

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI- CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

N° d'ordre :

N° de Série :

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de Magistère

En Biochimie – Microbiologie Appliquées

Thème :

Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebkhha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel

Par : M^{elle} **BENSMIRA Soumia**

Devant le jury :

Président :	M ^r BOULAHROUF A.	Prof. Université Mentouri
Rapporteur :	M ^{me} MERAIHI Z.	Prof. Université Mentouri
Examineurs :	M ^{me} MECHAKRA A.	M.C. Université Mentouri
	M ^r BENHAIZIA Y.	M.C. Université Mentouri

Soutenu le : 12 / 06 / 2006

Remerciements

Suite à l'achèvement de ce modeste travail, je tiens tout particulièrement à remercier l'honorable M^{me} Meraihi Zahia, présidente du conseil scientifique et professeur à l'université Mentouri de Constantine, qui m'a servi de modèle et qui a toujours honoré ses engagements. Par son savoir, sa droiture et son sérieux, elle a su me communiquer une méthodologie et une rigueur de travail. Sa patience et son dévouement pour accomplir ses objectifs m'ont été salutaires et j'espère qu'un jour je serai un professeur à son image.

Je tiens également à rendre hommage à toute notre équipe de recherche, particulièrement à M^r. Boulahrouf Abderrahmane, qui m'a énormément aidé par ses précieux conseils. Ainsi que M^{me} Mechakra et M^r. Benhaizia qui ont bien voulu examiner mon travail.

Je n'oublierai pas de citer tous les professeurs du laboratoire de Biotechnologie, de génétique, biochimie et biotechnologie végétale ainsi que ceux de l'institut de l'INATAA et toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Bensmira Soumia

Dédicaces

Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur, où le travail, la persévérance et la quête du savoir seront ma devise .

Je dédie ce travail à mes chers parents que j'aime tant, sans lesquels je ne serai jamais arrivée là où j'en suis.

A mon unique frère GHILANE et mes charmantes sœurs WAFI et HANENE et toute ma famille dont le soutien et les encouragements m'ont été salutaires.

Ainsi qu'à mes chers amis ; Ryma, Mounia, Kawther, Randa et tous les étudiants de ma promotion, en particulier Talbi Seif eddine qui n'a malheureusement pas pu poursuivre ce qu'il a pourtant si bien commencé...

A tous ceux que j'aime.

.Bensmira Soumia

SOMMAIRE

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Bibliographie

1^{ère} partie : La cellulose et la cellulase

1- La cellulose	3
1-1-Structure	3
1-2-Sensibilité de la cellulase à différents traitements.....	6
2- La cellulase	6
2-1- Nomenclature et quelques caractéristiques de la cellulase.....	6
2-2- Les enzymes cellulolytiques.....	8
2-3- Les différentes origines de la cellulase.....	10
2-4-Mecanisme d'action de la cellulase	14
2-5- Structure de la cellulase	14
2-6- Applications industrielles	15

2^{ème} partie : les moisissures

1- Caractéristiques générales des moisissures	19
1-1- Définition et caractéristiques principales	19
1-2- Habitat et pathogénicité	20
1-3- Besoins nutritifs et activité biologique	21
1-4- Production de métabolites	22
2- Caractères distinctifs en classification	23
2-1- Classification des champignons	23

2-2- Structure de la paroi	26
3-Identification des moisissures	26
4- Les déchets de dattes substrat de fermentation	27

Matériels et méthodes

1- Isolement et sélection des souches fongiques productrices de cellulase	29
1-1- Echantillonnage	29
1-2- Détermination des pH des échantillons	30
2- Isolement des moisissures	30
3.- Purification et étude macroscopique des moisissures isolées	31
4- Conservation des souches fongiques isolées	31
5- Sporulation des moisissures	31
5-1- Préparation des suspensions de spores	31
5-2- Dénombrement des spores	31
6- Sélection des souches cellulolytiques	32
7- Identification des souches sélectionnées	34
7-1- Caractères cultureux	34
7-2- Etude microscopique	34
8- Etude de la composition chimique de déchets de dattes	35
8-1- Détermination de la matière sèche	35
8-2- Dosage des sels minéraux	36
8-3- Dosage de l'azote total	36
8-4- Dosage des sucres	36
8-5- Dosage de la matière grasse	37
8-6- Détermination du pH	37
9- Production de l'enzyme	37
9-1- Microorganismes	37
9-2- Milieu de base, naturel	37
9-3- Milieu synthétique	37
9-4- Milieu de préfermentation	38

9-5- Milieu de production	38
9-6- Suivi de fermentation	38
10- Dosage de l'activité cellulolytique	39
11- Cinétique de production de la cellulase par <i>Trichoderma sp</i>	40
12- Purification partielle de la cellulase par précipitation au sulfate d'ammonium	41
13- Effet de la température, du pH et thermostabilité	42

Résultats et discussions

<i>1^{ère} partie : Isolement et sélection des souches fongiques cellulolytiques</i>	43
--	----

1- Echantillonnage	43
2- Les souches fongiques isolées	44
3- Sélection des souches cellulolytiques	46
4- Identification des souches sélectionnées	50
4-1- Etude macroscopique	50
4-2- Etude microscopique	50

2^{ème} partie : Production de la cellulase

1- Composition chimique des déchets de dattes	58
2- Détermination de la souche cellulolytique la plus performante	60
3- Détermination de la concentration optimale des déchets de dattes	60
4- Etude cinétique	61
4-1- Evolution de la biomasse	61
4-2- Evolution de la production de cellulase	63
4-3- Evolution des glucides	63
4-4- Evolution des protéines	65
4-5- Evolution du pH	65
5- Purification partielle de la cellulase au sulfate d'ammonium	65
6- Etude de la thermostabilité de la cellulase	69

7- Effet de la variation du pH sur l'activité cellulasique	71
8- Effet de la température sur l'activité cellulasique	71
Conclusion générale	74
Résumé	76
Références bibliographiques	79
Annexes	89

Introduction

La microbiologie est qualifiée aujourd'hui de participant majeur dans plusieurs industries : pharmaceutiques, agroalimentaires et chimiques (Demain, 2000). A cet effet, les moisissures disposent de possibilité d'applications biotechnologiques très étendues par leur capacité à conquérir des substrats naturels 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, 1999). Actuellement, les moisissures sont de plus en plus utilisées dans la production de métabolites en particulier les enzymes (Scriban *et al.*, 1999). Cependant, l'industrie exige l'emploi d'enzymes thermostables qui ont la capacité de supporter des températures élevées. Pour répondre à cette exigence, l'isolement des moisissures de régions arides peut constituer une alternative intéressante permettant d'obtenir des souches productrices de ce type d'enzymes. En effet, plusieurs études ont été réalisées dans ce sens afin de sélectionner des souches révélant une potentialité intéressante (Bouchet *et al.*, 1999).

Dans cette optique, nous avons réalisé, dans la première partie de notre travail, l'isolement des souches fongiques à partir du sol et de l'eau des Sebkhass de Biskra, afin de sélectionner les souches les plus performantes dans la production de cellulase thermostable.

En industrie, il ne s'agit pas seulement d'utiliser des souches productrices, mais il est également nécessaire de définir un milieu de production favorable et à faible coût. Dans notre étude, le milieu, utilisé pour la production de cellulase, est à base de déchets de l'industrie phéonicoles (les déchets de dattes) car le patrimoine phéonicoles algérien, évalué en l'an 2002, est de plus de 13,505,880 palmiers dattiers (toutes variétés confondues) avec une production annuelle estimée à 4.2 millions de quintaux (Anonyme, 2005). Ce déchet est choisi comme substrat de fermentation pour sa richesse en sucres facilement fermentescibles. Ce déchet est employé comme milieu de production dans plusieurs travaux pour la production d'autres métabolites : production de catalase extracellulaire par un mutant *d'Aspergillus phéonicoles* (Kacem chaouche, 2005), production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* (Boudjlel et Nancib, 2001), fabrication de la levure boulangère (Acourène, 2001) etc.

Par ailleurs, le faible prix de revient des déchets agroalimentaires industriels, fait d'eux une source d'énergie et de substrat bien adaptés aux fermentations.

Le milieu enrichi par une source azotée permet d'équilibrer le rapport C/N et donc de cultiver les souches fongiques performantes dans la production de cellulase. Nous avons procédé ensuite à une étude cinétique de la souche la plus performante afin de déterminer le temps idéal pour une production maximale. Enfin, l'enzyme subit une précipitation par le sulfate d'ammonium pour une purification partielle qui servira à l'étude des autres paramètres cinétiques (pH, température et thermostabilité) utiles pour la mise en application industrielle de cette enzyme.

1

BIBLIOGRAPHIE 1^{ère} PARTIE

1- LA CELLULOSE

1-1-Structure

La plus grande partie du carbone organique, produit par la photosynthèse, se présente sous forme de polymère de la paroi cellulaire des végétaux, composée de cellulose (30-45%), d'hémicellulose (25-45 %) et de lignine (15-30 %) (Betts *et al.*, 1992).

La cellulose est un polymère linéaire, constitué d'unités anhydro-D-glucopyranoses liés en β (1-4), la molécule de cellulose présente une configuration chaise, permettant aux groupements hydroxyles de se trouver en position équatoriale avec une stabilité du polymère (figure 1) (Mouranche et Costes, 1985).

L'observation au microscope électronique permet de distinguer une association des chaînes de cellulose par des liaisons hydrogènes intra et inter moléculaires, formant des microfibrilles rigides et insolubles (Hasper *et al.*, 2002), constituées de deux types de structures :

- Ø Des structures cristallines de chaînes associées, par des liaisons hydrogènes difficiles à rompre (Baumgartier, 1949, Mouranche et Costes, 1985). Ces dernières sont variables selon l'origine de la cellulose : 20% pour celle de la paille, 35 à 50% pour celle du bois et 95% pour celle de l'algue *Valonia* (Lin *et al.*, 1987 ; Bèguin et Aubert, 1994)
- Ø Des structures amorphes, sans cohésions et plus faciles à hydrolyser (Mouranche et Costes, 1985 ; Vidaud, 1984).

Certains auteurs estiment que la cellulose peut se présenter sous différents états (Bisaria et Chose, 1981) et classent la structure de la cellulose en deux groupes:

- Ø *La cellulose I* : qui représente la forme naturelle ou native (figure2), présente

dans le coton et le bois.

- Ø *La cellulose II* : qui est une forme modifiée obtenue après traitement chimique (à la soude par exemple).

La cellulose étant la seule source de carbone renouvelable sur terre. Elle peut être la solution aux problèmes d'énergie, de chimie et d'alimentation (Romero *et al.*, 1999). Dans le règne végétal, la cellulose est également associée à des substances pectiques, homogalacturonanes, arabinanes etc... , aux glycoprotéines et à la lignine (Vidaud, 1984).



Figure 2. : Cellulose native en coloration négative.

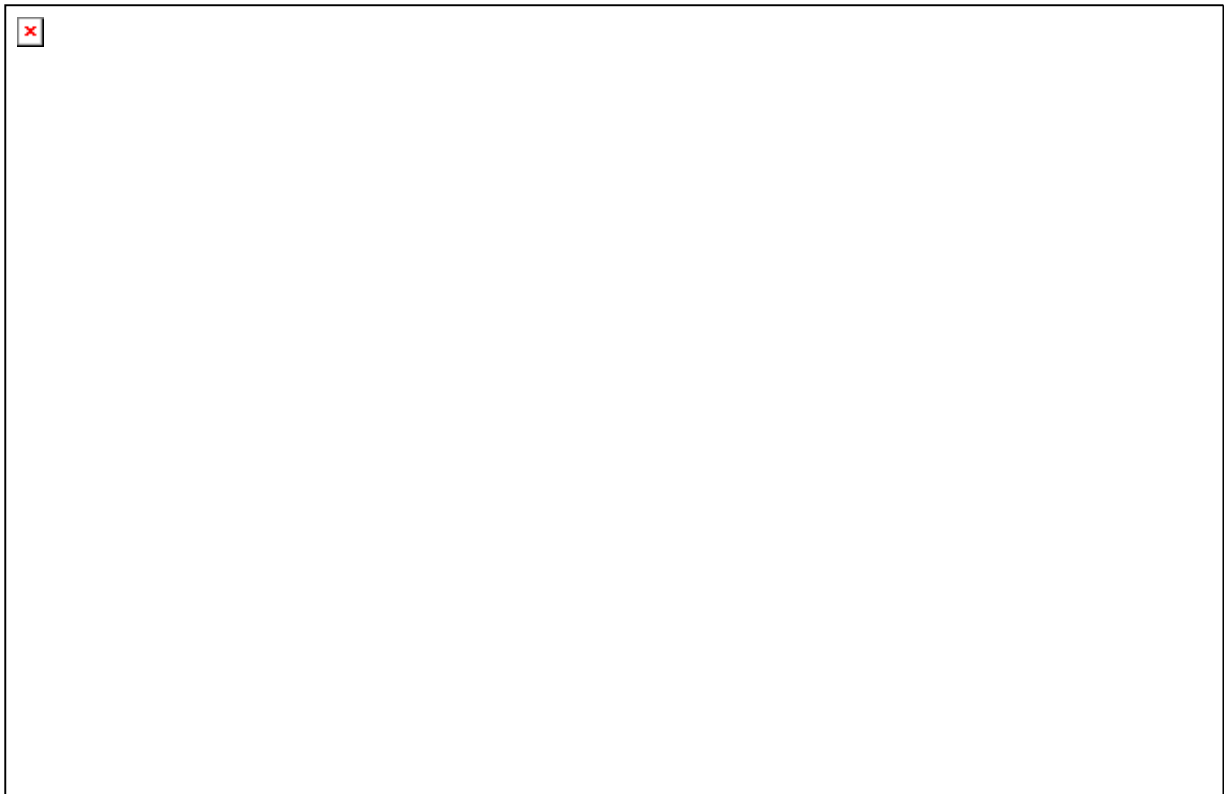
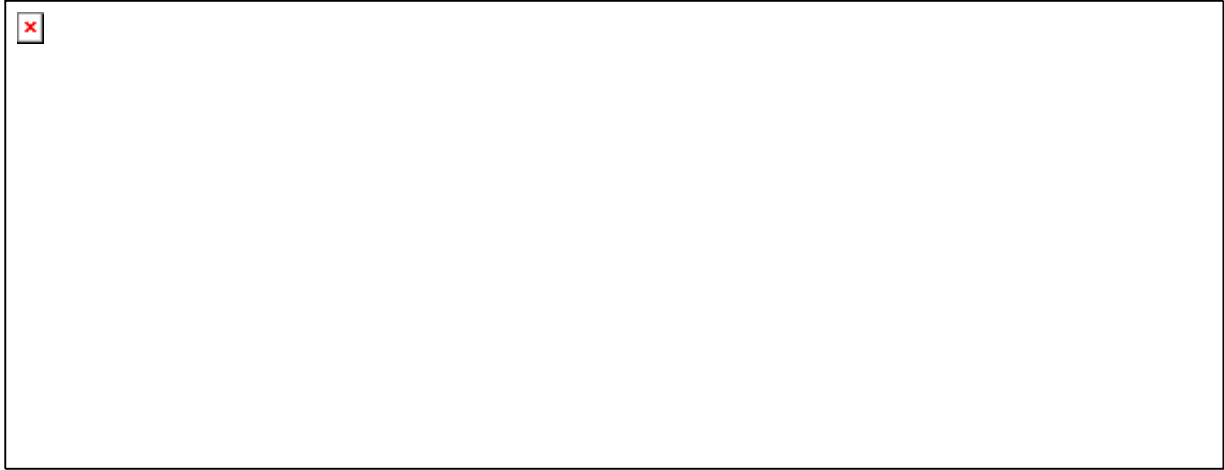


Figure 1 : Structure de la cellulose

1-2- Sensibilité de la cellulase à différents traitements

La sensibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique dépend étroitement de l'état du substrat, notamment de trois caractéristiques qui conditionnent la vitesse et le rendement de l'hydrolyse (Barnoud, 1980; Vidaud, 1984) :

- Ø L'incrustation par les polymères non cellulosiques tels que la lignine à laquelle la cellulose est généralement associée.
- Ø Le degré de polymérisation qui varie selon les sources (10.000 unités glucosidiques pour un poids moléculaire de 1.5 million avec une longueur de 5 µm pour la cellulose de bois (Mouranche et Costes, 1985)
- Ø Le degré de cristallinité, qui est plus ou moins important selon l'origine des tissus végétaux et selon les plantes (20 % pour la paille, 35 à 50 % pour le bois et 80 % pour les fibres du coton).

Des prétraitements physiques comme le broyage à sec ou humide, l'action de la chaleur, l'augmentation de la pression (25 atm) et de la température (225 °C) suivie d'une décompression brutale, modifient l'état de la cellulose et varient sa sensibilité à l'hydrolyse enzymatique (Barnoud, 1980; Vidaud, 1984).

2- LA CELLULASE

2-1- Nomenclature et quelques caractéristiques

*- *Nom codifié de la Cellulase* Ec : 3.2.1.4

*- *Nom systématique* : 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 –glucanohydrolase

*- *Nom recommandé* : cellulase

*-Réaction et spécificité

Elle est représentée par l'endohydrolyse des liaisons 1,4- β -D-glucosidiques de la cellulose et des lignines mais aussi l'hydrolyse des liaisons 1,4 et 1,3 en β -D- glucanes (Schamburg et Salzman, 1991).

*-Substrats naturels

La cellulase peut avoir différents substrats naturels tels que : la cellulose (Lachke et Despande, 1988 ; Robson et Chambliss, 1989), dont la dégradation complète nécessite une action complémentaire des enzymes cellulolytiques (Halliwell et Halliwell, 1989). Il en est de même pour d'autres substrats cellulosiques tels que les Xyloglucanes (Maclachlan *et al.*, 1988) ainsi que le Coton (Okada *et al.*, 1976).

*-Inhibiteurs

L'inhibition de la cellulase s'exerce par différents éléments tels que : Hg^{2+} [qui peut être restauré par la cystéine ou le NaCl (Eriksson et Petersson, 1968)], le glucose (exception faite pour la cellulase de *Bacillus subtilis* (Robson et Chambliss, 1989), le cellobiose (excepté pour la cellulase de *Bacillus subtilis* (Robson et Chambliss, 1989), la glucosylamine (Wood *et al.*, 1978), les gluconolactones (Wood *et al.*, 1978 ; Koehler *et al.*, 1976), le N-bromosuccinimide, l'arsenate, le sodium dodecyl sulfate, le dithiothreitol, les dextrans etc... (Schamburg *et al.*, 1991).

*-Activité enzymatique

L'activité cellulasique est exprimée en unités internationales. Elle correspond à la quantité d'enzymes dégradant la carboxyméthylcellulose en carbohydrates réduits (1 micromole de glucose par minute) (Schulein, 1988). Elle varie de 60U (Schulein, 1988) à 1168 U (Okada, 1976) et plus pour les enzymes immobilisées (Tanigushi *et al.*, 1989).

***- Poids moléculaire**

Les cellulases ont des poids moléculaires très variables qui dépendent principalement de leurs origines. Certaines endoglucanases ont des poids moléculaires de 30 à 90 KDa, alors que d'autres sont de dimensions beaucoup plus faibles de l'ordre de 13 KDa (Odier et Rouau, 1985 ; Dan *et al.*, 2000). Les exoglucanases ont des poids moléculaires de 30 à 50 KDa (Singh *et al.*, 1990) alors que les β -glucosidases ont des masses moléculaires plus élevées variant de 90 à 240 KDa (Sanyal *et al.*, 1988).

***- pH optimum**

La plupart des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH optimum variant de 3 à 7 (Lynd *et al.*, 2002). Celles d'origine fongique ont une gamme plus limitée (pH de 4 à 5) contrairement aux cellulases bactériennes dont le pH optimum est proche de la neutralité (Buchholz *et al.*, 1983).

***- Température optimale**

La température optimale des cellulases fongiques varie entre 40 et 70 °C alors que celle des bactéries varie entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation en industrie du textile (Ando *et al.*, 2002).

2-2- Les enzymes cellulolytiques

Sous le nom de cellulase, sont regroupées plusieurs enzymes dont seule l'action synergique peut aboutir à l'hydrolyse complète de la cellulose cristalline.

L'activité cellulasique se traduit par l'action de trois types d'enzymes :

2-2-1- L'exo β (1-4) glucanase ou Cellobiohydrolase : Ec (3.2.1.91)

Cet enzyme attaque les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose. L'enzyme seul n'est actif ni sur la cellulose cristalline, ni sur la cellulose soluble (carboxyméthyle cellulose). Par contre, il attaque les celluloses partiellement

dégradées. Le rôle essentiel de cet enzyme est de permettre l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline, seuls quelques champignons filamenteux (*Trichoderma resei*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum pulverulentum*) semblent disposer d'une cellobiohydrolase (Scriban., 1999).

2-2-2- Endo β (1-4) glucanase ou Endocellulase : Ec (3.2.1.4)

L'endocellulase est capable de rompre les liaisons internes de la chaîne cellulosique. L'attaque se fait au hasard et entraîne la libération de cellodextrines, de cellobiose et de glucose. L'endocellulase est très active sur les celluloses solubles. L'activité est d'autant plus importante que le degré de polymérisation est élevé. Par contre, son activité est très faible sur la cellulose cristalline. L'attaque, au hasard, a pour effet de créer de nouvelles extrémités non réductrices qui deviennent à leur tour des sites réactifs pour les cellobiohydrolases (Hasper *et al.*, 2002).

La complémentarité des deux types d'enzymes cités ci-dessous explique en partie l'effet synergique du mélange. Par contre, le mécanisme de coopération cellobiohydrolase / endocellulase qui permet l'hydrolyse de la cellulose cristalline, reste encore mal connu (Scriban, 1999).

Tous les microorganismes cellulolytiques possèdent au moins une endocellulase, parfois plusieurs tel que *Trichoderma koningii* qui possède quatre endocellulases à caractéristiques très différentes.(Scriban, 1999).

2-2-3- B(1-4) glucosidase ou Cellobiase : Ec (3.2.1.21)

La cellobiase hydrolyse la liaison β glucosidique du cellobiose et libère deux molécules de glucose. Selon sa spécificité, la cellobiase peut être active sur les β (1-4) oligoglucosides, mais l'activité diminue rapidement quand la longueur de la chaîne augmente.

De nombreux auteurs ont montré que la cellobiase est fortement inhibée par son produit d'hydrolyse le glucose. L'importance du rôle de la cellobiase lors d'une saccharification a été soulignée par plusieurs auteurs. En effet, en hydrolysant le cellobiose, la cellobiase permet d'éviter l'inhibition de la cellobiohydrolase, ainsi la vitesse globale de la cellulolyse est étroitement dépendante de l'activité cellobiasique (Lynd *et al.*, 2002).

Les microorganismes à forte activité cellulase, en particulier *Trichoderma viridae*, sont déficients en cellobiase. Ceci se traduit par une accumulation de cellobiose et par une baisse de la vitesse de saccharification (Scriban, 1999).

A l'intérieur de chaque classe peuvent exister plusieurs enzymes différentes se trouvant sous forme d'isoenzymes (Scriban, 1993).

2- 3- Les différentes origines de la cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature (Xu *et al.*, 2000). Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes, protozoaires, vers , mollusques, insectes etc...(Odier et Rouau, 1985). De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale ou microbienne.

2-3-1- Origine animale

Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif (Smant *et al.*, 1998). Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (Xu *et al.*, 2000).

Des cellulases ont été isolées à partir du suc digestif d'escargot comestible *Helix pomatia* (Rebeyrotte *et al.*, 1976 ; Kubicek., 1981), de la glande digestive d'une moule verte *Perna viridis* (Marchall.,1973), de la moule bleue *Mytilus edulis* (Xu *et al.*, 2000) et du mollusque marin *Littorina brevicula* (Purchon, 1977 ; Kiesov, 1982). De plus, l'amibe *Dictyostelium discoideum* produit une cellulase extra -cellulaire pendant la germination de ses spores (Blume et Ennis., 1991). Des cellulases ont également été identifiées dans les glandes de l'œsophage de kyste des nématodes *Globodera restochiensis* et *Heterdora glycines*, parasites obligatoires des plantes (Smant *et al.*, 1998).

2-3-2- Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (Cordonnier *et al.*, 1986). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces (Riccio

et al., 1999), de l'avocat *Persea americana* (Blume et Ennis, 1991), des céréales tels que l'orge (Dan *et al.*, 2000) et le riz de la variété *Oryza sativa* (Xu *et al.*, 2000).

Les préparations cellulases d'origine végétale sont dépourvues d'exo- β -glucanases (Mandels *et al.*, 1976). Néanmoins, la fabrication d'enzyme végétale est soumise aux contraintes d'approvisionnement de la matière première (caractère saisonnier des récoltes, spéculations dues aux incertitudes économiques et politiques des pays producteurs) (Joyeau, 1982).

2-3-3- Origine microbienne

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielles d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de culture après fermentation (Rapp et Beerman, 1991), bien que ces enzymes, peuvent être présentes sur la surface des cellules (Bond et Stutzenberger, 1989 ; Wachinger *et al.*, 1989).

Un grand nombre de microorganismes (bactéries, moisissures et levures aérobies et anaérobies) sont capables d'attaquer la cellulose en libérant des acides organiques tels que : l'acide formique, l'acide butyrique et l'acide acétique avec dégagement de CO₂ (Brisou., 1971). Néanmoins, ce sont les cellulases bactériennes et fongiques qui ont été les plus étudiées notamment en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie (Odier et Rouau., 1985).

· Les bactéries cellulolytiques

De nombreuses bactéries sont capables de se développer sur un substrat cellulosique dans la nature ou en symbiose avec certains animaux vertébrés (ruminants) ou invertébrés (termites et certains mollusques) (Vidaud, 1984).

Le système cellulase des bactéries est plus simple que celui des champignons ; il se compose uniquement des activités endo-glucanase et β -glucosidase (Bekhouche *et al.*,1991). Parmi les bactéries cellulolytiques, certaines sont aérobies (*Sporocytophaga*, *Myxococcoides*, *Baccillus subtilis*, *Cellulomonas* et *Pseudomonas*, d'autres sont anaérobies strictes (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefasciens* et *Bactéroïdes succinogenes*) (Vidaud, 1984) ou encore des anaérobies facultatives (*Erwinia chrysantharum*) qui possèdent un seul complexe multienzymatique extracellulaire appelé cellulosome (Schwarz, 2001). Cette dernière et le *Clostridium sp* ont été étudiés du fait de leur potentialité à transformer la cellulose en éthanol (Nevalainen et Palva, 1978). Les meilleurs

résultats ont été obtenus en associant deux bactéries : *Cellulomonas flavefasciens* et *Xanthomonas*, *Cellulomonas* et *Arthrobacter*, *Cellulomonas* et *Bacillus subtilis*. (Bekhouche *et al.*, 1991).

De plus, les cellulases ont été identifiées chez des actinomycètes tels que *Thermomonospora fusca* (Tuncer *et al.*, 1999), *Streptomyces reticuli* (Schlochtermeyer *et al.*, 1992), quelques archaebactéries *Pyrococcus orikoshii* (Ando *et al.*, 2002) et *Thermotoga neapolitana* (Bok *et al.*, 1998) qui constituent une source importante de cellulases thermostables.

· *Les champignons cellulolytiques*

Les mycètes sont des agents bien connus pour la décomposition de la matière organique, en général, et des substrats celluloses, en particulier (Carlile *et al.*, 1997).

De nombreux champignons sont cellulolytiques. Ils produisent des endoglucanases, des exoglucanases et des β -glucosidases (Bèguin, 1990). *Trichoderma reesei* est le champignon le plus étudié. Il produit au moins 2 exoglucanases (Shomaker *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). Nous avons recensé quelques espèces récapitulées dans le tableau (1).

Chez les levures, les genres pouvant présenter une activité cellulosique, sont beaucoup plus rares, néanmoins on peut citer le genre *Trichosporon* (Scriban, 1999), *Candida wickerhamii* dont l'activité cellulosique est uniquement de type β -glucosidase (Gunata *et al.*, 1990), ainsi que *Kluyveromyces lactis* avec deux endoglucanases Egl A et Egl B (Hasper *et al.*, 2002).

Tous ces microorganismes sont capables de dégrader la cellulose native (Williams et Orpin, 1987 ; Hebraud, 1988). Chez des champignons aérobies strictes, il a été mis en évidence (*Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* et *Piromonas communis*) un équipement enzymatique très complet leur permettant d'hydrolyser les polysaccharides des parois cellulaires végétales. D'autres espèces anaérobies telles que les *Chytridomycètes* sont connues pour leur capacité à dégrader la cellulose dans les appareils gastro-intestinaux des ruminants (Carlile *et al.*, 1997).

Tableau 1 : Quelques espèces fongiques productrices de cellulase.

ESPECES	REFERENCES
<i>Trichoderma viridae</i>	Nevalainen et Palva., (1978); Kubicek et Penttilä, (1998); Takashima <i>et al.</i> , (1999); Nogawa <i>et al.</i> , (2001).
<i>Trichoderma reesei</i>	Petersson <i>et al.</i> , 1981) ; Sheir-Neiss et Montenecourt, (1984) ; Mouranche et Costs, (1985).
<i>Trichoderma koningii</i>	Wood et McMrae, (1972) ; Mouranche et Costs, (1985).
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Fujita <i>et al.</i> , (2002).
<i>Aspergillus nidulans</i>	Lokington et Kelly, (1997).
<i>Aspergillus oryzae</i>	Kitamoto <i>et al.</i> , (1996) ; Riou <i>et al.</i> , (1998).
<i>Aspergillus niger</i>	Toda <i>et al.</i> ., (1971).
<i>Aspergillus terreus</i>	Nilsson, (1973).
<i>Fusarium solani</i>	Wood et McMrae, (1972) ; Mouranche et Costs, (1985).
<i>Sporotrichum pulverlentum</i>	Mats et Eriksson,(1980).
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Evans, (1971).
<i>Humicola insolens</i>	Boisset <i>et al.</i> , (2001) ; Receveur <i>et al.</i> , (2002).
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Aylward <i>et al.</i> , (1999).

2-4- Mécanisme d'action de la cellulase

Les cellulases se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons β -osidiques entre les résidus glycosyliques. (Lynd *et al.*, 2002).

L'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques s'effectue par un mécanisme acide-base, constitué d'un donneur de proton et d'une base nucléophile (Sinnott, 1990). Ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Généralement, l'hydrolyse des liaisons glycosidiques $\beta(1-4)$ de la cellulose se fait avec rétention de la configuration du carbone anomérique (Gebler *et al.*, 1992). Les produits d'hydrolyse peuvent avoir comme conséquence l'inversion ou la conservation (double mécanisme de rechange) de la configuration anomérique du carbone-1 à l'extrémité réductrice (Birsan, *et al.*, 1998 ; Ooshima *et al.*, 1990 ; Withers., 2001).

La nature insoluble de la cellulose représente un défi pour les systèmes cellulases, pour s'y adapter la plupart des cellulases ont une structure modulaire facilitant la fixation de l'enzyme à la surface de la cellulose, pour amorcer l'hydrolyse de la cellulose. Le système de cellulases montre une activité collective plus élevée que la somme des activités de différentes autres enzymes, un phénomène connu sous le nom de synergie (Lynd *et al.*, 2002). Quatre formes de synergisme ont été rapportées (Din *et al.* 1994 ; Teeri, 1997) :

- ✓ Synergie endo-exoglucanase
- ✓ Synergie exo-exoglucanase
- ✓ Synergie exoglucanase et β -glucosidase (la cellobiose en tant que produit final)
- ✓ Synergie intramoléculaire entre les domaines catalytiques et le « linker ».

2-5-Structure de la cellulase

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman *et al.*, 1985) et ne sont pas des métalloprotéines (Saha *et al.*, 1994). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : Le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux par un peptide glycosylé flexible riche en Ser / Pro et Thr appelé « linker » (Figure 3) (Cavako-Paulo,

1998 ; Receveur *et al.*, 2002 ; Hasper *et al.*, 2002). La présence du domaine de fixation est essentielle pour la dégradation de la cellulose cristalline de coton, car elle augmente la concentration de l'enzyme autour du substrat et de ce fait améliore la catalyse enzymatique (Din *et al.*, 1991 ; Boraston *et al.*, 1998). Le site actif situé dans le domaine catalytique, a la forme d'un tunnel où la réaction hydrolytique a lieu (Henrissat et Bairoch, 1996),.

Le domaine de fixation des cellulase fongiques comporte 36 acides aminés et se fixe de façon réversible à la cellulose (Linker et Teeri., 1996), grâce à la tyrosine qui joue un rôle important dans la fixation du substrat par une interaction hydrophobe (Reinikainen, 1994).

2-6- Applications industrielles de la cellulase

L'intérêt que porte la biotechnologie à la cellulase s'explique par ces vastes applications. En effet, son utilisation permet potentiellement la production de glucose , élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur *et al.*, 2002) ce qui revoie à différentes applications industrielles.

▼ Industries alimentaires

Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban,1993). Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes, le plus souvent en association avec les pectinases (Odier et Rouau,1985) pour la digestion qui précède les extractions (protéines de soja, amidon de pomme de terre ou de maïs, jus de fruits, huiles végétales etc...) (Odier et Rouau,1985) . Elle améliore l'arôme des jus de fruits et du vin (Ricchio *et al.*, 1999).

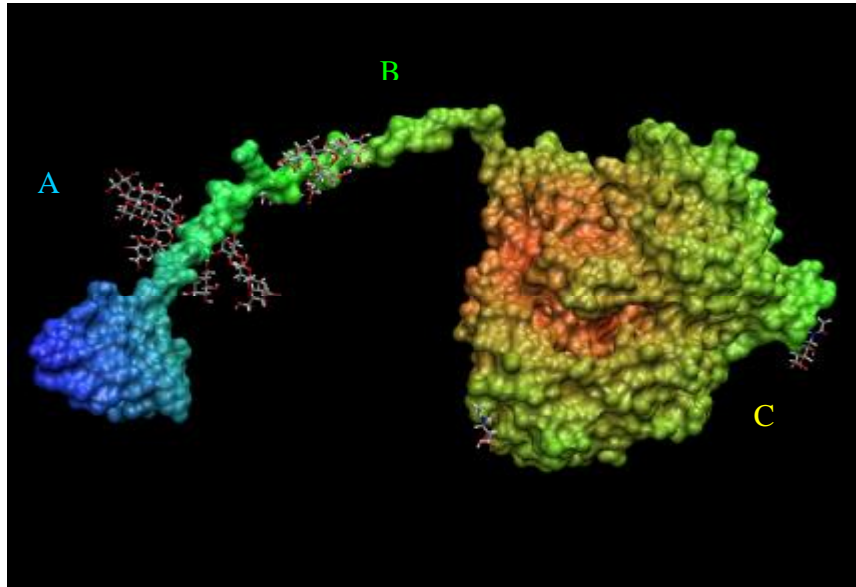


Figure3 : *Exocellulase CBHI (Cel7A) de Trichoderma reesei* (John *et al.* ,2005)
(A : le site de fixation,B : le « linker » glycosylé, C : le site catalytique)

▼ *Industrie des textiles et des détergents*

Depuis 1990, les textiles et les détergents constituent les plus grands marchés mondiaux pour l'utilisation des cellulases. Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov *et al.*, 2000). Elles sont utilisées aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997 ; Cavako-Paulo, 1998) des fibres et dans la préparation de « stone washed jeans » (Scriban, 1993 ; Gusakov *et al.*, 2000 ; Ando *et al.*, 2002).

▼ *Papeterie*

Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993). Elles contribuent également à l'amélioration de la qualité du papier (Odier et Rouau, 1985).

▼ *Nutrition animale*

C'est un autre marché qui pourrait s'ouvrir pour ces enzymes utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour volailles ou porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréta) (Scriban, 1993 ; Gusakov *et al.*, 2000) et améliore la valeur nutritive de l'aliment (Kolarova et Farkas, 1981 ; Odier et Rouau, 1985).

▼ *Domaine thérapeutique*

Certaines cellulases sont utilisées dans des formules médicamenteuses comme aides digestives (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993). Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viridae* sont utilisées en association avec des α -amylases fongiques, pour éviter les dysepsies et fermentations intestinales (Rivière, 1975).

▼ *Autres applications*

Les cellulases sont également utilisées dans différents domaines :

- ü La bioconversion de la cellulase des déchets de papeterie en source fermentescible par des cellulases de *Trichoderma viridae* (Van Wyk et Mohulatsi, 2003).
- ü L'utilisation de cellulases de *Trichoderma reesei* pour l'hydrolyse enzymatique de la pulpe de betterave en sucres fermentescibles (glucose, xylose, etc...) utilisés dans d'autres fermentations (Sidi Ali *et al.*, 1984) et processus biochimiques (Tangnu *et al.*, 1981 ; Kubicek, 1993).
- ü La production de protéines d'organismes unicellulaires (POU) à partir de paille qui constitue la majeure source de déchets cellulosiques (Peitersen et Andersen, 1978).
- ü L'utilisation de levures combinées possédant un système cellulasique pour la fermentation de matière cellulosique en éthanol ; la levure *Saccharomyces cerivisiae* fermente 45 g de cellulose par litre pour produire 16.5 litres d'éthanol au bout de 50 heures (Fujita *et al.*, 2002), où le bioéthanol peut substituer les carburants classiques entre autres le pétrole (Sicard, 1982).
- ü L'isolement de protéines végétales et la préparation de produits alimentaires (Raimbault, 1983).
- ü L'isolement de protoplastes végétales utilisées pour l'étude des virus végétaux destinés aux recherches métaboliques et génétiques (Evans et Bravo, 1983 ; Tewes *et al.*, 1984).

1

BIBLIOGRAPHIE

2^{EME} PARTIE

1-CARACTERISTIQUES GENERALES DES MOISSURES

1-1- Définition et caractéristiques principales

Les moisissures sont des organismes filamenteux hétérotrophes (Nicklin *et al.*, 2000). Certains vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant sur des déchets organiques. Les moisissures sont aérobies, en général, acidophiles (pH compris entre 3 et 7) ((Nicklin *et al.*, 2000) et mésophiles (température optimale 20-30°C)(Botton *et al.*, 1990). Cependant, certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température ($T^{\circ} < 15^{\circ}\text{C}$ ou même parfois $< 0^{\circ}\text{C}$, comme *Cladosporium herbarium*, *Thamnidium elegans*). Elles ont, en générale, un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ($a_w = 0.65$) (Boiron, 1996). Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes).

La sporulation des moisissures est sous la dépendance des facteurs nutritifs ; en particulier du rapport C/N égale à 20 (Barker et Worgan, 1981 ; Botton *et al.*, 1990) ainsi que des facteurs environnementaux, essentiellement la lumière qui influence fortement la croissance de certaines moisissures, soit par destruction photochimique de constituants du milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique. Ainsi, l'induction de la synthèse des pigments caroténoïdes sous l'influence de la lumière, colore en orange le mycélium de certaines espèces. D'autres pigments voient également leur production stimulée par la lumière et colore diversement les moisissures (Boiron, 1996). Cependant, beaucoup de moisissures n'exigent pas de lumière pour sporuler (Botton *et al.*, 1990).

1-2- Habitat et pathogénicité

Lorsque les conditions environnementales sont favorables (humidité, température et substrats organiques disponibles), les moisissures se développent. Beaucoup d'espèces se produisent dans les habitats froids, périodiquement arides ou autres, apparemment inhospitaliers (Isaac *et al.*, 1993). Il est important de souligner que les conditions optimales pour la croissance et la reproduction des moisissures changent considérablement d'une espèce fongique à une autre, d'où une biodiversité de mycètes qui tend à augmenter dans les régions tropicales, certains sont spécifiques à des endroits étroitement limités (la truffe blanche de Piémont est connue uniquement au niveau d'une Provence de l'Italie nordique) (Swann *et al.*, 1999). Environ 70.000 espèces de mycètes sont décrites. Cependant, quelques évaluations suggèrent l'existence de 1.5 million d'espèces (Hawksworth, 1991 ; Hawksworth *et al.*, 1995).

L'intervention néfaste des champignons filamenteux se manifeste essentiellement dans l'industrie alimentaire avec une activité phytopathogène en particulier sur les fruits et légumes.

Les moisissures les plus connues pour leur pathogénicité sont : *Aspergillus flavus*, *A. nomius* et *A. parasitica* connus pour leur production d'aflatoxine (substance cancérigène puissante). Ces espèces se développent à la surface de certains aliments tels que les céréales et les arachides (Guiraud, 1998), la moisissure *Penicillium citreonigrum* produit la citreoviridine (mycotoxine neurotoxique responsable du bérubéri cardiaque), alors que *P.citrinum* produit la citrinine un néphrotoxique, *Fusarium sporotrichoides* et des espèces voisines produisent divers toxines comme les trichothécènes, la zéaralénone, les fumonisines etc... certaines de ces toxines sont très thermostables (30 min à 200°C). Certaines maladies dues à l'aleucie alimentaire toxique (ATA) se présentent sous forme de simples malaises (Guiraud, 1998). D'autres exemples existent encore, telle que l'action de *Cryphonectria parasitica* responsable de la cessation de quatre milliards d'arbres de châtaigne aux Etat-Unis (Alexopoulos *et al.*, 1996).

1-3-Besoins nutritifs et activités biologiques

Les champignons sont des hétérotrophes ; ils utilisent des composés organiques comme source de carbone. La digestion des grosses molécules doit commencer dans le milieu extérieur car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme.

La panoplie enzymatique des champignons est extrêmement riche et leur permet d'utiliser les substrats les plus complexes plus efficacement que les bactéries, tel que : la cellulose, la lignine, la kératine, les acides humiques etc. (Davet, 1997).

Le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, l'amidon et la cellulose représentent les sucres les plus utilisés par les moisissures comme source de carbone et d'énergie. Ces hydrates de carbone sont dégradés grâce à la glycolyse et le métabolisme aérobie (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000). D'autres composés organiques tels que les pesticides, les hydrocarbures, la lignine, la pectine et les lipides sont également dégradés par les moisissures à côté d'autres substrats organiques bon marché comme les déchets issus de l'industrie agroalimentaire (lactosérum, mélasses de canne ou de betterave, amidon de maïs, déchets d'agrumes etc.).(Nishio et Nagai, 1981 ; Joyeau, 1982 ; Hart *et al.*, 1991).

L'azote représente, quant à lui, le second élément chimique le plus important du matériel cellulaire, composé majeur des protéines et des acides nucléiques. Il constitue en moyenne 12% du poids sec cellulaire (Scriban, 1993) ; non assimilable sous forme d'azote atmosphérique par les moisissures. Ces dernières métabolisent le nitrate, l'ammonium, l'urée et les acides aminés plus facilement assimilables (Botton *et al.*, 1990). Les peptides et les protéines ne sont utilisés par les moisissures qu'après leur dégradation (Botton *et al.*, 1990 ; Nicklin *et al.*, 2000). Par ailleurs, des sources naturelles complexes sont souvent utilisées comme source azotée telle que : la caséine, les farines de poissons et de soja, le «corn steep liquor » etc. (Joyeau, 1982).

Le cuivre, le magnésium, le sodium, le zinc et le molybdène constituent les micronutriments, et sont disponibles en grande quantité dans l'environnement des moisissures (Nicklin *et al.*, 2000). Ils sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production de cytochromes, des pigments, d'acides organiques, etc... Par ailleurs, le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium et le soufre représentent les macronutriments requis par les moisissures et sont convertis en divers composés après réduction (Boiron, 1996).

Les facteurs de croissance sont des composés indispensables à la nutrition et à la croissance de certains microorganismes (Leclerc *et al.*, 1995). Les stérols, les acides gras, les purines et les pyrimidines constituent des facteurs de croissance en quantité relativement importante pour le développement d'un certain nombre d'espèces. Les stérols jouent un rôle majeur dans la constitution des membranes fongiques et leur perméabilité (Boiron, 1996). Diverses vitamines sont également d'une grande importance pour leur croissance, en particulier la thiamine, la biotine intervenant comme coenzyme lors des carboxylations (Rivière, 1975; Botton *et al.*, 1990).

1-4-Production de métabolites

La glycolyse ou la voie d'Embder-Meyerhof-Parnas (EMP), la voie des pentoses phosphate et la voie d'Entner-Doudoroff sont trois modes de dégradation des glucides. Le produit terminal principal est l'acide pyruvique qui, en aérobiose, est converti en Acétyle Coenzyme A via le cycle des acides tricarboxyliques (respiration). La synthèse de l'ATP est la plus importante par la chaîne des transporteurs d'électrons (38 ATP/mole de glucose). L'oxygène est habituellement l'accepteur final mais le nitrate peut aussi parfois jouer ce rôle chez quelques champignons (*Neurospora crasse*, *Aspergillus nidulans*) (Botton, 1990).

Les molécules intermédiaires de la voie EMP sont utilisées pour la production d'acides aminés, d'acides nucléiques et de lipides. L'acetyl CoA est le point de départ de la production des acides gras et de métabolites secondaires (dérivés isoprénoïdes, caroténoïdes, stéroïdes). Le cycle glycoxylique est également important, il produit l'oxaloacétate à partir de l'acetyl CoA ; cet acide organique est en suite décarboxylé pour produire du phosphoénol-pyruvate à partir duquel la cellule synthétise les glucides de la paroi (Botton, 1990).

Lorsque la croissance végétative est inhibée (95% du glucose sont convertis en acide citrique), les molécules intermédiaires des métabolites primaires peuvent être orientées vers des biosynthèse inhabituelles, celles des métabolites secondaires. Plus de mille métabolites secondaires sont ainsi caractérisés chez les champignons : alcaloïdes (ergotamine), antibiotiques (pénicilline, céphalosporine), arômes (méthylcétone), gibbérellines, mycotoxines etc...(Botton, 1990).

2-CARACTERES DISTINCTIFS EN CLASSIFICATION ET TAXONOMIE

2-1- Classification des champignons

Les champignons constituent un groupe indépendant, égalant dans le rang celui des végétaux et des animaux (Hawksworth *et al.*, 1995). Ils partagent avec les animaux les capacités d'exporter les enzymes hydrolytiques qui décomposent les polymères utilisés en nutrition (Taylor, 1993). Ce sont des organismes eucaryotes sans chlorophylle et dont l'appareil végétatif (dépourvu de tiges, de racines et de feuilles) est appelé thalle qui peut être unicellulaire, dissocié et bourgeonnant (levures) ou filamenteux (moisissures). Il est habituellement limité par une paroi rigide à l'exception du groupe Gymnomycète composé d'organisme à structures végétatives nues et capables de se mouvoir à l'aide d'un pseudopode (Botton, 1990).

Selon Botton (1990), les plus grandes divisions caractérisant les champignons sont :

2-1-1-Division I : Gymnomycota

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

2-1-2-Division II : Mastigomycota

Reproduction asexuée typiquement par spores mobiles (zoospores).

2-1-3-Division III : Amastigomycota

Pas de cellules mobiles, cette division renferme plusieurs classes :

2-1-3-1- Zygomycètes

Mycélium sans cloisons avec reproduction asexuée le plus souvent, se manifestant par la reproduction de plusieurs sporangiospores (cellules uniques).

- ✓ Zygomycètes : par sporocystophores.
- ✓ Trichomycètes : par conidies exogènes.

La forme sexuée plus rare, se produit par la fusion de deux gamètes multinuclées aboutissant à la formation d'une cellule caractérisée par sa paroi épaisse jaune, marron ou parfois noir appelée zygospore (Samson *et al.*, 1981).

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

2-1-3-2- Ascomycètes

Cette classe représente 75% de tous les mycètes (Wu et Kimbrough, 1992), y compris celles des mycètes qui se combinent avec les algues pour former des lichens (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Cette classe est caractérisée par :

- ✓ Un thalle à mycélium septé et haploïde (Samson *et al.*, 1981), ou unicellulaire (levures).
- ✓ Une reproduction sexuée par formation de spores méiotiques (ascospores) dans des asques (figure 4).
- ✓ Une reproduction asexuée par conidies.

Dont la paroi cellulaire est constituée essentiellement de chitine et de β -glucanes (Wessels, 1994).

2-1-3-3- Basidiomycètes

Les basidiomycètes sont unicellulaires ou multicellulaires, sexuels ou asexuels, terrestres ou aquatiques. En effet, ils sont si variables qu'il est quasiment impossible d'identifier toutes les caractéristiques morphologiques qui sont spécifiques à ce groupe, le dispositif le plus révélateur est la reproduction des basides (basidium) qui représente la cellule où la méiose se produit et sur la quelle le basidiospore haploïde se forme (McLaughlin *et al.*, 1985 ; Ingold, 1991) (figure 5).

2-1-3-4- Deuteromycètes : (ou champignons imparfaits)

ils sont caractérisés par :

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

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

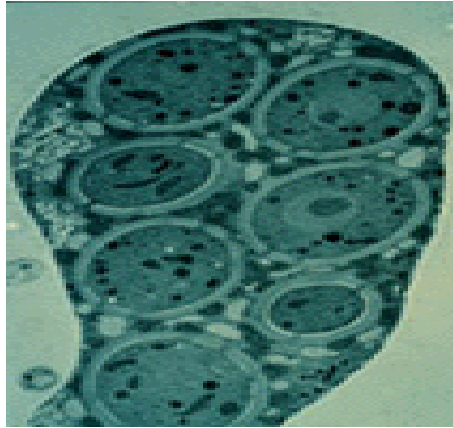


Figure 4 : Asque d'un ascomycète (Euascomycetes) observé au microscope électronique, (Vilgalys, 1996).

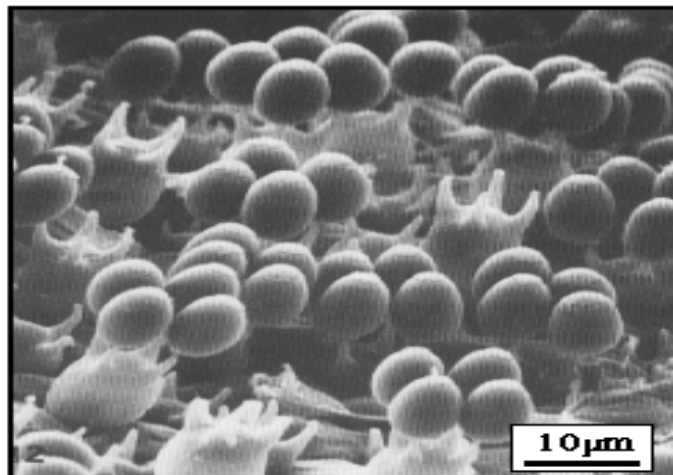


Figure 5 : Surface d'une ouïe de champignon (*Coprinus cinereus*) montrant plusieurs basides, certains avec quatre basidiospores joints. (McLaughlin *et al.*, 1985)

2-2- Structure de la paroi

La plupart des moisissures sont caractérisées par un corps non mobile (thalle), formé par des prolongements apicaux de filaments cloisonnés (hyphes), un cycle de vie avec une reproduction sexuée et (ou) asexuée, forme souvent un thalle commun. Les composants caractéristiques de la paroi sont principalement la chitine (homopolymères β -1,4 de N-acetylglucosamine dans sa forme microcristalline) et des glucanes principalement des α -1,3- et α -1,6-glucane.(Griffin, 1994).

Les exceptions à cette caractérisation sont bien connues, et incluent ce qui suit :

La plupart des espèces de *Chytridiomycètes* ont des cellules avec un flagelle simple, lisse inséré postérieurement à un moment du cycle de vie. Quelques espèces d'*Ascomycètes* (Ophiostomataceae) ont de la cellulose en plus de la chitine. D'autres mycètes tels que Chytridiomycetes (Coelomomycetales) sont carrément dépourvues de chitine (Alexopoulos *et al.*, 1996).

3-IDENTIFICATION DES MOISSURES

L'identification des moisissures est basée essentiellement sur l'étude des caractères cultureux (vitesse de croissance, couleurs des colonies et variation des couleurs au cours du temps, couleurs de l'envers des colonies, couleurs et changement de couleur du milieu, texture de la surface et éventuellement la présence de gouttes de transpiration sur le mycélium aérien et odeur) et des caractères morphologiques révélant des structures caractéristiques pour chaque genre (Guiraud,1998).

L'identification de l'espèce nécessite une étude plus délicate, basée sur différents tests (galeries biochimiques) afin de cerner les caractères physiologiques qui viennent s'allier aux caractères de l'appareil fructifère végétatif. Ce dernier jouant un rôle particulièrement important dans l'identification, pour venir à bout d'une identification complète.

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

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

4- LES DECHETS DE DATTES, SUBSTRAT DE FERMENTATION

Aujourd'hui grâce aux procédés biotechnologiques, il est possible de mettre sur le marché local et même international, une nouvelle génération de produits. Effectivement, les produits et sous- produits du palmier dattier, riche en sucres fermentescibles (environ 65%) (Touzi, 1997), constituent des substrats de choix pour la production de nombreuses substances à forte valeur ajoutée dont l'impact socio-économique est considérable tant du point de vue de la création d'emplois que de la mise à la disposition des consommateurs de substances stratégiques fortement prisées et souvent importées à coup de devises fortes.(Bessah et Touzi, 2001).

De nombreux microorganismes (champignons, bactéries et levures) sont susceptibles de croître sur différents substrats carbonés et de produire le métabolite recherché.

Le choix du substrat de fermentation (dattes déclassées) est motivé par les quantités importantes que le secteur phoenicicol algérien estimé en l'an 2002 à 13505880 palmiers dattiers (toutes variétés confondues) avec une production annuelle de 4.2 millions de quintaux de dattes (Anonyme, 2005) dont une partie plus ou moins importante est moins appréciée sur le marché, écarts de tri (dattes touchées, ratatinées et de h'chefs) auxquels s'ajoute un tonnage important de dattes communes qui ont une faible valeur marchande. D'où l'intérêt de valoriser les dattes, de par leur grande richesse en sucre et leur conservation relativement longue (Sawaya, 1982), offrent de nombreuses possibilités technologiques suivant le traitement auquel elles sont soumises. En effet, ces dattes riches en sucres peuvent être utilisées comme source carbonée pour la fermentation et la production de biomasse microbienne et de divers métabolites importants : acide citrique, oxytetracycline, alcools, vitamine B12, ferments lactiques, enzymes ainsi que la levure boulangère (Abou-zeid *et al.*, 1993). Malgré la richesse des dattes en sucres et sels minéraux (calcium, potassium, magnésium et fer) , l'analyse de différents types de dattes révèle leur déficience en phosphore, en protéines et en vitamines (Acourène,2001). A cet effet, l'enrichissement du milieu de fermentation avec de l'azote et du phosphore est nécessaire afin de constituer un milieu favorable au développement des moisissures.

La production de cellulases par les microorganismes s'est bien développée ces dernières années. Cependant, elle utilise des procédés de fermentation faisant intervenir des substrats relativement onéreux, tels que l'extrait de levure, le glucose ou le maltose. Par ailleurs, un grand nombre de milieux de culture à base de substrats autres que les dattes ont été mis au point telle

que l'utilisation de lactosérum par exemple (Acourène, 2001).

La stratégie de notre travail consiste à rechercher des souches fongiques cellulolytiques isolées de milieux extrêmes (sol et lac sahariens) et sélectionner les plus performantes dans la production de cellulases thermostables lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu à base de déchets de dattes.

2

MATERIELS ET METHODES

1- ISOLEMENT ET SELECTION DES SOUCHES FONGIQUES PRODUCTRICES DE CELLULASE

1-1- Echantillonnage

Les échantillons sont prélevés, à partir des sols et eaux des sebkhas de la région de Biskra (LEMGHYAIR) considérés comme des écosystèmes extrêmes (végétation très réduite, salinité très élevée de plus de 25° Bowie, température élevée pouvant atteindre 49.5°C, pluviométrie : 120 à 150 mm/an correspondant à 15 jours de pluie par an) (Météo France, 2003).

1-1-1-A partir du sol

200 à 300 grammes de sol ont été prélevés au niveau :

- Du sol avoisinant le lac à une profondeur de 20 centimètres.
- Du sol des palmeraies distantes de 30 mètres du lac principal et à une profondeur de 50 centimètres.
- Du sol d'une table à une profondeur d'un mètre.

Les échantillons sont déposés sur une feuille d'aluminium stérile soigneusement enveloppée dans des sacs en papier et transportés au laboratoire pour être analysés dans les 24 heures (stockés à 4°C).

1-1-2-A partir de l'eau

Le prélèvement d'eau a été effectué au niveau :

- Du lac principal à une distance de 5 mètres du bord et à une profondeur de 50 cm de la surface
- D'une flaque d'eau avoisinant le lac principal à une profondeur de 20 cm.

Des flacons stériles de 250 ml sont utilisés aux profondeurs indiquées puis fermés hermétiquement et analysés au plus tard dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

1-2- Détermination du pH des échantillons

La mesure du pH est réalisée dès l'arrivée au laboratoire. La mesure du pH de l'eau est effectuée directement en plongeant l'électrode du pH-mètre dans 10 ml d'échantillon. En ce qui concerne le sol, la technique consiste à mesurer le pH des suspensions du sol en eau distillée (5 g de sol pour 12.5 ml d'eau distillée) (Pochon et Tradieux, 1962).

2- ISOLEMENT DES MOISSURES

2-1-A partir du sol

Un gramme de sol est suspendu dans 9 ml d'eau physiologique stérile (dilution 10^{-1}) et homogénéisé pendant 10 minutes à l'aide d'un vortex. Cette dilution représente la solution mère à partir de laquelle d'autres dilutions sont préparées jusqu'à 10^{-9} . Chaque dilution fera guise d'un échantillon et sera étalée à la surface des milieux gélosés (Agar blanc, Czapek Dox (Annexes 1 et 2) à différentes concentrations de NaCl : 0%, 5% et 10%) avec l'addition d'un antibiotique la gentamicine (50ppm) afin d'incuber la croissance des bactéries grame positif et grame négatif (Botton *et al.*, 1990).

Les boîtes de pétri sont incubées à 28°C et observées quotidiennement durant 4 semaines.

2-2-A partir de l'eau

Des dilutions décimales sont préparées à partir des solutions mères (échantillons d'origines), 1 ml de chaque dilution sera ensuite étalé à la surface des milieux gélosés (Agar blanc, Czapek Dox à différentes concentrations de NaCl : 0%, 5% et 10%) supplémenté par la gentamicine (50 ppm), l'incubation dure un mois à 28 °C avec une observation quotidienne.

3- PURIFICATION ET ETUDE MACROSCOPIQUE DES MOISSURES ISOLEES

Les colonies de moisissures sont repérées dès leur apparition par leur aspect filamenteux caractéristique, après leur détection sur l'Agar blanc qui permet une croissance lente et disciplinée. Les filaments sont ensuite repiqués sur des milieux plus riches (Czapeck Dox, PDA (annexes 2 et 3), 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.

4- CONSERVATION DES SOUCHES FONGIQUES ISOLEES

La méthode de conservation des souches la plus communément utilisée car la plus simple, consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée (Botton *et al.*, 1990), les cultures sont maintenues pendant 7 jours à 28°C, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Botton *et al.*, 1990).

5- SPORULATION DES MOISSURES

Les moisissures sporulent sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar), incubées à 28°C pendant 7 jours .

5-1- Préparation de la suspension de spores (Inoculum)

Après sporulation des moisissures (ensemencées sur 40 ml de PDA dans des Erlen-meyers de 250ml), les spores sont récupérées par addition de 50 ml d'eau distillée stérile sous agitation vigoureuse (Solis-Pereira *et al.*, 1993).

5-2- Dénombrement des spores

Une série de dilutions est réalisée à partir d'une solution mère de spores. Ces dilutions sont dénombrées (cellule de Thomas), et lues à une absorbance à 650 nm ce qui permet de tracer la courbe d'étalonnage des spores de la souche étudiée (figure 6) .

6- LA SELECTION DES SOUCHES CELLULOLYTIQUES

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des moisissures isolées est réalisée sur 02 types de milieux :

6-1-En milieu solide

La technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des moisissures à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé à base de cellulose (en poudre à 0.5%) comme seule source carbonée (voir annexe 4).

6-2-En milieu liquide

Le principe reste le même, un milieu liquide totalement dépourvu d'une quelconque source carbonée exception faite, pour les bandes de papier filtre Whatman n°1 (0.5 mm de largeur et 12 cm de longueur) qui servent de source carbonée. Les échantillons sont incubés à 28°C en présence des bandelettes de papier plongées dans 10 ml du milieu minéral : $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1g, CaCl_2 0.1g, FeCl_3 0.02g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g préalablement stérilisées.

L'ensemencement se fait par une suspension de spores de chaque souche à une concentration de 10^5 spores / ml de milieu . Un blanc (sans inoculum) est soumis aux mêmes conditions.

La dégradation du papier est observée visuellement (Gunnar *et al.*, 1999)et quotidiennement.

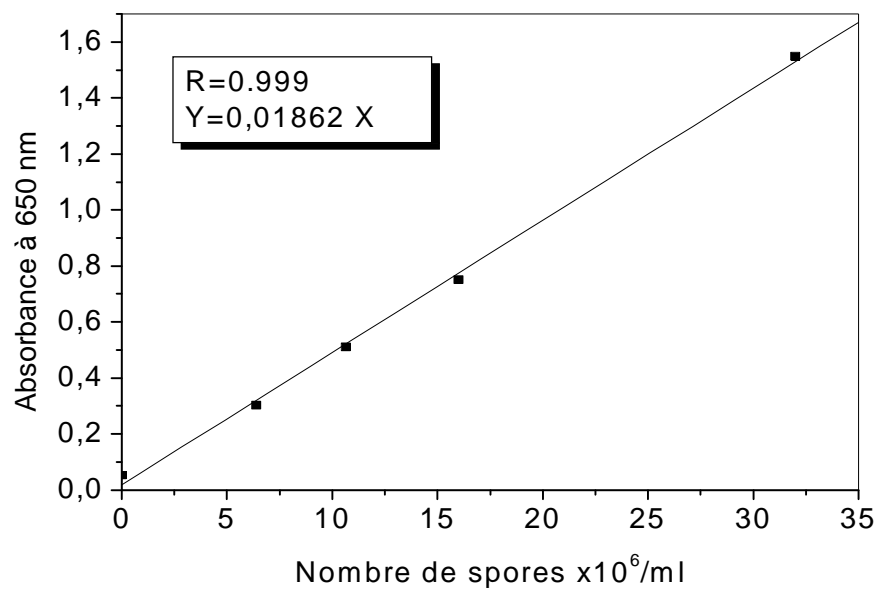


Figure 6 : Courbe d'étalonnage des spores de *Trichoderma sp*

7- IDENTIFICATION DES SOUCHES SELECTIONNEES

L'identification d'une souche représentative est effectuée par deux techniques classiques : une observation macroscopique et une étude microscopique des souches, largement suffisantes pour déterminer le genre des moisissures isolées et cela en réalisant des ensemencements par touches sur des milieux d'études solides favorisant la croissance et la sporulation des moisissures. Les milieux les plus souvent utilisés à ces fins sont l'Agar blanc (voir annexe 1), utile pour éviter certains phénomènes de pléomorphisme (Guiraud,1998), le Czapeck Dox Agar et le milieu MEA (voir annexe 2et5), utilisés simultanément (Botton *et al.*, 1990).

7-1- Caractères cultureux

Les caractères morphologiques et cultureux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur les milieux de cultures spécifiques cités si-dessus. Les milieux sont coulés sur des boites 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 en suite 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 boite.

L'évaluation de l'ampleur de la croissance et du développement est observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C. Ce suivi réalisable à l'œil nu mais aussi grâce à un 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 boite, la production de pigment diffusible, présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium, temps de sporulation, texture de la surface etc.)

7-2- Etudes microscopiques

L'observation in situ de la morphologie des chaînes de spores et celle du mycélium s'est faite en employant deux techniques :

7-2-1-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 becs Bunsen en présence d'une goutte du liquide de montage (lactophénol) et légèrement le dilacéré avec deux aiguilles pour éviter la réalisation d'une préparation trop dense et inobservable (Botton, 1990), puis le recouvrir délicatement d'une lamelle en évitant de créer des bulles d'air ou des débordements.

7-2-2-Réalisation de la culture sur lamelle

Cette technique est appliquée essentiellement aux champignons dont la structure est particulièrement fragile, qui subissent alors un examen microscopique spécial qui consiste à préparer une culture observable directement au microscope. Une lamelle stérile est insérée délicatement dans un milieu gélosé de manière à former un angle de 45°. Une goutte de l'inoculum (suspension de spores) est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu nutritif. Après 14 jours d'incubation à 28°C, la lamelle est retirée délicatement de la gélose, elle est en suite déposée sur une lame et examinée au microscope.

L'examen microscopique suivant cette manipulation permet d'étudier les caractères suivants: Hyphes cloisonnés ou non, mycélium diffus, épais, coloré ou incolore, présence de types de spores sexuelles (oospores, zygosporés, ascospores, basidiospores) ou asexuées, type et apparence du système sporal, présence de type de structure particulière etc.

8- ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES DECHETS DE DATTES

8-1- Détermination de la matière sèche

La matière sèche est déterminée sur un échantillon de 10 grammes de déchets de dattes par dessiccation à l'étuve à une température de 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Audigie *et al.*, 1984).

8-2- Dosage des sels minéraux

8-2-1-Phosphore

Après minéralisation de l'échantillon, le phosphore est combiné au phosphovanadomolybdate d'ammonium sous forme d'un complexe jaune, (réaction de Misson) dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de phosphore en solution (Lecoq, 1965).

Ce dosage est réalisé selon la méthode colorimétrique de Bohuon (Rodier et Mallein, 1973). Le réactif de Mann et Yoe, très spécifique au magnésium, le fait virer du bleu au rose en milieu hydroalcoolique à pH 9-10 (voire annexe 7).

8-3- Dosage de l'azote total

Ce dosage est réalisé selon la méthode de Kjeldhal mise au point en 1883 (Hamon *et al.*, 1990). Elle consiste à détruire toute trace de matière organique par de l'acide sulfurique concentré à l'ébullition en présence d'un catalyseur avec formation de sulfate d'ammonium puis d'ammoniaque. Ce dernier déplacé par une base fixe (la lessive de soude), est entraîné par la vapeur d'eau dans une solution d'acide fort. D'autre part, cette méthode est couramment utilisée en analyse appliquée pour le dosage de l'azote total des protéines, des hydrolysats de protéines, du lait, des farines etc (voir annexe 8).

8-4- Dosage des sucres totaux

Ce dosage est réalisé selon la méthode de Dubois et ses collaborateurs, (1956). L'acide sulfurique concentré provoque à chaud le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des alcools des oses. Cette déshydratation entraîne la formation d'un anhydro-méthylfurfural (cas d'un hexose) et d'un furfural (cas d'un pentose). Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est donc proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer) (Voir annexe 11).

8-5- Dosage de la matière grasse

La méthode utilisée dans ce travail est celle de Wiseman (Lecoq, 1965). L'acide chlorhydrique libère à chaud la matière grasse des protéines et d'autres substances, qui seront ensuite séparées par filtration. Après séchage, elle est extraite à l'éther de pétrole dans un appareil de Soxhlet, les extraits lipidiques étherés sont séchés puis pesés (voir annexe 9)

8-6- Détermination du pH

La détermination du pH des déchets de dattes s'effectue par une lecture directe, d'une suspension d'un gramme de déchet de dattes dilué dans 10 ml d'eau distillée, à l'aide d'un pH mètre (Meter lab) préalablement étalonné.

9- PRODUCTION DE L'ENZYME

9-1- Microorganismes

Les souches utilisées dans cette étude sont les moisissures répondant positivement aux tests de l'activité cellulolytique. Ils s'agit de 10 souches appartenant à différents genres.

9-2- Milieu de base, naturel

Les dattes déclassées sont soigneusement lavées et dénoyautées, séchées à température ambiante, l'eau est additionnée à raison de deux litres par kilogramme de pulpes. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 2 heures. L'extrait obtenu est centrifugé à 5000 rpm pendant 30 mn (Boudjelal et Nancib, 2001). Le surnageant est recueilli puis dilué aux proportions testées et utilisé comme substrat de fermentation (source d'énergie).

9-3- Milieu synthétique

Le milieu synthétique permet de déterminer la souche la plus cellulolytique parmi les 10 souches sélectionnées. Un milieu couramment utilisé pour la production d'enzymes cellulolytiques en milieu liquide et en culture en Batch (annexe 6).

9-4- Milieu de production

Différentes concentrations de déchets de dattes (0.5 à 5%) sont testées. Le milieu de production de l'enzyme est alors constitué de : substrat de fermentation (farine de dattes à la concentration optimale), 0.1% de sulfate d'ammonium (meilleure source azotée utilisée par les moisissures pour la production de cellulase (Gokhale *et al.*, 1991) et 0.5% d'extrait de levure (source de plusieurs facteurs de croissance) ainsi que 0.5% de cellulose (type Sigma Cell) comme substrat inducteur .

9-5- Suivi de la fermentation

9-5-1- Sélection de la souche la plus performante

Les 10 souches isolées (sur la base de leur activité cellulolytique) ont subi une culture dans le milieu synthétique et dans les mêmes conditions (température 25°C, pH=5 et agitation à 130 rpm) pendant 3 jours.

9-5-2-Production et dosage de l'activité enzymatique

Suite à la sélection de la souche la plus performante dont l'activité cellulasique est la plus importante, la souche subit simultanément deux cultures, l'une dans le milieu synthétique, l'autre dans le milieu de production à raison de 3 répétitions par essai. Cette opération est destinée à réaliser une étude comparative entre les deux milieux.

9-5-2-1- Récupération de la biomasse

Après fermentation, la biomasse fongique sous forme de pellettes est récupérée par filtration du milieu de fermentation sur papier Wattman n°1, après rinçage à l'eau distillée le contenu du papier est ensuite déversé dans des creusés préalablement pesés, et mis à sécher dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant (Nishio et Nagai, 1981 ; Gonzalez *et al.*, 1992).

9-5-2-2- Récupération de l'extrait enzymatique

La filtration permet à la fois la récupération de la biomasse fongique mais aussi de l'extrait enzymatique constituant le filtrat. L'extrait brut subit une mesure de pH puis stocké à 4°C jusqu'à son utilisation.

10- DOSAGE DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE

L'activité cellulasique est mesurée selon la méthode de Somogyi et Nelson (1952). Le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés lors de l'hydrolyse de la cellulose. Ces sucres réducteurs sont dosés par une réaction colorimétrique due à la présence de deux réactifs : le réactif de Somogyi et le réactif arsénomolybdique.

L'activité cellulasique est exprimée par l'unité internationale, correspondant à une micromole de cellobiose libéré par minute et par ml d'extrait enzymatique à 40°C et à pH 5.

10-1-LES REACTIFS

10-1-1-LE REACTIF DE SOMOGYI

Dissoudre 14 g de Na_2HPO_4 et 20 g de tartrate double de sodium et de potassium dans 350ml d'eau distillée. Ajouter 50 ml de NaOH 1N et 40 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ à 10%, agiter. Introduire 90 g de Na_2SO_4 anhydre. Diluer à 500 ml.

Ce réactif sera filtré 1 à 2 jours après sa préparation. Le filtrat mis à l'abri de la lumière se conserve environ deux mois.

10-1-2-LE REACTIF ARSENMOLYBDIQUE

Dissoudre 25 g de molybdate d'ammonium dans 450 ml d'eau distillée. Ajouter 21 ml d'acide sulfurique. Terminer par l'introduction de l'arsenate de sodium : 3 g dissous dans 25 ml d'eau distillée. Laisser reposer à 37 °C pendant 48 heures avant l'emploi.

Le réactif se conserve environ 1 an dans un flacon coloré et au frais.

10-2-LE SUBSTRAT

Dissoudre 0.5 g de cellulose (Sigma cell) dans 100 ml de tampon acétate 0.2 M, pH 5.

10-3-LE PROTOCOLE

Ajouter à 0.5 ml de filtrat (l'extrait enzymatique) 0.5 ml du substrat (solution de cellulose), incubé à 40°C pendant 15 minutes. Le blanc est constitué d'extrait enzymatique dénaturé à 100 °C pendant 30 minutes.

La réaction est arrêtée par l'addition de 2 ml de réactif de Somogyi. Le mélange est ensuite chauffé dans un bain marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, ajouter 2 ml de réactif arsénomolybdique, agiter vigoureusement. Diluer la couleur bleue en ajoutant 10 ml d'eau distillée. L'absorbance est déterminée à 520 nm. La concentration des sucres réducteurs correspondants est déterminée à partir d'une courbe étalon de cellobiose dont les concentrations varient de 0 à 2 mg/ml. (Voir annexe 12)

11- CINÉTIQUE DE PRODUCTION DE LA CELLULASE PAR TRICHODERMA sp:

Le milieu de production à base d'extrait de déchets de dattes servira pour la réalisation de cette cinétique qui s'effectue en erlenmeyers de 250 ml à raison de 50 ml de milieu par erlen. Après stérilisation et ensemencement (10^5 spores/ml), les erlenmeyers sont incubés à 25°C pendant 96^H dans un bain marie agitateur à 130 rpm.

Toutes les 2^H un prélèvement est effectué afin de mesurer les paramètres suivantes :

11-1-Le pH

Le pH de l'extrait enzymatique est mesuré à l'aide d'un pH mètre.

11-2-La biomasse

La biomasse fongique est récupérée dans le papier filtre et mise dans des creusets séchés

dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant.

11-3-L'activité cellulolytique

Le dosage de l'activité cellulolytique est réalisé grâce à la technique de Somogyi et Nelson décrite précédemment.

11-4-La concentration des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la technique de Lowry *et al.*, (1965) (Voir annexe 10)

11-5-La concentration des sucres totaux

La méthode de dosage est décrite (Annexe 11).

12- PURIFICATION PARTIELLE DE LA CELLULASE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM :

12-1-PRINCIPE :

Le salage (concentration excessive en sel) fait précipiter les protéines. Beaucoup de types de sels ont été utilisés pour effectuer la séparation et la purification de protéine par le salage. De ces sels, le sulfate d'ammonium a été le produit chimique le plus largement répandu de part sa solubilité élevée et son coût relativement bas, mais aussi pour son pouvoir peu dénaturant vis à vis des enzymes (Nam Sun Wang, 2003)

La solubilité de la protéine dépend, entre autres, la concentration en sel dans la solution. À basses concentrations, la présence du sel stabilise les divers groupes chargés sur une molécule de protéine, de ce fait attirant la protéine dans la solution et augmentant la solubilité de la protéine. Ceci est généralement connu comme *salting-out*. Cependant, au fur et à mesure que la concentration en sel augmente, de moins en moins d'eau est disponible pour solubiliser la protéine entraînant ainsi sa précipitation.

12-2-PROTOCOLE :

L'extrait enzymatique brut, obtenu après filtration, subit une précipitation par l'addition progressive de sulfate d'ammonium en réalisant un balayage de 30 à 80% durant 45min à 4°C. Le précipité est récupéré par centrifugation à 4.000 g dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C pendant 30 minutes (Bakare *et al.*,2005). Le précipité est dissout dans 2 ml de la solution tampon acetate 0.2 M, pH 5.0 et transféré dans des boudins pour une dialyse dans ce même tampon à 4°C pendant 24 heures.

Des mesures de l'activité enzymatique ainsi que le dosage des protéines sont effectuées après dialyse par les méthodes citées précédemment.

13- EFFET DE LA TEMPERATURE ,DU pH SUR LA THERMOSTABILITE DE LA CELLULASE

L'étude de la stabilité thermique de la cellulase produite par *Trichoderma sp* est effectuée à différentes températures : 60°, 70° 80° et 90°C pour un intervalle de temps allant jusqu'à plus de 120 min avec des prélèvements toutes les 5 min. Après refroidissement dans un bain de glace, l'activité cellulasique résiduelle est mesurée selon la méthode de Somogyi et Nelson, (1952). L'effet de la température sur l'activité cellulasique est réalisé pour une gamme allant de 20° à 90°C avec un pas de 5°C, afin de déterminer la température optimale. L'effet du pH, quant à lui ,est déterminé par l'emploi d'une gamme de tampon acetate s'étalant entre 2 et 8 .

3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1^{ère} PARTIE

ISOLEMENT ET SELECTION DE SOUCHES FONGIQUES PRODUCTRICES DE CELLULASE

1-Echantillonage

Les caractéristiques des échantillons prélevés de la région de Biskra sont consignées dans le tableau (n°2) :

Tableau n°2 : Caractéristiques des échantillons

Echantillon	date	Site de prélèvement	description	pH
1	18/11/2004	Eau du lac principal (profondeur 50 Cm de la surface)	Zone très exposée, ensoleillée, pas de végétation, taux de salinité très élevé (25°Bowie)	7.70
2	18/11/2004	Sol du lac principal (profondeur 20 Cm)	Zone très exposée, ensoleillée, aspect boueux, couleur marron foncée(25°Bowie)	7.68
3	18/11/2004	Eau de la table 1 (profondeur 20 Cm de la surface)	Zone très exposée, ensoleillée, eau relativement trouble. (25°Bowie)	7.58
4	18/11/2004	Sol de la table 1 (Profondeur 1 m)	Zone très exposée, ensoleillée, terre rouge et boueuse, pas de végétation(25°Bowie)	6.89
5	18/11/2004	Sol des palmeraies (profondeur 50 Cm)	Zone peu exposée, ombrée, présence de végétation, taux de salinité élevé(25°Bowie)	7.36

Les échantillons prélevés ont un pH neutre qui varie de 6.89 à 7.70 compatible avec celui des milieux naturels salés, par ailleurs, il est intéressant de noter que, l'ensemble des échantillons examinés appartient à des écosystèmes extrêmes (végétation très réduite, salinité très élevée de plus de 25° Bowie, température élevée pouvant atteindre 49.5°C, pluviométrie : 120 à 150 mm/an correspondant à 15 jours de pluie par an) (Météo France, 2003).

Les souches fongiques sont très répandues dans tout l'univers : sol, l'air et eau.... Par la richesse de ces écosystèmes en divers microorganismes, l'isolement des moisissures doit passer par l'élimination des autres microorganismes qui, par leur faculté d'envahissement, gênent la croissance des moisissures. Nous sommes dans l'obligation d'adopter des méthodes sélectives pour isoler les souches fongiques productrices de l'enzyme recherché :

- ü Réaliser des dilutions de $1/10^{\text{ème}}$ à $1/10^{\text{ème}}$ permettant d'éviter la condensation des microorganismes et de diminuer leur nombre.
- ü Choisir des milieux spécifiques à pH acide favorisant le développement des moisissures (Botton, 1990).
- ü Ajouter des antibiotiques tels que la gentamycine (antibiotique à large spectre d'action parmi les plus utilisés dans l'isolement des moisissures (Botton, 1990).
- ü Supplémenter le milieu par du chlorure de sodium pour favoriser le développement des moisissures halophiles (Botton, 1990).

Malgré les précautions prises et la combinaison de ces différentes méthodes, nous avons remarqué la présence de quelques colonies bactériennes sèches ou visqueuses, de levures peu abondantes dont les colonies sont moyennement développées. Ces petits inconvénients sont dus probablement à la résistance de ces microorganismes aux conditions imposées. Cependant leur disparition est observée suite aux repiquages consécutifs nécessaires à la purification des souches fongiques.

2- Les souches fongiques isolées

Sur les cinq échantillons prélevés, nous avons isolé 57 souches réparties en fonction des sites d'échantillonnage (Tableau n°3) .

Tableau n° 3 : Isolement des souches fongiques à partir des différents échantillons

Origine	Milieu	[NaCl] ajouté	Dilution	Nb de colonies
Sol du chott principal (profondeur 20 Cm) [1]	Agar blanc	5%	10^{-1}	2 (A1-A2)
			10^{-2}	2 (B1-B2)
		10%	10^{-5}	3 (C1-C2-C3)
	Czapeck Dox	0%	Solution Mère	2 (D1-D2)
		5%	10^{-2}	1 (E1)
		10%	10^{-1}	2 (F1-F2)
Sol de la table 1 à (profondeur 1 m) [2]	Agar blanc	0%	Solution Mère	3 (G1-G2-G3)
		5%	10^{-3}	2 (H1-H2)
			Solution Mère	1 (I1)
			10^{-1}	2 (J1-J2)
	Czapeck Dox	10%	Solution Mère	2 (K1-K2)
Sol des palmeraies (profondeur 50 Cm) [3]	Agar blanc	0%	Solution Mère	2 (L1-L2)
		5%	Solution Mère	5 (M1-M2-M3-M4-M5)
			10^{-1}	3 (N1-N2-N3)
			10^{-3}	2 (O1-O2)
	Czapeck Dox	0%	Solution Mère	2 (P1-P2)
		5%	Solution Mère	4 (Q1-Q2-Q3-Q4)
		10%	10^{-2}	4 (R1-R2-R3-R4)
Eau du chott principal (profondeur 50 Cm de la surface) [4]	Czapeck Dox	0%	Solution Mère	2 (S1-S2)
		5%	10^{-3}	1 (T1)
		10%	10^{-1}	4 (U1-U2-U3-U4)
Eau de la table 1 (profondeur 20 Cm de la surface) [5]	Czapeck Dox	0%	Solution Mère	1 (V1)
		5%	Solution Mère	3 (W1-W2-W3)
		10%	Solution Mère	2 (X1-X2)

Nous observons une forte densité de souches fongiques dans le sol des palmeraies aux concentrations en sel 5 et 10%. Ce résultat s'explique probablement par la richesse du sol de palmeraies en matière organique, apportée par les fruits et les feuilles, forme végétative du palmier dattier et d'autres plantes, ainsi que par le caractère halophile des souches isolées. A l'inverse, les autres échantillons renferment beaucoup moins de souches fongiques (tableau n°3).

3- Sélection de 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 ont été mis au point pour permettre une sélection primaire des souches cellulolytiques (parmi les 57 isolées) : un milieu minéral liquide contenant une bandelette de papier filtre et un milieu solide contenant de la cellulose. Ces deux tests nous ont permis, de détecter l'effet hydrolytique de certaines souches fongiques (Tableau n°4)

Seules les souches ayant répondu positivement aux deux tests ont été prises en considération. En effet, 10 souches fongiques parmi les 57 isolées, ont été sélectionnées pour la suite de notre étude.

2 souches (Q1 et R3), parmi les 10 sélectionnées, ont révélé un potentiel cellulolytique important vis à vis du milieu solide par un envahissement complet de la boîte au bout du 4^{ème} jour d'incubation. Les 8 autres (C1, F1, I1, K1, E1, L1, S2 et R4) ont montré une croissance faible (diamètre entre 2.5 à 4 cm) avec un mycélium aérien peu développé.

L'autre test (sur papier filtre) a permis d'observer différents aspects :

- Ø Dégagement des fibres cellulosiques et digestion partielle du papier lui conférant un aspect cotonneux entraînant sa rupture et sa dissolution. Cette observation s'explique probablement par la sécrétion des enzymes cellulolytiques dans le milieu extracellulaire caractérisant la production de cellulases fongiques extracellulaires (Nam Sun Wang, 2003).

Tableau n°4 : Sélection des souches cellulolytiques

Origine	souche	Test du papier filtre	Test en milieu solide (sur boîte)
Sol du chott principal à 20 Cm de profondeur [1]	A1	-	(+/-)
	A2	-	(+/-)
	B1	-	-
	B2	-	-
	C1	+	+
	C2	-	-
	C3	-	-
	D1	-	(+/-)
	D2	(+/-)	-
	E1	+++	+
	F1	+	+
	F2	-	-
Sol de la table 1 à 1m de profondeur [2]	G1	-	(+/-)
	G2	-	-
	G3	-	-
	H1	(+/-)	-
	H2	-	(+/-)
	I1	+	+
	J1	(+/-)	-
	J2	-	-
	K1	+	+
	K2	(*/-)	-
Sol des palmeraies à 50 Cm de profondeur [3]	L1	+	+
	L2	-	(+/-)
	M1	-	-
	M2	-	(+/-)
	M3	-	-
	M4	-	-
	M5	-	(+/-)
	N1	-	-
	N2	-	-
	N3	-	-
	O1	(+/-)	-
	O2	-	-
	P1	(+/-)	-
	P2	-	-
	Q1	+++	+++
	Q2	-	-
	Q3	(+/-)	-
	Q4	-	-
	R1	-	(+/-)
	R2	-	-
R3	+++	+++	
R4	+	+	
Eau du chott principal à 50 Cm de profondeur [4]	S1	-	-
	S2	+	+
	T1	-	(+/-)
	U1	(+/-)	(+/-)
	U2	-	-
	U3	-	-
	U4	-	(+/-)
	V1	(+/-)	(+/-)
Eau de la table 1 à 20 Cm de profondeur [5]	W1	-	-
	W2	-	-
	W3	-	(+/-)
	X1	-	-
	X2	-	-

(+++) Activité ou croissance très significative ,(+) Croissance mycélienne sur boîte ou dégradation significative du papier, (*/-) Dégagement de filaments du papier ou Croissance positive mais réduite sur boîte,(-) Pas de modification significative sur le papier ou pas de croissance sur boîte.

Ø Croissance mycélienne des souches fongiques sur la partie immergée du papier, probablement due à l'absorption des spores par le papier filtre. Leur condensation vers son 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 plus intense (Nam Sun Wang, 2003).
- La spécificité des mycètes filamenteux cellulolytiques, qui ont la capacité de pénétrer les substrats cellulosiques par les prolongements des hyphes, présentant ainsi leurs structures mycéliennes en cavités confinées dans les particules cellulosiques (Figure 7B)(Eriksson *et al.*, 1990).

Ø Formation d'un voile mycélien à la limite liquide/air s'expliquant probablement par l'effet du flottement des spores s'associant ainsi à la région cellulosique la plus proche.

3 souches (E1, Q1 et R3) des 10 sélectionnées suite à ce test, ont montré clairement ces trois critères de sélection de manière associée, alors que les autres souches révèlent leur activité cellulolytique par l'un ou l'autre de ces critères.

Toutes ces observations ont été 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), En effet cette structure ne peut être endommagée que par l'action de l'exoglucanase (un sous groupe de cellulase) (Nam Sun Wang, 2003). Les mycètes qui la produisent 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).



(A)



(B)



(E)



(C)



(D)

Figure 7 : Les différents cas de figure observés sur la papier filtre (Wattman N°1) après 5 jours d'incubation à 28°C.

(A)Apparition des filament, (B)Croissance mycélienne sur le papier, (C)Rupture du papier, (D)Dégradation du papier, (E) Le témoin

4- Identification des souches sélectionnées

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de Botton (1990) ; Samson et ses collaborateurs, (1981) ; Guiraud (1998) ainsi que celles de Collier et son équipe de recherche, (1998) .

4-1- Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches sélectionnées sont étudiés sur le milieu Czapek Dox le plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le tableau n°5 résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la surface et la consistance des colonies, la couleur du revers de la boîte ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

4-2- Etude microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des 10 souches fongiques sélectionnées (Conidiophores, conidies, mycélium etc). 7 genres de moisissures sont mis en évidence (tableau n°6).

1 souche (F1) présente les caractères suivants :

- ü Des conidiophores à croissance sympodiale.
- ü Des conidies en chaînes acropétales s'allongeant au sommet, cloisonnées longitudinalement et transversalement

Cette souche semble appartenir au genre *Altarnaria*

2 souches (Q1, C1) ont:

- ü Un thalle blanc et lisse
- ü Des arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités formées au niveau des doubles cloisons.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Geotrichum*

1 souche (I1) a les caractéristiques suivantes :

- ü Des conidiophores ramifiés et allongés.
- ü Des conidies en chaîne acropétale, septées avec plusieurs sites conidiogènes

Cette souche appartient probablement au genre *Cladosporium*

3 souches (E1, R4 et L1) présentent les caractéristiques suivantes :

- ü Un mycélium cloisonné
- ü Des conidiophores nombreux , dressés et non ramifiés, terminés en vésicule
- ü Des phialides formés directement sur la vésicule
- ü Des conidies en chaîne divergente
- ü Des cellules à paroi épaisse

Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*

1 souche (S2) caractérisée par:

- ü Des conidiophores isolés
- ü Des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.

Cette souche appartient probablement au genre *Penicillium*

1 souche (K1) décrite par les caractéristiques suivantes :

- ü Des cellules à paroi épaisse
- ü Des asques globuleux octosporés
- ü Des ascospores unicellulaires
- ü Des têtes conidiennes cylindriques
- ü Des conidiophores bisseriés
- ü Des conidies globuleuses échinulées




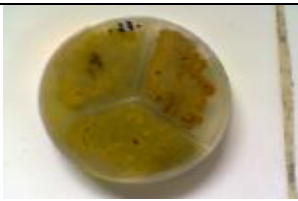
Par ces caractères cette souche semble appartenir au genre *Emericella*

1 souche (R3) caractérisée par :

- ü Un conidiophore en touffe compacte, très ramifié, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit.
- ü Des phialides ovoïdes et ellipsoïdales atténués au sommet.
- ü Des conidies réunies en glomérules au sommet des phialides.

Ces critères rejoignent ceux du genre *Trichoderma*

Tableau n° 5 : Les caractères macroscopiques des 10 souches fongiques sélectionnées

Code de la souche	Origine de la souche	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Caractéristique de la Colonie	surface	Pigments au Revers de la boîte	Revers de la boîte
R4 <i>Aspergillus</i> jaune	Sol des palmeraies [3]	Blanchâtre au début puis devient jaune à orange	Blanchâtre à beige	granuleuse	plane	Pas de pigment	
E1 <i>Aspergillus</i> verte	Sol du chott principal [1]	Dans les tons du vert au début de sporulation puis vire au jaune	Vert	Floconneuse et granuleuse	Epaisse et uniforme	Pas de pigment	
L1 <i>Aspergillus</i> niger	Sol des palmeraies [3]	Noire	Blanchâtre	Floconneuse	Epaisse et uniforme	Pas de pigment	
S2 <i>Penicillium</i>	Eau du chott principal [4]	Vert foncé	Beige virant au jaune	Glabre et poudreuse	Plane	Rouge et orange virant au jaune	











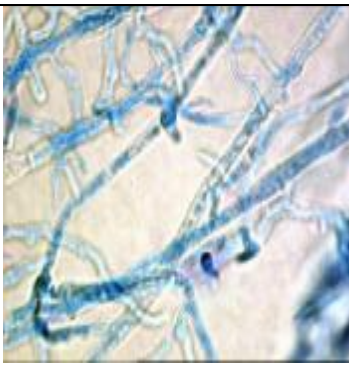
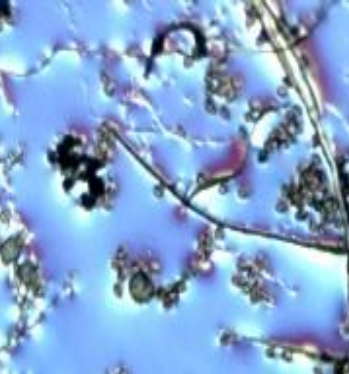
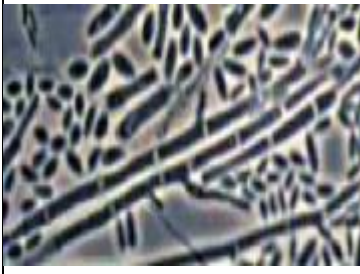
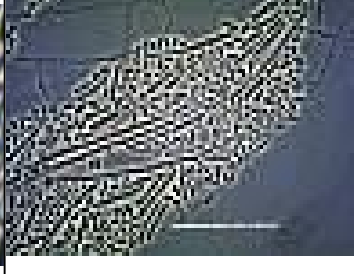




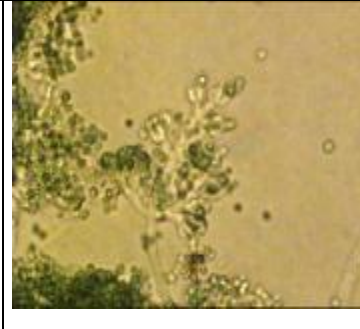

K1 <i>Emericella</i>	Sol de la table 1 à 20 Cm de profondeur [2]	Beige très clair	Marron à jaunâtre	Duveteuse	plane	Pigment très diffusible jaune	
Q1 <i>Geotrichum B</i>	Sol de palmeraies [3]	Blanc	Crème blanchâtre	Cotonneuse	Plane et lisse	Jaune	
C1 <i>Geotrichum R</i>	Sol du chott principal [1]	Blanc virant au rose	Rose très prononcé	Cotonneuse	Plane	Rose	
F1 <i>Altarnaria</i>	Sol du chott principal [1]	Brun virant au noir	Noire	Duveteuse	Flexueux avec plusieurs pores	Noire	
I1 <i>Cladosporium</i>	Sol de la table 1 à 20 Cm de profondeur [2]	Brun olivacé à brun noire	Olivacé à brun noire	Velouté et floconneux	Brun	Pas de pigment	
R3 <i>Trichoderma</i>	Sol de palmeraies [3]	Vert olive	Vert foncé	Poudreuse	Plane	Pas de pigment	

Tableau 6 : Caractères microscopiques des souches sélectionnées

Code de la souche	Aspects microscopiques du genre	genre	Aspect microscopique obtenu (nos résultats)	Photos microscopiques de référence (Malloch, 1997).
E1, R4 et L1	<ul style="list-style-type: none"> - Mycélium cloisonné - Conidiophores nombreux , dressés et non ramifiés, terminés en vésicule - Phialides formés directement sur la vésicule - Conidies en chaîne divergente 	<i>Aspergillus sp</i> (Gr X 100)		
S2	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores isolés - Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore 	<i>Penicillium sp</i> (Gr X 630)		
K1	<ul style="list-style-type: none"> - Cellule à paroi épaisse - Asques globuleux octosporés - Ascospore unicellulaire - Têtes conidiennes cylindriques - Conidiophores bisériés - Conidies globuleuses échinulées 	<i>Emericella sp</i> (Gr X 630)		

<p>Q1 et C1</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Thalle blanc et lisse - Arthropores cylindriques arrondies aux extrémités formées au niveau des double cloisons. 	<p><i>Geotrichum sp</i> (Gr X 400)</p>		
<p>F1</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores à croissance sympodiale. - Conidies en chaîne acropétales s'allongeant au sommet, cloisonnées longitudinalement et transversalement 	<p><i>Altarnaria sp</i> (Gr X 400)</p>		
<p>I1</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores ramifiés et allongés. - Conidies en chaîne acropétale, septées avec plusieurs sites conidiogènes 	<p><i>Cladosporium sp</i> (Gr X 630)</p>		
<p>R3</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores en touffe compacte, très ramifiés, irrégulièrement verticillés - Phialides ovoïdes et ellipsoïdales atténués au sommet, avec Conidies réunies en glomérules 	<p><i>Trichoderma sp</i> (Gr X 400)</p>		

Les caractères des sept 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*.

Aussi, les mêmes critères d'identification du genre *Geotrichum* ont été cités par Larone., (1995); Sutton et ses collaborateurs,(1998), ainsi que ceux du genre *Altarnaria* et *Emericella* décrits par Samson et son équipe,(1981) ; Guiraud., (1998) et Botton (1990), Les différents caractères présentés par la souche (I1) se rapprochent énormément à ceux correspondant au genre *Cladosporium* cité par Pritchard et ses collaborateurs,(1987) ; Sutton et son équipe,(1998) .

Enfin l'intérêt porté au genre *Trichoderma*, pour la faculté des souches fongiques appartenant à ce genre, à produire toute une variété de métabolites, 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).

La cellulose est probablement le matériel le plus abondant d'origine biologique sur la terre et , est une source principale d'énergie pour beaucoup de mycètes. Cependant, les résultats obtenus suite à la sélection des souches cellulolytiques, nous montrent que ces souches fongiques sont largement distribuées dans le domaine *Eucarya* des mycètes aérobies qui sont représentés parmi les subdivisions les plus cellulolytiques (Lynd *et al.*,2002).

Les Ascomycètes, les Basidiomycetes et les Deuteromycetes, contiennent un grand nombre d'espèces cellulolytiques (Carlile et Watkinson., 1997), qui ont subi un nombre d'études considérable en ce qui concerne leurs enzymes cellulolytiques, Les plus étudiés étant : *Aspergillus* (Kitamoto *et al.*,1996 ; Lokington *et al.*,1997 ; Riou *et al.*, 1998; Fujita *et al.*,2002), *Cladosporium*, *Geotrichum*., *penicillium*, et différentes espèces de *Trichoderma* (Wood *et al.*,1972 ; Petersson *et al* ., 1981 ; Neiss et Montenecourt, 1984 ; Mouranche et Costs ., 1985 ; Kubicek., 1998; Takashima, *et al.*, 1999 ; Nogawa, *et al.*, 2001), ce qui rejoint et confirme les résultats obtenus quant à la sélection des souches cellulolytiques. Cependant, d'autres souches sélectionnées tels que *Altarnaria* et *Emericella* sont moins connues pour leur activité cellulolytique même si ces souches ont été citées par certains chercheurs (Basil, 1984).

Les souches sélectionnées devront subir une deuxième sélection dont les conditions de fermentation seront soigneusement fixées, visant à récupérer l'extrait enzymatique, à le doser et en déterminer les caractéristiques. Cette étude constitue la deuxième partie de ce travail.

3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

2^{ème} PARTIE

PRODUCTION DE LA CELLULASE

1-Composition chimique des déchets de dattes

Le processus de fermentation est lié à la quantité des éléments entrant dans la composition du milieu de culture utilisé. Par conséquent, la détermination de la composition chimique des déchets de dattes (milieu de base pour la production de cellulase) est nécessaire.

Le tableau n°7 regroupe la composition du jus de dattes où la teneur en sucres totaux est très élevée (70%), nettement suffisante pour subvenir aux besoins des souches fongiques. En outre, le jus de dattes comparativement aux moûts et aux mûlasses de dattes, renferme des sucres fermentescibles notamment le glucose et le fructose (Acourène, 2001), directement assimilables par les souches fongiques, favorisant ainsi la production de biomasse et de métabolites.

Par ailleurs, le jus de dattes est relativement pauvre en protéines et en phosphore (3.50% et 0.30% respectivement). Ces quantités parviennent à couvrir 25% des besoins des souches fongiques (Botton *et al.*, 1999). Cependant, son pH est variable, 4.5 à 5.1, ce pH acide est favorable au développement adéquat des moisissures supportant des pH relativement acides (Davet, 1997).

Enfin, l'analyse des déchets de dattes (palmeraies de Biskra) permet de conclure que ces derniers peuvent constituer un milieu de fermentation de qualité pour la production de cellulase, en le supplémentant par :

- ü Une source azotée constituée par le sulfate d'ammonium et l'extrait de levure, permet de produire la cellulase, (Gokhale *et al.*, 1991) et d'équilibrer le rapport C/N indispensable à la croissance des moisissures (Barker *et al.*, 1981 ; Botton *et al.*, 1990).
- ü Un substrat, la cellulose à 0.5% en concentration optimale nécessaire à l'induction de la cellulase (Ghose et Sahai, 1997).

Tableau n°(7) : Composition chimique des principaux éléments des déchets de dattes

Déchets de dattes	Résultats en (%)
Matière sèche	81.5
Sucres totaux	70
Protéines	3.50
Azote total	0.56
Phosphore	0.30
pH	4.8
Matières grasses	0.54

2- Détermination de la souche cellulolytique la plus performante

Le milieu synthétique (voir annexe 6) utilisé pour la sélection de la souche la plus performante parmi les 10 souches préalablement sélectionnées, a permis de choisir la souche (R3) pour sa grande capacité cellulolytique. En effet, cette dernière possède une activité cellulolytique de 985 U ; elle est apparentée au genre *Trichoderma* (figure 8). Effectivement, le genre *Trichoderma* est connu parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques (Petersson *et al.*, 1981 ; Kubicek., 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).

Cependant, la souche (Q1) correspondant au genre *Geotrichum*, a une activité cellulolytique relativement importante de 756 U et produit une biomasse légèrement supérieure à celle de *Trichoderma* (75 g/L contre 68g/L) (Figure 8). Ce résultat explique que la production enzymatique n'est probablement pas liée à la production de biomasse. Par ailleurs, la souche K1, correspondant au genre *Emericella*, se caractérise par une activité cellulolytique faible (75 U), indiquant un pouvoir cellulolytique très réduit et peu reconnu à ce jour.

3- Détermination de la concentration optimale en déchets de dattes

Afin de maximiser l'activité cellulasique produite par *Trichoderma sp*, une gamme de, 0.5% à 5% en déchets de dattes est testée (figure 9).

La production de la cellulase est proportionnelle à la concentration en déchets de dattes. A une concentration de 1%, l'activité cellulasique est maximale et évaluée à 764 U. Au-delà de cette concentration l'activité cellulasique décroît lentement, puis brutalement à 3% de déchets de dattes. Ce constat peut être dû probablement à un excès en sucres qui réprime l'expression de la cellulase par leur condensation (Scriban, 1993).

Conclusion

Les déchets de dattes à 1% supplémenté par 0.5% de cellulose et 0.1% de sulfate d'ammonium et 0.5% d'extrait de levure, constituent un milieu de fermentation favorable à la production de cellulase par la souche *Trichoderma sp* isolée du sol de palmeraie de Biskra. Cependant, l'optimisation du milieu de production de l'enzyme nécessite une étude statistique plus poussée.

4- Etude cinétique

4-1- Evolution de la biomasse au cours de la fermentation

L'évolution cinétique de la biomasse au cours de la fermentation est représentée par la figure (10), où les quatre phases de croissance sont distinguées :

▼ *La phase de latence*

Qui dure environ 6- 8 heures. Elle correspond à la période d'adaptation de la moisissure à son environnement et la synthèse d'enzymes indispensables pour métaboliser les substrats présents dans le milieu. Au cours de cette phase, il n'y a pas de production cellulaire, la vitesse de croissance est pratiquement nulle.

A la phase de latence succède une seconde phase dite d'accélération, où la concentration en biomasse augmente significativement entre l'intervalle 8 - 16 heures. On assiste au démarrage de la croissance proprement dite avec une biomasse qui passe de 2.5 à 9.3 g/L.

▼ *La phase exponentielle*

A partir de la 16^{ème} heure, la vitesse de croissance est nettement accélérée. Le poids du mycélium sec atteint son maximum de 45.6 g/L au bout de 56 heures de fermentation.

▼ *La phase stationnaire*

De 58 à 74 heures, le mycélium entre en phase stationnaire qui correspond au niveau d'accumulation maximum de la biomasse avec une légère variation de 45 à 42 g/L. En effet, au cours de cette phase, les cellules conservent une activité métabolique mais leur structure biochimique change (Leclerc *et al.*, 1995 ; Leveau et Bouix, 1999).

▼ *La phase de déclin*

Durant cette dernière phase allant de 76 à 110 heures, la concentration des cellules viables diminue du fait de leur lyse causée par les conditions devenues défavorables dans le milieu (accumulation de produits d'excrétion métabolique, autolysines etc...)(Scriban, 1999). Cette phase est caractérisée par une diminution du poids sec du mycélium qui passe de 41 à 23g/L.

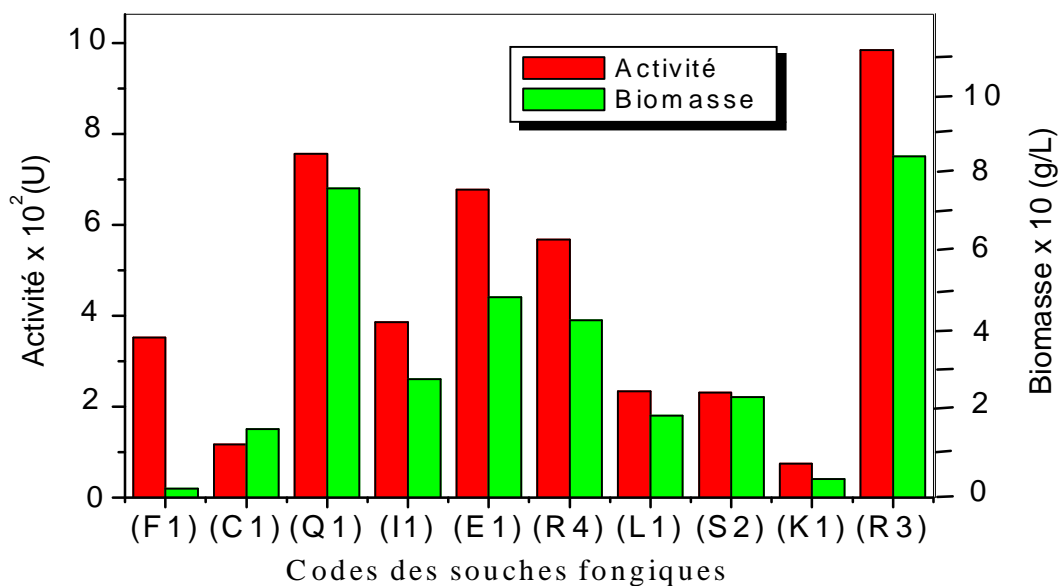


Figure (8) : Evaluation de l'activité cellulase et de la biomasse des 10 souches sélectionnées

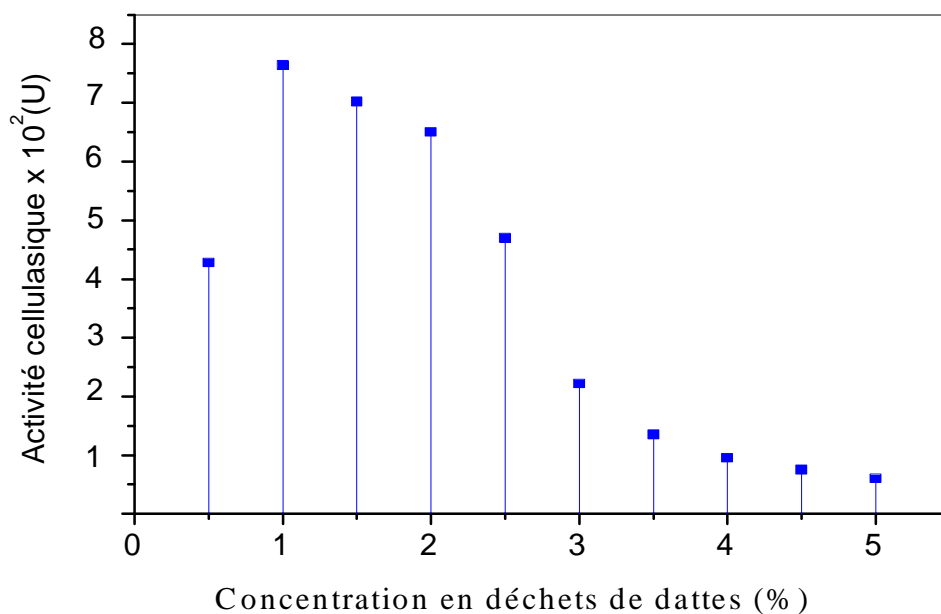


Figure (9) : Détermination de la concentration optimale en farine de dattes

4-2- Evolution de la production de cellulase

La figure (10) décrit la cinétique de production de la cellulase par *Trichoderma* sp.

La cellulase n'apparaît dans le milieu qu'après la 16^{ème} heure de fermentation avec une variation peu significative dans l'intervalle de 16 à 24 heures. Cette synthèse se poursuit de manière plus accélérée pour atteindre un maximum d'activité de 774.83 U au bout de 60 heures de fermentation. Ce maximum d'activité s'explique probablement par les changements morphologiques et physiologiques de la souche fongique influant la production de cellulase. En effet, la formation du mycélium secondaire de la souche *Trichoderma* (après 2 à 3 jours de fermentation) déclenchée par l'épuisement des substrats facilement assimilables, provoque une forte activité cellulolytique (Svetlana *et al.*, 1997).

Comparativement à d'autres études, le maximum d'activité cellulolytique est observé au cours de la phase d'accélération de la croissance : 40 heures pour la souche d'*Aspergillus niger* cultivée sur un milieu à base de lactosérum (Leghlimi, 2003), 96 heures de culture de *Thermomonospora fusca* sur milieu optimisé (Tuncer *et al.*, 1999) et 50 heures pour l'espèce *Clostridium cellulolyticum* cultivée sur un milieu synthétique (Desvaux *et al.*, 2000).

Par ailleurs, la diminution de l'activité cellulolytique commence dès la 68^{ème} heure de fermentation et elle se poursuit pour atteindre la valeur de 193 U après 100 heures de fermentation. Cette diminution est due certainement à l'épuisement du milieu en nutriments nécessaires à la croissance (Roméro *et al.*, 1999) d'une part à l'autolyse du mycélium suite à la libération des protéases (Leclerc *et al.*, 1995) d'autre part.

4-3- Evolution des glucides au cours de la fermentation

La consommation des glucides par la moisissure commence dès les premières heures de fermentation (fig10). Leur concentration varie de 14,4 à 3,74 g/L au bout de 72 heures d'incubation ce qui traduit une importante activité métabolique. Aux phases stationnaires et de déclin, la teneur en glucides varie peu (2,6 à 2,2 g/L) car les microorganismes ne les consomment plus.

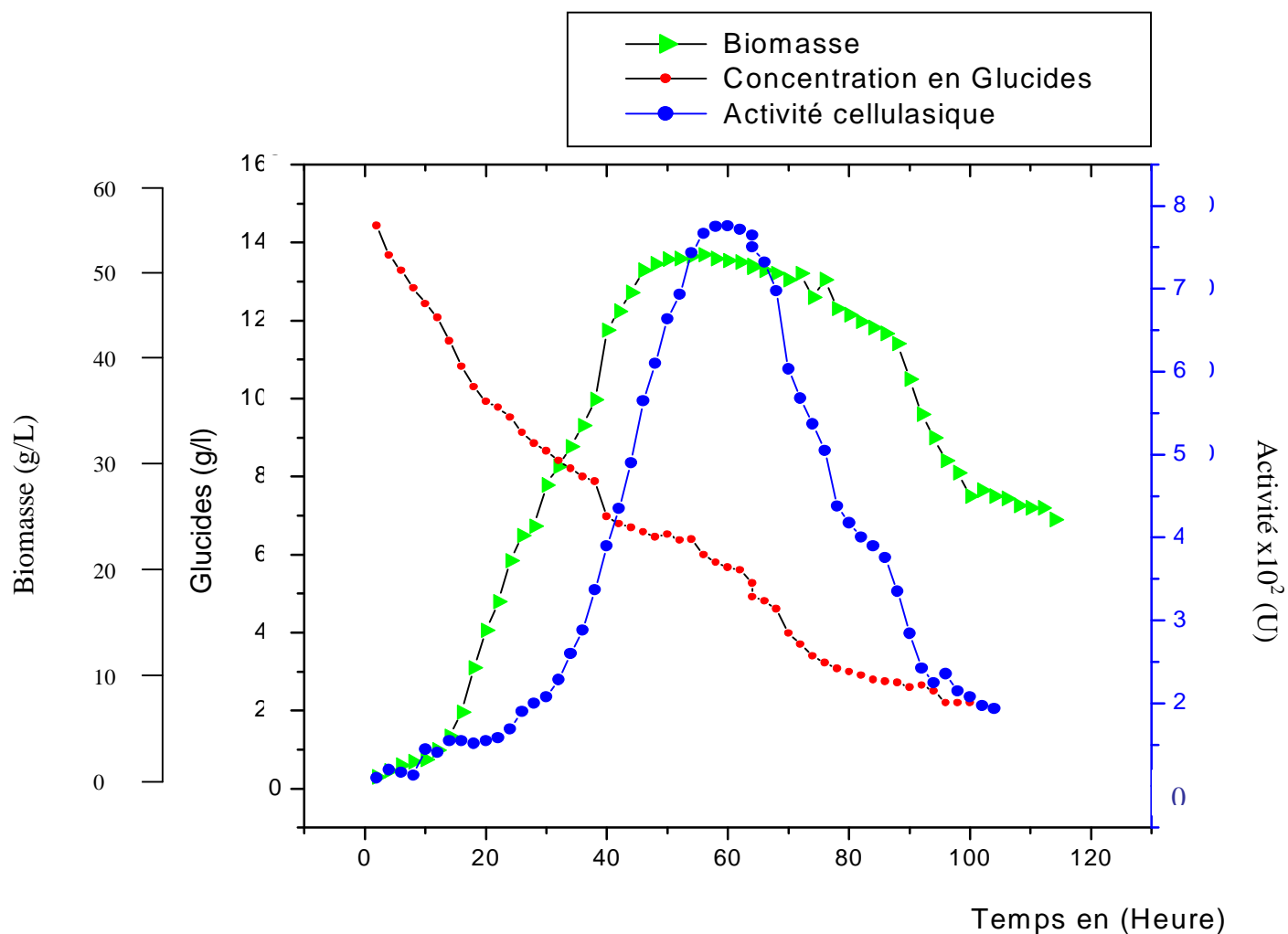


Figure (10) : Evolution cinétique de la croissance, la production de la cellulase et la consommation des glucides au cours de la fermentation de *Trichoderma sp* (Température 25°C, pH 5 , agitation 130 rpm, durée 3 jours) .

4-4- Evolution des protéines au cours de la fermentation

La concentration en protéines varie modérément au cours de la fermentation (fig11) : une légère diminution est observée dans l'intervalle 12- 24 heures correspondant à la consommation d'extrait de levure ajouté au milieu de base. Au bout de la 40^{ème} heure de fermentation, on assiste à une légère hausse de la concentration en protéines qui atteint la valeur de 3.8 g/L traduisant la synthèse protéique, entre autres les enzymes. Durant la phase de déclin, la concentration en protéines chute à 2.5 g/L suite à l'action protéolytique des protéases libérées au cours de la lyse cellulaire (Leclerc *et al.*, 1995 ; Roméro *et al.*, 1999).

4-5- Evolution du pH au cours de la fermentation

Le pH reste relativement stable durant les 1^{ères} heures de la fermentation : (variation de 4.8 à 5). Au bout de la 20^{ème} heure, on observe une diminution progressive qui se stabilise à 3.8 à la 64^{ème} heure de fermentation. Cette baisse est due à la libération d'acides organiques qui acidifient progressivement le milieu (Botton *et al.*, 1990). Le pH recommence à augmenter pour atteindre la valeur de 5.7. Cette remontée est due à la dégradation protéique et des acides aminés, qui libère de l'ammoniaque (Leclerc *et al.*, 1995) au bout de la 100^{ème} heure de fermentation.

5- Purification partielle de la cellulase par la précipitation au sulfate d'ammonium

Beaucoup de sels sont utilisés pour effectuer la précipitation des protéines (enzyme) par le salage. Cependant, le sulfate d'ammonium est le produit le plus largement répandu de part sa solubilité très élevée, son faible coût et son pouvoir non dénaturant vis à vis des enzymes (Nam Sun Wang., 2001)

A 40 % de sulfate d'ammonium, 78.4% de protéines sont précipités. Cette opération permet de purifier l'extrait enzymatique de 18 fois à une activité spécifique de 51 U/mg de protéines.

La purification en une seule étape (précipitation par le sulfate d'ammonium) a permis de purifier l'enzyme de 18 fois, valeur relativement élevée par rapport à des travaux qui ont purifié la cellulase de la même façon que nous : 5.69 (Bakare *et al.*, 2005), 1.2 (Po-jui *et al.*, 2004). Par ailleurs, nous observons une activité spécifique de 25 U/mg à 35 % de

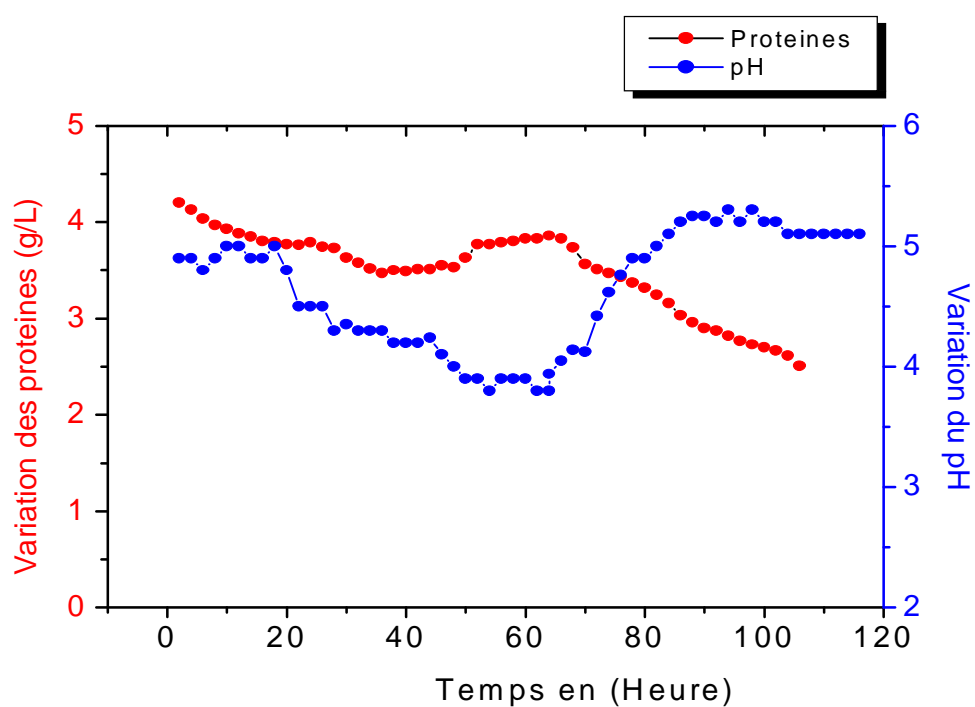


Figure (11) : Evolution cinétique des protéines et du pH au cours de la fermentation de *Trichoderma sp*

saturation par le sulfate d'ammonium, avec un rendement de 23 %. Ces résultats montrent clairement que la cellulase de *Trichoderma sp* existe sous forme d'isoenzyme.

La gamme utilisée pour la purification des cellulases par le sulfate d'ammonium est située entre 10 et 60 % (Po-Jui *et al.*, 2004). Elle varie d'une espèce à une autre : 50% de saturation pour *Trichoderma viride* (Ulger et Necdet, 2001), 50% également pour *Phanerochaete chrysosporium* (Gunnar *et al.*, 1999), 75 % pour *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Violot *et al.*, 2003) et jusqu'à 85% pour la cellulase produite par *Clostridium acetobutylicum* (López-Contreras *et al.*, 2004) et enfin jusqu'à 90 % pour celle produite par *Pseudomonas fluorescens*. (Bakare *et al.*, 2005). Ces résultats sont indicateurs d'une biodiversité de la cellulase.

Tableau(8): Bilan de la purification partielle de la cellulase de *Trichoderma sp*
(par le sulfate d'ammonium)

	Volume total (ml)	Activité totale (U)	Proteines (mg/ml)	Activité spécifique (U/mg pro)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	50	750	5.2	2.88	1	100
30%	10	83.79	0.63	13.3	4.61	11.17
35%	10	172.5	0.69	25	8.68	23
40%	10	571.10	1.12	50.99	17.70	76.61
45%	10	156.2	1.42	11	3.81	20.82
50%	10	----	0.12	----	----	----
60%	10	----	0.08	---	----	----
80%	10	----	0.24	----	----	----

6- Etude de la thermostabilité de la cellulase

L'étude de la stabilité thermique de la cellulase est testée à différentes températures : 60, 70, 80 et 90°C (figure 12).

Le figure (12) révèle que la cellulase produite par *Trichoderma sp* isolée du sol des palmeraies est très thermostable. En effet, les demis- vie à 60, 70, 80 et 90°C sont de 170, 140, 120 et 50 minutes respectivement. Cela exprime une importante résistance de la cellulase aux variations significatives de la température.

L'enzyme conserve, après un traitement à 90°C pendant 40 minutes, 50% de son activité, valeur largement au dessus des valeurs trouvées pour l'enzyme produite par d'autres souches fongiques : 50% de l'activité conservée pendant 10 minutes pour la souche d'*Aspergillus niger* ATTC 1644004 isolée de la région de Constantine (Leghlimi, 2004) ou encore 41.2 % d'activité conservée pendant 5 minutes pour la souche *Aspergillus niger* (Coral *et al.*, 2002). Par ailleurs, les cellulases bactériennes sont plus thermoresistantes que les cellulases fongiques. En effet, Ando et ses collaborateurs, (2002) décrivent une cellulase hyperthermostable produite par une Archeobactérie *Pyrococcus horikoshii* qui conserve 80% de son activité après 3 heures d'incubation à 97°C. 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) et de la cellulase animale de la Moule bleue *Mytilus edulis* qui résiste à 100°C pendant 10 minutes, au bout de 30 minutes, elle perd 50% de son activité (Xu *et al.*, 2000).

Cette thermostabilité s'explique très probablement par l'emplacement géothermique constituant le site d'isolement de la souche, car, ces Sebkhass thermophiles et halophiles favorisent le développement d'un système enzymatique assez résistant par un renforcement des liens peptidiques en structure secondaire ou des résidus aromatiques dans la structure tertiaire (Sandgren, 2004). Généralement, la thermostabilité des enzymes s'explique également par la présence de certaines liaisons dans leurs structures secondaires et tertiaires (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, interactions ioniques, liaisons avec métaux et ponts dissulfures) déterminée par des séquences particulières en acides aminés situés à des endroits stratégiques pour permettre aux enzymes de résister à la dénaturation thermique (Scriban, 1999). Par ailleurs, il a été démontré que la richesse en résidus cystéines et en glucides (glycosylation excessive) confère à la molécule enzymatique une grande intégrité structurale (Vielle et Zeikus, 2001) résistant à des températures élevées (Xu *et al.*, 2002). En effet, la thermostabilité est un des critères de sélection des enzymes destinées à la biotechnologie (Tuncer *et al.*, 1999).

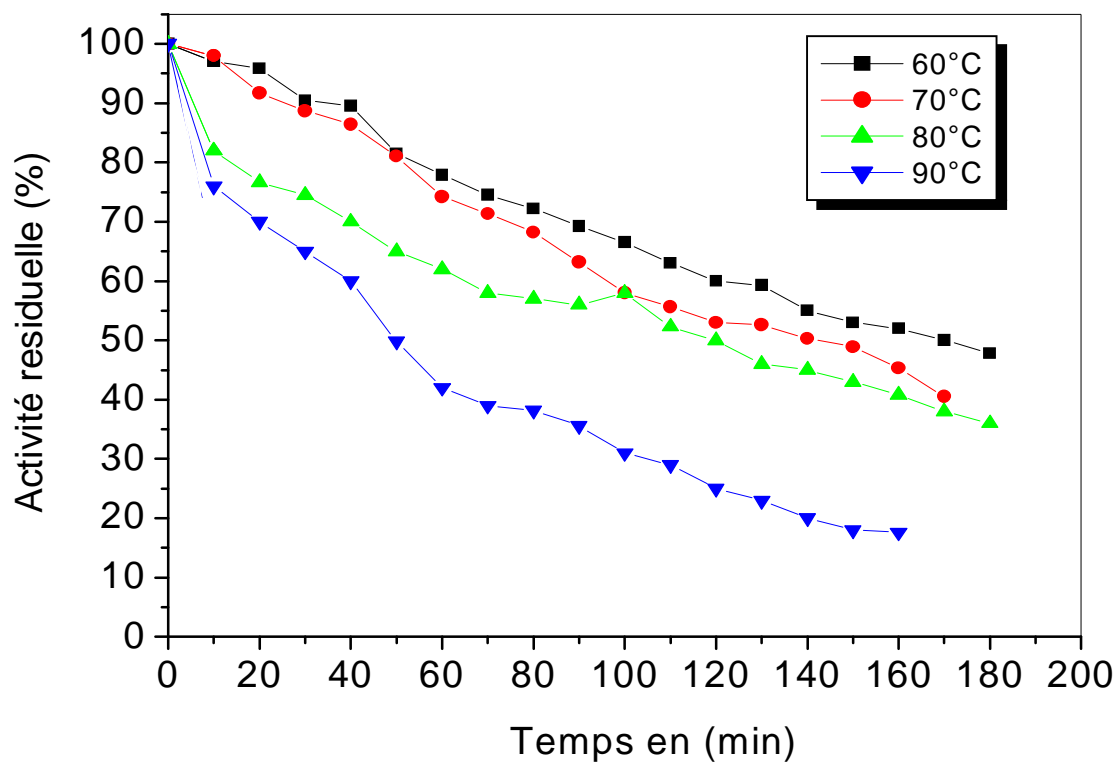


Figure 12 : Etude de la thermostabilité de la cellulase de *Trichoderma sp.* après des traitements thermiques

Notons que, les enzymes thermostables ont une grande importance industrielle, et elles peuvent remplacer des catalyseurs chimiques dans différents domaines industriels : pharmaceutiques, chimiques, textiles, agroalimentaires et papeteries utilisant des températures hautes dépassant les 60°C (Scriban, 1999).

7- Effet de la variation du pH sur l'activité cellulasique

La saccharification enzymatique de la cellulose cristalline à différentes valeurs du pH, s'étalant entre 2 et 8, est très significative (Loi de Fisher « ANOVA » voir annexe13)

En effet, la courbe de l'activité cellulolytique de la souche *Trichoderma sp* en fonction du pH a l'allure d'une cloche, indiquant une valeur maximale de 530.2 U à pH égal à 4.8 (figure 13) ; ce qui indique que la cellulase produite est relativement acide. En effet, la plupart des préparations cellulolytiques déjà étudiées, ont un pH optimum variant entre 3 et 7 (Lynd *et al.*, 2002). Cet aspect de la courbe traduit une variation de la charge du substrat qui modifie très probablement l'affinité et l'efficacité catalytique de l'enzyme. D'autres études révèlent que le pH optimal de la cellulase produite par *Trichoderma koningii* et celui de *Trichoderma reesei* est de 5.0 (Ortega *et al.*, 2001 ; Sandgren, 2004) .

Ces résultats corroborent ceux obtenus par Geeraerts et Vandamme, (1983) de Hadj-Taib et ses collaborateurs, (1992), de Gielkens et son équipe, (1999) de Saradouni et ses collaborateurs, (1999) ainsi que Domingues et son équipe de recherche, (2000) qui utilisent des pH situés entre 4.8 et 6 pour une activité cellulasique maximale des souches fongiques. Par ailleurs, la nature du substrat cellulosique intervenant dans la réaction modifie significativement la valeur du pH optimum de la cellulase. En effet l'utilisation de la cellulose cristalline révèle un pH optimal de la cellulase produite par *Trichoderma reesei* de 5 alors que la réaction entre la cellulase produite par la même souche et la CMC (cellulose microcristalline = amorphe) atteint son maximum à pH 4 impliquant la différence entre les systèmes cellulasiques mis en jeu (Sandgren, 2004).

8- Effet de la variation de la température sur l'activité cellulasique

Dans notre étude, l'activité cellulasique est relativement faible dans l'intervalle 10 – 30°C avec des valeurs variables entre 160 à 200 U. Elle atteint une valeur maximale de 521 U à une température de 55°C (Figure13). Cependant, l'activité cellulasique diminue lorsque la température dépasse les 55°C. Cette variation est très significative (Loi de Fisher « ANOVA » voir annexe14)

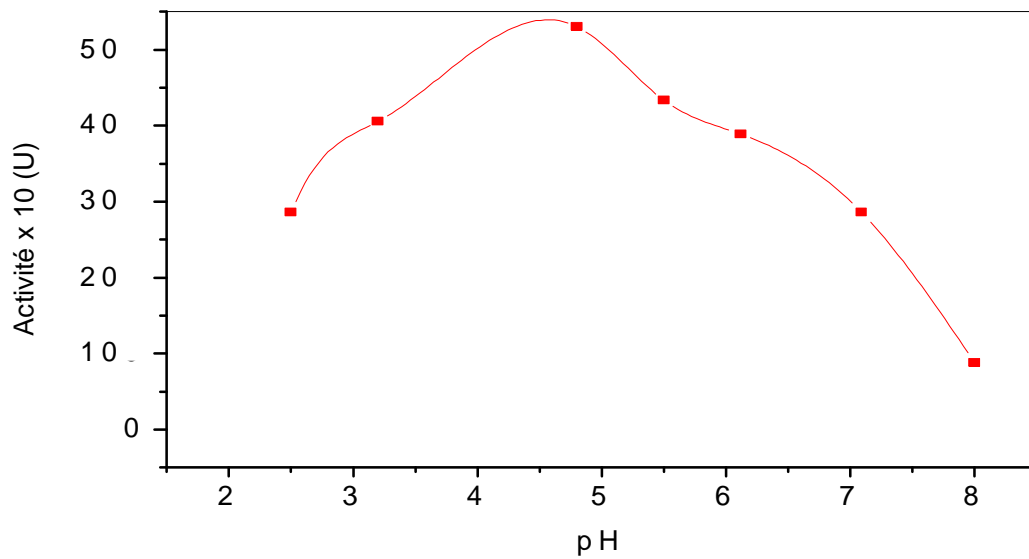


Figure 12 : Effet du pH sur la cellulase de *Trichoderma sp*

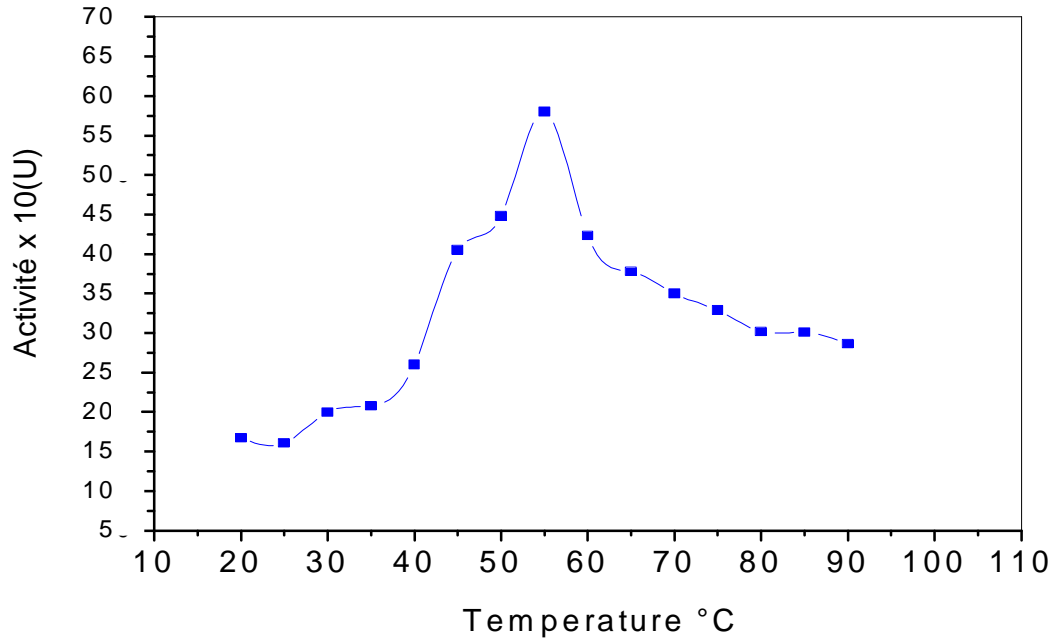


Figure 13 : Effet de la température sur la cellulase de *Trichoderma sp*

Par ailleurs, d'autres recherches révèlent que la température varie en fonction de l'origine de l'enzyme et de la nature du substrat mis en jeu.. 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). L'étude de Sandgren, (2004) a montré des températures optimales pour les cellulases produites par *Trichoderma koningii* et *Trichoderma Reesei* de 58°C et 54.4°C respectivement, alors que Ortega et ses collaborateurs, (2001) l'ont fixé entre 40 et 50°C pour la cellulase de *Trichoderma Reesei*. D'autres études ont trouvé une température optimale de 35°C pour d'autres espèces microbiennes: *Sinorhisobium fredii* (Po-Jui *et al.*, 2004) ou encore *Pseudomonas fluorescense* (Bakare, 2005).

Conclusion

Après précipitation au sulfate d'ammonium, la cellulase produite par *Trichoderma sp* s'est révélée très thermostable. Avec une température optimale de 55°C et un pH optimum de 4.8, ces caractéristiques sont très appréciées par les industriels, ce qui oriente l'usage de la cellulase produite à différentes applications industrielles.

Conclusion générale

L'objectif de notre travail consiste en l'isolement de souches fongiques à partir d'une région climatiquement aride (Sebkha et sol de palmeraies de la région de Biskra) et à la sélection d'une souche performante dans la production d'une cellulase thermostable.

Pour l'isolement, les examens macroscopiques et microscopiques approfondis des moisissures sélectionnées ont mis en évidence 10 souches réparties sur 7 genres différents: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Altarnaria*, *Cladosporium*, *Emericella* et *Trichoderma*.

Les 10 souches ont été cultivées sur un milieu à base de déchets de dattes dans le but d'un renouvellement énergétique qui permet, d'une part, de recycler les déchets de dattes et d'autre part, de produire une enzyme (cellulase) à forte valeur ajoutée à usage industrielle varié.

La production de la cellulase sur un milieu à base de déchets de dattes nécessite, dans un premier temps, une analyse chimique de ces déchets (substrat de fermentation). La composition chimique révèle un milieu riche en sucres (70%) mais déficient en azote (0.56% seulement) . Cette déficience peut être palliée par l'addition de sulfate d'ammonium et d'extrait de levure permettant de rétablir le rapport C/N à 20 suffisant pour une croissance adéquate des souches fongiques.

La souche (R3) isolée du Sol des palmeraies appartenant au genre *Trichoderma*, est la plus performante dont l'activité cellulolytique est évaluée à 775U. Cette souche est sélectionnée pour la production de l'extrait enzymatique.

Une évolution de la biomasse, de la cellulase, des glucides, des protéines et du pH a été étudiée. Le profil cinétique montre, qu'au bout de 56 heures de fermentation , la moisissure *Trichoderma* produit un maximum de biomasse (45.6 g/L) alors que l'activité cellulasiq ue atteint un maximum de 775U au bout de 60 heures de fermentation traduisant une dissociation partielle des deux réponses.

L'extrait enzymatique a subi une purification de 17.70 avec 40 % de saturation en sulfate d'ammonium. L'activité spécifique est de 50.99 avec un rendement de 76.71. Les valeurs de pH et de température maximum correspondent respectivement à 4.8 et 55°C.

L'étude de la thermostabilité de l'enzyme révèle une forte résistance aux hautes températures au cours du temps. Les demis-vie à 60, 70, 80 et 90°C sont de 170, 140, 120 et 50 minutes respectivement. Ces records de thermostabilité permettent l'utilisation industrielle de l'enzyme.

Enfin, ces résultats ouvrent d'autres perspectives qui consistent à :

- ✓ Optimiser le milieu de production pour un meilleur rendement.
- ✓ Immobiliser l'enzyme pour augmenter davantage sa stabilité thermique.
- ✓ Purifier l'enzyme s'il est destiné à un usage alimentaire ou pharmaceutique.

Résumé

L'étude microscopique des moisissures isolées des sebkhas et des palmeraies de la région de Biskra a permis, d'identifier 7 genres différents, parmi les 10 souches potentiellement cellulolytiques : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Altarnaria*, *Cladosporium*, *Emericella* et *Trichoderma*.

La fermentation, des déchets de dattes (sous - produit de l'industrie du secteur phoenicicol) par les 10 souches sélectionnées, a permis de choisir une souche hypercellulolytique (R3) ayant une activité cellulasique de 775 U et correspondant au genre *Trichoderma*. La cinétique de production de la biomasse et de l'activité cellulasique a été entreprise. Cette étude révèle que la synthèse de l'enzyme atteint son maximum à 60 heures de fermentation (à la phase stationnaire de la croissance) alors que la biomasse arrive à 45.6 g/l à la 56^{ème} heure d'incubation.

Par ailleurs, une purification partielle (à 40 % de saturation par le sulfate d'ammonium) a réduit la teneur en protéines totales de 78.4 % et a augmenté l'activité spécifique de 94.35 %. Ce traitement par le sel permet d'avoir un degré de purification de 17.70, enrichissement appréciable. Le traitement thermique de l'enzyme a révélé que la cellulase de *Trichoderma sp* est thermostable car les demi-vies à 60, 70, 80 et 90°C sont respectivement de 170, 140, 120 et 50 minutes. La température correspondant à l'activité maximale est de 55°C alors que le pH optimum est de 4.8. Ces caractéristiques (thermostabilité, pH acide) sont très appréciées par les industriels.

Mots clés

Isolement, identification, milieux extrêmes, moisissures, déchets de dattes, cellulase, thermostabilité.

Abstract

The microscopic study of the moulds isolated from Sebkhass of Biskra area allowed, to identify 7 different kinds from 10 potentially cellulolytic strains: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Altarnaria*, *Cladosporium*, *Altarnaria* and *Trichoderma*.

The fermentation of the 10 strains selected and cultivated on a medium containing date scrap (under product of pheonical industry) as a substrate of fermentation, allowed to select hypercellulolytic strains with a cellulasic activity of 775 U. The strain (R3), isolated from the ground soil of palm plantations of Biskra corresponds to the *Trichoderma* kind. This train is retained for the kinetic study of the biomass, the cellulasic activity, sugar, proteins like that of the pH. This study reveals that the synthesis of the enzyme reaches its maximum after 60 hours of fermentation during the stationary phase of the growth.

A partial purification with ammonia sulphate 40 % of saturation reduced the content of proteins of 78.4 % and increased the specific activity to 94.35 % which reached the degree of purification to 17.70. The enzyme was found very thermostable with a half-life of 170 , 140, 120 and 50 munites at 60, 70, 80 and 90°C respectively. The corresponding temperature for the maximum cellulolytic activity was 55°C whereas the optimim pH was 4.8.

Key words:

Isolation, identification, extreme medium, fungi , date scrap, cellulase, thermostability.

Abréviations

AG: Agar Blanc

PDA : Potato Dextrose Agar

MEA: Malt Extract Agar

Gr : Grossissement

sp : espèce

ppm : Partie par millier

rpm : Rotation par minute

C/N : Rapport Carbone/Azote

Aw : Activité de l'eau

ANOVA : Analyse de la variance

R : Coefficient de corrélation

atm : atmosphère

ملخص

الدراسة الميكروسكوبية للفطريات المعزولة من سبحة و تربة منطقة بسكرة أسفرت على تعريف سبع أجناس مختلفة من بين 10 الفطريات المختارة لقدرتها على إنتاج إنزيم السيلولاز و هي: *Aspergillus, Penicillium, Geotrichum, Altarnaria, Cladosporium, Emericella et Trichoderma*.
تنمية الفطريات المختارة في بيئة تركيبية بها بقايا التمور كمصدر مخدي و طاقي سمحت باختيار الفطر الأكثر إنتاجا بقيمة عضمي للنشاط الإنزيمي مقدرة ب 778.83 وحدة . العزلة R3 معزولة من تربة واحة النخيل توافق الجنس *Trichoderma* الذي أختيرت لمتابعة دراسة حركة إنتاج الكتلة ، الإنزيم ، تفكيك السكريات و البروتينات و كذا تغيرات ال pH

هذه الدراسة أدهرت أن إنتاج الأنزيم بلغ أقصاه أثناء الفترة المستقرة من نمو الفطر أي خلال نهاية الساعة 60 من التخمر زيادة على هذا التطهير الجزئي للأنزيم ، بلاستعمال الترصيب ب sulfate d'ammonium سمح بتطهير الأنزيم بدرجة 17.70 مما زاد الإنتاج الخاص ب 94.35 % وأنقص تركيز البروتين ب 78.8 % .
السيلولاز ظهرت جد مقاومة لدرجات الحرارة العليا حيث قدرت مدة نصف حياتها ب 170 ، 140 ، 120 و 45 دقيقة توافقا مع درجات الحرارة 60 ، 70 ، 80 و 90 درجة مئوية .
قدرت درجة الحرارة المثلى الموافقة للإنتاج أقصى للأنزيم ب 55 درجة مئوية أما ال pH الأمثل فقدر ب 4.8 .

الكلمات المفتاحية: عزل، تعريف، وسط اقصى، بقايا التمور، سلولاز، مقاومة الحرارة .

Références bibliographiques

- Abou-zeid A.A., Khoja S.M.(1993).** Utilisation of Date in the Fermentative Formation of Citric Acid by *Yarrowia Lipolytica*. *Zentrabl. Microbiol*, 148, p:213-221.
- Acourè S., Tama M.(2001).** Utilisation des Dattes de Faible Valeur Marchande (Rebuts de Deglet-Nour, Tunisie et Tantboucht) Comme Substrat pour la Fabrication de la Levure Boulangère. Station I.N.R.A.A, Touggourt. Rev. p :1-10.. *Energ. Ren.: Production et valorisation Biomasse*.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M.(1996).** *Introductory Mycology* (4 th Ed). p:868. New York, USA.
- Ando S., Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K. (2002).** Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1) p:430-433.
- Anonyme, (2003).** Données chiffrées N°4, les palmiers dattiers en Algérie, sous direction des statistiques agricoles, Ministère de l'agriculture et du développement rural. (Algérie)
- Audigie C.L., Fagerella J., Zonszain F.(1984).** Manipulation d'analyse biochimique. p : 270. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
- Aylward J.H., Gobius K.S., Xue G.P., Simpson G.D., Dalrymple B.P. (1999).** The Neocallimastix patricirum cellulase, Cel D, contain three almost identical catalytic domains with high specific activities on Avicel. *Enzyme and Microbial Technology*. 24 p: 609-614.
- Bakare M.K., Adewale I.O., Ajayi A., Shonukan O.O.(2005).** Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*. 4 (9), p: 898-904.
- Barnett C.C., Berka R.M., Fowler T. (1991).** Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technology*. 9 p: 562-567.
- Barnoud F.(1980).** La cellulose dans « les polymères végétaux », J ed par Monties, publication Gauthier-Villars. Paris. p : 66-68.
- 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.
- Basil J. M.(1984).** Production and Characterization of Cellulase and β -Glucosidase of *Alternaria alternata*. Department of Biology, Nuclear Research Center "Demokritos," Aghia Paraskevi, Attiki, Greece. *Appl Environ Microbiol*. March; 47(3).p: 560-565.
- Baumgartner J.G. (1949).** Canned foods : an introduction to their microbiology, ed 278. J and A. Churchill LTD London.
- Béguin P. (1990).** Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol*. 44 p: 219-248.
- Béguin P., Aubert J.P. (1994).** The biological degradation of cellulose, *FEMS, Microbiol. Rev.* 13 p: 25-58.
- Bekhouche F.(1991).** Recherche de champignons cellulolytiques du sol des zone arides du Sahara algérien. Etude comparée des cellulases de *Lasiobolidium Orbiculoides* et *Aspergillus Terreus*. Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire. Costantine.
- Beldman G., Searle-Van Leewen M.F., Rombouts F.M., Voorzangen F.G.J.(1985).** The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparaison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. *Eur. J. Biochem*. 146. p: 301-308.
- Bessah R, Touzi A.(2001).** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (P.O.U) à partir des déchets de dattes. Laboratoire Biomasse, Centre de Développement des Energies Renouvelables, B.P.62, Route de L'observatoire, Bouzaréah. Alger. *Rev. Energ. Ren.: Production et valorisation –Biomasse*, p : 37-40.

- Betts W.B., Dart R.K., Ball A.S., Pedlar S.L. (1992).** Biosynthesis and structure of lignocellulose. In: Biodegradation, natural and synthetic materials, Betts W.B, editor. London: Springer- Verlag. . p :139-156.
- Biely P. (1985).** Microbial xylanolytic systems. Trends. Biotechnol. 3. p: 286-290.
- Birsan, C., Johnson P., Joshi M., MacLeod A., McIntosh L., Monem V., Nitz M., Rose D. R., Tull D., Wakarchuck W. W., Wang Q., Warren R. A. J., White A., and Withers S. G.. (1998).** Mechanisms of cellulases and xylanases. Biochem. Soc. Trans. 26.p:156-160.
- Bisaria., V.S., Ghose, S.N.(1960).** Biodegradation of cellulosic materials, substrates microorganisms, enzymes and production enzymes, Microb. Technol. 3, p: 90-104.
- Blume J.E., Ennis H.L. (1991).** A dictistelium dicoideum cellulose is a member of a spore germination-specefic gene family.J. Biol.Chem.266 (23). p:15432-15437.
- Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan.p:13-69.
- Boisset C., Petrequin C., Chanzy H., Henrissat B., Schulein M. (2001).** Optimized mixtures of recombinant Humicola isolens cellulases for the biodegradation of cristalline cellulose. Biotechnol. Bioeng. 72 (3).p: 339-345.
- Bok J.D., Yrnool D.A., Eveleigh D.E. (1998).** Purification, characterisation and molecular analysis of thermostable cellulases Cel A and Cel B from Termotoga neapolitana. Applied and Environmental Microbiology: 64 (12). p: 4774-4781.
- Bond, K., and Stutzenberger F. (1989).** A note on the localization of cellulosome formation in Thermomonospora curvata. J. Appl. Bacteriol. 67. p :605-609.
- Boraston A., Bary M., Bru E., Creagh A.L., Gilkes N., Guarna M., Jervis E., Johanson P., Kormos J., Me Intosh L., Me Lean B., Sandercock L., Tomme P., Haynes C., Warren A., Kilburn D.(1998).** The structure and function of cellulose binding domains.In: Claeysens M., Nerinckse W., Piens K, editors, carbohydrases from Trichoderma reesei and other microorganisms: structure, biochemistry, genetics and applications. The royal Society of Chemistry. p: 139-146.
- 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.
- Bouchet P.H., Giraud J.L., and Vihard J.(1999).** Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. Masson (ed). p : 5-10.
- Boudjlal A., Nancib N.(2001).** Production d'acide lactique par Lactobacillus Rhamnosus sur Milieu à Base de Jus de Dattes. Département de biochimie. Université Badji Mokhtar, B.P.12. Sidi Amar, Annaba, Université Ferhat Abbas, Sétif. Rev. Energ. Ren.: Production et valorisation –Biomasse, p :41-46.
- Brissou J. (1971).** Technique d'enzymologie bactérienne.. Edition Masson et CIE , Paris. p :94.
- Buchholz K. Rapp P., Zadrazil F. (1983).** Methods of enzymatic analysis. Volume II.. Edition Bergmaeyer, H.U. Verlag Chemie, Weinheim. p: 178-180.
- Busto, M.D., Ortega, N. and Perez-Mateos, M.(1996).** Location, kinetics and stability of cellulases induced in Trichoderma reesei cultures. Bioresource Technology 57,p: 187–192.
- Carlile, M. J., and Watkinson S. C. (1997).** The fungi, p:269-275. Academic Press, New York, N.Y.
- Cavaco-Paulo A. (1998).** Processing textile fibers with enzymes. In : Erikson K.E., Cvaco-Paulo A., editors. Enzyme application in fiber processing. ACS. Symp. Ser. 687.p :180-189.
- Chen C.M., Gritzali M., Stafford D.W.(1987).** Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II frpm Trichoderma reesei. Bio/Technology.5 p:274-278.
- Collier L., Balows A., and Sussman M. (1998).** Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9, (4). Arnold, London, Sydney, Auckland, New York.

- Coral G., Arikan B., Unaldi M.N., Guvenmenz H. (2002).** Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-type strain. *Turk.J. Biol.* 26. p: 209-213.
- Cordonnier R.E., Bayonone C.L., Baumes R.L. (1986).** Données récentes sur les précurseurs d'arômes du raisin, perspectives de leurs exploitations en vinification. *Rev. Fr. Oenol.* 102.p :29-41.
- Dan S., Marton I., Dekel M., Bravdo B.A., He S., Withers S.G., Shoseyov O. (2000).** Cloning, expression, characterisation and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J.Biol.Chem.* 275(7).p: 4973-4980.
- Davet R.(1997).** La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker, Inc., New York.
- De Hoog G. S., Guarro J., Gene J., and Figueras M. J.. (2000).** Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Decker S.R., Adney W.S., Jennings E., Vinzant T.B., Himmel M.E. (2003).** Automated Filter Paper Assay for Determination of Cellulase Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Spring, Volume 107, p: 689-704.
- Demain A.L.(2000).** Microbiol Biotechnology (feature). *Trends in biotechnology.* 18(1), p: 26-31.
- Desveaux M., Guedon E., Petit Demang H.(2000).** Cellulose catabolism by *clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium .*Appl. Environ. Microbiol.*66(6). P:2461-2470.
- Din N., Damude H. G., Gilkes N. R., Miller R. C., Warren R. A. J., and Kilburn D. G.(1994).** C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, p: 1083-11387.
- Din N., Jilkes N., Tekant B., Miller R., Warren A., Kilburn D., (1991).** Non hydrolytic disruption of cellulose fibers by the binding of a bacterial cellulase . *Bio/Technology.* 9,p: 1096-1099.
- Dixon D. M., and Polak-Wyss A.. (1991).** The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycoses.* 34. p:1-18.
- Domingues F.C., Queiroz J.A., Warren A., Kilburn D. (2000).** Non hydrolytic distribution of cellulose fibers by binding domain of a bacterial cellulase. *Bio/Technology.*9, p: 1096-1099.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F.(1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, p: 350-356.
- Eriksson K.E., Petersson G.(1968).** Studies on cellulolytic enzymes. *Archi Biochem Biophys,* 124, p: 160-166.
- Eriksson, K. E. L., Blanchette R. A., and Ander P. (1990).** Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Evans D.A., Bravo J.E. (1983).** Plant protoplast isolation and culture. *Int.Rev.Cyt.Supl.*16, p :33-53.
- Evans H.C. (1971).** Thermophilous fungi of spoil tips. *Trans Br Mycol Soc,* 57(2). p:267-277.
- Fields, M. W., Russell J. B., and Wilson D. B.. (1998).** The role of ruminal carboxymethylcellulases in the degradation of β -glucans from cereal grain. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27. p:261-268.
- 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). p: 5136-5141.
- Gebler J., Gilkers N.R., Claeysens M., Wilson D.B., Beguin P., Wakarchuk**

- W.W.(1992).** Stereoselective hydrolysis catalyzed by related bet-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases. *J.Biol.Chem.*267. p:12559-12561.
- Geeraerts H.A.M., Vandamme E.J. (1983).** Cellulolytic properties of *Chaetomium crispatum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*33 p:107-113.
- Ghose TK, Sahai V.(1997).**Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous-flow culture with cell recycle. *Biotechnol Bioeng*; 21(2).p:283-96.
- Gielkens M.M.C., Dekkers E., Visser J., De Graf L.H.(1999).** Two cellobiohydrolases encoding genes from *Aspergillus niger* require D- xylose and D- xylanolytic transcriptional activator Xln R for their expression . *Appl. Environ. Microbiol.* 65. p :4340-4345.
- Giraud J.(1998).***Microbiologie alimentaire* .p 8-101.Edition Donod, Paris.
- Gokhale D.V., Patil S.G., Bastawde K.B.(1991).** Optimisation of cellulase production by *Aspergillus niger* N. p: 1207.
- Gonzalez M.P., Siso M.I.G., Murado M.A., Pastrana L., Montemayor M.I., Miron J.(1992).** Depuration and valuation of mussel-processing wastes. Characterisation of amylolytique postincubates from different species grown on an effluent. *Bioresource technology.*42, p: 133-140.
- Griffin, D. H.(1994).** *Fungal Physiology.* 2nd. Wiley-Liss, New York.
- Gunata Y.Z., Bayonove C.L., Arnaud A., Galzy P. (1990).** Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molishiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases.*J.Sci. Food Agric*, 50. p: 499-509.
- Gunnar H., Anu N., Hongbin H., Bert P., Ståhlberg J., Johansson and Pettersson G.(1999).** Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase .*Eur. J. Biochem.* 259, p: 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 fundamentals and applications.*
- Hadj-Taieb N., Chaabouni-Ellouz S., Kammoun A., Ellouz R.(1992).** Hydrolytic efficiency of *Penicillium accitanis* cellulase : kinetic aspects.*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37 p: 197-201.
- Halliwell G., Halliwell N.(1989).** *Biochim Biophys. Acta*, 992, p: 223-229.
- Hamon M., Pellin F., Guenet M., Maauzier G.(1990).** *Abrégés chimie analytique. Méthodes spectrales et analyse organique.*Tome 3. 2eme édition. Masson. Paris. p:232-233.
- Hart H.E., Parish M.E., Burns J.K., Wicker L. (1991).** Orange finisher pulp as substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *Journal of food science.*56 (2). p:408-483.
- 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). p: 1556-1560.
- Hawksworth D. L. (1991).** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95 p:641-655.
- Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C., and Pegler D. N. (1995).** *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi.*CAB International, Wallingford, United Kingdom. 8,p: 616.
- Hebraud M. (1988).** Production et caractérisation des hydrolases secrétées par les champignons anaérobies du rumen .Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon1.
- Hee D.B., Tim A., Yanke J., Cheng K.J. and 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). P: 2132-2138.
- Henrissat B., Bairoch A.(1996).** Up dating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J.*316, p: 695-696.

- Hibbett D. S., and Binder M.(2001).** Evolution of marine mushrooms. *Biol. Bull.* 201, p :319-322.
- Ingold C.T. (1991).** A view of the active basidium in heterobasidiomycetes. *Mycol. Res.* 95. p: 618-621.
- Issac S., Frankland J.C., Watling R., Whalley A.J.S.(1993).** *Airworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (8 th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. p:616.
- John W. B, Michael E. H, Linghao .Z, Michael F. C, and Mark R. N.(2005).** Towards Understanding the Action of Cellulases: Molecular Dynamics Simulation of T. reesei Cellobiohydrolase I and Crystalline Cellulose. Department of Food Science.
- Joyeaux A. (1982).** Les préparations industrielles d'enzymes. p :22-46. In: Durant G., Monsan. (ed.), *Les enzymes production et utilisations industrielles.* Edition Gautier-Villars.Paris.
- Kacem Chaouche N.E.(2005).** Production de catalase extracellulaire par un mutant d'Aspergillus phoenicis sur un milieu à base de farine de dattes déclassées. Université Mentouri Constantine.
- Kiesov A.A.(1982).** Enzymatic hydrolysis of cellulose,5. Cellulase complexes in marine organisms from the sea of Japan.*Bioorgan. Khim.* 8. p: 1490-1496.
- Kitamoto N., Go M., Shibayama T., Kito Y., Ohmiya K., Tsukagoshi N., (1996).** Molecular cloning, purification and characterisation of two endo-1,4- β -glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN 616.*Appl.Microbiol.Biotrechnol.*46.p: 538-544.
- Kohler D.E., Leonard R.T., Vanderwoude W., Linkins A.E., Lewis L.N.(1976).** *Plant Physiol*, 58 (324).
- Kolarova N., Farkas V.(1981).** Sensitivity of various yeasts to crude cellulolytic enzyme complexes from *Trichoderma reesei* .*Euro.J.Appl. Micrbiol. Biotechnol.* 13. p: 184-187.
- Kubicek C. P., and 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.
- Kubicek C.P. (1981).** Release of carboxymethyl-cellulase and β -glucanases from cell walls of *Trichoderma reesei*.*European.J.Appl .Microbiol.Biotrechnol* .13.p: 226-291.
- Kubicek C.P., Messner R., Gruber F., Mach R.L. Kubicek Pranz E.M.(1993).** The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle : from the interior life of a secretory fungus . *Enzyme Micro. Technol.* 15.p: 90-99.
- Lachke A.H, Despande M.V.(1988).** *FEMS Microbiol. Rev*, 45, p: 177-194.
- Larone, D. H. (1995).** *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Leclerc H., Gaillard J.L., Simonet M. (1995).** *Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien.*p :119-133-134-194. Edition Doin, Paris.
- Lecoq R.(1965).** *Manuel d'analyse alimentaire et d'expertises usuelles.* p :200-203-569-10604-1613. Tome 1. Edition Doin. Deren et Cie.
- Leghlimi H.(2004).** Optimisation de la production de la cellulase d'Aspergillus niger ATCC16404 cultivé sur un milieu à base de lactosérum: étude comparative entre *Aspergillus niger* ATCC 16404 et *Aspergillus niger* O.Z isolée localement. Université Mentouri Constantine.
- 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.
- Lin J.S., Tang M.Y., Fellers J.F. (1987).** Fractal analysis of cotton cellulose as characterized by small-angle X-ray scattering.*ACS.Symp.Ser.*340.p: 233-254.
- Linker M., Teeri T.(1996).** The cellulose binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversionability and a high exchange rate on crystalline cellulose.

Proc.Nat. Acad. Sci. 93.p: 12251-12255.

Lokington R.A., Kelly J.M. (1997). Direct conversion of cellulose to ethanol by engineered filamentous fungi. *Environmental. Biotechnology.* 7 (6). p : 363-368.

López-Contreras A. M., Gabor K., Aernout A. M., Bernadet A. M., Piernel A. M., van der Oost J., and De Vos W. M.(2004). Substrate-Induced Production and Secretion of Cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol.* 70(9). p: 5238–5243.

Lowry O.H., Rosebroughi N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1965). Proteine measurement with the folin phenol reagent.p:215.In: *Methodes d'analyse biochimiques.* Edition Gautier Villard. Paris.

Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W.H., and Pretorius I. S.(2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 66 (3), p: 506-577.

Maclachlan G.(1988). *Methods Enzymol,* 160, p : 382-391.

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., Andreotti R., Roche C.(1976). Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol.Bioeng.Sump.*6. p: 21-33.

Marchall J.J.(1973). Preliminary report on the digestive enzymes present in the digestive gland of *Perna viridis*. *Comp.Biochem.Physiol.B.*44. p :981-988.

Mats E.K., Eriksson K.E. (1980). Utilisation of the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* for water purification and protein production on mixed lignocellulosic. waste waters. *Biotech Bioeng,* 22. p : 273-284.

Maurer K.(1997). Developpement of new cellulases. In : *EeJE, Misset O., Baas E.J., editors . Enzymes in detergency . Surfactant science series.* 69. p: 175-202.

McLaughlin, D.M., Beckett, A. and Yoon, K.S. (1985). Ultrastructure and evolution of ballistosporic basidiospores. *Bot. J. Linnean Soc.* 9. p: 253-271.

Météo France.(2003). *Statistiques : Biskra (Algérie)*

Mouranche A., Costes C. (1985). *Hydrolases et dépolymérasés enzymes d'intérêt industriel.* Gauthier- Villars (ed.).

Nam Sun Wang.(2003) . Enzyme purification by salt precipitation (Ammonia Sulfate). Department of chemical engineering. University of Maryland .Park Of University.

Neiss S., Montenecourt B.C. (1984). Characterisation of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. *Appl Microbiol Biotech,* 20. p: 46-53.

Nevalainen K.M.H., Palva E.J.(1978). Production of extracellular enzymes in mutant isolated from *Trichoderma viride* unable to hydrolyse cellulose. *Appl Envir Microbiol,* 33, p: 11-16.

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R.(2000). *L'essentiel en microbiologie..* Edition Berti. p :210-216.

Nilsson T. (1973). Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. *Studia for Sued,* 104. p: 5- 40.

Nishio N., Nagai S.(1981). Single cell protein production from mandarin orange peel. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*1.p: 156-160.

Nogawa, M., Goto M., Okada H., and Morikawa Y. (2001). L-Sorbose induces cellulase gene trancription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 38. p:329-334.

Odier E., Rouau X.(1985). Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine.p :199-214. . Edition Gauthier-Villard, Paris.

Okada G.(1976). *J. Biochem,* 80,p: 913-922.

Ooshima H., Burns D. S., and Converse A. O. (1990). Adsorption of cellulase from

Trichoderma reesei on cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. *Biotechnol. Bioeng.* 36. p:446-452.

Ortega N., Busto M. D and Perez-Mateos M.(2001). Kinetics of cellulose saccharification by Trichoderma reesei cellulases . Elsevier Science B.V. Department of Biotechnology and Food Science, University of Burgos, Plaza de Misael Bañuelos, s/n. 09001 Burgos, Spain.

Peiterson N., Anderson B.(1978). Fermentation of barley straw by Trichoderma viride: Recovery and nutritive value of the fermentation product. *Aiche. Symposium. Series.* 74 (172). p:100-104.

Pentilla M.E., Andre E.L., Saloheimo M., Lehtovaara P., Knowles J.K. (1987). Expression of two Trichoderma reesei endo-glucanases in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Yeast.*3 p: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.

Pierre .B, Jean-Paul .A.(1992). Cellulases. *Encyclopedia of microbiology* . Rockefeller University New York. Academic press inc.

Pochon J., Tradieux P.(1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la tourelle, St Mandré. p :110-111.

Po-Jui C., Tao-Chun W., Yao-Tsung C., and Liang-Ping L.(2004). Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from Sinorhizobium fredii.

Pritchard, R. C., and Muir D. B.. (1987). Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five year period in a reference laboratory. *Pathology.* 19. p:281-4.

Purchon R.D.(1977).The biology of the mollusca, 2 nd ed. Pergamon Press, Oxford.

Raimbault M.(1983). Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. p:1-42. O.R.S.T.O.M.-Paris.

Rapp, P., and Beerman A. (1991). Bacterial cellulases. p: 535-595. In C. H. Haigler and P. J. Weimer (ed.), *Biosynthesis and biodegradation of cellulose.* Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Rebeyrotte P., Dupin F., Jayle M.F.(1976). Contribution à l'étude d'une cellulose extraite du suc digestif d'Helix pomatia. *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris.* 49. p : 1247-1256.

Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002). Dimension, shape, and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry.* 277 (43). p: 40887-40892.

Reese, E. T., Sui R. G. H., and Levinson H. S.. (1950). The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59.p:485-497.

Reinikainen T.(1994). The cellulose binding domaine of cellobiohydrolase I of Trichoderma reesei . Espoo, Finland : VTT Publications 206. Ph .D. Thesis .

Riccio P., Rossano R., Vinella M., Domizio P., Zito F., Sansevrino F., D'elis A., Rosi I.(1999).Extraction and immobilisation in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of Debaryomyces hanseni .*Enzyme and Microbiol Technology.*24. p:123-129.

Riou C., Salmon J.M., Vallier M.J., Gunata Z., Barre P.(1998). Purification, characterisation, and substrate specificity of a novel high glucose tolerant β -glucosidases from Aspergillus oryzae. *Appl .Microbiol.Biotrechnol.*64.p: 3607-3614.

Rivière J.(1975). Les applications industrielles de la microbiologie. p :31-195. Collection sciences agronomiques. Masson et Cie (éd.).

Robson L.M., Chambliss G.H.(1989). *Enzyme Microb. Technol.* 11, p : 626-644.

Rodier J., Mallein R.(1973). Manuel de biochimie pratique 4,p :319-322. Maloine S.A. Editeur. Paris.

Romero M.D., Aguado J., Gonzalez L., Ladero M. (1999). Cellulase production by

Neurospora crash on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*.25. p:244-250.

Saha B.C., Freer S.N., Bothast R.J.(1994). Production, purification and proprieties of a thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol* .60(10).p : 3774-3780.

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., Ståhlberg J. And Mitchinson C.(2004). Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Elsevier Review* .

Sanyal A., Kundu R.K., Dube S., Dube D.K. (1988). Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*. Purification and characterisation of an inductible extracellular -glucosidase. *Enzyme. Microb. Technol.* 10.p : 91-99.

Saradouni N., Penninckse M.J., Salhi O. (1999). High level production of thermostable β - xylanase. CMC-ase and β -glucosidase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) Albino mutant strain. *Science et Technology*.12 p: 65-70.

Sawaya W.N, Khatchadourian H.A, Khalil J.K, Safi W.M and Al-Shalhat A. (1982). Growth and Compositional Charges During the Various Developpemental Stages of Some Saudi Arabian Date Cultivars, *J. Food Sci*, 47,p: 1489-1497.

Schamburg D., Salzmann M.G.B.F.(1991). Cellulase. p:1-11. In: *Enzyme HandBook*. Volume IV Springer- Verlag Berlin.

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

Schulein M.(1988). *Methods Enzymol*, 160, p : 234-242.

Schwarz W.H.(2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*.56, p: 634-649.

Scriban R. (1999). *Biotechnologie*. p :149-156-157. 5^{ème} édition. *Technique et documentation -Lavoisier (éd.)*.

Scriban R. (1993). *Biotechnologie*. p:32-690. 4^{ème} édition. *Technique de documentation-Lavoisier (éd.)*.

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

Sicard P.(1982). Applications industrielles des enzymes. p :142. In : *Les enzymes, production et utilisation industrielle*. Duran G., Monson P. Edition Gauthier Villars, Paris.

Sidi Ali L., Cochet N., Ghose T.K., Lebeaut J.M.(1984). Enzymatic hydrolysis of sugar beet pulp. *Biotechnology letters*. 6(11), p: 723-728.

Singh A., Agrawal K.A., Abidi A.B., Darmwal N.S. (1990). Properties of exoglucanase from *Aspergillus niger*. *J. Gen. App. Microbiol*. 36. p: 245-253.

Sinnott M.L.(1990).Catalitic mecanism of anzymatic glycosyl transfer. *Chem.Rev.* 90. p: 1171-1202.

Smant G., Stokkermans JP.W.G., Yan Y., De Boer J.M., Baum T.J., Wang X., Hussey R.S., Gommers F.J., Henrissat B., Davis E.L., Helder J., Schots A., Bakker J .(1998). Endogenous cellulases in animals: Isolation of β -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Biochemestery*. 95(9). p: 4906-4911.

Solis-Pereira S., Ernesto F.T., Gustero V.G., Mariano-Gutierrez R.(1993). Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*.39. p: 36-41.

Somogyi M., Nelson N.(1952). Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem*.195, p: 19.23.

Srisodsuk M., Reinikainen T., Pentilla M., Teeri T.(1993). Role of the inter domain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I and its inter-action with cristalline

cellulose. *J. Biol. Chem.* 286. p: 20756-20761.

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*, Volume 107, Issue 1.3, p: 689-704.

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

Sutton D. A., Fothergill A. W., and Rinaldi M. G.(1998). Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Svetlana V., Marten M. R., Ollis D.F., . (1997). Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. North Carolina State University, Department of Chemical Engineering, Box 7905, Raleigh, NC 27695, USA.

Swann E.C., Frieders E.M., and McLaughlin D.J. (1999). *Microbotryum*, *Kriegeria* and the changing paradigm in basidiomycete classification. *Mycologia* 91. p :51-66.

Szabo, I.J., Johansson, G. & Pettersson, G. (1996). Optimized cellulase production by *Phanerochaete chrysosporium*: Control of catabolite repression by fed-batch cultivation. *J. Biotechnol.* 48, p: 221–230.

Takashima, S., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., and Uozumi T.(1999). Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* 125. p:728-736.

Tangnu S.K., Blanche H.W., Wilke C.R.(1981). Enhanced production of cellulase, hemicellulase and beta- glucosidase by *Trichoderma reesei* Rut c-30. *Biotechnol. Bioeng.* 23. p: 1849-1873.

Taniguchi M., Kobayashi M., Fujii M.(1989). *Biotechnol Bioeng*, 34, p : 1092-1097.

Taylor J. W.(1996). *Ascomycota Sac Fungi* Department of Plant and Microbial Biology. p: 94720-3120. University of California Berkeley, CA USA.

Taylor J.W., Bowman B., Berbee M.L., White T.J. (1993). Fungal model organisms. phylogenetics of *saccharomyces*, *Aspergillus* and *Neurospora*. *Systematic Biology* 42. p: 440-457.

Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15. p:160-167.

Teeri, T. T., Koivula A., Linder M., Wohlfahrt G., Divne C., and Jones T. A.(1998). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose. *Biochem. Soc. Trans.* 26. p:173-178.

Tewes A., Glund K., Walther R., Reinbothe H.(1984). High yeild isolation and rapid recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*lycopersicon esculentum*). *Z.Pflanzenphysiol.* 113. p:141-150.

Toda S., Suzuki H., Nizaw K. (1971). Some enzyme properties and the substrate specificities of the *Trichoderma* cellulose with special reference to their activity toward xylan. *J Fermant Technol*, 49. p: 499-521.

Touzi A.(1997). Production d'éthanol à partir des déchets de dattes, *Recherche Agronomique*, INRA, 1. p :.53-57.

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 Micribiol Technology.* 25. p: 38-47.

Ülger C. and Necdet S.L. (2001). Partitioning of industrial cellulase in aqueous two-phase systems from *Trichoderma viride* QM9414 . *Process Biochemistry* .36(11) , p:1075-1080

Umar-Dahot M., Hanif-Noomrio M.(1996). Microbiol Production of Cellulase by *Aspergillus fumigatus* Using Wheat Straw as A Carbon Source.

Van Wyk G.P.H., Mogale A.M., Seseng T.A.(2001). Bioconversion of waste paper to sugars by cellulase from *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Penicillium funiculosum*. The journal of Solide Waste Technology and Management. 27(2).p: 1-5.

Vidaud C. (1984). Contribution à l'étude de l'introduction du système cellulasique de *Trichoderma sp* par utilisation d'analogie de substrat thiosaccharidique. Thèse de 3eme Cycle. Université de Grenoble.

Vieille C and Gregory J. Z . (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability .Microbiology and Molecular Biology Reviews . 65(1):1-43.

Vilgalys R., Barns S. M., Gonzalez D., Hibbett D. S., Lane D. J., Simon L., Stickel S., Szaro T. M., Weisburg W. G., and. Sogin M. L. (1996). Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. Mol. Phylog. Evol. 1,p:231-241.

Violot S., Haser R., Sonan G., Georgette D., Feller G. and Aghajari N. (2003). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Acta Cryst. 59,p : 1256–1258.

Wachinger, G., Bronnenmeier K., Staudenbauer W. L., and Schrempf H. (1989). Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. Appl. Environ. Microbiol. 55. p:2653-2657.

Wessels J.G.H.(1994). Developmental regulation of fungal cell wall formation. Ann. Rev. Phytopathol. 32. p:413-437.

Williams A.C., Orpin C.G. (1987). B-Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stage of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. Canned J Microbiol, 33. p: 427-434.

Withers, S. G.(2001). Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolyses. Carbohydr. Polym. 44. p:325-337.

Wood T.M., Mc Crae S.I. (1972). The purification and properties of the C, component of *Trichoderma koningii* cellulose printed in Great Britain.

Wood T.M., Mc Crae S.I. (1978).Biochem. J,171, p: 61-72.

Wu, C. G., and Kimbrough J. W.(1992). Ultrastructural studies of ascosporeogenesis in *Ascobolus immersus*. Mycologia. 84, p:459-466.

Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J.C.(2000). Purification, characterisation 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. p:4970-4977.