

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

**Université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbès
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

Département de biologie

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE

**THESE Présentée par
Mlle REFFAS Fatma Zohra Imène**

**EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE EN SCIENCES**

Option : Sciences biologiques

Spécialité: Microbiologie moléculaire et proteomics

Thème

**Isolement et caractérisation de bactéries productrices de
cellulase**

Soutenue le: 21/02/2017

Jury

Président : Mr BENALI Mohamed	Professeur	Université de Sidi Bel Abbès
Examineurs : Mr BELABID Lakhdar	Professeur	Université de Mascara
Examineurs : Mr MEDDAH Boumediène	Professeur	Université de Mascara
Directeur de thèse : Mr ABBOUNI Bouziane	Professeur	Université de Sidi Bel Abbès

Année universitaire 2016/2017

Remerciements

-Je remercie mon encadreur Mr le professeur B. ABBOUNI qui a assuré ma formation durant tout mon cursus, pour lequel j'exprime une vive reconnaissance d'avoir mené à bien mon travail.

-Je remercie les membres du jury à savoir le président Mr. Pr. BENALI Mohamed (Université Djillali Liabès SBA), Mr. Pr. BELABID Lakhdar (Université de Mascara) et Mr. Pr. MEDDAH Boumediène (Université de Mascara) qui me font un grand honneur d'évaluer ce travail.

-Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à cette recherche.

- Mr Kerkoud M pour sa précieuse aide et ses bons conseils pour la réalisation de la partie moléculaire de ce travail.
- Mr Hamraoui directeur du laboratoire de sciences et techniques de production animale, Mr Nemiche S professeur en biochimie et Mlle Meghoufel N doctorante en biologie (Université de Mostaganem) pour leur accueil, leur modestie et leur esprit d'équipe.
- Mr Selouani M (ingénieur du laboratoire de microbiologie générale) et Mme Haddad F (ingénieur du laboratoire de microbiologie appliquée) pour leur disponibilité, leur sérieux et leur collaboration.
- J'adresse mon sincère remerciement à Mme. Pr .Sebane A (Professeur en sciences de la terre à l'université d'Oran) qui par ses paroles, ses écrits, ses conseils et ses critiques a guidé mes réflexions.

Dédicaces

Je dédie cette thèse

A mes chers défunts grands parents

A mes chers défunts oncles Dr Reffas Tidjini et Mr Lazreug Djillali

A ma plus grande source de bonheur mes chers parents pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien et surtout leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.

A mon frère Sofiane pour son encouragement, ses conseils précieux et son soutien, j'espère que la vie lui réserve le meilleur.

A ma grand-mère maternelle pour sa douceur et sa gentillesse.

A mes étudiantes que j'ai eu le plaisir d'encadrer Mme Missouri A, Mme Nourine Z, Mlle Benhalima K M, Mme Kralil H I K , Mlle Saoudi N et Mlle Sakeur N.

Résumé

Les enzymes produites par les micro-organismes présentent une importance particulière dans l'industrie biotechnologique, les cellulases, enzymes classées selon la nomenclature internationale EC 3.2.1.4, largement utilisées dans l'industrie de bio-transformation (agroalimentaire, biodégradation des déchets, production de biocarburants).

L'objectif de ce travail est l'isolement et caractérisation de bactéries productrices de cellulases, l'étude de la cinétique enzymatique, l'optimisation des paramètres physico-chimiques impliqués dans la production des cellulases les sources de carbone, les sources d'azote, les sources d'ions, pH et la température. L'isolement des bactéries productrices de la cellulase est effectué à partir d'échantillons prélevés du sol, les écorces d'oliviers et racines de pois chiche et fumier de vache par l'utilisation d'un milieu de culture, contenant la cellulose comme seule source de carbone (Cellulose medium Salt).

Le criblage primaire des souches bactériennes productrices de la cellulase est mis en évidence par inondation de la surface de la gélose du milieu de culture utilisé, contenant des colonies pures, avec une solution de 1% de rouge de congo. Les colonies isolées, sélectionnées productrices de la cellulase par la mesure de la zone d'hydrolyse formée sur la surface du milieu de culture contenant la cellulose comme seule source de carbone sont soumises à une éventuelle identification. Par ailleurs, l'étude du suivi de la cinétique enzymatique et l'optimisation des paramètres physico-chimiques impliqués dans la production de la cellulase sont réalisées par l'utilisation de la méthode DNS.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 16 souches isolées, 5 souches se manifestent hautement productrices de la cellulase. Par ailleurs, l'étude du suivi de la cinétique enzymatique et l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de la cellulase chez les 5 souches sélectionnées productrices de la cellulase ont révélé une importante source de production de cette enzyme, qui pourrait être exploitée dans le domaine industriel.

Mots clés : bactéries cellulolytiques, cellulase, biomolécules, paramètres physicochimiques.

Abstract

Cellulases enzymes presents an important biosources in biotechnological industry, their ability to transforme natural substance (plant biomass) into valuable products such as biofuels gives more interest to explor this bioconversion process.

The aim of this study is the isolation and identification of cellulolytic bacteria strains, optimization of cellulase activity and cellulase production.

16 bacterial strains were isolated and screened for high cellulase production in submerged method using congo red .Among this 16 tested strains, 5 barteriel stains shows the highest yield of cellulase activity.

The evaluation of cellulase activity and the optimization of physicochemical parameters were determined using DNS method. The results showed good potential for industrial application.

Molecular identification of newly isolated strains allowed bringing to: *lysinibacillus xylaniticus*, *Lyninibacillus fusiformis*, *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes faecalis subsp parafaecalis*, *Providencia vermicola*.

Keywords: cellulolytic bacteria, cellulase enzyme, activity , optimization.

ملخص

لدى الأنزيمات المنتجة عبر الجزيئات الدقيقة أهمية كبيرة في الصناعات البيوتكنولوجية من بينهم "السيلولاز المستعملة في عدة صناعات تحويلية من بينها الغذائية، صناعات البنزين البيولوجي

الهدف من هذا العمل هو عزل وتحديد مجموعة هذا البكتيريا المنتجة لأنزيم - السيلولاز/ دراسة حركية السيلولاز/ دراسة العوامل الفيزيائية المؤثرة في إنتاج الحرارة (pH) السيلولاز (مصادر الكربون، الأزوت، الأيونات، الرقم الهيدروجيني - تم عزل البكتيريا عبر مجموعة مختلفة من التربة روث البقر اللحاء باستعمال مشيتت يحتوي على السيلولوز كمصدر وحيد للكربون.

أسفر الفحص الأولي على عزل 16 سلالة بكتيرية باستعمال طريقة الغمر -

أما الدراسات المتعلقة بالعوامل الفيزيائية والحركية المؤثرة على إنتاج السيلولاز أوضحت نتائج قيمة يمكن الاستنتاج بها في المجال التحويلي الصناعي.

الكلمات المفتاحية : بكتيريا السيليلوز، السيلولار ، عوامل فيزيائية.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Présentation des principaux Les microorganismes cellulolytiques et pseudocellulolytiques (**Cailliez, 1991**).

Tableau 2: Origine des prélèvements, la codification des souches isolées et la description des caractéristiques des échantillons.

Tableau 3: Illustration des diamètres de zones d'hydrolyse formées autour des colonies inoculées sur milieu de culture gélose CMS, incubées à une température de 30°C pendant 48 heures.

Tableau 4: Illustration des caractéristiques macroscopiques des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase sur milieu CMS.

Tableau 5: Aspect macroscopique des 05 souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sur le milieu PCA.

Tableau 6: Illustration du test de la catalase et de l'oxydase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2').

Tableau 7: Illustration de la mise en évidence de la présence de l'amylase, la lipase et la caséinase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2').

Tableau 8: Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche EC4'.

Tableau 9: Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche.

Tableau 10: Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche EC2'.

Tableau 11: Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche EC3'.

Tableau 12: Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche RO2'.

Liste des figures

Figure 1: Présentation de la chaîne de cellulose (Stryer *et al.* , 2003).

Figure 2: Présentation de différents modèles d'hémicelluloses. a) Hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec des groupes *O*-acétyl ou de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, b) Hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique et de l'arabinose (Sassen , 1993).

Figure 3:Présentation de la structure de la Lignine (Paillet , 2013).

Figure 4: Présentation de l'action des enzymes cellulolytiques (Krause *et al.* , 2003).

Figure 5: Récapitulation de la deuxième génération de biocarburant (Paillet , 2013).

Figure 6: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de la rhizosphère du citronnier.

Figure 7: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de la rhizosphère du Néflier du Japon.

Figure 8: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du fumier.

Figure 9: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de l'écorce de l'olivier.

Figure 10: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du pois chiche.

Figure 11: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de l'araucaria.

Figure 12 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC4'', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 13: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC4', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 14: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez de la souche EC4, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 15: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC4''* inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 16: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC2'', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 17: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC3, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 18: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche RO2', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 19: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC3'', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 20: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC3', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 21: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche Ps5, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 22: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC2, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48heures.

Figure 23: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC1'', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 24: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC2',

inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 25: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche RO2, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 26: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC4, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 27: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC1, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 28: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC1', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 29: Evaluation de l'activité de la cellulase chez les souches sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2'), inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 30 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC3'', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulobiose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 31: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche RO2', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulobiose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 32 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC4', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulobiose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 33: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC3', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulobiose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure34: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC2', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulobiose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 35: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC4', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 36: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche RO2', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 37: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC3'', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 38: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC3'', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 39: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC2', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

Figure 40: Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche EC2' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 41: Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche RO2' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 42: Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche Ec3'' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 43: Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche EC4' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 44: Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche EC3'' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 45: Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche EC2' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

Figure 46: Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche RO2' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

Figure 47: Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche Ec3'' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

Figure 48: Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche EC4' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

Figure 49: Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche Ec3' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

Figure 50: Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche EC2', une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 51: Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche EC3'', une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 52: Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche EC3', incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 53: Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche EC4', incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 54: Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche RO2', incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

Figure 55: Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche EC2', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10, 20, 30 min).

Figure 56: Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche EC3'', incubé à 50°C

pendant (1, 2, 5, 10,20 ,30min).

Figure 57 : Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche EC 3', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10,20 ,30min)

Figure 58 : Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche EC4', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10,20 ,30min).

Figure 59 : Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche RO2', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10,20 ,30min).

Figure 60 : Illustration de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase brute (0,5 ml), produite par la souche EC2', incubée à 50°C pendant 30 min.

Figure 61 : Illustration de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase (0,5ml), de la souche EC3', incubée à 50°C pendant 30 min.

Figure 62 : Illustration de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase (0,5ml) de la souche EC3'', incubée à 50°C pendant 30 min.

Figure 63 : Illustration du changement de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase (0,5ml), de la souche RO2', incubée à 50°C pendant 30 min.

Figure 64 : Illustration du changement de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par

la cellulase (0,5ml), de la souche EC4'et incubée à 50°C pendant 30min.

Figure 65 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche Ec2' () dans le milieu de culture CMS, incubée température ambiante pendent 6 heures.

Figure 66 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche Ec3'' () dans le milieu de culture CMS, incubée à température ambiante pendent 6 heures.

Figure 67 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche RO2' () dans le milieu de culture CMS, incubée à une température ambiante pendent 6 heures.

Figure 68 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche Ec4' () dans le milieu de culture CMS, incubée à température ambiante pendent 6 heures.

Figure 69 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche Ec3'' () dans le milieu de culture CMS, incubée à température ambiante pendent 6 heures

Figure 70 : Aspect macroscopique de la souche EC2'', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 71 : Aspect macroscopique de la souche EC3, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures

Figure 72 : Aspect macroscopique de la souche EC3', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 73 : Aspect macroscopique de la souche EC4', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 74 : Aspect macroscopique de la souche EC2', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures

Figure 75 : Aspect macroscopique de la souche RO2', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 76 :Aspect macroscopique de la souche EC3'', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 77: Aspect macroscopique de la souche EC4', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 78 : Aspect macroscopique de la souche EC4, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 79 : Aspect macroscopique de la souche EC1, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 80 : Aspect macroscopique de la souche EC1', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 81 : Aspect macroscopique de la souche EC1'', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 82 : Aspect macroscopique de la souche EC2, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 83 : Aspect macroscopique de la souche RO2, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 84 : Aspect macroscopique de la souche Ps5, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 85: Aspect macroscopique de la souche EC4*, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 86 : Aspect macroscopique de la souche RO2', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 87 : Aspect macroscopique de la souche EC3'', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 88 : Aspect macroscopique de la souche EC3', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 89: Aspect macroscopique de la souche EC2', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 90: Aspect macroscopique de la souche EC4', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 91 : Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche RO2', sélectionnées productrices de la cellulase (grossissement $\times 100$).

Figure 92 : Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche EC3'', sélectionnée productrice de la cellulase (grossissement $\times 100$).

Figure 93 : Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche EC3', sélectionnée productrice de la cellulase (grossissement $\times 100$).

Figure 94 : Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche EC2', sélectionnée productrice de la cellulase (grossissement $\times 100$).

Figure 95: Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche EC4', sélectionnée productrice de la cellulase (grossissement $\times 100$).

Figure 96 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche Ec2', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 97 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC3', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 98 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC 3'', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 99: L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC4', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 100 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche RO2', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

Figure 101 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC3', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 102 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche RO2', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 103 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC3'', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 104 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC4', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure 105 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC2', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Figure106 : Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase EC4'.

Figure 107 :Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase EC2'.

Figure 108 :Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase EC3'.

Figure 109 : Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase EC3''.

Figure 110 :Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase RO2'.

Figure 111 : Présentation d'une partie de l'alignement de séquences de 5 souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sur logiciel MEGA.

Figure112 : Arbre phylogénétique basée sur l'analyse de l'ARN 16S, montrant la relation entre les 5 souches isolées et les espèces du même genre (la barre 0,05 indique le nombre de substitution par position de nucléotide).

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction01

Rappel Bibliographique

1-	Etude de la cellulose.....	04
1-1	La cellulose.....	04
1-2	Les Hémicelluloses.....	05
1-3	La Lignine.....	06
1-4	Sensibilité de la cellulose aux différents traitements.....	07
2-	Etude des cellulases.....	08
2-1	Définition des cellulases.....	08
2-2	Nomenclature des cellulases.....	08
2-3	Mode d'action des cellulases.....	09
2-4	Quelques caractéristique de la cellulase.....	10
2-4-1	Réaction et spécificité.....	10
2-4-2	Substrats naturels.....	10
2-4-3	Inhibiteurs.....	10
2-4-4	Activité enzymatique.....	10
2-4-5	Poids moléculaire.....	11
2-4-6	pH optimum.....	11
2-4-7	Température optimale.....	11
3-	Etude des microorganismes cellulolytiques.....	12
3-1	Les bactéries cellulolytiques.....	13
4-	Les biocarburants.....	15
4-1	Type de biocarburants.....	16
	Biocarburants primaires.....	16

Biocarburants secondaires.....	16
4-2 Biocarburants liquides pour le transport.....	17
4-3 Biocarburants liquides de deuxième génération.....	17
4-4 Procédé de production de biocarburants de deuxième génération.....	17
4-5 Les principales sources de la biomasse lignocellulolytique.....	18

Matériels et méthodes

1- Isolement et criblage de souches bactériennes productrices de cellulase.....	19
1-1 Echantillonnage.....	19
1-2 Enrichissement.....	25
1-3 Isolement des bactéries cellulolytiques.....	25
1-4 Purification et conservation des souches productrices de la cellulase.....	25
1-5 Screening des souches productrices de la cellulase.....	25
2- Etude enzymatique.....	26
2-1 Production de l'enzyme cellulase.....	26
2-2 Mise au point de la production de la cellulase.....	26
2-3 Récupération de la cellulase.....	26
2-4 Mesure de l'activité de la cellulase.....	26
2-5 Optimisation des conditions nutritionnelles pour la production de la cellulase.....	27
2-6 Optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans l'activité de la cellulase.....	27
2-7 Etude du suivi de la cinétique de la cellulase.....	28
3- Etude du suivi de la cinétique de croissance des souches bactériennes sélectionnées productrices de la cellulase.....	29
4- Identification des souches isolées.....	29
4-1 Identification phénotypique.....	29
4-1-1 Examen macroscopique.....	29

4-1-2	Coloration de Gram et examen microscopique.....	29
4-1-3	Etude des enzymes respiratoires terminales.....	30
4-1-4	Métabolismes des molécules larges.....	30
4-1-5	Identification par la galerie API20E.....	31
4-2	Identification génotypique.....	32
4-2-1	Extraction de l'ADN.....	32
4-2-2	Amplification des fragments de l'ADN.....	32
4-2-3	Purification de l'ADN par centrifugation.....	33
4-2-4	Séquençage de l'ADN.....	33

Résultats et discussion

1-	Description des échantillons.....	35
2-	Isolement et purification des souches bactériennes productrices de cellulase.....	35
2-1	Screening des souches bactériennes productrices de cellulase.....	36
3-	Etude enzymatique.....	46
3-1	Production de la cellulase.....	46
3-2	Evaluation de l'activité de la cellulase chez les souches sélectionnées.....	46
3-3	Optimisation des conditions nutritionnelles pour la production de la cellulase.....	48
3-4	Optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans la production de la cellulase.....	54
4-	Etude du suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées de cellulase.....	71
5-	Identification des souches isolées.....	74
5-1	Identification phénotypique.....	74
5-1-1	Examen macroscopique.....	74
5-1-2	Examen microscopique.....	86
5-1-3	Etude des enzymes respiratoires terminales.....	89

5-1-4 Métabolisme des molécules larges.....	91
5-1-5 Identification des souches isolées par la galerie API20E.....	92
5-2 Identification génotypique.....	101
Conclusion.....	109

Introduction

Les biocarburants occupent actuellement de plus en plus de place dans nos journaux, sites Internet ou même les débats politiques, l'idée n'est pas nouvelle. C'est en 1900 que Mr Diesel (inventeur du moteur portant le même nom) présenta lors de l'exposition universelle de Paris le premier moteur fonctionnant à l'huile végétale (Radich , 2004). L'idée avait alors été abandonnée par manque de compétitivité avec les hydrocarbures traditionnels. En outre, avec l'augmentation du prix de pétrole et l'aggravation des émissions de gaz à effet de serre (équivalents de CO₂) justifient la recherche de matières premières et de technologies alternatives capables de réduire la dépendance en ces combustibles fossiles et de protéger l'environnement (Margeot *et al.*, 2009 ; Laurent *et al.*, 2011). Selon le [Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat \(GIEC\)](#), principal organisme international chargé de l'évaluation des changements climatiques, le réchauffement du système climatique mondial est indiscutable. Cette évidence est tirée de l'observation d'une hausse des températures moyennes de l'air et des océans à travers le monde, de la fonte généralisée des neiges et des glaces et d'une élévation du niveau moyen des mers. Les experts scientifiques du climat ont déterminé que les hausses de température devaient être limitées à 2°C afin d'éviter qu'elles ne causent des dommages irréparables à la planète. Pour y parvenir, les émissions mondiales de gaz à effet de serre doivent culminer vers 2015 et diminuer ensuite, pour atteindre une réduction de 50 % vers 2050, selon l'ONU. Les gouvernements peuvent encourager une série d'options comme le gaz naturel et les énergies renouvelables et sensibiliser le public au rendement énergétique. Les technologies propres qui existent actuellement sur le marché sont les panneaux solaires, les turbines éoliennes, l'énergie hydroélectrique, les véhicules hybrides qui combinent les moteurs électriques et les moteurs à combustion, l'énergie nucléaire et la biomasse (ONU , 2015). En effet, la biomasse lignocellulosique des plantes contient des sucres polymérisés en cellulose et hémicellulose peut fournir du bioéthanol après plusieurs étapes de prétraitement et d'hydrolyse physique, chimique et biologique dites 'bio raffinerie'. Le bio raffinage peut être défini comme un processus durable de transformation de la biomasse en produits bio basés (alimentation, produits chimiques, matériaux) et en bioénergie (biocarburants, électricité, chaleur). Le concept de bio raffinerie est analogue à celui du raffinage de pétrole qui produit différents carburants et produits chimiques (Margeot et Monot , 2009 ; Laurant *et al.* , 2011 ; Khelfa , 2009 ; Zeitoun , 2011). L'Algérie est située dans une zone vulnérable aux effets néfastes des changements climatiques. Donc sensible aux déséquilibres environnementaux engendrés par

le réchauffement climatique que subit la planète. Pour pallier à ces deux problèmes, les énergies renouvelables sont la meilleure alternative durable. Parmi ces énergies, la bioénergie est produite à partir de la biomasse et de certains déchets tels que Les déchets agricoles, Les déchets de l'industrie agroalimentaire, Les rejets de l'industrie du papier, Les cultures énergétiques non destinées à l'alimentation dont l'Algérie en dispose (Aziza , 2010). La bioconversion est définie par l'utilisation de microorganismes pour la réalisation de réactions biochimiques (Boussebouda , 2002). Une méthode pratique pour épurer les environnements contaminés est la bioremédiation ou dépollution biologique. La bioremédiation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux (Perry *et al.* , 2004). La biodégradation de la cellulose est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre. Elle est assurée par des microorganismes cellulolytiques qui secrètent à cet effet des enzymes aux propriétés très particulières : les cellulases. La biodégradation de la cellulose a lieu aussi bien en aérobie (par exemple à la surface du sol) qu'en anaérobie (par exemple dans le rumen animal). Parmi les bactéries cellulolytiques figurent des bactéries appartenant aux genres *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Streptomyces*, *Ruminococcus* et *Clostridium*.

Ainsi, la cellulose constitue une source d'énergie renouvelable pratiquement inépuisable, pour cela des recherches de bioconversion des déchets cellulosiques sous l'action des Cellulases sont établies dans le but de les valoriser et de les transformer en un mélange de sucres plus intéressants sur le plan nutritif et gustatif, ou encore transformer ces mêmes sucres par fermentation en alcool utilisé dans différents domaines (Ouled Daoud *et al.* , 2005). La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson , 1987) et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Bhat , 2000).

Les objectifs tracés pour la réalisation de ce présent travail sont :

- ✓ L'isolement d'une large gamme de souches bactériennes productrices de cellulases à partir des rhizosphères du sol, les écorces de l'olivier et fumier de vache.
- ✓ L'optimisation de certains facteurs physicochimiques tels que le pH, la température, les sources de carbone, les sources d'azote et les sources d'ions, impliqués dans la production de la cellulase.
- ✓ L'identification des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase par l'utilisation de la galerie API20E et l'amplification du fragment d'ADN codant la région

conservée de ARN16S.

RAPPEL
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Etude de la cellulose

1.1 La cellulose

La cellulose est une molécule organique la plus abondante sur terre, de structure polysaccharidique de base des parois des cellules végétales, représente environ 50 % de la masse totale et une production mondiale annuelle de 1.5×10^{12} tonnes (**Deguchi *et al.* , 2006**).

La cellulose $[C_6H_{10}O_5]_n$ est un polyholoside à longues chaînes d'unités de cellobiose, constitués d'anhydroglucoses liés par des ponts β -1,4 (**Wiley et Atalla , 1987**) et se présente sous forme amorphe ou cristalline, générée grâce à la mise en place de liaisons d'hydrogène entre les différentes chaînes (**Kolpak et Blackwell , 1976 ; Oh *et al.* , 2005**). La cellulose est présente dans les plantes sous forme de microfibrilles, possédant un diamètre de 20-30 nanomètres (**Zhao *et al.* , 2007**), une longueur de 100 -40000 nanomètres. Chaque molécule de cellulose contient 2000 à plus de 15000 sous-unités de cellobiose. La cellulose présente un nombre variable de fibrilles élémentaires. En effet, les plantes supérieures possèdent approximativement 36 chaînes élémentaires de cellulodextrines, contre plus de 1200 chaînes chez les algues cellulosiques.

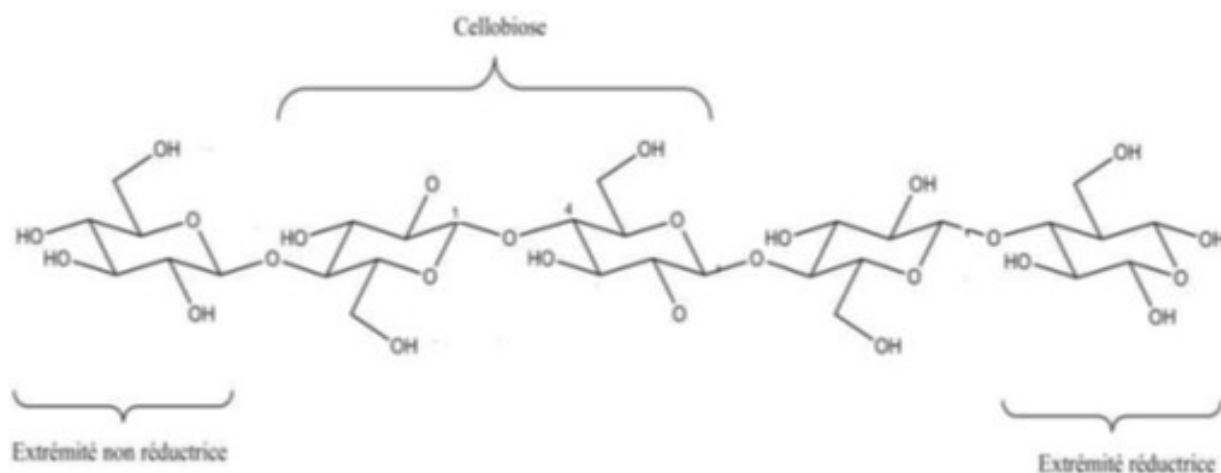


Figure 1 : Présentation de la chaîne de cellulose (**Stryer *et al.* , 2003**).

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 :

- Des structures cristallines de chaînes associées, par des liaisons hydrogènes difficiles à rompre (**Baumgartner , 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 , 1994**).
- 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 , 1960**) et classent la structure de la cellulose en deux groupes:
 - La cellulose I: qui représente la forme naturelle ou native, présente dans le coton et le bois.
 - La cellulose II: qui est une forme modifiée obtenue après traitement chimique (à la soude par exemple).

1.2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent la matrice des parois qui assure la liaison des microfibrilles de cellulose entre elles par des liaisons hydrogènes. Ces composés forment un groupe mixte d'hétéropolymères linéaires et ramifiés comportant principalement cinq sucres monomériques : D-glucose, D- mannose, D-galactose, Dxylose et L-arabinose (**Fengel *et al.* , 1989 , Kuhad *et al.* , 1997**). De manière générale les hémicelluloses s'associent entre elles par liaisons β -1-4 glucosidiques. Elles sont insolubles dans l'eau chaude ou froide et les acides dilués chauds (**Cho *et al.* , 1997**). Cependant les hémicelluloses se distinguent de la cellulose par leur solubilité dans une base diluée. Leur biodégradation est beaucoup plus facile que la cellulose .Les hémicelluloses font partie des substances ayant des effets critiques, c'est une source d'oligosaccharides, de sucres, d'alcools et d'autres composés organiques qui peuvent être libérés sous l'action des **hémicellulases** (**Rodionova *et al.* , 1992**).

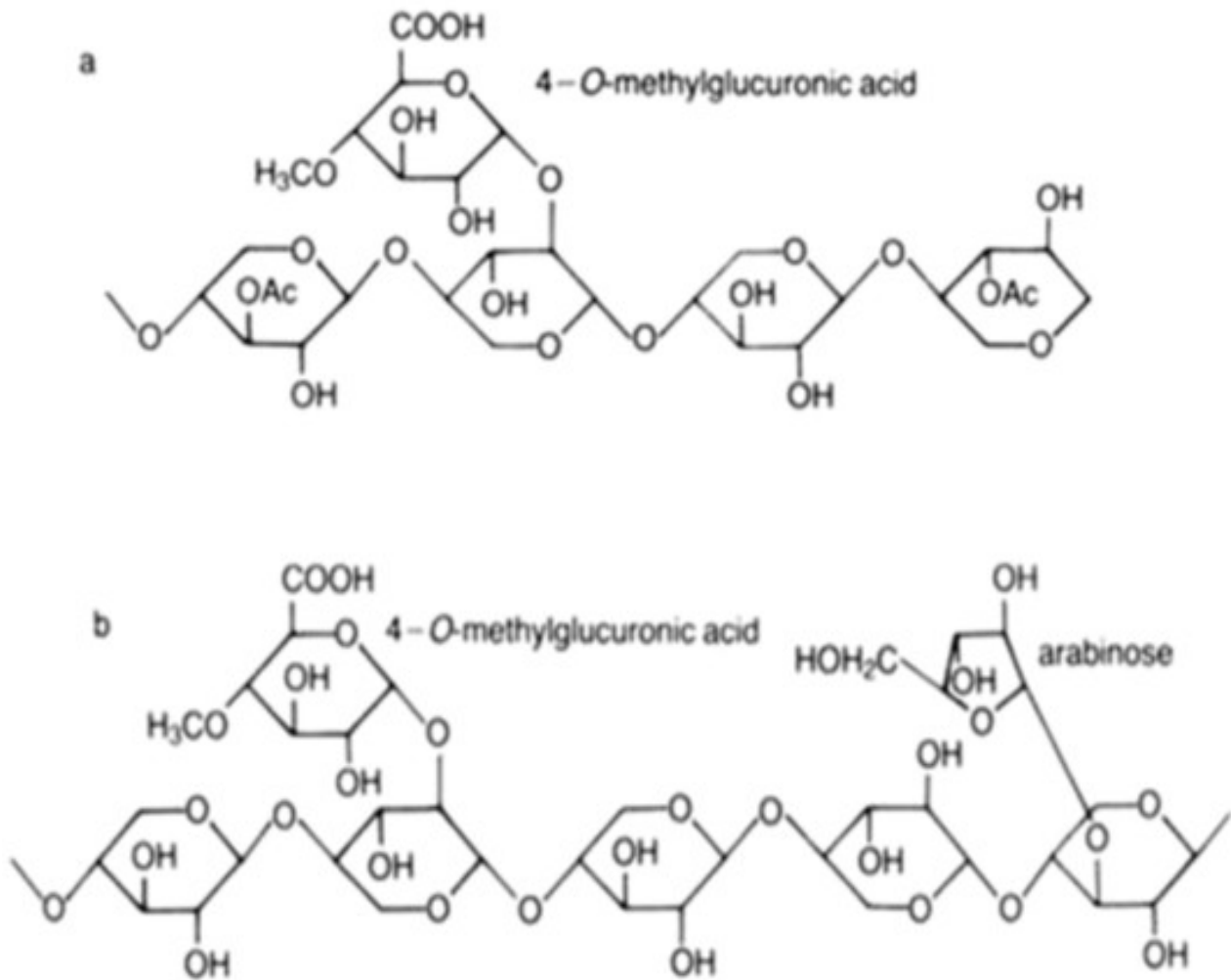


Figure 2: Présentation de différents modèles d'hémicelluloses. a) Hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec des groupes *O*-acétyl ou de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique, b) Hémicellulose composée d'unités répétées de xylose substituées avec de l'acide 4-*O*-méthylglucuronique et de l'arabinose (Sassen , 1993).

1.3 La lignine

La lignine est un hétéropolymère tridimensionnel provenant de la polymérisation oxydative de trois composés phénoliques : les alcools coniférylique, sinapylique et *p*coumarilique (ou *p*-hydroxyphényl) (Rouau *et al.* , 1987) et se dépose au niveau des parois primaires et secondaires des cellules végétales, renforçant les microfibrilles de cellulose. Sa structure forme un polymère tridimensionnel insoluble, dense et résistant qui cimente les fibres entre elles, assure le transport de l'eau et confère au bois toute sa rigidité, peu sensible à la dégradation biologique (Fengel *et al.* , 1989).

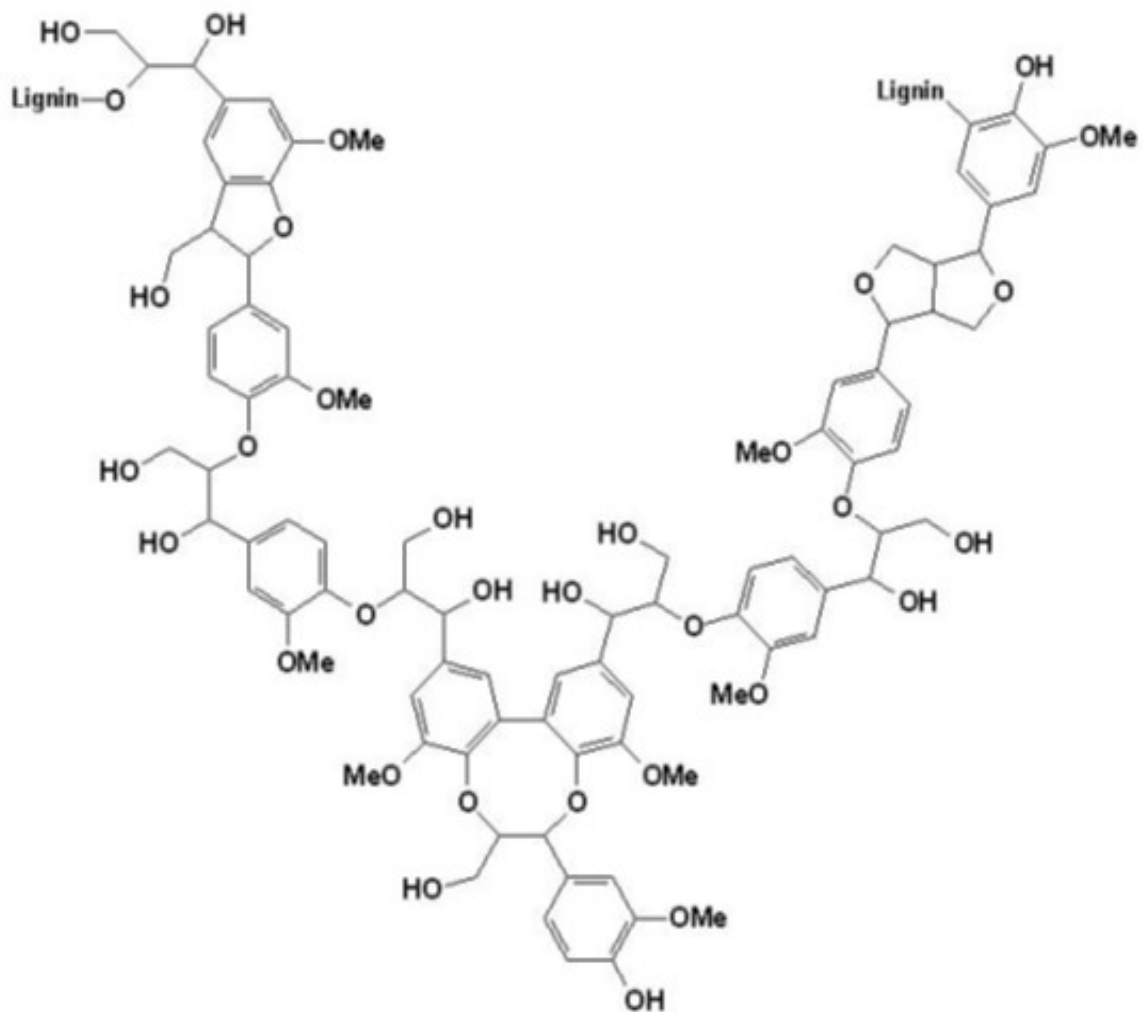


Figure 3 : Présentation de la structure de la Lignine (**Paillet , 2013**).

1.4 Sensibilité de la cellulose aux 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**) :

- L'incrustation par les polymères non cellulosiques tels que la lignine à laquelle la cellulose est généralement associée.
- Le degré de polymérisation varie selon les sources (10.000 unités glucosidiques pour un poids moléculaire de 1.5 million avec une longueur de 5µm pour la cellulose de bois) (**Mouranche et Costes , 1985**).

2. Etude des cellulases

2.1 Définition des cellulases

Les cellulases [1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucanohydrolase] se rapportent à un groupe d'enzymes agissant ensemble et hydrolysent la cellulose en sucres simples (**Kader *et al.* , 1999 ; Korish , 2003**).

Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides hydrolases, qui est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux d'enzymes: Endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), Exo β (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) (**Xu , 2002**) :

- L'endo-cellulase (EC 3.2.1.4) dégrade les liaisons internes pour la perturbation de la structure cristalline de la cellulose et l'exposition de différentes chaînes polysaccharidique de la cellulose, par diminution rapide du degré de polymérisation du substrat (**Kleman-Leyer *et al.* , 1994 ; Davies et Hanrissat , 1995 ; Harjunpaa *et al.* , 1996 ; Warren , 1996 ; Xu *et al.* , 2000**). Les endoglucanases coupent la cellulose aléatoirement au niveau des zones amorphes de la cellulose, générant de nouvelles extrémités de chaînes.

- L'exoglucanase (EC 3.2.1.91) attaque les liaisons β (1-4) glycosidiques des chaînes de les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose (**Teeri , 1997 ; Xu , 2002**).

- La cellobiase (EC 3.2.1.21) hydrolyse les liaisons β (1-4) glycosidiques du cellobiose, et donne deux molécules de glucose (**Onsori *et al.* , 2005**).

2.2 Nomenclature des cellulases

Nom codifié : E.C.3.2.1.4

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

Nom recommandé : Cellulase.

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

2.3 Mode d'actions des cellulases

Les trois principaux types d'enzymes constituant le complexe cellulasique présentent différents modes d'action.

- L'endocellulase rompt les liaisons internes de la chaîne cellulosique et entraîne la libération de cellodextrines, du cellobiose et du glucose. Elle agit sur les celluloses solubles.

L'action aléatoire de l'endocellulase permet la création de nouvelles extrémités non

réductrices, appelées les sites réactifs de la cellobiohydrolase (**Hasper *et al.* , 2002**).

- La cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), attaque les polymères de cellulose au niveau de des extrémités non réductrices et libère des résidus cellobiose. L'enzyme est inactive sur la cellulose cristalline et les celluloses solubles (carboxyméthylcellulose). Par contre, elle attaque les celluloses partiellement dégradées et intervient dans l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline (**Scriban , 1993**).

La complémentarité des deux types d'enzymes permet l'explication de l'effet synergique du mélange. Par contre, le mécanisme de coopération entre cellobiohydrolase et endocellulase permet l'hydrolyse de la cellulose cristalline (**Scriban , 1993 ; Josefsson , 2006**).

-La cellobiase dégrade les liaisons β (1-4) oligoglucosides, et son l'activité diminue rapidement lors de l'augmentation de la longueur de la chaîne (**Scriban , 1993 ; Josefsson , 2006**).

Outre, la complémentarité de leurs actions pour la réalisation d'une hydrolyse totale de la cellulose, le complexe enzymatique de la cellulase fonctionne en synergie, ce qui explique l'interaction entre les trois enzymes, auxquelles le produit de réaction enzymatique est utilisée comme en substrat pour une autre réaction (**Fang , 2008**).

Quatre formes de synergie sont décrites : une synergie endo-exo entre endoglucanases et exoglucanases (**Lemos *et al.* , 2003**), une synergie exo-exo entre exoglucanases agissant aux extrémités réductrices des chaînes de cellulose et celles agissant aux extrémités non-réductrices, une synergie entre les exoglucanases et les β - glucosidases qui permet l'hydrolyse de cellobiose, un produit final caractérisé par son important pouvoir d'inhibition des cellobiohydrolases (**Lynd *et al.* , 2002**) et une synergie intramoléculaire entre domaines catalytiques et CBM (**Mosier *et al.* , 1999 ; Josefsson , 2006**).

2.4 Quelques caractéristiques de la cellulase

2.4.1 Réaction et spécificité

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

2.4.2 Substrats naturels

La cellulase intervient dans la dégradation de différents substrats naturels tels que : la cellulose (**Lachke et Despande , 1988 ; Robson et Chambliss , 1989**), les Xyloglucanes (**Maclachlan *etal.*, 1988**), le coton(**Okada *et al.* , 1976**), dont la dégradation complète

nécessite une action complémentaire des enzymes cellulolytiques (**Haliwell et Halliwell , 1989**).

2.4.3 Inhibiteurs

L'inhibition de l'activité cellulolytique est engendrée par la présence de différents éléments tels que : Hg^{2+} , élément minéral qui peut être restauré en 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**).

2.4.4 Activité enzymatique

L'activité cellulolytique est exprimée en unités internationales, qui correspond à la quantité d'enzymes produite, intervenant dans la dégradation de carboxyméthylcellulose en carbohydrates réduits (1 μ mole de glucose / minute) (**Schulein , 1988**). L'activité cellulasique varie considérablement entre 60-1168 Unités (**Schulein , 1988 ; Okada , 1976**).

2.4.5 Poids moléculaire

Les cellulases ont des poids moléculaires très variables qui dépendent principalement de leurs origines. Certaines endoglucanases ont des poids moléculaires de 30-90 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 30-50 KDa (**Singh et al. , 1990**), alors que les β -glucosidases ont des masses moléculaires plus élevées variant de 90-240 KDa (**Sanyal et al. , 1988**).

2.4.6 pH optimum

La plupart des enzymes cellulolytiques caractérisés ont des valeurs de pH optimales de 3-7 (**Lynd et al. ,2002**). Cependant, les cellulases d'origine fongique ont des valeurs de pH optimale limitée de 4-5. Cependant, les valeurs de pH optimale de le cellulase bactérienne sont proches de la neutralité (**Buchholz et al. , 1983**).

2.4.7 Température optimale

Les enzymes cellulolytiques fongiques caractérisés ont des températures optimales entre 40-70°C. Cependant, les cellulases bactériennes ont des températures optimales entre 50 et 100°C, ce qui explique l'intérêt porté à cette classe enzyme par leur utilisation en industrie

du textile (Ando *et al.* , 2002).

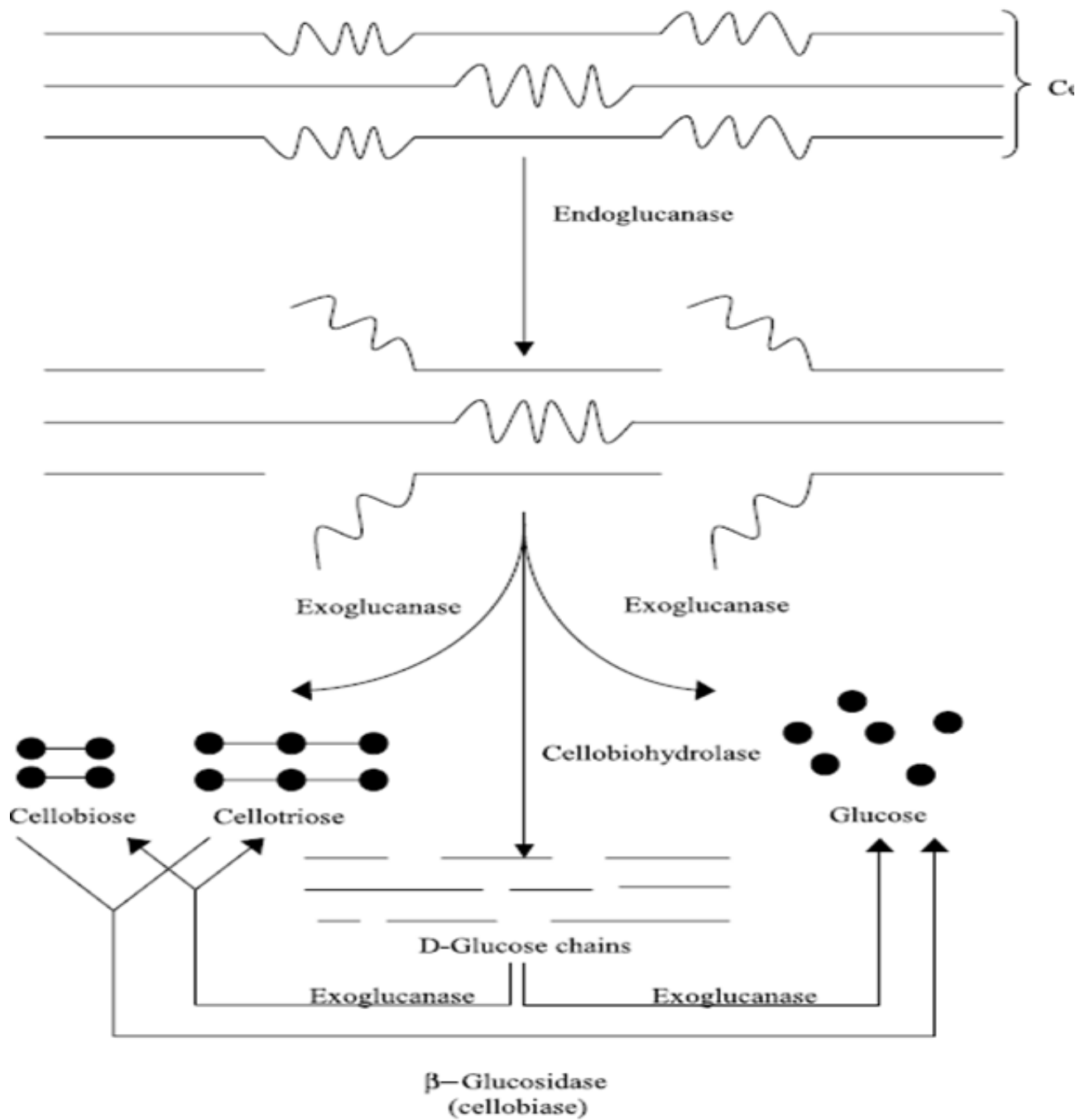


Figure 4 : Présentation de l'action des enzymes cellulolytiques (Krause, *et al.* , 2003).

3. Etude des microorganismes cellulolytiques

La cellulolyse est une étape fondamentale de la transformation de la cellulose en sucres fermentescibles et en produits économiquement rentables, qui correspond à l'hydrolyse biologique de la cellulose en molécules de petite taille comme les cellodextrines, le cellobiose et le glucose. Les cellulases forment une classe d'enzyme largement répandues dans la nature, produites principalement par les champignons, les bactéries et les protozoaires (**Xu et al. , 2000**). Cependant, d'autres cellulases sont produites par les plantes, les vers, les mollusques, les insectes, etc. (**Odier et Rouau , 1985**).

La flore cellulolytiques est très variée, rencontrée souvent dans des divers écosystèmes, constitués essentiellement par les composts, les fumiers, les litières, les boues d'estuaires, le fond des lacs et le tractus digestif des animaux. Ces microorganismes appartiennent à des groupes taxonomiques très variés, regroupés selon leur appartenance au groupe Eucaryotes ou Procaryotes. Leur température optimale de croissance permet la distinction entre les microorganismes psychrophiles, mésophiles et les thermophiles. (**Tchunden , 1990**).

3.1 Les bactéries cellulolytiques

Clostridium thermocellum de *Trichoderma reesei*. *Cl. thermocellum* sont des bactéries anaérobie saprophyte, productrice de la cellulase, interviennent dans la conversion directe de la cellulose cristalline en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO_2 , H_2) (**Johnson et al., 1982**). Les cellulases produites s'associent en complexe de haute masse molaire (2 millions de daltons), appelé cellulosome (**Lamed et al., 1983 ; Bayer et al., 1983**), composé de 14-18 polypeptides de masse molaire comprise entre 48 000-210000 daltons. A côté de *Cl. thermocellum*, de nombreuses bactéries très bien caractérisées telles que *Bacteroides succinogenes* sont capables de dégrader les celluloses les plus cristallines, s'adhèrent fortement aux fibres de cellulose et possèdent un système cellulolytique particulièrement complexe (**Schellhorn et Forsberg, 1984**).

Acetivibrio cellulolyticus est une bactérie anaérobie mésophile, capable de fermenter la salicine, le cellobiose et la cellulose par la production de l'acide acétique et de gaz (H_2 , CO_2) (**Patel et Mc Kenzie , 1982**).

Les bactéries aérobies et aérobies-anaérobies facultatives comprennent les genres *Pseudomonas*, *Cellvibrio* et *Cellulomonas*. Les *Cellulomonas* capables d'utiliser de nombreuses sources de carbone telles que les hémicelluloses (xylane) (**Peiris et Rickard,**

1982). La fermentation de ces sucres conduit à la production d'acétone, de lactate, de formate, de succinate, d'éthanol et de gaz carbonique.

De nombreuses souches appartenant à la famille d'actinomycètes sont caractérisées par la production de cellulases telles que *Streptomyces reticuli* et *Thermomonospora fusca* (Schlochtermeyer *et al.* , 1992; Tuncer *et al.* , 1999).

Certaines archaebactéries telles que *Thermotoga neapolitana* et *Pyrococcus horikoshii* (Bok *et al.* , 1998 ; Ando *et al.* , 2002) constituent une source de production importante de cellulases thermostables. (Tableau 1).

Tableau 1 : Présentation des principaux microorganismes cellulolytiques et pseudocellulolytiques (Cailliez, 1991).

Organisme	Température de croissance	Métabolisme énergétique
Bactéries Gram négatif		
*Pseudomonadaceae		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Cellvibrio gilvus</i>		
<i>Cellvibrio fulvus</i>	M	
<i>Cellvibrio vulgaris</i>	M	Ae
<i>Cellvibrio mixtus</i>	M	Ae
*Enterobacteriaceae	M	Ae
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	M	Ae
<i>Erwinia carotovora</i>		
*Bacteroidaceae		
<i>Bacteroides succinogenes</i>		
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>		Ae/An fac
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>		Ae/An fac
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i>	M	
<i>Acetivibrio cellulosolvens</i>	M	An
		An
		An
		An
		An
Bactérie Gram positif		
*Bacillaceae		
<i>Bacillus circulans</i>	M	
<i>Bacillus coagulans</i>	M	
<i>Bacillus laterosporus</i>	M	
<i>Bacillus licheniformis</i>	M	
<i>Clostridium aldrichii</i>		
<i>Clostridium C7</i>		Ae/An fac
<i>Clostridium celerecrescens</i>		Ae/An fac
<i>Clostridium cellobioparum</i>		Ae/An fac
<i>Clostridium cellulolyticum</i>		Ae/An fac
<i>Clostridium cellulovorans</i>		An
<i>Clostridium chartatabidum</i>		An
<i>Clostridium josui</i>	M	An
<i>Clostridium lochheadii</i>	M	An
	M	An
<i>Clostridium longisporium</i>	M	An
<i>Clostridium papyrosolvens</i>	M	An
<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	M	An
<i>Clostridium populeti</i>	M	An
<i>Clostridium stercorarium</i>	M	An

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

M: mésophile, T: thermophile, M/Tt: mésophile thermo tolérant, Ae: aérobie, An: anaérobie, Ae/An fac: aérobie, anaérobie facultative.

4. Les biocarburants

L'utilisation de la biomasse traditionnelle, notamment le bois de feu, le charbon de bois et les déchets animaux, constitue une importante source d'énergie dans de nombreuses régions du monde. La bioénergie demeure la principale source d'énergie pour de nombreuses populations du monde, vivant dans des conditions d'extrême de pauvreté.

Des technologies modernes de conversions plus avancées et efficaces permettent l'utilisation des biocarburants solides, liquides ou gazeux à partir de matériaux tels que le bois, les matières premières végétales et les déchets. Le potentiel des biocarburants et leur

implications dans l'agriculture constitue une priorité majeure. L'utilisation des biocarburants liquides dans les transports et leur emploi généralisé ont attiré particulièrement l'attention (FAO, 2008).

4.1 Type de biocarburants

Les biocarburants sont des vecteurs énergétiques industriels important qui emmagasinent l'énergie produite à partir de la biomasse. L'éventail de sources de production de la bioénergie sous une variété de formes à partir de la biomasse est large. A titre d'exemple, les résidus de transformation industrielle des aliments, les fibres, le bois; les cultures énergétiques, les plantations à rotation rapide, les déchets du secteur agricole, les résidus du secteur forestier peuvent être utilisés pour la production de l'électricité, de la chaleur.

Les biocarburants sont également appelés énergie *renouvelable* et classés en fonction de leur origine et de leur type.

En outre, les biocarburants peuvent provenir de déchets forestiers, agricoles ou de produits de la pêche ou de déchets municipaux ou encore de sous produits et déchets de l'agro-industrie, des industries alimentaires et des services alimentaires.

Les biocarburants peuvent se présenter sous une forme solide tels que le bois de feu, charbon de bois, briquettes de bois; et liquide tels que l'éthanol, le biodiesel, les huiles de pyrolyse; gazeux tels que les biogaz. On distingue également les biocarburants *primaires* (non transformés) et *secondaires* (transformés):

- **Les biocarburants primaires**

Les biocarburants primaires sont utilisés sous leur forme naturelle tels que le bois de feu, les copeaux et les briquettes de bois, sont ceux où la matière organique est utilisée dans sa forme naturelle et fournissent en générale des combustibles qui servent directement à la cuisson des aliments, la production de la chaleur et de l'électricité, utilisées dans des applications industrielle à petite et grande échelle.

- **Les biocarburants secondaires**

Les biocarburants secondaires sont utilisés sous la forme de solides tels que le charbon de bois et liquides tels que l'éthanol, le biodiesel, les huiles biologiques, etc.) ou de gaz (biogaz, syngaz et hydrogène) qui trouvent des applications très large notamment dans les transports et les processus industriels à température élevée (FAO , 2008).

4.2 Biocarburants liquides pour le transport

En dépit du faible taux de la production totale de biocarburants liquides, la production de

biocarburants liquides (l'éthanol et le biodiesel) utilisés dans le secteur du transport à partir de matières premières agricoles et alimentaires, a enregistré une croissance considérable ces dernières années.

4.3 Biocarburants liquides de deuxième génération

L'expression de biocarburant de la première génération renvoie généralement aux cultures énergétiques à forte teneur en sucre et en amidon ainsi qu'aux oléagineuses utilisées respectivement comme matières premières dans la production d'éthanol et de biodiesel. Les technologies modernes dites de la deuxième génération en cours de développement visent la possibilité d'utilisation de la biomasse lignocellulosique dans ce processus de production. La biomasse cellulosique offre un pouvoir de résistance à la dégradation des amylacés, des sucres et des huiles. La conversion de la biomasse en carburant liquide est très difficile car ces méthodes de production sont très coûteuses par rapport à la production des biocarburants de la première génération à partir des matières premières utilisées. Le processus de conversion de la cellulose en éthanol s'effectue en deux temps: les composants cellulosiques et hémicellulosiques de la biomasse sont d'abord décomposés en sucres, fermentés en éthanol.

Le déficit de débouchés commerciaux constaté a entravé le développement du secteur de la production des biocarburants. Etant donné que la biomasse cellulosique constitue la matière biologique très répandue sur terre, la mise au point de la production des biocarburants de la deuxième génération à base de cellulose commercialement rentable pourrait contribuer à l'augmentation du volume de la production des matières premières.

4.4 Procédé de production de biocarburants de deuxième génération

Ce procédé est réalisé par la fermentation des sucres et la production de l'éthanol. Cependant, la source ligno-cellulosique ne livre pas directement le sucre exploité. Une étape supplémentaire est indispensable pour la production du bioéthanol.

La première étape consiste le prétraitement et la séparation de la cellulose des autres constituants de la biomasse. Ensuite, la cellulose est transformée en glucose par hydrolyse grâce à la présence des enzymes produites par certains micro-organismes.

Le glucose subit ensuite une fermentation afin former de l'éthanol, déshydraté et distillé (**Paillet , 2013**).

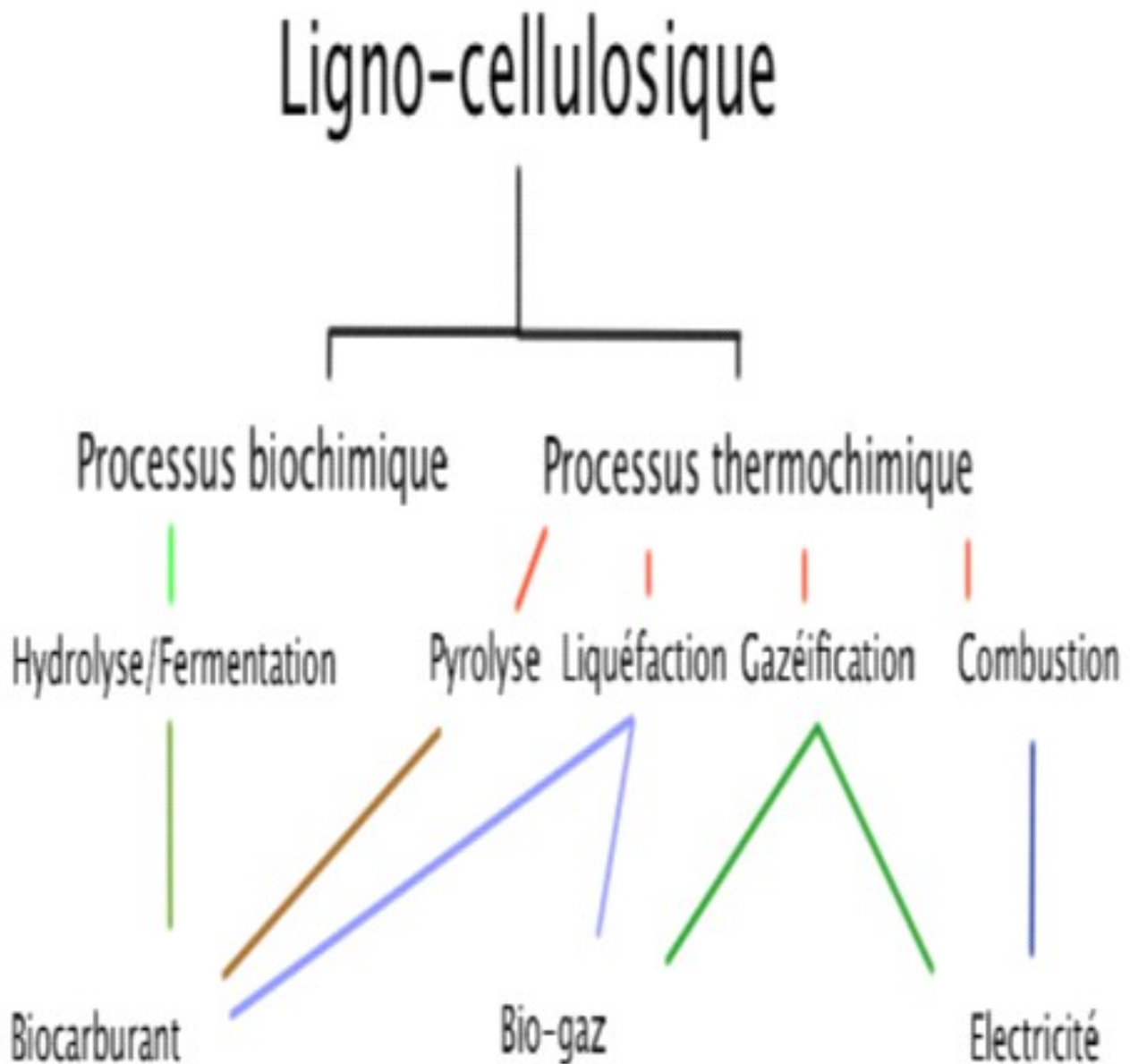


Figure 5 : Récapitulation de la deuxième génération de biocarburant (Paillet , 2013).

4.5 Les principales sources de la biomasse lignocellulosique

Les pailles, parties résiduelles des céréales, représentent environ 50% du poids total de la plante, principalement utilisées dans l'alimentation animale.

Cependant, l'utilisation récentes a inclu les biocarburants par la conversion possible de la lignocellulose en bioéthanol , les arbres à croissance rapide et les herbes telles que l'eucalyptus, le chanvre, le miscanthus, la canne de Provence.

MATERIELS
ET
METHODES

1. Isolement et criblage de souches bactériennes productrices de cellulase

1.1 Echantillonnage

L'échantillonnage est effectué à l'aide d'une spatule stérile à partir d'un sol de Citronnier, Néflier du japon, de pois chiche, d'Araucaria et d'écorce d'Olivier respectivement (**Figure 6, 7, 9, 10, 11**).

A l'aide d'une spatule stérile environ 100g d'écorce d'olivier sont prélevés en grattant la surface externe de l'arbre, ainsi une pesée de 100g est prélevée au niveau de la rhizosphère du sol, et du fumier à une profondeur d'environ 10-15 cm. Les échantillons sont récoltés dans des pots stériles avec étiquetage et transportés directement au laboratoire.



Figure 6: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de la rhizosphère du citronnier.



Figure 7 : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de la rhizosphère du Néflier du Japon.



Figure 8 : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du fumier.



Figure 9 : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de l'écorce de l'olivier.



Figure 10 : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du pois chiche .



Figure 11 : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir de l'araucaria.

1.2 Enrichissement

Une pesée d'un gramme des prélèvements effectués (sol de la rhizosphère, fumier et écorce d'olivier) est inoculée séparément dans une fiole Erlenmeyer stérile, contenant un volume de 100 ml du milieu de culture liquide Cellulose medium salt (**Annexe 1**), incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

1.3 Isolement des bactéries cellulolytiques

A partir des pré-cultures enrichies sur le milieu de culture liquide CMS, un ensemencement sur milieu de culture CMS gélosé et réalisé par la méthode d'épuisement sur trois quadrants. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant 24 heures (**Yin LJ et al. , 2010**).

1.4 Purification et conservation des souches productrices de la cellulase

Les souches isolées, sélectionnées productrices de cellulase sont purifiées par des repiquages successifs sur la surface du milieu de culture CMS gélosé et sur le milieu PCA (**Annexe 1**), incubées à une température de 30°C pendant un intervalle de temps de 24 heures. Les colonies obtenues sont ensuite ensemencées sur le milieu CMS en gélose inclinée et conservées à une température de 4°C, des repiquages réguliers sont effectués pendant un intervalle de 6 semaines.

-Congélation des souches productrices de la cellulase

Les souches isolées, sélectionnées productrices de cellulase sont inoculées sur le milieu de culture BHIB (**Annexe 1**), incubées à une température de 30°C pendant un intervalle de temps de 24 heures. Un volume de 1 ml de cette culture est prélevé dans un Eppendorf stérile, additionné d'un volume de 0,5 ml d'une solution de 20% de glycérol, conservées à une température de -20°C, des repiquages réguliers sont effectués pendant un intervalle de 6 mois.

1.5 Screening des souches productrices de la cellulase

La mise en évidence l'activité cellulolytique des souches bactériennes isolées à partir des différents échantillons récoltés est effectuée par ensemencement des colonies purifiées par spot (touche) au centre de la boîte de Pétri sur la surface du milieu de culture CMS gélosé, incubées à une température de 30°C pendant un intervalle de temps de 48 heures. Les boîtes de Pétri sont ensuite inondées avec une solution de rouge Congo à une concentration de 1%, déposées auprès du bec de Bunsen pendant 15 minutes, l'excès de la solution du rouge Congo est éliminé.

Les boîtes de Pétri sont ensuite lavées avec une solution de 1M NaCl. Une lecture positive se manifeste par la formation d'une zone d'hydrolyse, les diamètres de la zone d'hydrolyse sont mesurés à l'aide d'une règle (**Andro *et al.* , 1984**) , les souches bactériennes présentant des zones d'hydrolyses les plus large seront sélectionnées comme souches bactériennes plus performantes productrices de la cellulase.

2. Etude enzymatique

2.1 Production de l'enzyme cellulase

Le milieu de culture préconisé pour la production de la cellulase en mode de fermentation submergée contient les principaux ingrédients:(cellulose 1%, K_2HPO_4 0,2% , $MgSO_4$ 0,03% , peptone 1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,25%), ajusté à une valeur de pH de 7 (**Yin LJ *et al.* , 2010**).

2.2 Mise au point de la production de la cellulase

La production de la cellulase est réalisée dans des Fiole Erlenmeyer de 500 ml contenant un volume de 100 ml de milieu de culture de production stérile, ajusté une valeur de pH de 7. Les fioles Erlenmeyer sont inoculées avec une colonie bactérienne prélevée à partir d'une culture jeune (moins de 18 heures), incubées à température ambiante sous une agitation de 100 rpm, pendant un intervalle de temps de 24 heures.

2.3 Récupération de la cellulase

Un prélèvement d'un volume de 1ml de la culture des souches sélectionnées productrices de la cellulase, inoculé dans le milieu de fermentation est récolté dans un Eppendorf stérile, soumis à une centrifugation de 10000 g, à une température de 4°C, pendant un intervalle de 10 minutes. Le surnageant obtenus est utilisé comme source de la cellulase brute (**Shoham *et al.* , 1999**).

2.4 Mesure de l'activité de la cellulase

L'activité de la cellulase est estimée par mesure de la quantité des sucres réducteurs libérés selon la méthode décrite par **Miller (1959)**. La mesure de l'activité enzymatique est effectuée par l'introduction d'un volume de 0,5 ml de la solution enzymatique, additionnée d'un volume de 1 ml de la solution de 0,05M tampon de phosphate contenant une concentration de 1% de cellulose. La réaction enzymatique est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel dans un bain marie à une température de 50°C pendant 30 minutes, stoppée par l'ajout d'un volume de 1 ml du réactif de DNS et incubée ensuite à une

température de 100°C pendant 10 minutes. La lecture est effectuée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm et la concentration en sucres réducteurs est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage du glucose (**Annexe 2**), dont les concentrations varient de (0-0,2-0,4-0,6-0,9-1,2).

2.5 Optimisation des conditions nutritionnelles pour la production de la cellulase

Dans le but d'optimiser la production de la cellulase des souches isolées sélectionnées productrices de cellulase dans un milieu de culture de production contenant différentes sources de carbones à des concentrations de (0,5 %) telles que l'amidon, le cellulobiose, le xylose, mannitol et une bandelette de papier whatman (0,5cm -5cm) , les sources d'azote à des concentrations de (0,01 %) telles que peptone, sulfate d'ammonium, caséine, gélatine sont mise en évidence (**Ifraan *et al* , 2012**).

La réaction enzymatique est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel dans un bain marie à une température de 50°C pendant 30 minutes, stoppée par l'ajout d'un volume de 1 ml du réactif de DNS et incubée ensuite à une température de 100°C pendant 10 minutes. La lecture est effectuée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm et la concentration en sucres réducteurs est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage du glucose (**Annexe 2**), dont les concentrations varient de (0-0,2-0,4-0,6-0,9-1,2 g).

2.6 Optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans l'activité de la cellulase

Effet de la valeur du pH sur l'activité de la cellulase

La valeur du pH optimale de l'activité de la cellulase chez les souches sélectionnées est déterminée par l'inoculation d'un volume de 0,5 ml du surnageant contenant la cellulase avec une solution tampon de phosphate de 0,05 M à 1% de cellulose, ajustée à différentes valeurs de pH (5.8, 6.2, 6.6, 7, 7.45, 8). La réaction est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel à une température de 50°C pendant 30 minutes et l'activité de la cellulase est mesurée par la méthode de la DNS (**Ifraan *et al* , 2012**).

Effet de la température sur l'activité de la cellulase

La température optimale de l'activité de la cellulase chez les souches sélectionnées est déterminée par l'inoculation d'un volume de 0,5 ml du surnageant contenant la cellulase avec une solution tampon phosphate de 0,05 M à 1% cellulose, ajustée à une valeur de pH égale à 8. La réaction est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel à des

températures de (20-100°C) pendant 30 minutes et l'activité de la cellulase est mesurée par la méthode de la DNS (**Ifraan *et al* , 2012**).

Effet des ions sur l'activité de la cellulase

Dans le but d'explorer l'effet des ions sur l'activité de la cellulase, les souches isolées, sélectionnées, sont inoculées dans des Fiole Erlenmeyer de 500 ml contenant un volume de 100 ml de milieu de culture de production stérile CMS, additionnées de sources d'ions : Ca^{+2} , K^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} à des concentration de (1%),

incubées à température ambiante sous une agitation de 100 rpm, pendant un intervalle de temps de 48 heures, l'activité de la cellulase est mesurée par la méthode de la DNS (**Ifraan *et al* , 2012**).

2.7 Etude du suivi de la cinétique de la cellulase

L'étude du suivi de la cinétique de la cellulase chez les souches isolées sélectionnées productrices de cellulase est effectuée par l'inoculation d'un volume de 0,5 ml de la cellulase brute produite par mode de fermentation submergée, avec 1ml de tampon phosphate 0,05M contenant 1% de cellulose, ajustée à une valeur de pH de 8.

La réaction enzymatique est amorcée par l'incubation du mélange réactionnel dans un bain marie à une température de 50°C à des intervalles temps (1, 2 , 5, 10 ,20, 30 min), stoppée par l'ajout d'un volume de 1 ml du réactif de DNS et incubé ensuite à une température de 100°C pendant 10 minutes , l'activité de la cellulase est mesurée par la méthode de la DNS (**Ifraan *et al* , 2012**).

La lecture est effectuée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde 540 nm et la concentration en sucres réducteurs est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage du glucose (**Annexe 2**), dont les concentrations varient de (0-0,2-0,4-0,6-0,9-1,2g).

3. Etude du suivi de la cinétique de croissance des souches bactériennes sélectionnées productrices de la cellulase

L'étude du suivi de la cinétique de croissance des souches bactériennes isolées sélectionnées productrices de cellulase est réalisée par l'inoculation d'une colonie pure dans un volume 100 ml du milieu de culture liquide de CMS, incubé à une température ambiante sous une agitation de 100 rpm, pendant un intervalle de temps de 24 heures. La biomasse des cultures est ajustée à une densité optique initiale de 0.2, mesurée à une longueur d'onde de 550 nm , des prélèvements d'un volume de 1 ml, à des intervalles de temps réguliers de 6 heures sont effectués.

4. Identification des souches isolées

4.1 Identification phénotypique

L'identification préliminaire des souches isolées est basée essentiellement sur l'étude des caractères macroscopiques (couleur, relief, bordure, taille, élévation, opacité, surface des colonies), l'étude microscopique (coloration de Gram), étude des enzymes respiratoires terminales (recherche de la catalase et de l'oxydase), étude des caractères biochimiques : métabolisme des molécules larges (lipase, amylase, caséinase) ainsi que l'utilisation de la galerie API20E.

4.1.1 Examen macroscopique

Le diagnostic bactérien primaire est basé sur la description de l'aspect macroscopique des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase qui permet de procéder à une première caractérisation et la détermination des principaux caractères tels que la forme, la taille, la couleur et la consistance (**Thoma *et al.* , 1970**).

Une observation macroscopique des colonies sur deux milieux de cultures utilisés le CMS et le PCA est effectuée à l'œil nu. Le second milieu de culture permet de visualiser les caractéristiques des colonies dû a son aspect translucide.

4.1.2 Coloration de Gram et examen microscopique

La purification des souches isolées sélectionnées productrices de la cellulase est procédée par des repiquages successifs. La coloration de Gram et l'observation microscopique permet de distinguer deux grands groupes bactériens ; des bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs avec la détermination de la forme, la taille, et le mode de regroupement. Cependant, l'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes.

4.1.3 Etude des enzymes respiratoires terminales

Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui intervient dans la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène et en eau selon la réaction suivante :



Après l'étalement d'une colonie bactérienne sur une lame propre, une goutte d'eau oxygénée 10 volumes est déposée à l'aide d'une pipette de Pasteur boutonnée. Une lecture positive de la présence du catalase se manifeste par l'apparition de bulles d'air, due principalement à la production d'oxygène.

Recherche de l'oxydase

La recherche de l'oxydase est utilisée pour l'identification des bacilles à Gram négatif.

La présence de l'enzyme phénylène diamine oxydase est mise en évidence après le dépôt du disque d'oxydase sur une lame propre et leur imprégnation avec une suspension bactérienne pendant 2 minutes. Une réaction positive de la présence de l'oxydase se manifeste par le virage de la couleur du disque au rose-rouge (Joffin et Leyral, 2006).

4.1.4 Métabolisme des molécules larges

Recherche de l'amylase

Un ensemencement en spots ou en stries des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase sur la surface de la gélose nutritive additionnée d'une concentration de 1% d'amidon est réalisé afin de déterminer l'activité amylolytique. Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 24 heures, ensuite recouvertes avec une solution de Lugol. Une réaction positive de l'hydrolyse de l'amidon se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, à l'opposé une réaction négative est traduite par la formation d'une couleur bleu autour de la culture (De VOS et al. , 2009).

Recherche de la caséinase

La mise en évidence de la présence de la caséinase chez des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase est effectuée par ensemencement en spots ou en stries de la surface de la gélose nutritive, additionnée d'une concentration de 1% de lait écrémé. Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Une lecture positive de la production de la caséinase se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (De VOS et al. , 2009).

Recherche de la lipase

La mise en évidence de la présence de l'enzyme lipase chez des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase est effectuée par ensemencement en spots ou en stries de la surface de la gélose nutritive, additionnée d'une concentration de Tween 80 (16ml/l). Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Une lecture positive de la production de la lipase se manifeste par l'apparition d'un halo opaque autour de la colonie due à la précipitation d'acides gras issue de la lipolyse. (De VOS et al. , 2009).

4-1-5 Identification par la galerie API20E (BioMérieux SA ; 2010)

L'utilisation de la galerie API[®] 20 E permet la mise en évidence de quelques tests biochimiques tels que la β -galactosidase (ONPG), l'Ornithine 0décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d'H₂S, utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres.

La galerie API[®] 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes de la galerie API[®] 20 E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Les réactions positives des tests effectués sont traduites par les virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs. Une lecture est effectuée à l'aide du tableau (**Biomérieux , 2006**).

-Identification

L'identification est réalisée par l'utilisation de la notice disponible avec le kit et l'introduction du code dans un logiciel d'identification (Logiciel Identax).

4.2 Identification génotypique (Proméga France)

4.2.1 Extraction de l'ADN

La méthode de l'extraction de l'ADN chromosomique par choc thermique consiste l'inoculation d'une colonie isolée, sélectionnée productrice de la cellulase dans un tube d'Eppendorf d'un volume de 1,5 ml, contenant un volume de 1 ml de l'eau bi distillée.

Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un Vortex pendant un intervalle de temps de 3 à 5 minutes. Les tubes sont ensuite placés dans un bain marie, chauffés à une température de 96°C pendant 10 minutes, déplacés dans sur la glace pendant 15 min, centrifugés à une vitesse de 6000g/min et stockés à une température de -20°C .

4.2.2 Amplification des fragments de l'ADN

L'amplification des fragments par la technique de la PCR est réalisée dans un Icyclor de Biorad (Biorad, USA), par l'utilisation des amorces universelles décrites par LANE (1991) synthétisées par Eurogentec, (Belgique), qui permettent d'amplifier le fragment d'ADN, codant la région 16SrDNA (1.5 Kb).

·27f (forward): 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'.

·1492R (Reverse): 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'.

Cette technique consiste à introduire un volume de 4 μ l de l'ADN génomique, obtenu par

extraction à l'aide d'un choc thermique dans un Eppendorf, ensuite un volume de 25µl de mixture réactionnelle est ajouté.

Réactifs	Concentrations Initiales	Concentrations Finales	Volume à prélever
Eau ultra pure			
Tampon de Promega	Taq5X	1X	5 µl
MgCl ₂	25mM	1,5 mM	1,5 µl
dNTP	25mM	0,2mM	0,2 µl
Amorce 27F	10 µM	0,5	1,25 µl
Amorce 1492R	10µM	0,5	1,25 µl
Taq polymérase Promega	5U	1U	0,2 µl
ADN génomique (Suspension Bactérienne)			4 µl
Volume final :			25 µ

Condition de la PCR

Dénaturation initiale 95°C pendant 5min

35cycles

Dénaturation 95°C pendant 30

Hybridation 58°C pendant 30(*)

Elongation 72°C pendant 45

Elongation finale 72°C pendant 7min

Stockage avant révélation 10°C jusqu'à utilisation

Les fragments d'ADN amplifiés par la technique de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à une concentration de 1,5%, révélés par l'ajout d'un volume de 10 µl du colorant de bromure d'éthidium à une concentration de (0,5µg/ml). Les fragments d'ADN sont visualisés par l'utilisation d'une lampe à Ultra violet et ensuite photographiés.

4.2.3 Purification de l'ADN par centrifugation

Un volume de 10 µl d'une solution digestive du gel d'agarose est ajouté au fragment d'ADN séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, transféré dans un Eppendorf stérile, incubé à une température de 50°C -65°C jusqu'à la dissolution du gel. La solution est ensuite transférée dans un tube collection, incubée à température ambiante pendant un intervalle de temps d'une minute, centrifugée à une vitesse de 16000 g pendant d'une minute. Des lavages successifs sont procédés par l'ajout d'un volume de 700 µl d'une solution de l'éthanol, centrifugée à une vitesse de 16000 g pendant d'une minute. Les micro tubes d'Eppendorf contenant la solution sont ouverts pendant un intervalle de temps d'une minute, afin d'assurer l'évaporation de l'éthanol.

Un volume de 50 µl d'une solution de la nucléase est ajouté à la solution d'ADN, incubé à une température ambiante pendant une minute, centrifugé à une vitesse de 16000 g pendant d'une minute, conservé à une température 4°C ou -20°C, jusqu'à l'utilisation ultérieure.

4.2.4 Séquençage de l'ADN

Le séquençage des produits de la PCR de l'ADN ribosomal 16s obtenus sont purifiés et séquencés par l'utilisation des amorces universelles (27F et 1492R) selon la technique décrite par Sanger (**GATC biotech, Germany**). Les séquences obtenues sont comparées avec celles de la banque de données GeneBank par l'utilisation du Programme blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) de NCBI.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Description des échantillons

L'origine des prélèvements et la codification des souches isolées à partir de différents échantillons prélevés sont décrites dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Origine des prélèvements, la codification des souches isolées et la description des caractéristiques des échantillons.

Site de prélèvement des échantillons	Codification	Description
Rhizosphère du Néflier du Japon	EC2	Petits granules marron chocolat odeur de géosmine
Rhizosphère du citronnier	EC1	Petits granules marron foncé odeur de géosmine
Rhizosphère de la rocarya	RO2	Petits granules marron chocolat odeur de géosmine
Fumier de vache	EC3	Couleur marron foncé avec une très forte odeur
Rhizosphère du pois chiche	Ps	Petits granules marron très clair inodore
Ecorce de l'olivier	EC4	couleur marron clair facilement détachable sous forme de plaque de taille moyenne.

2. Isolement et purification des souches bactériennes productrices de la cellulase

L'isolement de souches bactériennes productrices de cellulase est effectué à partir de cinq échantillons prélevés au niveau de différents sites tels que l'Institut de l'agriculture (ITMA), Institut national de recherches en agronomie (INRA) et jardins de la région de Sidi Bel Abbès (Algérie).

L'échantillonnage des différents prélèvements effectués ont permis l'isolement de 16 souches bactériennes sur le milieu de culture gélose CMS et PCA, ajustés préalablement à des valeurs de pH de 7.

La présence d'une population bactérienne réduite, isolée à partir des échantillons effectués des sols et fumier est expliquée par la période des prélèvements effectués durant le mois de Février (2015), caractérisé par une forte pluviométrie, induisant une inhibition de la prolifération des bactéries présentes dans l'environnement.

Concernant l'isolement des bactéries à partir de l'écorce d'olivier reste mal expliquée puisque les travaux scientifiques sur l'arbre concernent généralement l'isolement de bactéries lactiques à partir du fruit,

l'espèce bactérienne la plus étudiée qui colonise l'écorce de l'olivier appartient au genre *Pseudomonas savastanoi* responsable de tumeur « tuberculose de l'olivier » au niveau du système de circulation de la sève.

2.1 Screening des souches bactériennes productrices de la cellulase

Le screening primaire des souches bactériennes productrices de la cellulase, isolées à partir de 05 échantillons prélevés au niveau de différents sites est effectués sur le milieu de culture synthétique (CMS), contenant de la cellulose comme seule source de carbone, incubées à une température de 30°C, pendant un intervalle de temps de 48 heures.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 16 souches isolées à partir de 05 échantillons prélevés au niveau de différents sites, 5 souches bactériennes ont manifesté une importante activité cellulolytique, dont les diamètres de la zone d'hydrolyse de la cellulose varient entre 52 et 60 mm. Par ailleurs, d'autres souches isolées ont présenté une moyenne activité cellulolytique, dont les diamètres des zones d'hydrolyse de la cellulose sont de 30 et 49 mm. Par ailleurs deux souches (EC4, EC4'') ont révélé une faible production de la cellulase, dont les diamètres de la zone d'hydrolyse de la cellulose sont de 3 et 10 mm respectivement. (**Tableau 3**).

Cette méthode de sélection qui se base sur le diamètre de la zone d'hydrolyse nous a permis d'éliminer 11 souches sur les 16 souches étudiées. Les souche EC4', EC3', EC2', EC3'', RO2' sont retenues pour la suite de notre travail.

Tableau 3 : Illustration des diamètres de zones d'hydrolyse formées autour des colonies inoculées sur milieu de culture gélosé CMS, incubées à une température de 30°C pendant 48 heures.

Code de la souche	Diamètre
Ec2''	51mm
<u>RO₂'</u>	<u>60mm</u>
Ec4''	49mm
Ec3	40mm
<u>Ec3''</u>	<u>60mm</u>
<u>Ec3'</u>	<u>52mm</u>
<u>Ec4'</u>	<u>52mm</u>
Ec1'	39mm
Ec4	3mm
Ps5	30mm
Ec2	38mm
Ec1''	50mm
<u>Ec2'</u>	<u>60mm</u>
2	10mm
Ec4''*	10mm
Ec1	24mm

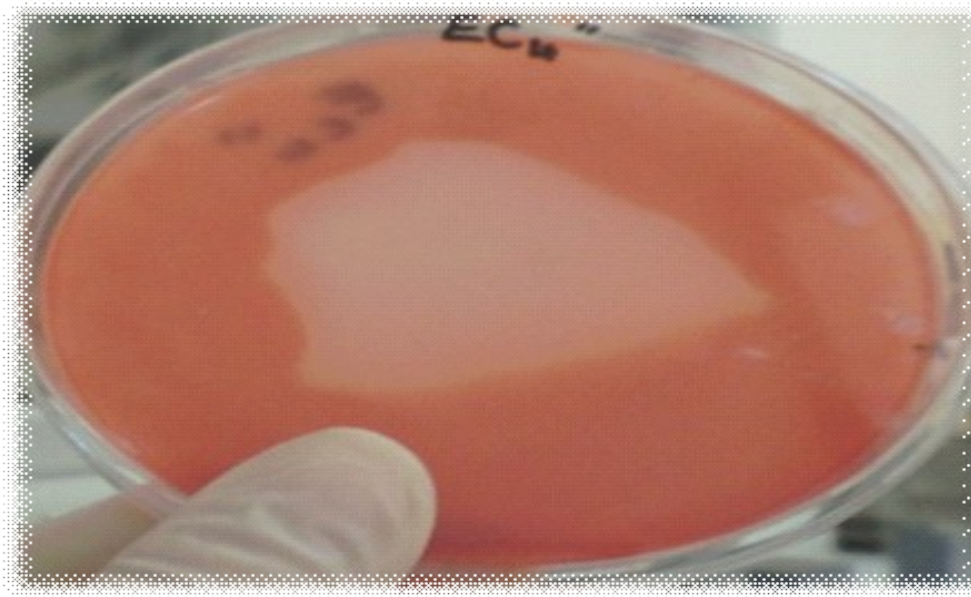


Figure 12 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC4'', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 13 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC4', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

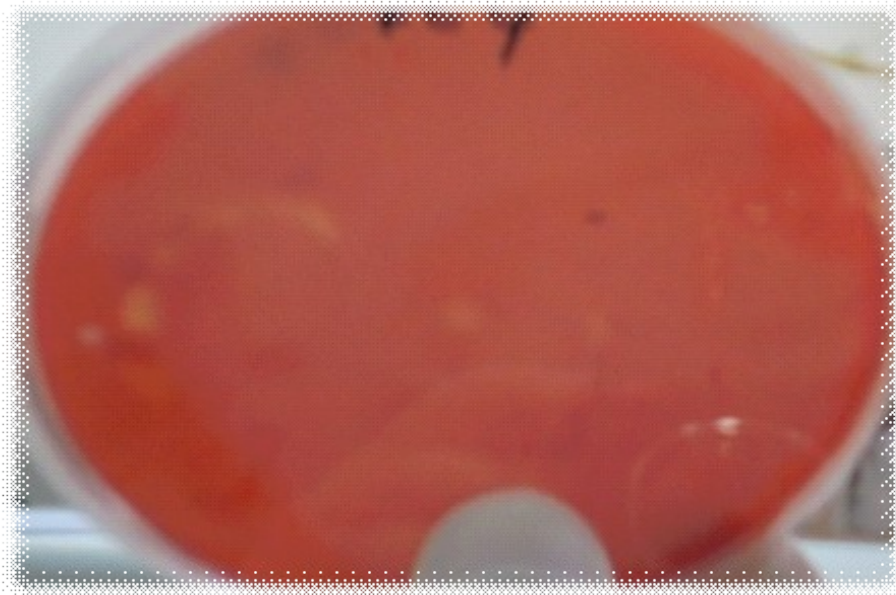


Figure 14 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez de la souche EC4, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 15 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC4''* inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

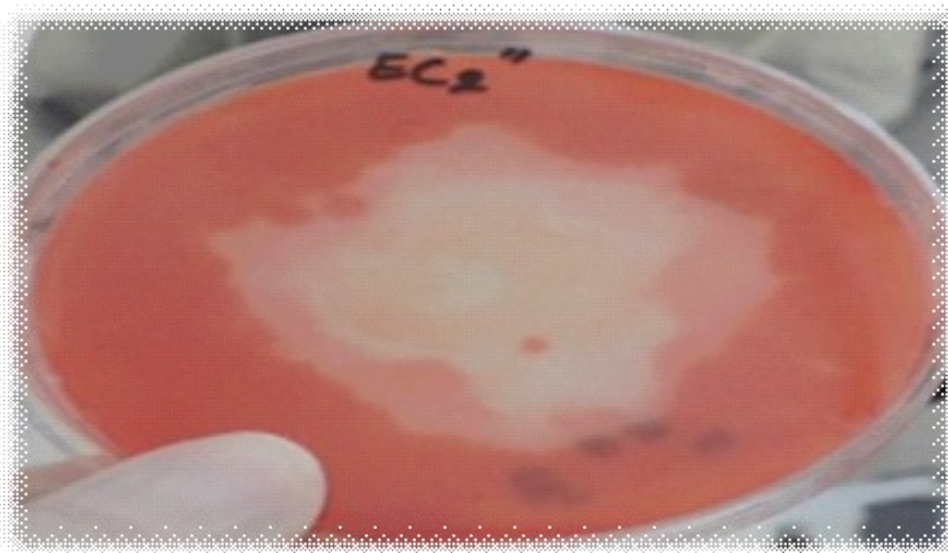


Figure 16: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC2", inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

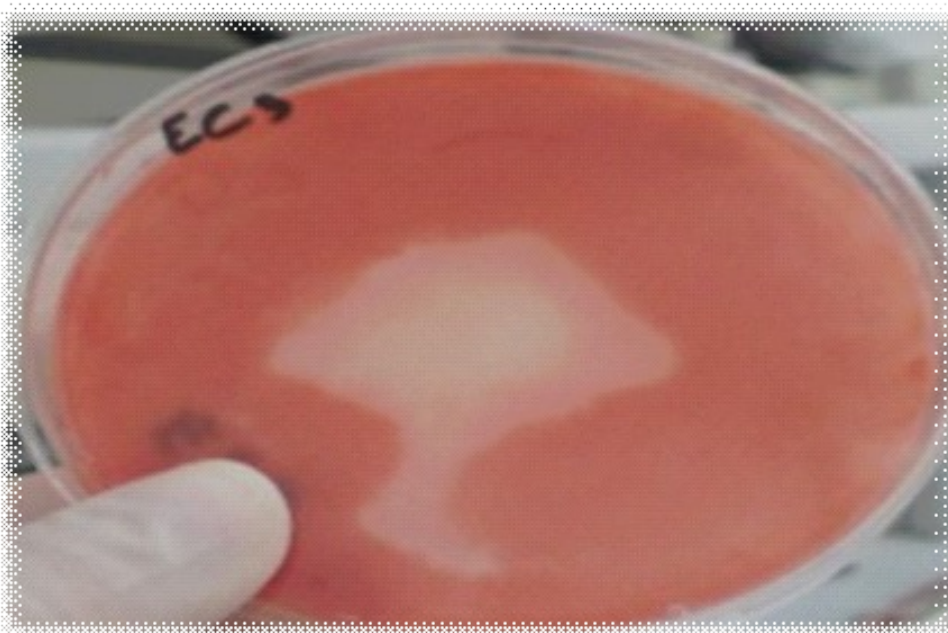


Figure 17: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC3, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

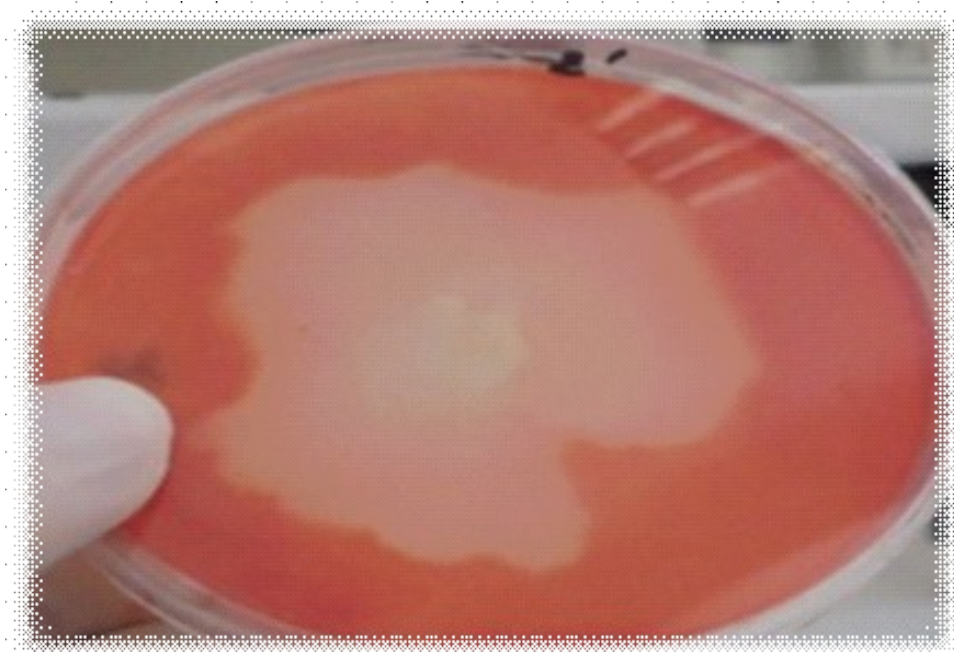


Figure 18 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche RO2', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

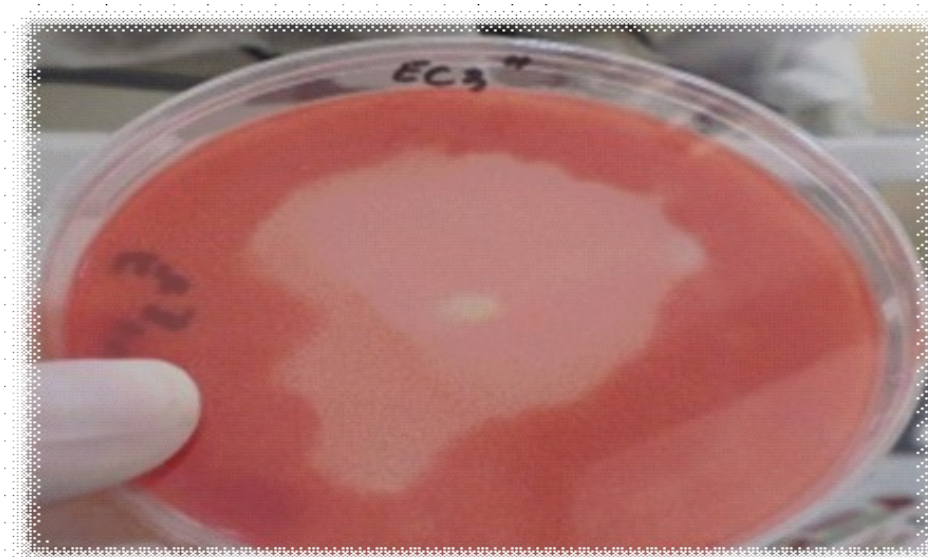


Figure 19 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC3'', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 20: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC3', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

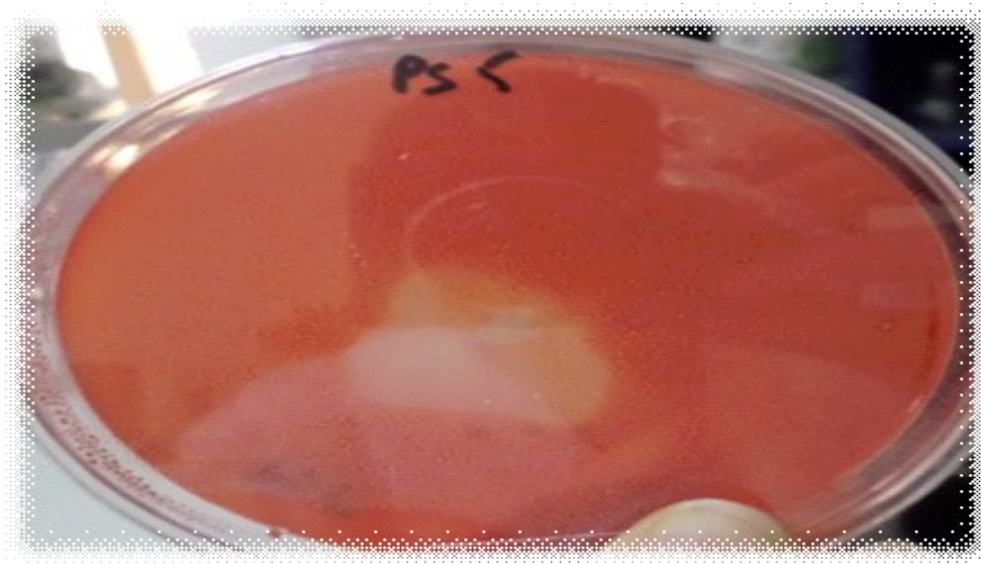


Figure 21: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche Ps5, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 22 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC2, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48heures.



Figure 23 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC1'', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 24 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC2', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

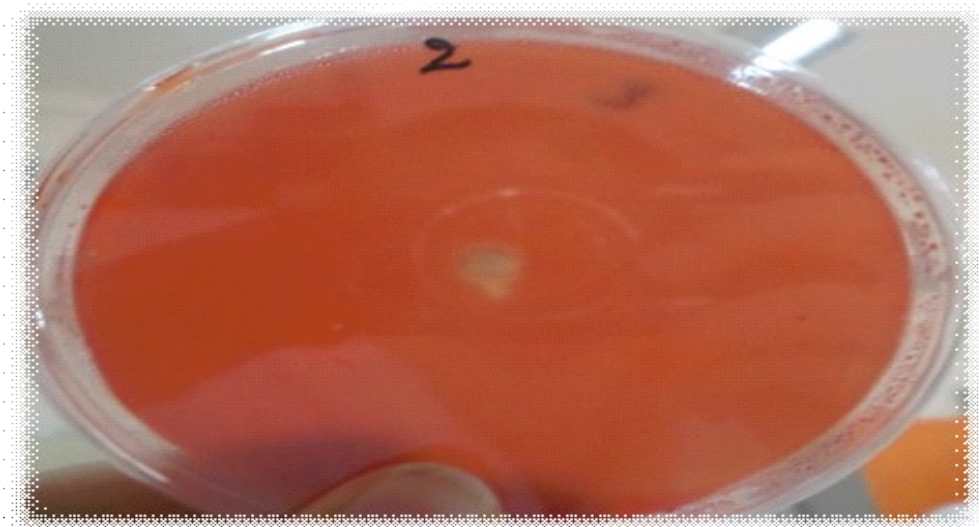


Figure 25 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche RO2, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

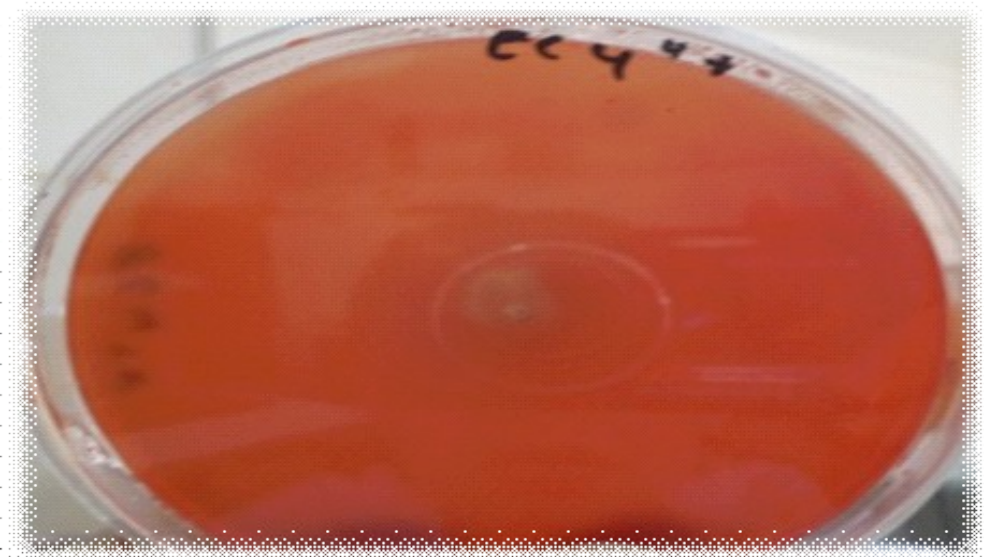


Figure 26 : Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC4, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

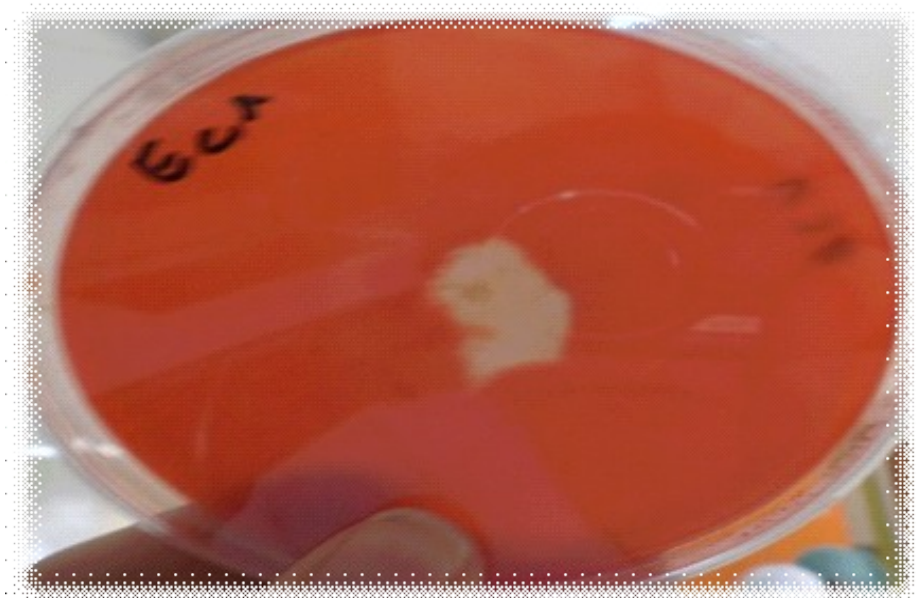


Figure 27: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC1, inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 28: Présentation de la zone d'hydrolyse formée, chez la souche EC1', inoculée sur le milieu de culture CMS, incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

3. Etude enzymatique

3.1 Production de la cellulase

L'utilisation de la méthode décrite par **Ando et ses collaborateurs (1984)**, basée sur la mesure du diamètre de la zone d'hydrolyse de la cellulose pour l'évaluation de la production de la cellulase chez les souches isolées, incubées à une température de 30°C pendant 48 heures, a permis la sélection des souches hautement productrices de la cellulase (EC4', EC3', EC2', EC3'', RO2'), avec des diamètres de zones d'hydrolyse de la cellulose de 52 mm à 60 mm.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 16 souches isolées à partir de 05 échantillons prélevés au niveau de différents sites, 5 souches bactériennes sélectionnées productrices de la cellulase sont utilisées pour l'évaluation de l'activité et l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de la cellulase.

La production de la cellulase est mise en évidence par la méthode de la fermentation submergée, lors de l'inoculation des souches sélectionnées productrices de la cellulase dans un milieu de culture CMS liquide, contenant la cellulose à une concentration de 1%, incubées à une température ambiante (environ 30°C) pendant un intervalle de temps de 24 heures. Le surnageant contenant la cellulase brute est récupéré par centrifugation à une vitesse de 10000 g à une température de 4°C pendant 10 minutes.

3.2 Evaluation de l'activité de la cellulase chez les souches sélectionnées

L'activité de la cellulase des 5 souches bactériennes isolées, sélectionnées productrices de la cellulase est évaluée lors de la fermentation submergée effectuée à une température ambiante (environ 30°C) pendant un intervalle de temps de 24 heures.

Les résultats obtenus ont montré que les souches sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC3', EC3'', EC2', RO2') ont manifesté une excellente activité productrice de la cellulase avec des taux de production de (0,7, 0,81, 0,82, 0,83, 0,90 UI/ml) respectivement.

Des études antérieures réalisées par **Ekperigin, (2007)** ont rapportés des taux de production de la cellulase de 0,48UI/ml et 2,56UI/ml chez les souches de *A. anitratus* et *Branhamella sp.*

En outre, la cellulose microcristalline utilisée dans cette étude est caractérisée par son insolubilité dans l'eau par rapport à la carboxyméthylcellulose. La cellulose microcristalline se rapproche de l'hémicellulose et de la lignine par la formation de liaisons hydrogène, formant des micros fibrilles constituant les parois cellulaires.

Les résultats obtenus ont montré que les souches sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC3', EC3'', EC2', RO2') ont manifesté un excellent pouvoir de dégradation de la cellulose microcristalline ajoutée au milieu de culture CMC, ce qui nous permet de conclure que l'utilisation de la cellulose microcristalline a démontré que les enzymes produits par nos souches peuvent être efficace dans l'hydrolyse de substrats naturels comme les déchets agricoles, confirmant ainsi les conclusions de (**Montenecourt et Eueleigh , 1979**) qui expliquent que la dégradation complète de la cellulose microcristalline est obtenue par une action synergétique d'un complexe enzymatique constitué d'endoglucanases, cellulobiohydrolases et les glucosidases.

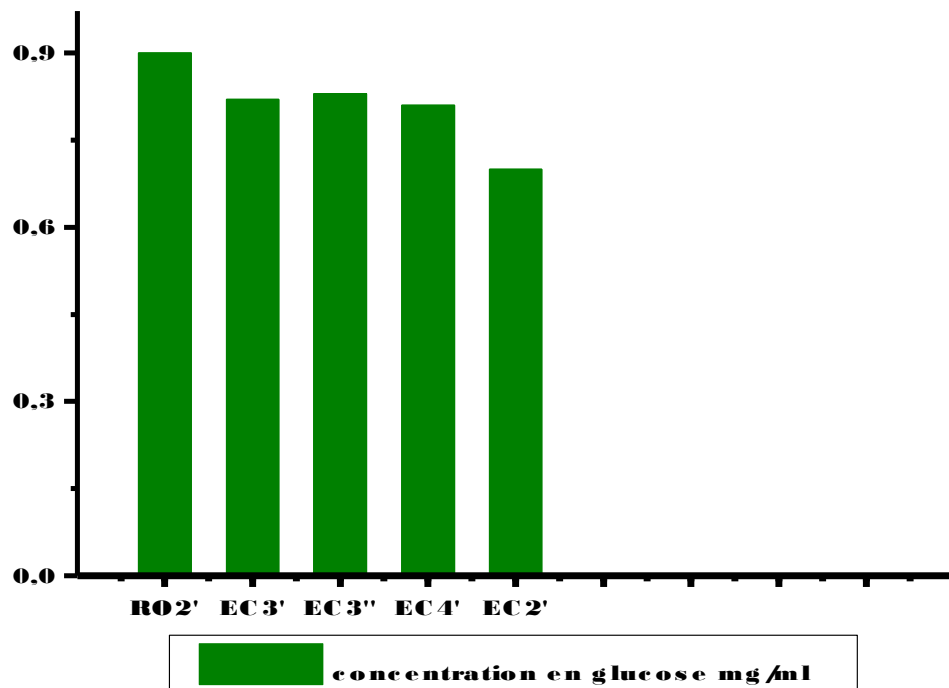


Figure 29 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez les souches sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2'), inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

3.3 Optimisation des conditions nutritionnelles pour la production de la cellulase

Afin de pouvoir établir les conditions nutritionnelles impliquées dans la production de la cellulase différentes sources sont utilisées.

L'effet de différentes sources de carbone sur la production de la cellulase chez les souches sélectionnées (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') est mis en évidence. Celles -ci sont inoculées dans un milieu de culture CMS, additionnée d'amidon, xylose, mannitol, le papier Whatman n°1, le cellulobiose à une concentration de 0,05%, incubées à une température ambiante (environ 30 °C) pendant 48 heures.

Les résultats obtenus (**Figure 30 ,31,32,33 ,34**) ont montré que les souches EC4' et EC2' ont manifesté une excellente production de la cellulase lors de l'ajout du papier Whatman n° 1, avec une taux de production de (2,14U, 1,62 UI/ml) respectivement.

Par ailleurs, les souches (EC3'', RO2', EC3') ont révélé lors de l'ajout de xylose, de mannitol et d'amidon des taux de production de (0,93, 1,43, 1,61 UI/ml) respectivement. Ces résultats informent sur la variabilité et les préférences pour les sources de carbone qui existent pour chaque souche étudiée et orientent le choix des substrats pour une utilisation ultérieure des souches ou de l'enzyme, des études similaires sont réalisées par (**Shabeb *et al.* , 2010 ;Robson *et al.* , 1984**) sur la production de la cellulase chez différentes espèces bactériennes telles que *Cellulomonas* sp, *Clostridium* et *Bacillus* sp.

L'effet de différentes sources d'azote sur la production de la cellulase chez les souches sélectionnées (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') est mis en évidence. Ces dernières sont inoculées dans un milieu de culture CMS, additionnée de sulfate d'ammonium, de peptone, de caséine, de la gélatine à une concentration de 0,01%, incubées à une température ambiante (environ 30 °C) pendant 48 heures.

Les résultats obtenus (**Figure 35, 36, 37, 38,39**) ont montré que les souches EC4', EC3' et EC3'' ont manifesté une excellente production de la cellulase lors de l'ajout du sulfate d'ammonium avec des taux de production de (8,66, 1,86, 0,92 UI/ml) respectivement. Par ailleurs, la souche RO2' a révélé un taux de production de la cellulase élevée en présence de la gélatine (0,7UI /ml) pour la souche EC2' sous l'effet du peptone la production de cellulase est estimée à (1UI/ml). Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux de (**Jaradat *et al.* , 2008**) qui obtiennent un maximum de production de cellulase en présence du (NH₄) SO₄, et (**Vyas *et al.* , 2005**) qui confirment que le sulfate

d'ammonium est la meilleure source d'azote pour une bonne activité endoglucanase et exoglucanase.

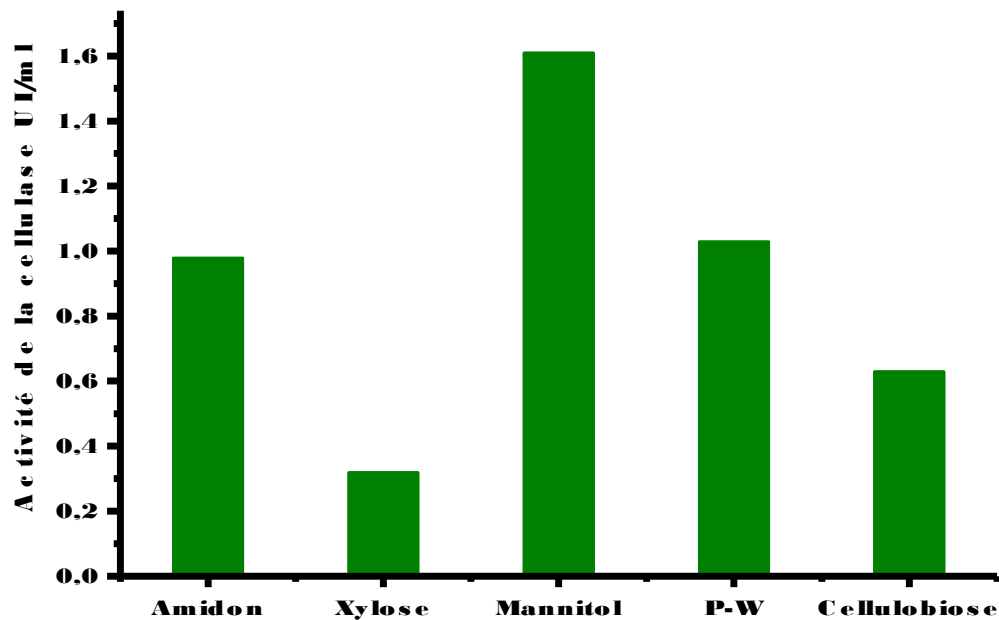


Figure 30 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC3'', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulobiose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

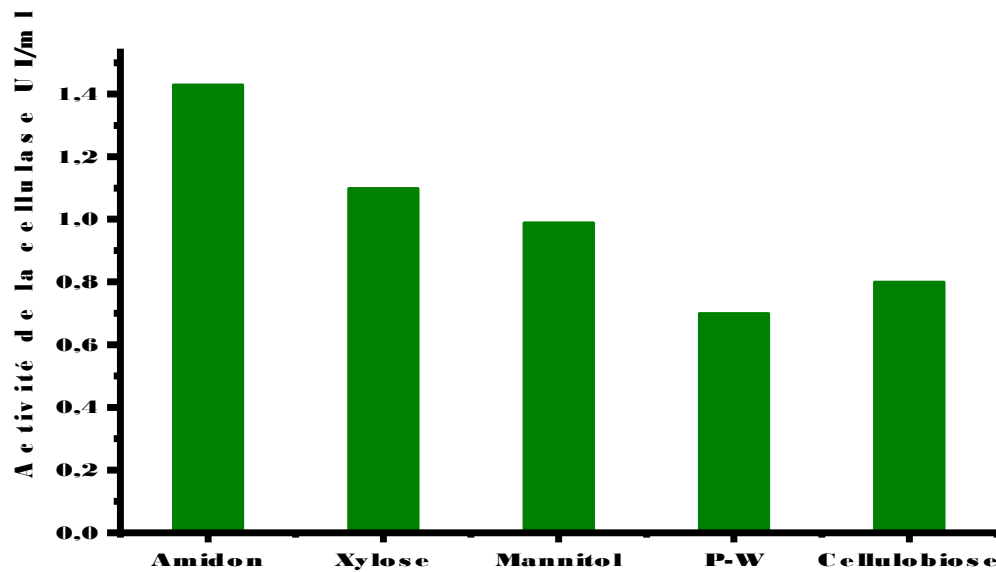


Figure 31 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche RO2', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulo-biose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

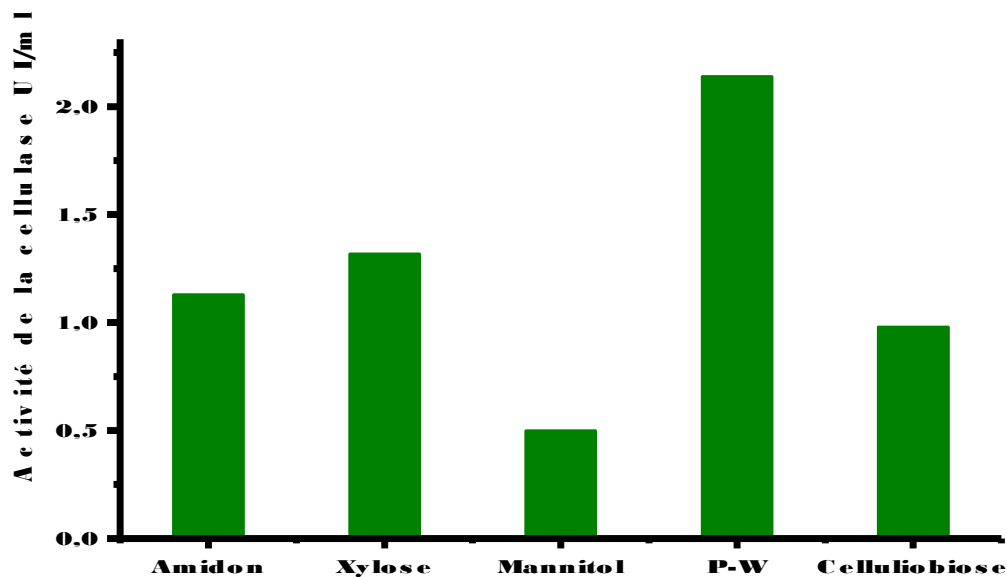


Figure 32 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC4', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulo-biose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures

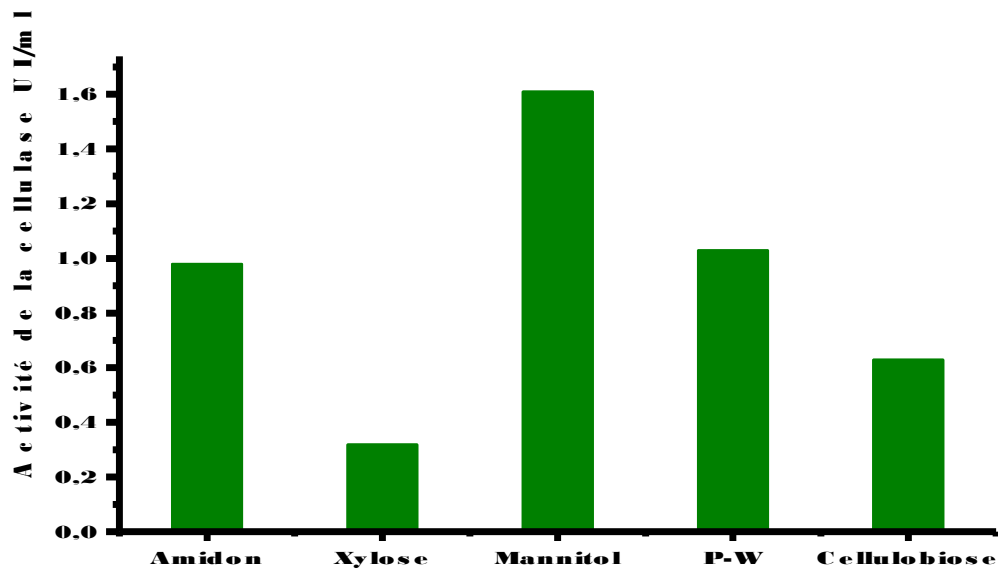


Figure 33 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC3', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulo-biose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

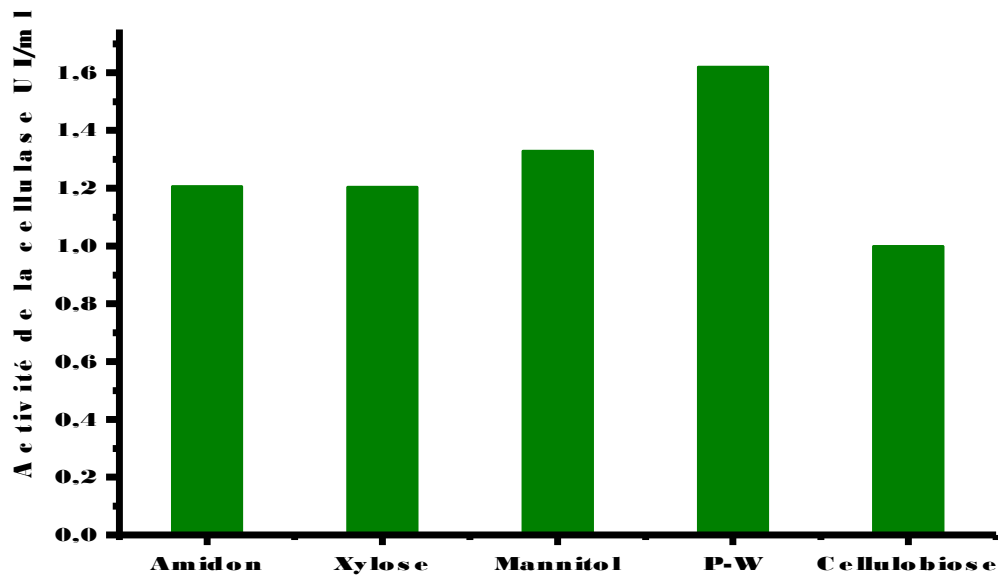


Figure34 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC2', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources de carbone (Amidon, Xylose, Mannitol, Papier Whatman, Cellulo- biose), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

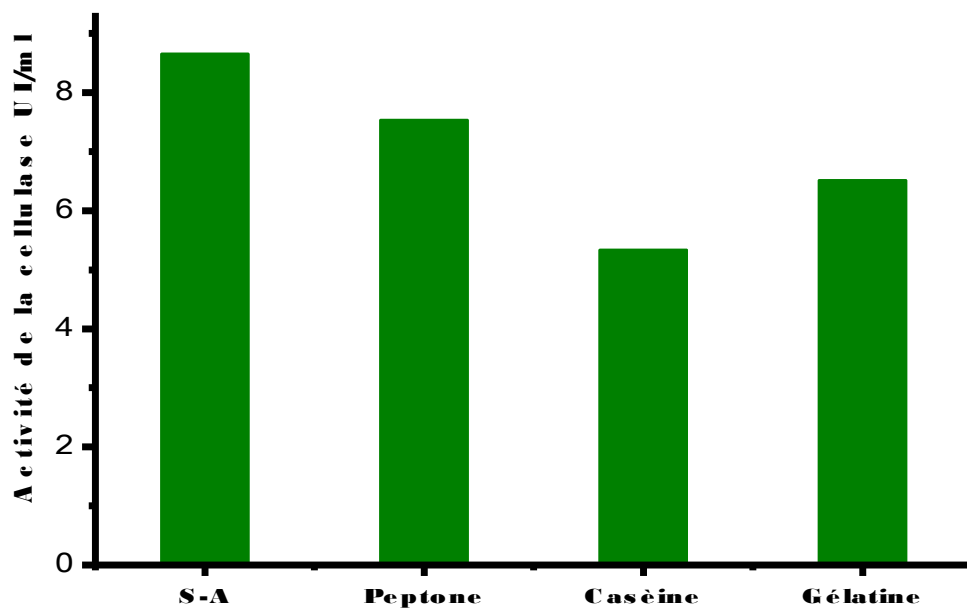


Figure 35: Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC4', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

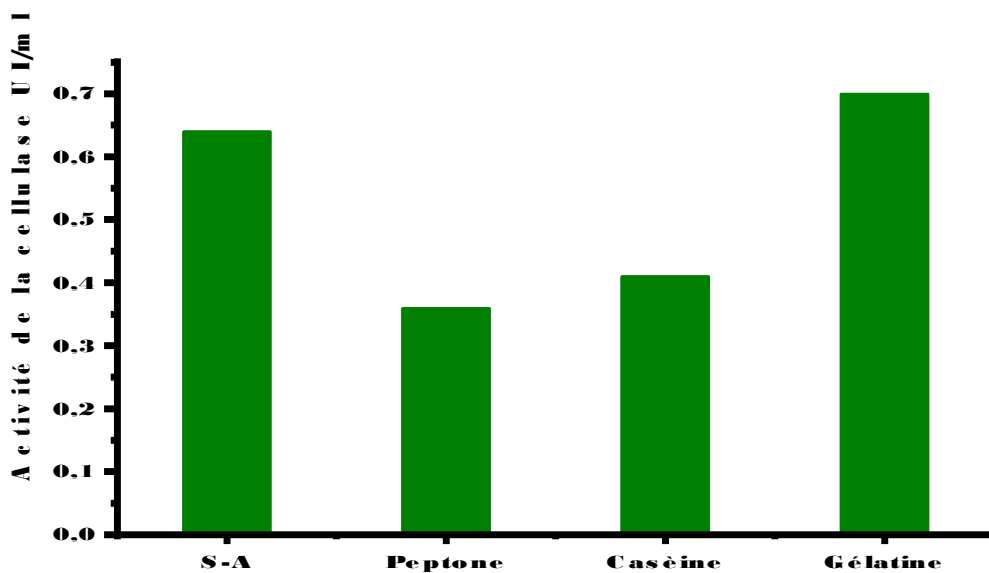


Figure 36 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche RO2', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

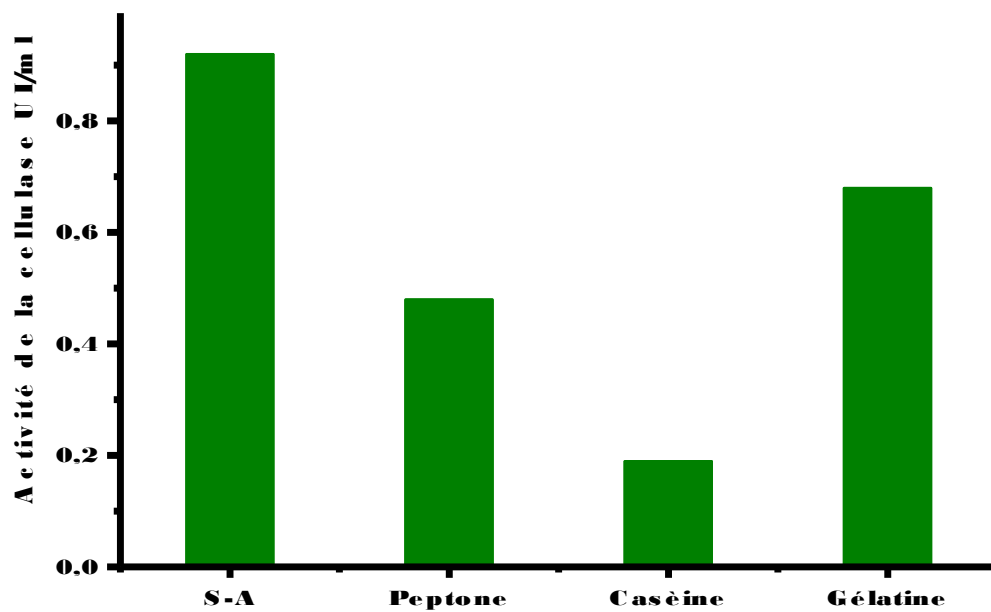


Figure 37 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC3'', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

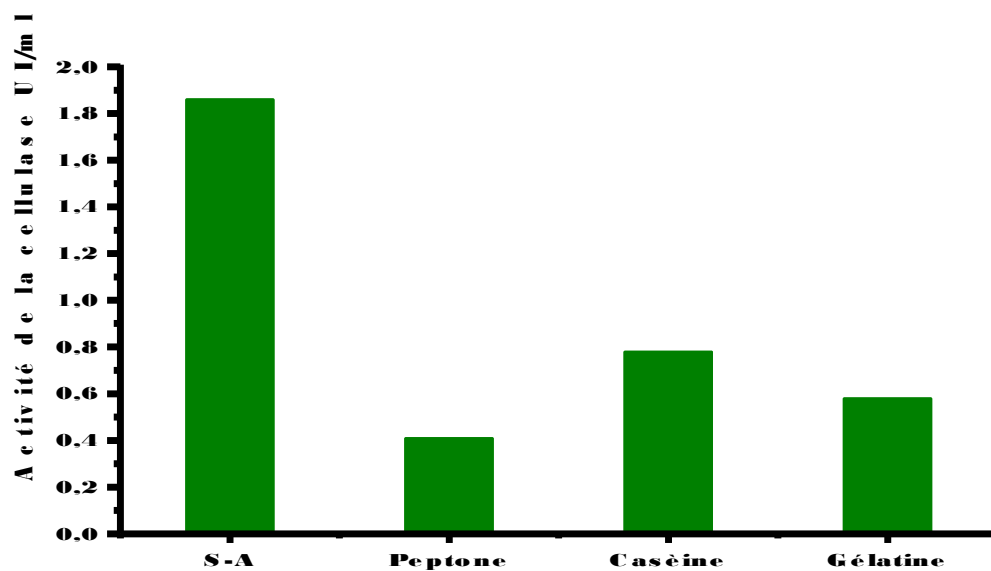


Figure 38 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC3'', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

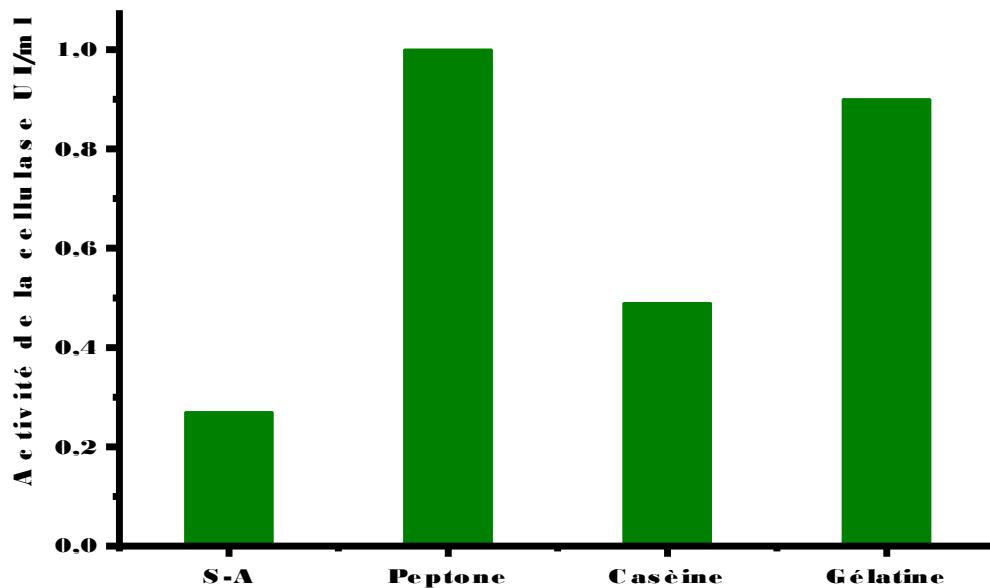


Figure 39 : Evaluation de l'activité de la cellulase chez la souche EC2', inoculée sur milieu CMS en présence de différentes sources d'azote (Sulfate d'ammonium, Peptone, Caséine, Gélatine), incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.

3.4 Optimisation des paramètres physicochimiques impliqués dans la production de la cellulase

-Effet du pH sur l'activité de la cellulase

L'effet de la valeur du pH sur la production de la cellulase chez les souches sélectionnées (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') est mis en évidence. Les souches sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sont inoculées dans un milieu de culture CMS, ajusté à différentes valeurs de pH, par fermentation submergée, incubées à une température ambiante (environ 30 °C) pendant 48 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 10000 g à une température de 4°C et l'activité de la cellulase brute est évaluée par la méthode de DNS.

Les résultats obtenus (**Figure 40, 41, 42, 43, 44**) ont montré que les souches sélectionnées productrice de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') ont manifesté une excellente production de la cellulase à des valeurs de pH comprises entre 6,2-7,45.

La présente étude est similaire à celle réalisée par (**Mawadza C *et al.* , 2000**) et (**Kim B *et al.* , 2009**) démontrant ainsi que le pH optimal pour l'activité de la cellulase est entre 5 et 6,5 pour les souches appartenant au genre *Bacillus*, de 6,5 pour *Bacillus subtilis subsp*

subtilis respectivement et confirmée par l'étude de (Lynd *et al.*, 2002) qui établie que la plupart des cellulases produites par différents microorganismes étudiés possèdent des activités entre les valeurs du pH de 3 à 7.

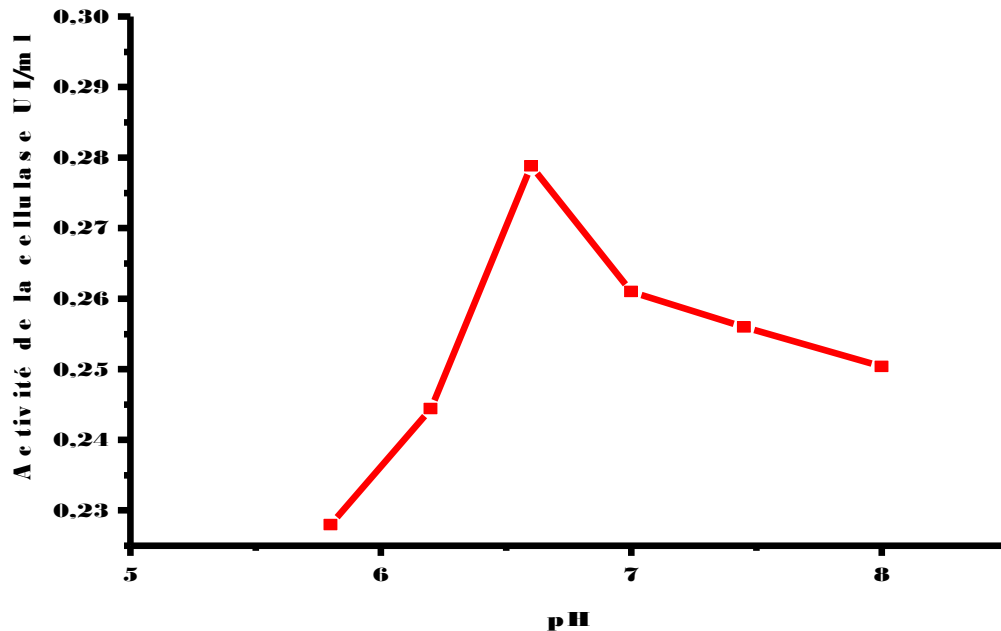


Figure 40 : Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche EC2' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

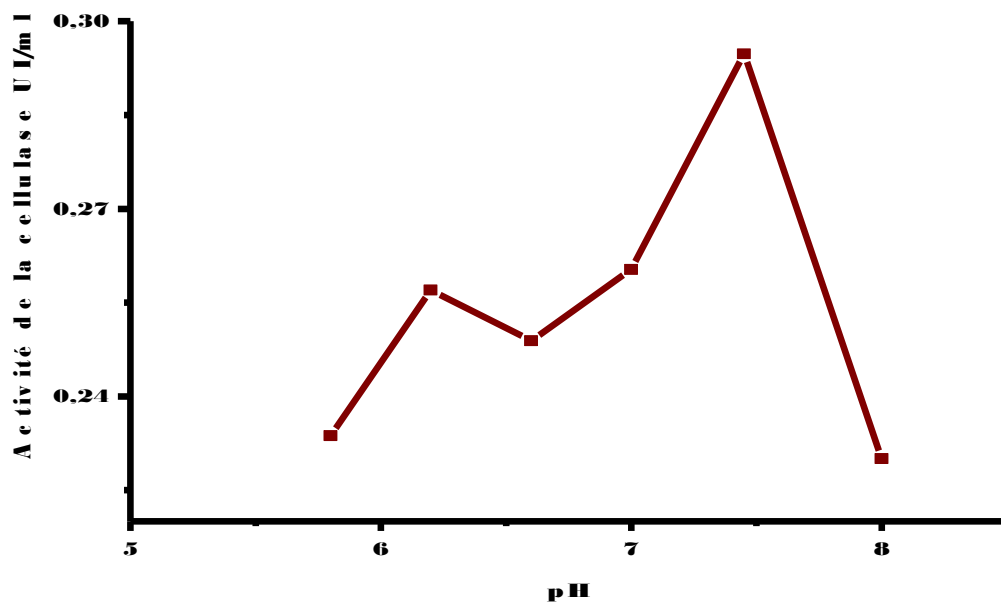


Figure 41 : Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche RO2' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

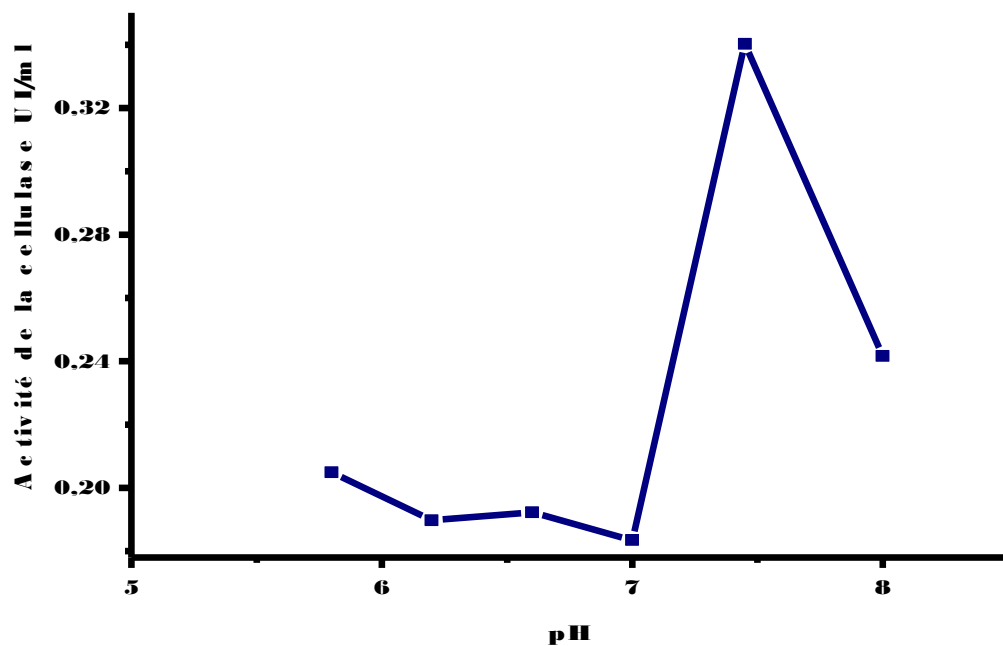


Figure 42 : Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche Ec3' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

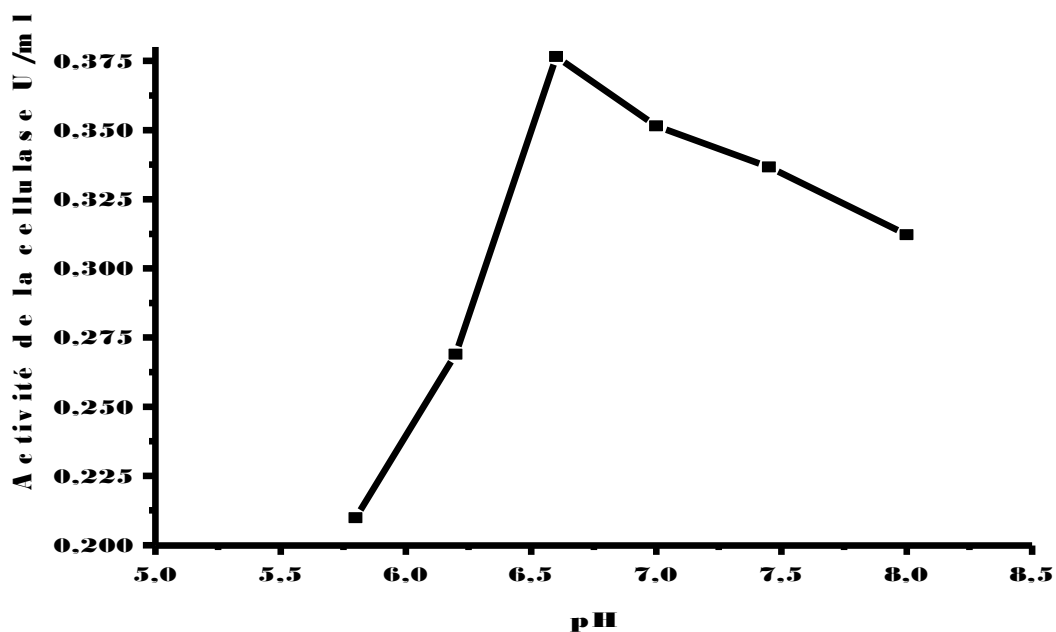


Figure 43 : Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche EC4' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

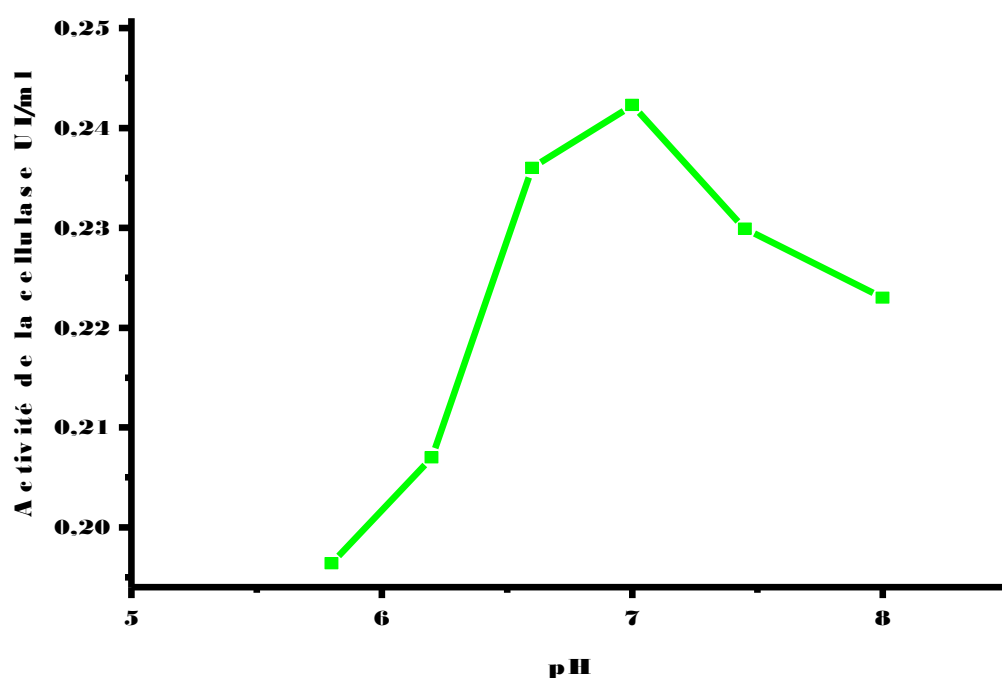


Figure 44: Effet du pH sur l'activité de la cellulase chez la souche EC3'' (—■—), incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

-Effet de la température sur l'activité de la cellulase

L'évaluation de l'effet de la température sur la production de la cellulase chez les souches sélectionnées (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') est mise en évidence. Les souches sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sont inoculées dans un milieu de culture CMS par fermentation submergée, incubées à différentes températures pendant 24 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 10000 g à une température de 4°C pendant 10 min et l'activité de la cellulase est évaluée par la méthode de DNS.

Les résultats obtenus (**Figure 46,47, 48, 49**) ont montré que les souches sélectionnées (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') ont manifesté une excellente production de la cellulase à une température de 40°C et l'activité de la cellulase est constante à des températures de 30 et 50°C au-delà de ces valeurs l'activité de la cellulase diminue et devient inactive à 100C.

Des travaux antérieurs réalisés par (**Yin *et al.* , 2010 ; Mawadza *et al.* , 2000**) ont rapporté que les températures optimales de l'activité de la cellulase des souches de *Bacillus subtilis* YJ1, *Bacillus* strains RH68 et CH43 sont (60 ,70, 65°C) respectivement. Par ailleurs,

Ando et ses collaborateurs (1984) ont rapporté que les cellulases bactériennes sont connues pour avoir une activité dans une gamme de température allant de 50 à 100°C.

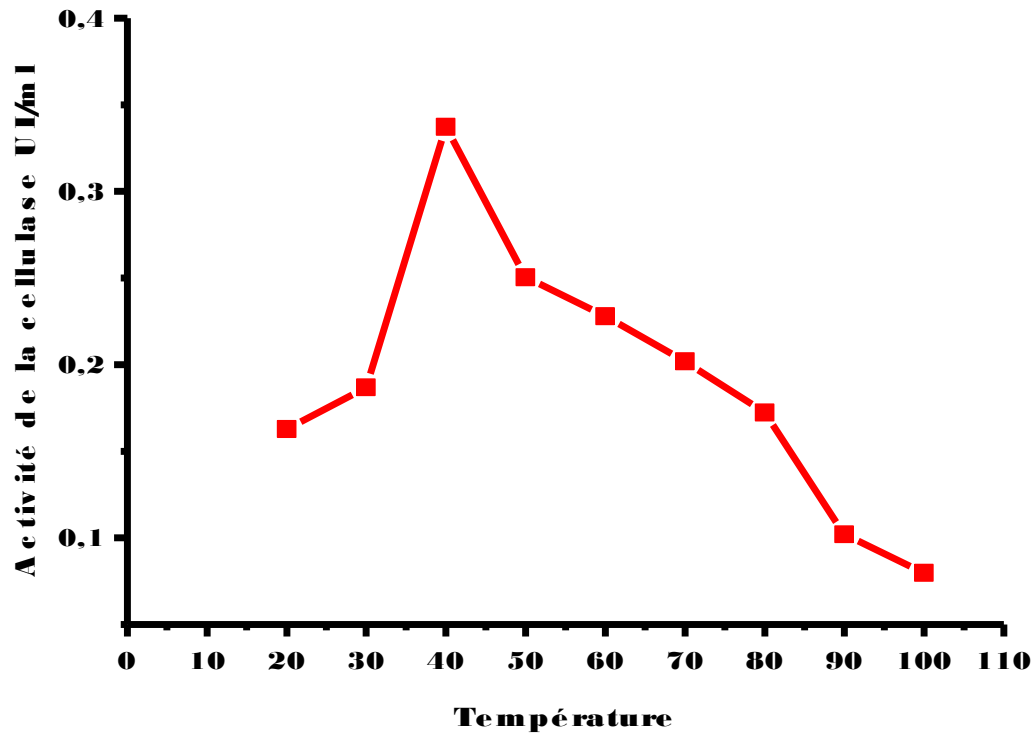


Figure 45 : Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche EC2' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

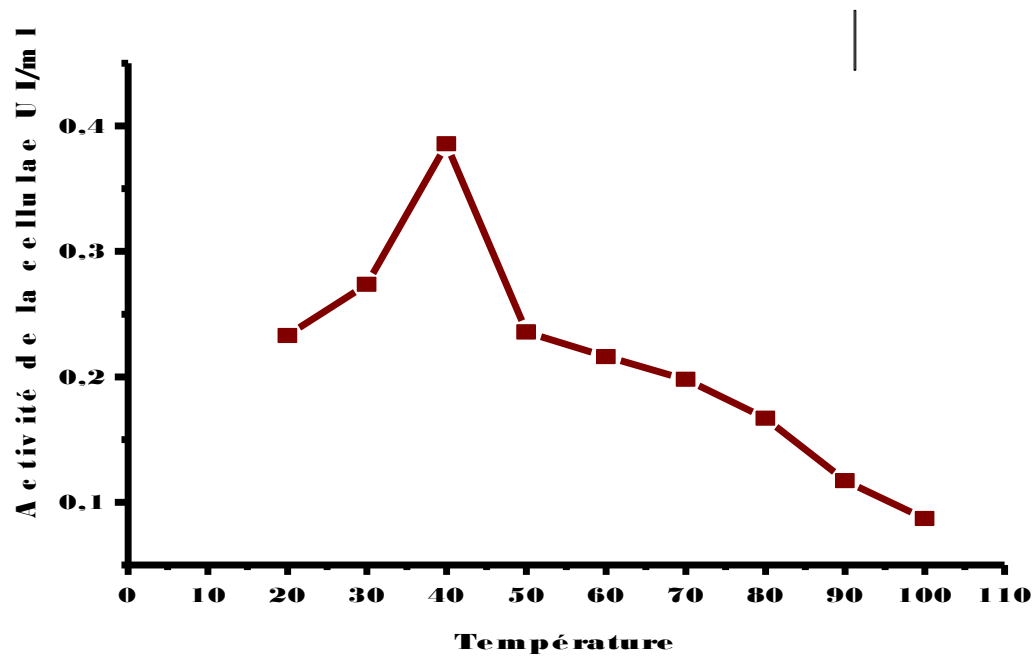


Figure 46 : Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche RO2' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

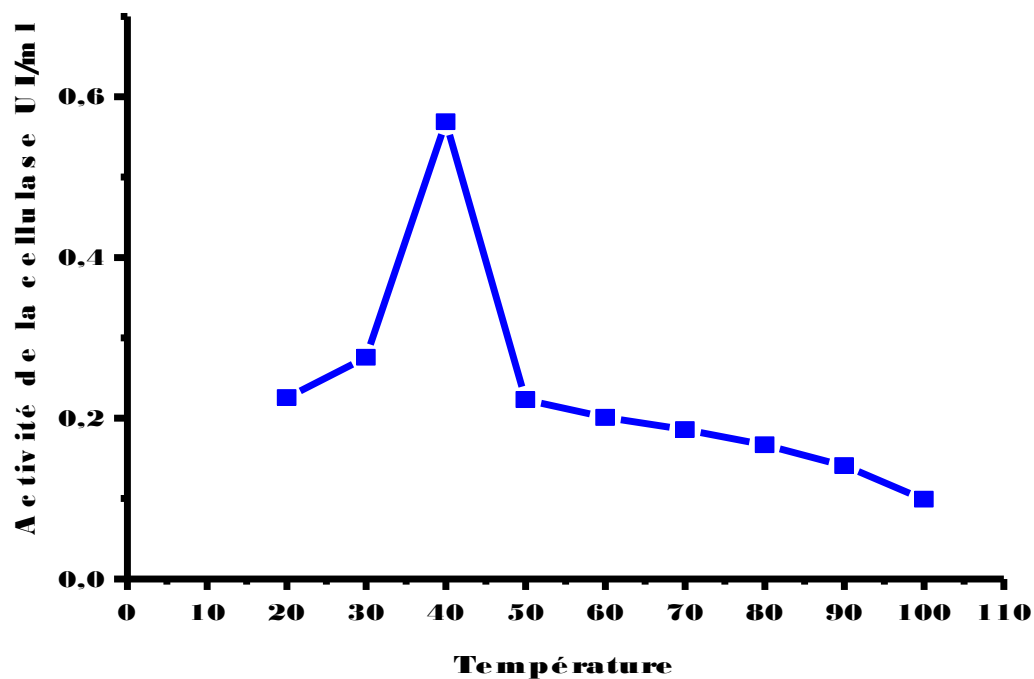


Figure 47 : Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche Ec3''(—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

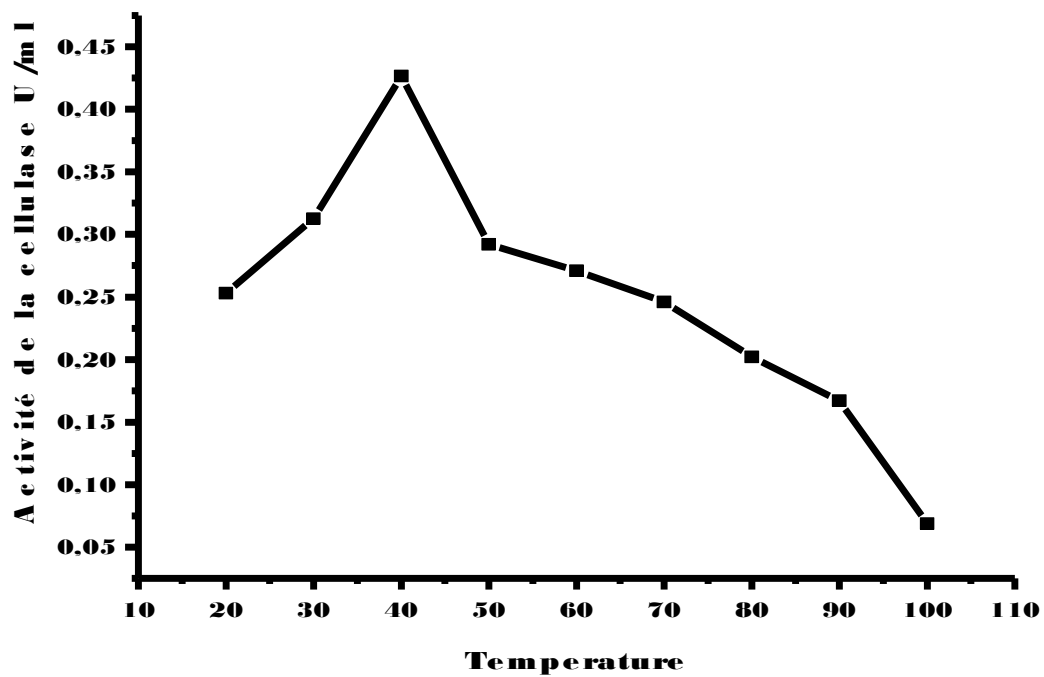


Figure 48 : Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche EC4' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

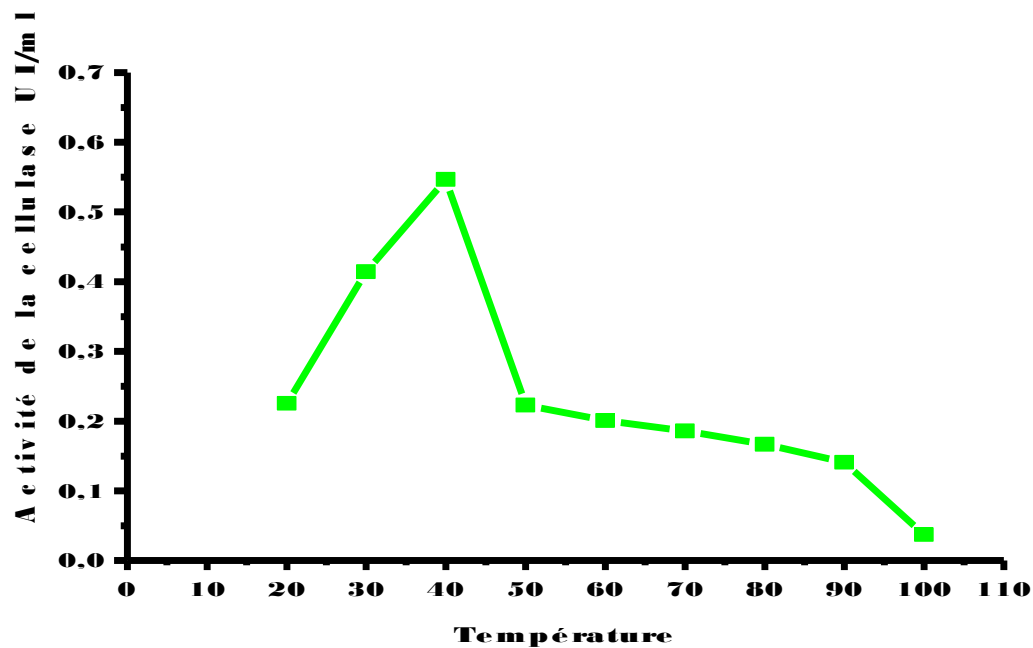


Figure 49 : Effet de la température sur l'activité de la cellulase chez la souche Ec3' (—■—), incubée à différentes températures pendant 30 min.

-Effet des ions sur l'activité de la cellulase

L'évaluation de l'effet des ions (Ca^{+2} , K^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez les souches sélectionnées ($\text{EC4}'$, $\text{EC2}'$, $\text{EC3}'$, $\text{EC3}''$, $\text{RO2}'$) est mise en évidence. Les souches sélectionnées productrices de la cellulase ($\text{EC4}'$, $\text{EC2}'$, $\text{EC3}'$, $\text{EC3}''$, $\text{RO2}'$) sont inoculées dans un milieu de culture CMS, contenant des ions (Ca^{+2} , K^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) par fermentation submergée, incubées à une température pendant 48 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 10000 g à une température de 4°C pendant 10 min et l'activité de la cellulase est évaluée par la méthode de DNS.

Les résultats obtenus (**Figure 50,54, 55, 56,57**) ont montré que les souches sélectionnées productrices de la cellulase ($\text{EC2}'$, $\text{EC3}''$ et $\text{EC3}'$) ont manifesté une forte activité de la cellulase en présence de Mn^{+2} avec des taux de production de (2,67, 1,25, 0,88UI/ml) respectivement. A l'opposé, les souches ($\text{EC4}'$ et $\text{RO2}'$) ont montré une importante activité de la cellulase en présence du K^{+2} et Ca^{+2} . **Ifran et al. , 2012 ; Saha et al., 2004**) ont rapporté que l'activité de la cellulase de *Cellulomonas sp* ASN2, *M circineloides* sont similaires à nos résultats.

Par ailleurs, **Lynd et al. , (2002)** ont révélé que la culture de *B.subtilis* YJ1 en présence de Mn^{+2} et Hg^{+2} interviennent dans l'activation et l'inhibition de l'activité de la cellulase.

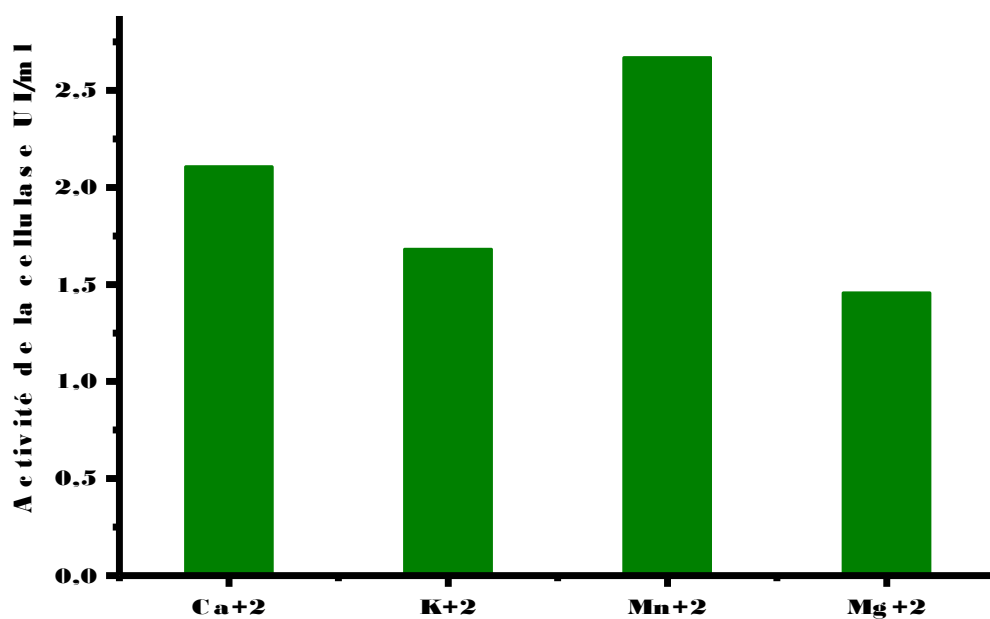


Figure 50 :Effet des ions (Ca^{+2} , K^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche $\text{EC2}'$, une température de 50°C pendant 30 min

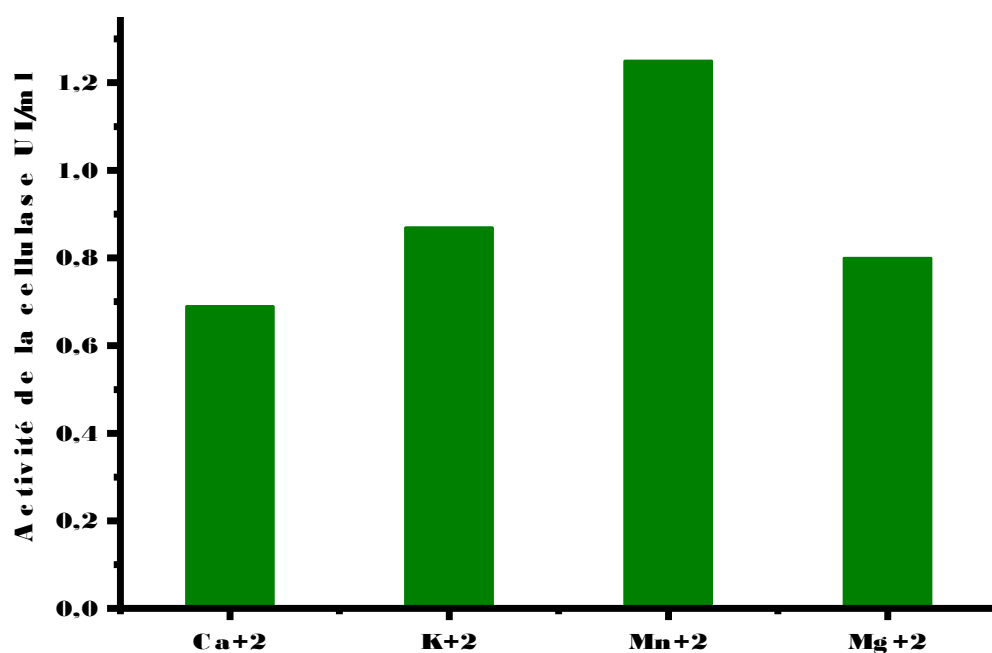


Figure 51 : Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche EC3'', une température de 50°C pendant 30 min

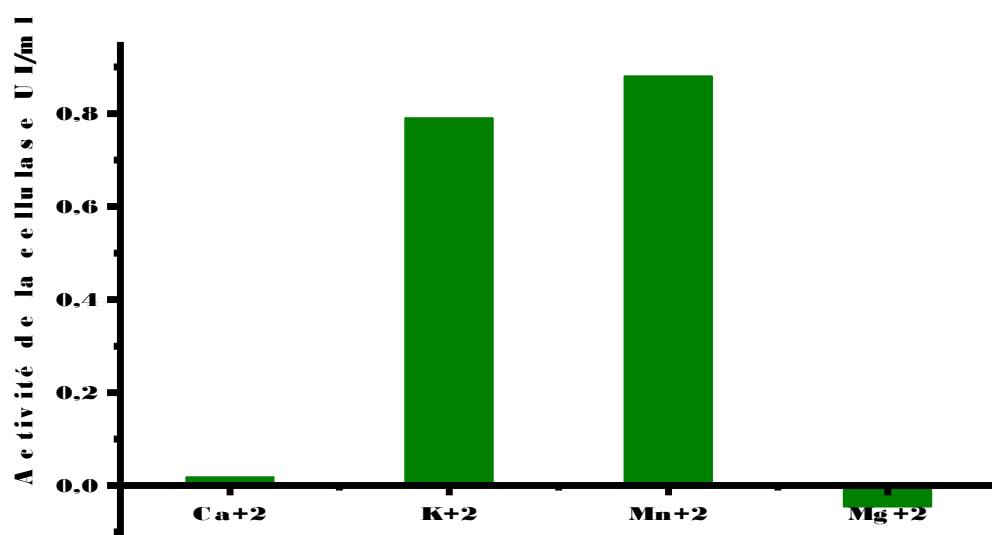


Figure 52 : Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche EC3', incubée à une température de 50°C pendant 30 min.

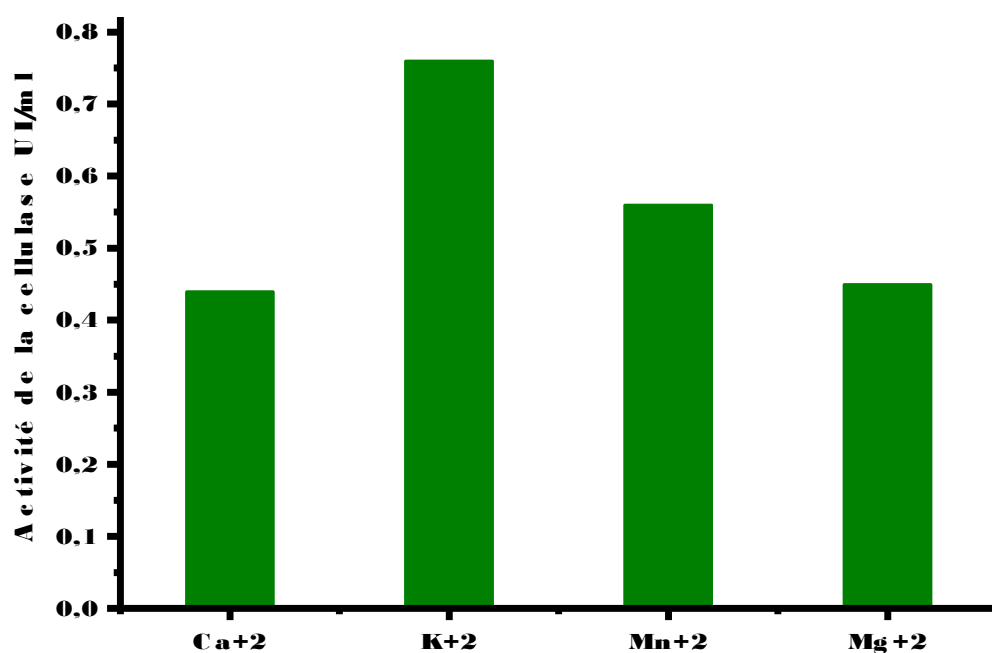


Figure 53 : Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche EC4', incubée à une température de 50°C pendant 30 min .

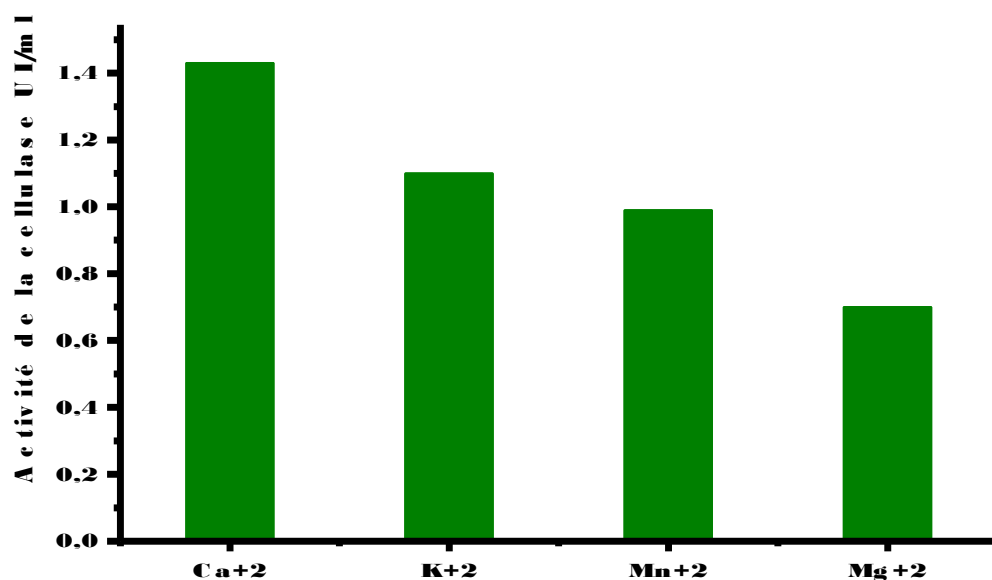


Figure 54: Effet des ions (Ca^{+2} , k^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2}) sur l'activité de la cellulase chez la souche RO2', incubée à une température de 50°C pendant 30min.

3.5 Etude du suivi de la cinétique de la cellulase

L'évaluation du potentiel catalytique de la cellulase chez les souches sélectionnées (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') est mise en évidence. Les souches sélectionnées productrices de la cellulase sont inoculées dans un milieu de culture CMS, contenant la cellulose microcristalline à une concentration de 1%, incubées à une température pendant 24 heures. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 10000 g à une température de 4°C pendant 10 min et l'activité de la cellulase est évaluée par la méthode de DNS.

Un volume de 0,5 ml du surnageant est ajouté à un volume de 1ml de la solution de 0,05M tampon phosphate (pH 8), contenant la cellulose à une concentration de 1%, incubé dans un bain marie à 50°C, à des intervalles de temps de (1, 2, 5, 10,20 ,30min) la quantité du glucose réduite est mesurée par la méthode DNS.

Les résultats obtenus (**Figure 55 , 56, 57, 58, 59**) montrent que plus la quantité du produit est consommé (région amorphe de la cellulose) plus la dégradation de la cellulose restante (région cristalline) devient difficile, d'autres études comme celle de (**Wu *et al.* , 2006**) ont démontré les mêmes résultats concernant l'étude de la cellulase brute..

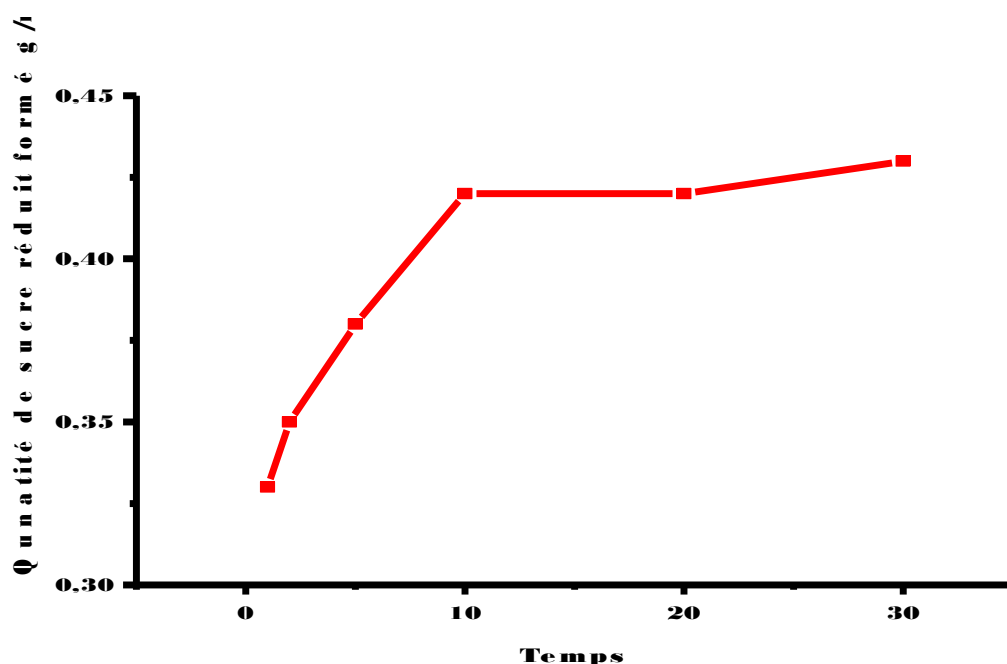


Figure 55 : Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche EC2', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10,20 ,30min).

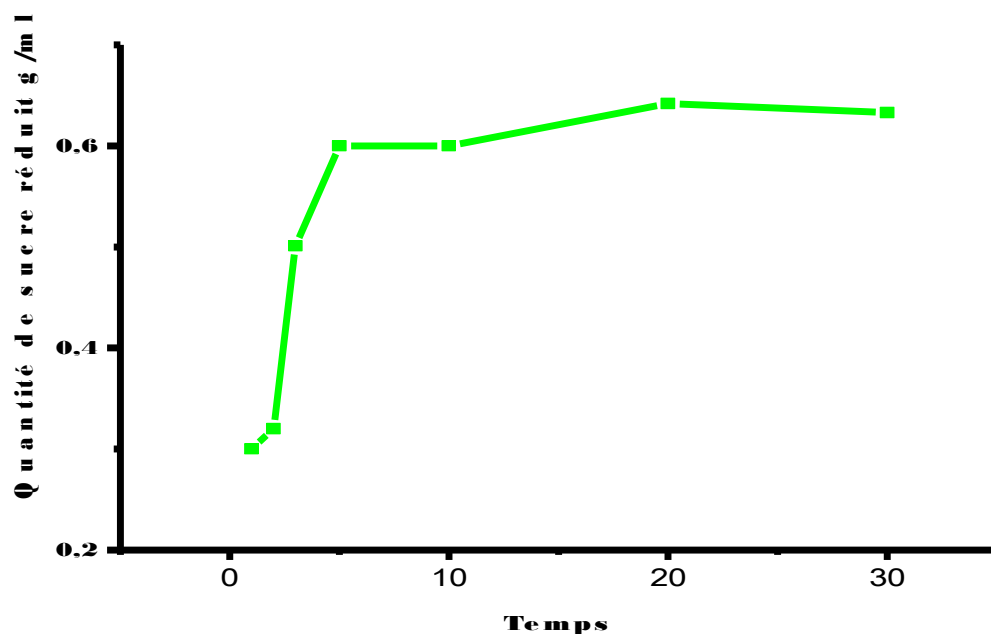


Figure 56: Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche EC3'', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10, 20, 30min).

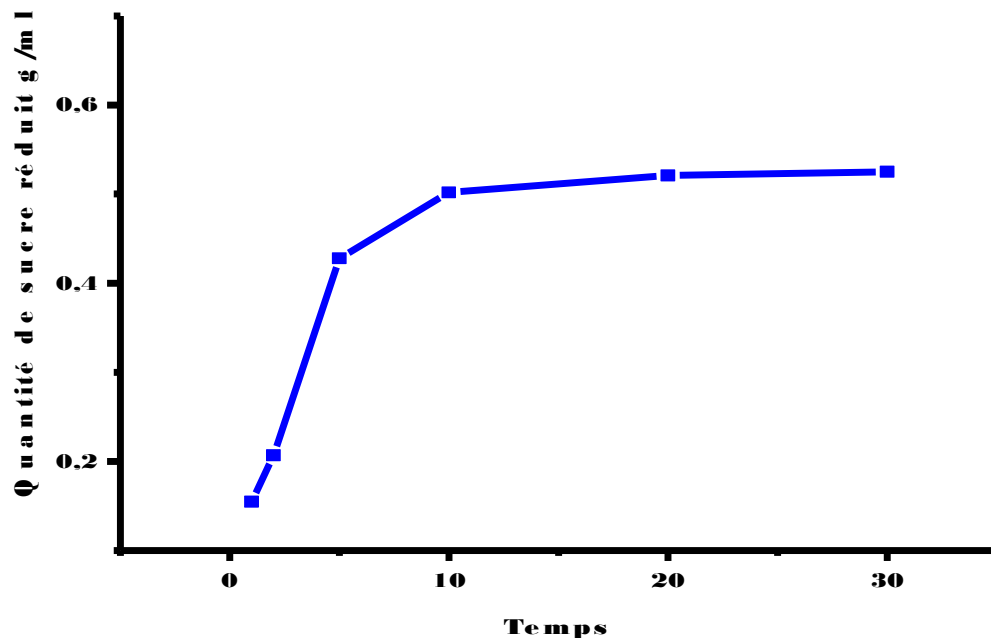


Figure 57 : Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche EC 3', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10, 20, 30min)

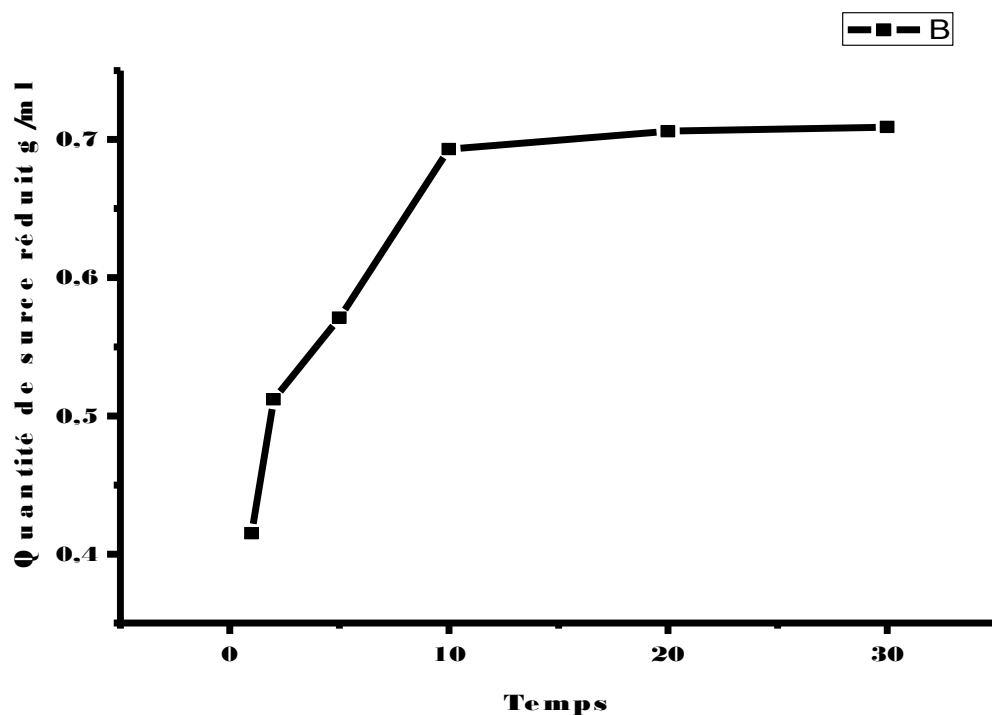


Figure 58 : Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche EC4', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10, 20, 30min)

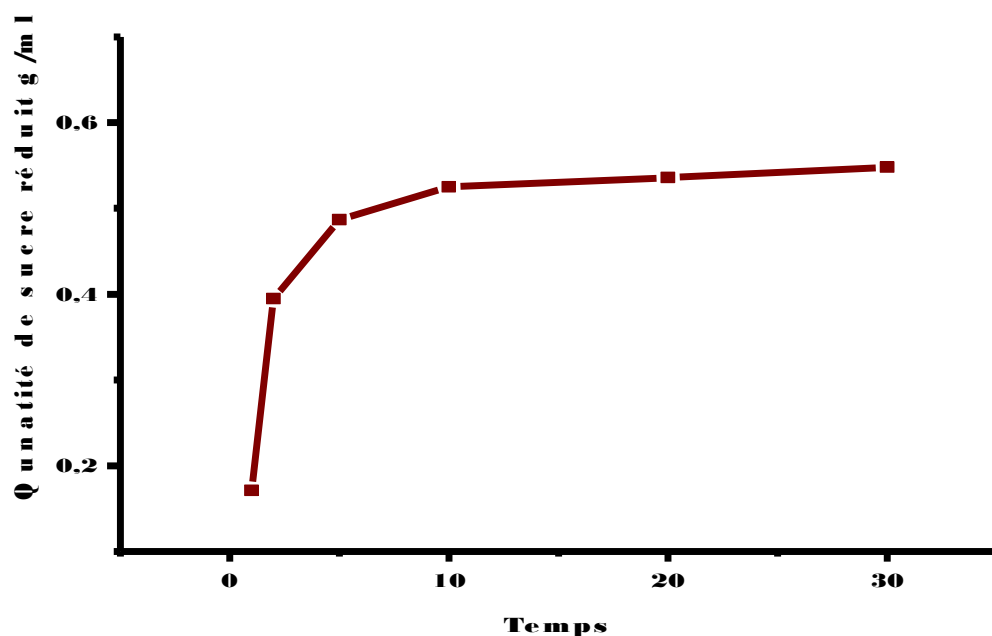


Figure 59 : Etude du suivi de l'hydrolyse de la cellulose (1%) en présence d'un volume de 0,5 ml du surnageant de la souche RO2', incubé à 50°C pendant (1, 2, 5, 10, 20, 30min).

L'hydrolyse enzymatique dépend de la concentration du substrat et de l'enzyme, un changement est observé en fonction du temps et de la quantité du sucre formé pendant ce processus de transformation, ce qui explique l'inversion proportionnelle entre l'augmentation du taux du produit formé, la diminution de la quantité du substrat utilisé et la concentration de l'enzyme en fonction du temps. L'étude du comportement de la cellulase sur le substrat ajouté reste encore mal élucidée. plusieurs méthodes et techniques sont adoptées mais la complexité qui existe entre la cellulose et la cellulase rend la description du mécanisme très difficile à expliquer. En outre, les caractéristiques de la cinétique de ces enzymes diffèrent entre le début et la fin de leurs réactions enzymatiques en les comparant avec la réaction catalytique des enzymes homogènes, la relation de Michaelis-Menten ne peut pas être appliquée sur notre enzyme (Wu *et al.*, 2006). (Sharrock, 1988) suggère que pour étudier les cellulases il faut utiliser les méthodes même les plus improbables.

Afin de mettre en évidence la relation entre la diminution de la quantité de la cellulase en fonction du temps (les figure 60, 61, 62, 63, 64), l'activité spécifique est calculée en utilisant la fonction suivante (Wu *et al.*, 2006):

Soit t est le temps de l'hydrolyse, C_s concentration de la cellulose, C_e concentration de la cellulase.

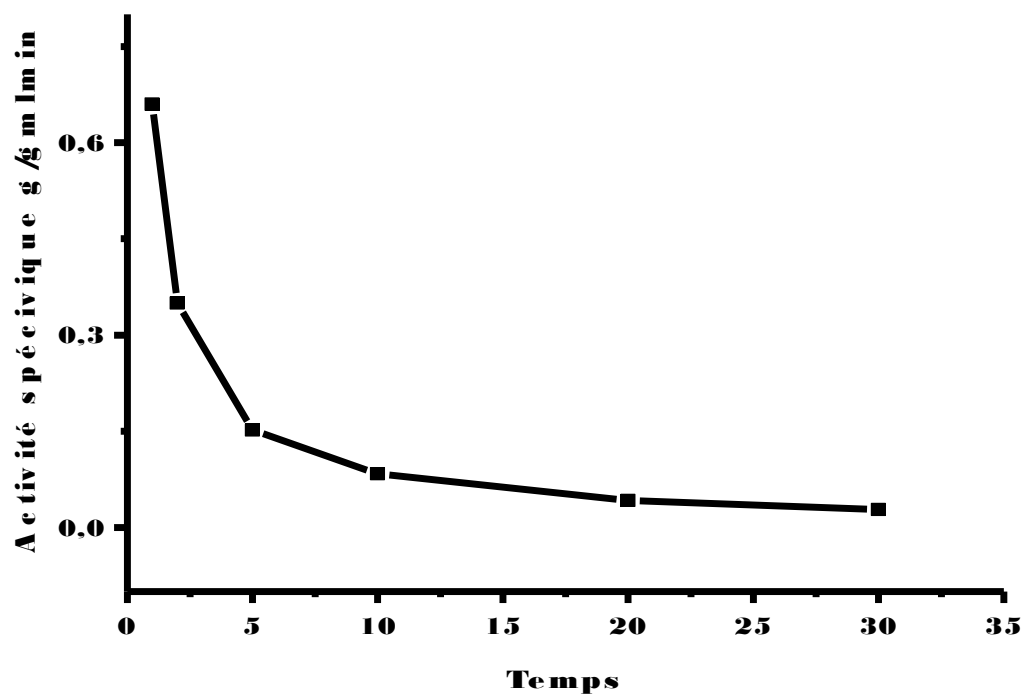


Figure 60 : Illustration de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase brute (0,5 ml), produite par la souche EC2', incubée à 50°C pendant 30 min.

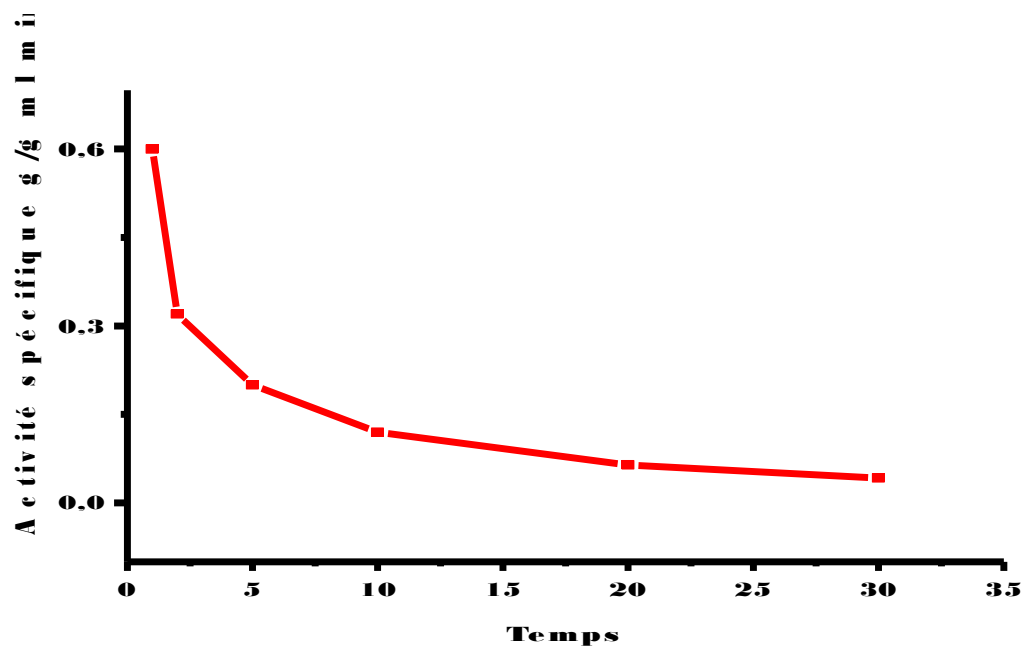


Figure 61 : Illustration de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase (0,5ml), de la souche EC3', incubée à 50°C pendant 30 min.

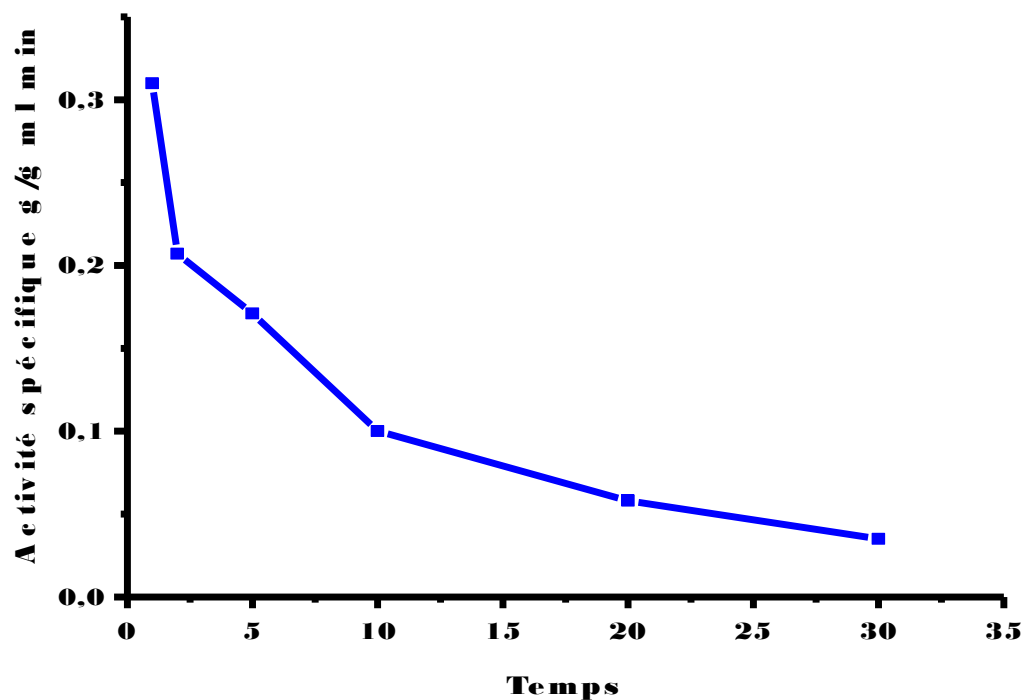


Figure 62 : Illustration de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase (0,5ml) de la souche EC3'', incubée à 50°C pendant 30 min.

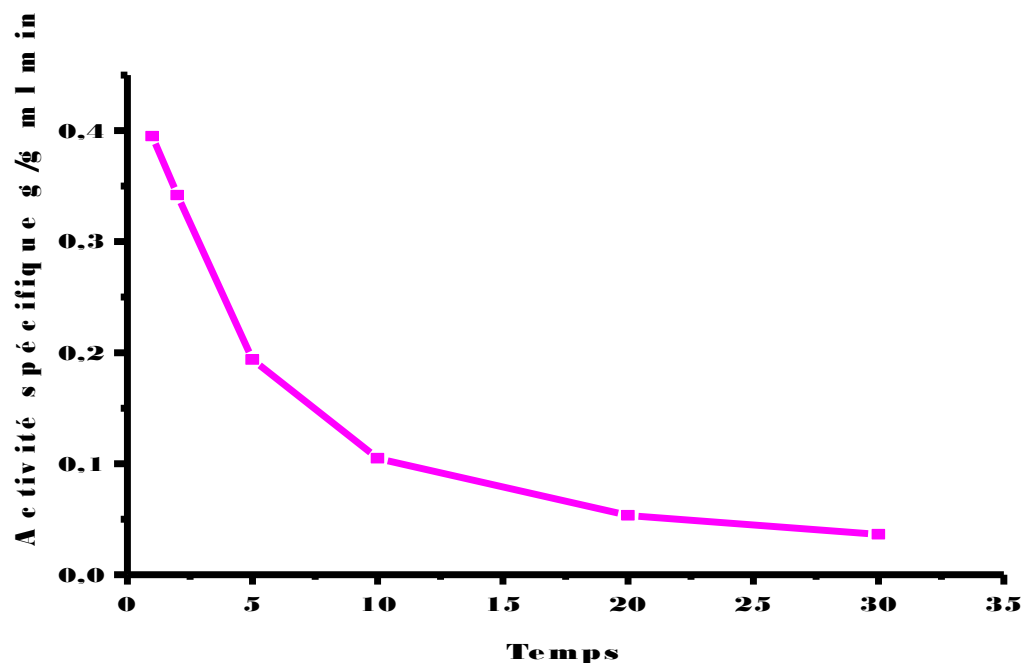


Figure 63 : Illustration du changement de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase (0,5ml), de la souche RO2', incubée à 50°C pendant 30 min.

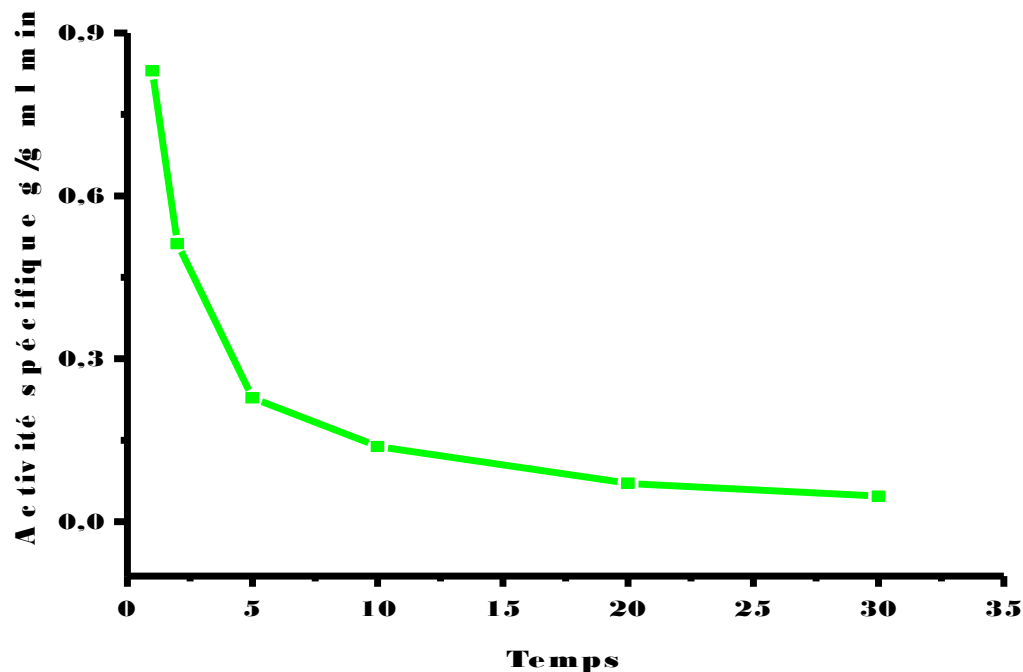


Figure 64 : Illustration du changement de l'activité spécifique de la cellulase durant le processus d'hydrolyse de la cellulose cristalline (1%) par la cellulase (0,5ml), de la souche EC4' et incubée à 50°C pendant 30min.

4. Etude du suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées productrices de la cellulase

L'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') dans un milieu de culture CMS avec une densité optique initiale 0,2, incubées à une température ambiante pendant 24 heures.

Le suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées limité sur un intervalle temps de 6 heures est réalisé par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats obtenus (**Figure 65, 66, 67, 68, 69**) ont montré que les souches sélectionnées productrices de la cellulase expriment une évolution classique de la croissance des souches étudiées avec une phase exponentielle suivie d'une phase stationnaire. Une baisse de croissance est observée au début de l'expérimentation pour les souches EC3', EC4' et EC2', ceci est probablement expliqué par la mauvaise adaptation de ces souches aux conditions de culture modifiées par l'ajout d'une nouvelle quantité du milieu CMS lors de l'ajustement de densité initiale à 0,2.

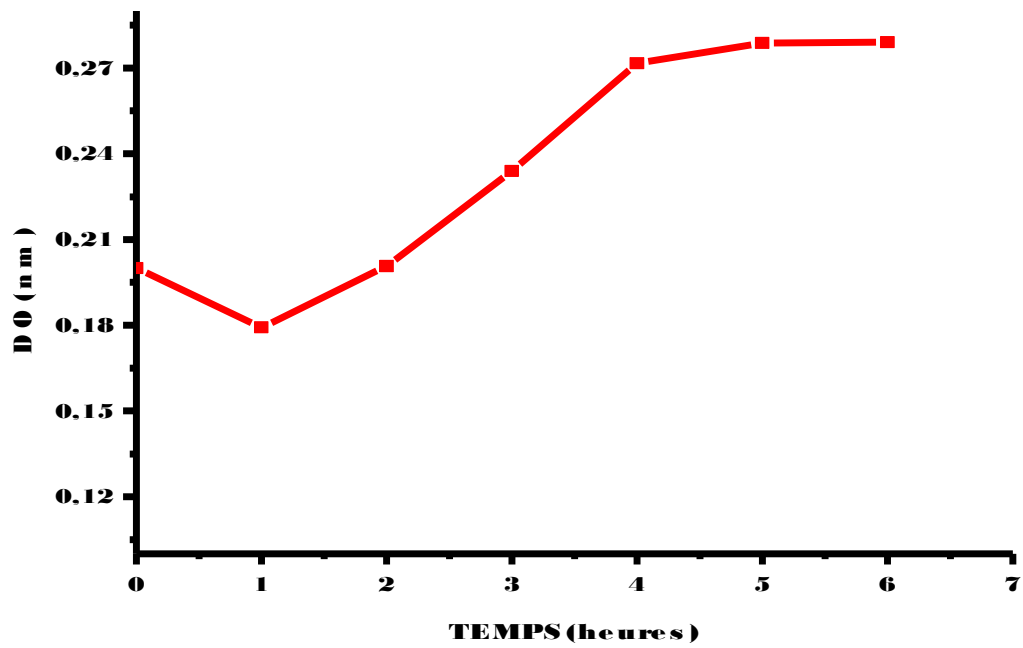


Figure 65 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche Ec2' (—■—) dans le milieu de culture CMS, incubée température ambiante pendant 6 heures.

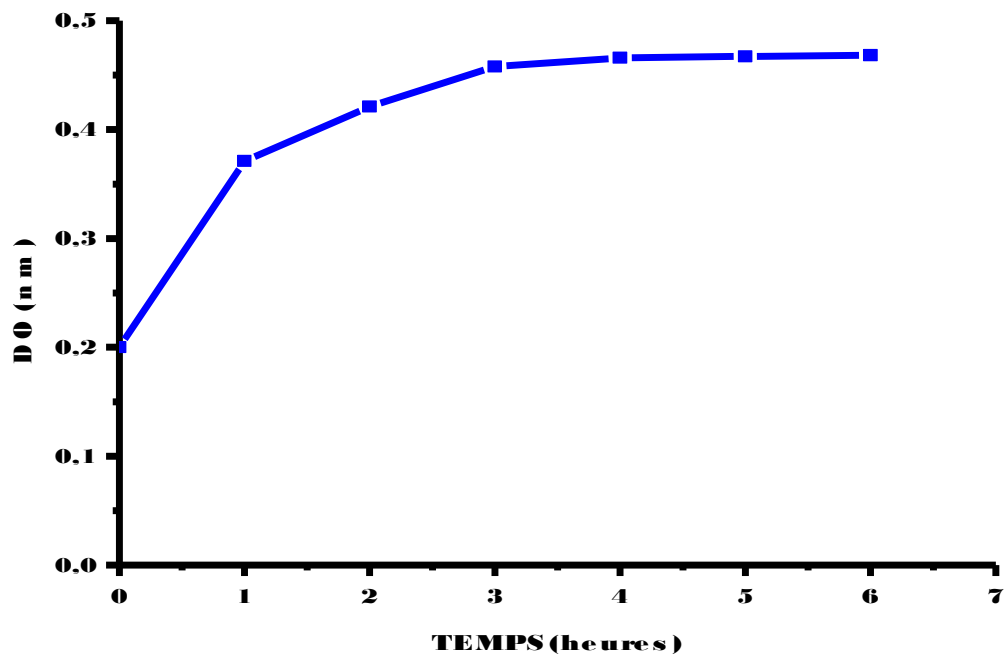


Figure 66 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche Ec3'' (—■—) dans le milieu de culture CMS, incubée à température ambiante pendant 6 heures.

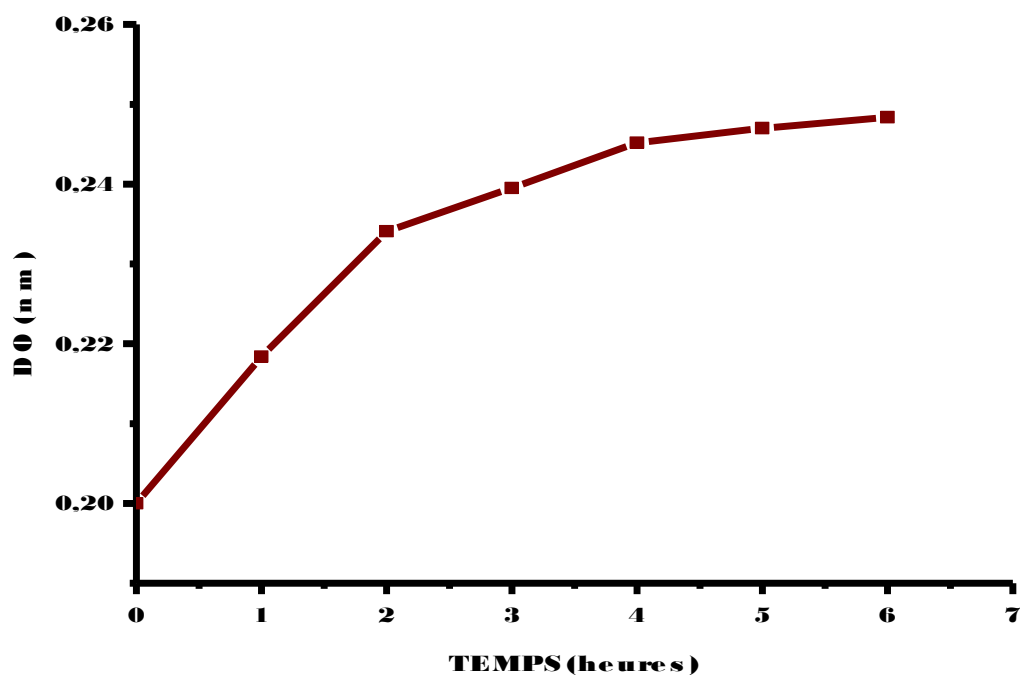


Figure 67 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche RO2' —■— dans le milieu de culture CMS, incubée à une température ambiante pendant 6 heures.

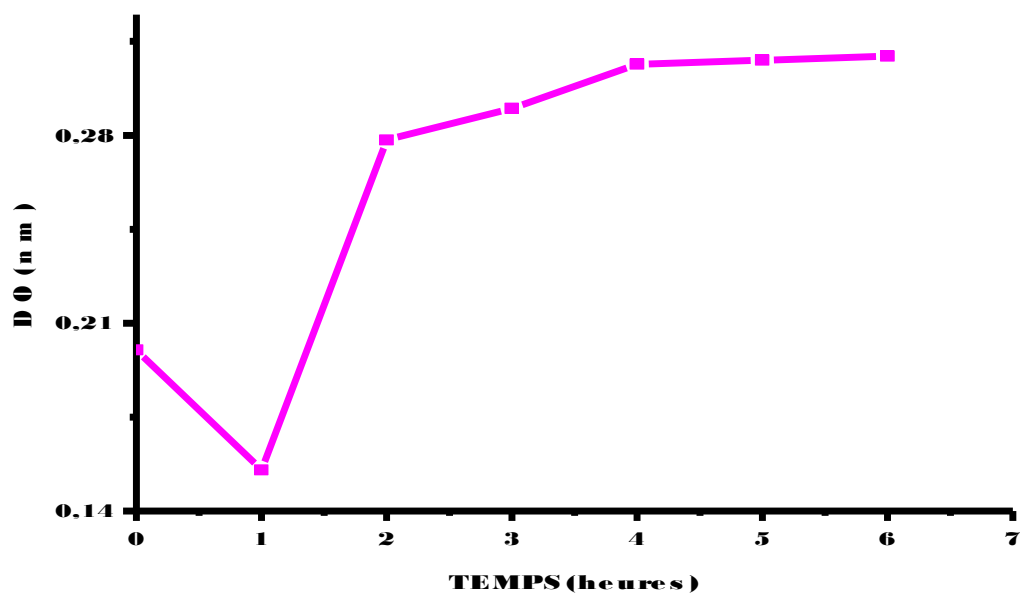


Figure 68 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche Ec4' (—■—) dans le milieu de culture CMS, incubée à température ambiante pendant 6 heures.

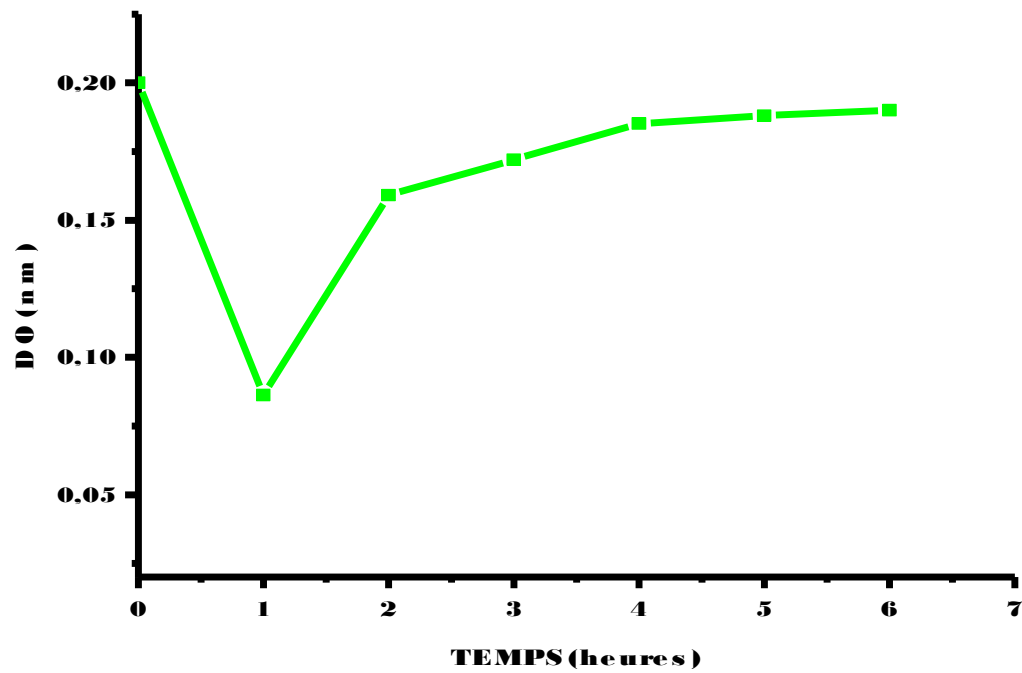


Figure 69 : Etude du suivi de la cinétique de croissance de la souche Ec3'' (—■—) dans le milieu de culture CMS, incubée à température ambiante pendant 6 heures.

5. Identification des souches isolées

5.1 Identification phénotypique

5.1.1 Examen macroscopique

L'observation macroscopique réalisée à l'œil nu des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase sur deux milieux de culture utilisés CMS et PCA, a permis d'établir certains critères tels que l'aspect, la couleur, le diamètre et le relief des colonies des souches isolées. Le tableau 4 récapitule les caractéristiques macroscopiques des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase.

Tableau 4: Illustration des caractéristiques macroscopiques des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase sur milieu CMS.

Souches	Description
Ec4''	Pigmentation marron, petites colonies
Ec4	Petites colonies Brillantes, jaunâtre
Ec1''	Petites colonies, transparentes brillantes
Ec2	Petites colonies, transparentes brillantes
Ps5	Petites colonies, brillantes, couleur (crème)
Ec1	Petites colonies, brillantes jaunâtre
Ec2'	Petites colonies, mûtes et sèches
Ec1'	Petites colonies, brillantes, couleur (crème)
RO2	Petites colonies, jaunâtre et brillantes
Ec2''	Petites colonies, partiellement brillantes, crème
Ec4'' *	Petites colonies brillantes et transparentes, pigmentation marron
Ec4'	Petites colonies partiellement brillante, verdâtre
Ec3	Petites colonies mûtes, sèches
Ec3'	Petites colonies mûtes, partiellement brillantes
Ec3''	Petites colonies jaunâtre partiellement brillantes
RO2'	Petites colonies, crémeuses et brillantes

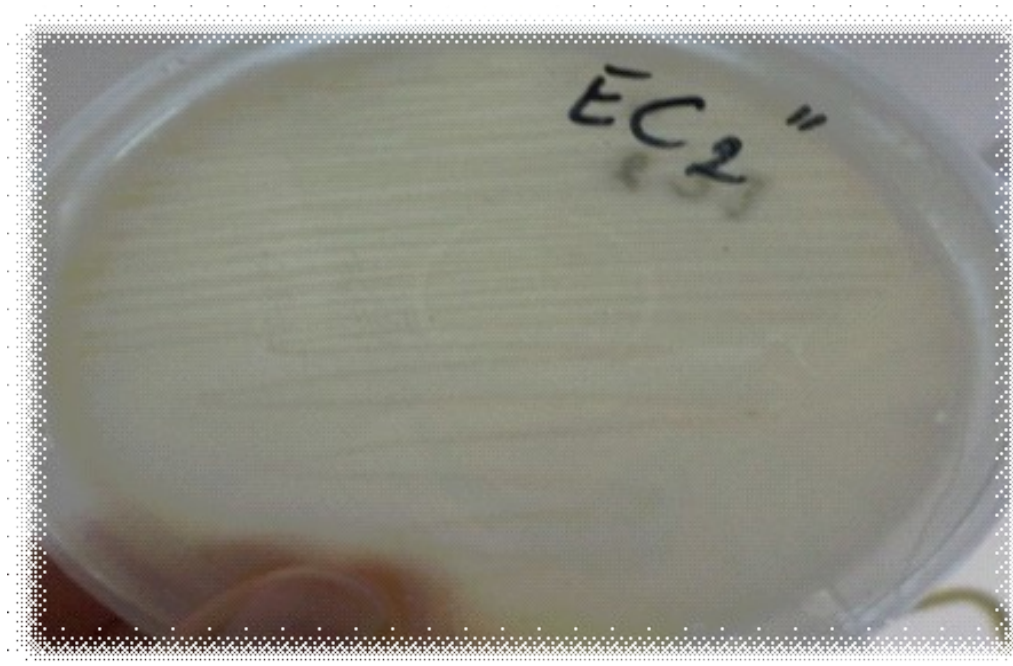


Figure 70 : Aspect macroscopique de la souche EC2", inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 71 : Aspect macroscopique de la souche EC3, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 72 : Aspect macroscopique de la souche EC3', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 73 : Aspect macroscopique de la souche EC4', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 74 : Aspect macroscopique de la souche EC2', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30 °C pendant 48 heures.



Figure 75 :Aspect macroscopique de la souche RO2', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 76 :Aspect macroscopique de la souche EC3'', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

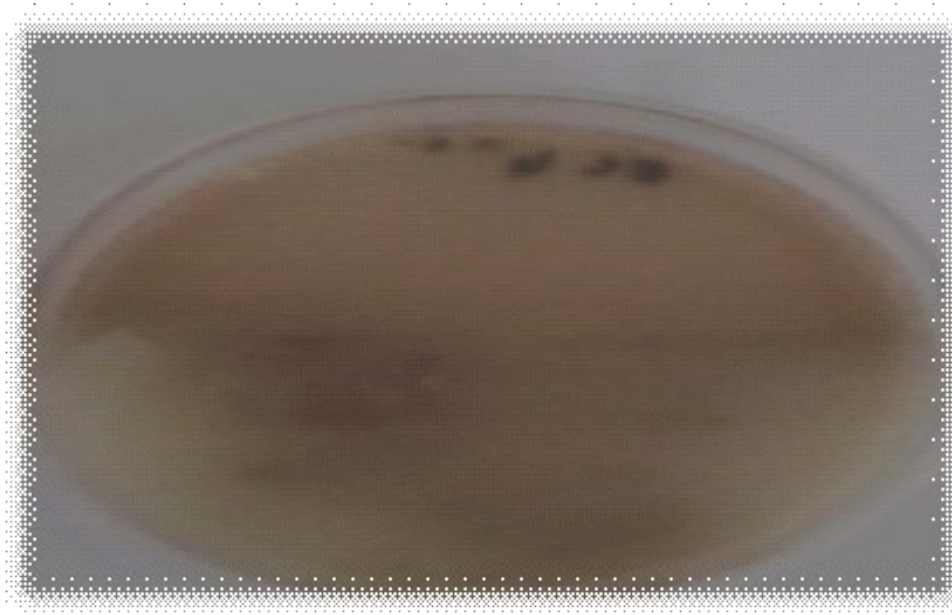


Figure 77: Aspect macroscopique de la souche EC4', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 78 : Aspect macroscopique de la souche EC4, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures



Figure 79 :Aspect macroscopique de la souche EC1, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 80 :Aspect macroscopique de la souche EC1', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 81 : Aspect macroscopique de la souche EC1'', inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 82 : Aspect macroscopique de la souche EC2, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures



Figure 83 : Aspect macroscopique de la souche RO2, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 84 :Aspect macroscopique de la souche Ps5, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 85: Aspect macroscopique de la souche EC4*, inoculée sur milieu CMS, incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

Tableau 5 : Aspect macroscopique des 05 souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sur le milieu PCA.

Souches	Description
EC4'	Très petites colonies blanches
RO2'	Petites colonies, brillantes, crème à bord régulier
EC3''	Très petites colonies blanches
EC2'	Petites colonies brillantes et crème
EC3'	Petites colonies brillantes, sec



Figure 86 : Aspect macroscopique de la souche RO2', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.



Figure 87 : Aspect macroscopique de la souche EC3'', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

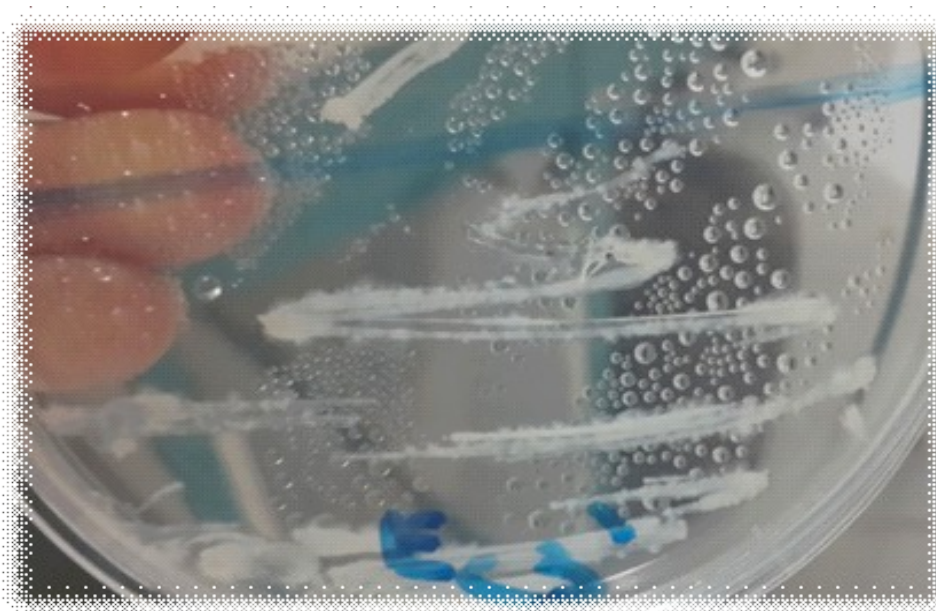


Figure 88 :Aspect macroscopique de la souche EC3', inoculée sur le milieu PCA , incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

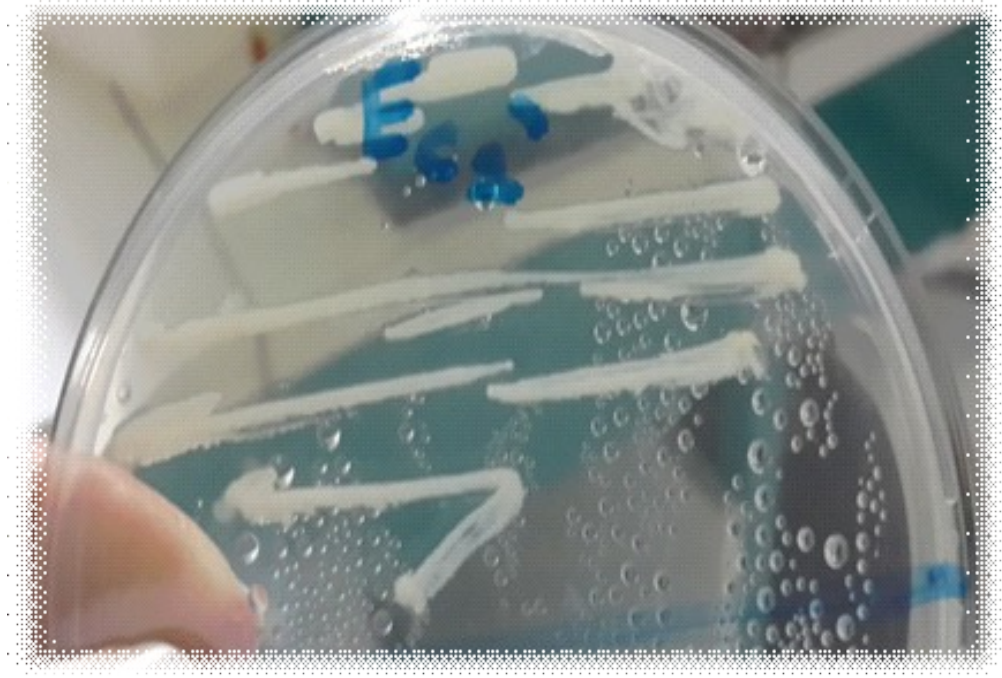


Figure 89: Aspect macroscopique de la souche EC2', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

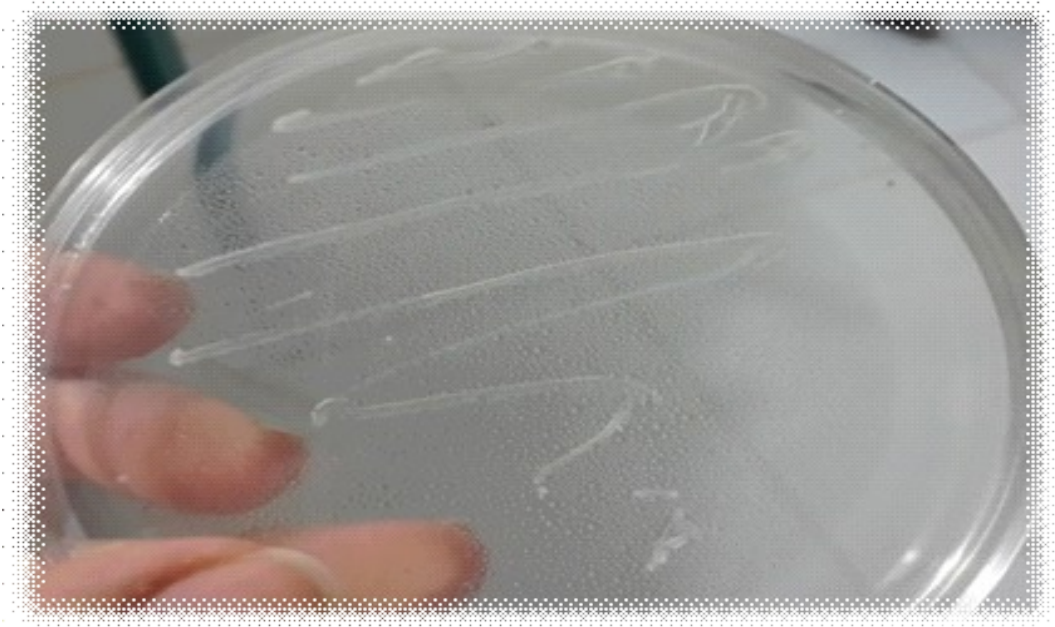


Figure 90:Aspect macroscopique de la souche EC4', inoculée sur le milieu PCA, incubée une température de 30°C pendant 24 heures.

5.1.2 Examen microscopique

La coloration de Gram et l'observation microscopique des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase a permis de constater la présence de formes cellulaires suivantes :

La souche EC4' : bacilles très fin à Gram⁺, spore non déformante, regroupés en amas.

La souche RO2' : bacilles moyen à Gram⁻, non sporulé.

La souche EC 3'' : bacilles en forme de bâtonnet à Gram⁻, non sporulé.

La souche EC3' : bacilles en forme de bâtonnet à Gram⁻, non sporulé.

La souche EC2' : bacilles à Gram⁺, fin et sporulés.

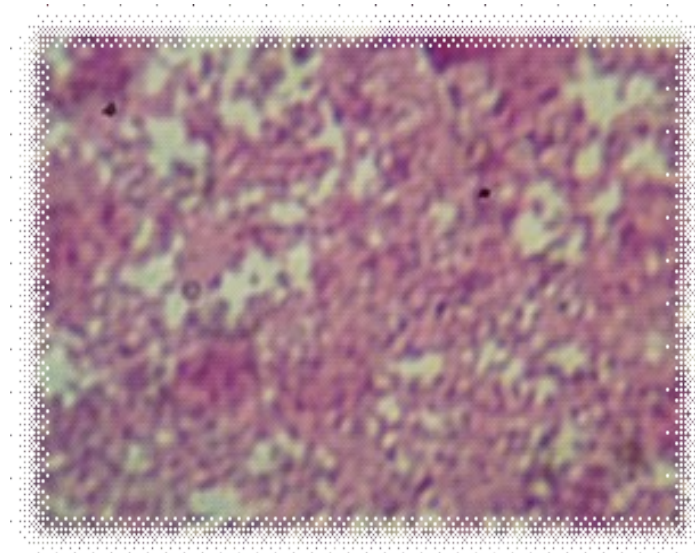


Figure 91 : Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche RO2', sélectionnées productrices de la cellulase (grossissement×100).

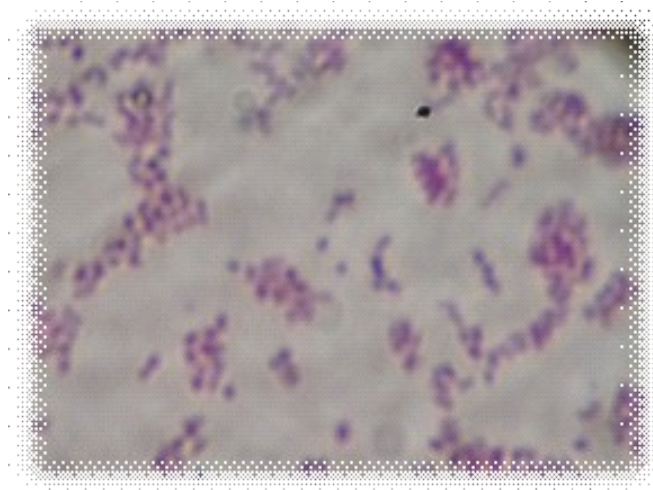


Figure 92 :Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche EC3'', sélectionnée productrice de la cellulase (grossissement $\times 100$).

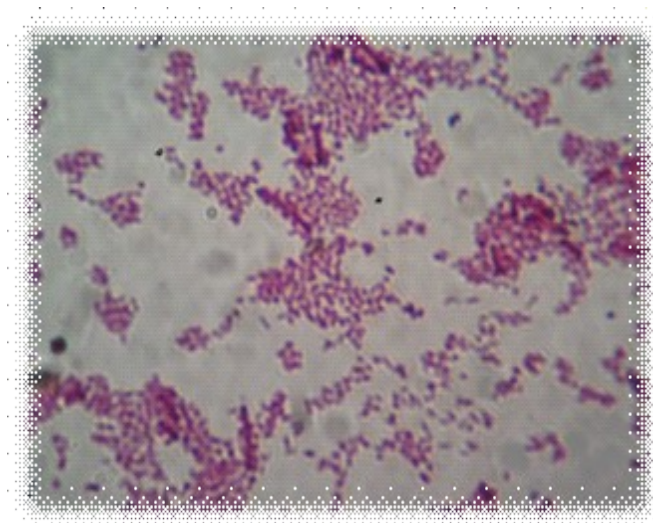


Figure 93 : Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche EC3', sélectionnée productrice de la cellulase (grossissement $\times 100$).

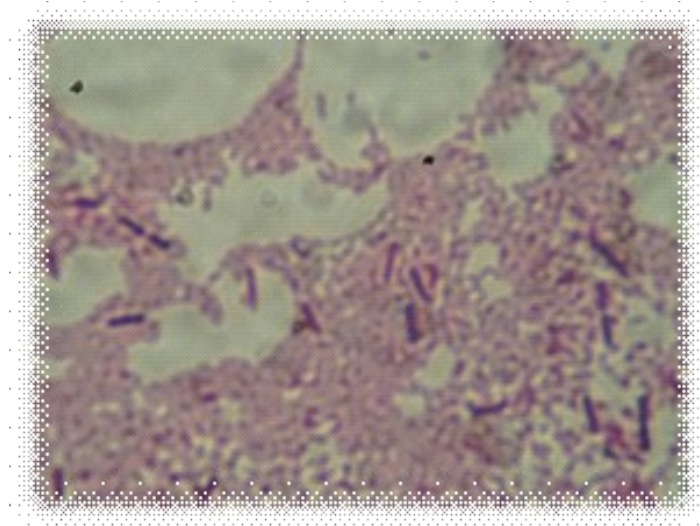


Figure 94 :Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche EC2', sélectionnée productrice de la cellulase (grossissement $\times 100$).

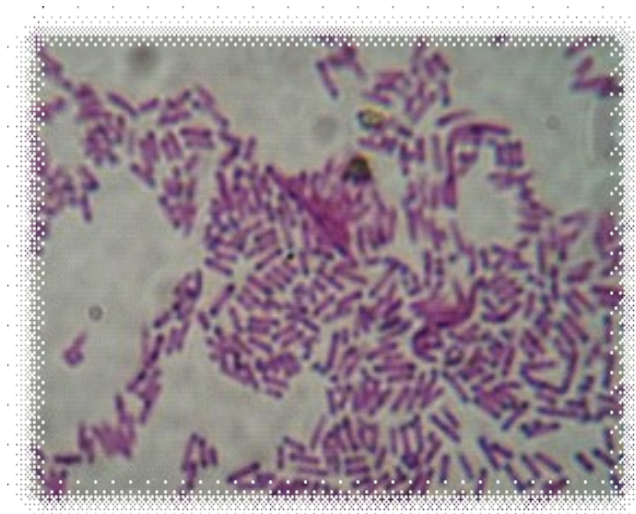


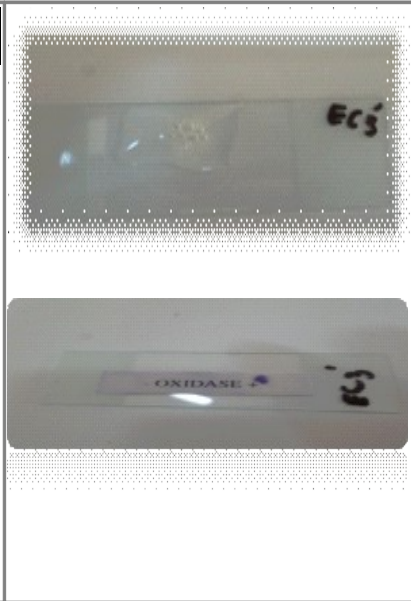
Figure 95: Coloration de Gram et l'observation microscopique de la souche EC4', sélectionnée productrice de la cellulase (grossissement $\times 100$).

5.1.3 Etude des enzymes respiratoires terminales

Les résultats des tests de la catalase et de l'oxydase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sont illustrés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Illustration du test de la catalase et de l'oxydase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2').

Souches	Résultats	Lectures
EC4'		Catalase positive : présence de bulles Oxydase positive : Présence de la coloration violette.
EC2'		Catalase positive : présence de bulles Oxydase positive : Présence de la coloration violette.

EC3'		Catalase positive : présence de bulles Oxydase positive : Présence de la coloration violette
EC 3''		Catalase positive : présence de bulles Oxydase positive : Présence de la coloration violette
RO2'		Catalase positive : présence de bulles Oxydase positive : Présence de la coloration violette

5.1.4 Métabolismes des molécules larges

Les résultats de la mise en évidence de la présence des enzymes telles que de l'amylase, la lipase et la caséinase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sont illustrés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Illustration de la mise en évidence de la présence de l'amylase, la lipase et la caséinase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2').

Souches	Amylase	Lipase	Caseinase	Interprétation
EC4'				Amylase positive : présence d'une zone d'hydrolyse Lipase négative : absence de zone opaque Caséinase positive : présence d'éclaircissement
EC2'				Amylase positive : présence d'une zone d'hydrolyse Lipase positive : présence de zone opaque Caséinase positive : présence d'éclaircissement

EC3''				Amylase positive : présence d'une zone d'hydrolyse Lipase positive : présence de zone opaque Caséinase positive : présence d'éclaircissement
EC3''				Amylase positive : présence d'une zone d'hydrolyse Lipase positive : présence de zone opaque Caséinase positive : présence d'éclaircissement
RO2'				Amylase positive : présence d'une zone d'hydrolyse Lipase positive : présence de zone opaque Caséinase positive : présence d'éclaircissement

5.1.5 Identification des souches isolées par la galerie API20E

Après l'ensemencement de la galerie API20E avec une suspension de chaque souche isolée et une incubation à 30°C pendant 24 heures, la lecture des résultats s'est effectuée par l'observation du changement de couleur des tests en s'appuyant sur le tableau d'interprétation des galeries disponibles avec le kit (**Figure 96, 97, 98, 99, 100**), l'utilisation du logiciel d'identification (Identax) a permis l'orientation de l'identification des souches isolées vers leur appartenance en ce qui concerne leur famille et de connaître les résultats concernant leurs profils biochimiques mais une identification génotypique reste essentielle pour avoir une identification fiable des souches isolées.



Figure 96 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche Ec2', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.



Figure 97 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC3', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.



Figure 98 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC 3'', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.



Figure 99: L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC4', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.



Figure 100 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche RO2', incubée à une température de 30°C pendant 24 heures.

Tableau 8 : Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche EC4'

Tests	Résultats
ONPG	+
ADH	-
LDC	-
ODC	-
CIT	+après 48h
H ₂ S	+
URE	-
TDA	+
IND	+
VP	-
GEL	-
GLU	+ sans production de gaz
Man	+ après 48h
Ino	+après 48h
Sor	+après 48h
Rha	+après48h
Sac	+après48h
Mel	+après48h
Amy	+
Ara	+après48h

Tableau 9 : Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche EC3”.

Tests	Résultats
ONPG	+
ADH	-
LCD	-
ODC	-
CIT	+
H ₂ S	+
URE	+
TDA	+
IND	+
VP	-
GEL	+
GLU	+ sans production de Gaz
Man	+
Ino	+
Sor	+
Rha	+
Sac	+
Mel	+ après 48h
Amy	+
Ara	+ après 48h

Tableau 10: Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche EC2'

Tests	Résultats
ONPG	+
ADH	-
LCD	-
ODC	-
CIT	-
H ₂ S	+
URE	-
TDA	-
IND	-
VP	-
GEL	-
GLU	-
Man	-
Ino	+ après 48h
Sor	+ après 48h
Rha	+ après 48h
Sac	+ après 48h
Mel	+ après 48h
Amy	+ après 48h
Ara	+ après 48h

Tableau 11: Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche EC3'.

Tests	Résultats
ONPG	-
ADH	+
LCD	-
ODC	+
CIT	+
H ₂ S	+
URE	+
TDA	+
IND	+
VP	-
GEL	-
GLU	+ sans bulles
Man	+ après 48h
Ino	+ après 48h
Sor	+
Rha	+
Sac	+
Mel	+ après 48h
Amy	+ après 48h
Ara	+ après 48h

Tableau 12: Présentation des tests d'identifications biochimiques par l'utilisation de la galerie API20E de la souche RO2'.

Tests	Résultats
ONPG	+
ADH	-
LCD	-
ODC	-
CIT	+
H ₂ S	-
URE	+
TDA	+
IND	+
VP	-
GEL	-
GLU	+ sans bulles
Man	+
Ino	+
Sor	+ après 48h
Rha	+ après 48h
Sac	+
Mel	+ après 48h
Amy	+
Ara	+ après 48h



Figure 101 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC3', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 102 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche RO2', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

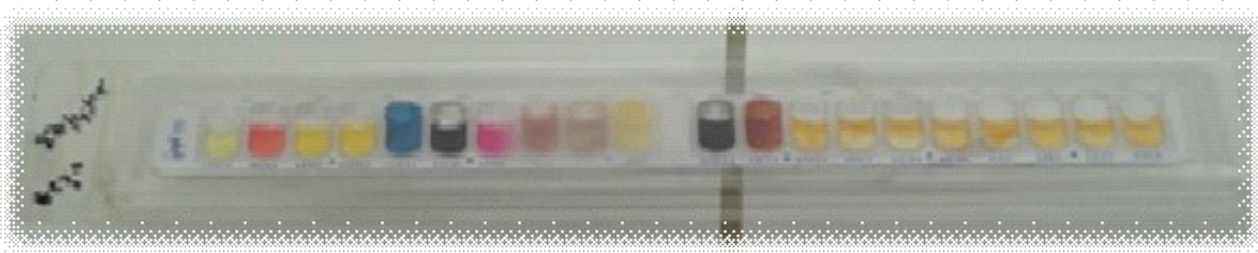


Figure 103 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC3'', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 104 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC4', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.



Figure 105 : L'aspect de la galerie API 20^E de la souche EC2', incubée à une température de 30°C pendant 48 heures.

5.2 Identification géotypique

Les séquences de l'ADN ribosomal 16S des souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sont identifiées à partir des produits PCR dans les deux sens (reverse et forward). Les séquences 16S de l'ADNr des souches sont alignées par l'utilisation du programme blast de la banque de données NCBI, comparées des séquences 16S de l'ADNr bactériennes préalablement alignées.

-La séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche EC4' a montré une similarité de 92% avec *Lysinibacillus xylaniticus* GDLY1 (identité de la séquence : gil379975141|JN999887.1).

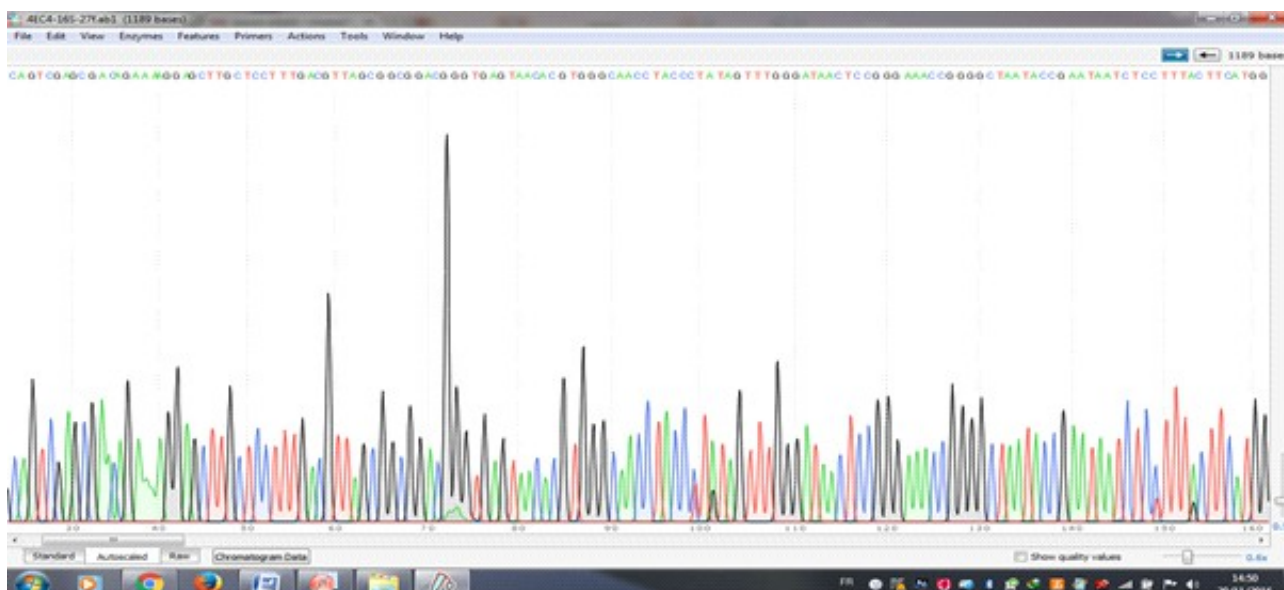


Figure106 : Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase EC4'.

>EC4'-16S-27f-3

```
CCAGGACGGCGGGTGCTATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGG
GTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTA
CTTCATGGTGAAATACTGAAAGACGGCTTCTCGCTGCCGCTATAGGAGGGGCGCGGCATTACCTAGTTGGGGAGG
TAACGGCTACCAAGGCAACAATGCGTACCCAACCTGAAAGGGGGACCGGCCCCCGGGAAGTGAACACGGCCCAA
ACTCTACGGAAGGCACCATTAGGGAATCTTCCCAAGGGGCAAAAGCCTGATGAACCACCGCGCGTGAGTGAAAAA
GGTTTTCGAATCGTAAACTCTGTTGTAAGGAAAAACAAGTCCAGAATTAAGTGGTTGTACCTTGACGGTACCTTATTA
AAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCACCAGCGGCGGTATACGTAGGTGGCAGGCGTGTCGGATTATTGCGCGTAAAGCG
CGCGCAGCGGTCCTTTAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACGTGGAGGTCATTGAACTGGGGGACTTGAGTGCAG
AGAGAAAGTGGAATTCCAAGTGAGCGTGAATGCGTAGAGATTGAAGAACACAGTGCGGAAGGCGACTTCTGTCTGT
ACTGACGCTGAGGCCGAAGCGTGGGAGCAACAGATAGATACCTGTAGTCAGCGTAACGATGATGCTACGTAGGTTGCC
CTATGCTGCAGCTACGCATAGATCGCTGGATACGTCGAGACTGACCAGATGACGGTCGCATCGTGAGCATGATATCGAGC
ACGGATCTACAGCTGACTCGTGACTGCAGTAGTCTCGGCAGTGACTGTCATGTGGTAGTGGTCTGAGTGTAGTCG
```

-La séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche EC2' a montré une similarité de 99% avec *Lysinibacillus fusiformis* RS-5 (identité de la séquence [gi|300791294|HM179549.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/300791294)).

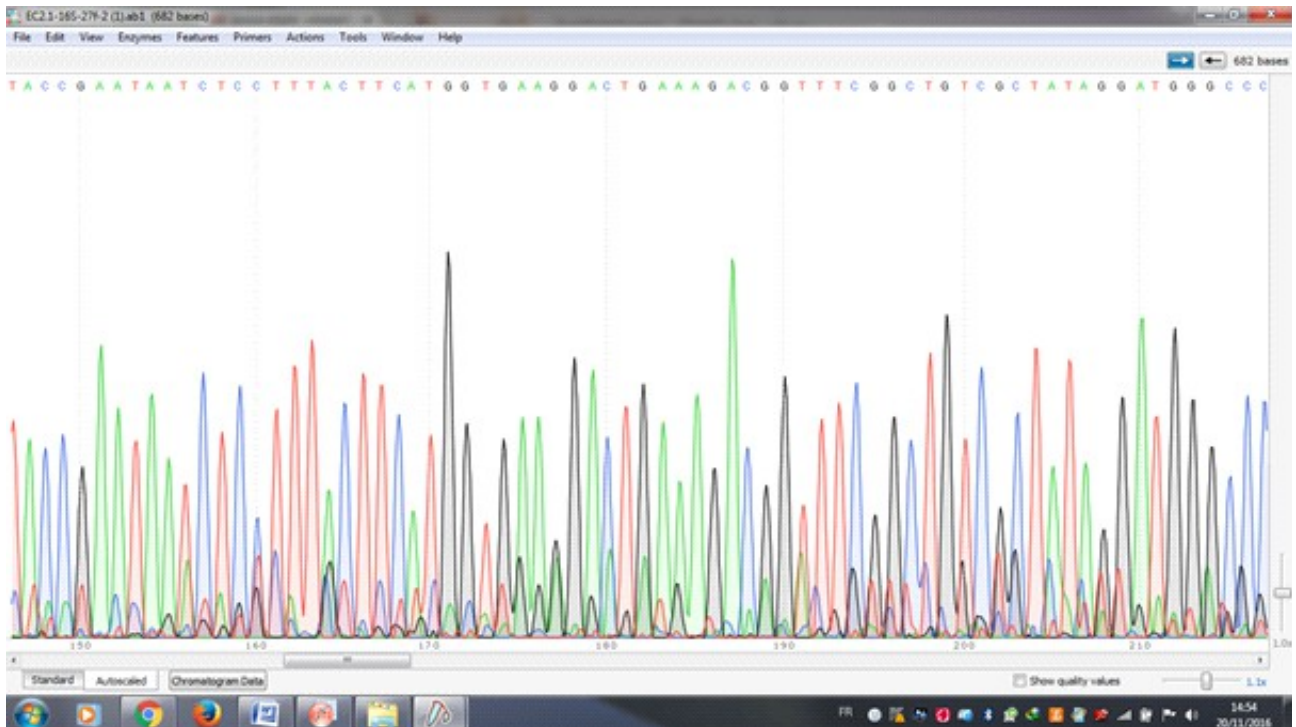


Figure 107 :Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase EC2'.

EC2'-16S-27f-2

```
CACTTAGGCGAAGGCGGGTGCATAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAAAGGAGCTT
GCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTATAGTT
TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCCTTTACTTCATGGTGAAG
GACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTGCTATAGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC
ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
ACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCG
TAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTGTACCTTGACGGTA
CCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGT
GAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAA
GAGGAAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGC
```

-La séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche EC3' a montré une similarité de 84% avec *Alcaligenes faecalis* CD234 (identité de la séquence [gi|459353669](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/459353669)|KC478943.1).

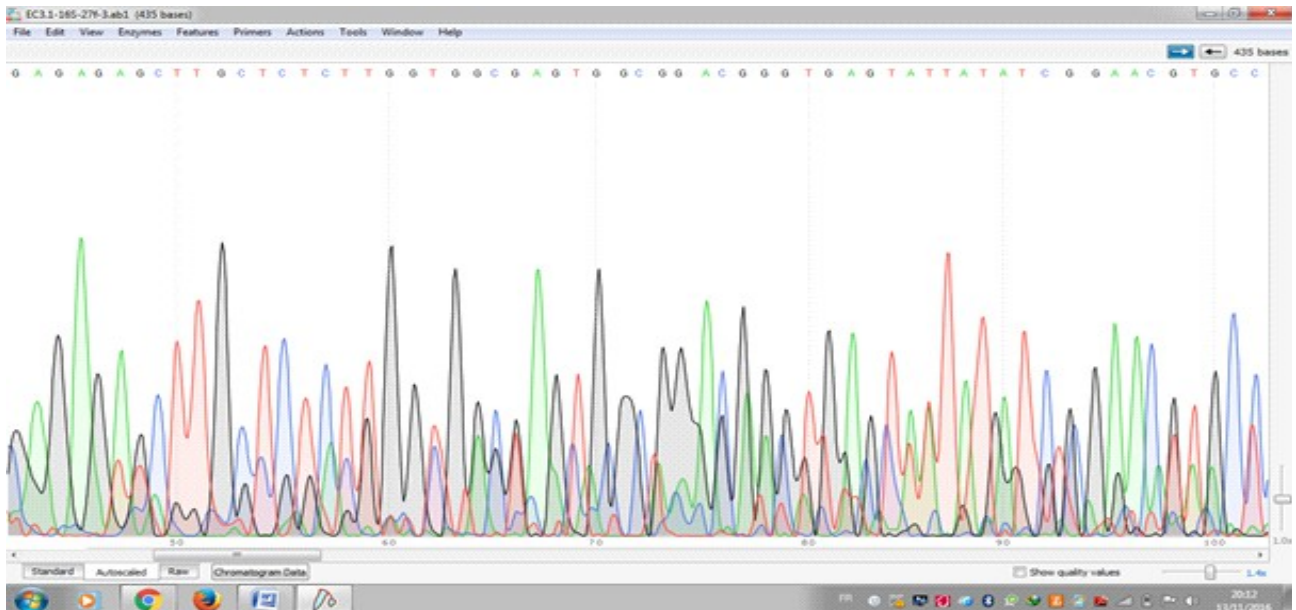


Figure 108 :Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase EC3'.

EC3'-16S-27f-3

```
TGTTTTAGATTCGGCAGCTTTCCATGCAGTCGACGGCTCGCGAGAGAGCTTGCTCTCTTG
GTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTATTATATCGGAACGTGCCCAGGAACGGGGGATAA
CTACTCGAAAGAGTGCCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGGGGGGGATCGCGA
GAACTCTCACTATTGGAGCGCGCGATATCCCATTACCTATTTTGTGGGGGTAAATGCTCACC
TTAGTCACCACCCGTAGCTGGATTCCCAGCACCAACCACCCACCCGAGGACTGATAGACG
CACCTTACTCCCTCGGGAGAAGCCCGAGGGTAATTTTGTGAGAATTTGGGAAACACTGAT
CCAACACTCCCAACCTGTTGATGAAGGTCATATGGGTGTCCACTTTTTTTATTCCCTGGAT
TACATCACGACCTGTAAA
```

-La séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche EC3'' a montré une similarité de 86% avec *Alcaligenes faecalis subsp. parafaecalis* NK4 (identité de la séquence [gi|761262340](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/761262340)|KP057590.1).

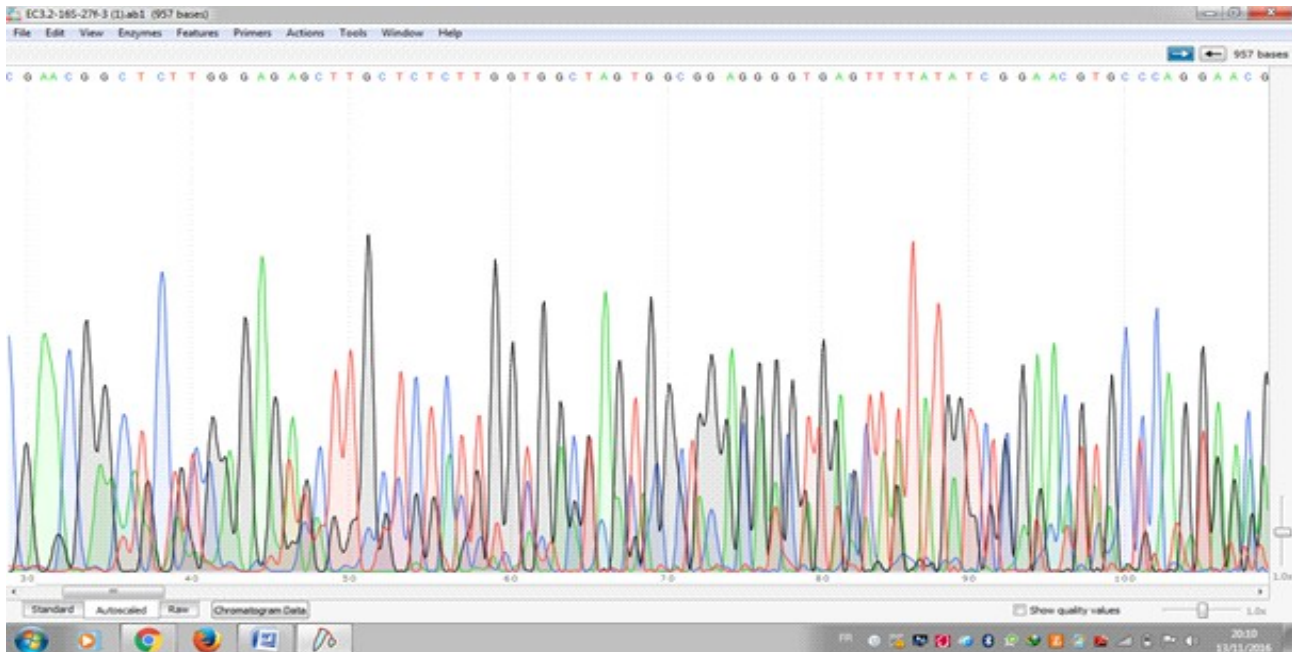


Figure 109 : Présentation d’une séquence partielle d’ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase EC3”.

EC3”16S-27f-3

CGGGCATTGCGGCAGCCTACCATGCAGTCGAACGGCTCTTGGGAGAGCTTGCTCTCTTG
GTGGCTAGTGGCGGAGGGGTGAGTTTTATATCGGAACGTGCCCAGGAACGGGGGAGCT
CTTCTCGAAAGAGTGCTTAATACCGCATAACGCCCTACGGTGGAAGGGGGGGATCCTGA
TACCTCTCACTATTGTAGCGCCCGATACCAAATTATCGATCTGGAGGTGTAAAGGCTCAC
ATGATCAACCATCTGGGATGGATTGCGGCCCAAACCTCTACGGTGGGACTGATGGGGAA
TCTTACTCCTACGGGAAAAGCCTGAGGCAAATTGCCACGAGGATGATGACCCTGAAAGA
TTGGAATAATTCTTTCACCGGGGACGATCTGACTGTACCCGGATTGTAAGCCCCGGCTGA
CTTCTTGCCTACAACCGGATTCTGCTGAGGGGGCTAGCGTTGCTCGAACTTACTGGTACT
TGCCAGCGCGTACGCGGATCCTTAAGGTGCGGGTGAAATCCCAGGGTACAACCTCTGAA
TTGCCCTTGATACTGGCGATCTTGAAGATGAGAAATCCATGGGCAAATCCTAGTGACTAC
GTTTTTACTGACATGCTAGAAAAAATCACAGTGGCGAAGGCTACCTAGTGTCTCATTACT
GAGCCTAAATATCTAAAGCATGAGGAGTAGACAGGATTACCTCCCGTGGATAGTACACA
CCCTAAAAACACGATAGCTAGGGGAGCAACCACGATTAGATCCCCTGCTCATTCCACGC
CCTTAACCATTTTCGCTGGGGGAGTGCGGCCGCTAGACTTTATCTCCACAGCTAACACG
GGAGCTCGCCACCCGGGGAAGCTGGTTCGCATAATTAAAACCCAAAAGAATTAGCCTGG
GCCCCCTCTGACCGGCGTGATAATGCCATATAATCTTGTGCTATCCCCTAAAAGCATAAC
CAAACACT

-La séquence d'ADN, codant la région ARN 16S de la souche RO2' a montré une similarité de 80% avec *Providencia vermicola* JK0216S (identité de la séquence [gi|529484592|KF135454.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/529484592)).

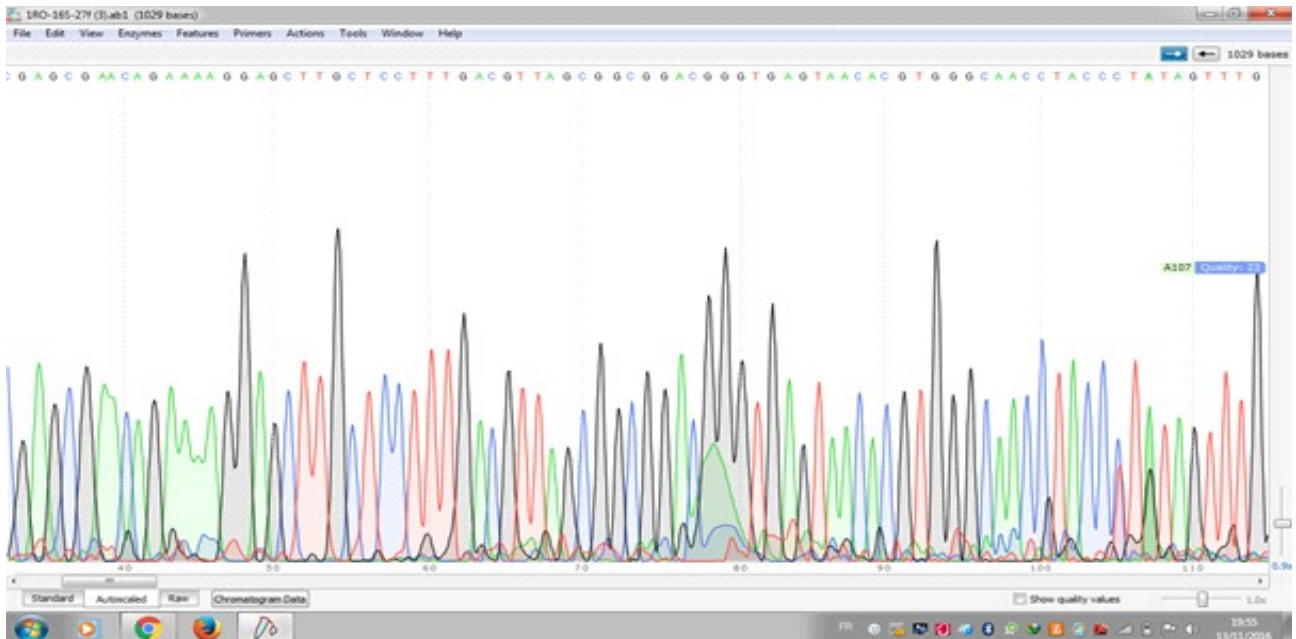


Figure 110 :Présentation d'une séquence partielle d'ADN de la souche sélectionnée productrice de la cellulase RO2'.

RO2'1-16S-27f-2

```
ATTAGAATGGGGCGGGCCTACCaTGCaAGTCGAGCGGTaACAGGGGAGCTTGCTTCTCTc
GatTAGCGGcGGACGGGTGAGTAATGTATGGGCGTATGTGCGATTAGGGGGGTATCACCCG
GCAAAGGAGGGCTAAACCCGAAAAACCCCTTTTGGTTCATGGGGGGAGATTGAAAGAC
CGCTCTATCGGATGACCCAGATGGGGTCAGCTAGTAAGTGGGGTATTGGCTAACCTAGG
CGACGATCCGTAGCTGATCCGAGACGATGATGAAACGGTGTGGGACTGAAACGGGGCC
CAAACCTCTACCGGAGGCCTCAGGGGGGAATATTGCAGAATGGGCCCAACCTGATGA
AGCCATGCCGCGTGTATGAATAAGGCCTTAGGATTGTTTTGTAATTTCAATCTTCTGTAAG
GCGTTGATGCTTATATCATCAACGATTGACGTTACCGACAGAAGACCTAACGGCTAACTC
CCTGCCCCCTCCCGGCCGGCTACGGAGGGTGTGCGCGTTAGTCCGAATTACTGGGCATTTA
TCGCACGTGTACGGTTGATTGAGTTACATGTGAAATCCCCGGGCTTCCCTGGGAAACCG
TCTAAGACTGGTCGGCTATAGTCTTGTTTAAAGGGGGTAGAATTCCATGTGTATCCCAGAA
ATGCCGTAAATGGGGAAGAATATCGGAGGCCAAAGGTGGCCCCCTGGACAATTACTGACC
CTCTCGTGCCAAAAGTGGGGAAGCAAAGGAATTATACCCTGGTAGTCCCGGTGCTAACC
GATGTAACTAAATGTTGTGCCCTTTAGGAGTGTCTCTCGCATCTAACGCGTTAAATCGAC
CGTCTGGGAGTACGGGCGCAAGATAAACTCAAATGAATTGACGGGGACTCGCACGAG
CGCTGGCATCATGTGGTTAATTCGATGCTACGCGAAAAACCCTTACCTACACCTTGACTC
GCGTCATGAACTTTCCCAGTAGATCTCTTGCGTGCTTTCAAGTAACTCCTGAAACAGGG
CGACTGTATAGACGTGTGTCTCACAGCTTGTCGTTCAAATATTGGTGTTAAAATTCCTCG
ACATAAAGCCACACCCCTTATGCCCTTATTGCGACGTTTGAGTCGTTTAAATTGAAATGGA
CCGTTCCAAGACACAACCGAAGTAAGGATTGGGATAAGTTCGTGCAGTTACTTTATCCTT
TACGAGTCTTCGCTTTATCACTCGTGGTG
```

L'analyse de la fraction 16S de l'ADNr a confirmée l'appartenance de la souche

- EC4' au *Frimicutes* , familles des *bacillaceae*, genre *lysinibacillus* et plus précisément *lysinibacillus xylaniticus*.

-EC2' au *Frimicutes* , famille des *Bacillaceas* , genre *Lysinibacillus* et plus précisément *Lyninibacillus fusiformis*

-EC3' au *Proteobacteria*, famille des *Alcaligenaceae*, genre *Alcaligenes* et plus précisément *Alcaligenes faecalis*

-EC3'' au *Proteobacteria*, famille des *Alcaligenaceae*, genre *Alcaligenes* et plus précisément *Alcaligenes faecalis subsp parafaecalis*

-RO2' au *Proteobacteria* , famille des *Enterobacteriaceae* , genre *Providencia* et plus précisément *Providencia vermicola*



Figure 111 : Présentation d'une partie de l'alignement de séquences de 5 souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') sur logiciel MEGA.

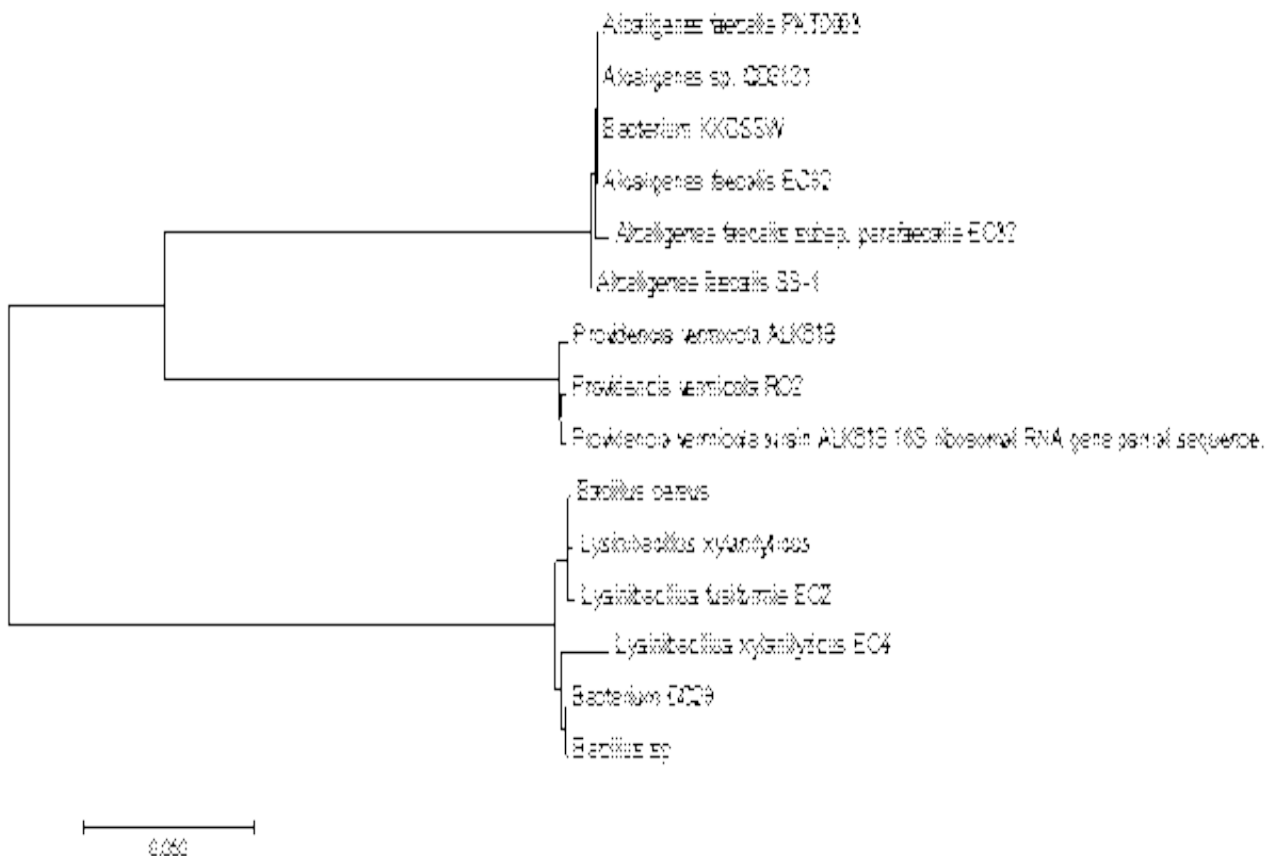


Figure112 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse de l'ARN 16S, montrant la relation entre les 5 souches isolées et les espèces du même genre (la barre 0,05 indique le nombre de substitution par position de nucléotide).

Les 5 souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') à partir de différents biotopes ont montré une grande diversité lors de leur identification phénotypique basée sur certains critères morphologiques et biochimiques (galerie API20E). Cependant ces caractères n'ont pas permis d'établir une classification précise et totale des isolats, une étude génotypique est nécessaire pour pouvoir indiquer un rang taxonomique des 5 souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2').

Cette technique moléculaire basée essentiellement sur l'analyse des séquences hautement conservées comme l'ARNr permet la détection de changements au niveau des séquences nucléotidiques lors de ces alignements et l'obtention des nombres de variances entre les bases (**Figure 111**), indiquant ainsi les similarités (homologies) des bases par une étoile, les mutations par changement de couleurs et les délétions survenues soit au cours de l'évolution ou bien une différence phénotypique entre les souches.

L'utilisation de l'alignement a permis la construction de l'arbre phylogénétique de 5 souches isolées, sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') (**Figure 112**) et leur division en deux groupes :

Les souches (EC3 ' , EC3'' et RO2') appartiennent au même groupe et sont liées par un ancêtre commun, étroitement apparenté au niveau des distances évolutives.

Cependant, les souches (EC4' et EC2') font partie du deuxième groupe et sont liées par un ancêtre en commun et étroitement apparenté au niveau des distances évolutives.

CONCLUSION

La préoccupation actuelle est de rechercher des alternatives ou compléments aux ressources fossiles, le concept de bio raffinerie forestière intégré est de plus en plus mis en avant. Afin de palier aux problèmes de prétraitement chimique et physique des sources lignocellulosiques nécessitant une forte consommation d'énergie, l'utilisation des procédés impliquant des enzymes est devenue importante. Les cellulases ont d'ailleurs déjà trouvé des applications dans le secteur de raffinage des fibres ou recyclage du papier.

L'objectif de ce présent travail est l'isolement, la sélection des souches bactériennes productrices de la cellulase à partir de de l'écorce d'olivier, fumier de vache, racine du pois chiche et des rhizosphères du sol, l'optimisation de certains facteurs physico-chimiques tels que le pH, la température, les sources de carbone, les sources d'azote et les sources d'ions impliqués dans la production et l'activité de la cellulase ainsi que leur identification phénotypique et génotypique par l'utilisation de la galerie API20E et l'amplification du fragment d'ADN codant la région conservée de l'ARN16S.

Les résultats obtenus ont permis l'isolement de 16 souches bactériennes à partir de l'écorce d'olivier, fumier de vache, racine du pois chiche et sols, dont le screening primaire a permis la sélection de 5 souches productrices de la cellulase (EC4', EC3', EC2', EC3'', RO2'), avec une excellente activité cellulolytique dont les diamètres des zones d'hydrolyse de la cellulose sont compris entre 52 mm et 60 mm.

L'optimisation des paramètres impliqués dans la production et l'activité de la cellulase des souches sélectionnées a montré que ces dernières (EC3'', RO2', EC3', EC4') ont manifesté lors de l'utilisation des sources carbone : xylose, mannitol, amidon, papier Whatman des taux de production de (0,93, 1,43, 1,61, 2,14 UI/ml) respectivement.

Cependant, la souche EC4' a manifesté une excellente production de la cellulase lors de l'ajout du sulfate d'ammonium et de peptone comme source d'azote, avec un taux de production de (8,66, 7,54 UI/ml) respectivement.

Par ailleurs, les souches (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') ont montré une importante activité de la cellulase à des valeurs de pH comprises entre 6,2-7,45 et une température de 40°C. Cependant, les souches (EC2', EC3'', et EC3') ont manifesté une forte activité de la cellulase en présence de Mn^{+2} avec des taux de production de (2,67, 1,25, 0,88 UI/ml) respectivement. A l'opposé, les souches (EC4' et RO2') ont montré une importante activité de la cellulase en présence du K^{+2} et Ca^{+2} .

L'étude du suivi de la cinétique de la croissance des souches (EC4', EC2', EC3', EC3'',

RO2') a montré que les souches (EC3'', EC4', EC2', RO2', EC3') ont révélé une excellente croissance, traduite par la production d'une importante quantité de la biomasse dont les valeurs de la DO sont respectivement : (0,4682-0,3095-0,2790-0,2484-0,1900).

Le séquençage de l'ARN 16S des souches sélectionnées productrices de la cellulase (EC4', EC2', EC3', EC3'', RO2') a permis l'identification de leur appartenance aux genres de *Lysinibacillus xylaniticus*, de *Lysinibacillus fusiformis*, *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes faecalis subsp. parafaecalis* *Providencia vermicola*, avec des degrés d'homologie de (92, 99, 84, 86, 80%) respectivement.

En perspective, des études approfondies doivent compléter ce modeste travail tel que :

- ✓ Purification de la cellulase par méthodes chromatographiques telles que HPLC, FPLC.
- ✓ Caractérisation des gènes impliqués dans la production de la cellulase.
- ✓ Clonage des fragments, codant la production de la cellulase dans des vecteurs puissants.
- ✓ La production industrielle des cellulases et leur utilisation dans la production de bioéthanol.

Références bibliographiques

ANDO S., ISHIA H., KOSUGI Y., ISHIKAWA K. (2002). Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. Applied and Environmental Microbiology. 68(1) p:430-433.

ANDRO T., CHAMBOST JP., KOTOUJANSKY A., CATTANO J., BARRAS F., et al. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. J Bacteriol (1984); 160:1199-1203

AZIZA.M.A, « perspectives du développement de la bioénergie en Algérie » , Centre de Développement des Energies Renouvelables Ministère de , l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique , Bulletin des Energies Renouvelables , N° 17,pp.1-4,2010

BARNOUD F. (1980). La cellulose dans «les polymères végétaux », J ed par Monties ,publication Gauthier-Villars. Paris. P: 66-68.

.BAUMGARTIER J.G. (1949). Canned foods: an introduction to their microbiology, ed 278.J and A.Churchill LTD London.

BAYER E A., KENIG R., LAMED R. (1983). Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. J Bacteriol. 156: 818-827.

BÈGUIN P., AUBERT J.P. (1994). The biological degradation of cellulose, FEMS, Microbiol.Rev. 13 p: 25-58.

BHAT M K. (2000). Cellulases and related enzymes in Biotechnology. Bioethanol Adv. 18:355-383.

BIOMERIEUX SA (2010). Consulté sur www.biomerieux.com

BISARIA, V.S., GHOSE, S.N. (1960). Biodegradation of cellulosic materials, Substrates Microorganisms, enzymes and production enzymes, Microb. Technol. 3, p: 90-104.

BOK J D. , YRNOOL D A., EVELEIGHV D E. (1998) . Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulases Cel A and Cel B from *Thermotoga neapolitana*. Applied and Environmental Microbiology: 64 (12): 4774-4781.

BUCHHOLZ K. RAPP P., ZADRAZIL F. (1983). Methods of enzymatic analysis. Volume II..Edition Bergmaeyer, H.U. Verlag Chemie, Weinheim. P: 178-180.

BOUSSEBOUA.H.(2002) . Microbiologie générale. Ed. Université Mentouri

Constantine Algérie.

CAILLIEZ. C. (1991). Isolement et caractérisation de bactéries cellulolytiques mésophiles :études physiologiques et approche moléculaire. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université de Nancy I. France.

CHESSON A. (1987). Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. *In*: Hresign W, Cole DJA, editors. Recent Advances in Animal Nutrition. London, Butterworths, p. 71-8

CHO S., DEVRIES J.W., PROSKY L. (1997). Dietary Fiber Analysis and Applications .Gaithersburg, MD: AOAC International.

CHRISTOPHER L.P., (2013). Integrated forest biorefineries: current state and development potential. *In*: Christopher L.P., ed. *Integrated forest biorefineries: challenges and opportunities*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry,

DEGUCHI. S., TSUJII. K , HORIKOSHI. K. (2006). Cooking cellulose in hot and compressed water. *Chemical Communications* 31: 3293–3295.

DAN S., MARTON I., DEKEL M., BRAVDO B.A., HE S., WITHERS S.G., SHOSEYOV O. (2000). Cloning, expression, characterization and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Biol. Chem.* 275 (7).p: 4973-4980.

DAVIES. G ., HENRISSAT. B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases .Structure. 3: 853-859.

DUFRESNE. A. (2012). *Nanocellulose: from nature to high performance tailored materials*. Berlin: Walter de Gruyter GmbH.

EKPRIGIN. M.M. (2007). Preliminary studies of cellulase production by *Acinetobacter anitratus* and *Branhamella* sp African Journal of Biotechnology, vol.6, no.1, pp.28-3.

ERIKSSON K.E ., PETERSSON G. (1968). Studies on cellulolytic enzymes. *Archi Biochem Biophy*, 124, p: 160-166.

FANG X. (2008). Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by Heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. *J. Biotechnol.* 136: 140-147.

FAO (2008). Rome Italy consulté sur le site : www.fao.org

FENGEL . D., WEGENER. G. (1989). *In*: *Wood: chemistry, ultra structure*,

reactions. Ed : De Gruyter W. New York. 613.

HALLIWELL G., HALLIWELL N. (1989). Biochim Biophys. Acta, 992, p: 223-229

HARJUNPAA. V., TELEMAN. A., KOIVULA. A., RUOHONEN. L., TEERI. T. T., TELEMAN. O., DRAKENDEG. T. (1996). Cello-oligosaccharides hydrolysis by cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei* – Association and rate constants derived from an analysis of progress curves. Eur J Biochem. 240: 584-591.

HASPER A.A., DEKKERS E., MIL M.V., VAN DE VONDERVOORT P.J.I., DE GRAAFF L.H. (2002).Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. Appl. Environ. Microbiol. 68 (4). P: 1556-1560.

IFRAN. M., SAFDAR. A., SYED. Q., NADEEM. M.(2012.) Isolation and screening of cellulolytic bacteria soil and optimization of cellulose production and activity. Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem 37 (3);287-293.

JARADAT. Z., DAWAGREH. A., ABABNEH. Q., SAADOUN. I.(2008). Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* Sp. (Strain J2). Jordan J Biol Sci ; 1: 141-146.

JOHNSON. E. A., SAKAJON. M., HALLIWELL. G., DEMAINE. A L. (1982). Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. Appl Environ Microbiol. 43 (5): 1125-1132.

JOSEFSSON. P. (2006). Biochemical modification of wood components. KTH, the royal institute of Technology, Department of Fiber and Polymer technology, Stockholm.

KADER. A. J., OMAR. O., FENG. L. S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the Barrio Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of Biodiversity and Environmental Conservation.

KHELEF.A.(2009). Etude des Etapes Primaires de la Dégradation Thermique de la Biomasse Lignocellulosique , Doctorat d'Etat, Université Paul Verlaine, Metz, France.

KIM. B. K., LEE. B. H., LEE. Y. J., JIN. I. H., CHUNG. C. H., LEE. J. W. (2009). Purification and characterization of carboxymethyl cellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* A-53. Enzyme and Microbial Technology. 44: 411-416.

KLEMAN-LEYER. K. M., GILKES. N. R., MILLER. R. C., KIRK. T. K. (1994). Changes in the molecular size distribution of insoluble cellulose by the

action of recombinant *Cellulomonas fimi* cellulases. Biochem J. 302: 463-469.

KOLPAK. F. J., BLACKWELL. J. (1976) . Determination of the Structure of Cellulose II. *Macromolecules* 9: 273-278.

KORISH. M. (2003). Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase from a Wild type Strain of a Yeast isolate. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg- University, Mainz, Germany.

KRAUSE, D. O., DENMAN, S. E., MACKIE, R. I., MORRISON, M., RAE, A. L., ATTWOOD, G. T., ET AL. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 663-693.

KUHAD. R.C., SINGH. A., ERIKSSON. K.E. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In : Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Ed: Eriksson K.E. Springer-Verlag, Germany.

LACHKE A.H., DESPANDEM.V. (1988). FEMS Microbiol. Rev, 45, p: 177-.

LAMED. R., SETTER. E., KENING. R., BAYER. E A. (1983b). The cellulosome a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. Biotechnol Bioengin Symp . 13: 163-181.

LAURENT.P., ROIZ.J., WERT.J.L., RICHEL.A., PAQUOT.M.(2011). Le Bioraffinage, une Alternative Prometteuse à la Pétrochimie, Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, Vol. 15, N°4, pp. 597 – 610.

LEMO. M. A., TEIXEIRA. J. A., DOMINGUES. M .R .M., MOTA. M., GAMA. F. M. (2003). The Enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolases I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. Enzyme and Microbial Technology. 32: 35-40.

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

LYND. L .R., WEIMER P. J., VAN ZYL W.H., PRETORIUS I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66 (3), p: 506-577.

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

MAWADZA. C., HATTI-KAUL. R., ZYAUYA. R., MATTIASSEN. B. (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. Journal of Biotechnology. 83:177-187.

MILLER. G L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt Chem.* 31: 426-428.

MARGEOT.M et MONOT.F.(2009). Procédé de Production d'Alcool dans un Contexte de Bio Raffinerie. Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle, WO 2009/098365 A2.

MOSIER. N. S., HALL. P., LADISCH. C. M., LADISCH. M. R. (1999). Reaction kinetics, Molecularaction, and mechanisms of cellulolytic proteins. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology.* 65: 23-40.

MOURANCHE. A., COSTES. C. (1985). Hydrolases et dépolymérase enzymes d'intérêt industriel. Gauthier- Villars (ed.).

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.

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

ONU (2015). Consulté sur le site : <http://www.un.org/fr/climate change/techfacts.shtml>

OULED DAOUD. F., AMRANI. F. et SAADOUN. T. (2005). Valorisation et traitement des déchets celluloses par la dégradation enzymatique par la cellulase *Aspergillus nige*. Premier séminaire international sur l'environnement et ses problèmes connexes.

OH. S. Y., YOO. D. I., SHIN. Y., KIM. H. C., KIM. H. Y., CHUNG. Y. S., PARK. W. H., YOUK. J. H. (2005). Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 340: 2376–2391

PAILLET .F (2013). Les biocarburants .mémoire de master en énergie. Université de Montpellier 2.

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

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

PERRY.J.J., STALE.J.T., LORY.S ,(2004). Microbiologie, cours et questions de révision. Dunod. Paris. 497-850.

PRPMEGA France. Consulté sur le site www.promega.com.

RADICH, A.(2004). Biodiesel Performance, Costs, an Use. Consulté sur EIA: <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biodiesel/>

ROBSON L.M., CHAMBLISS G.H. (1989). Enzyme Microb. Technol. 11, p: 626-644.

RODINOVA. N.A., KARPRE-YANTS.L.V., SERDNITSKII. P.V., KILMNIK. A.Y. (1992) .Hemicelluloses of cereal grains and their enzyme catalysts. *Appl. Bioch. Microbiol.* **28 (5)**, 485-501.

RAFIONE. T., MARINOVA. M., MONTASTRUC. L., PARIS. J.(2014). The green integrated forest biorefinery: an innovative concept for the pulp and paper mills. *Appl. Therm. Eng.*, **73**, 74-81.

ROUAU. X., THIBAUT. J.F. (1987) Les Fibres Alimentaires. Paris: APRIA.

SAHA.B.C.(2004) .Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. Process Biochem ; 39: 1871–1876.

SANYAL A., KUNDU R.K., DUBE S., DUBE D.K. (1988). Extracellular cellulolytic enzymesystem of *Aspergillus japonicus*. Purification and characterisation of an inductibleextracellular -glucosdase. Enzyme. Microb. Technol. 10. P: 91-99.

SASSEN. M. M. A. (1993). De celwand. Natuur & Techniek. 61: 896-903.

SCHAMBURG. D., SALZMANN. M.G.B.F. (1991). Cellulase. P: 1-11. In: Enzyme HandBook. Volume IV Springer- Verlag Berlin

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

SCHLOCHTERMEIER. A., WALTER. S., SCHRODER. J., MOORAMN. M., SCHREMP. H. (1992). The gene encoding the cellulase (Avicelase) Cel 1 from *Sterptomyces reticuli* and analysis of protein domains. Mol. Microbiol. 6: 611-621.

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

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

SHABEB. M.S, YOUNIS. A.M, HEZAYEN. F.F, NOUR-ELDEIN. M.A.(2010). Production of cellulase in low-cost medium by *Bacillus subtilis* KO strain. World Appl Sci J ; 8(1):35-42.

SHARROCK.K.R.(1988). Cellulase assay method: a review. Journal of biochem and biophys methods. 17,18-106.

SHOHAM. Y, LAMED. R, BAYER. E.A.(1999). The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. Trends Microbiol 1999; 7 (7):275 – 281.

SINGH A., AGRAWAL K.A., ABIDI A.B., DARMWAL N.S. (1990). Properties of Exoglucanase from *Aspergillus niger*. J. Gen. App. Microbial. 36. p: 245-253.

SOAWAPAR.K., YUPA.P., TAWEESEH.T.,SOMBOOM.T.(2014). Screening and identification of cellulose producing bacteria isolated from oil palm meal. Journal of applied pharmaceutical sciences vol.4(04),pp,090-096, April.

STRYER. L., BERG. J. M., TYMOCZKO. J. L. (2003). Biochimie. 5^{ème} édition. Médecine-Sciences.Flammarion. Paris. P: 303.

TANIGUCHI M., KOBAYASHI M., FUJII M. (1989). Biotechnol Bioeng, 34, p: 1092-1097.

TCHUNDEN. J. (1990). Cellulolyse Anaérobie Mésophile : Etude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35 31 9. Thèse de Doctorat de l'Université Nancy I. France.

TEERI. T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Tibtech. 15: 160-165

TORRES. C.E., NEGRO. C., FUENTE. E. BLANCO. A. (2012). Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **96**, 327-344.

TUNCER. M., BALLI. A. S., ROB. A., WILSON. M. T. (1999). Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. Enzyme and Microbial Technology. 25: 38-47.

VIDAUD. C. (1984). Contribution à l'étude de l'introduction du système

cellulasique de *Trichoderma* sp par utilisation d'analogue de substrat thiosaccharidique. Thèse de 3eme Cycle. Université de Grenoble.

VYAS. A., VYAS. D., VYAS. K.M.(2005). Production and optimization of cellulases on pretreated groundnut shell by *Aspergillus terreus* AV49. J Sci Ind Res 2005; 64: 281-286.

WARREN. R. A. J. (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. Annu Rev Microbiol. 50:183-212.

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

WU.B., ZHAO.Y,GAO.P.J. A new approach to measurement of saccharifying capacities of crude cellulase. Bioresources 1(2): 189-200;

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

XU. B., HELLMAN. U., ERSSON. B., JANSON. J. C. (2000). Purification, characterization and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*. Euro J Biochem. 267: 4970-4977.

YIN. L.J., HUANG. P.S., LIN. H.H.(2010). Isolation of Cellulase-Producing Bacteria and Characterization of the Cellulase from the Isolated Bacterium *Cellulomonas* Sp. YJ5. J Agric Food Chem 2010;58:9833–9837.

ZEITOUN.R.(2011). Procédés de Fractionnement de la Matière Végétale. Application à la Production des Polysaccharides du Son et de la Paille de Blé . Thèse de Doctorat, Université de Toulouse .

Annexe 1

Milieux de cultures

1-Gélose nutritif (Composition en g/L)

- Extrait de levure 05 g
- Peptone 10 g
- NaCl 05 g
- Agar 20 g

pH=7

2-Milieu CMS (Composition en g/L)

- Peptone 10 g
- CMC (cellulose microcristalline) 10 g
- K_2HPO_4 02 g
- Agar 10 g
- $MgSO_4$ 0,3g
- $(N_{H4})_2SO_4$ 02 g
- Gélatine 02 g

pH=7

3-Milieu CMS liquide (Composition en g/L)

- Peptone 10 g
- CMC (cellulose microcristalline) 10 g
- K_2HPO_4 02 g
- $MgSO_4$ 0,3 g
- $(N_{H4})_2SO_4$ 02 g

pH=7

4- Gélose au lait

- Lait écrémé 1 g dans 50 ml d'H₂O
- Gélose nutritive 5 g dans 50 ml d'H₂O

pH $7,2 \pm 0,2$ à 25°C

5-Gélose à l'amidon

- Gélose nutritif 100 ml
- Amidon 1 %

6-Gélose tween 80

- Gélose nutritive 100 ml
- Tween 80 1,6 ml

7-PCA

- Tryptone 5 g
- Extrait autolytique de levure 2,5g
- Glucose 01g
- Agar-agar 15 g

7 ± 0,2 à 25°C

8-BHIB

- Protéose-peptone 10 g
- Infusion de cervelle de veau 12,5 g
- Infusion de cœur de bœuf 5 g
- Glucose 2 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Hydrogénophosphate de sodium 2,5g

pH 7,4

Solutions

1-Solution rouge Congo 1% :

- Rouge Congo 1g
- Eau distillée 100 ml

2-Solution 1M NaCl

- NaCl 5,85 g
- Eau distillée 100 ml

3- Solution eau physiologique

- NaCl 0,85g
- Eau distillée 100 ml

4- Tampon phosphate

- KH_2PO_4 9,08 g
- Na_2HPO_4 9,47 g

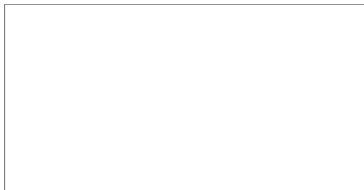
5 -Solution DNS

- DNS 12,5 g
- Sulfite de Sodium 0,625 g
- NaOH 12,5g

Annexe 2

La courbe standard de glucose

La courbe standard de glucose est établie lors de la préparation des étalons dilués et traités avec le réactif de DN. La lecture est effectuée lors par de l'absorption à une longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et les valeurs obtenues sont utilisées pour tracer une courbe d'étalonnage du glucose.



(Y :DO 540 nm, X :Concentration en glucose)

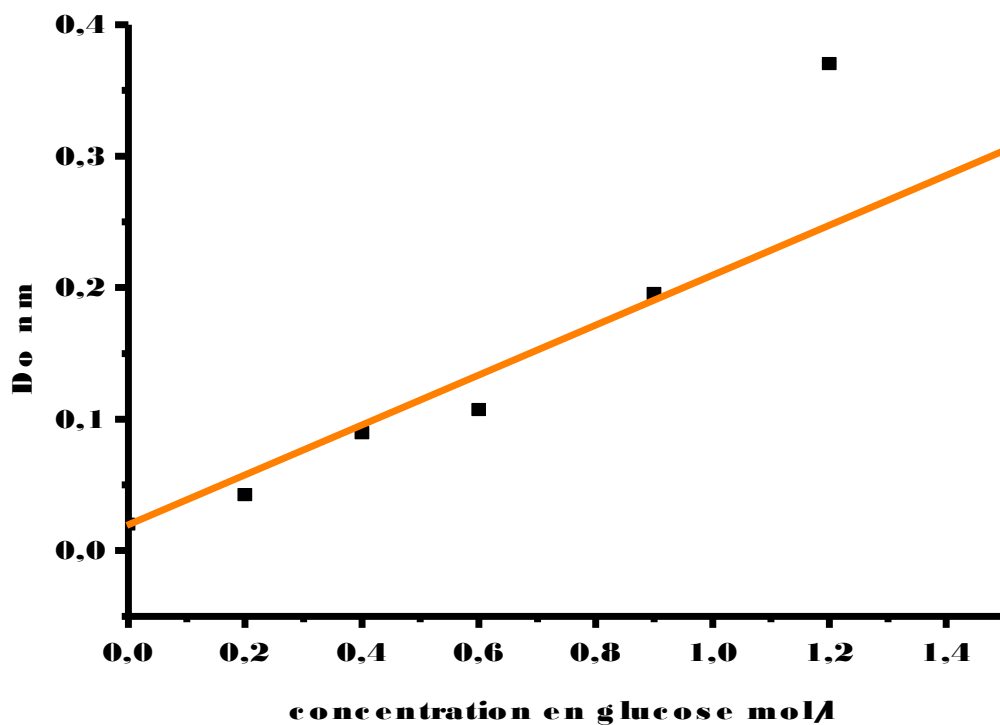


Figure 81: Courbe étalonnage du glucose.