et Michael J. Danson. 1999. « Extremozymes ». *Current Opinion in Chemical Biology* 3(1):39-46. doi: 10.1016/S1367-5931(99)80008-8.
- Hrmova, Maria, et Geoffrey B. Fincher. 2001. « Structure-Function Relationships of β -D-Glucan Endo- and Exohydrolases from Higher Plants ». *Plant Molecular Biology* 47(1):73-91. doi: 10.1023/A:1010619128894.
- Huang, Zhen, Guorong Ni, Xiaoyan Zhao, Fei Wang, et Mingren Qu. 2021. « Characterization of a GH8 β -1,4-Glucanase from *Bacillus Subtilis* B111 and Its Saccharification Potential for Agricultural Straws ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(10):1446-54. doi: 10.4014/jmb.2105.05026.
- Huyghues-Despointes, Beatrice M. P., C. Nick Pace, S. Walter Englander, et J. Martin Scholtz. 2001. « Measuring the Conformational Stability of a Protein by Hydrogen Exchange ». P. 69-92 in *Protein Structure, Stability, and Folding, Methods in Molecular BiologyTM*, édité par K. P. Murphy. Totowa, NJ: Humana Press.
- Ibrahim, Atef M., Ragaa A. Hamouda, Noura El-Ahmady El-Naggar, et Fatma M. Al-Shakankery. 2021. « Bioprocess Development for Enhanced Endoglucanase Production by Newly Isolated Bacteria, Purification, Characterization and in-Vitro Efficacy as Anti-Biofilm of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Scientific Reports* 11(1):9754. doi: 10.1038/s41598-021-87901-9.
- Ibrahim, Syahriar Nur Maulana Malik, Sibyandhita Erhaa Amalia, Bunga Agatha, Mustikayanti Yuni Lestari, Antonius Dwi Saputra, Nur Laily Fachira Ikmala, Fazareyna Hyuwan Argi Ryanto, Puspita Ayu Dewi, Mochamad Khoirul Anam, Farah Aisyah Nafidiastri, Nastiti Trikurniadewi, Ditta Putri Kumalasari, Erta Tri, Gendut Hariyanto, Suwarni, Agus Supriyanto, et Ni'matuzahroh. 2018. « Screening and Identifying of Cellulolytic Bacteria from Alas Purwo National Park ». P. 020064 in. Yogyakarta, Indonesia.
- Jacoby, Richard P., Nicolas L. Taylor, et A. Harvey Millar. 2011. « The Role of Mitochondrial Respiration in Salinity Tolerance ». *Trends in Plant Science* 16(11):614-23. doi: 10.1016/j.tplants.2011.08.002.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jensen, Claus Uhrenholt, Julie Katerine Rodriguez Guerrero, Sergios Karatzos, Göran Olofsson, et Steen Brummerstedt Iversen. 2017. « Fundamentals of HydrofactionTM: Renewable Crude Oil from Woody Biomass ». *Biomass Conversion and Biorefinery* 7(4):495-509. doi: 10.1007/s13399-017-0248-8.
- Joo, Myeong Hoon, et Ji Yeon Kim. 2013. « Characteristics of Crude Oil Biodegradation by Biosurfactant-Producing Bacterium *Bacillus Subtilis* JK-1 ». *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 56(2):193-200. doi: 10.1007/s13765-012-3269-9.
- Jørgensen, Henning, Jan Bach Kristensen, et Claus Felby. 2007. « Enzymatic Conversion of Lignocellulose into Fermentable Sugars: Challenges and Opportunities ». *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1(2):119-34. doi: 10.1002/bbb.4.
- Kai, Shinichi, Yoshiyuki Matsuo, So Nakagawa, Kirill Kryukov, Shino Matsukawa, Hiromasa Tanaka, Teppei Iwai, Tadashi Imanishi, et Kiichi Hirota. 2019. « Rapid Bacterial Identification by Direct PCR Amplification of 16S rRNA Genes Using the MinIONTM Nanopore Sequencer ». *FEBS Open Bio* 9(3):548-57. doi: 10.1002/2211-5463.12590.
- Kang, S. W., Y. S. Park, J. S. Lee, S. I. Hong, et S. W. Kim. 2004. « Production of Cellulases and Hemicellulases by *Aspergillus Niger* KK2 from Lignocellulosic Biomass ». *Bioresource Technology* 91(2):153-56. doi: 10.1016/s0960-8524(03)00172-x.
- Karan, Ram, Melinda D. Capes, Priya DasSarma, et Shiladitya DasSarma. 2013. « Cloning, Overexpression, Purification, and Characterization of a Polyextremophilic β -Galactosidase from the Antarctic Haloarchaeon *Halorubrum Lacusprofundi* ». *BMC Biotechnology* 13(1):3. doi: 10.1186/1472-6750-13-3.
- Kashif, Ayesha, Ramla Rehman, Ahmed Fuwad, Muhammad Kashif Shahid, H. N. P. Dayarathne, Asif Jamal, Muhammad Nauman Aftab, Bandita Mainali, et Younggyun Choi. 2022. « Current Advances in the Classification, Production, Properties and Applications of Microbial Biosurfactants – A Critical Review ». *Advances in Colloid and Interface Science* 306:102718. doi: 10.1016/j.cis.2022.102718.
- Khalid, Anam, Miao Ye, Chunjie Wei, Binghong Dai, Ru Yang, Shoujun Huang, et Zaigui Wang. 2021. « Production of β -glucanase and protease from *Bacillus velezensis* strain isolated from the manure of piglets ». *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 51(5):497-510. doi: 10.1080/10826068.2020.1833344.
- Khandeparker, Rakhee, et Mondher Th. Numan. 2008. « Bifunctional Xylanases and Their Potential Use in Biotechnology ». *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35(7):635-44. doi: 10.1007/s10295-008-0342-9.
- Kim, Bo-Kyung, Hye-Jin Kim, et Jin-Woo Lee. 2013. « Rapid Statistical Optimization of Cultural Conditions for Mass Production of Carboxymethylcellulase by a Newly Isolated Marine Bacterium, *Bacillus Velezensis* A-68 from Rice Hulls ». *Journal of Life Science* 23(6):757-69. doi: 10.5352/JLS.2013.23.6.757.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kirubakaran, V., V. Sivaramakrishnan, R. Nalini, T. Sekar, M. Premalatha, et P. Subramanian. 2009. « A Review on Gasification of Biomass ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13(1):179-86. doi: 10.1016/j.rser.2007.07.001.
- Kitamoto, Dai, Hiroko Isoda, et Tadaatsu Nakahara. 2002. « Functions and Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants — from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers — ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94(3):187-201. doi: 10.1016/S1389-1723(02)80149-9.
- Kolokassidou, K., W. Szymczak, M. Wolf, C. Obermeier, G. Buckau, et I. Pashalidis. 2009. « Hydrophilic Olive Cake Extracts: Characterization by Physicochemical Properties and Cu(II) Complexation ». *Journal of Hazardous Materials* 164(2):442-47. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.08.016.
- Kulisic, Biljana, Bruno Gagnon, Jörg Schweinle, Sam Van Holsbeeck, Mark Brown, Jurica Simurina, Ioannis Dimitriou, et Heather McDonald. 2021. « The Contributions of Biomass Supply for Bioenergy in the Post-COVID-19 Recovery ». *Energies* 14(24):8415. doi: 10.3390/en14248415.
- Kumar, R., V. Strezov, H. Weldekidan, J. He, S. Singh, T. Kan, et B. Dastjerdi. 2020. « Lignocellulose Biomass Pyrolysis for Bio-Oil Production: A Review of Biomass Pre-Treatment Methods for Production of Drop-in Fuels ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 123:109763. doi: 10.1016/j.rser.2020.109763.
- Kumar, Rajeev, Gaurav Mago, Venkatesh Balan, et Charles E. Wyman. 2009. « Physical and Chemical Characterizations of Corn Stover and Poplar Solids Resulting from Leading Pretreatment Technologies ». *Bioresource Technology* 100(17):3948-62. doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.075.
- Kumar, Vinod, Vivek Ahluwalia, Saurabh Saran, Jitendra Kumar, Anil Kumar Patel, et Reeta Rani Singhania. 2021. « Recent Developments on Solid-State Fermentation for Production of Microbial Secondary Metabolites: Challenges and Solutions ». *Bioresource Technology* 323:124566. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124566.
- Kuo, Tsai-Chi, Ni-Ying Hsu, Reza Wattimena, I.-Hsuan Hong, Chin-Jung Chao, et Jonathan Herlianto. 2021. « Toward a Circular Economy: A System Dynamic Model of Recycling Framework for Aseptic Paper Packaging Waste in Indonesia ». *Journal of Cleaner Production* 301:126901. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.126901.
- Lal, R. 2005. « World Crop Residues Production and Implications of Its Use as a Biofuel ». *Environment International* 31(4):575-84. doi: 10.1016/j.envint.2004.09.005.
- Li, Jing, Maocheng Deng, Yao Wang, et Weixin Chen. 2016. « Production and Characteristics of Biosurfactant Produced by *Bacillus Pseudomycolides* BS6 Utilizing Soybean Oil Waste ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 112:72-79. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.05.002.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Li, Lain-Jong, R. J. Nicholas, Chien-Yen Chen, R. C. Darton, et S. C. Baker. 2005. « Comparative Study of Photoluminescence of Single-Walled Carbon Nanotubes Wrapped with Sodium Dodecyl Sulfate, Surfactin and Polyvinylpyrrolidone ». *Nanotechnology* 16(5):S202. doi: 10.1088/0957-4484/16/5/012.
- Li, Xin, et Hui-Ying Yu. 2012. « Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1 ». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39(8):1117-24. doi: 10.1007/s10295-012-1120-2.
- Liang, Nathan. 2022. « Comparative transcriptomics of the interaction between *Bacillus velezensis* E68 and *Fusarium graminearum* DAOMC 180378 ». Consulté 2 janvier 2023 (<https://escholarship.mcgill.ca/concern/theses/tq57nw88j>).
- Liepins, Janis, Karina Balina, Raimonda Soloha, Ieva Berzina, Liva Kristiana Lukasa, et Elina Dace. 2021. « Glycolipid Biosurfactant Production from Waste Cooking Oils by Yeast: Review of Substrates, Producers and Products ». *Fermentation* 7(3):136. doi: 10.3390/fermentation7030136.
- Lineweaver, Hans, et Dean Burk. 1934. « The Determination of Enzyme Dissociation Constants ». *Journal of the American Chemical Society* 56(3):658-66. doi: 10.1021/ja01318a036.
- Liu, Dongyang, Ruifu Zhang, Xingming Yang, Yangchun Xu, Zhu Tang, Wei Tian, et Qirong Shen. 2011. « Expression, Purification and Characterization of Two Thermostable Endoglucanases Cloned from a Lignocellulosic Decomposing Fungi *Aspergillus Fumigatus* Z5 Isolated from Compost ». *Protein Expression and Purification* 79(2):176-86. doi: 10.1016/j.pep.2011.06.008.
- Liu, Hao, J. Y. Zhu, et X. S. Chai. 2011. « In Situ, Rapid, and Temporally Resolved Measurements of Cellulase Adsorption onto Lignocellulosic Substrates by UV-Vis Spectrophotometry ». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 27(1):272-78. doi: 10.1021/la103306v.
- Liu, Xiangyang, Biao Ren, Ming Chen, Haibin Wang, Chandrakant R. Kokare, Xianlong Zhou, Jidong Wang, Huanqin Dai, Fuhang Song, Mei Liu, Jian Wang, Shujin Wang, et Lixin Zhang. 2010. « Production and Characterization of a Group of Bioemulsifiers from the Marine *Bacillus Velezensis* Strain H3 ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(5):1881-93. doi: 10.1007/s00253-010-2653-9.
- Liu, Y., K. Teng, T. Wang, E. Dong, M. Zhang, Y. Tao, et J. Zhong. 2020. « Antimicrobial *Bacillus Velezensis* HC6: Production of Three Kinds of Lipopeptides and Biocontrol Potential in Maize ». *Journal of Applied Microbiology* 128(1):242-54. doi: 10.1111/jam.14459.
- Liu, Yang, Haipeng Guo, Jiali Gu, et Wensheng Qin. 2019. « Optimize Purification of a Cellulase from *Bacillus Velezensis* A4 by Aqueous Two-Phase System (ATPS) Using

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Response Surface Methodology ». *Process Biochemistry* 87:196-203. doi: 10.1016/j.procbio.2019.08.017.
- Liu, Yang, Haipeng Guo, Yanwen Wu, et Wensheng Qin. 2018. « Purification and Characterizations of a Novel Recombinant *Bacillus Velezensis* Endoglucanase by Aqueous Two-Phase System ». *Bioresources and Bioprocessing* 5(1):19. doi: 10.1186/s40643-018-0204-x.
- Liu, Yanrong, Yi Nie, Xingmei Lu, Xiangping Zhang, Hongyan He, Fengjiao Pan, Le Zhou, Xue Liu, Xiaoyan Ji, et Suojia Zhang. 2019. « Cascade Utilization of Lignocellulosic Biomass to High-Value Products ». *Green Chemistry* 21(13):3499-3535. doi: 10.1039/C9GC00473D.
- Ljungdahl, Lars G., et Karl-Erik Eriksson. 1985. « Ecology of Microbial Cellulose Degradation ». P. 237-99 in *Advances in Microbial Ecology: Volume 8, Advances in Microbial Ecology*, édité par K. C. Marshall. Boston, MA: Springer US.
- Ludot, Camille. 2013. « Développement de méthodologies de synthèse de tensioactifs glycosidiques à partir de biomasse lignocellulosique ». These de doctorat, Reims.
- Lynd, Lee R., Paul J. Weimer, Willem H. van Zyl, et Isak S. Pretorius. 2002. « Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3):506-77. doi: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.
- Mahmood, Zahed, Muhammad Yameen, Muhammad Jahangeer, Muhammad Riaz, Abdul Ghaffar, et Irum Javid. 2018. « Lignin as Natural Antioxidant Capacity ».
- McCleary, Barry V., et Paraic McGeough. 2015. « A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of Endo-1,4- β -Xylanase ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 177(5):1152-63. doi: 10.1007/s12010-015-1803-z.
- McKendry, Peter. 2002. « Energy Production from Biomass (Part 1): Overview of Biomass ». *Bioresource Technology* 83(1):37-46. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00118-3.
- Meena, Khem Raj, Rajni Dhiman, Kailash Singh, Sachin Kumar, Abhishek Sharma, Shamsher S. Kanwar, Rittick Mondal, Sandip Das, Octavio L. Franco, et Amit Kumar Mandal. 2021. « Purification and identification of a surfactin biosurfactant and engine oil degradation by *Bacillus velezensis* KLP2016 ». *Microbial Cell Factories* 20(1):26. doi: 10.1186/s12934-021-01519-0.
- Menert, Anne, Viiu Paalme, Jelena Juhkam, et Raivo Vilu. 2004. « Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in Yeast Industry Waste by Microcalorimetry and PCR Amplification ». *Thermochimica Acta* 420(1):89-98. doi: 10.1016/j.tca.2003.12.032.
- Mensah, Justice. 2019. « Sustainable Development: Meaning, History, Principles, Pillars, and Implications for Human Action: Literature Review ». *Cogent Social Sciences*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Miller, G. L. 1959. « Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar ». *Anal. Biochem.* 31:426-28. doi: 10.1021/ac60147a030.
- Miotto, Lis Schwartz, Camila Alves de Rezende, Amanda Bernardes, Viviane Isabel Serpa, Adrian Tsang, et Igor Polikarpov. 2014. « The Characterization of the Endoglucanase Cel12A from *Gloeophyllum Trabeum* Reveals an Enzyme Highly Active on β -Glucan ». *PLOS ONE* 9(9):e108393. doi: 10.1371/journal.pone.0108393.
- Miotto, Mattia, Pier Paolo Olimpieri, Lorenzo Di Rienzo, Francesco Ambrosetti, Pietro Corsi, Rosalba Lepore, Gian Gaetano Tartaglia, et Edoardo Milanetti. 2019. « Insights on protein thermal stability: a graph representation of molecular interactions ». *Bioinformatics* 35(15):2569-77. doi: 10.1093/bioinformatics/bty1011.
- Mirabella, Nadia, Valentina Castellani, et Serenella Sala. 2014. « Current Options for the Valorization of Food Manufacturing Waste: A Review ». *Journal of Cleaner Production* 65:28-41. doi: 10.1016/j.jclepro.2013.10.051.
- Mnif, Inès, Amir Bouallegue, Salwa Mekki, et Dhouha Ghribi. 2021. « Valorization of Date Juice by the Production of Lipopeptide Biosurfactants by a *Bacillus Mojavensis* BI2 Strain: Bioprocess Optimization by Response Surface Methodology and Study of Surface Activities ». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44(11):2315-30. doi: 10.1007/s00449-021-02606-7.
- Mohapatra, Sonali, Suruchee Samparnna Mishra, Manish Paul, et Hrudayanath Thatoi. 2020. « Lignolytic Enzymes from Fungus: A Consolidated Bioprocessing Approach for Bioethanol Production ». in *Frontiers in Soil and Environmental Microbiology*. CRC Press.
- Mohee, R., G. D. Unmar, A. Mudhoo, et P. Khadoo. 2008. « Biodegradability of Biodegradable/Degradable Plastic Materials under Aerobic and Anaerobic Conditions ». *Waste Management* 28(9):1624-29. doi: 10.1016/j.wasman.2007.07.003.
- Mottiar, Yaseen, Ruben Vanholme, Wout Boerjan, John Ralph, et Shawn D. Mansfield. 2016. « Designer Lignins: Harnessing the Plasticity of Lignification ». *Current Opinion in Biotechnology* 37:190-200. doi: 10.1016/j.copbio.2015.10.009.
- Mukherjee, Soumen, Palashpriya Das, et Ramkrishna Sen. 2006. « Towards Commercial Production of Microbial Surfactants ». *Trends in Biotechnology* 24(11):509-15. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.09.005.
- Mulligan, Catherine N. 2005. « Environmental Applications for Biosurfactants ». *Environmental Pollution* 133(2):183-98. doi: 10.1016/j.envpol.2004.06.009.
- Nagórska, Krzysztofa, Mariusz Bikowski, et Michał Obuchowski. 2007. « Multicellular Behaviour and Production of a Wide Variety of Toxic Substances Support Usage of *Bacillus Subtilis* as a Powerful Biocontrol Agent. » *Acta Biochimica Polonica* 54(3):495-508. doi: 10.18388/abp.2007_3224.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nahak, B. K., S. Preetam, Deepa Sharma, S. K. Shukla, Mikael Syväjärvi, Dana-Cristina Toncu, et Ashutosh Tiwari. 2022. « Advancements in Net-Zero Pertinency of Lignocellulosic Biomass for Climate Neutral Energy Production ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 161:112393. doi: 10.1016/j.rser.2022.112393.
- Nair, Anu Sadasivan, Huda Al-Battashi, Ahlam Al-Akzawi, Neelamegam Annamalai, Ashish Gujrathi, Saif Al-Bahry, Gurpreet Singh Dhillon, et Sivakumar Nallusamy. 2018. « Waste office paper: A potential feedstock for cellulase production by a novel strain *Bacillus velezensis* ASN1 ». *Waste Management* 79:491-500. doi: 10.1016/j.wasman.2018.08.014.
- Nair, Anu Sadasivan, Saif Al-Bahry, et Nallusamy Sivakumar. 2020. « Co-Production of Microbial Lipids and Biosurfactant from Waste Office Paper Hydrolysate Using a Novel Strain *Bacillus Velezensis* ASN1 ». *Biomass Conversion and Biorefinery* 10(2):383-91. doi: 10.1007/s13399-019-00420-6.
- Ndlovu, Thando, Marina Rautenbach, Johann Arnold Vosloo, Sehaam Khan, et Wesaal Khan. 2017. « Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant ». *AMB Express* 7(1):108. doi: 10.1186/s13568-017-0363-8.
- Ndlovu, Thando, Marina Rautenbach, Sehaam Khan, et Wesaal Khan. 2017. « Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates ». *AMB Express* 7(1):109. doi: 10.1186/s13568-017-0367-4.
- Nidetzky, B, Zachariae W, Gercken G, Hayn M, Steiner W. 1994. Hydrolysis of Cello-oligosaccharides by *Trichoderma Reesei* Cellobiohydrolases - Experimental-Data and Kinetic Modeling. *Enzyme and Microbial Technology*, 16:43-52.
- Nor, Farhah Husna Mohd, Shakila Abdullah, Zaharah Ibrahim, Muhamad Hanif Md Nor, Mohd Isa Osman, Dunia A. Al Farraj, Mohamed Ragab AbdelGawwad, et Hesam Kamyab. 2022. « Role of Extremophilic *Bacillus Cereus* KH1 and Its Lipopeptide in Treatment of Organic Pollutant in Wastewater ». *Bioprocess and Biosystems Engineering*. doi: 10.1007/s00449-022-02749-1.
- Nunes, M. Antónia, Filipa B. Pimentel, Anabela S. G. Costa, Rita C. Alves, et M. Beatriz P. P. Oliveira. 2016. « Olive By-Products for Functional and Food Applications: Challenging Opportunities to Face Environmental Constraints ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 35:139-48. doi: 10.1016/j.ifset.2016.04.016.
- Oliva-Taravilla, Alfredo, Cristhian Carrasco, Leif J. Jönsson, et Carlos Martín. 2020. « Effects of Biosurfactants on Enzymatic Saccharification and Fermentation of Pretreated Softwood ». *Molecules* 25(16):3559. doi: 10.3390/molecules25163559.
- Omisore, Suliati Olatidayo, Temitope Bukola Fabunmi, Adeyemi Oluwadare Ayodeji, Oladipo Oladiti Olaniyi, et Daniel Juwon Arotupin. 2022. « Production and Biochemical

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Characterization of Partially Purified Cellulase-Free, Thermo-Acidophilic Endoxylanase from *Lysinibacillus Fusiformis* Strain TB7 Using Kolanut Husk as Feedstock ». *Heliyon* 8(10):e11106. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e11106.
- Ongena, Marc, Emmanuel Jourdan, Akram Adam, Michel Paquot, Alain Brans, Bernard Joris, Jean-Louis Arpigny, et Philippe Thonart. 2007. « Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants ». *Environmental Microbiology* 9(4):1084-90. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x.
- Ongena, Marc, et Philippe Jacques. 2008. « *Bacillus* Lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol ». *Trends in Microbiology* 16(3):115-25. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009.
- Oren, A. 2002. « Diversity of Halophilic Microorganisms: Environments, Phylogeny, Physiology, and Applications ». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28(1):56-63. doi: 10.1038/sj/jim/7000176.
- Palonen, Hetti, et Liisa Viikari. 2004. « Role of Oxidative Enzymatic Treatments on Enzymatic Hydrolysis of Softwood ». *Biotechnology and Bioengineering* 86(5):550-57. doi: 10.1002/bit.20135.
- Patel, R. m., et A. j. Desai. 1997. « Biosurfactant Production by *Pseudomonas Aeruginosa* GS3 from Molasses ». *Letters in Applied Microbiology* 25(2):91-94. doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00172.x.
- Pekin, G., F. Vardar-Sukan, et N. Kosaric. 2005. « Production of Sophorolipids from *Candida Bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey ». *Engineering in Life Sciences* 5(4):357-62. doi: 10.1002/elsc.200520086.
- Pereira, Emanuele Graciosa, Jadir Nogueira da Silva, Jofran L. de Oliveira, et Cássio S. Machado. 2012. « Sustainable Energy: A Review of Gasification Technologies ». *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16(7):4753-62. doi: 10.1016/j.rser.2012.04.023.
- Pérez, J., J. Muñoz-Dorado, T. de la Rubia, et J. Martínez. 2002. « Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview ». *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 5(2):53-63. doi: 10.1007/s10123-002-0062-3.
- Perfumo, Amedea, Ibrahim M. Banat, et Roger Marchant. 2018. « Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications ». *Trends in Biotechnology* 36(3):277-89. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.10.016.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin, et J. Wallach. 1999. « Recent Trends in the Biochemistry of Surfactin ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 51(5):553-63. doi: 10.1007/s002530051432.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pham, Van Hong Thi, Jaisoo Kim, Jeahong Shim, Soonwoong Chang, et Woojin Chung. 2022. « Coconut Mesocarp-Based Lignocellulosic Waste as a Substrate for Cellulase Production from High Promising Multienzyme-Producing *Bacillus Amyloliquefaciens* FW2 without Pretreatments ». *Microorganisms* 10(2):327. doi: 10.3390/microorganisms10020327.
- Picchio, Rodolfo, Francesco Latterini, Rachele Venanzi, Walter Stefanoni, Alessandro Suardi, Damiano Tocci, et Luigi Pari. 2020. « Pellet Production from Woody and Non-Woody Feedstocks: A Review on Biomass Quality Evaluation ». *Energies* 13(11):2937. doi: 10.3390/en13112937.
- Planas, A. 2000. « Bacterial 1,3-1,4-Beta-Glucanases: Structure, Function and Protein Engineering ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1543(2):361-82. doi: 10.1016/s0167-4838(00)00231-4.
- Plaza, Grażyna A., Ireneusz Zjawiony, et Ibrahim M. Banat. 2006. « Use of Different Methods for Detection of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated and Bioremediated Soils ». *Journal of Petroleum Science and Engineering* 50(1):71-77. doi: 10.1016/j.petrol.2005.10.005.
- Plecha, Sarah, Danielle Hall, et Sonia M. Tiquia-Arashiro. 2013. « Screening for Novel Bacteria from the Bioenergy Feedstock Switchgrass (*Panicum Virgatum* L.) ». *Environmental Technology* 34(13-16):1895-1904. doi: 10.1080/09593330.2013.818701.
- Ponnaiyan, Thehazhnan Konguvel. 2016. « Aspects Critical to Advancing Ionic Liquid Pretreatment Technique as a Viable Approach for Lignocellulosic Biomass Conversion ». University of Toledo.
- Pramanik, Sajib Kumar, Shafi Mahmud, Gobindo Kumar Paul, Tabassum Jabin, Kamrun Naher, Md. Salah Uddin, Shahriar Zaman, et Md. Abu Saleh. 2021. « Fermentation Optimization of Cellulase Production from Sugarcane Bagasse by *Bacillus Pseudomycolides* and Molecular Modeling Study of Cellulase ». *Current Research in Microbial Sciences* 2:100013. doi: 10.1016/j.crmicr.2020.100013.
- Rabbee, Muhammad Fazle, et K. Baek. 2020. « Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus Velezensis* for Agricultural Applications ». *Molecules*.
- Raddadi, Noura, Ameer Cherif, Daniele Daffonchio, et Fabio Fava. 2013. « Halo-Alkalitolerant and Thermostable Cellulases with Improved Tolerance to Ionic Liquids and Organic Solvents from *Paenibacillus Tarimensis* Isolated from the Chott El Fejej, Sahara Desert, Tunisia ». *Bioresource Technology* 150:121-28. doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.089.
- Rahman, Shafkat Shamim, Romana Siddique, et Nafisa Tabassum. 2017. « Isolation and identification of halotolerant soil bacteria from coastal Patenga area ». *BMC Research Notes* 10:531. doi: 10.1186/s13104-017-2855-7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rajkhowa, Sanchayita, et Jyotirmoy Sarma. 2022. *Biosurfactant: An Alternative Towards Sustainability*. CRC Press.
- Rangabhashiyam, S., N. Anu, et N. Selvaraju. 2013. « Sequestration of Dye from Textile Industry Wastewater Using Agricultural Waste Products as Adsorbents ». *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1(4):629-41. doi: 10.1016/j.jece.2013.07.014.
- Rangarajan, Vivek, et Kim G. Clarke. 2016. « Towards Bacterial Lipopeptide Products for Specific Applications — a Review of Appropriate Downstream Processing Schemes ». *Process Biochemistry* 51(12):2176-85. doi: 10.1016/j.procbio.2016.08.026.
- Rathnan, Rahna K., Divya John, et Balasaravanan T. 2013. « Isolation, Screening, Identification And Optimized Production Of Extracellular Cellulase From *Bacillus Subtilis* Using Cellulosic Waste As Carbon Source ». *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2021(vol. 10):2383-86.
- Rattu, Gurdeep, Swati Joshi, et T. Satyanarayana. 2016. « Bifunctional Recombinant Cellulase–Xylanase (RBhcell-Xyl) from the Polyextremophilic Bacterium *Bacillus Halodurans* TSLV1 and Its Utility in Valorization of Renewable Agro-Residues ». *Extremophiles* 20(6):831-42. doi: 10.1007/s00792-016-0870-6.
- Raveendran, K., Anuradda Ganesh, et Kartic C. Khilar. 1995. « Influence of Mineral Matter on Biomass Pyrolysis Characteristics ». *Fuel* 74(12):1812-22. doi: 10.1016/0016-2361(95)80013-8.
- Razafindralambo, H., Y. Popineau, M. Deleu, C. Hbid, P. Jacques, P. Thonart, et M. Paquot. 1998. « Foaming Properties of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis*: Effect of Lipid and Peptide Structural Attributes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(3):911-16. doi: 10.1021/jf970592d.
- Razafindralambo, Hary, Michel Paquot, Choukri Hbid, Philippe Jacques, Jacqueline Destain, et Philippe Thonart. 1993. « Purification of Antifungal Lipopeptides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography ». *Journal of Chromatography A* 639(1):81-85. doi: 10.1016/0021-9673(93)83091-6.
- Rodríguez, Elizabeth Quintana, Domancar Orona Tamayo, José Nicacio González Cervantes, Flora Itzel Beltrán Ramirez, María Alejandra Rivera Trasgallo, et Adriana Berenice Espinoza Martínez. 2020. *Getting Environmentally Friendly and High Added-Value Products from Lignocellulosic Waste*. IntechOpen.
- Roelants, Sophie L. K. W., et Wim Soetaert. 2021. « Industrial Perspectives for (Microbial) Biosurfactants ». *Biosurfactants for the Biobased Economy* 1-15. doi: 10.1007/10_2021_175.
- Roig, A., M. L. Cayuela, et M. A. Sánchez-Monedero. 2006. « An Overview on Olive Mill Wastes and Their Valorisation Methods ». *Waste Management* 26(9):960-69. doi: 10.1016/j.wasman.2005.07.024.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Roth, Joyce Cristina Gonçalves, Michele Hoeltz, et Lisianne Brittes Benitez. 2020. « Current Approaches and Trends in the Production of Microbial Cellulases Using Residual Lignocellulosic Biomass: A Bibliometric Analysis of the Last 10 Years ». *Archives of Microbiology* 202(5):935-51. doi: 10.1007/s00203-019-01796-9.
- Ruiz-García, Cristina, Victoria Béjar, Fernando Martínez-Checa, Inmaculada Llamas, et Emilia Quesada. 2005. « *Bacillus Velezensis* Sp. Nov., a Surfactant-Producing Bacterium Isolated from the River Vélez in Málaga, Southern Spain ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55(Pt 1):191-95. doi: 10.1099/ij.s.0.63310-0.
- Sadhu, Sangrila, Pradipta Saha, Sukanta K. Sen, Shanmugam Mayilraj, et Tushar Kanti Maiti. 2013. « Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung ». *SpringerPlus* 2:10. doi: 10.1186/2193-1801-2-10.
- Sangwan, Saurabh Raj, et M. P. S. Bhatia. 2020. « Sustainable Development in Industry 4.0 ». P. 39-56 in *A Roadmap to Industry 4.0: Smart Production, Sharp Business and Sustainable Development, Advances in Science, Technology & Innovation*, édité par A. Nayyar et A. Kumar. Cham: Springer International Publishing.
- Saratale, Ganesh D., Rijuta G. Saratale, Gajanan S. Ghodake, Yuan–Yuan Jiang, Jo-Shu Chang, Han-Seung Shin, et Gopalakrishnan Kumar. 2017. « Solid State Fermentative Lignocellulolytic Enzymes Production, Characterization and Its Application in the Saccharification of Rice Waste Biomass for Ethanol Production: An Integrated Biotechnological Approach ». *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 76:51-58. doi: 10.1016/j.jtice.2017.03.027.
- Sarker, Tumpa R., Sonil Nanda, Ajay K. Dalai, et Venkatesh Meda. 2021. « A Review of Torrefaction Technology for Upgrading Lignocellulosic Biomass to Solid Biofuels ». *BioEnergy Research* 14(2):645-69. doi: 10.1007/s12155-020-10236-2.
- Scheller, Henrik Vibe, et Peter Ulvskov. 2010. « Hemicelluloses ». *Annual Review of Plant Biology* 61(1):263-89. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- Schimming, S., W. H. Schwarz, et W. L. Staudenbauer. 1991. « Properties of a Thermoactive Beta-1,3-1,4-Glucanase (Lichenase) from *Clostridium Thermocellum* Expressed in *Escherichia Coli* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 177(1):447-52. doi: 10.1016/0006-291x(91)92004-4.
- Schuster, André, et Monika Schmoll. 2010. « Biology and Biotechnology of *Trichoderma* ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(3):787-99. doi: 10.1007/s00253-010-2632-1.
- Sharma, Mukul, et Bijender Kumar Bajaj. 2014. « Cellulase Production from *Bacillus subtilis* MS 54 and Its Potential for Saccharification of Biphasic-Acid-Pretreated Rice Straw ».

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 8(4):449-56. doi: 10.1166/jbmb.2014.1458.
- Sharma, Rajat, Buddhi P. Lamsal, et William J. Colonna. 2016. « Pretreatment of Fibrous Biomass and Growth of Biosurfactant-Producing *Bacillus Subtilis* on Biomass-Derived Fermentable Sugars ». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39(1):105-13. doi: 10.1007/s00449-015-1494-4.
- Silva, Rita De Cássia F. S., Darne G. Almeida, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Valdemir A. Santos, et Leonie Asfora Sarubbo. 2014. « Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills ». *International Journal of Molecular Sciences* 15(7):12523-42. doi: 10.3390/ijms150712523.
- Silva, Tatielle P., Fabiana S. de Albuquerque, Cláudio Willian V. Dos Santos, Marcelo Franco, Luiz Carlos Caetano, et Hugo Juarez Vieira Pereira. 2018. « Production, Purification, Characterization and Application of a New Halotolerant and Thermostable Endoglucanase of *Botrytis Ricini* URM 5627 ». *Bioresource Technology* 270:263-69. doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.022.
- Singh, Anita, Somvir Bajar, Arti Devi, et Deepak Pant. 2021. « An Overview on the Recent Developments in Fungal Cellulase Production and Their Industrial Applications ». *Bioresource Technology Reports* 14:100652. doi: 10.1016/j.biteb.2021.100652.
- Singh, Shuchi, Vijayanand S. Moholkar, et Arun Goyal. 2013. « Isolation, Identification, and Characterization of a Cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SS35 from Rhinoceros Dung ». *ISRN Microbiology* 2013:728134. doi: 10.1155/2013/728134.
- Singhvi, Mamata S., et Digambar V. Gokhale. 2019. « Lignocellulosic Biomass: Hurdles and Challenges in Its Valorization ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(23):9305-20. doi: 10.1007/s00253-019-10212-7.
- Snook, Maurice E., Trevor Mitchell, Dorothy M. Hinton, et Charles W. Bacon. 2009. « Isolation and Characterization of Leu7-Surfactin from the Endophytic Bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a Biocontrol Agent for *Fusarium verticillioides* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(10):4287-92. doi: 10.1021/jf900164h.
- Song, Yafeng, Gang Fu, Huina Dong, Jianjun Li, Yuguang Du, et Dawei Zhang. 2017. « High-Efficiency Secretion of β -Mannanase in *Bacillus subtilis* through Protein Synthesis and Secretion Optimization ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(12):2540-48. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05528.
- Steinbach, David, Andrea Kruse, et Jörg Sauer. 2017. « Pretreatment Technologies of Lignocellulosic Biomass in Water in View of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural Production- A Review ». *Biomass Conversion and Biorefinery* 7(2):247-74. doi: 10.1007/s13399-017-0243-0.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sulyman, A. O., A. Igunnu, et S. O. Malomo. 2020. « Isolation, Purification and Characterization of Cellulase Produced by *Aspergillus Niger* Cultured on *Arachis Hypogaea* Shells ». *Heliyon* 6(12):e05668. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05668.
- Sun, Juntao, Hongxin Wang, Wenping Lv, Chaoyang Ma, Zaixiang Lou, Hong Yao, et Yixing Dai. 2012. « Cloning and Expression of a Thermostable β -1,3-1,4-Glucanase from *Bacillus Amyloliquefaciens* ATCC 23350 ». *Annals of Microbiology* 62(3):1235-42. doi: 10.1007/s13213-011-0366-7.
- Sun, Ye, et Jiayang Cheng. 2002. « Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review ». *Bioresource Technology* 83(1):1-11. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.
- Suryanti, Venty, Soerya Dewi Marliyana, Desi Suci Handayani, et Desi Ratnaningrum. 2013. « PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT BY *Pseudomonas Fluorescens* USING CASSAVA FLOUR WASTEWATER AS MEDIA ». *Indonesian Journal of Chemistry* 13(3):229-35. doi: 10.22146/ijc.21281.
- Taha, Mohamed, Esmaeil Shahsavari, Khalid Al-Hothaly, Aidyn Mouradov, Andrew T. Smith, Andrew S. Ball, et Eric M. Adetutu. 2015. « Enhanced Biological Straw Saccharification Through Coculturing of Lignocellulose-Degrading Microorganisms ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(8):3709-28. doi: 10.1007/s12010-015-1539-9.
- Taha, Mohamed, Krishna K. Kadali, Khalid AL-Hothaly, Andrew T. Smith, Andrew S. Ball, et Eric M. Adetutu. 2015. « An Effective Microplate Method (Biolog MT2) for Screening Native Lignocellulosic-Straw-Degrading Bacteria ». *Annals of Microbiology* 65(4):2053-64. doi: 10.1007/s13213-015-1044-y.
- Tchunden, Jeannette. 1990. « Cellulolyse Anaérobie Mésophile : étude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35319 ». phdthesis, Université Henri Poincaré - Nancy 1.
- Teather, R. M., et P. J. Wood. 1982. « Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. » *Applied and Environmental Microbiology* 43(4):777-80.
- Thomas, Lebin, Hari Ram, et Ved Pal Singh. 2017. « Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus* sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus* ». *Brazilian Journal of Microbiology* 49(2):429-42. doi: 10.1016/j.bjm.2017.05.010.
- Tian, Jinfang, Longguang Yu, Rui Xue, Shan Zhuang, et Yuli Shan. 2022. « Global Low-Carbon Energy Transition in the Post-COVID-19 Era ». *Applied Energy* 307:118205. doi: 10.1016/j.apenergy.2021.118205.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Toumi, Khadra-Hanane, Yacine Benguerba, Alessandro Erto, Guilherme L. Dotto, Chafia Tiar, Saci Nacef, Abdeltif Amrane, et Barbara Ernst. 2019. « Efficient Removal of Cationic Dyes From Aqueous Solutions Using the Low-Cost Algerian Olive Cake Waste Adsorbent ». *JOM* 71(2):791-800. doi: 10.1007/s11837-018-3143-2.
- Trivedi, Nitin, Vishal Gupta, Manoj Kumar, Puja Kumari, C.R.K.Reddy, et B. Jha. 2011. « An Alkali-Halotolerant Cellulase from *Bacillus Flexus* Isolated from Green Seaweed *Ulva Lactuca* ». *Carbohydrate Polymers* 83(2):891-97. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.08.069.
- Vallejos, María Evangelina, Julia Kruyeniski, et Maria Cristina Area. 2017. « Second-Generation Bioethanol from Industrial Wood Waste of South American Species ». doi: 10.18331/BRJ2017.4.3.4.
- Van den Burg, Bertus. 2003. « Extremophiles as a Source for Novel Enzymes ». *Current Opinion in Microbiology* 6(3):213-18. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00060-2.
- Van Soest, Peter J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca: Cornell University Press.
- Vieira, Gladys Rosane Thomé, Mariane Liebl, Lorena Benathar Ballod Tavares, Roberta Paulert, et Artur Smânia Júnior. 2008. « Submerged Culture Conditions for the Production of Mycelial Biomass and Antimicrobial Metabolites by *Polyporus Tricholoma* Mont. » *Brazilian Journal of Microbiology* 39:561-68. doi: 10.1590/S1517-83822008000300029.
- Vlasenko, E. Yu., H. Ding, J. M. Labavitch, et S. P. Shoemaker. 1997. « Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Rice Straw ». *Bioresource Technology* 59(2):109-19. doi: 10.1016/S0960-8524(96)00169-1.
- Vlyssides, Apostolos, Michael Loizides, et P. Karlis. 2004. « Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products ». *Journal of Cleaner Production - J CLEAN PROD* 12:603-11. doi: 10.1016/S0959-6526(03)00078-7.
- Volpe, Roberto, Antonio Messineo, Marcos Millan, Maurizio Volpe, et Rafael Kandiyoti. 2015. « Assessment of Olive Wastes as Energy Source: Pyrolysis, Torrefaction and the Key Role of H Loss in Thermal Breakdown ». *Energy* 82:119-27. doi: 10.1016/j.energy.2015.01.011.
- Wang, Hai, Melvin Tucker, et Yun Ji. 2013. « Recent Development in Chemical Depolymerization of Lignin: A Review ». *Journal of Applied Chemistry* 2013:e838645. doi: 10.1155/2013/838645.
- Wang, Hong-Yuan, Bing-Quan Fan, Chun-Hua Li, Shuang Liu, et Min Li. 2011. « Effects of Rhamnolipid on the Cellulase and Xylanase in Hydrolysis of Wheat Straw ». *Bioresource Technology* 102(11):6515-21. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.102.
- Wang, J. L., H. Ruan, H. F. Zhang, Q. Zhang, H. B. Zhang, G. Q. He, et S. R. Shen. 2007. « Characterization of a Thermostable and Acidic-Tolerable Beta-Glucanase from

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aerobic Fungi *Trichoderma Koningii* ZJU-T ». *Journal of Food Science* 72(9):C452-456. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00549.x.
- Watanabe, H., et G. Tokuda. 2001. « Animal Cellulases ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58(9):1167-78. doi: 10.1007/PL00000931.
- Wu, Miao. 2013. « X-ray structure and function studies of key enzymes for biomass conversion: GH6 cellobiohydrolases and GH61 lytic polysaccharide monooxygenases (LPMO) ».
- Xu, Jiaying, Bingfang He, Bin Wu, Bin Wang, Chenghua Wang, et Lei Hu. 2014. « An Ionic Liquid Tolerant Cellulase Derived from Chemically Polluted Microhabitats and Its Application in in Situ Saccharification of Rice Straw ». *Bioresource Technology* 157:166-73. doi: 10.1016/j.biortech.2014.01.102.
- Xu, Jiaying, Zhen Gao, Bin Wu, et Bingfang He. 2017. « Lactose-Inducted Production of a Complete Lignocellulolytic Enzyme System by a Novel Bacterium *Bacillus* Sp. BS-5 and Its Application for Saccharification of Alkali-Pretreated Corn Cob ». *Cellulose* 24(5):2059-70. doi: 10.1007/s10570-017-1247-4.
- Xu, Ting, Tianhui Zhu, et jiang Li. 2016. « β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZJ20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi ». *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32. doi: 10.1007/s11274-015-1985-0.
- Yan, Junjie, Weidong Liu, Yujie Li, Hui-Lin Lai, Yingying Zheng, Jian-Wen Huang, Chun-Chi Chen, Yun Chen, Jian Jin, Huazhong Li, et Rey-Ting Guo. 2016. « Functional and Structural Analysis of *Pichia Pastoris*-Expressed *Aspergillus Niger* 1,4- β -Endoglucanase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 475(1):8-12. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.012.
- Ye, Miao, Linghong Sun, Ru Yang, Zaigui Wang, et KeZong Qi. 2017. « The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed ». *Royal Society Open Science* 4(10):171012. doi: 10.1098/rsos.171012.
- Yoo, Dong-Hyung, Byung-Hoo Lee, Pahn-Shick Chang, Hyeon Gyu Lee, et Sang-Ho Yoo. 2007. « Improved Quantitative Analysis of Oligosaccharides from Lichenase-Hydrolyzed Water-Soluble Barley Beta-Glucans by High-Performance Anion-Exchange Chromatography ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(5):1656-62. doi: 10.1021/jf062603l.
- Yuliani, Hanif, Meka Saima Perdani, Imelda Savitri, Meilani Manurung, Muhamad Sahlan, Anondho Wijanarko, et Heri Hermansyah. 2018. « Antimicrobial Activity of Biosurfactant Derived from *Bacillus Subtilis* C19 ». *Energy Procedia* 153:274-78. doi: 10.1016/j.egypro.2018.10.043.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zarei, Omid, Siavoush Dastmalchi, et Maryam Hamzeh-Mivehroud. 2016. « A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media ». *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* 15(4):907-13.
- Zatout, Merzouk, Romina Lucrecia López Steinmetz, Messaoud Hacini, Shao Bing Fong, Adel M'nif, A. H. Hamzaoui, et Lorena Cecilia López Steinmetz. 2020. « Saharan Lithium: Brine Chemistry of Chotts from Eastern Algeria ». *Applied Geochemistry* 115:104566. doi: 10.1016/j.apgeochem.2020.104566.
- Zhang, Huaidong, Guimin Zhang, Chaoxiang Yao, Muhammad Junaid, Zhenghui Lu, Houjin Zhang, et Yanhe Ma. 2015. « Structural Insight of a Trimodular Halophilic Cellulase with a Family 46 Carbohydrate-Binding Module ». *PLOS ONE* 10(11):e0142107. doi: 10.1371/journal.pone.0142107.
- Zhang, Min, Xiu-Lan Chen, Zhi-Hua Zhang, Cai-Yun Sun, Lei-Lei Chen, Hai-Lun He, Bai-Cheng Zhou, et Yu-Zhong Zhang. 2009. « Purification and Functional Characterization of Endo- β -Mannanase MAN5 and Its Application in Oligosaccharide Production from Konjac Flour ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 83(5):865-73. doi: 10.1007/s00253-009-1920-0.
- Zhang, Qiuzhuo, Guofu He, Juan Wang, Weimin Cai, et Yatong Xu. 2009. « Mechanisms of the Stimulatory Effects of Rhamnolipid Biosurfactant on Rice Straw Hydrolysis ». *Applied Energy* 86:S233-37. doi: 10.1016/j.apenergy.2009.04.030.
- Zhang, Zhen-yu, Muhammad Fahim Raza, Ziqiang Zheng, Xuhao Zhang, Xinxin Dong, et Hongyu Zhang. 2018. « Complete Genome Sequence of *Bacillus Velezensis* ZY-1-1 Reveals the Genetic Basis for Its Hemicellulosic/Cellulosic Substrate-Inducible Xylanase and Cellulase Activities ». *3 Biotech* 8(11):465. doi: 10.1007/s13205-018-1490-x.
- Zhao, Kun, Li-Zhong Guo, et Wei-Dong Lu. 2012. « Extracellular Production of Novel Halotolerant, Thermostable, and Alkali-Stable Carboxymethyl Cellulase by Marine Bacterium *Marinimicrobium* Sp. LS-A18 ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168(3):550-67. doi: 10.1007/s12010-012-9796-3.
- Zheng, Guoxiang, Ting Yin, Zhaoxin Lu, Stopira yannick benz Boboua, Jiachen Li, et Wenlong Zhou. 2020. « Degradation of Rice Straw at Low Temperature Using a Novel Microbial Consortium LTF-27 with Efficient Ability ». *Bioresource Technology* 304:123064. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123064.

Annexes

Annexes

1. Milieu 863 (g/L)

Glucose	10
Extrait de levure	05
Peptone	05
Agar (si gélosé)	15

2. Milieu de base (g/L)

NaNO ₃	1.2
KH ₂ PO ₄	03
K ₂ HPO ₄	06
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
CaCl ₂	0.05
MnSO ₄ .7H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.001

3. Eau peptonée (g/L)

Peptone	01
Extrait de levure	05
NaCl	05
Tween 80	01 mL

4. Solution de détergent neutre (NDF) (g/L)

Di-sodium éthylène diamine tétra-acétate (EDTA)	18,62
Di-sodium tetra-borate	6.81
Sodium lauryl sulfate	30
2-ethoxyéthanol	10 mL
Di-sodium hydrogène-phosphate anhydre	4.56

5. Solution de détergent acide (ADF) (g/L)

Acide sulfurique (95-96%)	30 mL
Bromure de Cétyle Tri-méthyle Ammonium (C.T.A.B)	20

6. Solution de précipitation (dosage enzymatique) (g/L)

Acétate de Sodium Tri-hydraté	40
Acétate de zinc	04

Ces deux composés sont dissous dans 200 mL d'eau distillée, ensuite, le pH de la solution est ajusté à 5.0 avec l'acide chlorhydrique (HCl 5 M) et le volume à 1000 mL avec l'éthanol (95%).

Productions scientifiques

Productions scientifiques

Articles publiés

Djelid, H., Flahaut, S., Vander Wauven, C., Oudjama, Y., Hiligsmann, S., Cornu, B., Cherfia, R., Gares, M., Kacem Chaouche, N. (2022). Production of a halotolerant endo-1, 4- β -glucanase by a newly isolated *Bacillus velezensis* H1 on olive mill wastes without pretreatment: purification and characterization of the enzyme. *Archives of Microbiology*, 204(11), 1-15.

Communications Internationales

Djelid, H., Flahaut, S., Songulashvili, G., Vander Wauven, C., Hiligsmann, S., Kacem Chaouche, N. (2020). Co-production of microbial biosurfactants and lipases during a bio-pretreatment of olive oil processing wastes by a novel strain of *Bacillus velezensis* H1. International Conference on Biobased Surfactants. Gant, Belgique.

Communications nationales

Djelid, H., Flahaut, S., Vander Wauven, C., Oudjama, Y., Kacem Chaouche, N. (2022). Olive mill-based lignocellulosic waste as a substrate for halotolerant endo-1,4- β -glucanase production from high promising multienzyme-producing *Bacillus velezensis* H1 without pretreatments. 1^{er} séminaire national sur la biodiversité de la faune et la flore en Algérie. Constantine, Algérie.

Articles en soumission

Gares, M., Benaissa, A., Hiligsmann, S., Cherfia, R., Flahaut, S., Alloun, W., **Djelid, H.**, Chaoua, S., Kacem Chaouche, N. New approach for the valorization of *Stipa tenacissima* as a potential raw material for the production and the optimization of fungal hemicellulase and cellulase using Box–Behnken design. (Journal: Mycologia).

Alloun, W., Gares, M., Chaoua, S., **Djelid, H.**, Kecies, H., Cornu, B., Kacem Chaouche, N. Auxin originated from microorganisms participates in stress mitigation and sustainable crop management. (Journal: Journal of soil science).

Articles projets

Djelid, H., Flahaut, S., Vander Wauven, C., Kacem Chaouche, N. The relationship between endo-1,4- β -glucanase and biosurfactants production during olive mill wastes degradation by *Bacillus velezensis* strain H1.

Nom et Prénom : Djelid Hadjer	Date de soutenance : 25/05/2023										
Intitulé : Recherche et isolement de microorganismes des milieux extrêmes algériens producteurs de métabolites d'intérêt sur différents substrats agro-industriels pertinents											
Résumé Dans ce travail, l'activité cellulolytique a été explorée chez des isolats bactériens obtenus de divers sites d'un écosystème extrême algérien, en l'occurrence le lac salé d'El M'Ghair (l'eau du lac salé principal, le sol situé à sa proximité et le sol de la palmeraie située à proximité du lac). En effet, 43 isolats bactériens ont été isolés dont 9 ont montré une capacité à dégrader la carboxyméthyl-cellulose (CMC) avec différentes valeurs des indices cellulolytiques. Le criblage a montré que l'isolat H1, isolé à partir du sol de la palmeraie située à proximité du lac, possède le meilleur potentiel cellulolytique avec une valeur d'indice cellulolytique de 5.5. L'identification moléculaire de cet isolat a montré qu'il s'agit de l'espèce <i>Bacillus velezensis</i> dont les numéros d'accès aux GenBank (NCBI) sont : OM510337 pour l'ARNr 16S et OM523097 pour la <i>gyrA</i>. Cette souche exhibe une croissance optimale à 37 °C sur le bouillon 863 dépourvu de NaCl, cependant, elle se développait sur le même milieu contenant 10% de NaCl à 55 °C, ce qui lui procure les caractéristiques de thermotolérance et d'halotolérance. Pour tester sa capacité à dégrader la matière lignocellulosique et à produire des lipopeptides à activité biosurfactante, la souche a été ensemencée sur un milieu constitué de 5% de grignons d'olives supplémenté par 0.5% d'extrait de levure et incubée à 37°C sous agitation de 150 rpm. Effectivement, durant les 72 h de fermentation la souche a hydrolysé les grignons d'olives en libérant différents oligosaccharides grâce à sa production d'une cellulase (CelH1). Cette dégradation a permis, en outre, de produire des lipopeptides à activité tensioactive et émulsifiante, avec une importante corrélation positive de production de l'enzyme et de biosurfactants de 77%. L'enzyme CelH1 a été, ensuite, purifiée 44.9 fois et récupérée avec un rendement de 80% et une activité spécifique de 453.04 U/mg de protéine, en utilisant, seulement, deux étapes successives : une ultrafiltration et une chromatographie échangeuse d'ions. En effet, la masse moléculaire de l'enzyme a été estimée à 26 kDa par SDS-PAGE, et son identification, par analyse LC-ESI-MS/MS, a montré qu'elle couvre 40% de la séquence d'une endo-1,3-1,4-β-glucanase qui appartient à la famille 16 des glycosydes hydrolases. L'activité enzymatique optimale a été obtenue à pH 6.0-6.5 et à 60-65 °C, l'enzyme demeurait stable après 48 h d'incubation dans les conditions du test. L'activité CelH1 la plus élevée a été mesurée sur le substrat β-glucane d'orge (604,5 U/mL) suivi du lichénane et de CMC, confirmant que l'enzyme étudiée est une endo-1,4-β-glucanase. La CelH1 est hautement thermotolérante et halotolérante conservant 77% de son activité à 70 °C et 70% en présence de 4 M NaCl. L'enzyme a un V_{max} de 625 U/min/mL et une haute affinité avec le β-glucane d'orge avec un K_m de 0.69 mg/mL. Elle a également montré une capacité significative à libérer des cello-oligosaccharides en hydrolysant le cellopentaose. Les lipopeptides produits par <i>B. velezensis</i> H1 sont partiellement purifiés en utilisant une colonne C18. L'analyse par HPLC de l'extrait lipopeptidique a montré que la souche de <i>B. velezensis</i> H1 a la capacité de produire au moins deux lipopeptides : la surfactine et la fengycine, sur le milieu à base de GO. Le potentiel biosurfactant et tensioactif de ces produits a été démontré par un test de Drop Collapse en utilisant l'huile d'olive et de paraffine comme substrats hydrophobes, un effondrement complet de ces derniers a été observé, dû à la réduction de la tension superficielle de la surface des substrats hydrophobes sous l'effet de l'extrait lipopeptidique.											
Mots clés : Matière lignocellulosique, grignons d'olives, <i>Bacillus velezensis</i> , biodégradation, endo-1,4-β-glucanase, halotolérance, thermotolérance, biosurfactants.											
Laboratoire Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri Constantine1.											
Membres du jury <table border="0"> <tr> <td>Président : HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid</td> <td>Pr. Université Frères Mentouri Constantine</td> </tr> <tr> <td>Directeur de thèse : KACEM CHAOUCHE Noredine</td> <td>Pr. Université Frères Mentouri Constantine</td> </tr> <tr> <td>Co-directeur de thèse : FLAHAUT Sigrid</td> <td>Pr. Université Libre de Bruxelles</td> </tr> <tr> <td>Examineur : SIFOUR Mohamed</td> <td>Pr. Université Mohamed Seddik Ben Yahia</td> </tr> <tr> <td>Examineur : BENHAMDI Asma</td> <td>MCA. Université Frères Mentouri Constantine</td> </tr> </table>		Président : HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid	Pr. Université Frères Mentouri Constantine	Directeur de thèse : KACEM CHAOUCHE Noredine	Pr. Université Frères Mentouri Constantine	Co-directeur de thèse : FLAHAUT Sigrid	Pr. Université Libre de Bruxelles	Examineur : SIFOUR Mohamed	Pr. Université Mohamed Seddik Ben Yahia	Examineur : BENHAMDI Asma	MCA. Université Frères Mentouri Constantine
Président : HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid	Pr. Université Frères Mentouri Constantine										
Directeur de thèse : KACEM CHAOUCHE Noredine	Pr. Université Frères Mentouri Constantine										
Co-directeur de thèse : FLAHAUT Sigrid	Pr. Université Libre de Bruxelles										
Examineur : SIFOUR Mohamed	Pr. Université Mohamed Seddik Ben Yahia										
Examineur : BENHAMDI Asma	MCA. Université Frères Mentouri Constantine										