

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Constantine 1

N° Série :

N° Ordre :

Co-tutelle

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie/ UFR des Sciences Exactes et Naturelles

Département de Microbiologie Laboratoire GMA/ Laboratoire de Microbiologie Industrielle

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Présentée par

Hind LEGHLIMI

Spécialité : Biotechnologie Génie microbiologique

Cellulases de souches fongiques issues du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes.

Soutenue le : 17/11/2013

Devant le jury :

Président : Mr. H. BOUSSEBOUA. Professeur. Université Constantine 1. Algérie.

Encadreur : Mme. Z. MERAIHI. Professeur. Université Constantine 1. Algérie.

Co-encadreur : Mr. F. DUCHIRON. Professeur. URCA. Reims. France.

Examineurs : Mr. J. BOUDRANT. Directeur de Recherche CNRS. Nancy. France.

Mr. D. HARZALLAH. Professeur. Université Ferhat. A. Sétif. Algérie.

Mme. L. GILLMANN. Maître de Conférence A. Université d'Angers. France

Année Universitaire : 2012/2013

Remerciements

Le travail exposé dans cette thèse est réalisé en co-tutelle entre la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Constantine 1 et la Faculté des Sciences Exactes et Naturelles de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à Madame le Professeur Zahia MERAIHI, mon promoteur, pour toute son aide, sa patience, son soutien et ses précieux conseils qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Francis DUCHIRON, Directeur de laboratoire de Microbiologie Industrielle de l'Université de Reims. Je le remercie pour son accueil au sein du laboratoire de Microbiologie Industrielle, ses conseils, ses encouragements et ses critiques constructives et avisés qui m'ont permis de mener à bien mon travail.

Mes vifs remerciements vont à Monsieur Hacène BOUSSEBOUA, Professeur de l'Université Constantine 1, d'avoir bien voulu présider le jury de soutenance de cette thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur Joseph BOUDRANT, Directeur de recherche au CNRS de Nancy, pour m'avoir fait le grand honneur de juger ce travail.

Je suis honorée de la présence au titre de rapporteur de Monsieur Daoud HARZALLAH, Professeur de l'Université Ferhat Abbas. Sétif. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude d'avoir accepté de jugé ce travail.

Je tiens à exprimer ma grande considération et mes vifs remerciements à Madame Louisa GILLMANN, Maître de Conférence de l'Université d'Angers, d'avoir accepté de juger ce travail.

J'aimerais pouvoir dire un grand merci à toute notre équipe du laboratoire pour leur aide. Je cite : Madame MEZIANI Zohra, Madame DAKHMOUCHE Scheherazed, Madame Bennamoun Leila, Mlle LABBANI Fatima-Zohra Kenza et Mlle BENAOUIDA Karima.

Ma reconnaissance va aussi à BOUKHALFA-LEZZAR Hayet et à BOUTAGHANE Naima qui ont eu la gentillesse, le soutien et l'encouragement pendant la période de mon stage.

J'attache une importance particulière à remercier les personnes du laboratoire de Microbiologie Industrielle, Estelle COPINET, Parissa ALIMARDANI-THEUIL, et Angélique GAINVORS-CLAISSE, maîtres de conférence, les doctorants Vincent PREVOT et Clémence RESTINO, Véronique GAILLET assistante ingénieur, pour leur aide et l'ambiance amicale qu'ils ont su créer. Je remercie les personnes des autres laboratoires qui m'ont aidé dans mon travail, et en particulier Alain BAUDON technicien au Laboratoire d'Ecotoxicologie.

SOMMAIRE

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE I : SYNTHESES DES CONNAISSANCES

1. Etude des cellulases.....	5
Introduction.....	5
1.1. Nomenclature de la cellulase.....	7
1.2. Définition de la cellulase.....	7
1.3. Mode d'action de la cellulase.....	7
1.4. Mécanisme d'action de la cellulase.....	10
1.5. Applications industrielles des cellulases.....	10
2. Etude des microorganismes cellulolytiques.....	12
Introduction.....	12
2.1. Microorganismes procaryotes.....	12
2.1.1. Les bactéries cellulolytiques.....	12
2.2. Microorganismes eucaryotes.....	17
2.2.1. Les protozoaires.....	17
2.2.2. Les champignons cellulolytiques.....	17
2.2.3. Les champignons du genre <i>Trichoderma</i>	19

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Isolement et criblage de souches fongiques productrices de cellulases.....	25
1.1. Echantillonnage.....	25
1.2. Isolement des moisissures.....	26
1.3. Purification et description des moisissures isolées.....	26
1.4. Conservation des souches fongiques isolées.....	26
1.5. Sporulation des moisissures.....	27
1.6. Identification des souches isolées.....	27

1.7. Criblage des souches cellulolytiques.....	28
2. Production de cellulases par la souche d'intérêt (<i>Trichoderma</i> "GHL")......	30
2.1. Microorganismes, préparation de l'inoculum.....	30
2.2. Milieu de production de cellulases.....	30
2.3. Conduite de la fermentation.....	30
2.4. Sous-clonage de la souche d'intérêt <i>Trichoderma</i> "GHL".....	31
2.5. Cinétique de production de l'activité cellulasique en fermenteur de 2 litres.....	31
2.6. Cinétique de production de l'activité cellulasique en fermenteur de 4 litres.....	32
2.7. Techniques analytiques.....	33
2.8. Caractérisation des enzymes.....	39
2.8.1. Activité en fonction de la température et du pH.....	39
2.8.2. Etude de la stabilité thermique.....	39
2.8.3. Etude de la stabilité au pH.....	40
2.8.4. Effet de composés chimiques sur les activités enzymatiques.....	40
2.8.5. Effet des ions sur les activités enzymatiques.....	40
2.8.6. Hydrolyse de différents substrats.....	41
2.8.7. Activité en fonction de la concentration en substrat.....	41
3. Analyse statistique.....	41

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Isolement et sélection des souches fongiques productrices de cellulases.....	43
1.2. Identification des souches isolées.....	48
1.2.1. Etude macroscopique.....	48
1.2.2. Etude microscopique.....	48
1.3. Sélection des souches cellulolytiques.....	54
1.3.1. Test au papier filtre.....	54
1.3.2. Test sur plaques à trous.....	57
1.4. Effet de la température sur la croissance des souches fongiques sélectionnées....	59
2. Production de cellulases.....	63
2.1. La souche cellulolytique d'intérêt.....	63

2.2. Comparaison de la production par les deux souches : la souche isolée <i>Trichoderma longibrachiatum</i> et la souche de référence <i>Trichoderma reesei</i> Rut C- 30.....	65
2.3. Effet du taux d'inoculum sur la production de cellulases par <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	68
2.4. Effet de l'âge des spores sur la production de cellulases par <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	71
2.5. Sous clonage de la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (GHL).....	73
2.6. Cinétique de production de cellulases en fermenteur de deux litres.....	76
2.7. Cinétique de production de cellulases par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (souche D) en fermenteur de quatre litres.....	78
2.8. Caractérisation des enzymes produites par l'isolat <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (GHL).....	83
2.8.1. Activité en fonction de la température et du pH.....	83
2.8.2. Etude de la stabilité à la température.....	86
2.8.3. Etude de la stabilité au pH.....	91
2.8.4. Effet de composés chimiques sur l'activité des enzymes.....	91
2.8.5. Effet des ions sur l'activité des enzymes.....	95
2.8.6. Hydrolyse de différents substrats.....	98
2.8.7. Activité en fonction de la concentration en substrat.....	101
CONCLUSION GENERALE.....	103
RESUMES.....	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	110
ANNEXES.....	127

Abréviations

APF : Activité Papier Filtre.

A_w : Activité de l'eau.

CBD : Cellulose Binding Domain.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

C/N : Rapport carbone/azote.

DNS : Acide 3,5 dinitrosalicylique

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique.

F : Statistique test Fisher.

K_m : Constante de Michaelis.

SDS : Sodium dodécylsulfate.

T : *Trichoderma*.

V_{max} : Vitesse maximale.

Liste des figures

Figure 1. Structure de la cellulose.....	4
Figure 2. Mode d'action de la cellulase fongique.....	6
Figure 3. Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase.....	9
Figure 4. Les 5 sections systématiques de <i>Trichoderma sp.</i>	20
Figure 5. Aspect microscopique de <i>Trichoderma</i>	22
Figure 6. Vue générale des trois stations thermales des régions de Guelma et de Mila.....	24
Figure 7. Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.....	35
Figure 8. Courbe étalon de <i>para</i> -nitrophénol pour le dosage de l'activité β -glucosidase.....	35
Figure 9. Courbe étalon pour le dosage des protéines.....	37
Figure 10. Test au papier filtre (après 7 jours d'incubation sur milieu minéral Mandel avec bandelette de papier à 30°C et à pH 5).....	53
Figure 11. Effet de la température sur la croissance des souches fongiques sélectionnées par le test au papier filtre.....	58
Figure 12. Effet de l'âge des spores sur la production des activités enzymatiques par la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	70
Figure 13. Fermentation avec les cinq souches issues du sous clonage de l'isolat <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (GHL).....	72
Figure 14. Cinétique de production des activités cellulasiqes en fermenteur de deux litres.....	75
Figure 15. Cinétique de production des activités cellulasiqes par la souche <i>Trichoderma</i> (GHL) sur milieu Mandel 10g.l ⁻¹ cellulose Avicel en fermenteur de quatre litres à 35°C.....	77
Figure 16. Evolution cinétique des protéines et du pH au cours de la croissance de <i>Trichoderma</i> (GHL) sur milieu Mandel 10g.l ⁻¹ cellulose Avicel en fermenteur de quatre litres à 35°C.....	77
Figure 17. Effet de la variation de température sur les activités enzymatiques de <i>Trichoderma</i> (GHL).....	82
Figure 18. Effet de la variation du pH sur les activités enzymatiques de <i>Trichoderma</i> (GHL).....	82
Figure 19. La stabilité thermique des activités Endoglucanase (A) et Papier filtre (B) produites par <i>Trichoderma</i> (GHL) à différentes températures.....	85

Figure 20. La stabilité thermique des activités Endoglucanase (A) et Papier filtre (B) produites par <i>Trichoderma</i> (GHL) à différentes températures en présence du substrat CMC (1%).....	88
Figure 21. La stabilité thermique des activités Endoglucanase (A) et Papier filtre (B) produites par <i>Trichoderma</i> (GHL) à différentes températures en présence du substrat CMC (2%).....	88
Figure 22. La stabilité au pH des activités Endoglucanase (A) et Papier filtre (B) produites par <i>Trichoderma</i> (GHL) à différents pH.....	90
Figure 23. La stabilité à pH 7,0 des activités Endoglucanase et Papier filtre produites par <i>Trichoderma</i> (GHL), en présence du substrat CMC (1%) et CMC (2%).....	90
Figure 24. Effet d'ion Calcium (Ca^{2+}) à différentes concentrations sur les activités Endoglucanase et Papier filtre produites par <i>Trichoderma</i> (GHL).....	96
Figure 25. Effet d'ion Zinc (Zn^{2+}) à différentes concentrations sur les activités Endoglucanase et Papier filtre produites par <i>Trichoderma</i> (GHL).....	96
Figure 26. Effet de la concentration en substrats (CMC et papier filtre) sur l'activité de l'extrait enzymatique brut produit par l'isolat <i>Trichoderma</i> (GHL).....	100
Figure 27. Paramètres cinétiques avec les deux substrats testés (CMC et papier filtre) de l'extrait enzymatique brut produit par l'isolat <i>Trichoderma</i> (GHL), selon la représentation de Lineweaver et Burk.....	100

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux microorganismes cellulolytiques et pseudocellulolytiques.....	13
Tableau 2. Isolement des souches fongiques en fonction de la profondeur des échantillons du sol.....	42
Tableau 3. Caractères macroscopiques des souches fongiques isolées.....	45
Tableau 4. Caractères microscopiques des souches fongiques isolées.....	49
Tableau 5. Diamètre en mm des halos d'hydrolyse obtenus sur cellulose Walseth à 35°C...56	
Tableau 6. Diamètre en mm des halos d'hydrolyse obtenus sur cellulose Walseth à 30°C...56	
Tableau 7. Vitesse d'élongation des mycéliums des 6 souches productrices des cellulases à différentes températures de croissance.....	60
Tableau 8. Catégories de champignons selon leur gamme de température de développement.....	62
Tableau 9. Comparaison de la production de la cellulase par <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (J ₂) et <i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30.....	64
Tableau 10. Effet du taux d'inoculum sur la production de l'enzyme par la souche <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (à 35°C).....	67
Tableau 11. Evolution cinétique des activités enzymatiques spécifiques au cours de la croissance de <i>Trichoderma</i> (GHL) sur milieu Mandel 10g.l ⁻¹ cellulose Avicel en fermenteur de quatre litres à 35°C.....	79
Tableau 12. Effet de composés chimiques sur l'activité des enzymes.....	92
Tableau 13. Effet des ions sur l'activité des enzymes.....	94
Tableau 14. Spécificité de substrat de l'extrait enzymatique brut.....	98

INTRODUCTION GENERALE

Les champignons filamenteux microscopiques, sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes. Cosmopolites, ils sont retrouvés partout dans la nature. Ils jouent un rôle essentiel de recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir des sources carbonées externes (Chabasse *et al.* 2002). Les moisissures disposent des potentialités d'applications biotechnologiques très étendues, grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé, dû à un patrimoine génétique particulier qui explique leur grande capacité d'adaptation (Leveau et Bouix, 1993). Ces microorganismes peuvent cohabiter dans des environnements extrêmes où les conditions de vie sont particulières : température et pression élevées, pH acides... En effet, ces organismes représentent une importante source à exploiter pour développer des procédés biotechnologiques nouveaux, mais aussi pour comprendre les mécanismes qui permettent aux biomolécules d'être stables et actives dans des conditions extrêmes. Ils peuvent, par exemple, fournir des enzymes thermostables pour des applications dans les procédés industriels qui exigent l'emploi d'enzymes spécifiques et thermostables, non dénaturés à des températures supérieures ou égale à 70°C (Bhat, 2000; Peciulyte, 2007). Pour répondre à cette exigence, la présente étude nous amène, à la recherche et à l'isolement de moisissures d'un écosystème extrême (sols proches de sources thermales), et nous recherchons notamment la production d'une cellulase thermostable d'intérêt industriel.

Parmi les enzymes d'intérêt industriel, il existe des cellulases pour lesquelles l'industrie porte une attention toute particulière grâce à leur grand potentiel biotechnologique, industriel (industries du textile, des détergents, du papier, les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et de l'alimentation animale) et le recyclage de la biomasse cellulosique (Korish, 2003; Moussa et Tharwat, 2007). En effet, après la crise énergétique de 1973, un vif intérêt des pouvoirs publics s'est porté sur les ressources renouvelables. A ce titre, la cellulase fut naturellement au centre des recherches pour la production de carburants de substitutions (méthane, alcools) et même pour étudier de nouvelles filières de production de molécules chimiques à partir de la cellulose, étant présentée comme une alternative à la pétrochimie dans la fabrication de nouveaux biopolymères, biosolvants et biodétergents (Roussos, 1987).

Le bio-éthanol apparaît donc comme un débouché pour l'agriculture mais aussi comme un débouché pour l'industrie. En effet, l'opportunité se présente maintenant de proposer des alternatives telles que l'utilisation des terres disponibles pour la production des matières premières destinées à la fabrication de bio-éthanol carburant au lieu de recours au gel des terres. On pourrait ainsi réduire les dépendances énergétiques vis-à-vis du pétrole et diminuer aussi les émissions polluantes liées à la combustion des hydrocarbures (Gantelet, 1996). La perspective de production d'alcools à partir de la cellulose est plus intéressante. Cependant, la rentabilité économique est étroitement liée à la production de cellulases et les technologies enzymatiques de la saccharification de la cellulose. En effet, la dégradation de la cellulose par les microorganismes cellulolytiques a fait l'objet de nombreux travaux, en ce qui concerne la sélection des microorganismes cellulolytiques, les mutations génétiques pour l'obtention de souches hyperproductrices et les conditions de culture des microorganismes impliqués.

Ainsi, l'application croissante de l'enzyme appelle à un besoin urgent pour l'exploration des microorganismes issus de milieux extrêmes, comme source précieuse de cette enzyme commerciale.

Dans ce cadre, les objectifs de notre étude sont :

- L'isolement des souches de moisissures productrices de cellulases, issues de sols environnants : les stations thermales des régions de Hammam Debagh – Guelma, Hammam Grouz-Atmania et Hammam Safsaf Teleghma - Mila (Est - Algérie).
- L'identification des moisissures isolées productrices et la sélection de la souche d'intérêt, la plus performante dans la production de cellulases.
- L'évaluation des potentialités des activités enzymatiques, dans le sens d'une étude comparative ; avec la moisissure de référence *Trichoderma reesei* Rut C-30.
- L'étude de l'influence de certains facteurs (taux d'ensemencement et âge des spores) sur la production des enzymes recherchées, par la moisissure retenue.
- La réalisation d'un sous-clonage de la moisissure étudiée afin d'assurer sa stabilité au cours des repiquages, et d'avoir derrière une production de spores régulière pour une répétabilité de la production d'enzymes.

- L'étude des profils cinétiques de production des activités enzymatiques par la souche sélectionnée, dont le but est de déterminer le temps de culture pour une production maximale.
- Enfin, terminer ce travail par l'étude de quelques caractéristiques physico-chimiques (température et pH optimum, stabilité à la température et au pH, effet de certains composés chimiques, certains ions métalliques et l'hydrolyse de certains substrats) et la détermination des constantes de cinétique (K_m et V_{max}) de notre extrait enzymatique brut, qui s'avère utile pour la mise en application industrielle ultérieure de cette enzyme.

Synthèse des connaissances

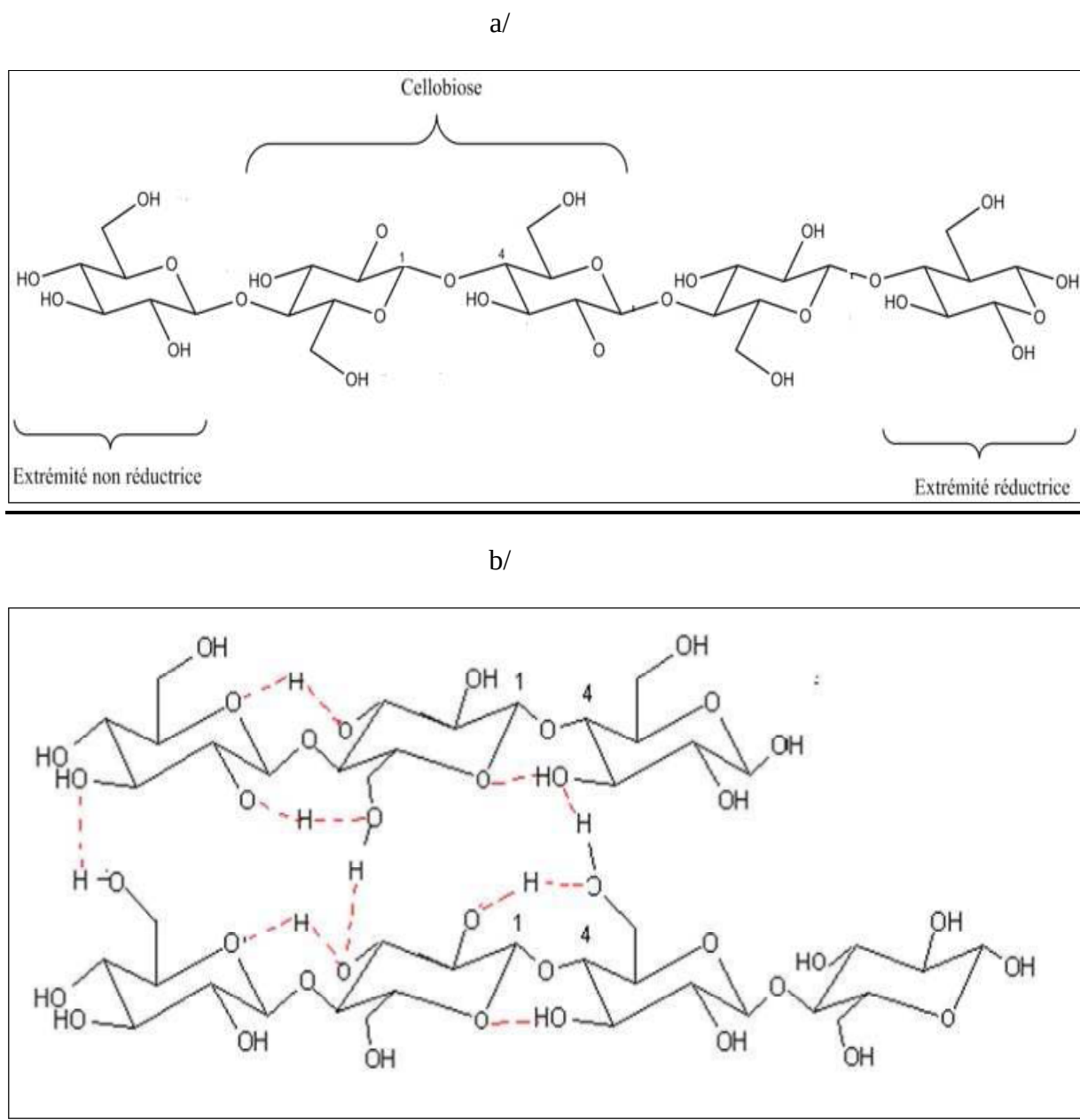


Figure 1 : Structure de la cellulose. a/ Représentation de la chaîne de cellulose ; b/ Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose. (Stryer *et al.*, 2003).

1. Etude des cellulases

Introduction

La cellulose, substrat des cellulases, est un polymère glucidique (polysaccharide), formé par l'enchaînement linéaire de monomères de glucose, reliés par des liaisons glycosidiques β 1-4 (figure 1). Dans ce cas, l'association de deux monomères de glucose forment une unité cellobiose. Le nombre de monomères de glucose définit le degré de polymérisation (DP) de la cellulose. Le grand nombre de groupements hydroxyles permet l'établissement de liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires formant ainsi un réseau tridimensionnel rigide et insoluble (Gandini et Pasquini, 2012). La molécule de cellulose participe sur sa longueur, à des structures cristallines (représentées par un cristal monocyclique contenant deux unités cellobiose « 4-o- β -D-glucopyranosyl-D-glucose » de deux chaînes de cellulose antiparallèles) et amorphes (sans cohésion avec des liaisons hydrogène) (Levy *et al.*, 2002).

Mettre la figure 1 ici par exemple

Par ailleurs, la cellulose est le produit de l'utilisation de l'énergie solaire et du dioxyde de carbone par les végétaux via la photosynthèse. C'est le bio polymère le plus abondant, et la seule source de carbone renouvelable sur terre (Romero *et al.*, 1999). Sa décomposition en sucres simples, permettrait de résoudre de nombreux problèmes, comme la pollution de l'environnement (par la bioconversion des déchets urbains, industriels et agroindustriels) ainsi que des problèmes énergétiques (par la production d'énergie : alcool, méthane) (Roussos et Hannibal, 1984). Sa biodégradation est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre, assurée par des microorganismes cellulolytiques sécrétant des cellulases (Lekchiri *et al.*, 2006).

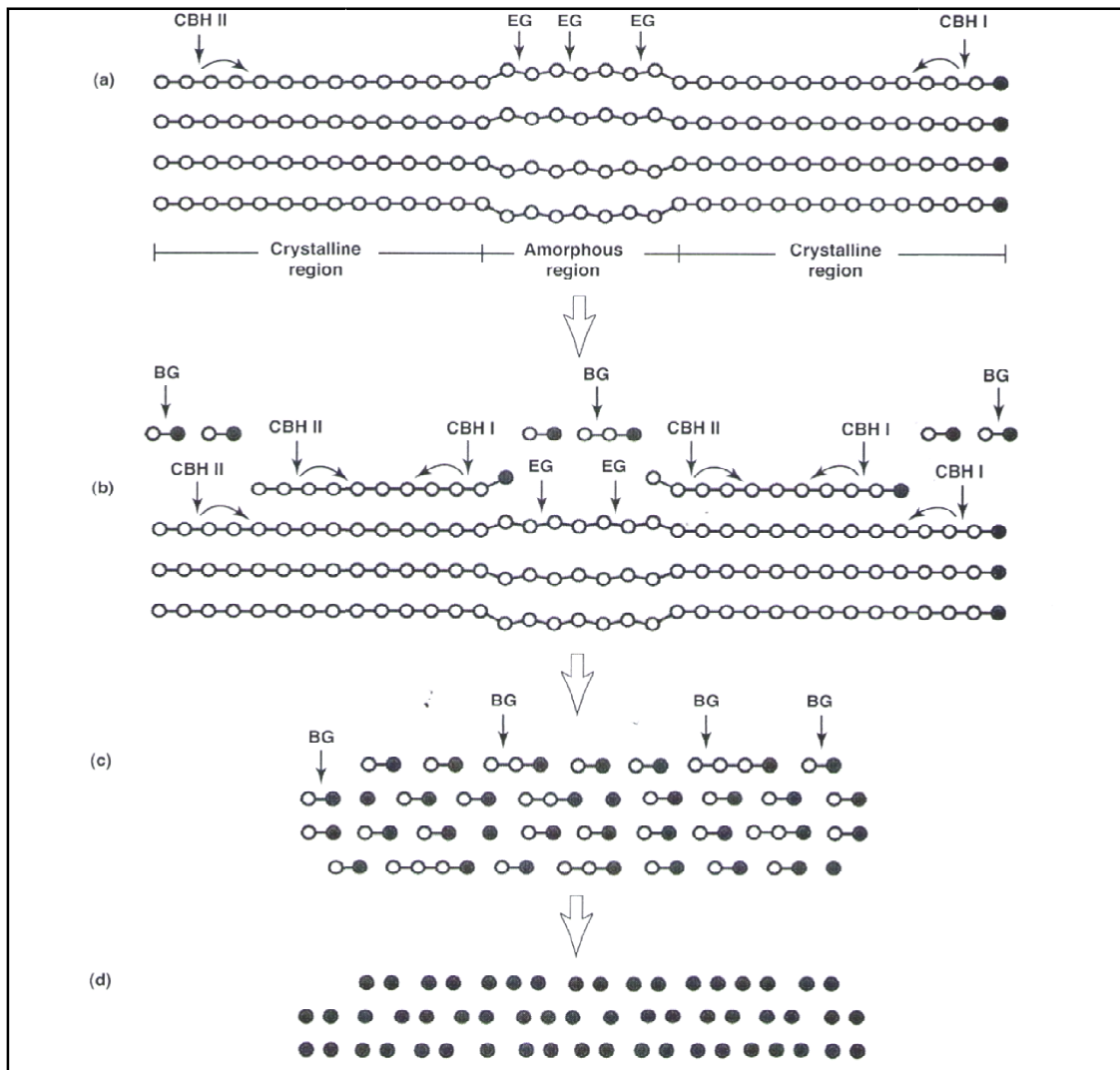


Figure 2 : Mode d'action des cellulases fongiques (Gusakov, 2011).

-Les cercles vides représentent les résidus anhydroglucose de la cellulose et des oligosaccharides.

-Les cercles pleins représentent les extrémités réductrices de la cellulose, des oligosaccharides ou de glucose.

(a) Cellulose initiale avec les régions cristallines et les régions amorphes

(b) Cellulose partiellement hydrolysée

(c) Solution contenant le cellobiose (disaccharide) comme produit majeur intermédiaire, avec des quantités faibles d'oligosaccharides et de glucose

(d) Sirop de glucose final.

Les exoenzymes cellobiohydrolases de La famille 6 (CBH II) et de la famille 7 (CBH I) attaquent la cellulose d'une façon processive, à partir des extrémités non réductrices et des extrémités réductrices, respectivement, libérant le cellobiose.

1.1. Nomenclature des cellulases

Nom codifié : E.C.3.2.1.4

Nom systématique : 1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucan 4-glucanohydrolase.

Nom recommandé : Cellulase.

Synonymes : Endoglucanase, Endo-1,4- β -Glucanase, Cellulase carboxyméthylque, β -1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, ect. (Schamburg et Salzmann, 1991).

1.2. Définition des cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (Kader *et al.*, 1999; Korish, 2003). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo β (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (Xu, 2002) :

- L'endo-cellulase (EC 3.2.1.4) casse les liaisons internes pour perturber la structure cristalline de la cellulose et pour exposer différentes chaînes de polysaccharide de cellulose, en diminuant rapidement le degré de polymérisation du substrat (Kleman-Leyer *et al.*, 1994; Davies et Hanrissat, 1995; Harjunpaa *et al.*, 1996; Warren, 1996; Xu *et al.*, 2000). Les endoglucanases coupent la cellulose aléatoirement au niveau des zones amorphes de la cellulose, générant de nouvelles extrémités de chaînes.
- L'exoglucanase (EC 3.2.1.91) attaque les liaisons β (1-4) glycosidiques des chaînes de cellulose par les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose (Teeri, 1997; Xu, 2002).
- La cellobiase (EC 3.2.1.21) hydrolyse les liaisons β (1-4) glycosidiques du cellobiose, pour donner deux molécules de glucose (Onsori *et al.*, 2005).

1.3. Mode d'action des cellulases

Les trois principaux types d'enzymes constituant le complexe cellulasique, peuvent présenter différents modes d'action (figure 2) :

- La première enzyme (endocellulase) rompt les liaisons internes de la chaîne cellulosique, d'une façon aléatoire et entraîne la libération de cellodextrines, du cellobiose et du glucose. Elle est très active sur les celluloses solubles. L'attaque «au hasard» de l'endocellulase a pour effet de créer de nouvelles extrémités non réductrices qui sont des sites réactifs pour la cellobiohydrolase (Hasper *et al.*, 2002).
- La deuxième enzyme (cellobiohydrolase) (EC 3.2.1.91), attaque les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libère des résidus cellobiose. L'enzyme seule n'est active, ni sur la cellulose cristalline, ni sur les celluloses solubles (carboxyméthylcellulose). Par contre, elle attaque les celluloses partiellement dégradées. Le rôle essentiel de cette enzyme est de permettre l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline (Scriban, 1993).

La complémentarité des deux types d'enzymes explique en partie l'effet synergique du mélange. Par contre, le mécanisme de coopération cellobiohydrolase/endocellulase, permettant l'hydrolyse de la cellulose cristalline, reste mal connu (Scriban, 1993 ; Josefsson, 2006).

- La cellobiase peut être active sur les β (1-4) oligoglucosides, mais l'activité diminue rapidement quand la longueur de la chaîne augmente (Scriban, 1993, Josefsson, 2006).

Outre la complémentarité de leurs actions pour réaliser une hydrolyse totale de la cellulose, le complexe enzymatique de la cellulase travaille en synergie, c'est-à-dire que l'activité des enzymes lors d'une mise en œuvre en commun est supérieure à la somme de leurs activités individuelles (Lynd *et al.*, 2002), expliquée par une coopération d'action entre les trois composantes d'enzymes, dans laquelle le produit d'une réaction enzymatique devient le substrat pour une autre (Fang, 2008). Quatre formes de synergie ont été décrites : une synergie endo-exo entre endoglucanases et exoglucanases (Lemos *et al.*, 2003) ; une synergie exo-exo entre exoglucanases agissant aux extrémités réductrices des chaînes de cellulose et celles agissant aux extrémités non-réductrices ; une synergie entre les exoglucanases et les β -glucosidases qui hydrolysent le cellobiose, produit final inhibiteur des cellobiohydrolases (Lynd *et al.*, 2002) et une synergie intramoléculaire entre domaines catalytiques et [CBM](#) (Mosier *et al.*, 1999; Josefsson, 2006).

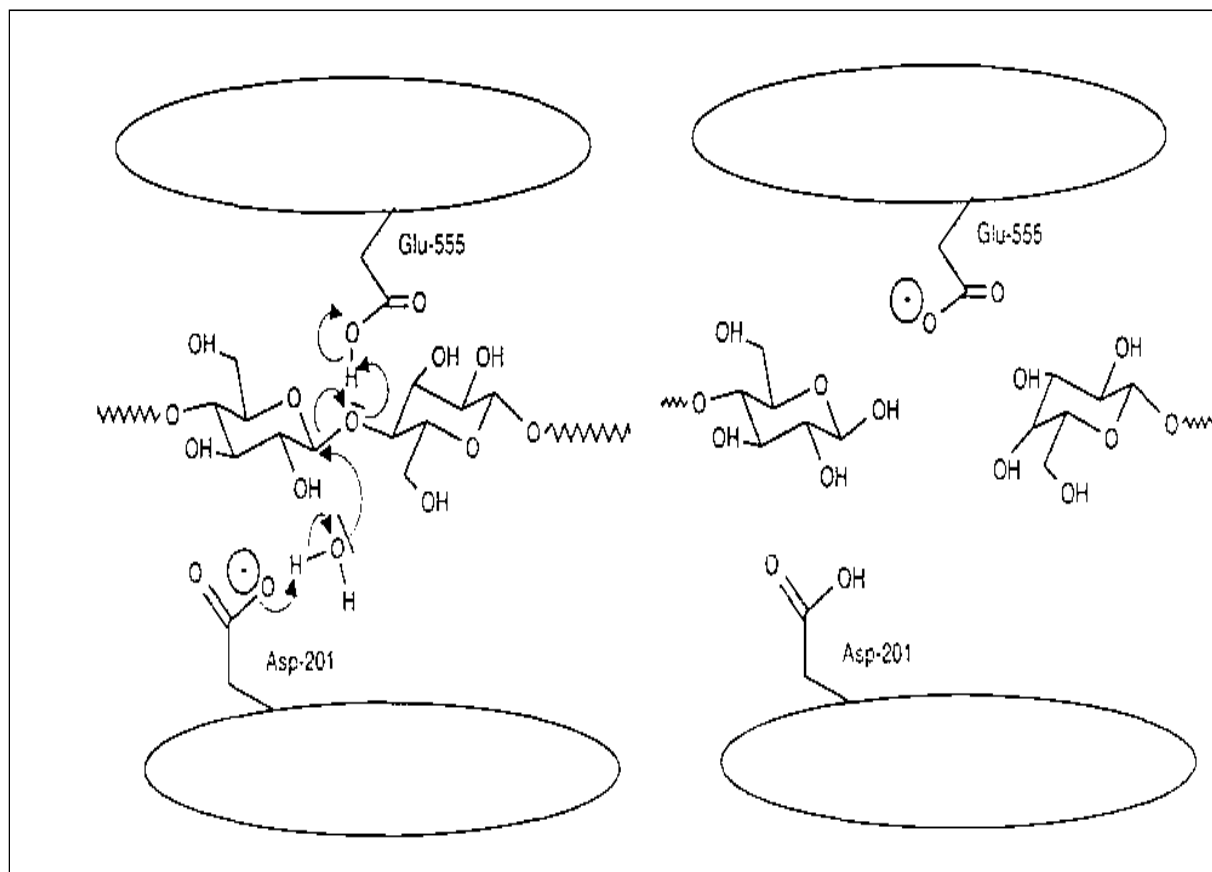


Figure 3 : Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (Béguin et Aubert, 1994).

Asp : Acide aspartique en position 201 de la séquence de l'enzyme

Glu : Acide glutamique en position 555 de la séquence de l'enzyme.

1.4. Mécanisme d'action des cellulases

Le mécanisme d'action est de type acide/base, exigeant un donneur de proton et une base nucléophile (Figure 3) (Sinnott, 1990; Davies et Henrissat, 1995). Cette hydrolyse se fait avec rétention ou inversion de la configuration anomérique (Davies et Henrissat, 1995). Les produits d'hydrolyse sont ainsi libérés par conservation ou inversion globale de la configuration anomérique du carbone alpha à l'extrémité réductrice. L'hydrolyse enzymatique se fait en deux étapes réactionnelles : dans la première étape, la base nucléophile attaque le centre anomérique du substrat, d'autre part, le donneur de protons (un premier acide aminé de la cellulase) protone l'oxygène de la liaison osidique, provoquant ainsi la coupure de la liaison C1 – O et la libération du premier fragment du substrat. Cependant, l'autre fragment, fixé à l'enzyme de façon instable, sera stabilisé par un second acide aminé de l'enzyme chargé négativement, qui arrache un hydrogène à une molécule d'eau formant ainsi un groupement hydroxyle (OH⁻) qui agit comme un nucléophile sur un carbone d'une molécule de glucose. La liaison glycosidique se trouve ainsi rompue et libère l'autre fragment du substrat (Béguin et Aubert, 1994 ; Dan *et al.*, 2000 ; Munoz *et al.*, 2001).

1.5. Applications industrielles des cellulases

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson, 1987) et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Bhat, 2000, Lekchiri *et al.*, 2006). Les performances élevées atteintes leur ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban, 1993), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (Gao *et al.*, 2008). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique.

- ***Production de biocarburants (pour la couverture énergétique)***

Les combustibles fossiles, tels que le pétrole et le charbon, sont une source principale d'énergie. Cependant, cette source d'énergie a de nombreux effets néfastes sur l'environnement (pollution atmosphérique, réchauffement de la planète et l'émission de gaz à effet de serre). Dans un effort de réduire ces effets néfastes sur l'environnement, des sources énergétiques alternatives sont mis en évidence (Smeets *et al.*, 2004). Le bioéthanol est

l'éthanol élaboré à partir de la biomasse végétale, son rendement énergétique est voisin de celui de l'essence, il est obtenu à partir de substrats fermentescibles (canne à sucre, betterave sucrière, maïs, orge, blé, pomme de terre...), ce biocarburant est appelé carburant de première génération (Thérien, 2006), le carburant de deuxième génération est obtenu à partir de la cellulose (résidus agricoles : la paille ou les cannes de maïs, résidus forestiers) (Pimentel et Patzek, 2005).

- **Industrie agro-alimentaire**

En industrie agro-alimentaire, les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques manipulées par ce type d'industrie (Scriban, 1993). Les cellulases sont employées avec d'autres enzymes dégradant la paroi végétale, dans le traitement des fruits et de légumes et dans l'industrie des boissons.

- **Industrie du textile et des détergents**

Depuis 1990, les textiles et les détergents constituent les plus grands marchés mondiaux pour l'utilisation des cellulases. Les cellulases sont employées dans l'industrie du textile pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage (Gusakov *et al.*, 2000), pour ramollir des tissus, pour enlever les nœuds (constituent des défauts de colorant), et dans les détergents de blanchisserie afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Bhat, 2000 ; Levy *et al.*, 2002).

- **Industrie du papier ou papetière**

L'addition de cellulases aux suspensions de pâtes (en cours de lavage) ou en suspension de pâtes de papiers de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1999).

- **Nutrition animale**

C'est un autre marché qui pourrait s'ouvrir pour ces enzymes utilisées comme additifs pour l'alimentation de bétail car L'addition de cellulases aux aliments pour volailles ou porcins améliore la digestibilité de leur fraction cellulosique et permet ainsi de réduire à la fois, les consommations de sources d'énergie (amidon) et l'excrétion de cellulose non digérée (la charge polluante des excréments) (Gusakov *et al.*, 2000).

- **Domaine thérapeutique**

L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1999). Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viride* sont utilisées en association avec des α -amylases fongiques, pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Rivière, 1975).

2. Etude des microorganismes cellulolytiques

Introduction

La cellulolyse est l'étape fondamentale de la transformation de la cellulose en sucres fermentescibles et en produits économiquement rentables, Elle correspond à l'hydrolyse biologique de la cellulose en molécules de plus petite taille comme les cellodextrines, le cellobiose et le glucose. Les cellulases sont largement répandues dans la nature (Xu *et al.*, 2000). Elles sont produites principalement par les champignons, les bactéries et les protozoaires qui catalysent l'hydrolyse de la cellulose. Cependant, il y a également des cellulases produites par d'autres organismes vivants comme : les plantes, les vers, les mollusques, les insectes, etc. (Odier et Rouau, 1985). De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale, et microbienne.

La flore cellulolytiques est très variée; elle se retrouve dans des écosystèmes divers constitués par les composts, les fumiers, les litières, les boues d'estuaires, le fond des lacs et le tractus digestif des animaux. Ces microorganismes appartiennent à des groupes taxonomiques très variés pouvant être groupés suivant leur appartenance au groupe Eucaryotes ou Procaryotes, leur température de croissance qui permet de distinguer les microorganismes mésophiles et les microorganismes thermophiles, et enfin suivant leur comportement vis-à-vis de l'oxygène (tableau 1) (Tchunden, 1990).

2.1. Microorganismes procaryotes

Ce groupe comprend les bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques. Suivant le mode de respiration, on distingue les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

2.1.1. Les bactéries cellulolytiques

Les bactéries sont moins étudiées que les champignons. Cependant certaines d'entre elles ont fait l'objet de nombreux travaux (tableau 1).

Clostridium thermocellum est la bactérie cellulolytique la mieux connue et la plus étudiée ; Elle permet la conversion directe de la cellulose en éthanol, en acides organiques et

Tableau 1 : Principaux microorganismes cellulolytiques et pseudocellulolytiques. (D'après Bagnara, 1986 ; modifié par Cailliez, 1991).

Organisme	Température de croissance	Métabolisme énergétique
Les EUCARYOTES :		
PROTOZOAIRE :		
<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	M	An
CHAMPIGNONS :		
*Zygomycètes :		
<i>Mucor pusillus</i>	T	Ae
<i>Rhizopus stolonifer</i>	M	Ae
*Ascomycètes :		
<i>Talaromyces emersonii</i>	T	Ae
<i>Chaetomium thermophile</i>	T	Ae
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	M/Tt	Ae
*Basidiomycètes:		
<i>Sclerotium rolfsii</i>	M	Ae
<i>Irpex lacteus</i>	M	Ae
<i>Lenzites trabae</i>	M	Ae
<i>Pleurotus</i>	T	Ae
<i>Sporotrichum thermophile</i>	M	Ae
<i>Sporotrichum pulverulum</i>	M	Ae
*Champignons imparfaits:		
<i>Verticillium albo-atrum</i>	M	Ae
<i>Alternaria alternata</i>	M	Ae
<i>Fusarium solani</i>	M	Ae
<i>Fusarium lini</i>	M	Ae
<i>Penicillium pinophilum</i>	M	Ae
<i>Aspergillus niger</i>	M	Ae
<i>Aspergillus fumigatus</i>	M/Tt	Ae
<i>Aspergillus terreus</i>	M/Tt	Ae
<i>Trichoderma koningii</i>	M	Ae
<i>Trichoderma viride/ T. reesei</i>	M	Ae
<i>Myrothecium verrucaria</i>	M	Ae
*Champignons anaérobies :		
<i>Neocallimastix frontalis</i>	M	An
<i>Piromonas communis</i>	M	An

<i>Sphaeromonas communis</i>	M	An
Les PROCARYOTES :		
Bactéries GRAM négatif :		
*Cytophagaceae :		
<i>Cytophaga sp</i>	M	Ae
<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	M	Ae
*Pseudomonadaceae :		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio gilvus</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio fulvus</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio vulgaris</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio mixtus</i>	M	Ae
*Enterobacteriaceae :		
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	M	Ae/An fac
<i>Erwinia carotovoera</i>	M	Ae/An fac
*Bacteroidaceae :		
<i>Bactroides succinogenes</i>	M	An
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	M	An
<i>Butyvibrio fibrisolvens</i>	M	An
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	M	An
<i>Acetivibrio cellulosolvens</i>	M	An
Bactéries GRAM positif :		
*Bacillaceae :		
<i>Bacillus circulans</i>	M	Ae/An fac
<i>Bacillus coagulans</i>	M	Ae/An fac
<i>Bacillus laterosporus</i>	M	Ae/An fac
<i>Bacillus licheniformis</i>	M	Ae/An fac
<i>Clostridium aldrichii</i>	M	An
<i>Clostridium C7</i>	M	An
<i>Clostridium celerecrescens</i>	M	An
<i>Clostridium cellobioparum</i>	M	An
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	M	An
<i>Clostridium cellulovorans</i>	M	An
<i>Clostridium chartatabidum</i>	M	An
<i>Clostridium josui</i>	M	An
<i>Clostridium lochheadii</i>	M	An
<i>Clostridium longisporium</i>	M	An
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	M	An
<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	M	An

<i>Clostridium populeti</i>	M	An
<i>Clostridium stercorarium</i>	T	An
<i>Clostridium thermocellum</i>	T	An
<i>Clostridium thermocopriaea</i>	T	An
<i>Thermoanaerobacter cellulyticus</i>	T	An
*Corynébactéries:		
<i>Cellulomonas biazota</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas cartae</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas cellasea</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas fimi</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas flavigena</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas gelida</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas turbada</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas uda</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas sp. Souche CB 4</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas sp. Souche IIbc</i>	M	Ae/An fac
<i>Cellulomonas sp. Souche CS1-1</i>	M	Ae/An fac
*Micrococcaceae :		
<i>Ruminococcus albus</i>	M	An
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	M	An
*Actinomycètes :		
<i>Micromonospora propionici</i>	M	Ae
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	M	Ae
<i>Streptomyces lividans</i>	M	Ae
<i>Thermonospora curvata</i>	T	Ae/An fac

M: mésophile, *T*: thermophile, *M/Tt*: mésophile thermotolérant, *Ae*: aérobie, *An*: anaérobie, *Ae/An fac*: aérobie, anaérobie facultative.

en gaz (CO₂, H₂). C'est l'une des rares bactéries qui produit des cellulases aussi efficaces dans l'hydrolyse de la cellulose cristalline (Johnson *et al.*, 1982) que les cellulases de *Trichoderma reesei*. *Cl. thermocellum* est une bactérie anaérobie saprophyte. Son système enzymatique est très étudié. Les cellulases secrétées par cette bactérie ont tendance à s'associer en un complexe de haute masse molaire (2 millions de daltons) appelé cellulosome (Lamed *et al.*, 1983; Bayer *et al.*, 1983), composé d'au moins 14-18 polypeptides de masse molaire comprise entre 48 000 et 210000 daltons.

A côté de *Cl. thermocellum*, certaines bactéries ont été également étudiées et possèdent des caractéristiques remarquables. C'est le cas de *Bacteroides succinogenes* qui est capable de dégrader les celluloses les plus cristallines. Elle adhère fortement aux fibres de cellulose. Le système cellulolytique de cet organisme semble particulièrement complexe (Schellhorn et Forsberg, 1984). *Acetivibrio cellulolyticus*, bactérie anaérobie mésophile ne semble capable de fermenter que la salicine, le cellobiose et la cellulose en produisant principalement de l'acide acétique et des gaz (H₂, CO₂) ; de plus cette bactérie possède une forte activité cellulase sur différents types de substrats cellulosiques (Patel et Mc Kenzie, 1982). Les bactéries aérobies et aérobies-anaérobies facultatives comprennent les genres *Pseudomonas*, *Cellvibrio* et *Cellulomonas*. Les *Cellulomonas* sont des organismes capables d'utiliser de nombreuses sources de carbone et entre autres les hémicelluloses comme le xylane (Peiris et Rickard, 1982). La fermentation de ces sucres conduit à la production d'acétone, de lactate, de formate, de succinate, d'éthanol et de gaz carbonique.

Certaines souches d'actinomycètes produisent des cellulases : *Streptomyces reticuli* (Schlochtermeyer *et al.*, 1992) et *Thermomonospora fusca* (Tuncer *et al.*, 1999) des cellulases ont été aussi déterminées. Les archaebactéries comme *Thermotoga neapolitana* (Bok *et al.*, 1998) et *Pyrococcus horikoshii* (Ando *et al.*, 2002) constituent une source importante de cellulases thermostables pouvant résister à des températures supérieures à 100°C pendant plus d'une heure.

2.2. Microorganismes eucaryotes

Ce groupe comprend les protozoaires et les champignons (tableau 1).

2.2.1. Les protozoaires

L'étude de la dégradation de la cellulose en sucres par les protozoaires présente des difficultés dues à l'interférence des métabolismes des bactéries symbiotiques hébergées (Tchunden, 1990). Des cellulases ont été également identifiées chez les protozoaires comme *Epidinium caudatum* et *Eudiplodinium ostracodinium* (Moracci *et al.*, 2001).

2.2.2. Les champignons cellulolytiques

Reese, en 1950, a mis en évidence une activité cellulolytique chez les champignons saprophytes, appartenant principalement à la classe des champignons imparfaits et à celle des basidiomycètes.

En dépit de la concurrence des bactéries, les moisissures occupent une place importante sur le marché des cellulases dont les producteurs principaux sont les *Aspergillus* et les *Trichoderma*. Ces champignons filamenteux sont les plus connus et les plus efficaces pour la dégradation des polysaccharides des parois cellulaires végétales, en produisant des mélanges d'enzymes hydrolytiques extra cellulaires (Hasper *et al.*, 2002). Le système de dégradation de la cellulose par ces moisissures est complexe et constitué de : endoglucanases, cellobiohydrolase et β -glucosidases (Beguín, 1990).

• Les champignons imparfaits

Parmi les cellulolytiques vrais ; *Trichoderma viride* (Li *et al.*, 1965) et son mutant hyperproducteur *Trichoderma reesei*. *Fusarium solani* (Wood, 1971); *Penicillium funiculosum* (Wood et Mc Care, 1979). De nombreuses espèces mésophiles sont décrites pour leur activité cellulolytique: *Penicillium iriensis* (Boretti *et al.*, 1973); *Fusarium avenaceum* (Zalewska *et al.*, 1981); *Aspergillus niger* (Pettersson et Porath, 1963). Dans le groupe des champignons imparfaits, *Trichoderma reesei* est l'espèce la plus étudiée en raison de ses potentialités commerciales. A l'heure actuelle les souches de *Trichoderma viride* et d'*Aspergillus niger* sont les plus importantes sources de cellulases à vocation industrielle.

Cependant certains champignons thermophiles sont étudiés pour leurs potentialités cellulasiques. *Talaromyces emersonii* est capable de produire des quantités importantes de cellulases en 50 heures alors qu'il faut 5 à 8 jours à *Trichoderma viride*. De plus les enzymes produites par cette souche sont très stables à l'agitation et à la chaleur (Moloney *et al.* 1983).

Les espèces d'*Aspergillus* (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus wentii*) sont capables de produire des cellulases en faible quantité. D'autres espèces d'*Aspergillus* comme *Aspergillus terreus* et *Aspergillus fumigatus*, sont capables de se développer sur la cellulose microcristalline en produisant des quantités importantes de β -glucosidases (Riccio *et al.*, 1999).

Les cellulases produites par des espèces d'*Aspergillus* sont généralement riches en endo- β -glucanase et β -glucosidase, mais pauvres en exo- β -glucosidases, de ce fait elles ont une action limitée sur la cellulose microcristalline (Riccio *et al.*, 1999).

• **Les Basidiomycètes**

L'espèce la plus étudiée est *Sporotrichum pulverulentum*, avec des activités cellulolytiques et lignolytique (Ander *et al.*, 1983; Streamer *et al.*, 1975).

Toutes ces espèces attaquent le bois (pourriture blanche du bois). Le complexe enzymatique de la souche *Sporotrichum pulverulentum* comprend des endoglucanases, exoglucanases, glucosidases, xylanases, lactonases, glucose oxydases, cellobiose oxydases, cellobiose quinone oxido réductases, catalases, laccases, peroxydases ainsi que des enzymes de dégradation de la lignine en monomère. Ce microorganisme est capable de produire des protéines d'organismes unicellulaires à partir de substrats lignocellulosiques. La souche *S. thermophile* est également proposée comme modèle pour l'étude de la régulation de biosynthèse des cellulases (induction- répression) dans le cas des espèces thermophiles (Roussos, 1987).

• **Les Ascomycètes**

Dans ce groupe, l'espèce *Talaromyces emersonii* produit de grandes quantités de cellulases (Mc Hale et Coughlan, 1980-1981). D'autres champignons anaérobies stricts (*Néocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas communis*) sont capables de coloniser les particules végétales du rumen du bovin et du mouton, grâce à un équipement enzymatique très complet permettant d'hydrolyser les polysaccharides des parois cellulaires végétales (Williams et Orpin, 1987).

La capacité cellulolytique des levures est rapportée dans la littérature (Steven et Payne, 1977 ; Scriban, 1993, Korish, 2003), on peut citer le genre *Trichosporon* (genre principal de levures cellulolytiques) (Scriban, 1993), *Candida molischiana*, *Cryptococcus flavus*, *Kloeckera apiculata*, etc. Le système enzymatique de la cellulase des levures est constitué par

des endoglucanases et/ou des β -glucosidase (Oikawa, 1998; Witkowska et Piegza, 2006). Ces dernières constituent le type d'enzymes cellulases le plus fréquent chez les levures (Witkowska et Piegza, 2006).

2.2.3. Les champignons du genre *Trichoderma*

Le genre *Trichoderma* est une moisissure imparfaite de type mésophile aérobie retrouvée dans les sols des régions tropicales. Selon la structure des conidiophores et selon la morphologie des conidies ; la taxonomie du genre *Trichoderma* comporte neuf espèces: *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* et *T. viride* (Rifai, 1969).

- **Historique**

Durant la seconde guerre mondiale, en Nouvelle Guinée, une moisissure s'est avérée responsable de la destruction des vêtements et tentes en coton de l'armée américaine. Elwyn T. Reese et Mary Mandels ont isolé et identifié cette moisissure comme étant un *Trichoderma* souche QM6a (Eveleigh et Mandels, 1998). Leurs travaux faits au Centre de recherche et développement Natick de l'armée américaine ont visé en premier à éliminer la détérioration du matériel à base de coton mais leur objectif initial s'est modifié pour s'intéresser à l'utilisation de cellulases pour convertir la biomasse cellulosique en sirop de glucose (Gogary *et al.*, 1990). C'est à partir de cette souche que des mutants ont été sélectionnés par plusieurs équipes de recherche pour leurs aptitudes à produire des cellulases.

- **Taxonomie**

La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp* se présente comme suit (Bissett, 2004):

Embranchement	<i>Amastigomycota et/ou Eumycètes</i>
Sous embranchement	<i>Ascomycotina</i>
Classe	<i>Sordariomycètes</i>
Ordre	<i>Hypocréales</i>
Famille	<i>Hypocraceae</i>
Genre	<i>Trichoderma</i>

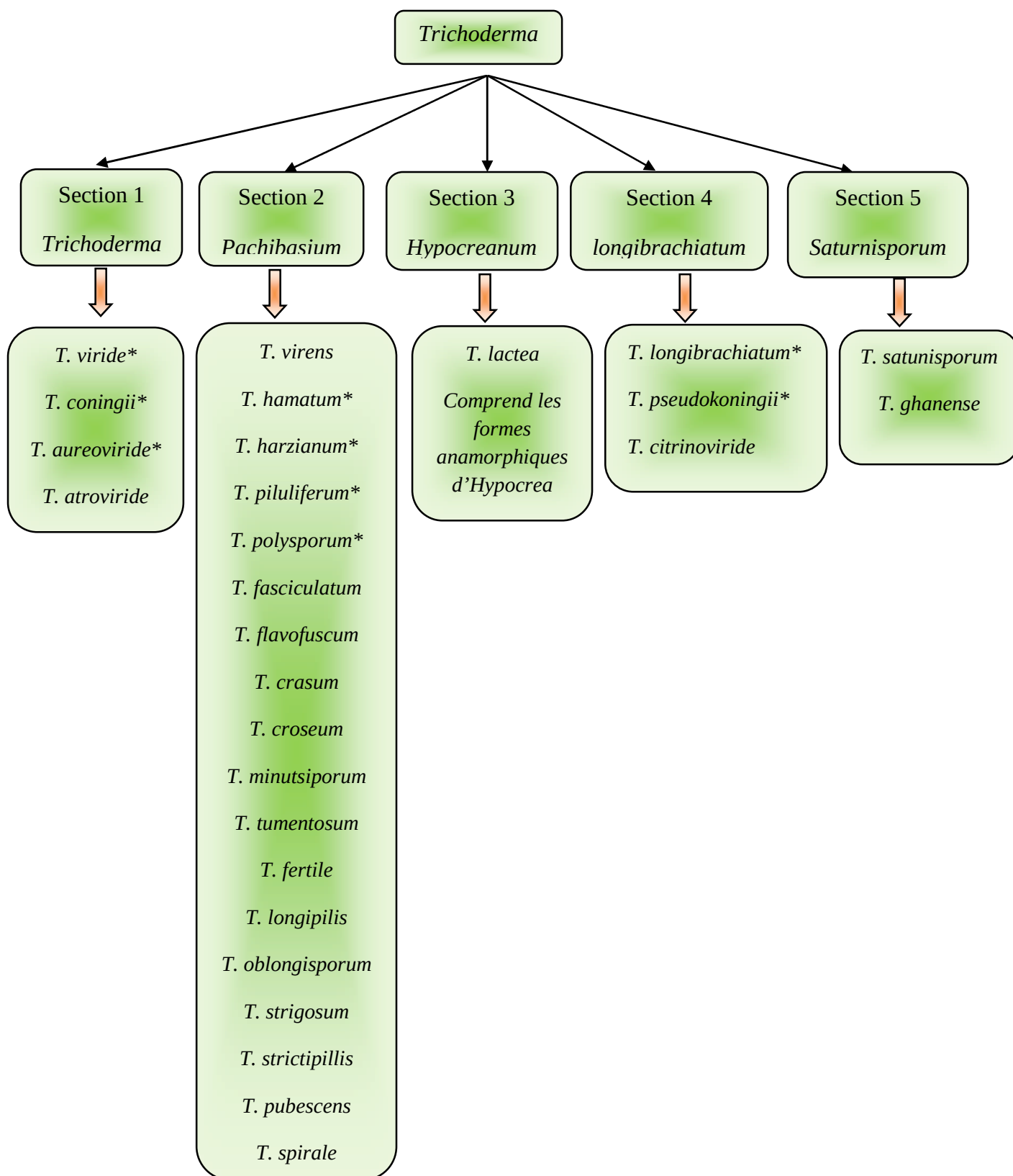


Figure 4 : Les 5 sections systématiques de *Trichoderma* sp (Bisset, 1991 a et b) ; * Les espèces agrégées de Rifai, (1969).

Vue le nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma sp*, Bisset en 1991, propose la notion de « section » se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces dans 5 sections (Figure 4) (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Leuchtmann., 1996).

• **Morphologie**

L'aspect macroscopique de *Trichoderma sp* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Ces champignons ont une croissance très rapide et extensive sur milieu de Sabouraud à 25°C. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour un feutrage épais se superpose à la culture. (Chabasse *et al.*, 2002).

Au microscope optique (Figure 5) le mycélium fait apparaître des hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses, avec des petits conidiophores très ramifiés de forme conique ou pyramidale. Ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. Renflées à leur base, solitaire ou groupées par 3, les phialides sont fixées à angle droit sur les conidiophores. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies). Les conidies, lisses ou échinulées, globuleuses, mesurent de 2,5 à 3µm de diamètre. Elles se rassemblent en amas au sommet des phialides, et forment ainsi des « fausses têtes » (Chabasse *et al.*, 2002).

• **Ecologie**

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, dans différents milieux écologiques (milieu terrestre et marin). Les *Trichoderma sp* sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats et sont, par conséquent, l'élément majeur dans la microflore terrestre et marine.

Le genre *Trichoderma* vient à la 3^{ème} position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma sp* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau., 2001).

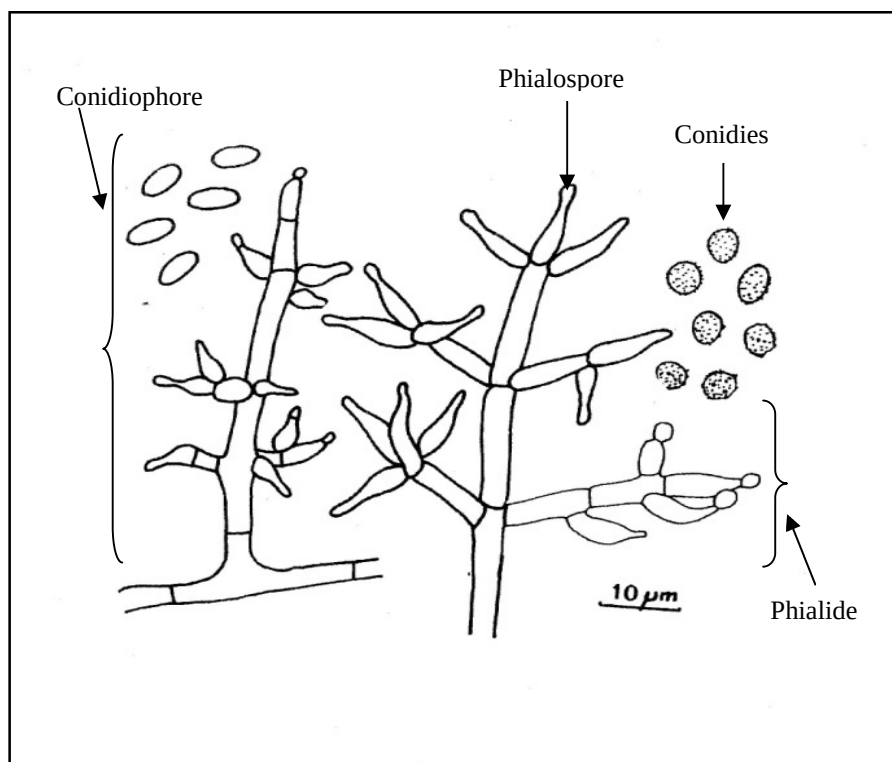


Figure 5 : Aspect microscopique de *Trichoderma* (Botton *et al.*, 1990).

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

- **Intérêt**

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma sp* est rapportée pour la première fois par Weidling, (1934), où la production d'un antifongique a été décrite (Papavizas, 1985). Les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizcaino *et al.*, 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990). La littérature cite que les métabolites importants de *Trichoderma sp* sont principalement des enzymes et des molécules bioactives :

- La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre, principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren *et al.*, 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek *et al.*, 2003).
- Production de substances bioactives comme les métabolites volatils (6-pentyl- α -pyrone, éthylène, cyanure d'hydrogène, alcools, aldéhydes) (Vizcaino *et al.*, 2005) ; les métabolites non volatils diffusibles [polyacétates (antifongiques, antibiotiques), trichotécènes (variété de toxines actives sur microorganismes et mammifères) notamment les trichodermines] ; les métabolites polypeptidiques ciclosporines immunosuppresseurs anti- inflammatoire (Landreau, 2001).
- Les champignons sont capables de synthétiser les 20 acides aminés usuels des deux séries L et D, en plus d'autres particuliers, en partant de l'ammoniaque, environnant provenant soit de la dégradation enzymatique de composés azotés organiques ou inorganiques ou bien suite à la fixation bactérienne de l'azote atmosphérique. Le rythme de croissance élevé des *Trichoderma sp* leur permet d'assimiler rapidement l'ammoniaque. La biosynthèse des acides aminés est initiée par la production de glutamate, rare et précieux dans la nature, car il est la trame de synthèse du reste des acides aminés (Ala, Asp, Ser) et se trouve de ce fait à des concentrations élevées dans les cellules vivantes (Ahmed *et al.*, 1995 ; Voet, 1998).

Matériel et méthodes

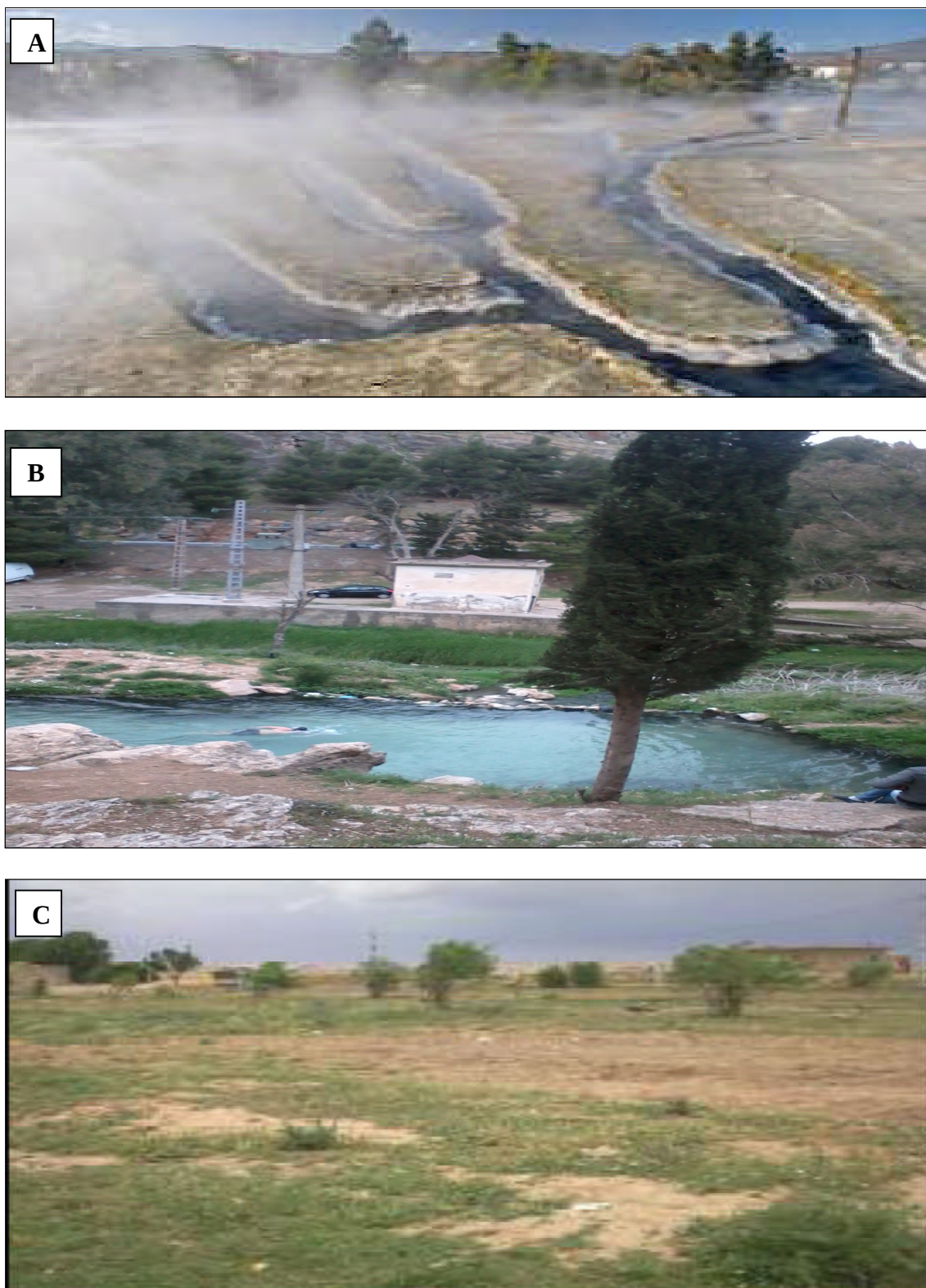


Figure 6 : Vue générale des trois stations thermales des régions de :(A) : Guelma (Hammam Debagh), (B): Mila (Hammam Grouz, Atmania), (C): Mila (Hammam Safsaf, Teleghma).

1. Isolement et criblage de souches fongiques productrices de cellulases

1.1. Echantillonnage

Les échantillons sont prélevés à partir des sols environnants de trois stations de sources thermales, de deux régions différentes climatiquement (situées dans le Nord Est de l'Algérie): la première station à Guelma (Hammam DEBAGH) et les deux autres à Mila (Atmania : Hammam GROUZ, Teleghma : Hammam SAFSAF) (figure 6).

La région de Guelma se caractérise par un climat humide et sub-humide, une température moyenne annuelle de 17°C et une pluviométrie annuelle de 450mm - 600mm ([http:// fr.wikipedia.org/wiki/Hammam_Challala](http://fr.wikipedia.org/wiki/Hammam_Challala)). Les coordonnées géographiques sont 36°25'0" N et 7°25'0" E en DMS (degrés, minutes, secondes) ou 36.4167 et 7.41667 (en degrés décimaux). La région de Mila a un climat sec et une pluviométrie annuelle de 300mm (sud) et 700mm (nord) ([http:// www.algerieinfo.biz/ algérie/wilaya/index.htm](http://www.algerieinfo.biz/algérie/wilaya/index.htm)). Les coordonnées géographiques sont 36°25'0" N et 6°10'0" E en DMS (degrés, minutes, secondes) ou 36.4167 et 6.16667 (en degrés décimaux).

100g, environ, de sol sont prélevés de ces stations en tenant compte de la végétation, à différentes profondeurs :

➤ *Région de Hammam DEBAGH, Guelma :*

- 13 m de la source et 5 cm de profondeur.
- 13 m de la source et 10 cm de profondeur.
- 6 m de la source et 20, 30, 40 et 50 cm de profondeur.

➤ *Région de Mila :*

**Atmania, Hammam GROUZ :*

- 14 m de la source et 5 cm de profondeur.
- 14 m de la source et 10 cm de profondeur.
- 10 m de la source et 20, 30, 40 et 50 cm de profondeur.

**Teleghma, Hammam SAFSAF :*

- 14 m de la source et 5 cm de profondeur.
- 14 m de la source et 10 cm de profondeur.
- 10 m de la source et 20, 30, 40 et 50 cm de profondeur.

Les différents échantillons sont déposés sur des papiers d'aluminium stériles soigneusement enveloppés dans des sacs en papiers stériles. Ils sont ensuite gardés au frais (4°C) puis transférés au laboratoire pour une analyse immédiate.

1.2. Isolement des moisissures

Une suspension de l'échantillon est constituée par 1 g de sol et 9 ml d'eau physiologique stérile (solution mère). La suspension est agitée pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur Vortex. Une série de dilutions décimales (10^{-1} jusqu'à 10^{-5}) est ensuite préparée à partir de la solution mère (1 % décrite ci-dessus). Chaque dilution correspond à un échantillon qui sera étalé à la surface des milieux gélosés (Agar Blanc, Czapek Dox) (Annexe 1), additionnés d'un antibiotique, la gentamicine (0.04mg/ml) pour inhiber la croissance des bactéries GRAM positif et GRAM négatif (Leveau et Bouix, 1993 ; Tarr, 2004). Les boîtes de Pétri à Agar Blanc sont incubées à 30°C pendant 7 jours. Les filaments transparents apparus sur Agar Blanc sont ensuite repiqués sur milieu plus riche Czapek Dox, incubés durant 7 jours à 30°C avec une observation quotidienne.

1.3. Purification et description des moisissures isolées

Les colonies des moisissures sont repérées dès leur apparition par leur aspect filamenteux caractéristique. Sur l'Agar Blanc, la croissance est lente et disciplinée. Les filaments sont ensuite repiqués sur des milieux plus riches (Czapek Dox, Potato Dextrose Agar « PDA ») (Annexe 1), toujours supplémentés par la gentamicine, permettant un développement optimal et fourni. Les souches pures sont ensuite groupées en fonction de la couleur du mycélium aérien, la couleur du revers de la boîte, la production de pigment diffusible et du temps d'incubation nécessaire pour un envahissement complet de la boîte.

1.4. Conservation des souches fongiques isolées

Les souches fongiques isolées sont maintenues sur milieu PDA (incubation à 30°C jusqu'à une bonne sporulation). Les spores sont récupérées par adition de 10ml d'eau tweenée (0.1%). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990). Pour une conservation à -20°C, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau tweenée (0.1%) avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur).

1.5. Sporulation des moisissures

Les moisissures sporulent sur milieu PDA, après 7 jours à 30°C (Kwak et Rhee, 1992).

➤ *Préparation de la suspension de spores*

Les spores sont récupérées par addition de 10ml d'eau tweenée (0.1%) dans la boîte de culture.

➤ *Dénombrement des spores*

Une dilution de 1/100^e est réalisée à partir d'une solution mère de spores. Cette dilution est dénombrée à l'aide d'une cellule de comptage ou de numération (cellule de Thoma).

1.6. Identification des souches isolées

L'identification d'une souche est effectuée par deux techniques classiques : une observation macroscopique et une étude microscopique des souches, peut être suffisante pour déterminer le genre des moisissures isolées et cela en réalisant des ensemencements par touche sur des milieux d'étude solides favorisant la croissance et la sporulation des moisissures. Les milieux les plus souvent utilisés à ces fins sont l'Agar Blanc (Annexe 1), utile pour éviter certains phénomènes de pléomorphisme (Guiraud, 1998), le Czapeck Dox Agar et le milieu MEA (Annexe 1), utilisés simultanément (Botton *et al.*, 1990).

➤ *Etude des caractères cultureux*

Les caractères morphologiques et cultureux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur les milieux de culture spécifiques (décrits ci-dessus). Les milieux sont coulés sur des boîtes de Pétri 36 heures avant leur utilisation afin de diminuer l'humidité de la surface de la gélose et de contrôler leur stérilité. Ils sont ensuite ensemencés par quelques spores ou une petite bouture mycélienne prélevée auparavant à l'aide d'une anse de platine stérile et déposée au centre de la boîte.

L'évaluation de l'ampleur de la croissance et du développement est observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 30°C. Ce suivi réalisable à l'œil nu mais aussi grâce à une loupe binoculaire permet de rassembler des indices révélateurs sur l'identité de nos souches (couleur du mycélium aérien et sa variation au cours du temps, la couleur de l'envers de la boîte, la

production de pigments diffusibles, présence ou absence d'exudat (gouttelettes) sur le mycélium, temps de sporulation, texture de la surface etc...).

➤ ***Etude des caractères microscopiques :***

Ces caractères sont étudiés par des examens microscopiques qui sont effectués sur les cultures des souches isolées, en employant cette technique :

- ***Réalisation d'un montage du matériel à examiner :***

Les préparations microscopiques se font à l'état frais en milieu liquide entre lame et lamelle. La manipulation consiste à mettre un petit fragment mycélien sur la lame propre placée entre deux bec Bunsen en présence d'une goutte du liquide de montage (Bleu au lactophénol, Annexe 1) et légèrement le dilacéré avec deux aiguilles pour éviter la réalisation d'une préparation trop dense et inobservable (Botton *et al.*, 1990), puis le recouvrir délicatement d'une lamelle en évitant de créer des bulles d'air ou des débordements. L'examen microscopique est fondé sur l'aspect morphologique des différentes structures des champignons permettant de définir les caractères suivants : le type de thalle (septé ou non), mycélium diffus, épais, la couleur des hyphes (foncées ou claires), la forme des têtes (en forme de pinceau, aspergillaire), le type de spores sexuées (oospores, zygosporos, ascospores, basidiospores) ou asexuées, le type et l'apparence du système sporal, la présence de type de structure particulière etc...

1.7. Criblage des souches cellulolytiques

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des souches isolées, est testée sur deux types de milieux :

➤ ***Test au papier filtre (en milieu liquide)***

La technique la plus évidente est de faire apparaître les capacités des moisissures à assimiler la cellulose sur un milieu liquide minéral (Milieu Mandel, Annexe 1) totalement dépourvu d'une quelconque source carbonée exception faite, pour les bandes de papier filtre Whatman n°1 (0.5 cm de largeur et 10 cm de longueur), la seule source carbonée. Les échantillons sont incubés à 30°C en présence de bandelettes de papier plongées dans 10ml du milieu minéral : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4g, KH_2PO_4 2g, Urée 0.3g, Peptone 1g, CaCl_2 0.3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, Solution d'oligo-éléments 1ml, Tween 80 2ml, Extrait de levure 0.25g, l'eau

distillée 1000ml, préalablement stérilisé. L'ensemencement se fait par une öse contenant le mycélium et les spores de chaque souche. Un blanc sans inoculum est soumis aux mêmes conditions. La dégradation du papier est suivie visuellement et quotidiennement (Gunnar *et al.*, 1999).

- ***Effet de la température sur la croissance des souches fongiques sélectionnées***

L'étude de l'effet de la température sur la croissance des souches fongiques ayant répondues positivement au test papier filtre (J₁, J₂, Q₂, H₄, M₁, S₃) est effectuée par ensemencement d'une öse de chaque souche au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu PDA, puis incubation à différentes températures (30°C, 35°C, 40°C et 45°C) pendant 7 jours. La cinétique de mesure des diamètres des colonies fongiques apparues est mesurée en mm et réalisée en trois essais.

- ***Test des plaques à trous (en milieu solide)***

Cette méthode a été mise au point par Durand *et al.*, (1984). La technique consiste, à couler le milieu minéral BSM (Annexe 1) contenant le polysaccharide cellulose « Walseth » (Annexe 1) dans des plaques NUNC® (déposer sur la gélose une plaque en polycarbonate stérile, de la même dimension que la boîte et qui adhère au milieu). Cette plaque est percée de trous de 5 mm de diamètre à travers lesquels le milieu est ensemencé avec une öse contenant le mycélium et les spores de chaque souche. Les plaques sont incubées à la température d'expérience (30°C ou 35°C). La cinétique de mesure des diamètres des auréoles est faite après différents temps d'incubation. Les enzymes produites par les souches vont diffuser dans le milieu opaque et hydrolyser le polysaccharide, on pourra par la suite comparer les performances des différentes souches par mesure directe des halos (translucides) d'hydrolyse.

2. Production de cellulases par la souche d'intérêt (*Trichoderma*"GHL")

2.1. Microorganismes, préparation de l'inoculum

Les moisissures utilisées dans cette partie sont :

➤ La souche performante ayant répondu positivement aux tests de l'activité cellulolytique, *Trichoderma* "GHL" isolée au laboratoire de Génie Enzymatique de l'Université Constantine 1 (Algérie), à partir d'échantillons de sol collectés proche de la source thermale de Guelma située dans le nord est de l'Algérie (Février, 2007). La souche est identifiée, comme *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, par la DSMZ (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

➤ La souche de référence *Trichoderma reesei* Rut C-30 VTT-D-86271, provenant du Centre National de la Recherche Technique, Finlande.

Les souches sont maintenues sur milieu PDA, incubées à 30°C pour la souche de référence et à 35°C pour la souche isolée, jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de spores. Après sporulation des moisissures, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0.1 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich). La concentration en spores est déterminée par le dénombrement de la dilution appropriée à l'aide d'une cellule de Thoma.

2.2. Milieu de production

Le milieu synthétique utilisé pour la production de la cellulase en mode de fermentation submergée, est celui proposé par Mandels et Weber, (1969) (Annexe 1). Le pH initial du milieu est 5.5. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes avant inoculation.

2.3. Conduite de la fermentation

La production de l'enzyme est réalisée dans des erlens-meyers de 500 ml à raison de 100 ml de milieu de production par erlen, puis stérilisés à 120°C pendant 20 minutes (pH initial de culture égal à 5.5). Les erlens meyers sont inoculés après refroidissement avec une

suspension de spores à raison de 10^7 spores par ml de milieu. Les erlens meyers ensemencés sont ensuite incubés à 30°C et 35°C dans le but de comparer les activités cellulases produites par les deux souches étudiées, sous agitation (150 tours/minute) dans une étuve agitée (INFORS® AG CH-4103. Bottmingen/ SUISSE).

L'étude de l'influence du taux d'inoculum sur la production de l'enzyme par la souche isolée est réalisée par incubation des erlens contenant le milieu de production à 35°C (température optimale de croissance de la souche isolée). La gamme des taux d'inoculum étudiée varie de 10^5 à 10^8 spores par ml de milieu.

L'effet de l'âge des spores est réalisé par utilisation d'un inoculum de suspension de spores de différents âges variant de 3 à 7 jours. Pour l'ensemble des fermentations, les erlens meyers sont incubées pendant 10 jours à 35°C. Les prélèvements sont effectués quotidiennement, puis centrifugés à 4000g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu (représente l'extrait enzymatique) est utilisé pour la mesure du pH et le dosage des activités enzymatiques. Les expérimentations sont réalisées en triplicate.

2.4. Sous-clonage de la souche d'intérêt *Trichoderma "GHL"*

Suite aux repiquages successifs de la souche isolée, nous avons remarqué une hétérogénéité de la souche au niveau de la pigmentation des spores et de la vitesse de croissance de la souche (diamètre de la colonie fongique après incubation à 35°C). Pour cet effet, la solution mère de la suspension de spores de *Trichoderma "GHL"* et des dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) sont ensemencées sur boîtes de PDA, incubées à 35°C pendant 24 heures. Les colonies bien isolées de chaque boîte sont ensuite repiquées sur d'autres boîtes de PDA neuf, puis incubées à 35°C pendant 24 heures. Ce test est réalisé en trois essais. Les cinq souches issues du sous-clonage ont subi une fermentation de 10 jours en erlens meyers de 500 ml dans les mêmes conditions décrites précédemment (voir paragraphe : conduite de la fermentation).

2.5. Cinétique de production de la cellulase en fermenteur de 2 litres

La cinétique de production de la cellulase par les deux souches B et D, sélectionnées après la fermentation en erlens, parmi les cinq souches issues du sous-clonage, est réalisée dans un fermenteur de 2 litres (SETRIC® Génie Industriel, Toulouse/ France) à raison de

1200 ml de milieu de production. L'inoculum de chaque souche représente une suspension de spores à une concentration de 10^6 spores par ml de milieu. La température est maintenue à 35°C et l'agitation à 150 tours/minute. Dans ces conditions, l'oxygène dissous dans le milieu de culture ne doit pas être inférieur à 20% de la saturation en air.

Le pH initial du milieu après stérilisation est de 5.5, par la suite au cours de la fermentation le pH n'est pas ajusté. La mousse qui se forme pendant la culture (conséquence de l'agitation) est contrôlée par addition de l'huile de colza stérile. La production de l'enzyme se poursuit pendant 10 jours. Deux prélèvements sont effectués quotidiennement, puis centrifugés à 4000 g pendant 10 minutes. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique et sert pour l'analyse des activités cellulolytiques et la mesure du pH.

2.6. Cinétique de production de la cellulase en fermenteur de 4 litres

La souche D étant celle qui a présenté l'activité cellulolytique la plus importante en fermenteur de 2 L, est choisie pour subir une cinétique de production de l'enzyme en condition batch dans un fermenteur de 4 litres (SETRIC® Génie Industriel, Toulouse/France), avec un volume utile de 2700ml. Une suspension de 10^6 spores par ml de milieu constitue l'inoculum ; dans les conditions suivantes : La température est maintenue à 35°C, le pH 5.5, l'agitation à 300 tours/minute et la pression en oxygène dissous est maintenue à une valeur supérieure à 20%.

Au cours de la croissance, le pH n'est pas régulé. La mousse, qui se forme avec l'agitation est contrôlée par addition de l'huile de colza stérile, quand il est nécessaire. La cinétique de production de l'enzyme est suivie pendant 10 jours. Deux prélèvements sont effectués par jour, puis centrifugés à 4000 g pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage des activités cellulolytiques, des protéines et la mesure du pH.

2.7. Techniques analytiques

❖ Mesure du pH

Pour chaque prélèvement réalisé lors des fermentations (erlens et fermenteurs) une mesure de pH de l'extrait enzymatique est réalisée à l'aide d'un pH mètre (METTLER TOLEDO®, Viroflay/ France), préalablement étalonné.

❖ Dosage des activités enzymatiques

- *Activité papier filtre (APF)* : est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe cellulastique selon la méthode de Ghose (Ghose, 1987) dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique). Le mélange réactionnel est constitué d'une solution d'enzyme (0.5 ml), d'1 ml de tampon citrate (0.1 M, pH 4.8) et de 50 mg de papier filtre Whatman N° 1 (des morceaux de 1x6 cm), incubé à 50°C, pendant 60 minutes.
- *Activité Endoglucanase* : (CMCase, endo 1,4-β-D-glucanase ; EC 3. 2. 1. 4) est mesurée dans un volume total de 1 ml d'un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans un tampon citrate 0.1 M, pH 4.8 et 0.5ml d'une solution de CMC (carboxyméthyl-cellulose) à 1% (W/V) préparé dans le même tampon que l'extrait enzymatique. Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 minutes.

La quantité des sucres réducteurs libérée de l'hydrolyse du papier filtre et du carboxyméthyl-cellulose est mesurée selon la méthode de Miller (Miller, 1959) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe 2). L'absorbance est déterminé à 540 nm. La concentration en sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir d'une courbe étalon de glucose (figure 7) dont les concentrations varient de 0 - 0.027 M.

L'activité enzymatique est calculée en unité internationale par ml (UI/ml). Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par ml d'enzyme à 50°C, pH 4.8.

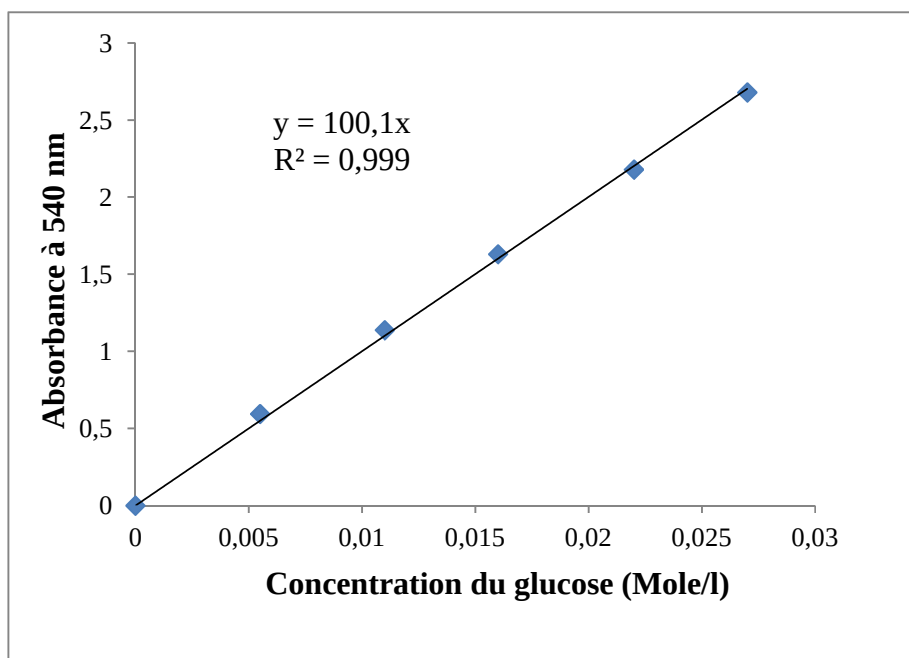


Figure7 : Courbe étalon glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.

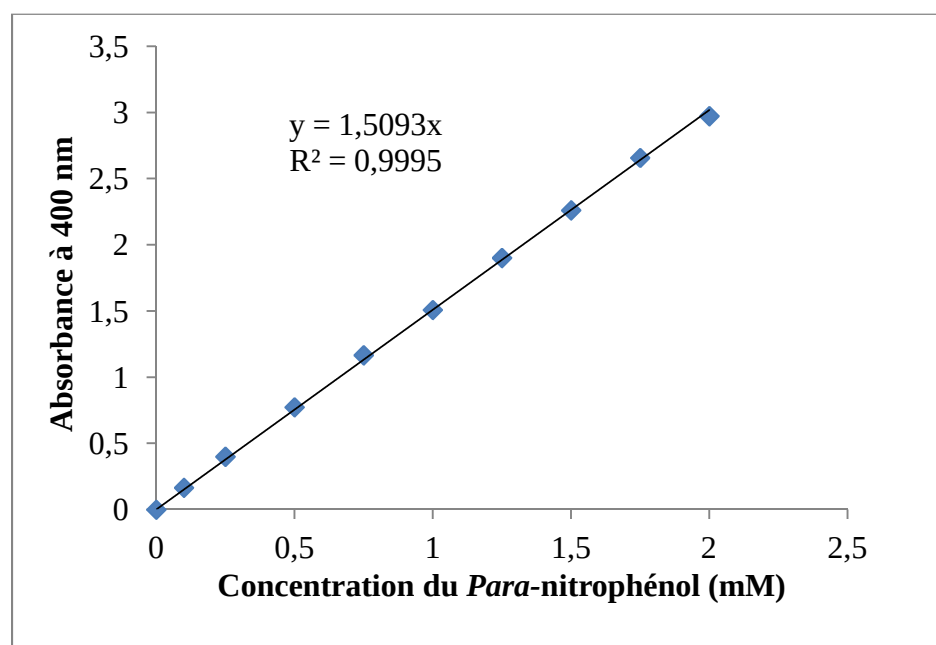


Figure 8 : Courbe étalon de *para*-nitrophénol pour le dosage de l'activité β -glucosidase.

- *Activité β -glucosidase* : est déterminée selon la méthode de Norkrans (1957) : 0.1 ml de surnageant (extrait enzymatique) est mélangé avec 1 ml d'une solution de 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside à 5 mM dans le tampon citrate (0.1M, pH 4.8), incubé à 50°C pendant 10 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 1 M, suivie par l'ajout de 10 ml d'eau distillée. L'absorbance est mesurée à 400 nm. La courbe étalon du *para*-nitrophénol (0-2mM) est établie (figure 8). L'activité β -glucosidase (U/ml) est calculée en micromoles de *para*-nitrophénol produite par minute dans les conditions de la réaction.

Pour toutes les activités enzymatiques mesurées, le blanc enzyme est préparé de la même façon sans addition de substrat (Papier filtre pour l'APF, CMC pour l'endoglucanase et 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside pour la β -glucosidase). Tous les prélèvements sont analysés en triplicate, les valeurs moyennes et les erreurs standards sont calculées.

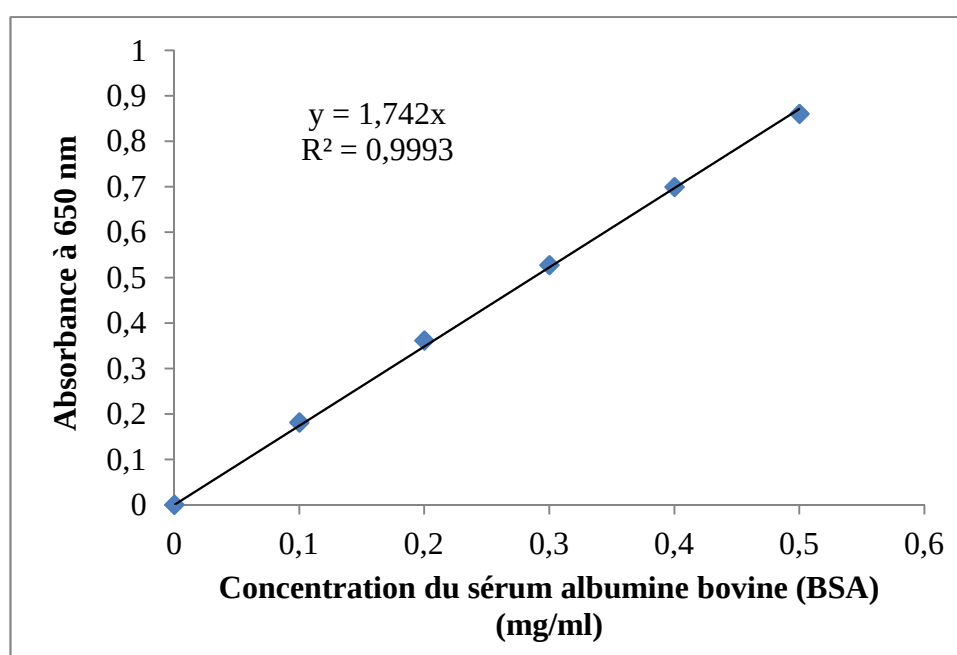


Figure 9 : Courbe étalon pour le dosage des protéines.

❖ Dosage des protéines

La concentration en protéines est mesurée selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951). Cette méthode a pour principe le fait que le réactif de Folin-ciocalteu mis en présence d'une protéine est réduit en un complexe bleu. L'intensité de la coloration est mesurée à la longueur de 650 nm (Annexe 2). La méthode de Lowry est la résultante de deux réactions:

- Réaction de Biuret qui, en présence de sulfate de cuivre et en milieu alcalin, permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.

- Réaction du réactif de Folin sur la tyrosine, le tryptophane et dans une moindre mesure la cystine, la cystéine et l'histidine, qui entraînent une réduction par perte d'un à trois atomes d'oxygène, et la fixation du cuivre par chélation faciliteront le transfert d'électrons vers ce réactif.

La solution de sérum albumine bovin(BSA) dont les concentrations varient de 0 à 0.5 mg/ml, est utilisée comme protéine de référence pour réaliser la gamme d'étalonnage (figure 9).

2.8. Caractérisation des enzymes

Les enzymes produites par l'isolat retenu *Trichoderma* GHL"D" sont caractérisées. Cette caractérisation préliminaire est réalisée avec les surnageants de culture (extrait enzymatique brut) obtenu après croissance de l'isolat en fermenteur de 4 litres sur milieu liquide Mandels plus la cellulose Avicel (1%) comme inducteur, pendant 6 jours à 35°C. L'extrait enzymatique brut obtenu est utilisé pour toutes les études de caractérisation, et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation.

2.8.1. Activité en fonction de la température et du pH

L'influence de la température sur l'activité des enzymes (APF et endoglucanase) est étudiée à pH 4.8 (tampon citrate 0.1 M). Les mesures sont réalisées pour une gamme allant de 30°C à 80°C afin de déterminer la température optimale de chaque enzyme.

L'étude de la variation des activités enzymatiques en fonction du pH est menée à la température optimale de chaque enzyme pour une gamme de pH de 3.0 à 9.0. Quatre types de solutions tampon sont utilisés pour suivre les effets du pH sur les activités enzymatiques : tampon citrate 0.1M pour les pH 3.0 et 4.0, le tampon citrate-phosphate 0.1M pour les pH de 4.0 à 7.0, le tampon phosphate 0.2M pour les pH 7.0 et 8.0 et le tampon glycine-NaOH 0.2M pour le pH 9.0.

2.8.2. Etude de la stabilité thermique

La thermostabilité des enzymes est testée en incubant l'extrait enzymatique brut, dans du tampon citrate (0.1M, pH 4.8), à différentes températures (60°C-70°C-75°C-80°C et 90°C) pour un intervalle de temps allant jusqu'à 5 heures, des prélèvements sont effectués chaque heure. Nous avons également testé l'effet de la présence du substrat carboxyméthyl cellulose (CMC) à deux concentrations (1% et 2% dans le tampon citrate 0.1M, pH 4.8) sur la thermostabilité. Après incubation à différentes températures, les activités enzymatiques résiduelles (APF et endoglucanase) sont déterminées selon les conditions standards.

2.8.3. Etude de la stabilité au pH

La stabilité au pH est effectuée par incubation de l'extrait enzymatique brut à 50°C dans différents pH allant de 3.0 à 9.0 pendant 5 heures avec des prélèvements chaque heure. Nous avons également étudié la stabilité à pH 7.0 de l'extrait enzymatique brut en présence du CMC à 1% et 2% dans le tampon citrate (0.1M, pH 4.8). Les activités résiduelles de chaque prélèvement sont mesurées selon les conditions standards.

2.8.4. Effet de composés chimiques sur les activités enzymatiques

Dans le but d'étudier l'influence de composés chimiques sur les activités enzymatiques (APF et endoglucanase), nous avons pré-incubés l'extrait brut, en présence de différents composés chimiques : EDTA (5mM), SDS (5mM), β -mercapto-éthanol (5mM), Ethanol (40%) et Acétone (40%), à 50°C pendant 1 heure ; puis les activités résiduelles sont mesurées selon les conditions standards. Pour l'éthanol et l'acétone, après 1 heure d'incubation, le mélange est centrifugé à 4000 g pendant 15 minutes et les activités résiduelles sont mesurées dans le culot et le surnageant.

2.8.5. Effet des ions sur les activités enzymatiques

Pour visualiser l'effet des ions sur l'activité des enzymes, nous avons pré-incubé l'extrait brut pendant 1 heure à 50°C en présence de différents ions testé : (K^+ 150mM, Na^+ 150mM, Ca^{2+} 7.5mM, Hg^{2+} 0.75mM, Zn^{2+} 0.75mM et $(NH_4)_2^{2+}$ 0.75mM. Les activités d'hydrolyse du papier filtre et du CMC sont mesurées à 50°C dans du tampon citrate (0.1M, pH 4.8). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité mesurée sans addition d'ions. Nous avons également regardé l'influence des ions Ca^{2+} et Zn^{2+} à différentes concentrations sur l'extrait enzymatique additionné de l'EDTA.

2.8.6. Hydrolyse de différents substrats

L'extrait enzymatique est incubé en présence de plusieurs substrats pendant 1 heure à 50°C dans du tampon citrate (0.1M, pH 4.8). Nous avons dosé les sucres réducteurs par la méthode au DNS avec du glucose comme référence.

Les substrats testés à 1% dans du tampon citrate (0.1 M, pH 4.8) sont : Amidon soluble, Arabinoxylane, β -glucan, Carboxyméthyl-cellulose (CMC), Cellulose Avicel PH 101, cellulose microcristalline, pectine et Xylane d'avoine.

2.8.7. Activité en fonction de la concentration en substrat

Deux types de réactions sont étudiés : Activité APF pour l'hydrolyse du papier filtre avec des quantités de 10 à 60 mg, activité endoglucanase pour l'hydrolyse du carboxyméthyl-cellulose dont les concentrations allant de 1 à 10 mg/ml. Les mesures sont réalisées à la température optimale de chaque enzyme, dans du tampon citrate (0.1 M, pH 4.8). Les paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) de chaque enzyme sont déterminés en utilisant le mode de représentation en coordonnées inverses de Lineweaver et Burk (1934).

3. Analyse statistique

L'analyse de la variance (ANOVA) est utilisée pour la détermination de :

- Comparaison de la production de la cellulase par les deux souches : la souche isolée (*Trichoderma longibrachiatum*) et la souche de référence (*Trichoderma reesei* Rut C-30).
- Effet du taux d'inoculum sur la production de la cellulase par *T. longibrachiatum*.
- Effet de l'âge des spores sur la production de la cellulase par *T. longibrachiatum*.
- Effet des souches issues du sous-clonage sur la production de la cellulase par *T. longibrachiatum*.
- Effet de la température sur les activités cellulase de *T. longibrachiatum*.
- Effet du pH sur les activités cellulase de *T. longibrachiatum*.

Résultats et discussion

Tableau n°2: Isolement des souches fongiques en fonction de la profondeur des échantillons du sol.

Origine	Dilution	Souches
Hamam DEBAGH (région de Guelma) [1]		
Profondeur 10cm	10^{-1} 10^{-2}	3 (A ₁ , A ₂ , A ₃) 2 (B ₁ , B ₂)
Profondeur 20cm	SM 10^{-1} 10^{-2} 10^{-5}	4 (C ₁ , C ₂ , C ₃ , C ₄) 3 (D ₁ , D ₂ , D ₃) 8 (E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄ , E ₅ , E ₆ , E ₇ , E ₈) 4 (F ₁ , F ₂ , F ₃ , F ₄)
Profondeur 30cm	10^{-1} 10^{-2}	4 (G ₁ , G ₂ , G ₃ , G ₄) 4 (H ₁ , H ₂ , H ₃ , H ₄)
Profondeur 40cm	SM 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-5}	4 (J ₁ , J ₂ , J ₃ , J ₄) 5 (K ₁ , K ₂ , K ₃ , K ₄ , K ₅) 2 (L ₁ , L ₂) 2 (M ₁ , M ₂) 2 (N ₁ , N ₂)
Profondeur 50cm	SM 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}	2 (O ₁ , O ₂) 4 (P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₄) 4 (Q ₁ , Q ₂ , Q ₃ , Q ₄) 1 (R ₁)
Hamam Atmania (Région Mila) [2]		
Profondeur 10cm	10^{-1} 10^{-2}	4 (S ₁ , S ₂ , S ₃ , S ₄) 1 (T ₁)
Profondeur 20cm	10^{-3}	1 (U ₁)
Profondeur 30cm	10^{-3}	2 (V ₁ , V ₂)
Profondeur 50cm	10^{-2}	1 (W ₁)
Hamam Teleghma (Région Mila) [3]		
Profondeur 10cm	SM 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-5}	3 (X ₁ , X ₂ , X ₃) 1 (Y ₁) 7 (Z ₁ , Z ₂ , Z ₃ , Z ₄ , Z ₅ , Z ₆ , Z ₇) 1 (A' ₁) 1 (B' ₁)
Profondeur 20cm	10^{-2} 10^{-3}	1 (C' ₁) 3 (D' ₁ , D' ₂ , D' ₃)
Profondeur 40cm	10^{-3}	1 (E' ₁)
Profondeur 50cm	10^{-3} 10^{-5}	2 (G' ₁ , G' ₂) 1 (F' ₁)

1. Isolement et sélection des souches fongiques productrices de cellulase

L'isolement des moisissures est fait à partir des sols environnants les sources thermales des régions de Guelma (Hammam DEBAGH) et de Mila (Atmania : Hammam GROUZ, Teleghma : Hammam SAFSAF). Sur 18 échantillons prélevés, j'ai isolé 88 souches réparties en fonction des sites d'échantillonnage (Tableau 2).

Nous observons une densité de souches fongiques mesurées à 58 isolats (66%), dans le sol proche de la source thermale de Guelma (Hammam DEBAGH). Ce résultat s'explique par un climat humide et subhumide, une température moyenne annuelle de 17°C et une pluviométrie annuelle de 450mm-600mm (http://fr.wikipedia.org/wiki/hammam_challala), qui caractérise la région de Guelma. En effet, les moisissures ont besoin de l'eau pour absorber des nutriments et sont par conséquent, restreints à des environnements humides (Boiron, 1996).

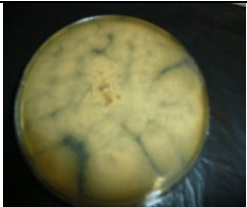
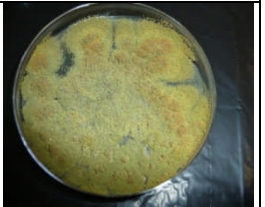
Les échantillons des autres stations renferment beaucoup moins de souches fongiques, 09 souches fongiques dans l'échantillon d'Atmania (10.23%) et 21 souches fongiques dans l'échantillon de Teleghma (23.86%), le % relativement faible s'explique par un climat sec qui caractérise la région de Mila. Dans ces conditions, un a_w de 0.65 (a_w : activité de l'eau) est la limite de la disponibilité en eau pour que les moisissures croissent (Raimbault, 1983 ; Guiraud, 1998).

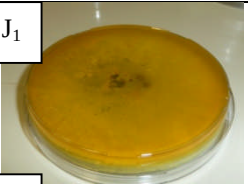
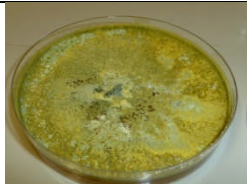
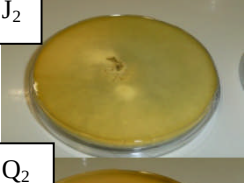
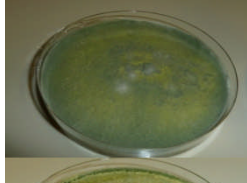
Par ailleurs, les échantillons de sol possèdent un pH neutre à légèrement basique (pH=7.8) favorisant plutôt le développement des populations bactériennes par rapport aux populations fongiques qui sont plutôt acidophiles (pH optimum 4-6) (Nicklin *et al.*, 2000). Cependant, Botton *et al.*, (1990) mettent en évidence une croissance dans une large gamme de pH de 4.5-8.0 pour les moisissures (Botton *et al.*, 1990).

Il est intéressant de noter que, l'ensemble des échantillons examinés appartient, à des écosystèmes extrêmes, où les températures de l'eau s'échelonnent de 80°C (Hammam Atmania), 86°C (Hammam Teleghma) à 97°C (Hammam Guelma) (http://fr.wikipedia.org/wiki/hammam_challala). Ces milieux naturels de température élevée vont certainement influencer la flore de proximité, en particulier, la biodiversité des champignons microscopiques qui, en général, sont des organismes mésophiles avec des optima de croissance situé entre 25-30°C (Botton *et al.*, 1990 ; Leveau et Bouix, 1993). D'autres champignons sont thermotolérants ou thermophiles et peuvent croître et survivre dans des milieux où la température dépasse 50°C (Nicklin *et al.*, 2000).

En plus de l'adaptation du microorganisme à son biotope, la croissance ou la présence de certaines souches peuvent être expliquée par la richesse des sols étudiés en matières organiques apportée par des résidus des végétaux et d'animaux (2.081% pour le sol de Hammam Teleghma, 1.73% pour le sol de Hammam Atmania et 1.41% pour celui de Hammam Guelma (Annexe 3). Par ailleurs, la croissance de cette flore fongique est expliquée par un rapport C/N favorable à la prolifération des moisissures. Barker et Worgan, (1981) ; Botton *et al.*, (1990) préconisent un rapport C/N de 10/1. Nos résultats montrent un rapport C/N=17.44 pour le sol de la première station [1], 18.16 pour le sol de la deuxième station [2] et 18.61 pour le sol de la troisième station [3].

Tableau n° 3 : Caractères macroscopiques des souches fongiques isolées.

Code de la souche	Origine de la souche	Fructification	Mycélium du substrat	Caractéristique de la colonie	Surface	Pigment au revers de la boîte	Revers de la boîte	Vue d'ensemble
<i>Aspergillus fumigatus</i> A ₁ , A ₂ , B ₁ , B ₂ , D ₂ , E ₃ , E ₆ , E ₈ , F ₁ , F ₂ , F ₃ , G ₁ , G ₂ , H ₂ , H ₃ , J ₃ , J ₄ , K ₁ , K ₅ , L ₂ , M ₂ , N ₂ , O ₁ , O ₂ , P ₂ X ₁ , X ₂ , X ₃ , Z ₁ , Z ₂ , Z ₃ , Z ₄ , G' ₂	1 3	Bleu verdâtre sombre formant un gazon mycélien	Blanchâtre	Duveteuse	Plane et lisse	Incolore (pas de pigments)		
<i>Aspergillus terreus</i> A ₃ , E ₅ , G ₃ , G ₄ , H ₁ , K ₂ , K ₃ , L ₁ , M ₁ , N ₁ , P ₁ , P ₃ , P ₄	1	Marron sable	Blanchâtre à jaune	Velouté ou parfois floconneuse	Plane	Jaune		
<i>Aspergillus flavus</i> E ₄ , F ₄ S ₁ , S ₂ Y ₁ , Z ₆ , W ₁ , A' ₁ , F' ₁	1 2 3	Vert jaune	Blanchâtre	Floconneuse	Epaisse et uniforme	Incolore (pas de pigment)		
<i>Aspergillus niger</i> D ₁ , E ₁ , E ₂ , Q ₁ , R ₁ Z ₅	1 3	Noir	Blanchâtre	Floconneuse	Epaisse et uniforme	Incolore (pas de pigment)		

<i>Trichoderma</i> J ₁ , J ₂ , Q ₂	} 1	Vert au début de sporulation puis vire au jaune Vert olive	Vert	Poudreuse	Plane	Pigment jaune orangé	J ₁		
			Vert foncé	Poudreuse	Plane	Pas de pigment	J ₂		
		Vert	Vert clair	Poudreuse	Plane	Beige virant au jaune	Q ₂		

1 : Hammam Debagh (région de GUELMA) ; 2 : Hammam Atmania (Région MILA) ; 3 : Hammam Teleghma (Région MILA).

1.2. Identification des souches isolées

L'identification des genres fongiques est réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de Botton *et al.*(1990) et de Chabasse *et al.*, (2002).

1.2.1. Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches isolées sont étudiés sur le milieu Czapek Dox, le plus communément utilisé à cet effet (Botton *et al.*, 1990). Le tableau 3 résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la surface et la croissance des colonies, la couleur du revers de la boîte ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

1.2.2. Etude microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des souches fongiques isolées (mycélium, conidiophore, conidies...). 6 genres de moisissures sont mis en évidence (Tableau 4).

- ◆ 61 souches (A₁, A₂, A₃, B₁, B₂, D₁, D₂, E₁, E₂, E₃, E₄, E₅, E₆, E₈, F₁, F₂, F₃, F₄, G₁, G₂, G₃, G₄, H₁, H₂, H₃, J₃, J₄, K₁, K₃, K₅, L₁, L₂, M₁, M₂, N₁, N₂, O₁, O₂, P₁, P₂, P₃, P₄, Q₁, R₁, S₁, S₂, W₁, X₁, X₂, X₃, Y₁, Z₁, Z₂, Z₃, Z₄, Z₅, Z₆, A'₁, F'₁, G'₂) ont les caractéristiques suivantes :

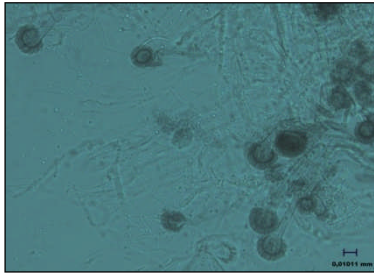
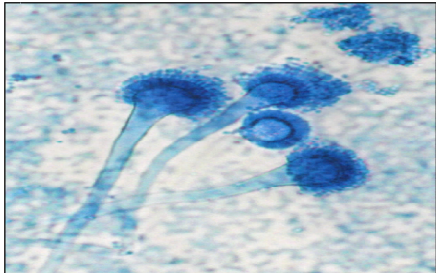
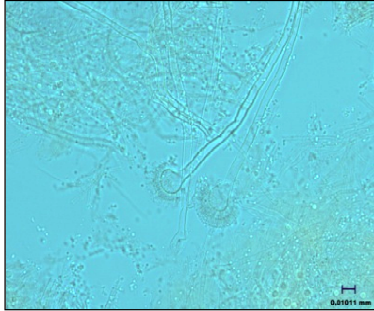
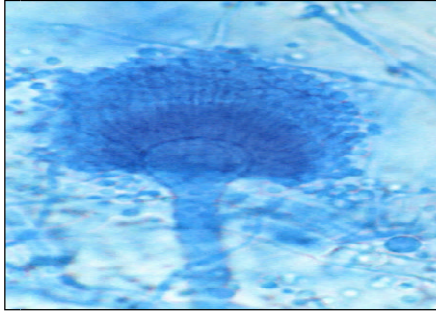
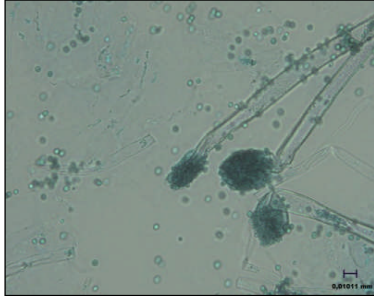
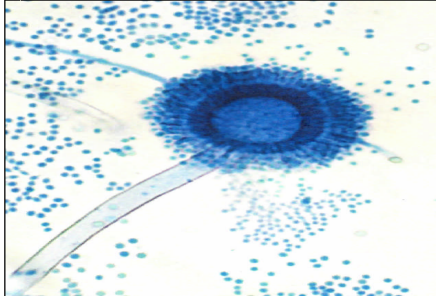
- Thalle à mycélium cloisonné
- Conidiophores nombreux, dressés, non ramifiés, terminés en vésicules
- Phialides formés directement sur la vésicule
- Conidies en chaînes divergentes
- Cellules à paroi épaisse

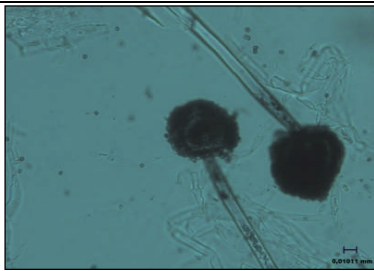
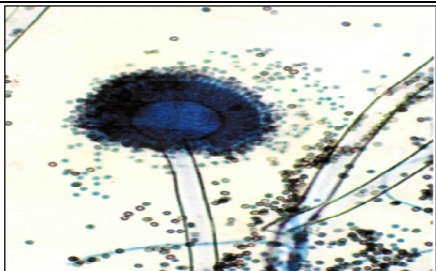
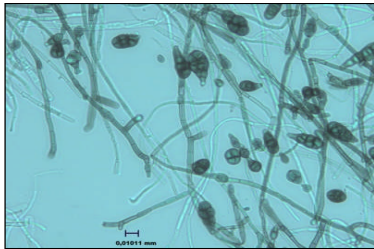
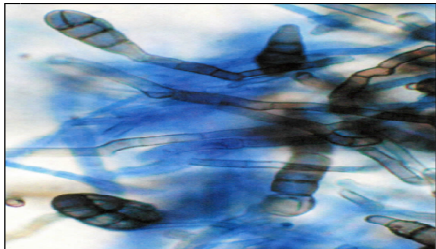
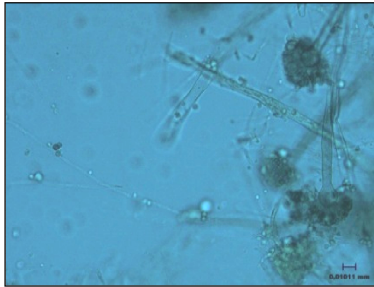
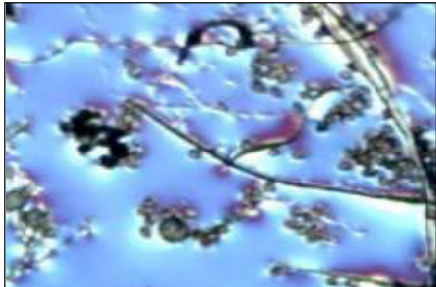
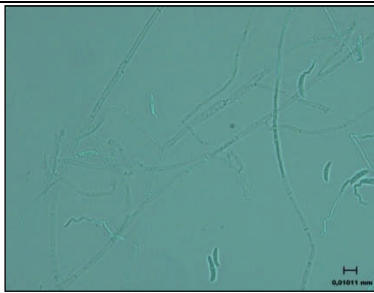
Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*

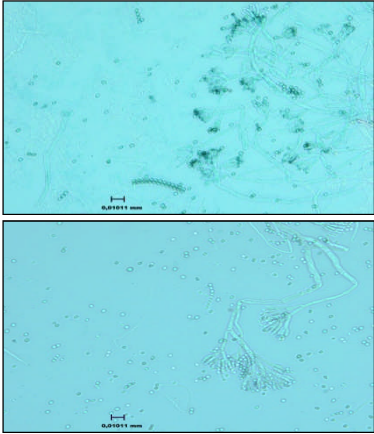
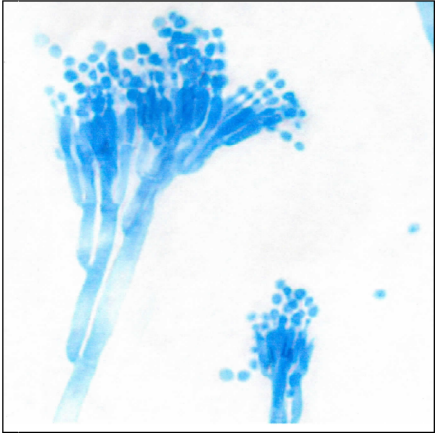
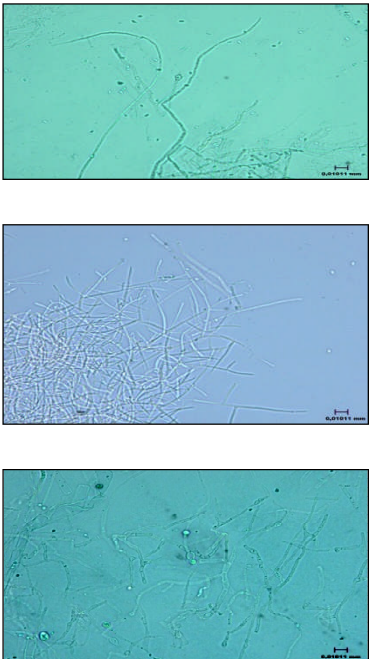
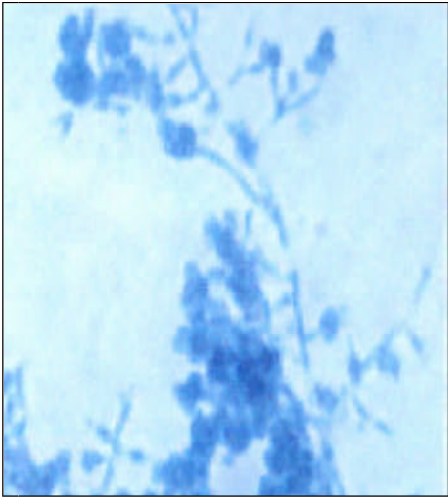
- ◆ 06 souches (C₂, D₃, E₇, U₁, V₁, V₂) présentent les caractères suivants :
- Conidiophores à croissance sympodiale, noirs
- Conidies bourgeonnées, en chaînes acropétales, noires, souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement

Ces souches appartiennent probablement au genre *Alternaria*

Tableau n° 4 : Caractères microscopiques des souches fongiques isolées.

Code de la souche	Aspect microscopique du genre	Genre	Photo microscopique (nos résultats)	Photo microscopique de référence. Malloch, (1997) ; Chabasse <i>et al.</i> , (2002).
A ₁ , A ₂ , B ₁ , B ₂ , D ₂ , E ₃ , E ₆ , E ₈ , F ₁ , F ₂ , F ₃ , G ₁ , G ₂ , H ₂ , H ₃ , J ₃ , J ₄ , K ₁ , K ₅ , L ₂ , M ₂ , N ₂ , O ₁ , O ₂ , P ₂ , X ₁ , X ₂ , X ₃ , Z ₁ , Z ₂ , Z ₃ , Z ₄ , G' ₂	-Têtes conidiennes unisériées, en colonne compacte -Conidiophores courts s'élargissant au sommet en vésicule sub-hémisphérique -Phialides dressés groupées -Conidies sub-globuleuses à globuleuses, échinulées	<i>Aspergillus fumigatus</i>		
A ₃ , E ₅ , G ₃ , G ₄ , H ₁ , K ₂ , K ₃ , L ₁ , M ₁ , N ₁ , P ₁ , P ₃ , P ₄	- Têtes conidiennes bisériées, très longues, cylindriques et compactes -Conidiophores lisses, hyalins -Vésicules hémisphériques -Métules ne couvrant que la moitié supérieure ou les deux tiers de la vésicule -Phialides groupés parallèles -Conidies globuleuses lisses	<i>Aspergillus terreus</i>		
E ₄ , F ₄ , S ₁ , S ₂ , Y ₁ , Z ₆ , W ₁ , A' ₁ , F' ₁	- Têtes conidiennes unisériées ou bisériées -Conidiophores hyalins -Vésicules sub-globuleuses -Conidies globuleuses à sub-globuleuses	<i>Aspergillus flavus</i>		

D ₁ , E ₁ , E ₂ , Q ₁ , R ₁ , Z ₅	- Têtes conidiennes bisériées, radiées - Conidiophores lisses, hyalins - Vésicules globuleuses - Métules brunâtres, variables - Conidies globuleuses, échinulées	<i>Aspergillus niger</i>		
C ₂ , D ₃ , E ₇ , U ₁ , V ₁ , V ₂	- Conidiophores à croissance sympodiale - Conidies en chaînes acropétales, noirs, souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement	<i>Alternaria</i>		
C ₁ , C ₃ , C ₄ , K ₄	- Cellules à paroi très épaisse - Asques globuleux, octosporés - Ascospores unicellulaires - Têtes conidiennes cylindriques - Conidiophores bisériés - Conidies globuleuses, échinulées	<i>Emmericella</i>		
S ₃ , S ₄ , T ₁	- Thalle à croissance rapide - Conidiophores parfois très ramifiés - Phialides plus ou moins allongés pouvant produire deux types de conidies : macroconidies fusiformes, microconidies septées fusiformes ou ovoïdes	<i>Fusarium</i>		

H₄, Q₃, Q₄, Z₇, B'₁, C'₁, D'₁, D'₂, E'₁, G'₁	-Conidiophores isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille -Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore -Conidies disposées en longue chaîne, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses	<i>Penicillium</i>		
J₁, J₂, Q₂	-Thalle à croissance rapide -Conidiophores en touffes compactes, très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit -Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet -Conidies réunies en glomérules au sommet des phialides	<i>Trichoderma</i>		

- ◆ 04 souches (C₁, C₃, C₄, K₄) décrites par les caractéristiques suivantes :

- Cellules à paroi très épaisse
- Asques globuleux octosporés, nombreux et disposés sans ordre
- Ascospores unicellulaires
- Têtes conidiennes cylindriques
- Conidiophores bisériés
- Conidies globuleuses, échinulées

Par ces caractères, ces souches semblent appartenir au genre ***Emericella***

- ◆ 03 souches (S₃, S₄, T₁) caractérisées par :

- Thalle à croissance rapide
- Conidiophores parfois très ramifiés
- Phialides plus ou moins allongées pouvant produire deux types de conidies : des macroconidies fusiformes, des microconidies septées fusiformes ou ovoïdes

Ces souches semblent appartenir au genre ***Fusarium***

- ◆ 10 souches (H₄, Q₃, Q₄, Z₇, B'₁, C'₁, D'₁, D'₂, E'₁, G'₁) ont les caractéristiques suivantes :

- Conidiophores isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille
- Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore
- Conidies disposées en longue chaînes, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses

Ces souches appartiennent probablement au genre ***Penicillium***

- ◆ 03 souches (J₁, J₂, Q₂) caractérisées par :

- Thalle à croissance rapide
- Conidiophores en touffes compactes, très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit
- Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet
- Conidies réunies en glomérules au sommet des phialides

Ces critères rejoignent ceux du genre ***Trichoderma***

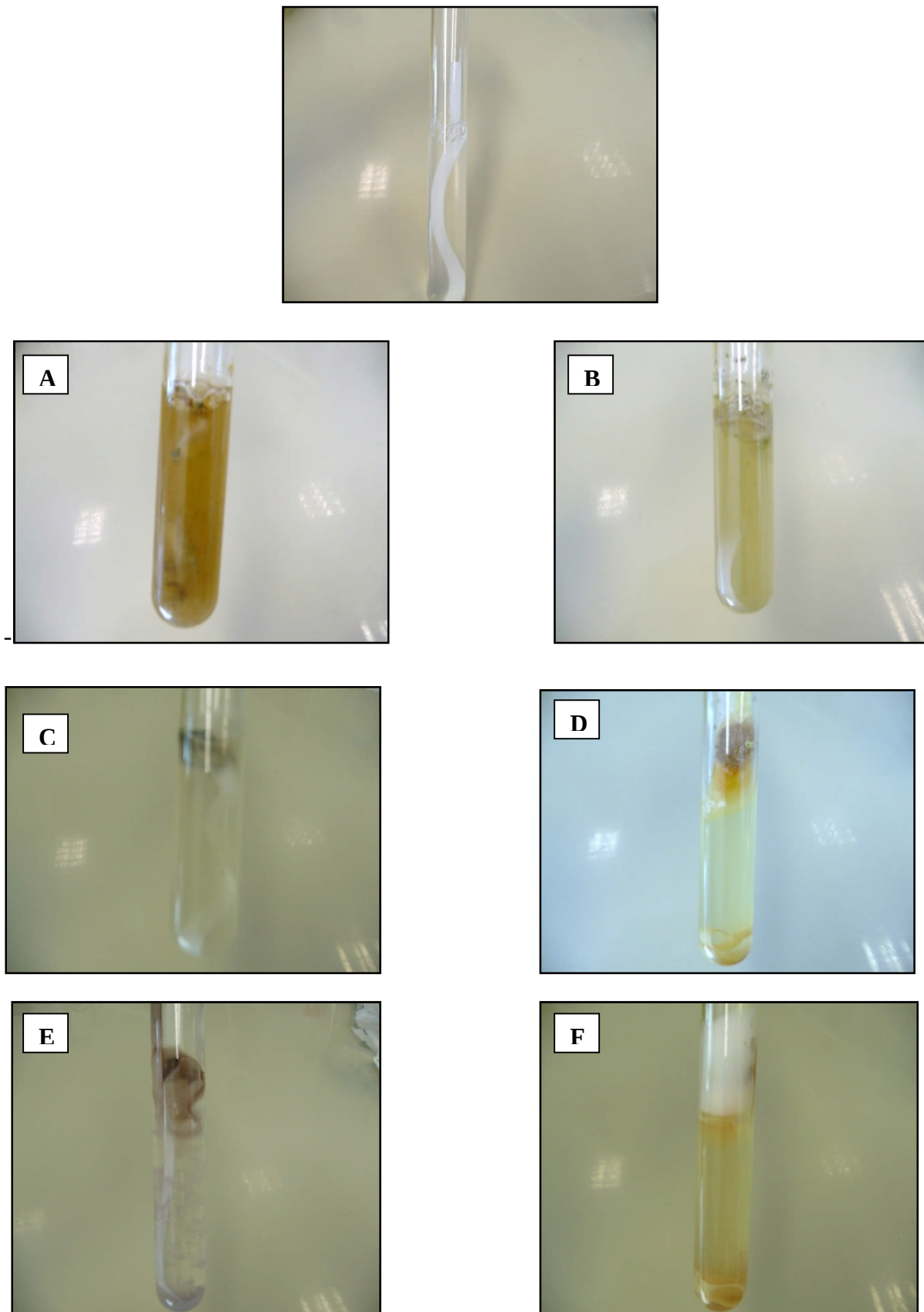


Figure 10 : Test au papier filtre (après 7 jours d'incubation sur milieu minéral Mandel avec bandelette de papier à 30°C et à pH 5) : Témoin, A : *Trichoderma* (J₂), B : *Trichoderma* (J₁), C : *Trichoderma* (Q₂), D : *Penicillium* (H₄), E : *Alternaria* (E₇), F : *Aspergillus* (M₁).

Les caractères des six genres cités précédemment correspondent parfaitement à ceux décrits par Larone, (1995) ; St-Germain et ses collaborateurs, (1996) ; Collier et son équipe, (1998) pour l'identification du genre *Aspergillus*, ou encore par Larone, (1995) ; St-Germain et ses collaborateurs, (1996) ; Malloch, (1997) ; Sutton et ses collaborateurs, (1998), De Hoog et son équipe, (2000) pour celle du genre *Penicillium*.

Les mêmes critères d'identification du genre *Fusarium* sont décrits par Larone, (1995) ; Sutton et ses collaborateurs, (1998), et pour les genres *Alternaria* et *Emmericella* décrits par Samson et son équipe, (1981) ; Guiraud, (1998) et Botton (1990).

Enfin, le genre *Trichoderma* attire notre intérêt par sa capacité à produire toute une variété de métabolites. La caractérisation de ce genre permet de faire le rapprochement avec ces dispositifs micro et macroscopiques spécifiques décrits par Larone, (1995) ; St-Germain et ses collaborateurs, (1996), Sutton et ses collaborateurs, (1998) et De Hoog et son équipe, (2000).

1.3. Sélection des souches cellulolytiques

La quantification et l'obtention des cellulases fongiques sont des objectifs difficiles à atteindre (Stephen *et al.*, 2003). De ce fait, deux milieux différents sont mis au point pour permettre le criblage des souches cellulolytiques (88 isolats) : un milieu minéral liquide contenant une bandelette de papier filtre pour une sélection primaire et un milieu solide contenant de la cellulose Walseth pour une sélection secondaire (choix de la souche cellulolytique performante ; souche d'intérêt).

Seules les souches ayant répondu positivement au test papier filtre ont été prises en considération pour le test des plaques à trous. En effet, 06 souches fongiques parmi les 88 isolées, ont été sélectionnées pour le test des plaques à trous.

1.3.1. Test au papier filtre

- ✓ Le test sur papier filtre (figure 10) a permis d'observer différents aspects : Dégagement des fibres cellulosiques et digestion partielle du papier lui conférant un aspect cotonneux suite à sa rupture et à sa dissolution. Cette observation s'explique probablement par la sécrétion des enzymes cellulolytiques par les souches testés dans le milieu extracellulaire

caractérisées par la production de cellulases fongiques extracellulaires (Nam Sun Wang, 2003).

- ✓ Croissance mycélienne des souches fongiques sur la partie immergée du papier, probablement due à l'absorption des spores par le papier filtre. Leur condensation sur l'extrémité terminale entraîne une croissance par fixation au support cellulosique. Ce phénomène d'adhésion se traduit par :
 - ◆ La présence d'enzymes cellulases à la surface des cellules fongiques (Wachinger *et al.*, 1989 ; Bond et Stutzenberger, 1989). Par cet effet de proximité, l'enzyme devient plus active lorsqu'elle est immobilisée à la surface du substrat, et la réaction de dégradation de la cellulose devient alors plus intense (Nam Sun Wang, 2003).
 - ◆ La capacité des mycètes filamenteux cellulolytiques, à pénétrer les substrats cellulosiques par les prolongements des hyphes, présentant ainsi leurs structures mycéliennes en cavité confinées dans les particules cellulosiques (Eriksson *et al.*, 1990).
- ✓ Formation d'un voile mycélien à la limite liquide/air s'expliquant probablement par l'effet de flottement des spores s'associant ainsi à la région cellulosique la plus proche. Les champignons ont besoin d'air et poussent à la surface.

La souche (J₂) a montré clairement ces trois critères de sélection de manière associée, alors que les cinq autres souches révèlent leur activité cellulolytique par l'un ou l'autre de ces critères. Toutes ces observations sont comparées à un tube témoin qui au bout du 30^{ème} jour d'incubation n'a pas changé d'état grâce à sa structure (cristaux très serrés), qui ne peut être endommagée que par l'action de l'exoglucanase (Nam Sun Wang, 2003). Les moisissures qui produisent cette enzyme, ont la capacité de dissoudre les fibres de cellulose du papier ou du coton, et faire ainsi désagréger le matériau (Carlile et Watkinson, 1997), leur potentiel cellulolytique est déterminé par les différentes modifications apparentes sur le papier (Hee *et al.*, 1993).

Les souches fongiques cellulolytiques, les plus étudiées sont : *Aspergillus* (Kitamoto *et al.*, 1996 ; Lokington Kelly, 1997 ; Riou *et al.*, 1998 ; Fujita *et al.*, 2002), *Penicillium* et différentes espèces de *Trichoderma* (Pettersson *et al.*, 1981 ; Neiss et Montenecourt, 1984, Kubicek et Penttilä, 1998 ; Takashima *et al.*, 1999 ; Nogawa *et al.*, 2001). Ces

Tableau n° 5 : Diamètre en mm des halos d'hydrolyse obtenus sur cellulose Walseth à 35°C.

Temps (heures)	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240
J₂	-	10.4	12.4	14.5	16.5	18.4	20.8	22.6	24.4	26.4
J₁	-	-	9.25	11	13.4	14.5	16	17.5	18.2	18.8
Q₂	-	-	8.25	10	11.8	13	14	15	16	17
H₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M₁	-	-	09	11	13	14.4	16.2	17	17.8	18.2
E₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Absence du halo d'hydrolyse.

Tableau n° 6 : Diamètre en mm des halos d'hydrolyse obtenus sur cellulose Walseth à 30°C.

Temps (heures)	120	192
J₂	16	20
<i>T.reesei</i> Rut C-30	19	27

observations corroborent nos résultats. Cependant, le genre *Alternaria* est moins connu pour la production de la cellulase, mais révélé par Macris, (1984).

1.3.2. Test sur plaques à trous

Cette méthode de révélation permet une lecture directe, quand on dispose d'un polysaccharide opaque (cellulose Walseth). Les enzymes libérées diffuseront à travers la gélose et hydrolyseront le substrat, provoquant la formation d'un halo clair sur fond opaque.

Les six souches (J₁, J₂, Q₂, H₄, M₁, E₇) préalablement sélectionnées par le test au papier filtre, sont testées par cette méthode. Le tableau 5, regroupe les cinétiques d'hydrolyse des souches testées, obtenus sur cellulose Walseth.

La lecture du tableau 5 permet l'analyse suivante :

Les souches H₄ et E₇ ne possèdent pas d'activité cellulolytique.

Les souches J₁, Q₂ et M₁ possèdent une faible activité cellulolytique (entre 17 et 18,8 mm d'hydrolyse en 240h) comparée à la souche J₂ qui possède une production plus importante en cellulase (halo d'hydrolyse de 26,4 mm après 10 jours d'incubation à 35°C). Cette souche est retenue pour la poursuite des travaux.

Cette sélection a permis d'éliminer les 05 souches préalablement sélectionnées (J₁, Q₂, H₄, M₁, E₇), qui dans ces conditions donnent un faible diamètre du halo d'hydrolyse (J₁, Q₂ et M₁), ou n'éclaircissent pas la cellulose Walseth (H₄ et E₇).

Le test des plaques à trou est utilisé aussi pour la comparaison de la souche sélectionnée (J₂) avec la souche de référence *T.reesei* Rut C-30 (tableau 6). Après préparation, ensemencement et incubation des boîtes à 30°C pendant 192 heures, la souche sélectionnée J₂ a des performances comparables (le diamètre du halo d'hydrolyse de la cellulose Walseth est mesuré à 20 mm) à celle de la souche répertoriée *T.reesei* Rut C-30 (le diamètre du halo d'hydrolyse de la cellulose Walseth est mesuré à 27 mm).

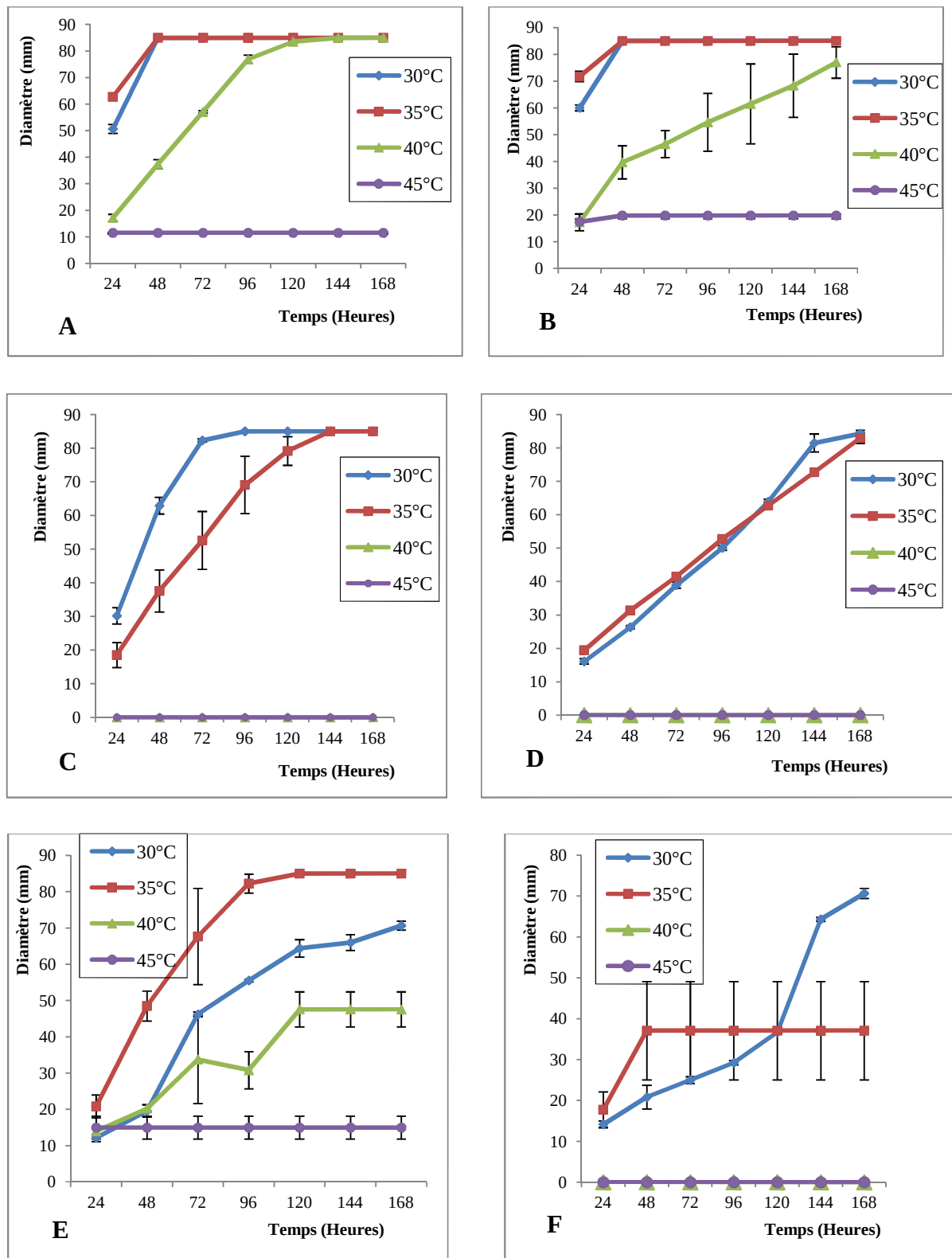


Figure 11 : Effet de la température sur la croissance des souches fongiques sélectionnées par le test au papier filtre : (A) *Trichoderma* (J₂), (B) *Trichoderma* (J₁), (C) *Trichoderma* (Q₂), (D) *Alternaria* (E₇), (E) *Aspergillus* (M₁), (F) *Penicillium* (H₄) à différentes températures : 30°C (◆), 35°C (■), 40°C (▲), 45°C (●).

1.4. Effet de la température sur la croissance des souches fongiques sélectionnées

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance, la germination, la sporulation et le métabolisme des moisissures (Raimbault, 1983). Aussi, les microorganismes sont répartis en 3 groupes : les psychrophiles qui se développent entre -5 et +20°C, les mésophiles entre 15 et 45°C et enfin les thermophiles entre 45 et 100°C ou plus (Herbert, 1992).

L'étude de l'effet de la température sur la croissance des six souches fongiques sélectionnées par le test au papier filtre (figure 11), a été étudié en boîte de Pétri (85 mm de diamètre).

La souche J₂ envahie complètement la boîte de Pétri (85 mm de diamètre) au bout de 48 heures à 30°C et à 35°C, avec une croissance fournie et un début de sporulation après 72 heures d'incubation à 35°C. A 40°C, une augmentation progressive est observée : le diamètre de la colonie fongique de 17.1 mm après 24 heures passe à 85 mm après 144 heures d'incubation. A 45°C pendant 24 heures, un début de croissance de la colonie (diamètre de 11.5 mm). Cependant, au-delà de 48 heures, la croissance s'arrête.

La souche de *Trichoderma* (J₁) montre un envahissement complet de la boîte de Pétri (diamètre = 85 mm) à 30°C et à 35°C, après 48 heures d'incubation, et donne une très bonne sporulation après 72 heures d'incubation à 35°C. Le diamètre de la colonie fongique augmente progressivement de 17.3 mm après 24 heures jusqu'à 77 mm après 168 heures à 40°C. Un début de croissance (diamètre = 22.5 mm) après 48 heures d'incubation. Après 72 heures jusqu'à 168 heures d'incubation à 45°C, la croissance est arrêtée avec un diamètre constant (22.5 mm).

La souche de *Trichoderma* (Q₂) envahie la boîte de Pétri (diamètre = 85mm) après 96 heures d'incubation à 30°C. A 35°C, une croissance progressive de 18.6 mm de diamètre après 24 heures jusqu'à 85 mm de diamètre après 144 heures d'incubation. A 40 et 45°C, la souche ne peut pas se développer.

Le genre *Alternaria* (E₇), montre une croissance lente à 30 et 35°C, avec des diamètres de 16 mm et 19.4 mm après 24 heures d'incubation, respectivement. Aucune croissance n'est observée à 40 et à 45°C.

Tableau 7 : Vitesse d'élongation des mycéliums des 6 souches productrices de cellulases à différentes températures de croissance.

	Vitesse d'élongation en mm/h			
Température de croissance	30°C	35°C	40°C	45°C
<i>Trichoderma</i> J2	1.04 (24h)	1.29 (24h)	0.37 (96h)	0.00
<i>Trichoderma</i> J1	1.25 (24h)	1.50 (24h)	0.20 (entre 24 et 168h)	0.00
<i>Trichoderma</i> Q2	0.54 (entre 24 et 72h)	0.27 (entre 24 et 144h)	0.00	0.00
<i>Alternaria</i> E7	0.27 (entre 24 et 144h)	0.29 (entre 24 et 168h)	0	0
<i>Aspergillus</i> M1	0.26 (entre 24 et 120h)	0.61 (entre 24 et 72h)	0.19 (entre 24 et 120h)	0.00
<i>Penicillium</i> H4	0.19 (entre 24 et 168 h)	0.66 (entre 24 et 48h)	0.00	0.00

Entre parenthèse : temps de croissance utilisé pour le calcul (le champignon ayant envahi la boîte de Pétri)

Quand au genre *Aspergillus* (M₁), la souche montre une croissance lente à 30°C, le diamètre de la colonie est mesuré à 12.1 mm après 24 heures et à 70.6 mm après 168 heures d'incubation. Une émergence et sporulation de plusieurs colonies après 96 heures d'incubation à 35°C. A 40°C, un début de croissance avec 14 mm de diamètre après 24 heures jusqu'à 47.6 mm après 120 heures d'incubation, suivi d'une sporulation au bout de 168 heures d'incubation à 45°C, émergence de nombreux points de colonies avec sporulation, dont le diamètre est mesuré à environ 15 mm après 24 heures d'incubation jusqu'à la fin de la culture.

La souche de *Penicillium* (H₄), montre une croissance lente à 30°C avec un diamètre = 14.1 mm après 24 heures et 70.6 mm après 168 heures d'incubation. Une émergence et sporulation de plusieurs colonies dont le diamètre = à environ 37 mm après 72 heures d'incubation à 35°C. A 40 et à 45°C, il n'y a pas de croissance.

Les croissances des 6 moisissures sélectionnées ont donc été menées sur 168 h (soit 7 jours) à 30°, 35°, 40° et 45°C et les vitesses d'élongation des mycéliums ont été mesurées. (tableau 7). *Trichoderma* et *Aspergillus* se montre plus résistant à la chaleur que *Pénicillium*. Naturellement les *Trichoderma* sont des moisissures qui « envahissent » bien les surfaces avec un développement et un étalement rapide du mycélium, aussi la sporulation que l'on a observé plus ou moins rapidement. L'observation de la croissance à 45°C chez certaines souches sur les 24 premières heures, peut être lié à la mise au point technique de la manipulation, plus qu'à la possibilité de croissance réelle à 45°C. On a pu l'observer chez les souches les plus thermophiles des 6 (*Trichoderma* et *Aspergillus*) donc effectivement une croissance proche de 45°C mais inférieur à 45° est envisageable.

Les champignons sont classés selon la gamme de température à laquelle ils se développent. On distingue quatre catégories citées ci-dessous (tableau 8).

Tableau n° 8 : Catégories de champignons selon leur gamme de température de développement (d'après Roquebert, 1997).

Types de champignons	Gamme de température	Température optimale
Mésophiles	0°C à 50°C	15°C à 30°C
Thermophiles	20°C à 50°C	35°C à 40°C
Thermotolérants	0°C à 50°C	15 à 40°C
Psychrophiles	0°C à 20°C	0°C à 17°C

Les champignons sont majoritairement mésophiles. A côté des quatre catégories de champignons citées en tableau 8, il existe des champignons qui se développent dans des conditions extrêmes. C'est le cas par exemple des champignons dits thermorésistants pouvant se développer jusqu'à 80°C comme *Aspergillus fischieri* (Conner et Beuchat, 1987).

En se basant sur la classification de Roquebert, (1997), on peut conclure que la souche d'intérêt *Trichoderma* (J₂) est thermophile avec une température optimale de croissance proche ou égale à 35°C, et une croissance appréciable entre 30 et 40°C avec des vitesses d'élongation du mycélium de 1.04 et 0.37 mm/h respectivement.

2. Production des cellulases

2.1. La souche cellulolytique d'intérêt

Le test des plaques à trou, utilisé pour la sélection de la souche la plus performante parmi les six souches préalablement sélectionnées, a permis de choisir la souche (J₂) pour sa grande capacité cellulolytique. En effet, cette dernière a provoqué un diamètre d'hydrolyse de 26.4 mm après 240 heures d'incubation à 35°C sur cellulose Walseth. Elle est apparentée au genre *Trichoderma*. Effectivement, le genre *Trichoderma* est connu parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques et les mieux étudiées (Pettersson *et al.*, 1981 ; Kubicek Penttilä, 1998) par leur capacité à produire au moins 2 exoglucanases (Shoemaker *et al.*, 1983 ; Chen *et al.*, 1987), 5 endoglucanases (Pentilla *et al.*, 1987) et 2 β -glucosidases (Barnett *et al.*, 1991 ; Takashima *et al.*, 1999 ; Nogawa *et al.*, 2001). L'identification de la souche a été réalisée au niveau du laboratoire DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH).

▪ **Caractères culturels :**

Ce champignon a une croissance très rapide et extensive sur milieu PDA à 35°C (diamètre de 25 mm après 24 heures d'incubation). La souche produit un mycélium hyalin puis apparaissent en vieillissant des touffes verdâtres sur le milieu de culture. Le verso de la colonie est jaunâtre. La moisissure ne produit aucune odeur.

▪ **Morphologie microscopique :**

Sur des hyphes septés hyalins apparaissent des conidiophores ramifiés à angle droit, avec parcimonie, pas d'appendices stériles. Les hyphes portent des phialides, en forme de flacon, fixés à angle droit sur le conidiophore, disposés essentiellement seuls, latéralement ou d'un phialide terminal le long des branches (7.5 à 10 μ m de long).

Les conidies, cylindriques à ellipsoïdes, à paroi lisse, mesurent de 4 à 5 x 3 μ m de diamètre.

▪ **Identité :**

Trichoderma longibrachiatum Rifai.

Néanmoins, l'espèce *Trichoderma longibrachiatum* est moins connue pour son activité cellulolytique, notre souche sélectionnée en possède une (d'où l'originalité de notre étude).

Tableau n° 9: Comparaison de la production de cellulases par *Trichoderma longibrachiatum* (J₂) et *Trichoderma reesei* Rut C-30.

A: Production de cellulases à 30°C

Temps (Heures)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (J ₂)				<i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30			
	Activités enzymatiques (UI ml ⁻¹)				Activités enzymatiques (UI ml ⁻¹)			
	APF	Endoglucanase	β-glucosidase	pH	APF	Endoglucanase	β-glucosidase	pH
48	0.84±0.06	6.15±0.23	0.20±0.01	2.90±0.01	2.38±0.06	10.91±0.27	0.21±0.01	2.71±0.02
72	1.04±0.03	8.62±0.11	0.22±0.01	3.20±0.02	2.42±0.10	11.47±0.13	0.32±0.06	2.85±0.00
96	1.45±0.03	9.57±0.17	0.26±0.01	3.02±0.01	2.36±0.30	11.51±0.21	0.43±0.02	2.76±0.01
120	1.49±0.06	10.07±0.15	0.30±0.02	3.31±0.06	2.75±0.15	11.85±0.24	0.43±0.02	2.81±0.02
144	1.56±0.03	9.79±0.21	0.32±0.06	3.32±0.03	2.72±0.08	11.03±0.23	0.56±0.04	2.75±0.02
168	1.56±0.04	10.37±0.14	0.44±0.02	3.37±0.04	2.67±0.11	11.47±0.21	0.58±0.05	2.70±0.02
192	1.63±0.04	9.84±0.48	0.49±0.01	3.86±0.12	2.78±0.13	13.67±0.20	0.62±0.02	2.70±0.02
216	1.61±0.08	9.83±0.62	0.48±0.02	5.11±0.11	2.53±0.06	12.04±0.42	0.42±0.01	2.80±0.03
240	1.72±0.08	9.38±0.18	0.37±0.05	5.62±0.11	2.53±0.17	12.22±0.14	0.39±0.01	2.76±0.00

B: Production de cellulases à 35°C

Temps (Heures)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (J ₂)				<i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30			
	Activités enzymatiques (UI ml ⁻¹)				Activités enzymatiques (UI ml ⁻¹)			
	APF	Endoglucanase	β-glucosidase	pH	APF	Endoglucanase	β-glucosidase	pH
48	1.09±0.06	9.22±0.15	0.22±0.01	2.75±0.02	1.32±0.04	9.72±0.106	0.21±0.01	3.41±0.12
72	1.39±0.05	10.17±0.27	0.27±0.01	2.94±0.01	1.90±0.07	10.73±0.10	0.42±0.02	3.02±0.02
96	1.71±0.08	10.42±0.18	0.44±0.06	3.17±0.02	2.02±0.07	10.39±0.14	0.59±0.03	3.14±0.01
168	2.04±0.09	10.61±0.13	0.70±0.03	4.48±0.04	2.08±0.09	10.11±0.55	0.65±0.02	3.22±0.01
192	2.02±0.05	10.46±0.25	0.92±0.03	5.47±0.03	1.76±0.11	9.68±0.17	0.60±0.02	3.36±0.02
216	1.78±0.07	9.78±0.20	1.25±0.03	5.92±0.02	1.69±0.10	9.38±0.60	0.64±0.05	3.47±0.04
240	1.61±0.05	9.08±0.15	1.32±0.06	6.1±0.02	1.63±0.09	8.68±0.51	0.72±0.03	3.61±0.05

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts-types.

2.2. Comparaison de la production par les deux souches : la souche isolée *Trichoderma longibrachiatum* et la souche de référence *Trichoderma reesei* Rut C- 30

La comparaison des quantités d'enzymes produites par la souche isolée (J_2) *Trichoderma longibrachiatum* et la souche de référence *Trichoderma reesei* Rut C- 30, est effectuée par fermentation sur milieu Mandel dans des erlens meyer avec un taux d'inoculum de 10^7 spores/ml, incubées à 30°C et à 35°C.

Au vu du tableau 9 A, à 30°C, la souche isolée montre une production enzymatique progressive avec un maximum obtenu après 240 heures, 168 heures et 192 heures pour l'activité papier filtre (1.72UI/ml), endoglucanase (10.37UI/ml) et la β -glucosidase (0.49UI/ml), respectivement. Par contre, les activités enzymatiques sont secrétées en quantité importante après 48 heures d'incubation par la souche mutante *T. reesei* Rut C-30, et pour atteindre le maximum de ces activités enzymatiques, elle présente des temps de culture presque équivalent à ceux de notre isolat, 192 heures pour l'activité APF (2.78UI/ml), l'endoglucanase (13.67UI/ml) et la β -glucosidase (0.62UI/ml), respectivement.

A 35°C, la souche isolée atteint le maximum de ces activités, qui sont supérieures à celles produites à 30°C (tableau 9 B). Le maximum de l'activité APF des deux souches est produit après 168 heures de croissance avec des valeurs similaires (*T. longibrachiatum* : **2.04UI/ml** et *T. reesei* Rut C-30 : **2.08UI/ml**). Le maximum de l'activité β -glucosidase de *T. longibrachiatum* (1.32UI/ml) est obtenu après 240 heures, il est 2.69 fois plus élevé que celui obtenu à 30°C et 1.83 fois plus élevé que chez *T. reesei* Rut C-30, à 35°C (pour la même durée d'incubation). Il est à signaler que, *T. reesei* Rut C-30 secrète le maximum d'activité endoglucanase (10.73UI/ml) après 72 heures de culture, équivalent à celui de la souche locale isolée : 10,17 UI/ml (dans le même temps).

La température et le pH des fermentations, sont deux facteurs importants, affectant la biosynthèse des enzymes. La production des cellulases par la souche isolée est favorisée à 35°C, qui correspond plutôt à sa température optimale de croissance. Le mutant *T. reesei* Rut C-30, produit plus d'activités enzymatiques (APF, endoglucanase et β -glucosidase) que la souche isolée avec les différences respectives de 1.06UI/ml, 3.3UI/ml et 0.13UI/ml, à 30°C. A 35°C, les deux souches ont la même capacité pour produire l'activité papier filtre et endoglucanase. La souche isolée, dans les mêmes conditions produit deux fois plus de β -glucosidase (1.32UI/ml) que celle produite par *T. reesei* Rut C-30 (0.72 UI/ml).

L'analyse de la variance indique que la production des enzymes est influencée par les trois facteurs testés (origine de la souche, la température et le temps de fermentation). La souche exerce un effet significatif sur la production des activités endoglucanase ($F=271.67$), APF ($F=2180.01$) et β -glucosidase ($F=27.17$). La température agit significativement sur la production des activités endoglucanase ($F=74.13$), APF ($F=307.81$) et β -glucosidase ($F=3196.10$). Le temps d'incubation a également un effet significatif sur la production des activités endoglucanase ($F=33.84$), APF ($F=152.89$) et β -glucosidase ($F=1261.47$) (Annexe 4 - 1).

De ces résultats, nous pouvons conclure que : les activités cellulaisques produites par la souche isolée, sont à leurs valeurs maximales à une température de fermentation de **35°C**, après une durée de culture de **168 heures** pour les activités **APF et endoglucanase**, **240 heures** pour l'activité **β -glucosidase**.

Le maximum des activités enzymatiques (**APF et endoglucanase**), produites par la souche de référence est obtenu à la température de fermentation de **30°C** après une durée d'incubation de **192 heures**. L'activité **β -glucosidase** est maximale à **35°C**, en fin de culture (**240 heures**).

Tableau n° 10: Effet du taux d'inoculum sur la production des enzymes celluloliques par la souche *Trichoderma longibrachiatum* (à 35°C).

A: 10^5 spores/ml, 10^6 spores/ml

Temps (Heures)	10^5 spores/ml				10^6 spores/ml			
	Activités enzymatiques (UI ml ⁻¹)				Activités enzymatiques (UI ml ⁻¹)			
	APF	Endoglucanase	β -glucosidase	pH	APF	Endoglucanase	β -glucosidase	pH
48	0.72±0.04	6.56±0.33	0.20±0.01	3.05±0.07	0.96±0.14	8.27±0.70	0.23±0.04	2.87±0.23
72	1.30±0.13	9.71±0.28	0.22±0.01	3.02±0.01	1.31±0.06	9.59±0.18	0.23±0.01	3.06±0.07
96	1.86±0.03	10.46±0.34	0.28±0.00	3.09±0.03	1.88±0.10	10.44±0.14	0.31±0.02	3.25±0.12
168	2.12±0.12	10.86±0.17	1.03±0.10	5.26±0.42	2.25±0.09	10.78±0.09	1.11±0.09	5.31±0.42
192	2.13±0.19	10.39±0.14	1.11±0.08	5.89±0.17	2.26±0.15	10.54±0.34	1.14±0.08	5.97±0.14
216	1.84±0.05	9.45±0.61	1.50±0.12	6.13±0.07	1.91±0.09	9.83±0.30	1.53±0.07	6.16±0.10
240	1.54±0.05	8.74±0.52	1.49±0.06	6.23±0.07	1.70±0.07	8.88±0.20	1.52±0.04	6.23±0.08

B: 10^7 spores/ml, 10^8 spores/ml

Temps (Heures)	10^7 spores/ml				10^8 spores/ml			
	Activités enzymatiques (UI ml ⁻¹)				Activités enzymatiques (UI ml ⁻¹)			
	APF	Endoglucanase	β -glucosidase	pH	APF	Endoglucanase	β -glucosidase	pH
48	1.09±0.06	9.22±0.15	0.22±0.01	2.75±0.02	1.13±0.07	9.24±0.10	0.20±0.01	2.79±0.00
72	1.39±0.05	10.17±0.27	0.27±0.01	2.94±0.01	1.37±0.09	10.05±0.13	0.29±0.01	3.00±0.01
96	1.71±0.08	10.42±0.18	0.44±0.06	3.17±0.02	1.52±0.05	10.24±0.21	0.48±0.02	3.24±0.02
168	2.04±0.09	10.61±0.13	0.70±0.03	4.48±0.04	1.75±0.08	10.22±0.11	0.74±0.06	4.42±0.30
192	2.02±0.05	10.46±0.25	0.92±0.03	5.47±0.03	1.75±0.22	10.48±0.17	0.80±0.07	5.20±0.40
216	1.78±0.07	9.78±0.20	1.25±0.03	5.92±0.02	1.58±0.04	10.12±0.15	1.08±0.08	5.79±0.26
240	1.61±0.05	9.08±0.15	1.32±0.06	6.1±0.02	1.38±0.04	9.06±0.09	1.17±0.06	6.11±0.09

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types.

2.3. Effet du taux d'inoculum sur la production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*

L'influence du taux d'inoculum sur la production de cellulases par *T. longibrachiatum* à 35°C est présentée dans le tableau 10

L'examen du tableau 10, montre que le taux d'ensemencement influe différemment l'expression des trois enzymes de la souche isolée *Trichoderma longibrachiatum* qui secrète le maximum d'endoglucanase (10.86UI/ml) après 168 heures de fermentation avec un taux d'ensemencement égal à 10^5 spores/ml. Après le même temps de culture l'activité est de 10.78UI/ml, 10.61UI/ml avec les taux d'inoculum de 10^6 spores/ml et 10^7 spores/ml, respectivement. Avec le taux 10^8 spores/ml, l'activité endoglucanase atteint la valeur 10.48UI/ml après 192 heures de culture. D'un autre coté, le maximum de l'activité papier filtre (2.26UI/ml) est mesuré avec le taux 10^6 spores/ml après 192 heures de culture, suivi sur le même temps de culture, par 2.13UI/ml avec 10^5 spores/ml, mais après 168 heures, l'activité APF est mesurée à 2.04UI/ml et 1.75UI/ml avec les taux 10^7 spores/ml et 10^8 spores/ml, respectivement. Concernant la β -glucosidase, le maximum de l'activité est évalué à 1.53UI/ml et 1.50UI/ml avec les taux 10^6 spores/ml et 10^5 spores/ml, respectivement après 216 heures de fermentation. Avec les taux 10^7 spores/ml et 10^8 spores/ml, l'activité atteint son maximum vers la fin (240 heures) de la culture (1.32UI/ml et 1.17UI/ml, respectivement).

L'influence de différentes concentrations en spores sur la synthèse de l'enzyme par la souche isolée *Trichoderma longibrachiatum*, est étudiée. Avec le taux 10^5 spores/ml, la production de l'enzyme est faible par comparaison aux autres taux. Les valeurs maximales des activités endoglucanase, papier filtre et la β -glucosidase sont obtenues avec le taux **10^6 spores/ml**, après **168, 192 et 216 heures**, respectivement. L'analyse de la variance des résultats, montre que le taux d'inoculum a un effet significatif sur la production des activités endoglucanases ($F=15.57$), papier filtre ($F=51.71$) et β -glucosidase ($F=36.30$). Le temps d'incubation exerce également un effet significatif sur la production des activités endoglucanase ($F=122.49$), papier filtre ($F=377.83$) et β -glucosidase ($F=745.57$) (Annexe 4 – 2).

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux indiqués par Roussos et Raimbault, (1982) pour la production de la cellulase par *Trichoderma harzianum*, où il n'existe pas de différences significatives entre les activités enzymatiques produites à concentrations élevées en spores (10^{10} spores/ml) avec celles mesurées à faibles taux d'inoculum (10^7 spores/ml). Par

contre, Domingues *et al.*, (2000) reportent des concentrations élevées en protéines et en activité enzymatique sont obtenues avec les taux d'inoculum les plus concentrés de *Trichoderma reesei* Rut C-30 cultivée sur milieu Mandel modifié. D'autres études montrent, qu'avec un taux d'inoculum de 10^4 spores/ml une souche de *Trichoderma harzianum* FJ1 produit d'importantes activités enzymatiques : CMCase (9.41UI/ml), xylanase (14.40UI/ml), β -glucosidase (0.71UI/ml) et Avicelase (0.24UI/ml), respectivement (Kim *et al.*, 2003). Aussi, Kwang *et al.*, (1994) reportent une concentration moyenne en inoculum pour la production de la cellulase et de la xylanase par *Aspergillus niger* KKS. En effet, cette différence s'explique par le fait que le produit inhibiteur contenu dans la suspension de spores réprime la croissance et la production d'enzymes lorsque l'inoculum est ajouté à une concentration élevée au milieu de culture (Jeenes *et al.*, 1991).

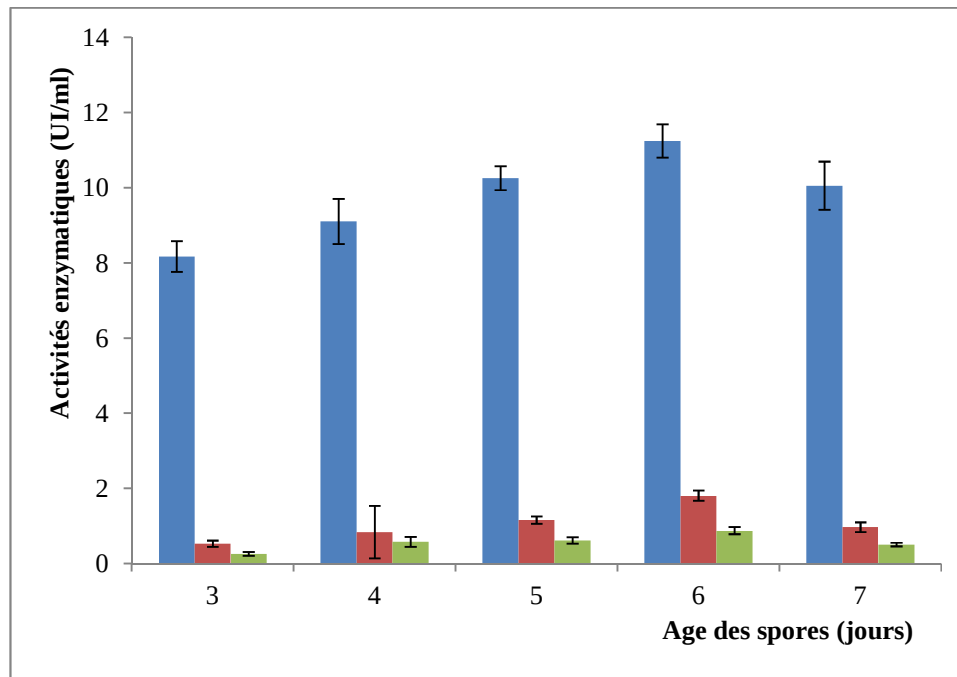


Figure 12: Effet de l'âge des spores sur la production des activités enzymatiques par la souche *Trichoderma longibrachiatum* : (■) Activité papier filtre, (■) endoglucanase, (■) β -glucosidase, après 10 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3.

2.4. Effet de l'âge des spores sur la production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*

L'effet de l'âge des spores sur la production des activités cellulolytiques par l'isolat *Trichoderma longibrachiatum* est étudié après 10 jours de culture sur milieu Mandel Avicel 1% (figure 12).

La production des enzymes est nettement influencée par les différents âges de spores testés. Le maximum des activités enzymatiques est obtenu après 10 jours de fermentation avec une suspension de spores préparée à partir d'une boîte de culture de la souche âgée de 6 jours, on mesurant l'activité endoglucanase à 11.24UI/ml, l'activité papier filtre à 1.81UI/ml et l'activité β -glucosidase à 0.88UI/ml. L'analyse de la variance (ANOVA) des résultats, montre que l'âge des spores exerce un effet significatif sur les activités enzymatiques mesurées : endoglucanase ($F=54.27$), activité papier filtre ($F=155.09$) et activité β -glucosidase ($F=160.16$) (Annexe 4 - 3).

Les inocula âgés renferment des spores matures, résultant d'un réseau végétatif d'hyphes plus dense et plus de sites de libération enzymatique (Reese, 1959). L'âge des spores varie d'une souche à une autre : 3 jours de spores d'*Aspergillus niger* pour la production d'enzymes pectinolytiques (Majsov, 2010) ; 6 jours de spores d'*Aspergillus tamarisii* pour la dégradation du caféine en fermentation solide (Hakil et al., 1999) et 7 jours de spores de *Rhizopus oryzae* pour la production de protéase (Aikat et Bhattacharyya, 2000).

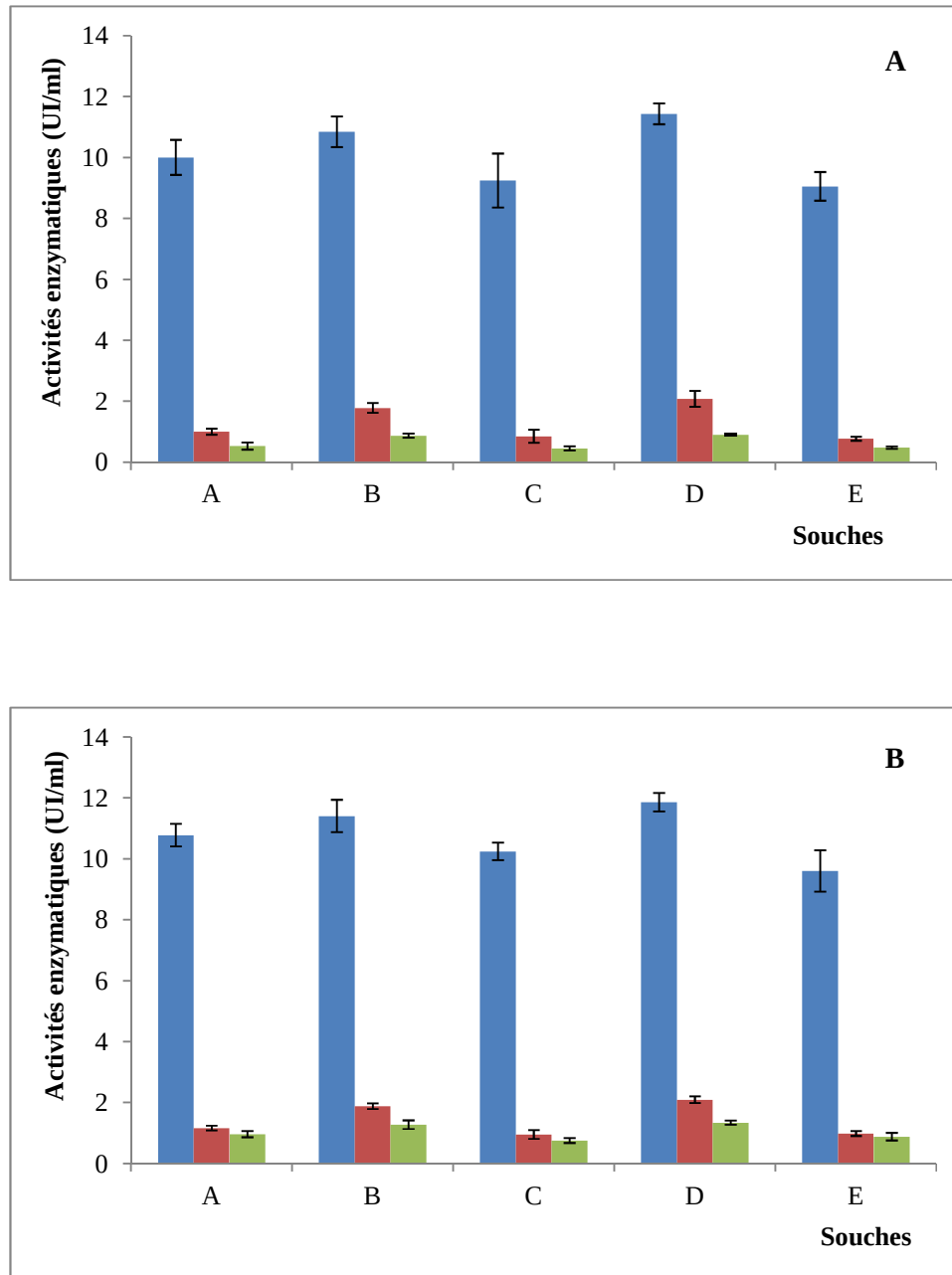


Figure 13: Production de cellulases avec les cinq souches issues du sous clonage de l'isolat *Trichoderma longibrachiatum* (GHL) : (■) Activité papier filtre, (■) endoglucanase, (■) β -glucosidase. A : après 7 jours de fermentation, B : après 10 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3.

2.5. Sous clonage de la souche *Trichoderma longibrachiatum* (GHL)

Notre isolat *Trichoderma longibrachiatum*, au fur et à mesure des manipulations, a montré une hétérogénéité au niveau de son aspect phénotypique, et de l'expression des activités enzymatiques produites (ça peut être une dérive génétique de la souche, c'est fréquent pour les souches sauvages), ce qui nous a dirigé vers le sous clonage afin de chercher les clones producteurs de cellulases de cette souche sauvage et d'assurer sa stabilité génétique au cours des repiquages qui soient issus d'une seule spore.

De ce fait, la suspension mère de spores et une série de dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , et 10^{-5}) sont étalées sur la gélose PDA en boîte de Pétri. Après incubation à 35°C pendant 24 heures, on note l'apparition de très petites colonies en étoile, on a repiqué les colonies bien isolées sur d'autres boîtes de PDA. Après incubation à 35°C pendant 24 heures, on enregistre 2 types de boîtes :

Type 01 : 03 boîtes que l'on désigne par **A**, **B** et **C** ayant des colonies avec un diamètre égale à 55 mm, accompagnées par un début de sporulation. En fin d'incubation, le mycélium de ces boîtes est pigmenté en vert clair qui vire dans le jaune

Type 02 : 02 boîtes que l'on désigne par **D** et **E** ayant des colonies de diamètre de 40 mm, sans sporulation. Le mycélium de ces boîtes est pigmenté en vert olive en fin d'incubation (7 jours)

Des fermentations sur milieu minéral Mandel Avicel 1% sont effectuées avec les cinq souches (A, B, C, D et E) issues du sous clonage, avec des prélèvements après 7 et 10 jours d'incubation afin de mesurer le pH et les activités enzymatiques.

La figure 13, montre des différences significatives entre les cinq souches étudiées. Après 7 jours d'incubation, la souche D s'est montrée plus performante que les autres, en produisant 2.08UI/ml d'activité APF, 11.43UI/ml d'activité endoglucanase et 0.90UI/ml d'activité β -glucosidase. Viennent ensuite les souches B, A, C et E, respectivement. A la fin de la fermentation (10 jours), on enregistre une légère augmentation des activités enzymatiques produites par les cinq souches. La souche D vient en première position (2.09UI/ml d'activité APF, 11.85UI/ml d'activité endoglucanase et 1.34UI/ml d'activité β -glucosidase), en deuxième position, on trouve la souche B (1.88UI/ml d'activité APF, 11.40UI/ml d'activité endoglucanase et 1.27UI/ml d'activité β -glucosidase). Enfin, viennent les souches A, C et E, respectivement.

L'analyse de la variance indique que le facteur souche, exerce un effet significatif sur la production des activités endoglucanase ($F=28.82$), papier filtre ($F=86.36$) et β -glucosidase ($F=30.54$) (Annexe 4 - 4).

Les deux souches **B** et **D** sont choisies pour le test cinétique des trois enzymes dans un fermenteur de 2 litres, afin de sélectionner une souche pour la suite des travaux.

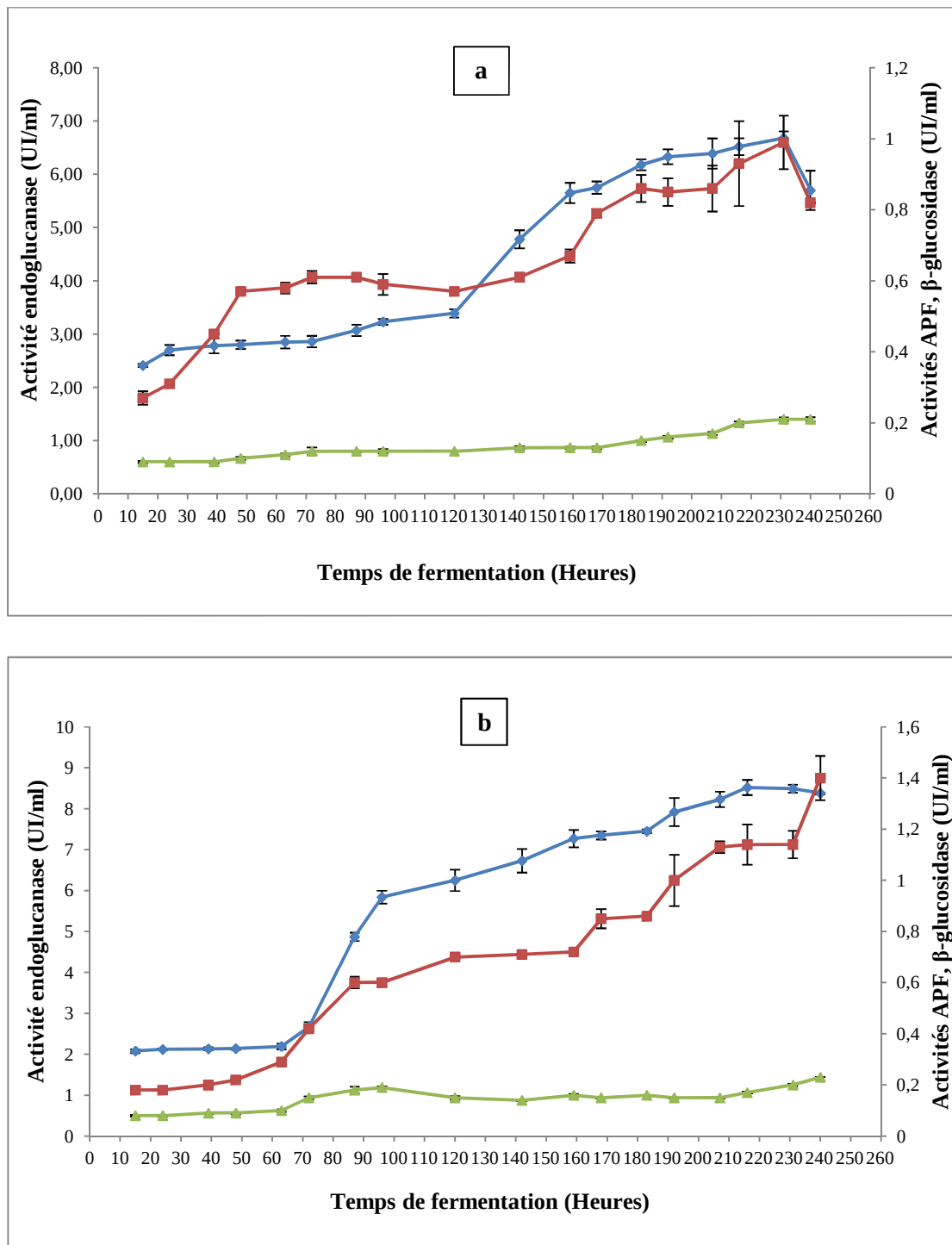


Figure 14 : Cinétique de production des activités cellulases en fermenteur de deux litres: (■) Activité papier filtre, (◆) endoglucanase, (▲) β -glucosidase. a : la souche B, b : la souche D. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3.

2.6. Cinétiques de production de cellulases en fermenteur de deux litres

Les résultats obtenus jusqu'ici sont réalisés en erlen-meyers de 500 ml. Pour poursuivre la cinétique de production des enzymes des souches B et D, nous réalisons des cultures dans un fermenteur de deux litres. Le milieu minéral Mandel Avicel 1% est utilisé à raison de 1200 ml de milieu de production, les conditions de la fermentation sont : pH initial 5.5, la température est maintenue à 35°C, sous agitation à 180 rpm.

Des échantillons sont prélevés à des intervalles de temps réguliers au cours de la croissance, et des mesures des activités enzymatiques sont réalisées sur les surnageants de culture.

La production des enzymes par la souche (B) est représentée dans la figure 14 a. L'activité endoglucanase varie de 2.41UI/ml à 3.39UI/ml dès le début de la culture jusqu'à 120 heures d'incubation. Au-delà de ce temps, une augmentation progressive est observée pour atteindre une valeur maximale 6.68UI/ml à 231 heures de fermentation. L'activité papier filtre (APF) est mesurée à 0.61UI/ml à 72 heures, qui reste stable jusqu'à 159 heures. Elle augmente ensuite pour atteindre un niveau maximal de 0.99UI/ml à 231 heures d'incubation. Cependant l'activité β -glucosidase demeure très faible, avec une production stable jusqu'à 216 heures, son maximum 0.21UI/ml est atteint après 231 heures de fermentation.

Avec la souche (D) (figure 14 b), l'activité endoglucanase reste identique sur les 72 premières heures à 2.67UI/ml puis elle augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum 8.52UI/ml à 216 heures. L'activité APF mesurée à 63 heures est de 0.18UI/ml, puis augmente jusqu'à sa valeur maximale 1.40UI/ml à 240 heures. L'activité β -glucosidase est encore très faible par rapport aux résultats obtenus en erlens (0.90UI/ml), 0.23UI/ml en fin de culture (240 heures).

Avec les deux souches (B et D) en fermenteur de deux litres, on n'arrive pas à de bons rendements en comparaison aux activités obtenues en erlens-meyers. Ceci est dû probablement au non contrôle du pH au cours de la fermentation.

Comme critère de sélection, nous avons considéré le rendement de production des activités cellulasiqes et nous avons retenu pour la suite de notre étude, la souche (**D**) qui est la plus productive.

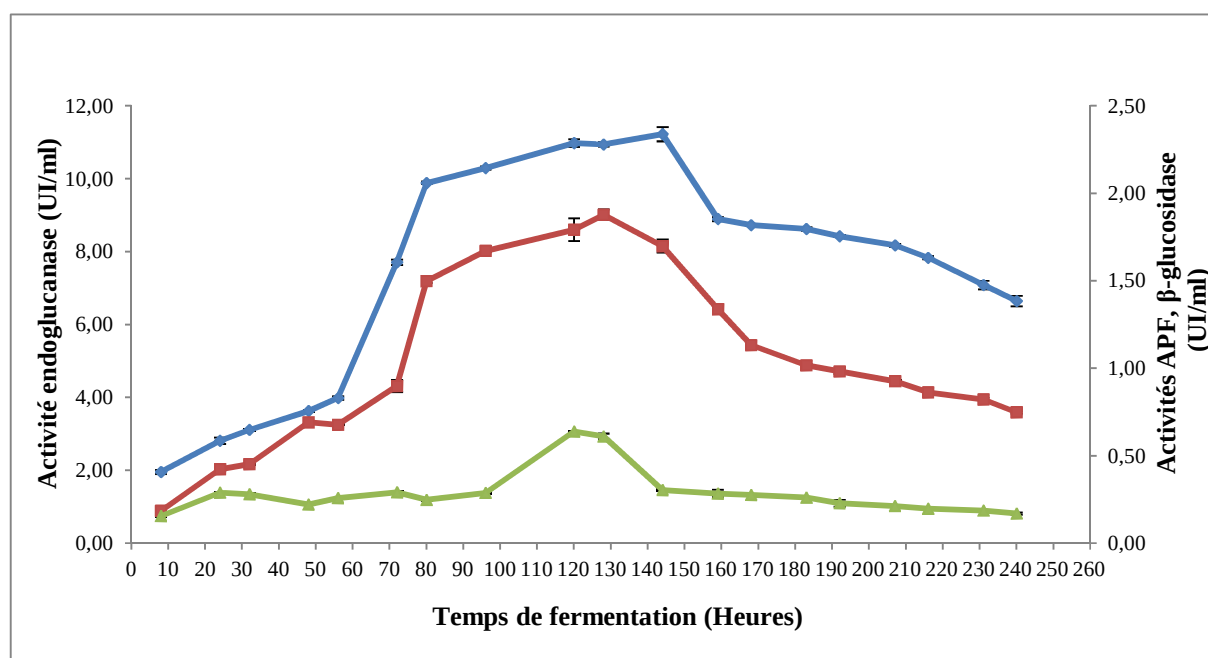


Figure 15: Cinétique de production des activités cellulases par la souche *Trichoderma* (GHL) sur milieu Mandel 10g.l⁻¹ cellulose Avicel en fermenteur de quatre litres à 35°C: (■) Activité papier filtre, (♦) endoglucanase, (▲) β-glucosidase. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts-types. N=3.

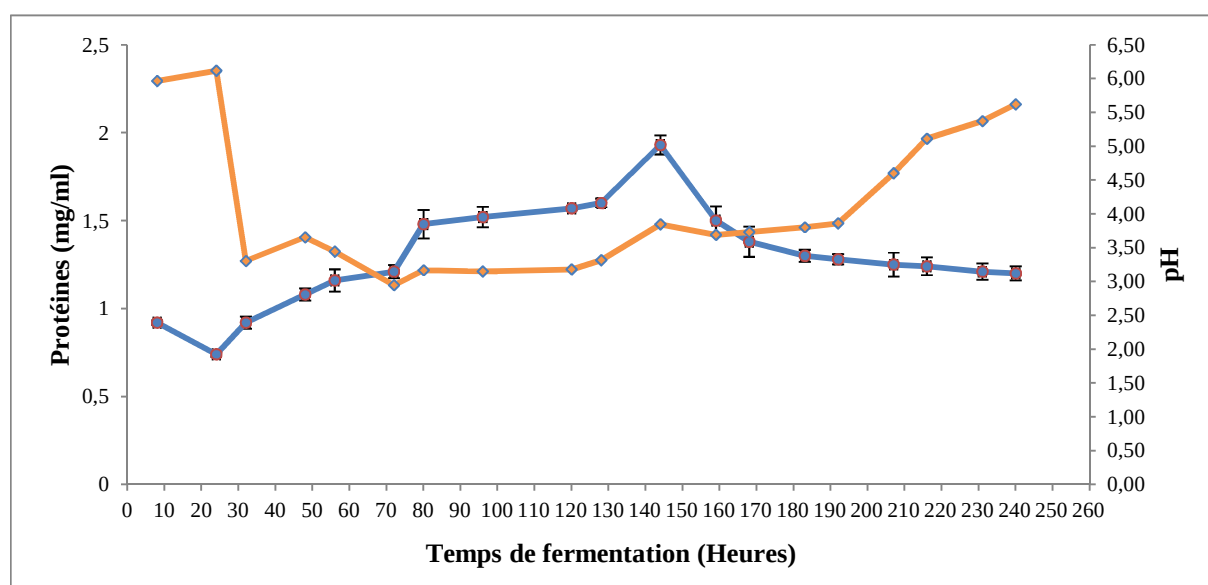


Figure 16 : Evolution cinétique des protéines et du pH au cours de la croissance de *Trichoderma* (GHL) sur milieu Mandel 10g.l⁻¹ cellulose Avicel dans le fermenteur de quatre litres à 35°C: (●) Protéines, (♦) pH. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts-types. N=3.

2.7. Cinétique de production des cellulases par *Trichoderma longibrachiatum* (souche D) en fermenteur de quatre litres

Une bonne croissance de la souche (D) de notre isolat *Trichoderma longibrachiatum* est observée en fermenteur de quatre litres sur le milieu minéral Mandel avec cellulose Avicel 1% comme seule source de carbone et inducteur de l'enzyme. De façon générale, nous obtenons des activités cellulases plus importantes après un temps de culture plus court que celles produites en fermenteur de deux litres. En effet, le maximum d'activité endoglucanase (11.22UI/ml) est atteint au bout de 144 heures de fermentation contre 216 heures en fermenteur de 2L pour une activité de 8.52UI/ml. Même chose avec l'activité papier filtre qui atteint son maximum (1.88UI/ml) à 128 heures de fermentation soit 112 heures plus tôt qu'en fermenteur de 2L. L'activité β -glucosidase atteint sa valeur maximale de 0.64UI/ml au bout de 120 heures de fermentation, soit une augmentation en activité (presque 3 fois plus) et un gain de temps (figure 15). La productivité enzymatique volumétrique est mesurée à $17.71\text{UI.L}^{-1}.\text{H}^{-1}$ et $166.66\text{UI.L}^{-1}.\text{H}^{-1}$ pour les activités papier filtre et endoglucanase, respectivement. Les activités spécifiques mesurées sont consignées dans le tableau n° 11.

La quantité totale de protéines augmente linéairement en fonction du temps de la fermentation (figure 16), puis atteint son maximum de 1.93 mg/ml au bout de 140 heures de fermentation. Cette augmentation traduit la synthèse des protéines, entre autres les enzymes. Au-delà de 140 heures de fermentation, la concentration en protéines diminue jusqu'à atteindre 1.20mg/ml (à 240 heures de fermentation), suite à l'action protéolytique des protéases libérées au cours de la lyse cellulaire (Roméro *et al.*, 1999). Le profil de l'évolution du pH est présenté dans la figure 16, où quatre phases de l'évolution du pH sont repérables. La première correspond à la germination des spores et le début de la croissance mycélienne, durant 25 heures environ montrant une légère augmentation du pH de 5.6 à 6.1. Dans la seconde phase, le pH diminue rapidement (moins de 10heures) et passe de 6.0 à 3.0 suite à une croissance active du mycélium qui libère des acides organiques qui acidifient progressivement le milieu. La 3^{ème} phase se caractérise par un pH qui reste stable à une valeur de 3 sur plus de 170 heures et puis augmente à 3.8 au bout du 6^{ème} jour de fermentation. Enfin, la dernière phase où le pH augmente jusqu'à atteindre la valeur de 6 en fin de culture, cette augmentation du pH s'explique par la libération des acides aminés et des ions ammonium (NH_4^+) dans le milieu, suite à une protéolyse intense (Botton *et al.*, 1990), aussi à l'épuisement du milieu en substrats nutritifs et au début de l'autolyse mycélienne.

Tableau n° 11: Evolution cinétique des activités enzymatiques spécifiques au cours de la croissance de *Trichoderma* (GHL) sur milieu Mandel 10g.l⁻¹ cellulose Avicel en fermenteur de quatre litres à 35°C.

Temps (Heures)	Activités enzymatiques spécifiques (U.mg ⁻¹)		
	APF	Endoglucanase	β-glucosidase
8	0.20±0.19	2.13±0.06	0.17±0.13
24	0.57±0.54	3.80±0.08	0.39±0.37
32	0.49±0.16	3.38±0.01	0.30±0.10
48	0.64±0.08	3.36±0.02	0.21±0.08
56	0.58±0.04	3.43±0.05	0.22±0.03
72	0.74±0.92	6.37±0.07	0.24±0.13
80	1.01±0.13	6.68±0.04	0.17±0.05
96	1.10±0.11	6.77±0.04	0.19±0.08
120	1.14±0.06	6.99±0.10	0.41±0.42
128	1.17±1.25	6.84±0.06	0.38±0.65
144	0.88±0.69	5.81±0.19	0.16±0.09
159	0.89±0.13	5.93±0.06	0.19±0.26
168	0.82±0.13	6.32±0.01	0.20±0.05
183	0.78±0.22	6.63±0.04	0.20±0.09
192	0.77±0.51	6.58±0.01	0.18±0.71
207	0.74±0.05	6.54±0.04	0.17±0.01
216	0.69±0.19	6.31±0.04	0.16±0.06
231	0.68±0.23	5.85±0.11	0.15±0.05
240	0.62±0.18	5.54±0.14	0.14±0.15

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts-types.

Les résultats obtenus par notre souche sont comparables aux travaux de Wen *et al.*, (2005), qui ont obtenus en fermenteur, 1.74UI/ml de l'activité papier filtre et 12.22UI/ml en activité endoglucanase, par *Trichoderma reesei* cultivée sur des déchets agricoles. Cependant, l'activité endoglucanase mesurée dans notre investigation (11.22 UI/ml) est supérieure à la valeur de 4.2UI/ml obtenue par Ahamed et Vermette, (2008), dans les mêmes conditions, à l'inverse l'activité papier filtre (5.02UI/ml) est supérieure à celle obtenue dans notre étude (1.88 UI/ml). Aussi, une activité papier filtre (2.8UI/ml) est obtenue par *Trichoderma reesei* Rut C-30 cultivé sur un mélange de lactose (15g.l⁻¹) et de glucose (30g.l⁻¹) (Domingus *et al.*, 2001), valeur supérieure à celle obtenue par notre étude. Notre résultat est comparable à la valeur de 1.9UI/ml d'activité papier filtre trouvée chez *Trichoderma reesei* cultivé dans un milieu à 45g.l⁻¹ de cellulose Avicel PH 101 (Weber et Agblevor, 2005). Par contre, un maximum d'activité papier filtre (5.48UI/ml) est produit par *Trichoderma reesei* après quatre jours de culture sur les résidus de corn cob (40g.l⁻¹) dans un fermenteur de 30m³ (Liming et Xueliang, 2004). On peut dire que, l'activité des enzymes cellulolytiques dépend de l'origine de la souche et de la composition des milieux de culture.

L'activité β -glucosidase mesurée est très faible (0.64UI/ml après 120 heures de fermentation), une valeur inférieure à celle obtenue en culture dans les erlens de 500ml. Notre résultat reste supérieur à ceux obtenus par Jun *et al.*, (2009) 0.39UI/ml et 0.42UI/ml d'activité β -glucosidase après 6 jours de culture quand le lactose (1%) et le son de blé (1%), sont utilisés respectivement, comme substrat pour le mutant NU-6 de *Trichoderma reesei* Rut C-30. Aussi Sohail *et al.*, (2009) ont obtenu, une valeur inférieure à notre résultat, 0.25UI/ml d'activité β -glucosidase après 225 heures de culture par *Aspergillus niger* MS 82 sur milieu Mandel avec 1% de carboxymethyl cellulose.

L'activité β -glucosidase est faible par comparaison aux enzymes du complexe cellulasique, cela a été rapportée comme un critère commun des souches de *Trichoderma* (Sternberg *et al.*, 1977 ; Ruy et Mandels, 1980). D'un autre côté, il est difficile de comparer l'efficacité des enzymes analysées dans notre travail avec d'autres déjà cités. Ceci est dû à la variété des milieux cellulosiques utilisés et des différentes méthodes d'expression des activités cellulasiques.

Bien que, le milieu Mandel soit largement utilisé pour la production de la cellulase, la concentration en sources carbonée et azotée dans ce milieu reste relativement faible pour une synthèse enzymatique importante. Des études ont démontré que pour une production cellulasique importante, il est nécessaire d'avoir une concentration élevée en nutriment (Sternberg et Dorval, 1979 ; Tangnu et Blanch, 1981).

Compte tenu de ce qui précède, notre étude révèle des activités enzymatiques importantes sur le milieu Mandel à 1% cellulose Avicel PH 101, mais ces résultats peuvent être améliorés par l'utilisation d'autres milieux de cultures ou à base de la biomasse cellulosique.

Quant au pH, il diminue à 3.0. Sternberg et Dorval, (1979) reportent que l'abaissement du pH du milieu à une valeur inférieure à 3.0 provoque une inactivation de la cellulase et affecte la croissance fongique. Aussi, pour cette raison, 50% de l'activité papier filtre est perdue quand le pH du milieu diminue de 3.0 à 2.4 (Sternberg, 1976). Comme le pH est un facteur limitant pour la production de la cellulase, il est nécessaire de contrôler le pH (en le maintenant à une valeur supérieure à 3.0 pour ne pas inhiber l'enzyme). Xiong *et al.*, (2004) montrent qu'il existe une corrélation entre le pH initial du milieu et celui de la production de la cellulase par *Trichoderma reesei* Rut C-30. Il est reporté que *Trichoderma reesei* Rut C-30 produit des taux élevés en cellulases quand le pH du milieu contenant du lactose, est ajusté à 4.0-4.5. Cette étude suppose aussi que le pH acide (4.0) du milieu induit la production des cellulases, soit par glycosylation des cellulases ou par un autre moyen (Sprey et Lambert, 1983 ; Xiong *et al.*, 2004).

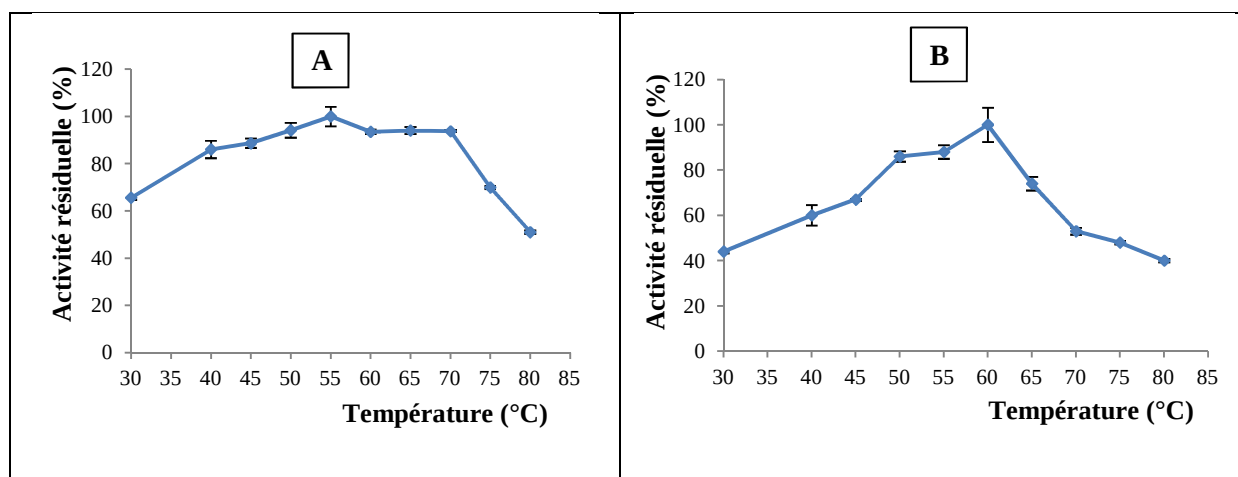


Figure 17: Effet de la variation de température sur les activités enzymatiques : Endoglucanase (A) et Papier filtre (B), de *Trichoderma* (GHL). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

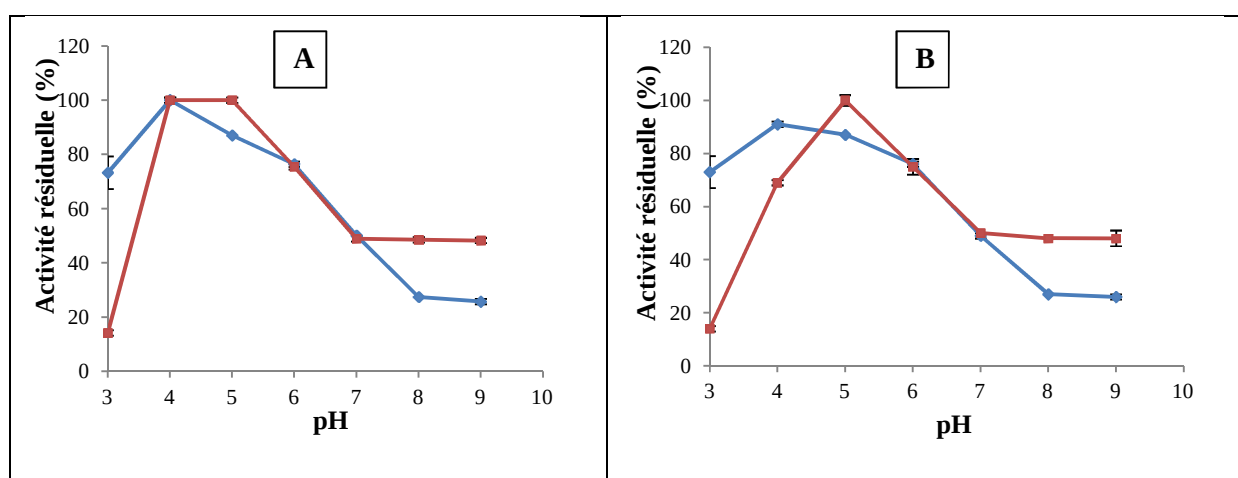


Figure 18: Effet de la variation du pH sur les activités enzymatiques : Endoglucanase (♦) et Papier filtre (■), de *Trichoderma* (GHL). **(A):** Tampon citrate pH 3.0 et 4.0, tampon citrate phosphate pH 5.0, 6.0 et 7.0, tampon phosphate pH 8.0 et 9.0. **(B):** Tampon citrate pH 3.0, tampon citrate phosphate pH 4.0, 5.0 et 6.0, tampon phosphate pH 7.0, 8.0 et 9.0. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

2.8. Caractérisation des enzymes produites par l'isolat *Trichoderma longibrachiatum* (GHL)

Quelques propriétés physico-chimiques de l'extrait enzymatique brut (le surnageant de culture de notre souche) sont déterminées.

2.8.1. Activité en fonction de la température et du pH

L'influence de la température sur les activités enzymatiques est étudiée à différentes températures (30°C-80°C) (figure 17). Les activités enzymatiques papier filtre et endoglucanase atteignent leur valeur maximale à 60°C et 55°C, respectivement.

80 à 100% de l'activité endoglucanase est préservé aux températures situées entre 40 et 70°C. (figure 17 A). A 80°C, 60% de l'activité papier filtre sont perdus, et 51% de l'activité endoglucanase sont préservés. Comme indiqué dans la figure 17 A, une qualité de l'activité endoglucanase produite par notre souche, est le maintien d'une forte activité sur une large gamme de température (de 40°C à 70°C) sur laquelle, elle atteint des valeurs élevées (plus de 80% de l'activité originale est retenu), avec un pic à 55°C et elle garde 51% de son activité à 80°C. Cependant l'activité papier filtre (figure 17 B) montre un pic à 60°C. L'étude statistique par analyse de la variance (ANOVA) des résultats (Annexe 4 - 5), montre que la température exerce un effet significatif sur les activités endoglucanase ($F = 127.66$) et papier filtre ($F=67.42$).

La température optimale des activités cellulases varie en fonction de l'espèce microbienne et de son biotope. En général, les cellulases ont des températures optimales élevées par comparaison à d'autres systèmes enzymatiques (Tong *et al.*, 1980). En effet, la température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70°C, alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C (Ando *et al.*, 2002). Les activités cellulases de *Trichoderma* sp et d'autres moisissures ont une température optimale de 50°C (Mandels *et al.*, 1974 ; Kawamori *et al.*, 1987). L'étude de Busto *et al.*, (1996) a montré une température optimale de 60°C pour l'activité CMCase produite par *Trichoderma reesei*. Jun *et al.*, (2009) rapportent 50°C comme la température optimale des activités FPase et CMCase produites par le mutant NU6 de *Trichoderma reesei* Rut C-30. Ces résultats corroborent les nôtres. Alors que Nawaz *et al.*, (2006) ont mesuré le maximum de l'activité CMCase produite par *Trichoderma harzianum* à 30°C. Cependant, le maximum des activités enzymatiques produites par la moisissure thermophile *Sporotrichum thermophile* est obtenu à 68°C pour les activités papier filtre et CMCase (Margaritis et Creese, 1981). L'endoglucanase de

Myceliophthora thermophila D-14 (ATCC 48104) a une température optimale de 65°C (Roy *et al.*, 1990) et 60°C pour *Aspergillus niger* AS 101 (Singh *et al.*, 1990), par contre une température optimale de 55°C est mesurée pour la CMCase de *Trichoderma viride* (Kim *et al.*, 1994 ; Liu et Xia, 2006), d'*Aspergillus niger* (Hasper *et al.*, 2002) et d'*Alternaria alternata* (Macris, 1984). Comparée aux cellulases bactériennes dont les températures optimales sont plus élevées (60°C) pour les cellulases de *Bacillus stearothermophilus* et *Clostridium josui* (Kume and Fujio, 1991 ; Fujino *et al.*, 1989), notre enzyme a des performances de stabilité thermique proche de celle-ci. Nos résultats, coïncident avec la notion qui indique que les enzymes issues de moisissures thermophiles ont des températures optimales élevées destinées à des applications industrielles (Maheshwari *et al.*, 2000).

L'étude de la variation des activités papier filtre et endoglucanase, en fonction du pH est menée à 60°C et 55°C, respectivement. Le pH optimum des enzymes est déterminé (figure 18 A). L'activité papier filtre est maximale à pH 4.0 (tampon citrate) et aussi à pH 5.0 (tampon citrate-phosphate). L'activité endoglucanase est active sur une large gamme de pH (3.0 à 6.0) et avec une activité maximale à pH 4.0 (tampon citrate).

La nature du tampon a une influence sur les activités enzymatiques (figure 18 B). Le maximum de l'activité endoglucanase est obtenu avec le tampon citrate pH 4.0. 91% du maximum de cette activité est obtenu avec le tampon citrate phosphate pH 4.0. Cependant, environ 69% du maximum de l'activité papier filtre est obtenu avec le tampon citrate phosphate pH 4.0, contre un maximum d'activité obtenu avec le tampon citrate pH 4.0. A pH 7.0, il n'y a pas de différence des activités enzymatiques papier filtre et endoglucanase, quelque soit la nature du tampon. Vis-à-vis du pH, l'activité papier filtre est active sur une large gamme de pH (4.0 à 9.0) et retient plus de 50% de l'activité originale. Alors que l'activité endoglucanase est active sur une large gamme de pH (3.0 à 6.0) en gardant plus de 70% de son activité originale. L'analyse de la variance (ANOVA) des résultats (Annexe 4 - 6) révèle que le pH exerce un effet significatif sur les activités endoglucanase ($F = 330.1878$) et papier filtre ($F = 517.16$).

Le pH optimum des enzymes cellulolytiques est souvent situé entre pH 4.0 et pH 6.0 (Tong *et al.*, 1980). Cependant, les pH optimaux de 4.0 et 5.0 sont très répandus chez les cellulases de divers microorganismes comme *Trichoderma reesei* (Krishna *et al.*, 2000), *Geotrichum candidum* (Witkowska et Piegza, 2006), *Myceliophthora thermophila* D-14 (Roy *et al.*, 1990), *Aspergillus niger* (Singh *et al.*, 1990 ; Hasper *et al.*, 2002), *Thermoascus*

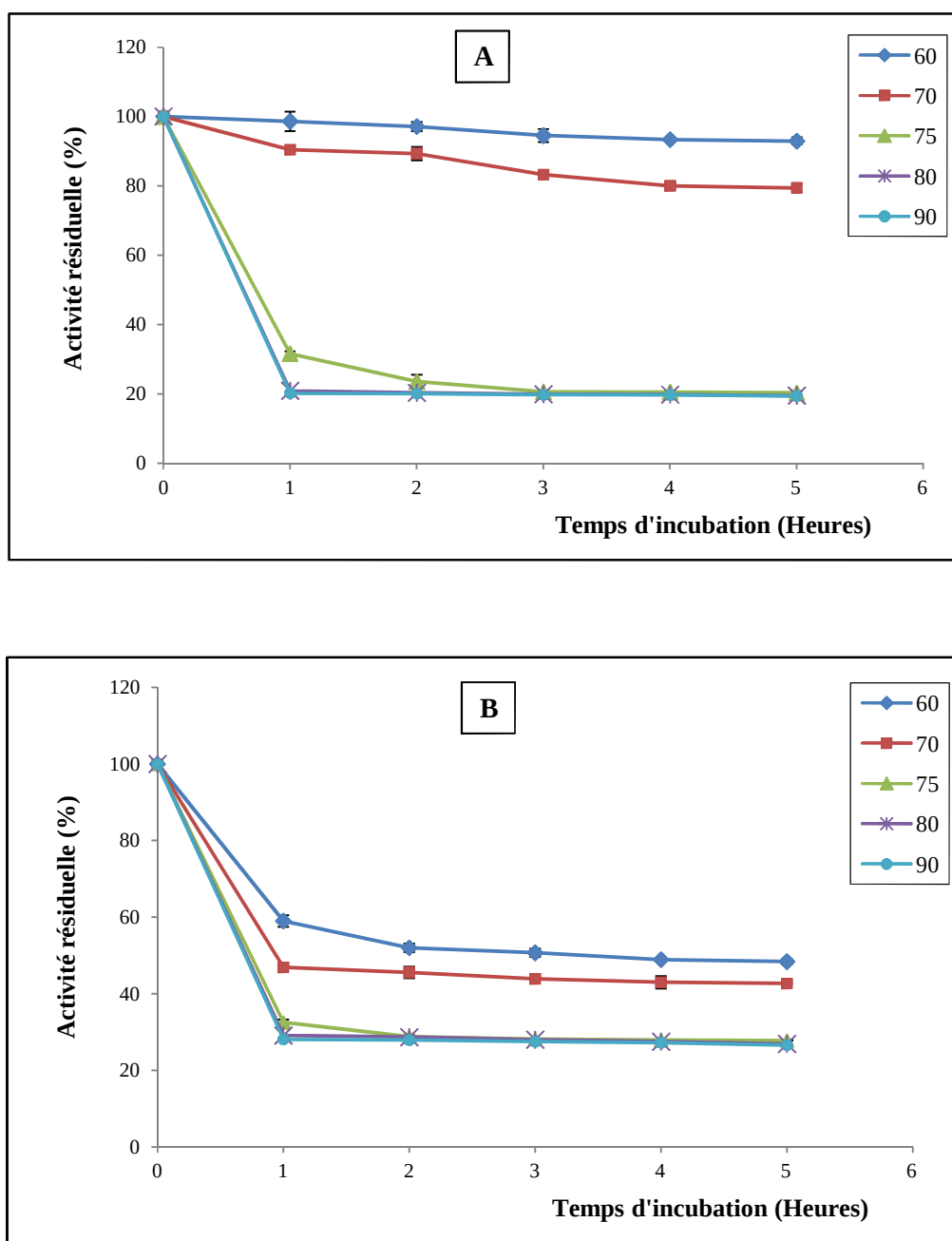


Figure 19 : La stabilité thermique des activités Endoglucanase (A) et Papier filtre (B) produites par *Trichoderma* (GHL) à différentes températures : 60°C (♦), 70°C(■), 75°C(▲), 80°C(+) et 90°C(●). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

aurantiacus (Tong *et al.*, 1980), *Trichoderma harzianum* (Nawaz *et al.*, 2006) et *Trichoderma viride* (Kim *et al.*, 1994 ; Liu et Xia, 2006). Jun *et al.*, (2009) décrivent des activités FPase et CMCase produites par le mutant NU 6 de *Trichoderma reesei* Rut C-30 à pH optimum d'activité de 5.0 et 6.0, respectivement. Lorsque le pH est inférieur à pH 3.0 ou supérieur à pH 9.0, seuls 20% - 30% de l'activité maximale est retenue, respectivement. Dans une autre étude conduite par Busto *et al.*, (1996), l'endoglucanase de *Trichoderma reesei* est active sur un intervalle de pH 4.0 à 6.0 avec un maximum d'activité à pH 5.0. En outre, les optima de pH acide ont été rapportés pour les CMCase et les β -glucosidases excrétées par d'autres espèces fongiques (Garg et Neelakantan, 1982 ; Mc Hale et Coughlan, 1981). Le pH optimum des cellulases bactériennes est légèrement alcalin, un pH optimum de 6.5 est rapporté pour les endoglucanases de *Bacillus sp* (Mawadza *et al.*, 2000), 6.6 pour *Thermotoga neapolitana* (Bok *et al.*, 1998).

2.8.2. Etude de la stabilité à la température

L'étude de la stabilité à la température des enzymes produites par notre souche *Trichoderma longibrachiatum* (GHL) est testée après un traitement thermique d'une durée de 25 heures de l'extrait enzymatique à cinq températures différentes : 60, 70, 75, 80 et 90°C.

L'endoglucanase est stable à 60 et 70°C, et l'activité totale retenue est 93% et 80%, respectivement, après 5 heures d'incubation à ces deux températures (figure 19 A). A 80 et 90°C, l'enzyme ne retient que 20% de son activité totale, après 5 heures d'incubation.

Cependant, l'activité papier filtre est plus affectée par le traitement thermique. 48% de l'activité originale est retenu, après 5 heures d'incubation à 60°C, avec une demi-vie de 3 heures d'incubation à cette température (figure 19 B). Au-delà de 70°C, environ 72% de l'activité papier filtre est perdu après 5 heures d'incubation à 75°C.

Les résultats obtenus révèlent que les enzymes produites par notre souche sont des enzymes thermostables, et dépassent largement les valeurs rapportées par la littérature.

Selon Jun *et al.*, (2009), les enzymes FPase et CMCase produites par le mutant NU6 de *Trichoderma reesei* Rut C-30 sont stables uniquement à 50°C, avec une activité résiduelle de 80% après 30 minutes d'incubation à cette température, mais leur inactivation thermique est rapide au-delà de 60°C. Quiroz-Castaneda *et al.*, (2009), rapportent aussi que la CMCase du

champignon de la pourriture blanche *Pycnoporus sanguineus*, résiste à 60°C pendant 1 heure d'incubation et garde 80% de son activité originale, mais cette activité est perdue après 1 heure d'incubation à 70°C. De même, Margaritis et Creese, (1981) signalent que les activités papier filtre et CMCase produites par *Sporotrichum thermophile*, maintient 88% et 98% de leurs activités originales, respectivement, après 48 heures d'incubation à 50°C.

Comparativement aux cellulases fongiques, les cellulases bactériennes sont plus thermorésistantes. En effet, Ando *et al.*, (2002) décrivent une cellulase hyper thermostable produite par l'archaebactérie *Pyrococcus horikoshii*, qui est stable à 97 °C avec une activité résiduelle de 80% après 3 heures d'incubation. Il en est de même pour la cellulase de *Thermotoga neapolitana* qui garde 73% de son activité à 100°C pendant 4 heures (Bok *et al.*, 1998). Ainsi, Xu *et al.*, (2000) montrent que la cellulase d'origine animale extraite de la moule bleue *Mytilus edulis* résiste à 100°C pendant 10 minutes et conserve 100% de son activité, mais son exposition à 100°C pendant 30 minutes, fait perdre 50% de son activité initiale. Compte tenu de ces valeurs, les enzymes produites par notre isolat *Trichoderma longibrachiatum* (GHL), s'avèrent relativement sensible.

Notons que, les enzymes cellulolytiques thermostables ont un grand potentiel dans les processus industriels tels que l'industrie alimentaire, l'industrie de textile et la bioconversion (Bhat et Bhat, 1997 ; Murray *et al.*, 2004). Les enzymes produites par la souche isolée trouvent ici une application intéressante.

Ces différents résultats s'expliquent probablement par l'influence de la nature de l'habitat qui oblige le microorganisme de s'adapter aux conditions extrêmes et à l'enzyme qui doit acquérir sa stabilité structurale, soit à une glycosylation excessive (Vieille et Zeikus, 2001), soit à la présence de certaines liaisons dans leurs structures tertiaires (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, interactions ioniques et ponts disulfures) (Kumar *et al.*, 2000b ; Sedlak *et al.*, 2001 ; Vieille *et al.*, 2001 ; Mallick *et al.*, 2002 ; Roovers *et al.*, 2004), de ponts salins et les cofacteurs (Vieille *et al.*, 2001). Les éléments déterminés par des séquences particulières en acides aminés situées à des endroits stratégiques, ont participé certainement au maintien de la structure spatiale de l'enzyme malgré les traitements thermiques subis.

Par ailleurs, il a été montré aussi que la richesse en paires de base CG des mRNA des protéines affecte énormément leur thermo stabilité (Farias et Bonato, 2003 ; Paz *et al.*, 2004 ; Hickey et Singer, 2004 ; Trivedi *et al.*, 2006).

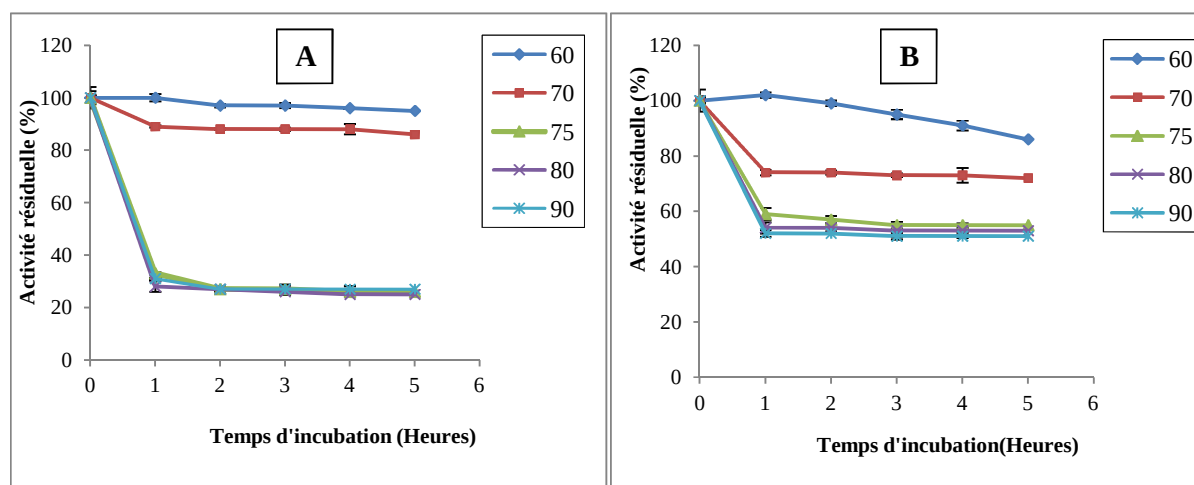


Figure 20 : La stabilité thermique des activités Endoglucanase (A) et Papier filtre (B) produites par *Trichoderma* (GHL) à différentes températures en présence du substrat CMC (1%). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

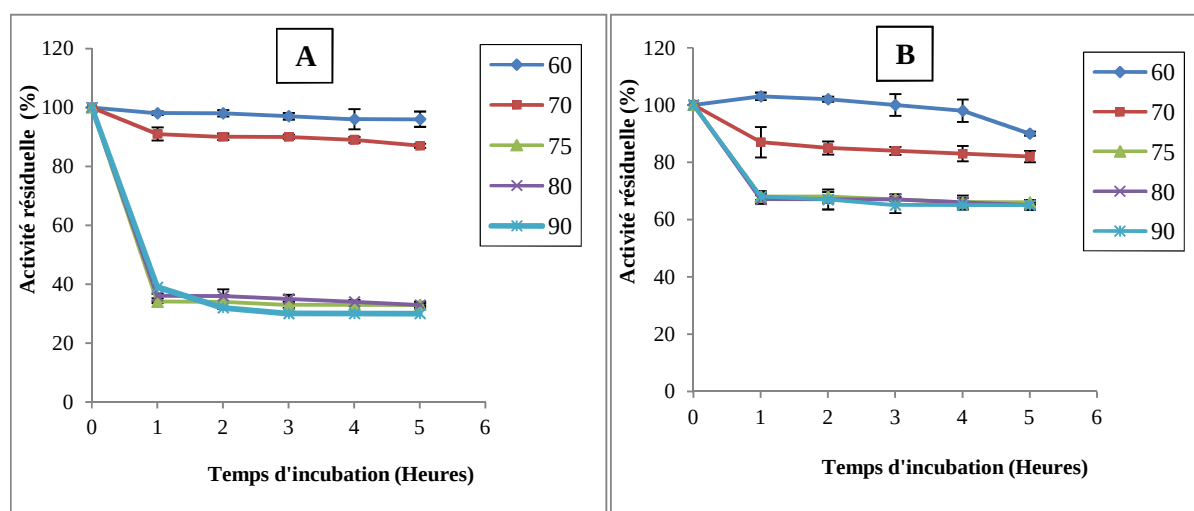


Figure 21 : La stabilité thermique des activités Endoglucanase (A) et Papier filtre (B) produites par *Trichoderma* (GHL) à différentes températures en présence du substrat CMC (2%). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

L'étude de la thermostabilité des enzymes de l'extrait brut produit par notre souche en présence du substrat carboxyméthyl cellulose (CMC) (1 et 2%) à différentes températures est aussi testée.

La thermostabilité de l'endoglucanase n'est pas bien améliorée par le CMC (figures 20 A, 21 A), et elle conserve 95 et 86% de son activité à 60 et 70°C, respectivement, après 5 heures d'incubation d'un extrait contenant 1% de CMC, contre 93 et 80% d'activité résiduelle dans les mêmes conditions avec un extrait sans CMC. L'activité endoglucanase conserve 30% après 5 heures d'incubation à 90°C d'un extrait additionné du CMC à 2%.

La stabilité thermique de l'activité globale papier filtre est nettement augmentée lorsque le CMC est ajouté (figures 20 B, 21 B) : le temps de demi-vie est de 5 heures à 90°C en présence de 1% de CMC, alors, il reste 65% de cette activité après 5 heures d'incubation à 90°C avec le CMC à 2%. Comparée à une pullulanase produite par l'archaebactérie *Thermococcus. Sp*, qui garde 50% de son activité après 29 minutes de traitement à 95°C, d'un extrait contenant 1% de pullulane (Gantelet, 1996), notre traitement s'avère relativement intéressant.

Le phénomène de thermo stabilisation de l'activité papier filtre est également observé en présence de CMC, puisque le temps de demi-vie passe de 3 heures en absence de CMC à 60°C, à 5 heures en présence de 1% CMC à 90°C.

Ces résultats montrent que la cellulase de l'isolat *Trichoderma longibrachiatum* (GHL) du sol environnant la source thermique de Hammam Debagh (dont la température de l'eau est à 97°C), est parmi les cellulases les plus thermoactives et les plus thermostables décrites à ce jour, puisqu'elle garde plus de 80% de ces activités initiales après un traitement de 5 heures à 60°C et à 70°C. Ces propriétés particulières prédisposent l'enzyme à des applications industrielles.

Aussi, notre extrait enzymatique brut conservé à 4°C pendant 5 mois, garde une activité résiduelle de 85% de l'endoglucanase et 78% de l'activité papier filtre. Ces valeurs expliquent une stabilité importante de notre extrait enzymatique conservé pour une longue période (5 mois), à basse température (4°C).

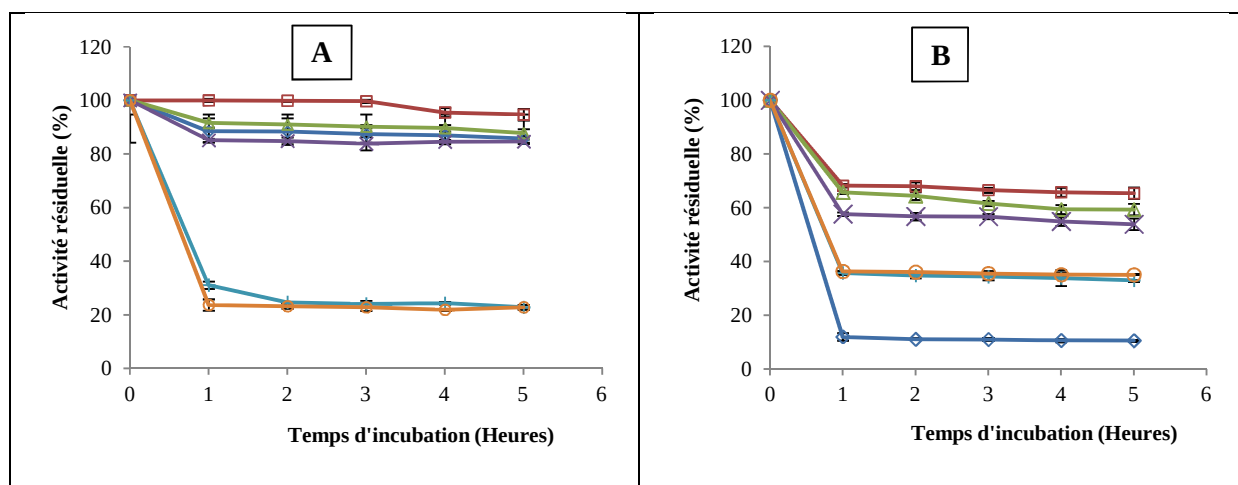


Figure 22: La stabilité au pH des activités Endoglucanase (A) et Papier filtre (B) produites par *Trichoderma* (GHL) à différents pH : 3.0 (◇), 4.0 (□), 5.0 (△), 6.0 (×), 7.0 (+) et 8.0 (○). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

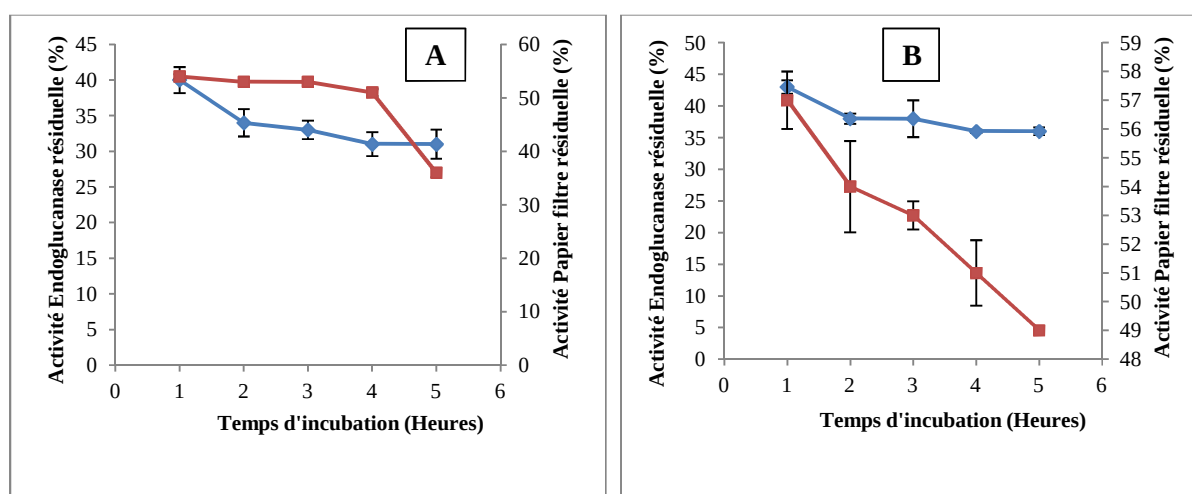


Figure 23: La stabilité à pH 7.0 des activités Endoglucanase (◆) et Papier filtre (■) produites par *Trichoderma* (GHL), en présence du substrat CMC (1%) (A) et CMC (2%) (B). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

2.8.3. Etude de la stabilité au pH

La stabilité au pH de l'extrait enzymatique brut est aussi examinée à différents pH allant de pH 3.0 à pH 9.0 (figure 22). Plus de 80% de l'activité endoglucanase est maintenue sur une gamme de pH 3.0 à pH 6.0, après 5 heures d'incubation à 50°C. L'endoglucanase retient 100% et 95% de son activité après 3 heures et 5 heures d'incubation dans le tampon citrate pH 4.0, respectivement. Aux pH 7.0, 8.0 et 9.0, environ 20% de l'activité originale est gardé après 5 heures d'incubation (figure 22 A). De l'autre côté, l'activité papier filtre n'est pas stable à pH 3.0, mais plus de 50% de l'activité originale sont maintenus avec des pH allant de 4.0 à 6.0, après 5 heures d'incubation à 50°C. Supérieure à pH 6.0, environ 35% de l'activité papier filtre est retenue après 5 heures d'incubation (figure 22 B).

Par comparaison à notre résultat, selon Clanet, (1987), les activités enzymatiques papier filtre et CMCase produites par *Trichoderma reesei* et *Trichoderma reesei* CL 240 se sont révélées parfaitement stables conservant 100% de leur activité sur une gamme de pH de 3.0 à 7.0, même après 48 heures d'incubation à ces pH extrêmes.

La stabilité de notre extrait en présence du substrat CMC (1% et 2%) à pH 7.0, est aussi étudiée (figure 23). D'après les résultats obtenus, l'activité endoglucanase résiduelle augmente, avec 31 et 38% en présence du CMC 1% et 2%, respectivement après 5 heures d'incubation, par comparaison à 23% d'activité endoglucanase résiduelle obtenue après 5 heures d'incubation de l'extrait brut sans CMC. Mais l'activité papier filtre conserve 49% de son activité, en présence du CMC (2%) après 5 heures d'incubation contre 33% d'activité papier filtre résiduelle sans substrat.

2.8.4. Effet de composés chimiques sur l'activité des enzymes

Les résultats obtenus avec les composés chimiques testés, sont consignés dans le tableau 12.

L'incubation de l'extrait enzymatique brut avec l'EDTA (5mM) en tant que agent chélateur, provoque une forte diminution des activités enzymatiques papier filtre et endoglucanase, d'environ 78% et 83%, respectivement. L'agent chélateur d'ions EDTA, provoque une forte diminution de l'activité des enzymes, ce qui semble indiquer la présence d'une métallo enzyme (les cations sont impliqués dans le site catalytique actif de l'enzyme). Un effet

Tableau n° 12 : Effet de composés chimiques sur l'activité des enzymes.

Composés chimiques	Activités enzymatiques résiduelle (%)	
	APF	Endoglucanase
EDTA (5mM)	22±0.47	17±0.48
SDS (5mM)	36±0.63	17±0.08
β-Mercaptoéthanol (5mM)	148±5.08	144±1.86
Ethanol (40%) Culot	13±0.14	19±0.34
Ethanol (40%) Surnageant	23±0.92	18±0.29
Acétone (40%) Culot	13±0.38	20±0.26
Acétone (40%) Surnageant	32±0.48	34±1.13

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts-types.

similaire a été observé avec les endoglucanases de *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104) (24% d'activité résiduelle) (Roy *et al.*, 1990), de *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 (24.5% d'activité relative) (Lee *et al.*, 2008). Cependant, les endoglucanases de *Bacillus spp* CH 43 et HR 68 ne sont pas affectées par la présence de l'EDTA (Mawadza *et al.*, 2000), mais une inhibition à 18% et 50% a été observée pour les endoglucanases d'*Aspergillus niger* (Singh *et al.*, 1990) et d'*Aspergillus flavus* (Ajayi *et al.*, 2007). Par contre, une activation en présence de l'EDTA (5mM), de l'activité CMCCase produite par *Bacillus sub sp.subtilis* A-53 (187% d'activité relative) a été rapportée par Kim *et al.*, (2009).

L'inhibition des activités enzymatiques en présence de l'EDTA est probablement due à la chélation de certains ions métalliques indispensable pour l'activation et /ou la stabilisation de l'enzyme (Roy *et al.*, 1990). L'enzyme est une métalloprotéine, ou requière certains ions métalliques pour son activation.

En présence de SDS, il en est de même, les activités enzymatiques sont fortement inhibées. Selon la littérature, une inhibition complète des endoglucanases, 0% d'activité relative chez *Bacillus* CH 43 et HR 68 en présence de SDS (1%) (Mawadza *et al.*, 2000) et 3.2% d'activité relative chez *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104) (Roy *et al.*, 1990).

En présence du β -mercaptoethanol (5mM), qui est un agent réducteur des liaisons disulfures, on note une activation des enzymes jusqu'à 148% et 144%, respectivement. Résultat similaire à celui trouvé par Roy *et al.*, (1990), une stimulation de l'activité endoglucanase de *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104) jusqu'à 174.3% en présence du β -mercaptoethanol (4 mM). Des observations similaires ont été rapportées pour les endoglucanases d'*Acetivibrio cellulolyticus* (Mackenzie et Bilous, 1982), d'*Humicola lanuginosa* (Olutiola, 1982) et de *Bacillus subtilis* (Au et Chan, 1987). Cette augmentation des activités enzymatiques en présence du β -mercaptoethanol, suggère la possibilité que un ou plusieurs groupes thiol sont impliqués dans le site actif de l'enzyme.

Les solvants organiques testés n'ont pas stimulés les activités enzymatiques mesurées. Avec l'éthanol, on note une diminution importante que ce soit dans le culot que dans le surnageant. L'acétone supprime 87% d'activité papier filtre et 80% d'endoglucanase dans le culot, mais il conserve 32% d'activité papier filtre et 34% d'endoglucanase dans le surnageant. Par contre, une stimulation de l'endoglucanase de *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104) est obtenue avec l'éthanol à 22.5% (Roy *et al.*, 1990).

Tableau n° 13: Effet des ions sur l'activité des enzymes.

Ions métalliques	Activités enzymatiques résiduelles (%)	
	APF	Endoglucanase
KCl (150mM)	84±2.38	99±6.10
NaCl (150mM)	83±2.44	99.5±4.06
CaCl ₂ .2H ₂ O (7.5mM)	88.7±1.01	105.6±1.78
ZnSO ₄ .7H ₂ O (0.75mM)	83.1±2.72	103.3±2.78
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.75mM)	81.5±1.70	105.4±0.63
HgCl ₂ (0.75mM)	63±2.78	99.4±2.49
EDTA (5mM) + CaCl ₂ .2H ₂ O (7.5mM)	42±1.36	41±1.46
EDTA (5mM) + ZnSO ₄ .7H ₂ O (0.75mM)	38±0.59	47±1.42
EDTA (5mM) + CaCl ₂ .2H ₂ O (30mM)	46.43±0.10	39.62±1.58
EDTA (5mM) + ZnSO ₄ .7H ₂ O (3.0mM)	43.87±0.26	47.30±0.80

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts-types.

2.8.5. Effet des ions sur l'activité des enzymes

L'étude de l'effet des ions métalliques monovalents et divalents sur les activités enzymatiques est présentée dans le tableau 13.

L'activité endoglucanase n'est pas influencée par l'addition d'ions tels que le potassium (K^+), le sodium (Na^+) et le mercure (Hg^{2+}). Une légère activation est constatée en présence de calcium (Ca^{2+}), d'ammonium (NH_4) $_2^+$ et de zinc (Zn^{2+}). De l'autre côté, l'activité papier filtre est légèrement diminuée avec le calcium (Ca^{2+}), le potassium (K^+), le zinc (Zn^{2+}), le sodium (Na^+) et l'ammonium (NH_4) $_2^+$. Une inhibition à 37% de cette activité est obtenue avec le mercure (Hg^{2+}).

Le calcium (Ca^{2+}) provoque une augmentation des activités : 127% d'endoglucanase et 93% d'activité papier filtre en présence de 30 mM de cet ion à 50°C (figure 24). Il en est de même avec le zinc (Zn^{2+}) : 126% d'endoglucanase et 101% d'activité papier filtre en présence de 3 mM de cet ion à 50°C (figure 25).

L'incubation de l'extrait enzymatique brut avec l'EDTA (5 mM) et les cations divalents calcium (Ca^{2+}) et zinc (Zn^{2+}), provoque une amélioration des activités mesurées : 41% d'endoglucanase et 46.43% d'activité papier filtre en présence du calcium (30 mM), 47.30% d'endoglucanase et 43.87% d'activité papier filtre avec le zinc (3 mM).

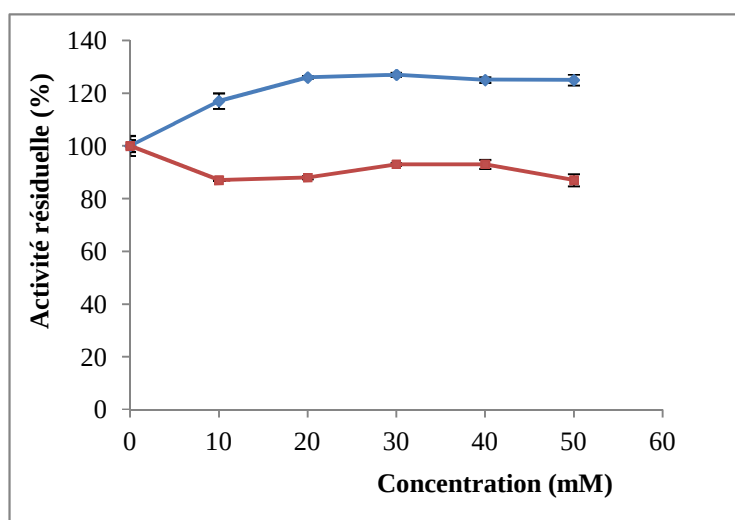


Figure 24: Effet d'ion Calcium (Ca^{2+}) à différentes concentrations sur les activités Endoglucanase (♦) et Papier filtre (■) produites par *Trichoderma* (GHL). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

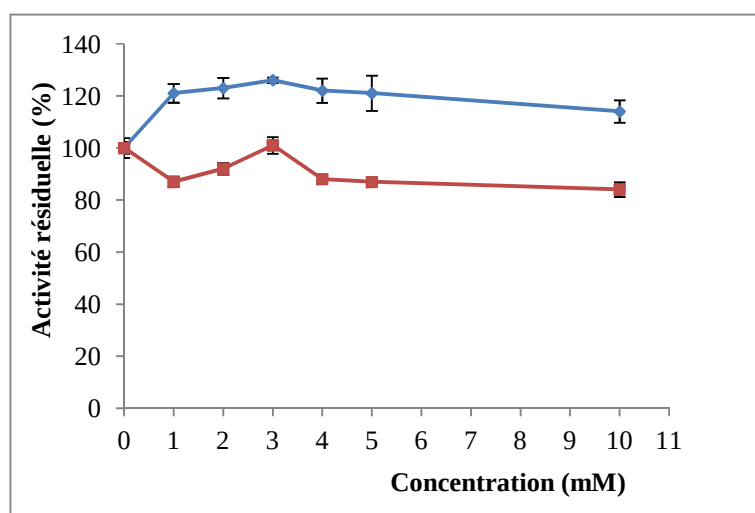


Figure 25: Effet d'ion Zinc (Zn^{2+}) à différentes concentrations sur les activités Endoglucanase (♦) et Papier filtre (■) produites par *Trichoderma* (GHL). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes $\pm$ écarts-types. N=3. L'absence de barres indique que les erreurs sont inférieures aux symboles.

Tableau 14: Spécificité de substrat de l'extrait enzymatique brut.

Substrat	Activités enzymatiques (UI/ml)
CMC	11.12±0.51
Papier filtre	1.56±0.03
Amidon	3.86±0.03
β- glucan	19.67±0.63
Arabinoxylane	10.64±0.39
Xylane	8.35±0.14
Pectine	4.41±0.70
Cellulose Avicel	4.13±0.19
Cellulose microcristalline	3.96±0.04

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts-types.

Comparé à d'autres travaux, l'activité endoglucanase d'*Aspergillus flavus* augmente graduellement avec l'augmentation en concentration des cations (Na^+), (K^+), (Cu^{2+}) et (Mg^{2+}) (Ajayi *et al.*, 2007). Selon Kim *et al.*, (2009), le mercure (Hg^{2+}) provoque une forte inhibition de l'activité CMCase (20% d'activité relative) produite par *Bacillus subtilis sub sp. Subtilis* A-53, mais le potassium (K^+) stimule significativement cette activité (154.2% d'activité relative). Cependant, les activités résiduelles de l'endoglucanase sont mesurées à 87% et 34% chez *Bacillus* HR 68 et CH 43, respectivement en présence du mercure (1 mM) (Mawadza *et al.*, 2000). Les activités relatives de l'endoglucanase produites par *Bacillus amyloliquifaciens* DL-3, après addition de 5 mM de calcium, de mercure et de potassium étaient 109.3%, 23.7% et 77.4%, respectivement (Lee *et al.*, 2008). L'endoglucanase d'*Aspergillus niger* AS-101 est inhibée par les cations monovalents ($(\text{NH}_4)_2^+$ et (Ag^+), les cations divalents (Mg^{2+}) et (Ca^{2+}) ont été jugés de modulateurs positifs, mais le (Pb^{2+}), (Hg^{2+}) et (Zn^{2+}) ont été considérés de puissants inhibiteurs (Singh *et al.*, 1990). Une inactivation significatives de l'endoglucanase de *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104) a été observé avec $(\text{NH}_4)_2^+$, Fe^{2+} et Cu^{2+} , par contre, les cations Hg^{2+} , K^+ , Na^+ et Ca^{2+} augmente cette activité (Roy *et al.*, 1990).

Les sels modifient l'activité de l'enzyme, probablement par interaction avec les sites régulateurs (Singh, 1990). Aussi, l'effet des ions sur l'activité de l'enzyme peut être due à des changements dans la liaison électrostatique, qui allait changer la structure tertiaire de l'enzyme (Roy *et al.*, 1990).

2.8.6. Hydrolyse de différents substrats

La spécificité aux substrats est déterminée par incubation de l'extrait enzymatique brut avec différents substrats (tableau 14).

Notre extrait a une activité significativement élevée (19.67U/ml) avec le β -glucan (polymère glucidique contenant des liaisons β -1,3-1,4), ce qui montre une sensibilité raisonnable des liaisons β -1,3 avec l'enzyme. En outre, l'enzyme possède une activité significative avec le CMC (11.12U/ml), le substrat cellulosique soluble avec des liaisons β -1,4. Une certaine activité est aussi mesurée sur l'arabinoxylan. L'activité de l'hydrolyse du xylan qui est un polymère de xylose β -1,4 (très abondant dans le bois et d'autres plantes, céréales et herbes) (Petzold *et al.*, 2006), est évaluée à 8.35 U/ml. Une faible activité est mesurée sur la pectine et l'amidon. Cet extrait enzymatique est capable d'hydrolyser les substrats cellulosiques insolubles (cristallins) tels que la cellulose Avicel, la cellulose

microcristalline et le papier filtre. Ceci est probablement dû à une certaine affinité de l'extrait enzymatique envers la cellulose cristalline. De ces résultats, il semble plus approprié de se référer à cette enzyme comme un type endo et exo de la cellulase.

Par référence à d'autres résultats, Roy *et al.*, (1990) ont trouvé que l'endoglucanase de *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104) possède la meilleure activité avec le CMC et une activité significativement faible envers le papier filtre, suivi par l' α -cellulose, la cellulose en poudre (microcristalline) et le coton. Cependant, la cellulase de *Bacillus* HR 68 a la meilleure activité avec le β -glucan (21.3 nKat/ μ g protéine), suivi par le CMC, l'hydroxyethyl cellulose, le papier filtre et l'Avicel, mais n'a pas d'activité sur le xylan (Mawadza *et al.*, 2000). Aussi, la cellulase de *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 dégrade l'Avicel, le CMC, le cellobiose, le β -glucan et le xylan, mais sans activité détectable sur le *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG). Le taux de dégradation du CMC est supérieur à celui des autres substrats testés (Lee *et al.*, 2008). Selon Kim *et al.*, (2009), la carboxyméthyl cellulase isolée d'une bactérie marine, *Bacillus subtilis* sub sp. *Subtilis* A 53, a l'activité la plus élevée envers le CMC par rapport aux autres substrats, mais cette enzyme n'hydrolyse pas les substrats cellulosiques insolubles tels que l'Avicel et la cellulose en poudre. L'endoglucanase de *Thermoascus aurantiacus* est active sur le CMC, le β -glucan, le cellobiose, le salicin et le méthyle- β -D-glucoside (Parry *et al.*, 2002), il en est de même pour l'endoglucanase de la levure *Cryptococcus* sp. S-2, qu'elle a une activité importante avec le CMC, mais ne dégrade pas les substrats insolubles, qui est probablement dû à l'absence de Cellulose Binding Domain (CBD) (Thongekkaew *et al.*, 2008).

Notre résultat indique une activité sur les substrats solubles et insolubles, ceci corrobore avec la cellulase sécrétée par *Humicola grisea*, qui possède une cellobiohydrolase, appelée EXO 1, dépourvue de CBD, et a une faible spécificité de substrat avec l'Avicel, qu'une deuxième cellobiohydrolase possédant le CBD (Takashima *et al.*, 1998).

Tenant en considération, les différents comportements de cet extrait dans l'hydrolyse des liaisons β -1,4- des polysaccharides de différentes structures chimiques, il est possible de dire que ces enzymes possèdent différents sites catalytiques pour dégrader les liaisons glycosidiques de ses substrats (Liu et Xia, 2006).

Au vu de ces résultats, notre enzyme possède un grand potentiel pour être utilisée dans la saccharification enzymatique des celluloses insolubles et solubles, surtout le CMC, comme substrat, à faible pH et à des températures modérées et élevées.

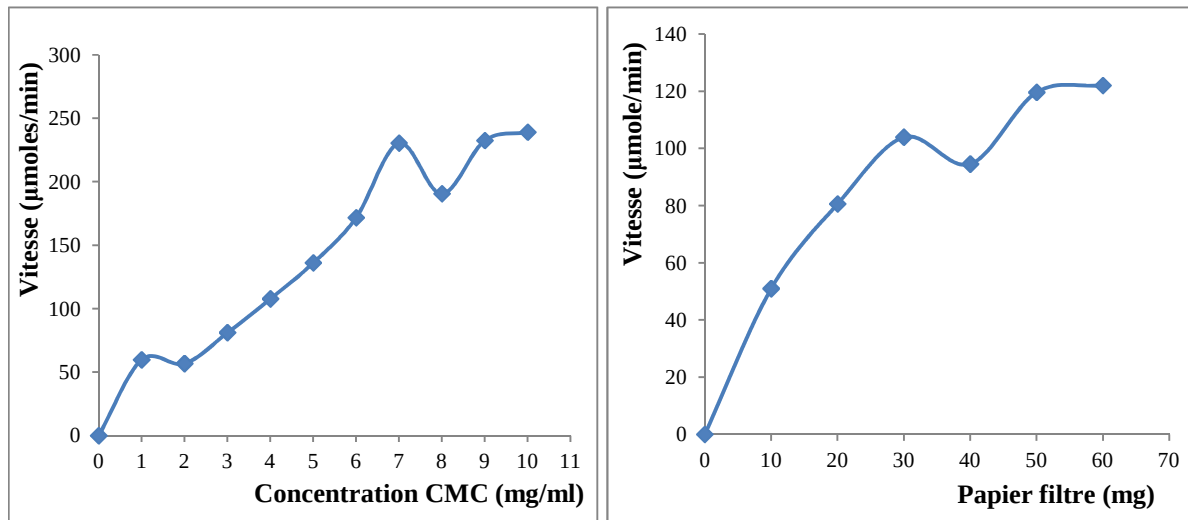


Figure 26: Effet de la concentration en substrats (CMC et papier filtre) sur l'activité de l'extrait enzymatique brut produit par l'isolat *Trichoderma* (GHL).

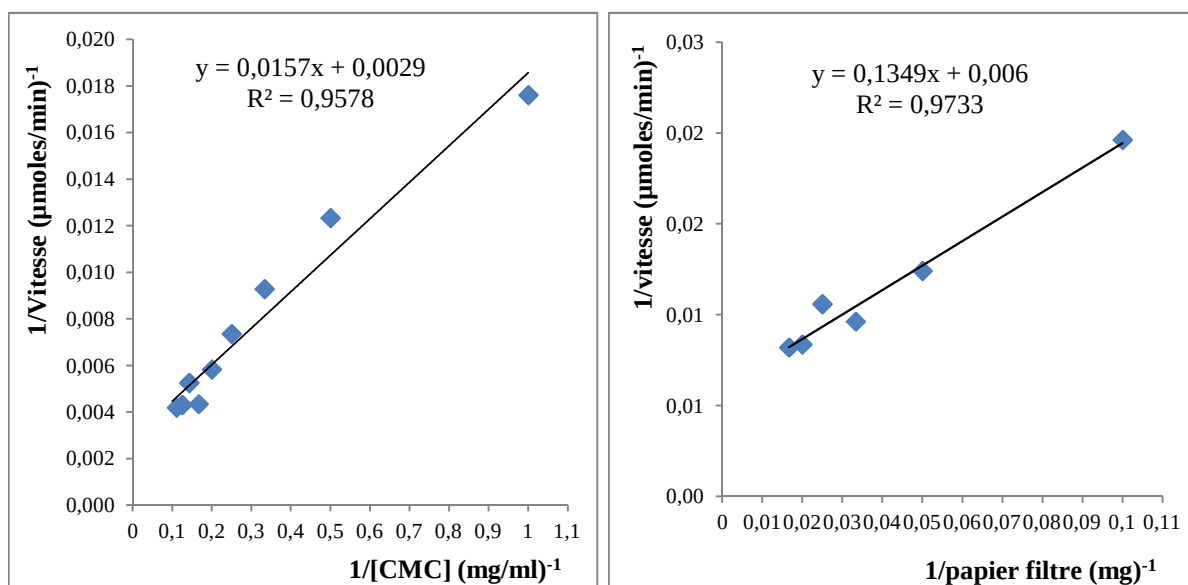


Figure 27: Paramètres cinétiques avec les deux substrats testés (CMC et papier filtre) de l'extrait enzymatique brut produit par l'isolat *Trichoderma* (GHL), selon la représentation de Lineweaver et Burk.

2.8.7. Activité en fonction de la concentration en substrat

L'extrait enzymatique brut a suivi des cinétiques selon le schéma réactionnel de Michaelis-Menten avec les substrats testés. En effet, la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat (figure 26), ne ressemble pas parfaitement à la représentation théorique de Michaelis-Menten (une branche d'hyperbole). Néanmoins, il n'est pas surprenant, quand la diversité d'endoglucanase trouvée dans les préparations enzymatiques de *Trichoderma reesei*, est prise en considération (Enari, 1983).

Avec différentes concentrations en CMC, l'allure graphique obtenue, peut être expliquée par la présence de plusieurs endoglucanases (probablement trois) :

- Une première atteint la saturation à 0.1% (1mg/ml) CMC
- Une deuxième atteint la saturation à 0.7% (7mg/ml) CMC
- Une troisième atteint la saturation à 0.9% (9mg/ml) CMC.

Sur le papier filtre (de 10 à 60mg), on mesure l'activité papier filtre qui exprime l'activité cellulase globale, qui est en fait la somme des activités endoglucanases et exoglucanases.

Vue la représentation graphique en fonction de différentes quantités en papier filtre, on peut dire qu'il y a probablement deux exoglucanases dans notre extrait. Une atteint la saturation à 30mg papier filtre, et l'autre à 50mg papier filtre.

Les paramètres cinétiques (V_{max} : vitesse maximale et K_m : constante de Michaelis) sont déterminés en utilisant le mode de représentation en coordonnées inverses de Lineweaver et Burk, (1934) (figure 27).

Notre résultat indique une faible valeur de K_m pour le CMC, qui démontre une grande affinité de l'enzyme avec ce substrat (Palmer, 1981). Le K_m pour le CMC est déterminé pour être de **5.41 mg/ml**. Pour le papier filtre, le K_m est de **22.48 mg/ml**.

Les valeurs de V_{max} sont calculées pour être de **344.83 $\mu\text{mole.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$** pour le CMC, et de **166.66 $\mu\text{mole.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$** pour le papier filtre.

Différentes valeurs ont été rapportées par la littérature, en effet, Liu et Xia, (2006) ont trouvés une valeur de $K_m=0.88$ mg/ml et une valeur de $V_{max}=3.5$ μmole de glucose/min/ml

pour l'hydrolyse du CMC par un extrait enzymatique de *Trichoderma viride*. Les valeurs de V_{max} et de K_m d'une carboxyméthyl cellulase produite par *Trichoderma harzianum* sont 1.25 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{ml}$ et 0.5 mM, respectivement (Nawaz *et al.*, 2006). Notre valeur de K_m est supérieure à celle mesurée par les endoglucanases, avec le CMC comme substrat, de *Myceliophthora thermophila* ($K_m=3\text{mg}/\text{ml}$) (Roy *et al.*, 1990), de *Thermoascus aurantiacus* (1.9mg/ml) (Tong *et al.*, 1980), de *Bacillus* spp.HR 68 (1.7mg/ml) et de *Bacillus* spp. CH 43 (1.5mg/ml) (Mawadza *et al.*, 2000), mais proche d'une endoglucanase de *Bacillus subtilis* (4mg/ml) (Au et Chan, 1987).

Le K_m est normalement déterminé pour des réactions enzymatiques agissant sur des substrats simples et solubles avec lesquels le produit formé est connu (Tong *et al.*, 1980). En outre, la dégradation du CMC pourrait être affecté par la présence de groupes substituants, qui peuvent ralentir la réaction après la phase initiale, et affecte également la détection du produit d'hydrolyse (Lindner *et al.*, 1983).

Dans le cas de cellulose tel que le papier filtre, non seulement l'insolubilité du substrat, mais aussi les produits de la réaction enzymatique sont hétérogènes. De plus, le taux d'hydrolyse de différentes parties du substrat peut varier.

Il y a peu d'informations sur les valeurs de K_m de l'hydrolyse du cellulose par des cellulases, mais l'effet de la concentration en substrat sur le taux de la réaction est compliqué par l'adsorption de l'enzyme sur son substrat (soit cellulose soluble ou insoluble), de telle sorte que soit rendue inactive lorsque le rapport de l'enzyme sur le substrat est relativement faible (Tong *et al.*, 1980). Il a été montré que le K_m pour le CMC augmente avec son degré de substitution. C'est probablement, ce qui explique les valeurs élevées du K_m calculée pour les endoglucanases hydrolysant le CMC avec un degré de substitution élevé (Tong *et al.*, 1980).

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de ce travail concernant l'étude de cellulases de souches fongiques provenant de sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Nous avons effectué : étude et sélection de champignons filamenteux isolés, production et caractérisation cellulase recherchée.

L'objectif principal du travail est d'isoler d'un écosystème extrême (sol proche de stations thermales), des moisissures productrices de cellulases thermostables. Cette enzyme présente un intérêt biotechnologique extrêmement important, et ce pour deux raisons :

Premièrement, la décomposition de la cellulose en sucres simples, constitue une solution pour des problèmes graves tels que : l'alimentation, l'énergie et la pollution de l'environnement. Deuxièmement, il n'existe pas sur le marché de cellulases suffisamment thermoactives et thermostables pour supporter les conditions de la saccharification enzymatique des celluloses.

A partir des sols environnant les stations (Hammam Debagh – Guelma, Hammam Grouz Atmania et Hammam Safsaf Téléghma – Mila, Est algérien), nous avons isolé 88 souches fongiques. Les examens macroscopiques et microscopiques approfondis des moisissures isolées ont mis en évidence 6 genres différents : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Emericella*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Trichoderma*.

Un criblage préliminaire de l'activité cellulolytique, par le test au papier filtre sur les souches isolées, permet de choisir six souches (J₁, J₂, Q₂, H₄, M₁, E₇) appartenant aux genres : *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria*. La culture de ces dernières sur un milieu de sélection (milieu minéral BSM contenant le polysaccharide cellulose « Walsyth ») dans des plaques à trous, montre que seule la souche J₂ possède une activité cellulolytique importante. L'étude des caractères culturels et la morphologie microscopique ont permis son classement à l'espèce *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. Cette souche est retenue pour la suite du travail.

Après une étude comparative des niveaux des activités enzymatiques chez la souche retenue et la souche de référence *Trichoderma reesei* Rut C-30, à 30°C et à 35°C, nous avons constaté que la production de l'enzyme est favorisée à 30°C pour le mutant *T. reesei* Rut C-30, alors qu'à 35°C, on ne trouve pas de différences significatives des activités papier filtre et endoglucanase, mais l'activité β -glucosidase produite par notre isolat est deux fois plus que celle produite par *T. reesei* Rut C-30.

L'influence de différentes concentrations en spores sur la synthèse de l'enzyme par la souche isolée *Trichoderma longibrachiatum*, est étudiée. Les valeurs maximales des activités

endoglucanase, papier filtre et la β -glucosidase : 10,78UI/ml, 2,25UI/ml et 1.53UI/ml sont obtenues avec le taux 10^6 spores/ml, après 168, 168 et 216 heures, respectivement.

La production des enzymes par notre souche est nettement influencée par les différents âges de spores testés. Le maximum des activités enzymatiques est obtenu avec une suspension de spores âgée de 6 jours, on mesurant l'activité endoglucanase à 11.24UI/ml, l'activité papier filtre à 1.81UI/ml et l'activité β -glucosidase à 0.88UI/ml.

Le sous clonage de la souche afin de chercher les bonnes spores pour la production de l'enzyme, et les plus stables, permet de mettre en évidence cinq souches (A, B, C, D et E). La souche D s'est montrée meilleure aux autres, après des fermentations en erlens et en fermenteur de deux litres, effectuées sur milieu Mandel Avicel 1%.

En cultivant notre isolat *Trichoderma longibrachiatum* en fermenteur de quatre litres, nous avons pu préciser le maximum des activités enzymatiques produites, l'évolution cinétique des protéines et du pH au cours de la fermentation. Le profil cinétique montre, que la moisissure a une très bonne croissance sur le milieu minéral Mandel avec cellulose Avicel 1% comme seule source de carbone et inducteur de l'enzyme, et produit un maximum d'activité papier filtre 1.88UI/ml, d'activité endoglucanase 11.22UI/ml et d'activité β -glucosidase 0.64UI/ml après 128 heures, 144 heures et 120 heures d'incubation, respectivement.

L'étude des propriétés physico-chimiques de la cellulase (extrait brut) montre que les activités enzymatiques papier filtre et endoglucanase ont des températures optimales de 60°C et 55°C, respectivement. L'activité endoglucanase est située entre 80 et 100% dans une gamme de température entre 40 et 70°C. A 80°C, 60% de l'activité papier filtre sont perdus, et 51% de l'activité endoglucanase sont préservés. L'activité papier filtre a un pH optimum de 4.0 (tampon citrate) et 5.0 (tampon citrate-phosphate), elle est active sur une large gamme de pH (4.0 à 9.0) et retient plus de 50% de son activité originale. L'activité endoglucanase est active sur une large gamme de pH (3.0 à 6.0) avec 70% d'activité résiduelle, et un pH optimum de 4.0 (tampon citrate). L'activité endoglucanase supporte 5 heures de chauffage à 60 et 70°C, avec une perte d'activité de 7 et 20%, respectivement. Alors que, 48% de l'activité papier filtre est retenue après 5 heures d'incubation à 60°C. 30% de l'activité endoglucanase est retenue après 5 heures de chauffage à 90°C, en présence de la CMC à 2%. Cependant, l'activité papier filtre est nettement augmentée en présence de la CMC, 65% d'activité résiduelle après 5 heures de chauffage à 90°C, en présence de la CMC à 2%. Ces

performances thermiques permettent de classer la cellulase produite par *Trichoderma longibrachiatum* parmi les enzymes thermostables décrites à ce jour.

Plus de 80% de l'activité endoglucanase est maintenue dans une gamme de pH entre 3.0 et 6.0, après 5 heures d'incubation à 50°C. L'activité papier filtre est située à plus de 50% dans une gamme de pH entre 4.0 et 6.0, après 5 heures d'incubation à 50°C.

L'EDTA, provoque une forte diminution des activités enzymatiques, ce qui semble indiquer la présence d'une métallo enzyme, qui requière certains ions métalliques pour son activation. En présence de SDS, les activités enzymatiques sont fortement inhibées. Une activation des enzymes papier filtre et endoglucanase jusqu'à 148% et 144%, respectivement, en présence du β -mercaptoethanol. Cette augmentation suggère la possibilité qu'un ou plusieurs groupes thiol soient impliqués dans le site actif des enzymes. Les solvants organiques testés (éthanol et acétone) n'ont pas stimulé les activités enzymatiques mesurées. Les cations divalents calcium (Ca^{2+}) et zinc (Zn^{2+}), provoquent une augmentation et une amélioration des activités enzymatiques en présence de l'EDTA. L'extrait enzymatique de notre isolat est capable d'hydrolyser les substrats cellulotiques insolubles (cristallins) tels que la cellulose Avicel, la cellulose microcristalline et le papier filtre, il semble plus approprié de se référer à cette enzyme comme un mélange de type endo et exo de cellulases.

Les paramètres cinétiques de l'enzyme sont déterminés : Le K_m pour le CMC et le papier filtre est mesuré à 5.41mg/ml et 22.48mg/ml, respectivement. Les valeurs de V_{max} sont calculées à 344.83 $\mu\text{mole.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ et 166.66 $\mu\text{mole.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ pour le CMC et le papier filtre.

Couplé avec les rendements enzymatiques, la mesure d'une quantité relativement importante de la β -glucosidase, et les caractéristiques des enzymes étudiées, avec la propriété de la thermostabilité de l'endoglucanase, compte-tenu de ces premiers résultats, nous sommes convaincus que cette souche devrait être un bon candidat pour la production de cellulases. Par conséquent, ces travaux doivent être poursuivis afin de confirmer nos premiers résultats à plus grandes échelles et sur un cocktail enzymatique partiellement purifié, où l'activité cellulotique spécifique serait améliorée.

Deux autres voies de recherche seraient pertinentes pour la compréhension des mécanismes de dégradation des substrats cellulotiques : L'amélioration génétique de la souche isolée *Trichoderma longibrachiatum*, qui pourrait optimiser la production des enzymes, sur le plan de la production des enzymes et aussi la composition du complexe cellulotique.

La séparation et la purification des différentes enzymes du complexe cellulotique, par les techniques de chromatographie ; l'obtention de ces enzymes à l'état pur permettrait une connaissance beaucoup plus fine des forces et des faiblesses de ce spectre, par exemple, l'obtention de la séquence d'acides aminés de certaines de ces enzymes pourrait permettre d'élucider le mécanisme de leur thermostabilité.

ANNEXES

Résumé

L'activité cellulolytique est recherchée chez des champignons filamenteux microscopiques isolés de sols environnant des sources thermales des régions Guelma (Hammam Debagh) et de Mila (Hammam Grouz-Atmania et Hammam Safsaf-Teleghma). 88 souches fongiques sont isolées, appartenant à six genres différents : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Emericella*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Trichoderma*. Leur sélection (test au papier filtre et le test des plaques à trous), montre que seule la souche J₂ possède une activité cellulolytique importante, comparable à celle de la souche *T. reesei* Rut C-30. Cet isolat appartient à l'espèce *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. A 35°C, notre isolat ne montre pas de différences significatives des activités papier filtre et endoglucanase par rapport à *T. reesei* Rut C-30, mais l'activité β -glucosidase produite par notre isolat est deux fois plus importante que celle produite par cette dernière. Le maximum des activités cellulolytiques est obtenu avec un taux d'ensemencement de 10⁶spores/ml. Le meilleur rendement en enzyme est obtenu avec des spores âgées de 6 jours. La souche D choisie du sous-clonage, est cultivée en fermenteur de 4 litres sur le milieu minéral Mandel Avicel 1%, et produit un maximum d'activité papier filtre 1.88UI/ml, d'activité endoglucanase 11.22UI/ml et d'activité β -glucosidase 0.64UI/ml après 128 heures, 144 heures et 120 heures d'incubation, respectivement. Les enzymes papier filtre et endoglucanase sont optimalement actives à 60°C et 55°C, respectivement. Un pH optimum de 4.0 et 5.0 pour l'activité papier filtre, alors que l'activité endoglucanase à un pH optimum de 4.0. L'activité endoglucanase est thermostable, elle résiste à un traitement thermique pendant 5 heures à 70°C, 80% de son activité originale sont maintenus. La demi-vie de l'activité papier filtre est de 3 heures à 60°C. Le substrat CMC améliore la stabilité thermique de ces enzymes. Ces enzymes sont stables à 50°C pendant 5 heures dans une gamme de pH de 3.0 à 6.0 et 4.0 à 6.0, respectivement. L'EDTA (5 mM), provoque une forte diminution des activités cellulolytiques, alors que, le β -mercaptoethanol (5 mM) conduit à leur activation. Les cations divalents calcium (Ca²⁺) et zinc (Zn²⁺), provoquent une augmentation des activités enzymatiques en présence de l'EDTA. L'extrait enzymatique brut est capable d'hydrolyser les substrats cellulolytiques insolubles, cette enzyme peut ainsi être classée comme un type endo et exo de la cellulase. Par ces caractéristiques, production de l'enzyme, thermostabilité et pH acide, notre souche sauvage *Trichoderma longibrachiatum* peut être attractive en industrie pour la production de la cellulase.

Mots clés : Moisissures, isolement, écosystèmes extrêmes, cellulase, β -glucosidase, thermostabilité.

Abstact

Filamentous fungi found in soils surrounding the hydrothermal stations of regions in the east of Algeria: Guelma (Hammam Debagh) and Mila (Hammam Grouz-Atmania, Hammam Safsaf-Teleghma), are screened for the presence of cellulase activity. 88 fungal strains were isolated and identified as belonging to six genera: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Emericella*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Trichoderma*. Their selection (filter paper test and test of perforated plates) shows that only the strain J₂ has a significant cellulolytic activity. This isolate belongs to the species of *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. At 35°C, our isolate shows equivalent activities filter paper and endoglucanase than *T. reesei*. On the other hand the β -glucosidase activity of our isolate was until twice more important than *T. reesei* one. With an inoculum size of 10⁶ spores/ml the strain produces the maximum enzyme activities. A good yield of enzyme is obtained with spores aged of six days. The strain D allowed from subcloning cultivated in 4 liters fermenter on Mandels medium with cellulose Avicel (1%) produces maximum activities of filter paper (1.88UI/ml), endoglucanase (11.22UI/ml) and β -glucosidase (0.66UI/ml) after 128 hours, 144 hours and 120 hours, respectively. The optimum temperatures were 55°C and 60°C for endoglucanase and FPA, respectively. The endoglucanase was optimally active at pH 4.0, and the FPA was optimal at pH 4.0 and 5.0. The endoglucanase was thermostable at 70°C after 5 hours incubation, preserved 80% of the original activity. The half-life of the filter paper activity appeared to be 3 hours at 60°C. These activities were stable at 50°C after 5 hours incubation in a pH range of 3.0 to 6.0 and 4.0 to 6.0, respectively. The EDTA (5mM) causes a significant diminution of the cellulosic activity, while the β -mercaptoethanol (5mM) leading to their activation. Divalent cations calcium (Ca²⁺) and zinc (Zn²⁺) cause an increase and improvement of enzymes activities in the presence of EDTA (5mM). The crude enzyme extract is able to hydrolyse insoluble cellulosic substrates. This enzyme can be classified as an endo and exo type of the cellulase. These results suggested that the no-mutated strain *Trichoderma longibrachiatum* should be an attractive producer for cellulases production.

Keywords: Fungi; isolation; extreme ecosystems; cellulase; β -glucosidase; thermostability.

الملخص

تم البحث عن النشاط الإنزيمي السيليلوزي عند الفطريات الخيطية المجهرية المعزولة من عينات التربة المحيطة بالينابيع الحارة لمنطقتي قالمة (حمام دباغ) و ميله (حمام قروز-العثمانية و حمام صفصاف-التلاغمة) سمحت الدراسة بعزل 88 سلالة فطرية تنتمي إلى الأجناس التالية :

Aspergillus, Alternaria, Emericella, Fusarium, Penicillium Trichoderma .

الاختيار على أساس القدرة على إنتاج إنزيم السيلولاز باستعمال اختبار ورق الترشيح و اختبار لوحات بتقوب، فقط السلالة J₂ أعطت النشاط السيليلوزي الأهم

هذه السلالة تنتمي الى النوع *Trichoderma longibrachiatum* Rifai.

عند 35°م، هذه السلالة لم تظهر أي فروق من حيث إنتاج APF و *endo*glucanas مقارنة مع *Trichoderma reesei* Rut C. لكن النشاط *beta* glucosidase المنتج من طرف هذه السلالة هو ضعف ذلك المنتج من طرف السلالة المرجعية. مع معدل الزرع 10⁶ ml/spores لهذه السلالة ، الفطر يعطي النشاط الإنزيمي الأقصى.

يتم الحصول على مردود جيد من الإنزيم باستعمال أبواغ عمرها يعادل 6 أيام. تنمية السلالة D المختارة في جهاز التخمر و حجم 4 لتر في البيئة المغذية المعدنية لمندل و المضاف لهل سكرالكاربوكسي ميثيل سيليلوز سمح بالحصول على كميات كبيرة من APF (1.88 ml/UI)، *endo*glucanase (11.22 ml/UI) و *beta* glucosidase (0.64 ml/UI) بعد مرور 128 ساعة، 144 ساعة و 120 ساعة من مدة الحضان، بالترتيب.

الإنزيمات APF و *endo*glucanase تنشط على النحو الأمثل عند 60 و 55 درجة مئوية ، على التوالي أما ال pH الأمثل فقدر ب 4.0 و 5.0 بالنسبة لإنزيم APF و قدر ب 4.0 بالنسبة لإنزيم *endo*glucanase. الإنزيم *endo*glucanase يتميز بالثبات الحراري لأن المعالجة الحرارية لهذا الإنزيم لمدة 5 ساعات عند 70°م سمحت بالاحتفاظ ب 80 بالمائة من نشاطه الأصلي. تم قياس 3 ساعات عند 60°م كمدة نصف حياة الإنزيم APF. إن سكرالكاربوكسي ميثيل سيليلوز سمح بتحسين الثبات الحراري لهذه الإنزيمات.

هذه الإنزيمات تميزت بالثبات عند 50°م لمدة 5 ساعات في مجال ال pH من 3.0 إلى 6.0 و 4.0 إلى 6.0، على التوالي. إن مادة (mM5)EDTA يؤدي إلى انخفاض كبير في الإنزيمات في حين مادة (mM5)beta mercaptoethanol يؤدي إلى تفعيلها. الكاتيونات ثنائية التكافؤ الكالسيوم و الزنك تؤدي إلى زيادة و تحسين نشاط الإنزيمات في وجود مادة (mM5)EDTA. الإنزيم الخام المنتج من هذه السلالة قادر على تحليل المواد السيليلوزية غير القابلة للذوبان يمكن تصنيف هذا النوع من الإنزيم كنوع من *endo* و *exo* cellulase.

بهذه الخصائص، إنتاج الإنزيم، الثبات الحراري و ال pH الحامضي، هذه السلالة البرية *Trichoderma longibrachiatum* يمكن أن تكون جذابة بالنسبة للصناعة من أجل إنتاج إنزيم

Cellulase.

كلمات مفتاحية: فطريات خيطية، عزل، مناطق قاسية، إنزيم ال cellulase, *beta* glucosidase ، الثبات الحراري.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahamed A., Vermette P.** (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* Rut C-30 in bioreactor culture conditions. *Biochem Eng.* 40: 399-407.
- Ahmed I., Bissett J., Malloch D.** (1995). Effect of phosphinothricin on nitrogen metabolism of *Trichoderma* species and its implications for their control of phytopathogenic fungi. *Pestic Biochem Physiol.* 53: 49-59.
- Aikat K., Bhattacharyya B. C.** (2000). Optimization of some parameters of solid state fermentation of wheat bran for protease production by a local strain of *Rhizopus oryzae*. *Acta Biotechnol.* 20 (2): 149-159.
- Ajayi A. A., Adejuwon A. O., Awojobi O. K., Olutiola P. O.** (2007). Effect of cations and chemicals on the activity of partially purified cellulase from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits deteriorated by *Aspergillus flavus* Linn. *Pak J Nut* 6(2): 198-200.
- Ander P., Eriksson K. E., Yu H. S.** (1983). Cellobiose oxydase, purification and partial characterization of a homoproteine from *Sporotrichum pulverulentum*. *Europ J Biochem.* 90: 171-181.
- Ando S., Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K.** (2002). Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology.* 68(1): 430-433.
- Au K. S., Chan K. Y.** (1987). Purification and properties of endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol.* 133: 2155-2162.
- Bagnara C.** (1986). Identification et caractérisation d'une nouvelle bactérie cellulolytique mésophile : *Cellulomonas fermentans*. Etudes physiologiques et biochimiques. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université d'Aix-Marseille. France.
- Barker T. W., Worgan J. T.** (1981). The application of air. Lift fermenters to the cultivation of filamentous fungi. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13 p: 77-148.
- Barnett C. C., Berka R. M., Fowler T.** (1991). Cloning and amplification of the gene encoding an extra cellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio Technology.* 9: 562-567.
- Bayer E. A., Kenig R., Lamed R.** (1983). Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J Bacteriol.* 156: 818-827.
- Béguin P.** (1990). Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 219-248.

- Beguin P, Aubert J P.** (1994). The biological degradation cellulose. FEMS (Federation of European Microbiological Societies). Microbiology Reviews.13:25-58.
- Bhat M K.** (2000). Cellulases and related enzymes in Biotechnology. Biotechnol Adv. 18: 355-383.
- Bhat M K., Bhat S.** (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances. 15(3-4): 583-620.
- Bissett J.** (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Pachybasium. (a) Can. J. Bot. 69: 2373-2417.
- Bissett J.** (2004). Commentaires de l'adresse internet suivante : http://www.Medicalglossary.org/fungi_mitosporic_fungi_definitions.html.
- Boiron P.** (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P: 13-69.
- Bok J D., Yrnool D A., Eveleigh D E.** (1998). Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulases Cel A and Cel B from *Thermotoga neapolitana*. Applied and Environmental Microbiology: 64 (12): 4774-4781.
- Bond K., Stutzenberger F.** (1989). A note on the localization of cellulosome formation in *Thermomonospora curvata*. J Appl Bacteriol. 67: 605-609.
- Boretti G., Garofano L., Montecucchi P., Spalla C.** (1973). Cellulase production with *Penicillium iriense* (N. sp). Arch Fur Mikrobiologie. 92 (3): 189-200.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P H., Larpent J P., Reymond P., Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P.** (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P: 34-428.
- Busto M D., Ortega N., Perez-Mateos M.** (1996). Location, Kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. Bioresource Technology. 57: 187-192.
- Cailliez C.** (1991). Isolement et caractérisation de bactéries cellulolytiques mésophiles : études physiologiques et approche moléculaire. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université de Nancy I. France.
- Carlile M J., Watkinson S C.** (1997). The fungi, p: 269-275. Academic Press, New York, N.Y.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimen B., Penn P.** (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Edition Bioforma. Paris. P. 11, 53, 55, 57, 59, 81, 85, 93, 102, 103, 109.
- Chen C M., Gritzali M., Stafford D W.** (1987). Nucleotide sequence and deduced primary

structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Bio Technology*.5: 274-278.

Chesson A. (1987). Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. *In*: Hresign W, Cole DJA, editors. *Recent Advances in Animal Nutrition*. London, Butterworths, p. 71-89.

Clanet M. (1980). Etude des enzymes polysaccharolytiques produites par un champignon thermophile nouvellement isolé. Thèse de Doctorat de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Collier L., Balows A., and Sussman M. (1998). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9, (4). Arnold, London, Sydney, Auckland, New York.

Conner D E., Beuchat L R. (1987). Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. *International Journal of Food Microbiology*. 4: 303-312.

Dan S., Marton I., Dekel M., Bravdo B A., He S., Withers S G., Shoseyov O. (2000). Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Biol. Chem.* 275(7): 4973-4980.

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

De Hoog G S., Guarro J., Gene J., Figueras M J. (2000). *Atlas of Clinical Fungi*, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Domingues F C., Queiroz J A., Cabral J M S., Fonseca L P. (2001). Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. *Biotechnol Lett.* 23: 771-775.

Domingues FC., Queiroz J A., Cabral J M S., Fonseca L P. (2000). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microbial Technol.* 26(5-6): 394-401.

Durand H., Soucaille Ph., Tiraby G. (1984). A comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi, two mesophilic: *Trichoderma reesei* and *Penicillium sp* and two thermophilic *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme Microb Technol.* 6: 174-180.

Enari T M. (1983). *In*: N. M. Fogarty (Ed.), *Microbial Cellulases. I. Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publisher. London. PP: 183-223.

Eriksson K E L., Blanchette R A., Ander P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, Springer-Verlag, New York, N.Y.

- Eveleigh D., Mandels M.** (1998). In memoriam Dr. Elwin Thomas Reese. In Carbohydrases from *Trichoderma reesei* and Other Microorganisms. Structure, Biochemistry, Genetics and Applications (Claeyssens, M., Nerinckx, W. and Piens, K., eds), pp. ppxi–xiii, The Royal Society of Chemistry.
- Fang X.** (2008). Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. J. Biotechnol. 136: 140-147.
- Farias S T., Bonato M C.** (2003). Preferred amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. J Mol Biol. 309: 835-843.
- Fujino T., Sukhumavasi J., Sasaki T., Ohmiya K., Shimizu S.** (1989). Purification and properties of an endo -1,4- β - glucanase from *Clostridium josui*. J. Bact. 171: 4076 – 4079.
- Fujita Y., Takashashi S., Ueda M., Tanaka A., Okada H., Morikawa Y., Kawaguchi T., Arai M., Fukuda H., Kondo A.** (2002). Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. Appl Environ Microbiol. 68 (10): 5136-5141.
- Gandini A., Pasquini D.** (2012). The impact of cellulose fibre surface modification on some physicochemical properties of the ensuing papers. Industrial Crops and Products. 35: 15-21.
- Gantelet H.** (1996). Mise en évidence, purification et caractérisation des propriétés d'une pullulanase thermostable issue d'une Archaébactérie thermophile extrême de l'ordre des Thermococcales isolée des écosystèmes hydrothermaux océaniques abyssaux. Thèse de Doctorat. Université de Reims-Champagne Ardenne. France.
- Gao J., Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F., Xi Y.** (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solide state cultivation of corn stover. Bioressour Technol. 99: 7623-7629.
- Garg S K., Neelakantan.** (1982). Studies on the properties of cellulase enzyme from *Aspergillus terreus* GN1. Biotechnol Bioeng. 24: 737-742.
- Ghose T K.** (1987). Measurement of cellulase activities. Pure Appl Chem. 59: 257-268.
- Gogary S E., Leite A., Crivellaro O., Dorry H E., Eveleigh D E.** (1990). *Trichodema reesei* cellulase from mutants to induction. In: *Trichodema reesei* Cellulases: Biochemistry, Genetics, Physiology and Application. Kubicek C P., Eveleigh D E., Esterbauer H., Steiner W., Kubicek-Pranz E M. Edition The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 201 -211.
- Guiraud J.** (1998). Microbiologie alimentaire. Edition Dunod, Paris. P: 8-101.

- Gunnar H., Anu N., Hongbin H., Bert P., Ståhlberg J., Johansson Pettersson G.** (1999). Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase .Eur J Biochem. 259: 88-95.
- Gusakov A V., Sinitsyn A P., Markov A V., Skomarovsky A A., Sinitsyna O A., Berlin A G., Ankudimova N V.** (2000). Indigo-binding domain in cellulase molecule. Biocatalysis fundamantals and applications. 11 (6): 77-80.
- Gusakov AV.** (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. Trends in Biotechnology. 29 (9): 419-425.
- Hakil M V., Viniegra-Gonzalez A.** (1999). Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tarrarii*: Effects of additional nitrogen sources. Proc Biochem. 35: 103-109.
- Harjunpaa V., Teleman A., Koivula A., Ruohonen L., Teeri T T., Teleman O., Drakenderg T.** (1996). Cello-oligosaccharides hydrolysis by cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei* – Association and rate constants derived from an analysis of progress curves. Eur J Biochem. 240: 584-591.
- Hasper A A., Dekkers E., Mil M V., Van de Vondervoort P J I., De Graaff L H.** (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. Appl.Environ.Microbiol.68 (4): 1556-1560.
- Hee D B., Tim A., Yanke J., Cheng K J., Muir A D.**(1993). Effect of Condensed Tannins on Endoglucanase Activity and Filter Paper Digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. Applied and Environmental Microbiology. 59 (7): 2132-2138.
- Herbert R A.** (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. Tib tech. 10: 395-402.
- Hickey A., Singer G A C.** (2004). Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. Genome Biol. 5: 117.
- Jeenes D J., Mackenzie D A., Roberts I N., Archer D B.** (1991). Heterologous protein production by filamentous fungi. Biotechnol Genet Eng. 9: 327-367.
- Johnson E A., Sakajon M., Halliwell G., Demain A L.** (1982). Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. Appl Environ Microbiol. 43 (5): 1125-1132.
- Josefsson P.** (2006). Biochemical modification of wood components. KTH, the royal institute of Technology, Department of Fiber and Polymer technology, Stockholm.

- Jun H., Bing Y., Keying Z., Xuemei D., Daiwen C.** (2009). Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for increased cellulase production. *Indian J Microbiol.* 49: 00-00.
- Kader A J., Omar O., Feng L S.** (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the barrio Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of Biodiversity and Environmental Conservation.
- Kawamori M., Takayama K., Takasawa S.** (1987). Production of cellulase by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* A-T₃. *Agric Chem.* 51: 647-654.
- Kim B K., Lee B H., Lee Y J., Jin I H., Chung C H., Lee J W.** (2009). Purification and characterization of carboxymethyl cellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology.* 44: 411-416.
- Kim D W., Jeong Y K., Jang Y H., Lee J K.** (1994). Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 77(4): 363-369.
- Kim K C., Seung S Y., Young A O H., Seong J K.** (2003). Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanases. *J Microbiol Biotechnol.* 13 (1): 1-8.
- Kitamoto N., Go M., Shibayama T., Kito Y., Ohmiya K., Tsukagoshi N.** (1996). Molecular cloning, purification and characterization of two endo-1,4- β -glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN 616. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46: 538-544.
- Kleman-Leyer K M., Gilkes N R., Miller R C., Kirk T K.** (1994). Changes in the molecular size distribution of insoluble cellulose by the action of recombinant *Cellulomonas fimi* cellulases. *Biochem J.* 302: 463-469.
- Korish M.** (2003). Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg- University, Mainz, Germany.
- Krishna S H., Rao K C., Babu J S., Reddy D S.** (2000). Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Biop. Eng.* 22: 467-470.
- Kubicek C P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C., Szakacs G.** (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma* sp.: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biology.* 38 (3): 310-319.

- Kubicek C P., Penttilä M E.** (1998). Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (2 ed), p: 49-72. Taylor & Francis Ltd. London. United Kingdom.
- Kumar S., Tsai C J., Nussinov R.** (2000b). Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.* 13: 179-191.
- Kume S., Fujio Y.** (1991). Production of two types of thermophilic cellulases in a mixture of thermophilic bacilli. *J. Gen. Microbiol.* 37: 25 - 34.
- Kwak M Y., Rhee J S.** (1992). Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. *Biotechnol Bioeng.* 39: 903-906.
- Kwang S W., Kim S W., Kim K.** (1994). Production of cellulase and xylanases by *Aspergillus niger* KKS. *J Microbiol Biotechnol.* 4: 49-55.
- Lamed R., Setter E., Kenig R., Bayer E A.** (1983b). The cellulosome a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnol Bioengin Symp.* 13: 163-181.
- Landreau A.** (2001). Métabolites d'une souche de *Trichoderma koningii* Oudemans isolée du milieu marin : Etude chimique, biologique et risques pour les coquillages en culture. Thèse de Doctorat: Pharmacie: Nantes. P: 201.
- Larone D H.** (1995). Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Lee Y J., Kim B K., Lee B H., Jo K I., Lee N K., Chung C H., Lee Y C., Lee J W.** (2008). Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology.* 99: 378-386.
- Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A.** (2006). Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.
- Lemos M A., Teixeira J A., Domingues M R M., Mota M., Gama F M.** (2003). The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolases I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology.* 32: 35-40.
- Leuchtmann A., Petrini O., Samuels G.** (1996). Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia.* 88 (3): 384-394.

- Leveau J Y., Bouix M. (1993).** Les moisissures. p : 112-163. In : Florent J. (ed), Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc-Lavoisier Apria.
- Levy I., Shani Z., Shoseyov O. (2002).** Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1, 4- β -glucanase and cellulose binding domains. *Biomolecular Engineering*. 19: 17-30.
- Li L H., Flora R M., King K W. (1965).** Individual roles of cellulase components derived from *Trichoderma viride*. *Arch Biochem Biophys*. 111(2): 439–447.
- Liming X., Xueliang S. (2004).** High yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresour Technol*. 91: 259-262.
- Lindner W A., Dennison C., Quicke G V. (1983).** Pitfalls in the assay of carboxymethyl cellulase activity. *Biotechnol Bioengng*. 25: 377-385.
- Lineweaver H., Burk D. (1934).** The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc*. 56: 658-666.
- Liu J., Xia W. (2006).** Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from commercial cellulase. *Biochemical Engineering Journal*. 30: 82-87.
- Lokington R A., Kelly J M. (1997).** Direct conversion of cellulose to ethanol by engineered filamentous fungi. *Environmental Biotechnology*. 7 (6): 363-368.
- Lowry O H., Rosebrough N J., Fan A L. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-271.
- Lynd L R., Weimer P J., van Zyl W H., Pretorius I S. (2002).** Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbial and Molecular biology Reviews*. 66(3): 506–577.
- Mackenzie C R., Bilous D. (1982).** Location and kinetic properties of the cellulase system of *Acetivibrio cellulolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 28: 1158-1164.
- Macris B J. (1984).** Production and Characterization of Cellulase and β -Glucosidase from a mutant of *Alternaria alternata*. *Appl Environ Microbiol*. 47(3): 560–565.
- Maheshwari R., Bharadwaj G., Bhat M K. (2000).** Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiol. Mol. Biol*. 3 (3): 461-488.

- Majsov K.** (2010). Experimental investigations of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*: Effect of inoculum size and age of spores. Applied Technologies Innovations. 2 (2): 40-46.
- Mallick P., Broutz D R., Eisenberg D., Yeates T O.** (2002). Genomic evidence that the intracellular proteins of archaeal microbes contain disulfide bonds. Proc Natl Acad Sci. USA. 99: 9679-9684.
- Malloch D.** (1997). Moulds isolation, cultivation and identification. University of Toronto [Http// www. Botany.utoronto.ca/researchlabs/malloch/moulds/html](http://www.Botany.utoronto.ca/researchlabs/malloch/moulds/html).
- Mandels M., Hontz L., Nystrom J.** (1974). Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol Bioeng. 26: 1471-1493.
- Mandels M., Weber J.** (1969). The production of cellulases. Adv Chem Ser. 95: 394-414.
- Margaritis A., Creese E.** (1981). Thermal stability characteristics of cellulase enzymes produced by *Sporotrichum thermophile*. Biotechnology Letters. 3(9): 471-476.
- Mawadza C., Hatti-Kaul R., Zvauya R., Mattiasson B.** (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnology. 83: 177-187.
- Mc Hale A., Coughlan M P.** (1980). Synergistic hydrolysis of cellulose by components of the extracellular cellulose system of *Talaromyces emersoni*. FEBS Lett. 117: 319-322.
- Mc Hale A., Coughlan M P.** (1981). The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*. Purification and characterization of the extracellular and intracellular β -glucosidases. Biochim Biophys Acta. 662: 152-159.
- Miller G L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyt Chem. 31: 426-428.
- Mohamed-benkada Mustapha.** (2006). Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Thèse: Pharmacie: Nantes. P: 9, 10, 11, 12, 13.
- Moloney A P., Mackett T J., Considine P J., Coughlan M P.** (1983). Isolation of mutants of *Talaromyces emersonii* CBS 814-70 with enhanced cellulase activity. Enzyme Microb Technol. 5: 260-264.

- Moracci M., Trincon A., Cobucci-ponzano P G., Ciaramella M., Rossi M.** (2001). Enzymatic synthesis of oligosaccharides by two glycosyl hydrolases of *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 5: 145-152.
- Mosier N S., Hall P., Ladisch C M., Ladisch M R.** (1999). Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 65: 23-40.
- Moussa T A A., Tharwat N A.** (2007). Optimization of cellulase and β -glucosidase induction by sugarbeet pathogen *Sclerotium rolfii*. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (8). P: 1048-1054.
- Munoz I G., Ubhaayasekera W., Henriksson H., Szabo I., Pettersson G., Johansson G., Mowbray S L., Stahlberg J.** (2001). Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: Crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH 58) at 1.32Å resolution and homology models of the isozymes. *J. Mol. Biol.* 314: 1097-1111.
- Murray P., ARO N., Collins C., Grassick A., Penttila M., Saloheimo M., Tuohy M.** (2004). Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expression and Purification*. 38(2): 248-257.
- Nam Sun Wang.** (2003). Enzyme purification by salt precipitation (Ammonia Sulfate). Department of chemical engineering. University of Maryland .Park Of University.
- Nawaz S., Aslam Malana M., N Ikram., Hafeez S., Ishfaq Ghori M., Jamil A.** (2006). Kinetic study of carboxymethyl cellulase from *Trichoderma harzianum*. *Pak J Life Soc Sci.* 4 (1-2): 15-19.
- Neiss S., Montenecourt B C.** (1984). Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. *Appl Microbiol Biotech.* 20: 46-53.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R.** (2000). L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. p : 210-216.
- Nogawa M., Goto M., Okada H., Morikawa Y.** (2001). L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr Genet.* 38: 329-334.
- Norkrans B.** (1957). Studies of β -glucosidase and cellulose splitting enzymes from *Polyporus annosus*. *Fr Physiol Plantarum.* 10: 198-213.
- Odier E., Rouau X.** (1985). Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. In: Mouranche A., Costes C. (ed.), *Hydrolases et dépolymérase. Enzymes d'intérêt industriel.*

Edition Gauthier-Villard, Paris, p: 199-214.

Oikawa T., Tsukagawa Y., Soda K. (1998). Endo- β -glucanase secreted by a psychrotrophic yeast: purification and characterization. *Biotechnol. Biochem.* 62: 1751-1756.

Olutiola P O. (1982). Characterization of cellulase from *Humicola lanuginosa*. *Experientia.* 38: 1332-1333.

Onsori H., Zamani M R., Motallbei M., Zarghami N. (2005). Identification of over producing strain of endo- β -1, 4-glucanase in *Aspergillus* species: characterization of crude carboxymethyl cellulose. *African.Jour. Biotechnol.* 4 (1): 26-30.

Palmer T. (1981). *Understanding enzymes.* Ellis Horwood, England. 372-376.

Papavizas G C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54.

Parry N J., Beever D E., Owen O., Nerinckx W., Claeysens M., Beeumen J V. (2002). Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Arch Biochem Biophys.* 404: 243-253.

Patel G B., Mc Kenzie G R. (1982). Metabolism of *Acetivibrio cellulolyticus* during optimized growth on glucose, cellobiose and cellulose. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 16: 212-218.

Paz A., Mester D., Baca I., Nevo E. (2004). Adaptive role of increased frequency of polypurine tracts in mRNA sequences of thermophilic prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci. USA* 101: 2951-29-56.

Peciulyte D. (2007). Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling materials. *Ekologija.* 53: 11–18.

Peiris S P., Rickard P A D. (1982). Comparison of the xylanolytic and cellulolytic activities of *Cellulomonas*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 14 (3): 169-173.

Penttila M E., Andre E L., Saloheimo M., Lehtovaara P., Knowles J K. (1987). Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 3: 175-785.

Petterson G., Farger S L., Bhikhabhai R., Leandroer K. (1981). In the Ekman-Days. International Symposium on wood and pulping Chemistry, SCPI, Stockholm, 111.p: 39.

Pettersson G., Porath J. (1963). Studies on cellulolytic enzymes: Isolation of a low molecular weight cellulase from *Polyporus versicolor*. *Biochem Biophys Acta.* 67: 1-8.

Petzold K., Schwikar K., Heinze T. (2006). Carboxymethyl xylan-synthesis and detailed structure characterization. *Carbohydr Polym.* 64: 292-298.

- Pimentel D., Patzek T.** (2005). Ethanol production using corn switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*. 14 (1): 65-76.
- Quiroz-Castaneda R., Balcazar-Lopez E., Dantan-Gonzalez E., Martinez A., Folch-Mallol J., Martinez Anaya C.** (2009). Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12(4): 1-8.
- Raimbault M.** (1983). Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. p:1-42. O.R.S.T.O.M.-Paris.
- Reese E T.** (1959). In: Marine boring and fouling organisms. (RAY, D. L., Ed.). Seattle, Washington: University of Washington Press. P: 265-300.
- Riccio P., Rossano R., Vinella M., Domizio P., Zito F., Sansevrino F., D'elis A., Rosi I.** (1999). Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbiol Technology*. 24: 123-129.
- Rifai, M A.** (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia.Papers*. 116: 1-56.
- Riou C., Salmon J M., Vallier M J., Gunata Z., Barre P.** (1998). Purification, characterization, and substrate specificity of a novel high glucose tolerant β -glucosidases from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotrechnol*. 64: 3607-3614.
- Rivière J.** (1975). Les applications industrielles de la microbiologie. p : 31-195. Collection sciences agronomiques. Masson et Cie (éd.).
- Romero M D., Aguado J., Gonzalez L., Ladero M.** (1999). Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 244-250.
- Roovers M., Wouters J., Bujnicki J M., Tricot C., Stalon V., Grosjean H., Droogmans L.** (2004). A primordial RNA modification enzyme: the case of tRNA (m¹A) methyl transferase. *Nucleic Acids Res*. 32: 465-476.
- Roquebert M F.** (1997). Les moisissures, nature biologie et contamination. <http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/roqueber.htm#Bibliographie>.
- Roussos S.** (1987). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : physiologie, sporulation et production de cellulases. Edition de l'ORSTOM. Institut Français de Recherche Scientifique pour le développement en coopération. Collection Etudes et Thèses. Paris.
- Roussos S., Hannibal L.** (1984). Valorisation biotechnologique de la bagasse par la production au niveau pilote d'enzymes de champignons filamenteux cellulolytiques. *Compte Rendu Final d'une Recherche financée par le CORDET 83*. Laboratoire de Biotechnologie et

de Microbiologie Appliquée. Edition de l'ORSTOM. Institut Français de Recherche Scientifique pour le développement en coopération. France.

Roussos S., Rimbault M. (1982). Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. Production de la cellulase de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu liquide. Ann Microbiol (Inst. Pasteur). 133 B: 465-474.

Roy S K., Dey S K., Raha S K., Chakrabarty S L. (1990). Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). Journal of General Microbiology. 136: 1967-1971.

Ryu D D Y., Mandels M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. Enzyme Microb Technol.2: 91-102.

Samson A R., Hoekstra E S., Van Oorschot C A N. (1981). Introduction to Food-Borne Fungi. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science. P: 4 - 42.

Sandgren M., Stahlberg J., Mitchinson C. (2005). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. Prog Biophys Mol Bio. 89: 246-291.

Schamburg D., Salzman M G B F. (1991). Cellulase. In: Enzyme Handbook, Vol IV. Springer-Verlag Berlin, p: 1-11.

Schellhorn H E., Forsberg C W. (1984). Multiplicity of extracellular β -(1,4)-endoglucanases of *Bacteroides succinogenes* S85. Can J Microbiol. 30 (7): 930-937.

Schlechtermeier A., Walter S., Schroder J., Moorman M., Schremp H. (1992). The gene encoding the cellulase (Avicelase) Cel 1 from *Sterptomyces reticuli* and analysis of protein domains. Mol. Microbiol. 6: 611-621.

Scriban R. (1993). Biotechnologie. 4^{ème} édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P: 40.

Scriban R. (1999). Biotechnology. 5^{ème} édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P: 149-156-157.

Sedlak E., Valusova E., Nesper-Brock M., Antalík M., Sprinzl M. (2001). Effect of the central disulfide bond on the unfolding behavior of elongation factor Ts homodimer from *Thermus thermophilus*. Biochemistry. 40: 9579-9586.

Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M., Gelfand D., Kwok S., Myamlo K., Innis M. (1983). Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. Bio Technology. 1: 691-695.

Singh A., Agrawal A K., Abidi A B., Darmwal N S. (1990). General and kinetic properties of endoglucanase from *Aspergillus niger*. FEMS Microbiology Letters. 71: 221-224.

Sinnott M L. (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. Chem. Rev. 90: 1171-1202.

Sites web

Smeets E., Faaïj A., Lewandowski I. (2004). A quickscan of global bioenergy potentials to 2050. Report NWSE2004109, ISBN 9039339090, enzymes in tetergency surfactant science series. 69. P: 175-202.

Sohail M., Siddiqi R., Ahmad A., Ahmad Khan S. (2009). Cellulase production from *Aspergillus niger* MS 82: effect of temperature and pH. New Biotechnol. 00(1): 55-45.

Sprey B., Lambert C. (1983). Titration curves of cellulases from *Trichoderma reesei*: demonstration of a cellulase-xylanase- β -glucosidase-containing complex. FEMS Microbiol Lett. 18: 217-222.

Stephen R., Decker William S., Adney Jennings E., Vzant T B., Himmel M E.(2003). Automated Filter Paper Assay for Determination of Cellulase Activity. Applied Biochemistry and Biotechnology. 107 (13): 689-704.

Sternberg D. (1976). Production of cellulase by *Trichoderma*. Biotechnol Bioeng Symp. 6: 33-35.

Sternberg D P., Vijayakumar., Reese E T. (1977). β -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. Can J Microbiol. 23: 139-147.

Sternberg D., Dorval S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. Biotechnol Bioeng. 21: 181-191.

Stevens B.J.H., Payne J. (1977). Cellulase and Xylanase Production by Yeast of the Genus *Trichosporon*. J. Gen. Microbiol. 100: 381 - 393.

St-Germain G., Summerbell R. (1996). Identifying Filamentous Fungi - A Clinical Laboratory Handbook, 1st ed. Star Publishing Company, Belmont, California.

Streamer M., Eriksson K E., Pettersson B. (1975). Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. Functional characterization of five endo-1,4-beta-glucanases and one exo-1,4-beta-glucanase. Euro J Biochem. 59 (2): 607-613.

- Stryer L., Berg J M., Tymoczko J L.** (2003). Biochimie. 5^{ème} édition. Médecine-Sciences. Flammarion. Paris. P: 303.
- Sutton D A., Fothergill A W., Rinaldi M G.** (1998). Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Takashima S., Iikura H., Nakamura M., Hidaka M., Masaki H., Uozumi T.** (1998). Isolation of the gene and characterization of the enzymatic properties of a major exoglucanases of *Humicola grisea* without a cellulose-binding domain. J Biochem. 124: 717-725.
- Takashima S., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., Uozumi T.** (1999). Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. J Biochem. 125: 728-736.
- Tangnu S K., Blanch H W.** (1981). Enhanced production of cellulase, hemicellulases and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Biotechnol Bioeng. 23: 1837-1849.
- Tarr S.** (2004). Yeasts from Lesotho - Their classification and possible applications. Thèse de doctorat. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of the Free State. South Africa.
- Tchunden J.** (1990). Cellulolyse Anaérobie Mésophile : Etude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35 31 9. Thèse de Doctorat de l'Université Nancy I. France.
- Teeri T T.** (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Tibtech. 15: 160-165.
- Thérien Y.** (2006). Natural ressources, mais pour l'éthanol. Le bulletin des agriculteurs. www.lebulletin.com/abonnement2/0611/0611g.cfm (consulté le 15/02/2008).
- Thongekkaew J., Ikeda H., Masaki K., Lefuji H.** (2008). An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. 60: 140-146.
- Tong C C., Cole A L., Shephred M G.** (1980). Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Biochem Jnl. 191: 83-94.
- Trivedi S., Gehlot H S., Rao S R.** (2006). Protein Thermostability in Archaea and Eubacteria. Genet Mol Res. 5 (4): 816-827.

- Tuncer M., Balli A S., Rob A., Wilson M T.** (1999). Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 38-47.
- Vieille C., Epting K L., Kelly R M., Zeikus J G.** (2001). Bivalent cations and amino acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase. *Eur J Biochem*. 268: 6291-6301.
- Vieille C., Zeikus J G.** (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, Uses, and molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiol Mol Biol*. 65(1): 1- 43.
- Vining L C.** (1990). Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol*. 44: 395- 27.
- Vizcaino J A., Sanz L., Cardoza R E., Monte E., Gutierrez S.** (2005). Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microb Lett*. 244: 139–148.
- Voet D., Voet J G.** (1998). *Biochimie*. Paris, Bruxelles : De Boeck Université. P: 56-69, 1360.
- Wachinger G., Bronnenmeier K., Staudenbauer W L., Schrempf H.** (1989). Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. *Appl Environ Microbiol*. 55: 2653-2657.
- Walseth C S.** (1952). The influence of the fine structure of cellulose on the action of cellulase. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry*. 35: 233-238.
- Warren R A J.** (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol*. 50: 183-212.
- Weber J., Agblevor F A.** (2005). Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Process Biochem*. 40: 669-676.
- Weidling R.** (1934). Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology*. 24: 1153-1156.
- Wen Z., Liao W., Chen S.** (2005). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresour Technol*. 96: 491-499.
- Williams A C., Orpin C G.** (1987). Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. *Can J Microbiol*. 33: 427-434.
- Witkowska D., Piegza M.** (2006). Capability of *Geotrichum candidum* yeasts for cellulases and xylanases biosynthesis. *EJPAU*, 9(4): 41.

Wood T M. (1971). The cellulase of *Fusarium solani* purification and specificity of the β -D-(1-4) glucanase and the β -D-glucosidase components. *Biochem J.* 121: 353-362.

Wood T M., Mc Care S I. (1979). Enzymes involved in the generation of glucose from cellulose. *Develop Food Sci.* 2: 257-263.

Xiong H., Nyssola A., Janis J., Pastinen O., Weymarn N V., Leisola M., Turunen O. (2004). Characterization of xylanases produced by submerged cultivation of *Thermomyces lanuginosus* DSM 10635. *Enzyme and Microbial Technology.* 35: 93-99.

Xu B. (2002). Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*: Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thèse de doctorat. Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Sweden.

Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J C. (2000). Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*. *Euro J Biochem.* 267: 4970-4977.

Zalewska Sobczak J., Urbanek H. (1981). Cellulose and xylan degrading enzymes of *Fusarium avenaceum*. *Arch Microbiol.* 129: 247-250.

Sites web

- ([http:// fr.wikipedia.org/wiki/Hammam_Challala](http://fr.wikipedia.org/wiki/Hammam_Challala)). (2007). Géographie de l'Algérie.
- ([http:// www.algerieinfo.biz/ algérie/wilaya/index.htm](http://www.algerieinfo.biz/algérie/wilaya/index.htm)). (2006). Algérie information.

ANNEXES

Annexe 1

Composition des milieux de culture

1/ Agar blanc :

Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

2/ Czapeck Dox :

Saccharose	30 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
F ₂ SO ₄ 7H ₂ O	0.01 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

3/ Potato Dextrose Agar « PDA »:

Extrait de pomme de terre	1000 ml
Glucose	20 g
Agar	20 g

Préparation de l'extrait de pomme de terre :

200 g de pommes de terre non pelées et vieilles, sont lavés et coupés en petits dés ensuite, mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1 heure. Ils sont enfin écrasés, filtrés. Compléter à un litre d'eau distillée.

Préparation du milieu :

L'agar et le glucose sont dissous à chaud dans l'extrait. Compléter à un litre d'eau distillée et stériliser à 110°C pendant 30 minutes (Botton *et al.*, 1990).

4/ Malt extract agar « MEA » :

Extrait de malt :	20 g
Peptone	1 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Préparation du milieu :

Dissoudre les constituants dans l'eau distillée, compléter le volume à 1000 ml, stériliser le mélange à 121°C pendant 15 minutes.

5/ Milieu Mandel:

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Urée	0.3 g
Peptone	1 g
CaCl ₂	0.3 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.3 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml
Tween 80	2 ml
Extrait de levure	0.25 g
Eau distillée	1000 ml

Solution d'oligo-éléments :

HCl	0.96 ml
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.88 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.17 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.54 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.34 g
Eau distillée	100 ml

Préparation du milieu:

Dissoudre les constituants dans l'eau distillée, compléter le volume à 1000 ml, stériliser le mélange à 120°C pendant 20 minutes.

6/ Milieu minéral BSM :

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0.3 g
CaCl ₂	0.2 g
Solution d'oligo-éléments	1 ml
FeSO ₄	5 mg
Tween 80	1 ml
Agar	20 g

Le pH est ajusté à 5.5, et le milieu est autoclavé 20 minutes à 121°C.

Solution d'oligo-éléments :

MnSO ₄	300 mg
ZnSO ₄	200 mg
CuSO ₄	50 mg
CoSO ₄	50 mg
Thiamine	100 mg
Eau distillée	100 ml

Le polysaccharide cellulose Walseth est ajouté à la concentration de 10 g/l.

Préparation de la cellulose Walseth (méthode décrite par Walseth, 1952) :

A 10 g de cellulose Avicel sont ajoutés lentement 200 ml d'acide o-phosphorique à froid (4°C). Le mélange est ensuite homogénéisé à l'ultra-turax pendant quelques minutes en évitant un échauffement du mélange. La cellulose acide est laissée pendant deux heures à 4°C avec agitation occasionnelle. Le mélange est ensuite lavé avec de l'eau distillée préalablement refroidie, puis décanté. Le surnageant est éliminé. L'opération est renouvelée jusqu'à ce que le pH du surnageant soit supérieur à 2 (en moyenne 7 lavages sont nécessaires). La cellulose est alors suspendue dans 500 ml d'une solution de carbonate de sodium à 3% et laissée une

nuit à 4°C. Des cycles de décantation-resuspension dans de l'eau distillée froide sont pratiqués pour éliminer les sels. Le pH final doit être approximativement de 5.5. Après avoir égoutté la cellulose dans une gaze fine, on obtient un poids humide de 100 g. Cette cellulose est conservée à 4°C. La matière sèche de la cellulose Walseth est de 8% (p/p).

***Bleu au lactophénol :**

Phénol en cristaux	20 g
Acide lactique	20 g
Glycérine	40 g
Eau distillée	20 g
Bleu de méthylène	0.5 g

Les produits doivent être dissous dans l'ordre indiqué, en agitant modérément à l'aide d'une baguette de verre. La dissolution du bleu de méthylène peut prendre un certain temps.

Annexe 2

Méthode de dosage

1/ Réactif DNS :

Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée. Ajouter 30g tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois (Miller, 1959).

2/ Dosage des protéines :

☐ Réactifs

Solution A : Na_2CO_3 2 % dans NaOH 0.1N.

Solution B : Tartrate double de Na et K 2% dans l'eau distillée.

Solution C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1ù dans l'eau distillée.

Solution M : 0.5 ml de la solution C

0.5 ml de la solution B

50 ml de la solution A

Réactif de Folin-ciocalteu dilué au 1/3ème.

□ Protocole

- Ajouter à 1ml d'échantillon, 5 ml de la solution M. Agiter et laisser reposer 10 minutes à température ambiante. Ajouter 0.5 ml de réactif de Folin et agiter extemporanément. Placer les tubes pendant 30 minutes à l'obscurité, pour laisser la réaction colorée se développer, puis lire l'absorbance à 650 nm. La solution de sérum albumine bovine (BSA) dont les concentrations varient de 0 à 0.5mg/ml, est utilisée comme protéine de référence pour réaliser la gamme d'étalonnage (figure 9).

Annexe 3

Analyse chimique des échantillons prélevés de sols

	Sol de Hammam DEBEGH (Guelma)	Sol de Hammam GROUZ (Mila)	Sol de Hammam SAFSAF (Mila)
Matière organique (%)	1.401	1.730	2.081
Carbone (%)	0.82	1.09	1.21
Azote (%)	0.047	0.060	0.065
C/N	17.446	18.166	18.615
Saturation (%)	58	60	64
pH	7.8	7.8	7.8
CO₃H⁻ (%)	0.0043	0.00365	0.00305
SO₄⁻ (%)	0.06	0.050	0.047
Cl⁻ (%)	0.0348	0.00876	0.00816
Ca⁺⁺ (%)	0.0216	0.0154	0.0138
Na⁺ (%)	0.0193	0.0060	0.0053
Mg⁺⁺ (%)	0.0041	0.003	0.003
K⁺ (%)	0.00078	0.0015	0.0015

Annexe 4

Analyse statistique

1/Analyse de la variance : Comparaison de la production de la cellulase par les deux souches : la souche isolée *Trichoderma longibrachiatum* et *Trichoderma reesei* Rut C- 30

Effet des facteurs (1 : souche, 2 : température, 3 : temps) sur l'activité endoglucanase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	1	0.042552	56	0.000157	271.6736	0.000000
2	1	0.011611	56	0.000157	74.1328	0.000000
3	6	0.005300	56	0.000157	33.8410	0.000000
12	1	0.041159	56	0.000157	262.7809	0.000000
13	6	0.002810	56	0.000157	17.9429	0.000000
23	6	0.008033	56	0.000157	51.2838	0.000000
123	6	0.001065	56	0.000157	6.7998	0.000019

Effet des facteurs (1 : souche, 2 : température, 3 : temps) sur l'activité papier filtre

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	1	2.321116	56	0.001065	2180.013	0.000000
2	1	0.327738	56	0.001065	307.814	0.000000
3	6	0.162789	56	0.001065	152.893	0.000000
12	1	1.605525	56	0.001065	1507.923	0.000000
13	6	0.027031	56	0.001065	25.388	0.000000
23	6	0.031010	56	0.001065	29.125	0.000000
123	6	0.017518	56	0.001065	16.453	0.000019

Effet des facteurs (1 : souche, 2 : température, 3 : temps) sur l'activité β -glucosidase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	1	0.004634	56	0.000171	27.167	0.000000
2	1	0.545162	56	0.000171	3196.104	0.000000
3	6	0.215171	56	0.000171	2161.477	0.000000
12	1	0.198667	56	0.000171	1164.719	0.000000
13	6	0.029832	56	0.000171	174.894	0.000000
23	6	0.036806	56	0.000171	215.783	0.000000
123	6	0.037014	56	0.000171	217.002	0.000019

2/Analyse de la variance : Effet du taux d'inoculum sur la production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*

Effet des facteurs (1 : taux d'inoculum, 2 : temps) sur l'activité endoglucanase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	3	0.001574	56	0.000101	15.5753	0.000000
2	6	0.012382	56	0.000101	122.4986	0.000000
3	18	0.001051	56	0.000101	10.3979	0.000000

Effet des facteurs (1 : taux d'inoculum, 2 : temps) sur l'activité papier filtre

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	3	0.061185	56	0.001183	51.7109	0.000000
2	6	0.447059	56	0.001183	377.8369	0.000000
3	18	0.014342	56	0.001183	12.1217	0.000000

Effet des facteurs (1 : taux d'inoculum, 2 : temps) sur l'activité β -glucosidase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	3	0.057936	56	0.001596	36.3027	0.000000
2	6	1.189868	56	0.001596	745.5745	0.000000
3	18	0.017139	56	0.001596	10.7392	0.000000

3/Analyse de la variance : Effet de l'âge des spores sur la production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*

Effet de l'âge des spores sur l'activité endoglucanase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	4	0.014006	10	0.000258	54.27189	0.000001

Effet de l'âge des spores sur l'activité papier filtre

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	4	0.212754	10	0.001372	155.0988	0.000000

Effet de l'âge des spores sur l'activité β -glucosidase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	4	0.228589	10	0.001427	160.1664	0.000000

4/Analyse de la variance : Effet des souches issues du sous-clonage sur la production de la cellulase par *Trichoderma longibrachiatum*

Effet de la souche sur l'activité endoglucanase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	4	0.009496	10	0.000329	28.82102	0.000018

Effet de la souche sur l'activité papier filtre

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	4	0.085656	10	0.000992	86.35831	0.000000

Effet de la souche sur l'activité β -glucosidase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	4	0.188814	10	0.006182	30.54119	0.000014

5/Analyse de la variance : Effet de la température sur les activités cellulases de *Trichoderma longibrachiatum*

Effet de la température sur l'activité endoglucanase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	9	0.017297	20	0.000135	127.6683	0.000000

Effet de la température sur l'activité papier filtre

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	9	0.128272	20	0.001903	67.41959	0.000000

6/Analyse de la variance : Effet du pH sur les activités cellulases de *Trichoderma longibrachiatum*

Effet du pH sur l'activité endoglucanase

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	8	0.037727	18	0.000114	330.1878	0.000000

Effet du pH sur l'activité papier filtre

Effet	Dl effet	MC effet	Dl erreur	MC erreur	F	Niveau P
1	8	0.096489	18	0.000187	517.1674	0.000000

Nom : LEGHLIMI Prénom : Hind	Date de soutenance : 17/11/2013
<u>Thème :</u> <i>Cellulases de souches fongiques issues du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes</i>	
<u>Résumé :</u> L'activité cellulolytique est recherchée chez des champignons filamenteux microscopiques isolés de sols environnant des sources thermales des régions Guelma (Hammam Debagh) et de Mila (Hammam Grouz-Atmania et Hammam Safsaf-Teleghma). 88 souches fongiques sont isolées, appartenant à six genres différents : <i>Aspergillus</i>, <i>Alternaria</i>, <i>Emericella</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Penicillium</i> et <i>Trichoderma</i>. Leur sélection (test au papier filtre et le test des plaques à trous), montre que seule la souche J₂ possède une activité cellulolytique importante, comparable à celle de la souche <i>T. reesei</i> Rut C-30. Cet isolat appartient à l'espèce <i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai. A 35°C, notre isolat ne montre pas de différences significatives des activités papier filtre et endoglucanase par rapport à <i>T. reesei</i> Rut C-30, mais l'activité β-glucosidase produite par notre isolat est deux fois plus importante que celle produite par cette dernière. Le maximum des activités cellulases est obtenu avec un taux d'ensemencement de 10⁶ spores/ml. Le meilleur rendement en enzyme est obtenu avec des spores âgées de 6 jours. La souche D choisie du sous-clonage, est cultivée en fermenteur de 4 litres sur le milieu minéral Mandel Avicel 1%, et produit un maximum d'activité papier filtre 1.88UI/ml, d'activité endoglucanase 11.22UI/ml et d'activité β-glucosidase 0.64UI/ml après 128 heures, 144 heures et 120 heures d'incubation, respectivement. Les enzymes papier filtre et endoglucanase sont optimalement actives à 60°C et 55°C, respectivement. Un pH optimum de 4.0 et 5.0 pour l'activité papier filtre, alors que l'activité endoglucanase à un pH optimum de 4.0. L'activité endoglucanase est thermostable, elle résiste à un traitement thermique pendant 5 heures à 70°C, 80% de son activité originale sont maintenus. La demi-vie de l'activité papier filtre est de 3 heures à 60°C. Le substrat CMC améliore la stabilité thermique de ces enzymes. Ces enzymes sont stables à 50°C pendant 5 heures dans une gamme de pH de 3.0 à 6.0 et 4.0 à 6.0, respectivement. L'EDTA (5 mM), provoque une forte diminution des activités cellulases, alors que, le β-mercaptoethanol (5 mM) conduit à leur activation. Les cations divalents calcium (Ca²⁺) et zinc (Zn²⁺), provoquent une augmentation des activités enzymatiques en présence de l'EDTA. L'extrait enzymatique brut est capable d'hydrolyser les substrats celluloses insolubles, cette enzyme peut ainsi être classée comme un type endo et exo de la cellulase. Par ces caractéristiques, production de l'enzyme, thermostabilité et pH acide, notre souche sauvage <i>Trichoderma longibrachiatum</i> peut être attractive en industrie pour la production de la cellulase.	
<u>Mots-clés</u> Moisissures, isolement, écosystèmes extrêmes, cellulase, β-glucosidase, thermostabilité.	
<u>Laboratoire de recherche</u> Laboratoire de Génie Microbiologie et Applications. Algérie. Laboratoire de Microbiologie Industrielle. France.	
<u>Membres du jury</u> Président : Mr. H. BOUSSEBOUA. Professeur. Université Constantine 1. Algérie. Encadreur Mme. Z. MERAIHI. Professeur. Université Constantine 1. Algérie. Co-encadreur : Mr. F. DUCHIRON. Professeur. URCA. Reims. France. Examineurs : Mr. J. BOUDRANT. Directeur de Recherche CNRS. Nancy. France. Mr. D. HARZALLAH. Professeur. Université Ferhat. A. Sétif. Algérie. Mme. L. GILLMANN. Maitre de Conférence A. Université Angers. France.	