

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

# Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de **Master**

**Domaine** : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

**Filière** : Sciences biologiques

**Spécialité** : Biotechnologie microbienne

Intitulé du thème :

**Isolement et caractérisation des souches cellulolytiques  
et l'optimisation de leurs activités enzymatiques**

Présenté par : **Mme Ibrir Hafida**

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : <b>Mr</b> Benine. M .A	(Professeur/ UDL/SBA)
Examineur 1 : Melle GUENAOUI K	( <b>M.C.B/</b> UDL/ SBA)
Examineur 2 : <b>Mme</b> Zemri K	( <b>M.C.A/</b> UDL/ SBA)
Promoteur : <b>Melle</b> Kanoun K	( <b>M.C.A/</b> UDL/SBA)
Co-Promoteur : <b>Mme</b> Boucif M	( <b>Doctorante/</b> UDL/SBA)

**Année universitaire 2019 - 2020**

**Session** : « **Septembre** »

# *Remerciements*

Tout d'abord, je remercie Dieu qui m'a donné la volonté, la santé et la force nécessaires pour faire ce travail.

Je remercie chaleureusement tous les professeurs qui ont contribué à ma formation par leurs généreuses contributions au savoir.

J'offre tous mes remerciements à mon encadreur dem'avoir dirigé avecses précieux conseils et pour sa patience inépuisable, ainsi que pour mon co-encadreur qui ma partager sa compétence et ses précieux conseils.

Mes sincères remerciements a l'honorable jury Mr Benine Mohamed Amine pour avoir accepté de présider ce jury ainsi que Le membre examinateur

Mme Zemri K et Melle Guenaoui K pour bien voulu examiner ce travail bien voulu examiner ce travail.

Mes remerciements s'étendent également à tous mes enseignants durant les années des études.

# *Dédicace*

A ma chère maman qui est la source de mon bonheur éternel et qui m'a donné la volonté, le courage et la patience d'aller loin.

A toutes mes sœurs, en particulier ma petite sœur gâtée safia.

Je remercie mon généreux mari qui m'a aidé dans mon cheminement professionnel et éducatif.

Je remercie tous mes collègues de travail, en particulier le chef de département, qui m'a encadrer dans mon cheminement académique

## *Liste des abréviations*

<b>C°</b>	<b>Degré Celsius</b>
<b>DO</b>	<b>Densité optique</b>
<b>G</b>	<b>Gramme</b>
<b>Glu</b>	<b>Glucose</b>
<b>H</b>	<b>Heure</b>
<b>L</b>	<b>Litre</b>
<b>Ox</b>	<b>Oxydase</b>
<b>pH</b>	<b>Potentiel hydrogène</b>
<b>rpm</b>	<b>Rotation par minute</b>
<b>tr/min</b>	<b>Tours par minutes</b>
<b>DNS</b>	<b>Dinitrosalicilic acide</b>
<b>EC</b>	<b>Echantillon</b>
<b>R</b>	<b>Racine</b>
<b>API20</b>	<b>Analytical profile index 20</b>
<b>E</b>	<b>Entérobactéries</b>
<b>UI</b>	<b>Unité international</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Représentation de la chaîne de cellulose.....</b>	<b>03</b>
<b>Figure 2 : Les microfibrilles de la cellulose.....</b>	<b>05</b>
<b>Figure 3 : Les différents niveaux d'organisation de la cellulose.....</b>	<b>06</b>
<b>Figure 4 : Les différentes conformations des molécules glucidiques.....</b>	<b>06</b>
<b>Figure 5 : Présentation de la structure de lignine .....</b>	<b>07</b>
<b>Figure 6 : Présentation de la chaîne de la cellulase .....</b>	<b>8</b>
<b>Figure 7 : Représentation schématique de l'action des enzymes cellulolytiques.....</b>	<b>09</b>
<b>Figure 08 :Caroubier .....</b>	<b>10</b>
<b>Figure 9 : Caroubier.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 10 :Cyprés.....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 11 :Frêne .....</b>	<b>13</b>
<b>Figure 12 :Melia .....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 13 :Pin d'Alep.....</b>	<b>15</b>
<b>Figure 14 :Aspect de la galerie Api 20 E avant incubation .....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 15 :Isolement et screening des Bacteries cellulolytique .....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 16 :Aspects des colonies de la souche EC1 sur le milieu de culture de Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse .....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 17 :Aspects des colonies de la souche EC2 sur le milieu de culture de Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse .....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 18 :Aspects des colonies de la souche EC3 sur le milieu de culture de Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse .....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 19 :Aspects des colonies de la souche EC3* sur le milieu de culture de Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse .....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 20 :Aspects des colonies de la souche EC5 sur le milieu de culture de Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse .....</b>	<b>31</b>
<b>Figure 21 :Aspects des colonies de la souche R2 sur le milieu de culture de Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse .....</b>	<b>31</b>
<b>Figure 22 :Etude du suivi de la cinétique de croissance de l'isolat EC1 , dans le milieu de culture Mendel .....</b>	<b>32</b>

Figure 23 :Etude du suivi de la cinétique de croissance de l'isolat EC2 , dans le milieu de culture Mendel .....	33
Figure 24 :Etude du suivi de la cinétique de croissance de l'isolat EC3 , dans le milieu de culture Mendel .....	33
Figure 25 :Etude du suivi de la cinétique de croissance de l'isolat EC3* , dans le milieu de culture Mendel .....	34
Figure 26 :Etude du suivi de la cinétique de croissance de l'isolat EC5 , dans le milieu de culture Mendel .....	34
Figure 27 :Etude du suivi de la cinétique de croissance de l'isolat R2 , dans le milieu de culture Mendel .....	35
Figure 28 : Courbe standard de glucose par méthode DNS.....	36
Figure 29 :L'activité enzymatique de la cellulase chez EC1.....	37
Figure 30 :L'activité enzymatique de la cellulase chez EC2.....	38
Figure 31 :L'activité enzymatique de la cellulase chez EC3.....	38
Figure 32 :L'activité enzymatique de la cellulase chez EC3* .....	39
Figure 33 :L'activité enzymatique de la cellulase chez EC5.....	39
Figure 34 :L'activité enzymatique de la cellulase chez R2.....	40
Figure 35 : optimisation du PH chez L'isolat EC1.....	41
Figure 36 : optimisation du PH chez l'isolat EC2.....	41
Figure 37 : optimisation du PH chez l'isolat EC3.....	42
Figure 38 : optimisation du PH chez l'isolat EC3*.....	42
Figure 39 : optimisation du PH chez l'isolat EC5.....	43
Figure 40 : optimisation du PH chez l'isolat R2.....	43
Figure 41 : optimisation du T° chez L'isolat EC1.....	44
Figure 42 : optimisation du T° chez l'isolat EC2.....	45
Figure 43 : optimisation du T° chez l'isolat EC3.....	45
Figure 44 : optimisation du T° chez l'isolat EC3*.....	46
Figure 45 : optimisation du T° chez l'isolat EC5.....	46
Figure 46 : optimisation du T° chez l'isolat R2.....	47
Figure 47: Aspects microscopique des 6 isolats sélectionnés productrices de la cellulase ' Après coloration de Gram ( G*1000) .....	49
Figure 48 :L'effervescence obtenue de la réaction d'H2O2 avec la catalase bactérienne .....	50



<b>Figure 49 :Aspects des galeries Api 20<sup>E</sup> ‘ après 24h d’incubation par les 4 isolats sélectionnées productrices de la cellulase .....</b>	<b>51</b>
<b>Figure 50 : capture fenêtre de la grille d’identification du programme ABIS on line contenant ‘ les resultats obtenus pour la souche EC2.....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 51 : capture fenêtre de la grille d’identification du programme ABIS on line contenant ‘ les resultats obtenus pour la souche EC3* .....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 52 : capture fenêtre de la grille d’identification du programme ABIS on line contenant ‘ les resultats obtenus pour la souche R2.....</b>	<b>54</b>
<b>Figure 53 : capture fenêtre de la grille d’identification du programme ABIS on line contenant ‘ les resultats obtenus pour la souche EC5.....</b>	<b>55</b>
<b>Figure 54 : Capture de la fenetre d’affichage de l’identification probabiliste de la souche EC1donné par programme ABIS 8 on line .....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 55 : Capture de la fenetre d’affichage de l’identification probabiliste de la souche EC3*donné par programme ABIS 8 on line .....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 56 : Capture de la fenetre d’affichage de l’identification probabiliste de la souche R2 donné par programme ABIS 8 on line .....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 57 : Capture de la fenetre d’affichage de l’identification probabiliste de la souche EC3 donné par programme ABIS 8 on line .....</b>	<b>59</b>

## *LISTE DES TABLEAUX*

<b>Tableau 1 : Origine et nombre des prélèvements.....</b>	<b>17</b>
<b>Tableau 2 : Paramètres caractéristiques de la courbe d'étalonnage .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau 03 :Codification origine et description des colonies des souches isolées.....</b>	<b>27</b>
<b>Tableau 4 : Mesure du diamètre des zones d'hydrolyse de la cellulose.....</b>	<b>26</b>
<b>Tableau 5 : Aspect macroscopique des souches les plus performantes sur le milieu Mendel.....</b>	<b>48</b>

## *Tables des Matières*

Introduction .....	01
chapitre 1	
1.1 Etude de la cellulose .....	03
1.2 Les hémicellulose .....	05
1.3 La Lignine.....	07
1.4 Sensibilité de la cellulose aux différents traitements.....	07
1.5 Les bactéries cellulolytiques .....	08
1.6 Etude des cellulases .....	08
1.6.1 La cellulase .....	08
1.7 Nomenclature des cellulases .....	09
1.8 Classification et description des arbres choisis.....	10
1.8.1 Caroubier.....	10
1.8.1.1 Classification : (web master 1).....	10
1.8.1.2 Description .....	11
1.8.2 Cyprès.....	13
1.8.2.1 Classification .....	13
1.8.2.2 Description .....	13
1.8.3 Frêne.....	14
1.8.3.1 Classification .....	14
1.8.3.2 Description .....	14
1.8.4 Melia.....	15
1.8.4.1 Classification .....	15
1.8.4.2 Description .....	15
1.8.5 Pin d'Alep .....	16
1.8.5.1 Classification .....	16
1.8.5.2 Description .....	16
CHAPITRE 2	
2 MATERIELS ET METHODES.....	17
2.1 Objectif.....	17

2.2	Prélèvement et Echantillonnage .....	17
2.3	Matériel utilisé .....	17
2.3.1	Appareillage.....	17
2.3.2	Solution et réactifs .....	18
2.4	Isolement des bactéries cellulolytiques.....	18
2.5	Screening des bactéries cellulolytiques .....	19
2.6	Test d'hydrolyse de la cellulose .....	19
2.7	Suivi cinétique de la croissance bactérienne .....	19
2.7.1	Préparation de la préculture .....	19
2.7.2	Ensemencement et suivi de cinétique .....	19
2.8	Teste de l'activité enzymatique.....	20
2.8.1	La courbe standard de glucose.....	20
2.8.1.1	Préparation de la solution glucose standard 1mg/ml .....	20
2.8.1.2	Lecture de la courbe standard .....	20
2.8.2	Estimation de l'activité de la cellulase .....	20
2.8.3	Optimisation du pH .....	21
2.8.4	Optimisation de la température .....	21
2.9	Identification phénotypique des candidats les plus performants .....	21
2.9.1	Caractères morphologiques .....	21
2.9.2	Caractères biochimiques et physiologiques.....	40
2.9.3	Identification biochimique par la galerie Api 20E .....	22
2.9.3.1	Lecture et interprétation des résultats.....	22
CHAPITRE 3		
	Résultats et discussion .....	25
3.1	Screening des bactéries cellulolytiques.....	26
3.1.1	Isolement des bactéries productrices de cellulose .....	26

3.1.2	Teste d'hydrolyse de la cellulose.....	28
3.2	suivi de la cinétique de croissance des isolats sélectionnés productrices de la cellulase.....	32
3.3	Estimation de l'activité enzymatique.....	36
3.3.1	la courbe standard de glucose .....	36
3.3.2	Estimation de l'activité enzymatique des 6 souche plus performantes .....	37
3.3.3	Optimisation du PH.....	40
3.3.4	Optimisation de la T° .....	44
3.4	Identification phénotypique des candidats les plus performants .....	48
3.4.1	Aspects macroscopique et microscopique des colonies.....	48
3.4.2	observation microscope a l'état frais .....	49
3.4.3	Observation microscopique a l'état fixé.....	49
3.4.4	Détermination du type respiratoire testes de catalase et l'oxydase .....	50
3.4.5	Identification biochimique par la galerie Api 20 <sup>E</sup> .....	51
3.4.6	Interprétation heuristique du profile biochimique des galerie.....	56
	Discussion .....	60
	Conclusion.....	64
	Référence.....	66
	Annex .....	70

## **RESUME**

Les enzymes produites par les micro-organismes présentent une importance particulière dans l'industrie biotechnologique, par exemple la cellulase, enzyme classée selon la nomenclature internationale EC 3.2.1.4, largement utilisée dans l'industrie des biotransformations (agroalimentaire, biodégradation des déchets, production de biocarburants).

L'objectif de ce travail est l'isolement et la caractérisation des bactéries productrices de la cellulase, l'étude de la cinétique enzymatique, l'optimisation des paramètres physico-chimiques impliqués dans sa production, les sources de carbone, les sources d'azote, les sources d'ions, PH et la température.

Les bactéries qui seront isolées à partir de rhizosphères diverse (Caroubier, Cyprée, Frêne, Pin d'Alep, Melia) dans la région de sidi Bel Abbes, seront testées in vitro pour leurs capacités à dégrader la cellulose par le bié de la cellulase, et les souches les plus performantes seront choisie pour éventuelles études.

La bactérie la plus performante sera identifiée biochimiquement.

---

**Mots clés :** Cellulose, bactéries cellulolytiques, activité enzymatique, Cellulase.

## ***ABSTRACT***

Cellulase enzymes presents an important biosources in biotechnological industry, their ability to transformed natural substance (plant biomass) into valuable products such as biofuels grives more interest to explored this bioconversion process.

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

The bacterial strains were isolated from rhizosphere diverse (Carobie, Cyprus, Ash, Aleppo pine, Melia) in the region of sidi Bel Abbes, and tested in vitro for their ability to degrade cellulose, and the most efficient strains has been selected for their growth kinetics.

---

**Key words:** Cellulose, cellulolytic bacteria, enzyme activity, Cellulase.

## ملخص

لدى الأنزيمات المنتجة عبر الجزيئات الدقيقة أهمية كبيرة في الصناعات البيولوجية من بينهم \* السيليلاز \* المستعملة في عدة صناعات تحويلية من بينها صناعات البنزين البيولوجي .

الهدف من هذا العمل هو عزل و تحديد مجموعة هذا البكتيريا المنتجة لأنزيم \*السيليلاز\* ، دراسة حركية السيليلاز ، دراسة العوامل الفيزيائية المؤثرة في إنتاج الحرارة \*PH\* \* السيليلاز \* مصادر الكربون ، الأزوت ، الايونات ، الرقم الهيدروجيني\* تم عزل سلالات بكتيرية من ريزوسفير متنوعة \* الخروب ، قبرص ، الرماد ، الصنوبر الحلبي ، ميليا \* في منطقة سيدي بلعباس و إختبارها في المختبر لقدرتها على تحليل السيليلوز ، ثم يتم إختيار السلالات الأكثر كفاءة لدراسة حركية النمو .

البكتيريا الأكثر كفاءة ستدرس و تحلل للتعرف عليها كيميائيا.

---

**كلمات مفتاحية :** السليلوز ، و البكتيريا السيليلوزية، نشاط الأنزيم ، السيليلاز.

# *Introduction générale*

## Introduction

La valeur de la cellulose comme source d'énergie renouvelable a fait de l'hydrolyse de la cellulose l'objet de recherche intense et d'intérêt industriel (**Bhat ,2000**).

C'est le principal produit de la photosynthèse en milieu terrestre, et la bio – ressource renouvelable la plus abondante produite dans la biosphère (100 milliards de tonnes sèches/an) (**Zhang and Lynd, 2004**).

Environ 70% de la biomasse végétale est emprisonnée dans les sucres à 5 et 6 carbones (D-xylose, D- arabinose, D- glucose, D- galactose, D-mannose) qui se trouvent dans la biomasse Lingon cellulosique composée principalement de cellulose , moins d'hémicelluloses et moins de lignine (**Sadhu and Maiti, 2013**).

Il est possible de convertir ce bio polymère en molécule monomère de glucose à la fois par des moyens chimiques et biologiques dans ce fait elle et la plus grande composante des résidus végétaux pénètrent dans les écosystèmes terrestres (**Richmond, 1991**) et représente donc une énorme source d'énergie pour les micro- organismes les principaux agents responsables de la décomposition des matières organiques dans le sol (**Lavelle and Spain, 2001**).

Les microorganismes sont capables de réaliser la bioconversion de la cellulose, un polymère cristallin de résidus D-glucose liés à des liaisons  $\beta$ -1, 4 glucosidiques, étant le principal matériau structuré de la paroi cellulaire végétale, est le glucide le plus abondant dans la nature (**Saha et al, 2006**).

Par conséquent, il est devenu un intérêt économique considérable de développer des procédés de traitement et d'utilisation efficaces des déchets cellulosiques en tant que sources de carbone peu couteuses (**Shanmugapriya et al., 2012**).

La cellulase est une enzyme utilisée pour la bioconversion des résidus cellulolytiques et lignocellulosiques, l'activité cellulolytiques est un système enzymatiques multi-complexe et en concurrence l'hydrolyse enzymatiques de l'enzyme nécessite une action synergique de 3 enzymes, endoglucanase (EC 3.2.1.4), exo-•- glucanase (EC 3.2.1.91) et •-glucosidase (EC 3.2.1.21) (**Shankar and Isaiarasu, 2011**).

Ces enzymes agissent séquentiellement dans le système synergique et convertissent ensuite la cellulose en une source d'énergie utilisable et du glucose et par conséquent,

Les cellulases jouent un rôle clé dans l'utilisation de la biomasse, principalement des activités des cellulase efficaces sont observées chez les champignons mais il ya un intérêt croissant pour un taux de croissance élevé par rapport aux champignons et a bon potentiel pour être utilisé dans la production de la cellulase. La recherche d'une nouvelle souche bactérienne améliorée, ayant une productivité hyper cellulologique avec plus d'activité, avec une stabilité élevée contre la température, ph et dans des conditions non aseptiques, pourrait rendre le procédé plus économique. On a découvert que certaines bactéries et champignons produisent et sécrètent ces enzymes librement en solution, cependant, certains micro-organismes se sont également avérés producteur des enzymes liées aux cellules et des complexes multi – protéiques exprimant des cellulases et les hémicelluloses appelées cellulosomes.

le cellulosomes a été découvert pour la première fois en 1983 à partir de la spore anaérobie thermophile *formingclostridium thermocellum* (Maki et al., 2011), ainsi la production de la cellulase dépend généralement de la variété des paramètres de croissance qui incluent la taille de l'inoculum ph valeur , température , présence d'inducteurs , additifs moyens , aération , croissance et temps (Immanuel et al., 2006) et l'activité de la cellulase semble également dépend de la présence de divers ions métalliques en tant que activateurs et inhibiteurs (Muhammad I et al., 2012).

Les cellulases ont de nombreuses applications dans le domaine de l'industrie et des produits pharmaceutiques , les applications industrielle textile pour le bio polissage des tissus et produisant un look délavé de denims , dans les détergents à lessive ménagers pour améliorer la douceur et la luminosité des tissus (Cavaco-Paulo, 1998), dans les industries alimentaires , du cuir du papier , de la pate et également utilisé dans la fermentation de la biomasse pour la production de biocarburants, biodiesel ,en outre les cellulases sont également utilisées dans la nutrition des ruminants pour améliorer la digestibilité , dans le traitement des us de fruits et d'autres applications émergentes , le désencrage du papier (Sakthivelet al.,2010).

*Chapitre I*  
*Etude Bibliographique*

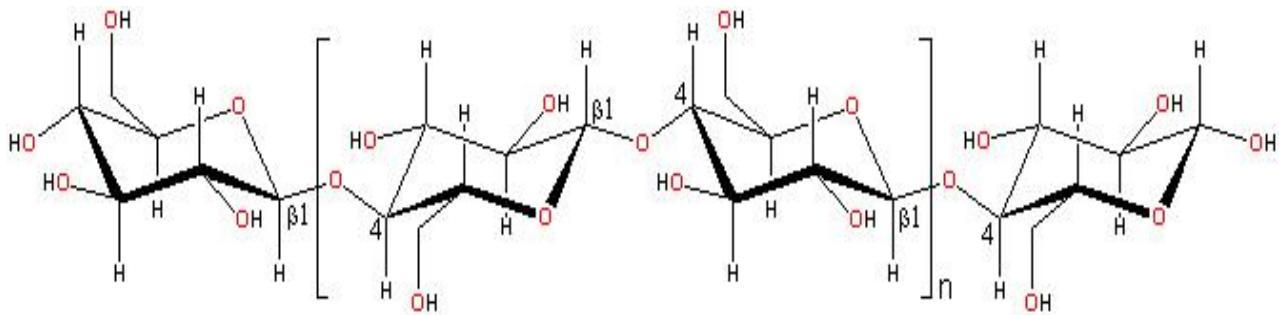
**1.1 Etude de la cellulose**

La cellulose homopolymère naturel est le constituant principal de la paroi cellulaire de nombreux végétaux (et notamment des plantes et des arbres) avec une teneur variant de 15 % à 99 %.

La cellulose appartient à la classe des glucides et contient 44,4% de carbone, 6,2% d'hydrogène et 49,4% d'oxygène (Sadov et al ; 1973).

La cellulose est un polysaccharide de la série des β-D-glucanes. Son motif répétitif est le cellobiose : il est constitué de deux β-D-glucopyranoses (glucoses) dans leur conformation chaise, unies par une liaison glycosidique β1-4

[



Extrémité non

Réductrice

Glucose

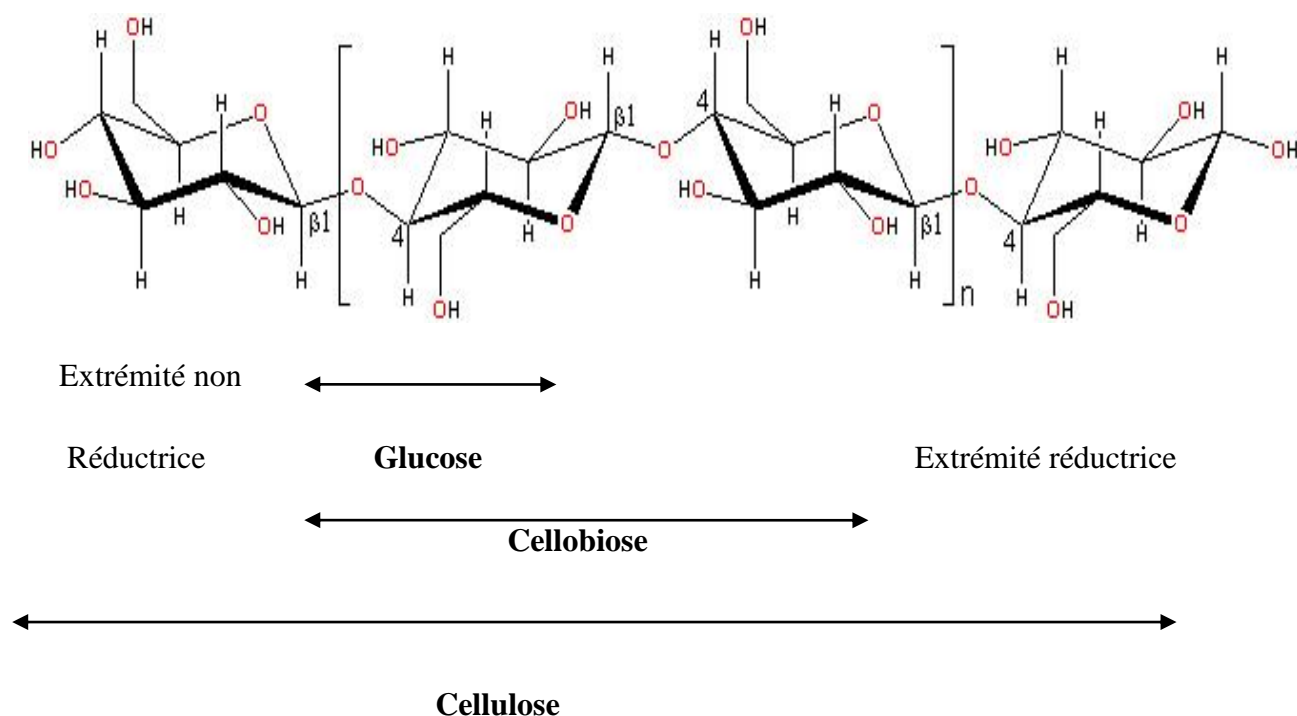
Extrémité réductrice

Cellobiose

Cellulose

**Figure 1** : Structure de la molécule de cellulose Tiré de **Chaplin (2004)**.

]



**Figure 1 :** Structure de la molécule de cellulose Tiré de **Chaplin (2004)**.

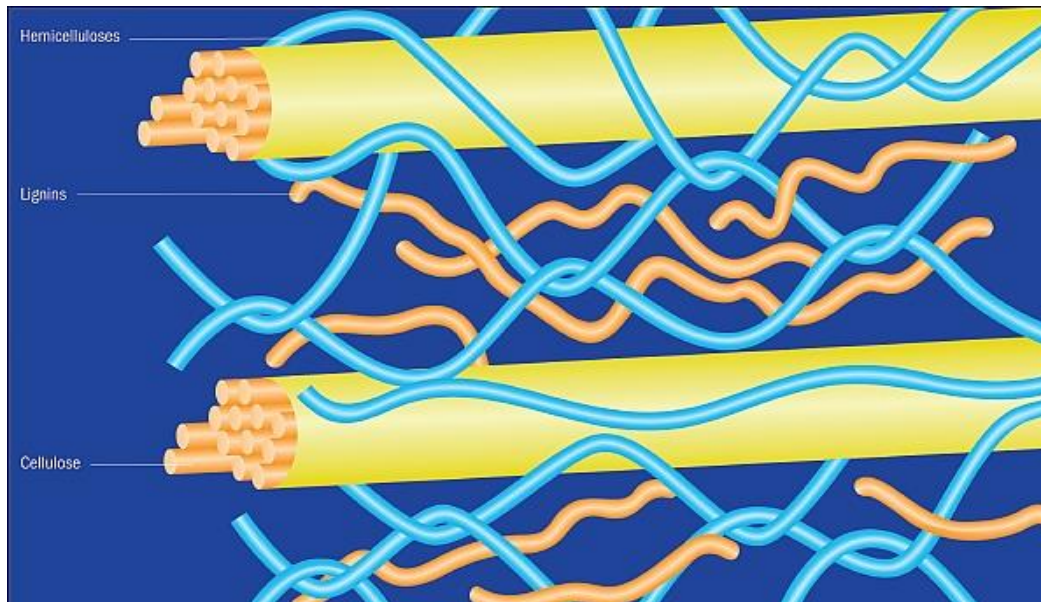
Dans de nombreuses réactions (principalement l'estérification), les groupes hydroxyles primaires ont une plus grande réactivité et les hydroxyles primaires des unités élémentaires cellulosiques sont responsables de la sordidité et de la teinture des matières. La cellulose est hypostyle stéréospécifique, la teneur élève en hydroxyle de la cellulose pourrait suggérer une grande solubilité dans l'eau et cela est dû à la rigidité des chaînes et à la liaison hydrogène entre les groupes hydroxyle des chaînes adjacentes, comme indique ci-dessous (**Sadov et al ; 1973**), en plus de la liaison hydrogène, un autre type de liaison appelé liaison semi acétal est présent entre les molécules de chaîne adjacentes de cellulose (**Hiller et al ; 1946**).

Dans la région amorphe, les chaînes polymères ont tendance à être repliées ; par conséquent ils auront des propriétés assez différentes de la région cristalline. Ce sont les régions indisposées ou la plupart des réactions chimiques ont lieu avec la cellulose. Les bribes polymères ne sont jamais complètement cristallines et cette interconnexion des régions cristallines et amorphes améliore la résistance du polymère aussi facilement qu'en 1920, Herzog et Jeneke ont reconnu que la cellulose provenant de source aussi différentes que le coton, des diagrammes de rayons x identiques pour le bois de ramie, le jute et le lin et ont conclu que ces fibres avaient une structure cristalline identique (**Herzog et al ; 1920**).

**Figure. 2** Les microfibrilles de la cellulose (**Référence internet 2**)

## 1.2 Les hémicellulose

L'hémicellulose est un groupe de polysaccharides de la paroi cellulaire, sont aussi des substances amorphes par contre la cellulose et la lignine des parois cellulaires végétales sont étroitement interpénétrées par un mélange de polysaccharides appelés hémicellulose et sont donc soluble dans un milieu alcalin dilué et facilement hydrolysé en pentose et hexose avec



certains acides uroniques.

**Sarker** et d'autres ont montré que l' xylose lié à l'acide méthyluronique formait les unités de base de l'hémicellulose dans le jute (**Sarker et al ; 1950**) et il est apparu que six unités de xylose étaient liées à des unités d'acides 1-méthyl glucuronique (**Das Gupta et al ; 1954**).

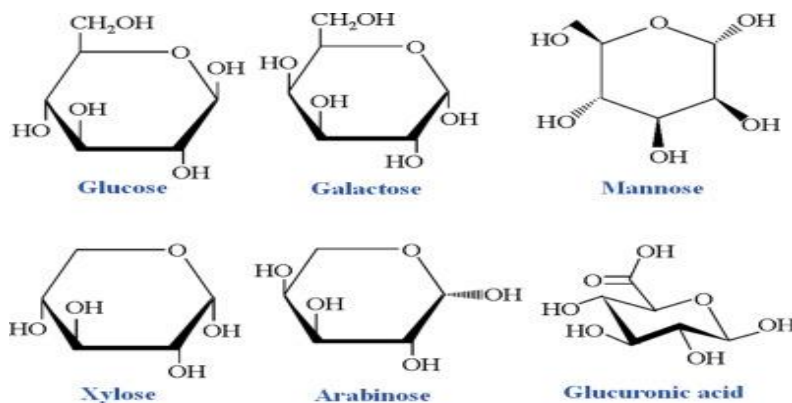
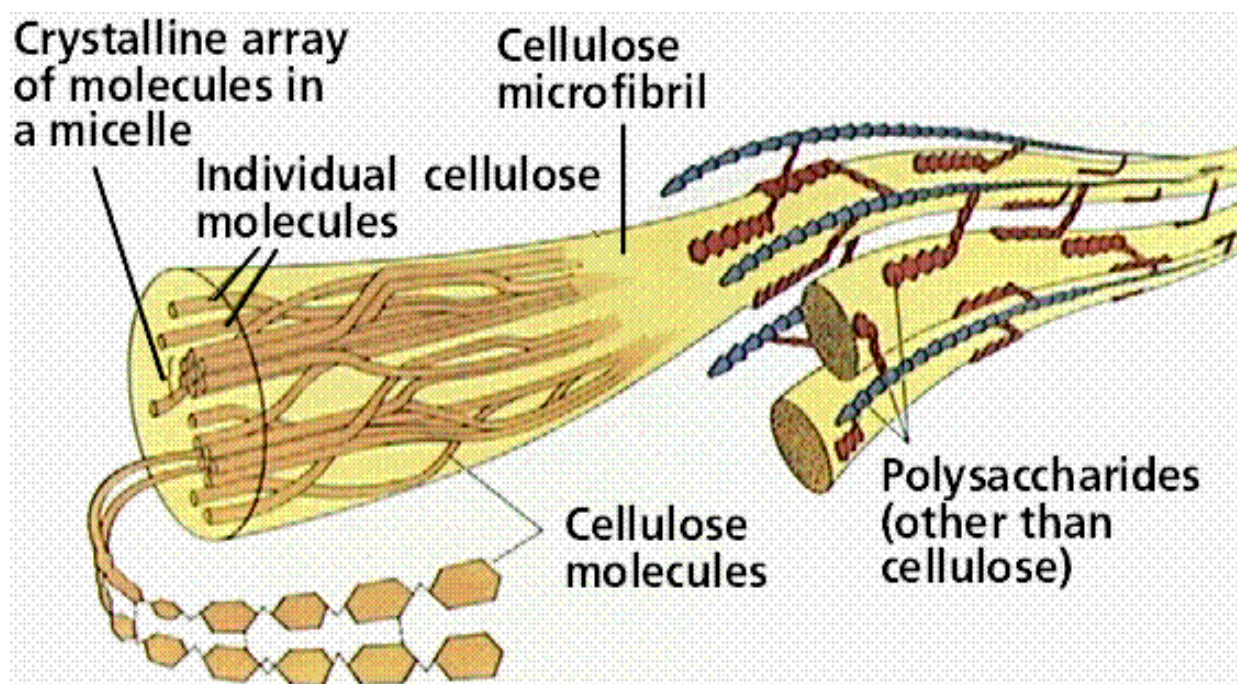


Figure 1 : Les différents niveaux d'organisation de la cellulose

(Référence internet 1)

Figure 4: Les différents niveaux d'organisation de la cellulose



(Référence internet 1)

La structure de l'unité répétitive de l'acide hémicellulose 3- méthoxy galacturonique de jute est liée aux unités xylose et la cellulose ont des composées à chaîne relativement courte et par conséquent occupent longitudinalement le même espace que l'anhydro-glucose s'unissent dans la chaîne de la cellulose. Les polysaccharides à chaîne courte seraient, par conséquent, emballés rigidement dans la structure cellulosique orientée avec une certaine croix, un pontage ou une boucle peut également se produire.

### 1.3 La Lignine

la plupart des tissus végétaux contiennent en plus des glucides et des extraits, un matériau gommeux polymère amorphe appelé lignine (**Browns et al ; 1952**). La nature de la lignine et sa relation avec la cellulose et d'autres composants de la fibre de jute sont encore incertaines, contrairement à la cellulose et à l'hémicellulose, la lignine donne une série de réactions colorées qui indiquent la présence de composés pour lesquels ces réactions sont typiques elle est aussi isolée généralement d'un matériau amorphe de poids moléculaire en moyenne élevé.

La lignine est insoluble, substance résineuse à caractère phénolique. Est construit dans une large mesure, de pierres de construction en phénylpropane, après avoir un group hydroxyle en position para et un groupe/groupes méthoxy en position/positions méta sur la chaîne latérale (**Hibbert et al ; 1939**) (**Tiemann et al ; 1975**).

De plus , il peut y avoir des liaisons carbone – carbone ou carbone-oxygène reliant le cycle aromatique aux portions de structure et la molécule de lignine, étant ainsi polyfonctionnelle du fait de la présence de groupements hydroxyles alcooliques et phénoliques, peut exister en combinaison avec deux ou plusieurs molécules de chaîne voisines, cellulose ou hémicellulose, servant de fonction de réticulant, postulé monomère dans la lignine comme indique ci-dessous (**Exam. et al ; 1979**).

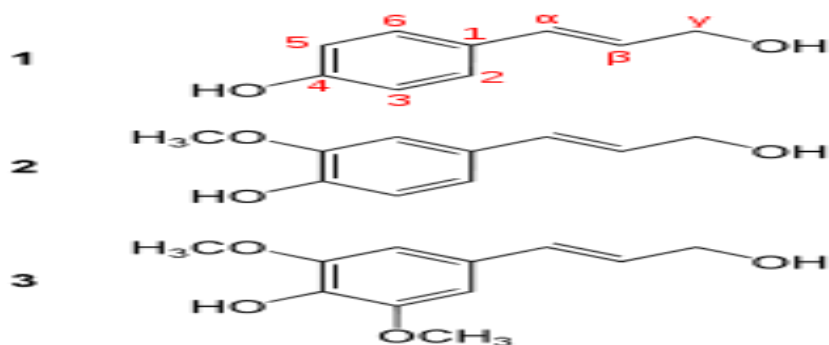


Figure 2 : Présentation de la structure de lignine  
(Référence internet 1)

### 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 de rendement de l'hydrolyse (**Barnoud, 1982 ; Viaud, 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 milieu avec une longueur de 5  $\mu$ m pour la cellulose de bois) (**Mouranche et costs ,1985**).

## 1.5 Les bactéries cellulolytiques

*Clostridium thermocellum* de *Trichoderma reesei*, *Cl. thermocellum* sont des bactéries anaérobie saprophyte, productrice de la cellulase, comme beaucoup d'autre bactéries interviennent dans la conversion directe de la cellulose cristalline en éthanol, en acide organiques et en gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) (**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 48000 – 210000 daltons , a coté de *Cl. Thermocellum*, de nombreuses bactéries très bien caractérisées *telles que* Bcteroides succinogenes sont capable de dégrader les celluloses les plus cristallines, s'adhèrent fortement aux fibres de cellulose et possèdent un système cellulolytiques particulièrement complexe (**Schellhorn et Forsberg ; 1984**).

## 1.6 Etude des cellulases

### 1.6.1 La cellulase

La cellulase est une enzyme qui hydrolysent les liaisons  $\beta$ -1-4 dans les chaines cellulosiques.

Les modules catalytiques des cellulases ont été classés en de nombreuses familles en fonction de leurs séquences d'acides aminés et de leurs structures cristallines (**Henrissat ,1991**) , aussi contiennent des hydrates de carbone non catalytiques modules de liaison (CBNs) et/ou d'autres modules de fonctionnement connus ou inconnus, qui peut être situé à l'extrémité N- ou C- d'un module catalytique et dans la nature, l'hydrolyse complète de la cellulose est méditée par une combinaison de trois principaux types de cellulases (**Juturu et al ., 2014**), ce sont des endoglucanases (Ec3.3.1.4) , exoglucanases (Ec3.2.1.1.91) ,et glucosidases (Ec3.2.1.21).

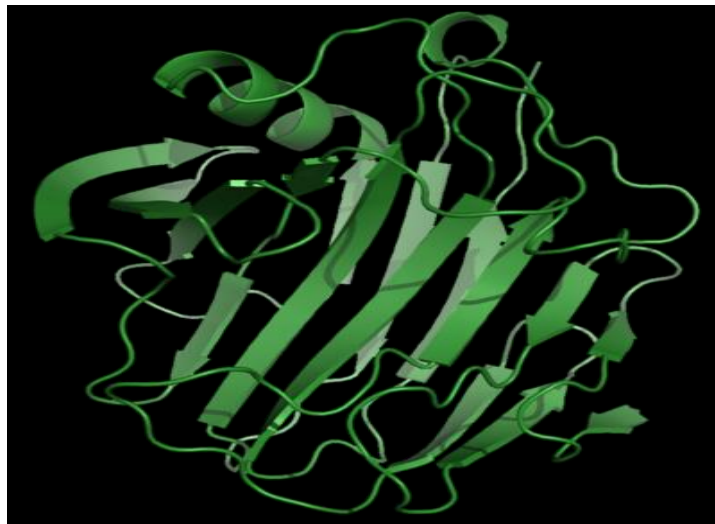
L'endoglucanase hydrolyse les liaisons glucosidiques au niveau des régions amorphes de la cellulose générant des oligomères à longue chaîne oligomère (extrémités non réductrices) pour l'action des exoglucanases ou des cellobiohydrolases , qui clivent les

oligosaccharides chaînes longue générés par l'action des endoglucanases en oligosaccharides à chaîne courte, il existe deux types d'exoglucanases, agissant unie directionnellement sur les oligomères à longue chaîne soit à partir du réducteur (Ec3.2.1.1.176) ou des extrémités non réductrices (Ec3.2.1.91) libérant du cellobiose qui est en outre hydrolysé en glucose par les  $\beta$  glucosidases (Ec3.2.1.21).

Ces enzymes hydrolytiques ne sont pas seulement utilisées dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques, détergentes et textiles, mais aussi dans l'industrie des pâtes et papiers de bois dans une vaste gestion, et dans l'industrie médico-pharmaceutique ( **Bhat and Bhat, 1997** ).

Dans l'industrie alimentaire, les cellulases sont utilisées dans l'extraction des composantes du thé vert, protéine de soja, les huiles essentielles des produits aromatiques, et amidon de patate douce.

Couplé aux hémicelluloses et aux pectinées, ils sont utilisés dans l'extraction et la clarification des jus de fruits après écrasement des fruits.



**Figure 3 : Présentation de la chaîne de la cellulase**

**(Référence internet 1)**

### **1.7 Nomenclature des cellulases**

**Nom codifié:** E.C.3.2.1.4

**Nom systématique :** 1,4-(1,3 ; 1,4)-B-Glucan 4-glucanohydolase.

**Nom recommandé:** cellulase.

**Synonymes** Endoglucanase, Endo-1,4-B Glucanase, celmulase carboxyméthylque, B-1,4-endoglucanhydroLase, Celludextrinase, Avicelase, ect (**Schamburg et Salzamann 1991**).

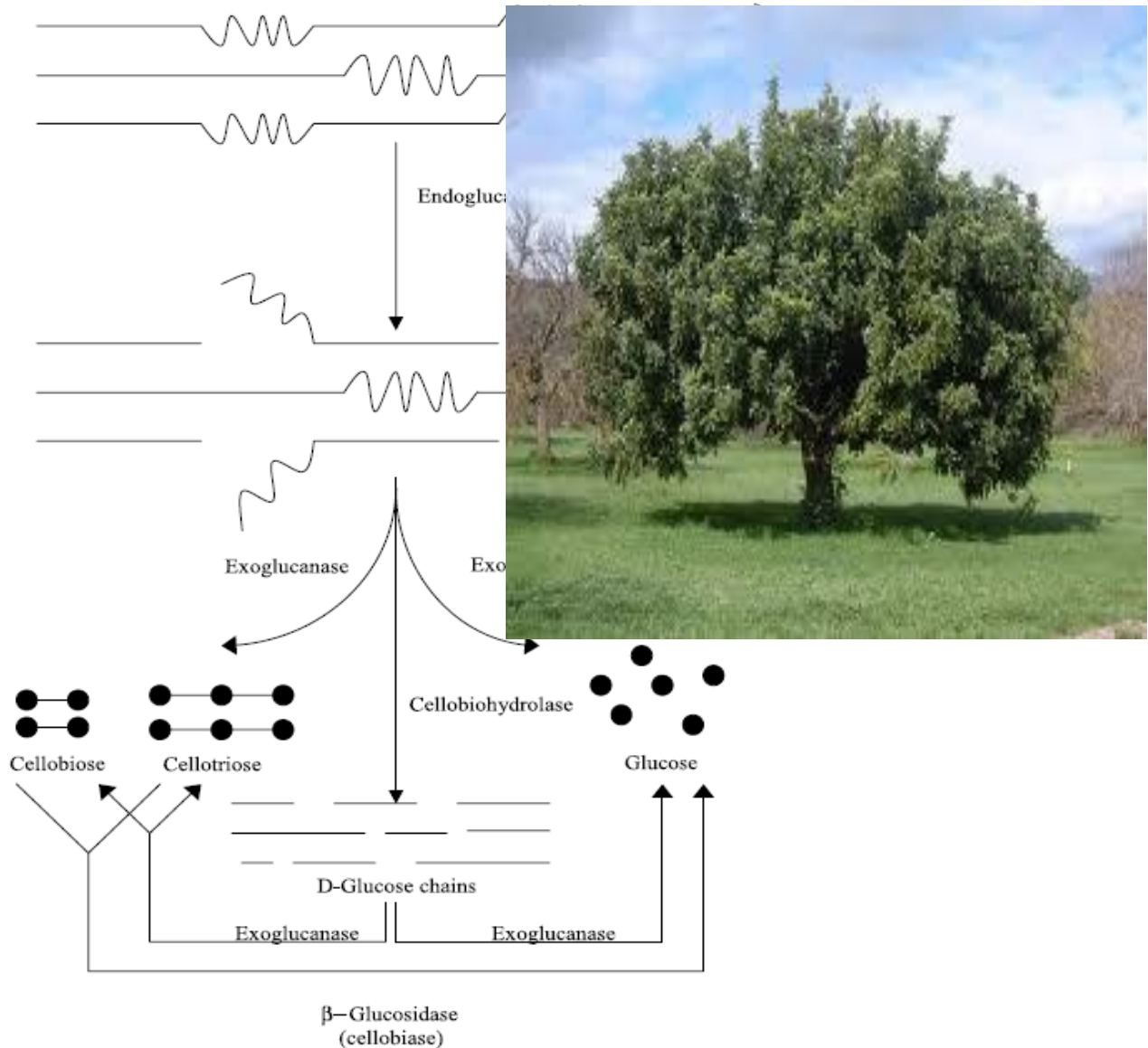


Figure 4 : Représentation schématique de l'action des enzymes cellulolytiques (Krause *et al.*, 2003)

## 1.4) Classification et description des arbres choisis

### 1.4.1) Caroubier

**Classification : (web master 1)**

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheophyta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

**Figure 8. Caroubier (Référence internet 4)**

Genre : *Ceratonia*

Espèce : *Ceratonia siliqua* L

**Description**

Petit arbre de 7-10 m en France (jusqu'à 16-20m sur 3 m de tour en Orient, Afrique de Nord, Espagne) toujours vert, touffu, à couvert épais. Tronc ± difforme, à écorce rugueuse mais non fissurée, brun-rouge **(Pierre lieutaghi, 2004)**. Feuille persistantes, paripennées, à 3-5 paires de folioles ovales, entières, pennatinervées, coriaces, luisantes **(Master 2)** foncées en dessous, largement ovales, arrondies ou échancrées au sommet, mesurant jusqu' à 6×4.5 cm .

Fleurs très petites, vert rougeâtre (pas de corolle mais calice à 5 divisions, têt caduc) en grappes cylindriques dressées, les males (5 étamines) et les femelles (1 stigmaté sessile) sur des pieds séparés **(Pierre lieutaghi, 2004)**. Gousses de 10-20× 1.5-2.5 cm ± arquées, pendantes, brun violacé clair à noir rougeâtre, à pulpe

d'abord acerbe puis sucrée renfermant 12-16 graines brunes (**Pierre lieutaghi, 2004**).



**Figure**  
**9 :**  
Caroubie  
r

**(Référence internet 4)**

### 1.4.2) Cyprès

#### Classification

Règne : *Plantae*.

Sous-règne : *Tracheophyta*.

Division : *Magnoliophyta*.

Classe : *Coniferphyta*.

Sous classe : *Pinopsida*.

Ordre : *Pinales*.

Famille : *Cupressaceae*.

Genre : *Cupressus*.

Espèce : *Cupressus sempervirens*.

#### Description

Le port de cette espèce est très étroit, avec des branches dressées. Son écorce est brun-gris, assez fine et crevassée (**web master 3**). Ses branches et rameaux irréguliers, serrés, dressés appliqués, formant une cime longue et étroite (**web master2**). Feuille froissées à odeur résineuse faible, très petites (<1 mm), d'un vert terne ; ramules très fins (1 mm) (**Lieutaghi, 2004**). fleurs monoïques, en chatons terminaux, Cônes mâles ovoïdes (long : 4-8 mm), groupées en fascicules axillaires. Cônes femelles gris, ellipsoïdes à globuleux (long : 25-40 mm). Cônes fructifiés ligneux, gris jaunâtre (long : 40 mm), avec 8-14 écailles



**Figure 10 : Cyprès (Référence internet 5)**

avec une petite protubérance centrale, avec 8-10 petites graines plates et étroitement ailés.

### 1.4.3) Frêne

#### Classification

Règne : *Plantae*.

Sous-règne : *Tracheophyta*.

Division : *Magnoliophyta*.

Classe : *Magnoliopsida*.

Sous classe : *Asteridae*.

Ordre : *Scrophulariales*.

Famille : *Oleaceae*.

Genre : *Fraxinus*.

espèce : *Fraxinus excelsior*.

#### Description

Le port du frêne commun est élancé. Son houppier est ample, mais toujours assez clair alors qu'en forêt, il est étroit et allongé. Cette espèce présente des branches ascendantes, une cime irrégulière et un feuillage peu dense. Son écorce est lisse, gris pâle et se fissurant au bout d'une trentaine d'années. Ses feuilles caduques naissent de bourgeons noirs, veloutés, le terminal pyramidal, gros (5-10 mm). Elles sont opposées et composées, disposant de 7 à 13 folioles dentées et glabres. Fleurs brunâtres, paraissant avant les feuilles, en panicules latérales opposées et courtes ; calice et corolle nuls ; anthère presque sessiles,



**Figure 11** Frêne : (Référence internet 6)

d'un pourpre noirâtre ; samares pendantes, oblongues, renflées inférieurement, ailées au sommet.

#### 1.4.4) Melia

##### Classification

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheophyta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Scrophulariales*

Famille : *Oleaceae*

Genre : *Melia* L

espèce: *Melia azedarach* L



Figure 12 : Melia (Référence internet 7)

##### Description

Petit arbre aux branches dressées, caduc, d'environ 8 à 12m de hauteur (**web master 6**). Forme étalée. Écorce sillonnée, de couleur grise. Feuilles pennées, mesurant jusqu'à 60 cm de long, aux folioles ovales, dentées, de couleur vert franc (**web master 7**). Fleurs parfumées, en grappes, de couleur blanches, bleues ou violettes, au centre des quelles on voit les étamines de couleur bleu foncé ou violet, avec les anthères jaunes. Les fruits, sont des drupes

charnues sphériques, de couleur jaunâtre (**web master 6**), de 1 cm de long (**web master 7**).

#### 1.4.5) Pin d'Alep

##### Classification

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheophyta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Coniferphyta*

Sous classe : *Pinopsida*

Ordre : *Pinales*

Famille : *Cupressaceae*

Genre : *Cupressus*

espèce : *Cupressus sempervirens* L



**Figure13:** Pin d'Alep (**Référence internet 8**)

##### Description

Son tronc presque toujours flexueux, à sa ramure fine ; assez dense, d'un gris argenté (**Pierre lieutaghi, 2004**). Feuilles 2, rarement 3-5 dans chaque gaine, longues de 6-10 cm, filiformes, molles, lisses, d'un vert clair. Chatons males oblongs-coniques aigus, longs de 8-12cm, rouge-brun luisant, à pédoncule très épais, constamment réfléchis (**web master 2**), inclinés vers le bas, persistant fort longtemps sur les **branches**, par fois en quantité incroyable (**Pierre lieutaghi, 2004**).

# *Chapitre II*

## *Matériels et méthodes*

## 2 MATERIELS ET METHODES

### 2.1 Objectif

L'objectif de ce travail est l'isolement des bactéries à partir des rhizosphères et des racines des arbres dans la région de Sidi Bel Abbés, capables de dégrader la cellulose. Dans un second temps, l'étude du potentiel de production de la cellulase chez les souches sélectionnés, performants.

### 2.2 Prélèvement et Echantillonnage

Les prélèvements ont été effectués à partir des arbres suivants Caroubier (Error! Reference source not found.), Cyprès Conique (Error! Reference source not found.), Frêne (Error! Reference source not found.), Pin d'Alep (Error! Reference source not found.) et Melia (Error! Reference source not found.).

Environ 10g de racine de chaque arbre et 50g de sol ont été prélevés de la rhizosphère des arbres de profondeur de 10 cm dans des sacs de conservation (Tableau 1)

**Tableau 1 : Origine et nombre des prélèvements**

Lieu de prélèvement	Origine de prélèvement	Nombre des prélèvements
Site 1 : Conservation des forêts Sidi Bel Abbes	Caroubier	2
Site 2 : Conservation des forêts Sidi Bel Abbes	Cyprès conique	2
Site 3 : Conservation des forêts Sidi Bel Abbes	Frêne	2
Site 4 : Conservation des forêts Sidi Bel Abbes	Pin d'Alep	2
Site 5 : Conservation des forêts Sidi Bel Abbes	Melia	2

### 2.3 Matériel utilisé

#### 2.3.1 Appareillage

- Autoclave (sanoclave ®).
- Microscope optique (B series, Motic ©).

- Etuve (Memert®).
- Spectrophotomètre UV- visible (UV mini-1240, Shimadzu ©).
- Agitateur de cultures (SM 25, Edmund buhrler).
- Loupe binoculaire (Zeiss©).
- Centrifugeuse (1-15K, sigma ®).
- Agitateur magnétique à thermostat (Heidolph).
- Balance de précision (Sartorius).
- pH – mètre (pH 210, Hanna).
- Bain-marie (Memert).

### 2.3.2 Solution et réactifs

- Eau distillée.
- Solution de cristal violet (violet de gentiane).
- Solution de fuchsine.
- Lugol.
- Alcool chirurgical 95°.
- Huile d’immersion (huile de cèdre).
- Disque oxydases.
- Peroxyde d’hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- Réactifs de révélation pour les galeries Api 20 E ® : VP1 (Hydroxyde de potassium), VP2 (α-naphtol), NIT1 (Acide sulfanilique), et NIT2 (N, N-diméthyl-1-naphtylamine), JAMES(ou réactif de Kovac : composant J2183) Zn (Zinc), TDA (Perchlorure de fer).

## 2.4 Isolement des bactéries cellulolytiques

### • Isolement à partir des Racines

Les racines prélevées sont grattés à l’aide d’une lame bistouri stérile et mesure d’un gramme (1gr) pour chaque échantillon de racine.

Ces échantillons sont ensuite utilisés pour la réalisation d’un enrichissement dans un volume de 10 ml de bouillon nutritif (**Annexe 1**), les tubes inoculés par les racines sont incubés à une température de 30°C pendant 24 heures (**Yoav et al., 1993**).

### • Isolement de la rhizosphère

Une pesée d'un 1 gr de sol rhizosphérique est inoculée dans un volume de 10 ml de bouillon nutritif (**Annexe 1**). Les tubes sont ensuite incubés à une température à 30°C pendant 24 heures (**Yoav et al., 1993**).

## 2.5 Screening des bactéries cellulolytiques

A partir des tubes d'enrichissement pour les différents échantillons de racine et du sol rhizosphérique, réaliser un ensemencement par stries serrées sur gélose Mendel (**Annexe 1**) milieu de culture à base de cellulose comme seule source d'énergie, puis incubé 48h à 30°C.

Seules les bactéries cellulolytiques qui utilise la cellulose comme seule source de carbone peut donner croissance sur la gélose Mendel (**Annexe 1**).

Après observation, les colonies sont sélectionnées et purifiées 4 fois par stries d'épuisements sur gélose Mendel (**Annexe 1**), puis conservées sur bouillon nutritif glycérolé à 20% à -4°C.

## 2.6 Test d'hydrolyse de la cellulose

18 souches pures ont été ensemencées dans du bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C pendant 24h. Une suspension bactérienne des souches tests d'un volume de 50µl est prélevé et déposé au centre d'une boîte Pétri contenant le milieu Mendel additionnée de Rouge Congo à une concentration 1 % (**Wang et al., 2004**), incubée à une température de 30°C, successivement 24h, 48h, 72h. La lecture est effectuée par mesure des diamètres des zones d'hydrolyses.

## 2.7 Suivi cinétique de la croissance bactérienne

### 2.7.1 Préparation de la préculture

Les 6 souches pures, sélectionnées productrices de la cellulase performantes sont inoculées dans des fiole-Erlenmeyer de 250 ml, contenant un volume de 50 ml de bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C, pendant 18 heures.

### 2.7.2 Ensemencement et suivi de cinétique

Les suspensions bactériennes sont ajustées à une densité optique initiale, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde 550 nm.

Inoculées dans le milieu Mendel, afin de les mettre dans les mêmes conditions de biomasse initiale en Erlenmeyer de 250ml renfermer avec du coton carder contenant 100ml de milieu Mendel, après cela, les isolats ont été cultivés pendant 30h sous une agitation de 100tr/min à une température ambiante.

Chaque 2h une prise d'échantillonnages a été faite pour un volume de 6ml ; 2ml a été destiné pour la lecture de la charge bactérienne à 550nm dans des cuves de spectrophotomètre, et 4 ml ont été centrifugés à  $14000 \times g$  pendant 10 min à  $4^{\circ}\text{C}$  afin de recueillir un surnageant enzymatique, lequel est conservé en Ependorf stériles à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2.8 Teste de l'activité enzymatique

### 2.8.1 La courbe standard de glucose

#### 2.8.1.1 Préparation de la solution glucose standard 1mg/ml

Afin de réaliser une courbe d'étalonnage, Différentes concentrations de la solution de glucose ont été préparées à partir d'une solution mère (1mg/ml) (Tableau 2). (Shoham *et al.*, 1999)

Tableau 2 : Paramètres caractéristiques de la courbe d'étalonnage

Numéro des Tubes	0	1	2	3	4	5
Concentration du glucose (mg/ml)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Solution de glucose (ml)	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
Eau distillée (ml)	10,0	8,0	6,0	4,0	2,0	0,0

#### 2.8.1.2 Lecture de la courbe standard

Un volume 1ml de réactif DNS (**Annexe 1**) est ajouté à un volume de 1ml des différentes concentrations de glucose introduites dans des tubes à essai stériles.

Les tubes à essai sont ensuite chauffés dans un bain marie à une température de  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 10min, refroidis à une température ambiante. Un volume de 10 ml d'eau distillée est ajouté afin de diluer la concentration de la solution.

La lecture est effectuée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 540nm.

### 2.8.2 Estimation de l'activité de la cellulase

L'activité cellulolique est estimée par le dosage du taux de sucre réduit d'une solution de cellulose à 2%. 1ml de cette dernière est mélangé dans des tubes à essais stériles avec un volume de 0.5ml du surnagent contenant l'enzyme,

Les tubes à essai sont ensuite incubés à une température de 50°C pendant 30 min, puis jetés 0.5 ml de la solution et lui rajouté 1 ml du réactif DNS, ensuite placés pendant 10 min dans un bain marie à 100°C, refroidis à une température ambiante. Un volume de 10 ml d'eau distillée est ajouté afin de diluer la concentration de la solution.

Le dosage des sucres réduits générés est effectuée par mesure de l'absorbance à 540 nm.

### **2.8.3 Optimisation du pH**

L'optimisation de la valeur du pH est effectuée lors de l'incubation du surnageant contenant l'enzyme en présence du substrat de cellulose à une concentration 2%, préparée dans une solution tampon de 0.05 M phosphate à différentes valeurs de pH (5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8), à une température 50°C pendant 30 minutes. L'activité cellulolytiques est évaluée par la méthode DNS.

### **2.8.4 Optimisation de la température**

L'optimisation de la température est effectuée après une série d'incubation du surnageant contenant l'enzyme et son substrat la cellulose à une concentration 2%, en présence d'une solution tampon de phosphate 0.05 M à différentes températures (30°C, 40°C, 50°C, 60°C), pendant 30 minutes. L'activité cellulolytiques est évaluée par la méthode DNS.

## **2.9 Identification phénotypique des candidats les plus performants**

### **2.9.1 Caractères morphologiques**

#### **Aspect des colonies**

L'aspect et la couleur des colonies sur le milieu-Mendel ont été observés à l'œil nu et sous une loupe binoculaire.

#### **Etude microscopique à l'état frais**

L'observation microscopique des cellules à l'état frais permet de visualiser la forme, la mobilité et le mode d'agencement des cellules bactérienne. Une suspension bactérienne est prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile, étalée sur une lame propre et recouvre avec une lamelle par limitation de la formation des bulles d'air. Les cellules sont observées au microscope optique à un grossissement  $\times 100$  après l'ajout de l'huile d'immersion.

### Etude microscopique à l'état fixé

La coloration de Gram selon la constitution de leurs est un procédé différentiel qui divise les bactéries en 2 classes selon la constitution de leurs parois cellulaires.

- Le frottis est séché et fixé sur la flamme du bec benzène et coloré ensuite avec le violet de gentiane pendant une minute puis il est lavé avec l'eau distillé.
- Ensuite la préparation est traitée avec une solution d'iode pendant une minute : le Lugol, qui agit comme un mordant c'est-à-dire qu'il augmente les interactions entre la cellule et le colorant pour que la cellule soit plus fortement contrastée.
- Le frotti est décoloré par lavage avec de l'éthanol, cette étape engendre l'aspect différentiel de la coloration de Gram : les bactéries Gram + gardent le violet de gentiane tandis que les bactéries le perdent et se décolorent.
- Enfin, le frotti est contre coloré à l'aide d'un colorant basique de couleur différente pendant quelques secondes : la fuchsine, colore les bactéries à Gram – négative en rose et laisse les bactéries à Gram positives colorées en violet foncé (**Prescott et Harley, 2002**).
- La préparation est ensuite recouverte par une lamelle et observée à un grossissement  $\times 100$ .

### 2.9.2 Caractères biochimiques et physiologiques

- **Détermination du type respiratoire**

La détermination du type respiratoire des bactéries est réalisée sur le milieu de culture Viande-Foie (VF). Le milieu en surfusion est ensemencé par les isolats dans des tubes à essai par pique centrale avec une anse de platine stérile. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h. La lecture est procédée par l'observation de la croissance bactérienne.

- **Test de catalase**

Une goutte d'eau oxygénée 10 volumes est déposée sur une lame propre, ensuite la colonie bactérienne prélevée est étalée sur cette lame. Une réaction positive se manifeste par un dégagement immédiat de bulles gazeuses.

- **Test d'oxydase**

Le test d'oxydase constitue un moyen d'identification des bactéries à Gram négatives, qui permet la mise en évidence de la présence d'enzyme cytochrome oxydase. Une suspension bactérienne est ajoutée au disque imprégné de réactif. La réaction positive se manifeste par l'apparition d'une teinte rose violette à la température ambiante pendant 5 minutes (Marchal et Bourdon., 1973).

### 2.9.3 Identification biochimique par la galerie Api 20E

La galerie API 20 E est un système standardisé utilisée pour l'identification des Entérobactéries et autre bacilles à Gram négatives non exigeantes et non entériques. C'est une technique de routine très utilisée en milieu professionnel pour le diagnostic *in vitro* et le contrôle microbiologique. Une galerie se compose de 20 micro tubes contenant un substrat déshydraté pour réaliser 21 tests biochimiques miniaturisés.

On inocule chaque tube avec la suspension bactérienne à identifier, les réactions produites après la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant (DELAHAYE, 2005).

- **Inoculation des galeries Api 20 E :**

Le fond de la boîte de l'inoculation de la galerie a été humidifié en ajoutant dans les alvéoles de l'eau distillée stérile, ensuite, des suspensions bactériennes des 4 souches les plus performantes ont été ajustées pour une densité optique égale à 0.1 (Annexe3).

- Bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5-10 secondes. La suspension bactérienne doit être utilisée dans les 15 minutes suivant sa préparation.
- Déposer soigneusement 150 µl de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile.
- Ajouter de nouveau 150 µl de la suspension bactérienne aux cupules CIT, VP et GEL (total = 300 µl) par puits.
- Après l'inoculation, remplir les cupules ADH, LDC, ODC, H2S et URE d'huile de paraffine.
- Placer les galeries dans une chambre humide et incuber à 30°C pendant 18 à 24 heures.



Figure 14 : Aspect de la galerie Api 20 E avant incubation

### 2.9.3.1 Lecture et interprétation des résultats

Après l'incubation et l'ajout des réactifs de révélation (NIT 1 et NIT 2, VP1 et VP2, Kovac, Zinc, Chlorure ferrique), la lecture des résultats obtenus s'effectue directement en se référant au tableau. Les résultats obtenus ont été interprétés avec le logiciel d'identification probalistique on-line "Abis 8".

# *Chapitre III*

## *Résultats et discussion*

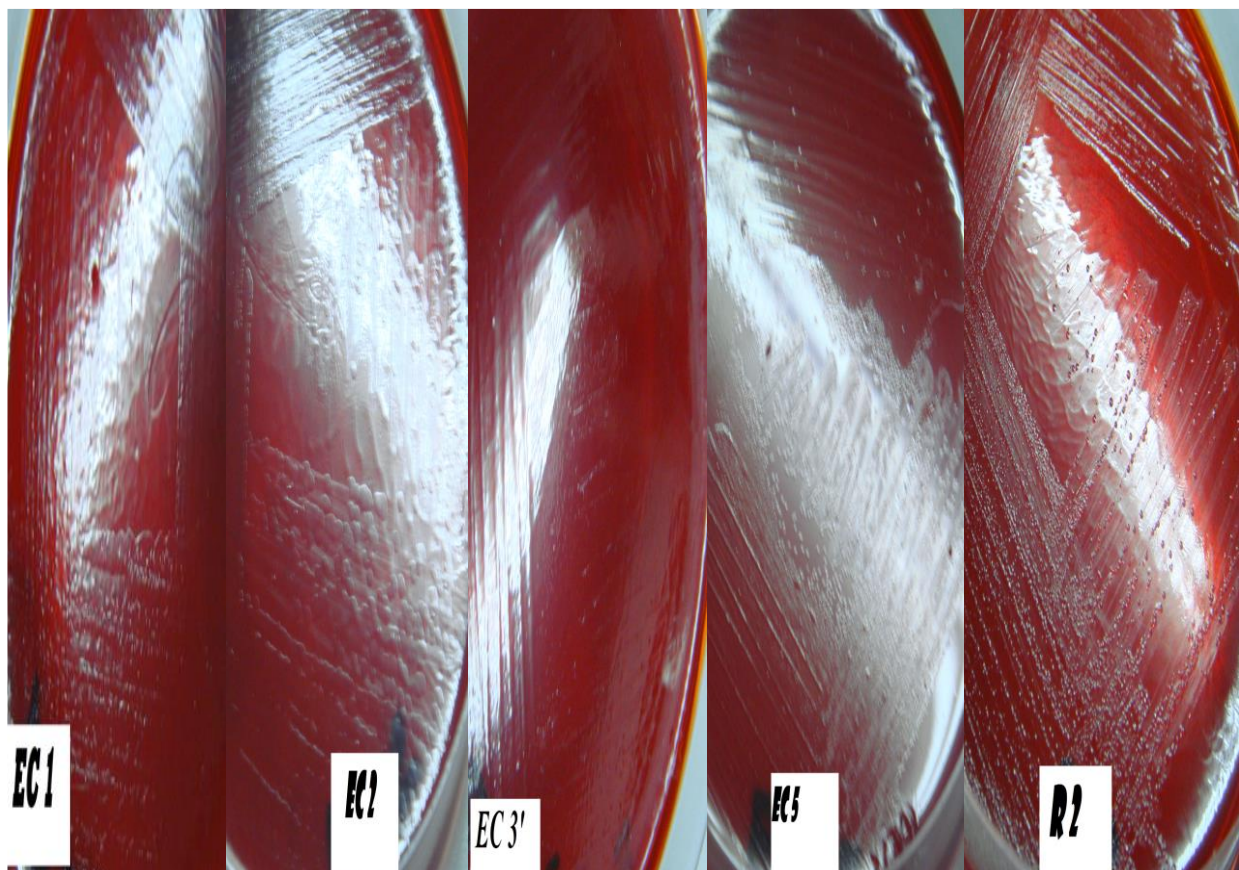
Les présents résultats on été pris du mémoire de fin d'étude de l'étudiante Mme **Boucif .M .** , et al (2013) .Isolement et caractérisations des bactéries dégradatrices de la cellulose et l'optimisation de leurs activités enzymatique, page 40-74.

### 3.1 Screening des bactéries cellulolytiques

#### 3.1.1 Isolement des bactéries productrices de la cellulase

Les prélèvements racinaires et rhizosphérique effectués ont permis d'isoler 18 souches productrices de la cellulase sur le milieu de culture gélose de Mendel.

Les souches isolées et purifiées sur milieu de culture de Mendel ont présenté les couleurs et des formes identiques. **(Tableau 3)**.



**Fig. 15** : Isolement et screening des bactéries cellulolytiques ( Boucif Meriem )

**Tableau 3** : Codification, origine et description des colonies des souches isolées ( Boucif Meriem )

Codification	Site de prélèvement	Origine	Caractérisation des colonies
EC 1	Site 1	Rhizosphérique	Colonies blanchâtre irrégulière.
EC <u>1</u>	Site 1	Rhizosphérique	Colonies blanchâtre régulière.
EC 1'	Site 1	Rhizosphérique	Colonies blanchâtre bombé.
R 1	Site 1	Racinaire	Colonies blanchâtre irrégulière.
EC 2	Site 2	Rhizosphérique	Colonies petites et crémeuse.
EC <u>2</u>	Site 2	Rhizosphérique	Colonies petites et blanchâtre.
EC 2'	Site 2	Rhizosphérique	Colonies petites et blanchâtre
R 2	Site 2	Racinaire	Colonies petites et blanche.
EC 3	Site 3	Rhizosphérique	Colonies très petites et crémeuse.
EC <u>3</u>	Site 3	Rhizosphérique	Colonies très petites et crémeuse
EC 3'	Site 3	Rhizosphérique	Colonies très petites et crémeuse
R 3	Site 3	Racinaire	Colonies petites et crémeuse
EC 4	Site 4	Rhizosphérique	Colonies moyenne et blanche.
EC <u>4</u>	Site 4	Rhizosphérique	Colonies moyenne et blanche.
EC 4'	Site 4	Rhizosphérique	Colonies moyenne et blanche.
R4	Site 4	Racinaire	Colonies petite et transparente.
EC 5	Site 5	Rhizosphérique	Colonies petites de coloration verte très claire.
R 5	Site 5	Racinaire	Colonies petites de coloration verte très claire.

### 3.1.2) Teste d'hydrolyse de la cellulose

Dans le but de sélectionner des souches productrices de la cellulase performantes chez les 18 isolats, le test de la dégradation de la cellulose est mis en évidence. Une lecture positive de la dégradation de la cellulose est manifestée par la formation d'une zone d'hydrolyse autour des colonies sur le milieu de culture Mendel gélosé, additionné de Rouge Congo (**Tableau 4**). Les résultats obtenus ont montré que la production de la cellulase chez les souches testées a initié dès le premier jour. Cependant, la capacité maximale de l'hydrolyse de la cellulose a été révélée chez la souche EC3' qui marque un diamètre de 55mm (**figure19**).

**Tableau 4.** Mesure du diamètre des zones d'hydrolyse de la cellulose ( Boucif Meriem )

Diamètres des zones d'hydrolyses (mm)					
N°	Echantillon	Après 24h	Après 48h	Après 72h	Performances
1	EC 01	18	24	29	++
2	EC 01	10	14	16	++
3	EC 01'	10	12	14	+
4	EC 02	14	19	23	++
5	EC 02	14	20	29	++
6	EC 02'	14	17	17	++
7	EC 03	15	30	47	+++
8	EC 03	29	48	55	++++
9	EC 04	13	15	18	++
10	EC 04	12	14	15	+
11	EC 05	18	34	47	+++
12	R 01	13	14	19	++
13	R 02	11	19	40	+++
14	R 03	12	14	19	++
15	R 04	11	15	16	++

16	R <u>04</u>	13	13	14	++
17	R <u>05</u>	13	17	17	++
18	R <u>05</u>	13	15	15	++

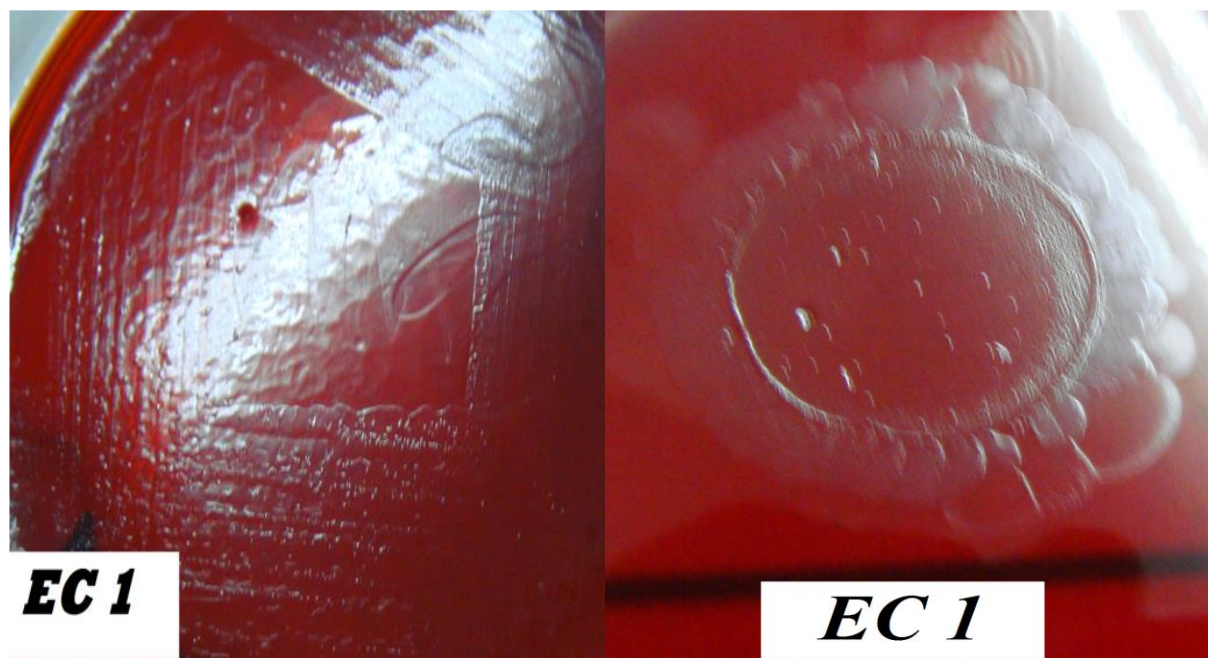


Figure 16 : Aspects des colonies de la souche EC1 sur le milieu de culture Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse ( Boucif Meriem ).

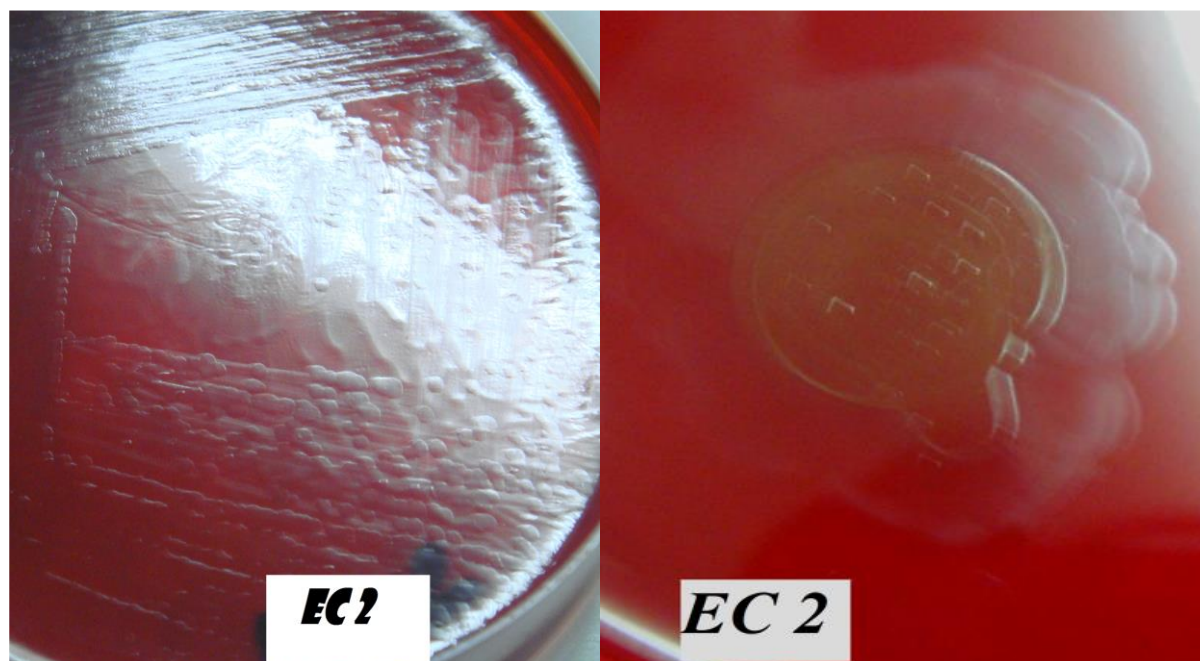
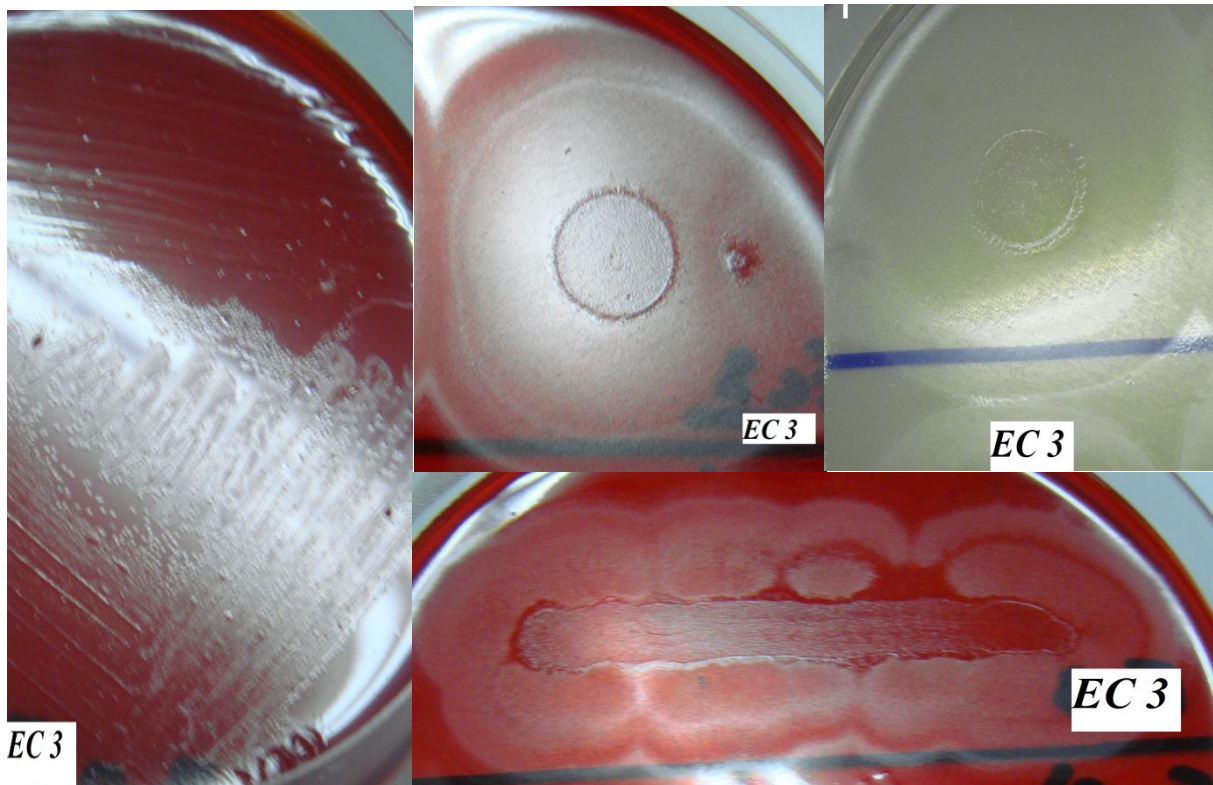
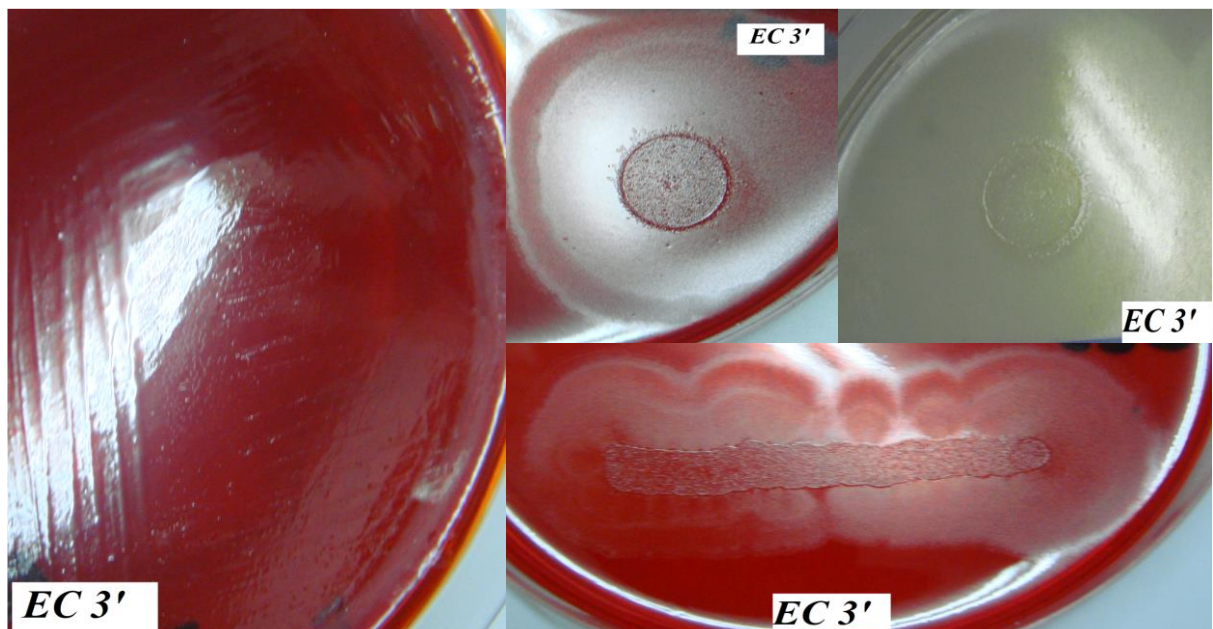


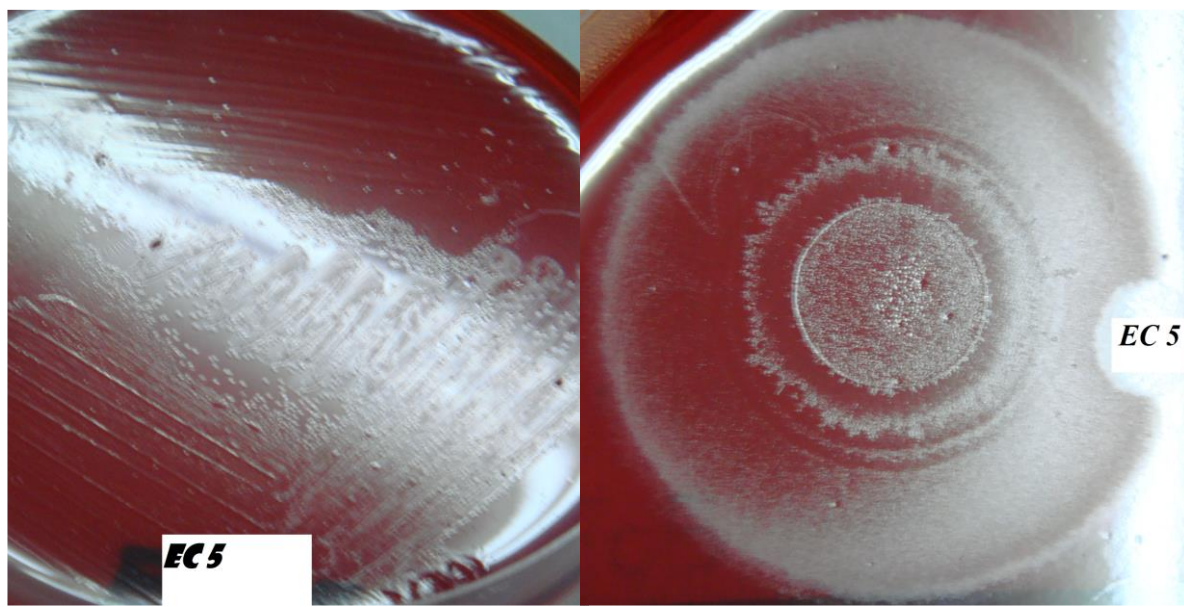
Figure 17 : Aspects des colonies de la souche EC2 sur le milieu de culture Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse ( Boucif Meriem ).



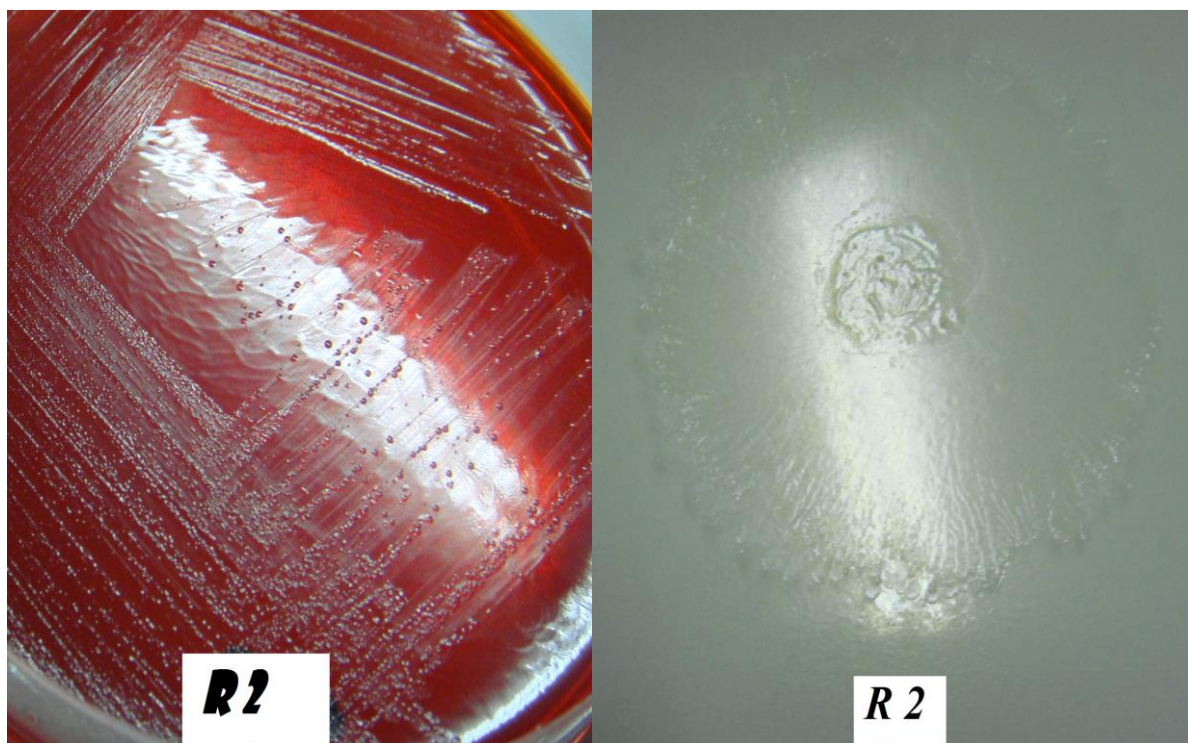
**Figure 18:** Aspects des colonies de la souche EC 3 sur le milieu de culture Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse (Boucif Meriem ).



**Figure 19:** Aspects des colonies de la souche EC 3' sur le milieu de culture Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse (Boucif Meriem ).



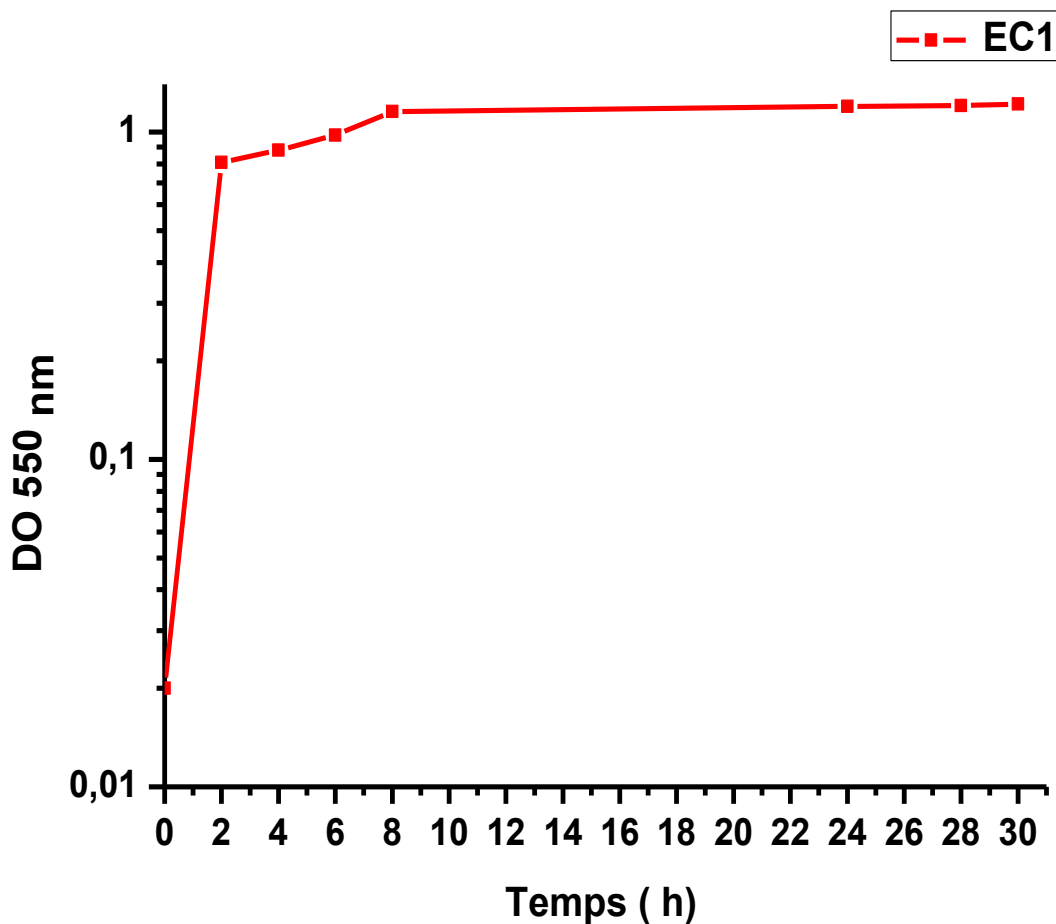
**Figure 20:** Aspects des colonies de la souche EC 5 sur le milieu de culture de Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse ( Boucif Meriem ).



**Figure 21:** Aspects des colonies de la souche R2 sur le milieu de culture de Mendel et l'apparition de la zone d'hydrolyse (Boucif Meriem ).

### 3.2) Suivi de la cinétique de croissance des isolats sélectionnés productrices de la cellulase

Ce teste a servi pour l'observation du potentiel de la croissances bactérienne des souches les plus performantes à partir des différentes origines rhiesphériques et racinaires choisie pour les essais d'isolements ,les souches EC1, EC2, EC3, EC3', EC5, R2, ont montré une forte hydrolyse de la cellulose ( respectivement 29,29,47,55,47,40 mm) montrés dans les figures suivantes.



**Figure 22 :** Étude du suivie de la cinétique de croissance de l'isolat EC1, dans le milieu de culture Mendel (Boucif Meriem )

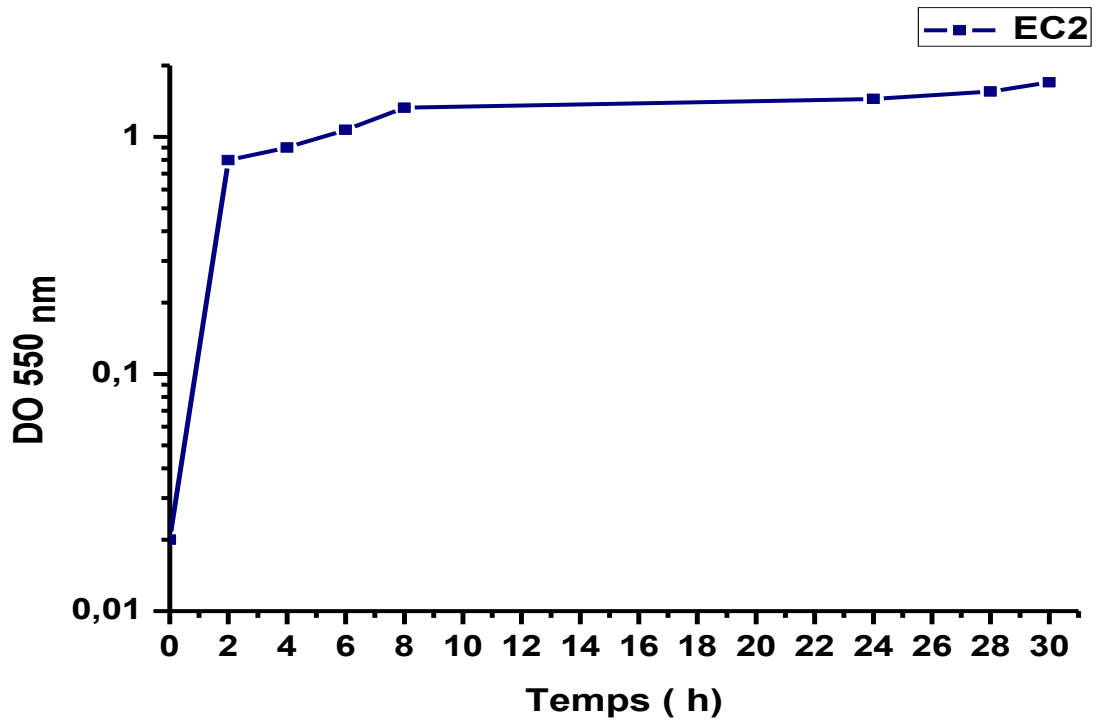


Figure 23 : Étude du suivi de la cinétique de croissance de l'isolat EC2, dans le milieu de culture Mendel (Boucif Meriem )

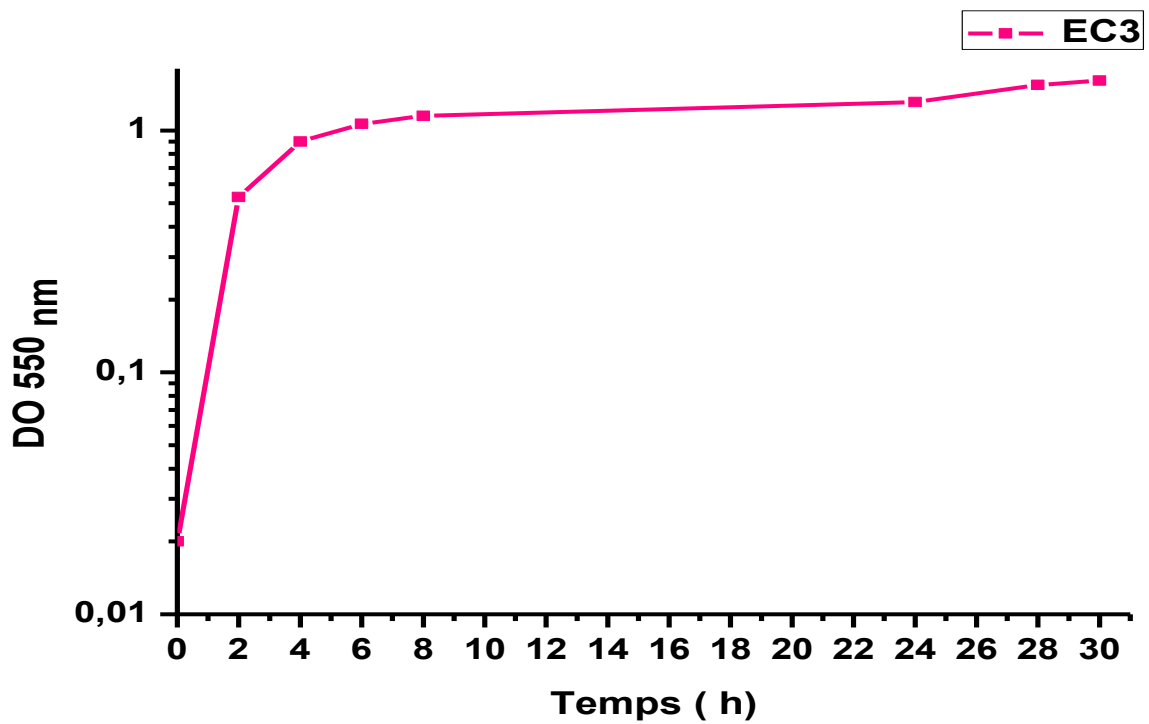


Figure 24 : Étude du suivi de la cinétique de croissance de l'isolat EC3, dans le milieu de culture Mendel (Boucif Meriem )

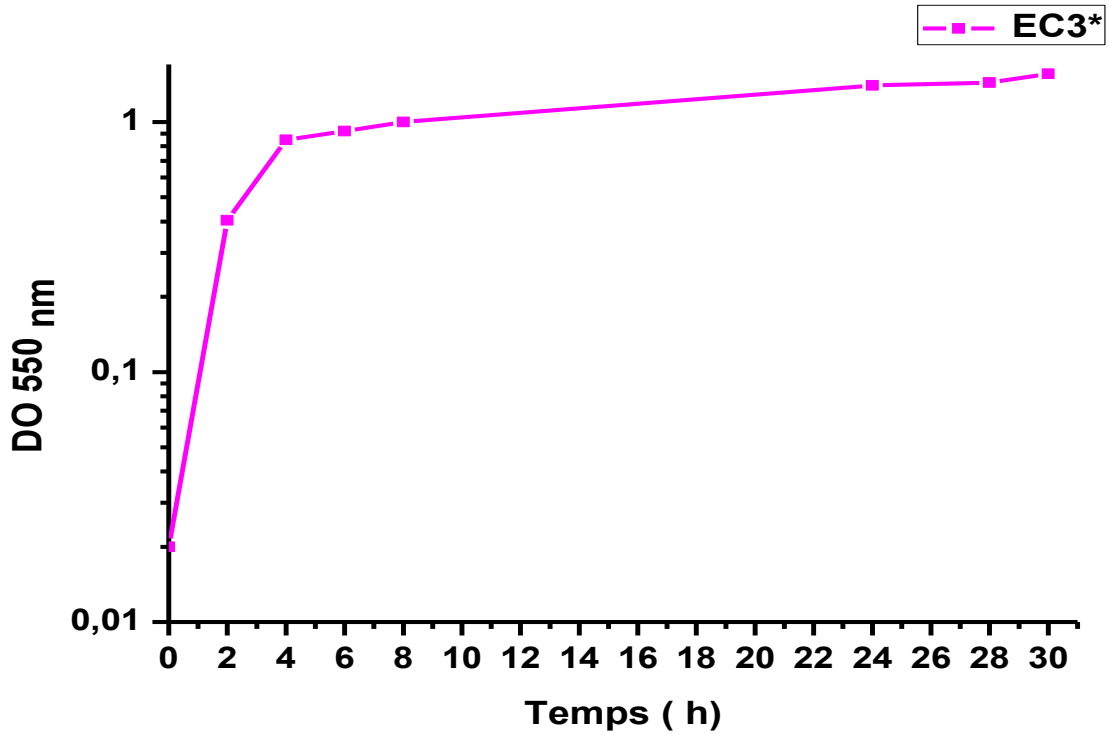


Figure 25 : Étude du suivie de la cinétique de croissance de l'isolat EC3', dans le milieu de culture Mendel (Boucif Meriem )

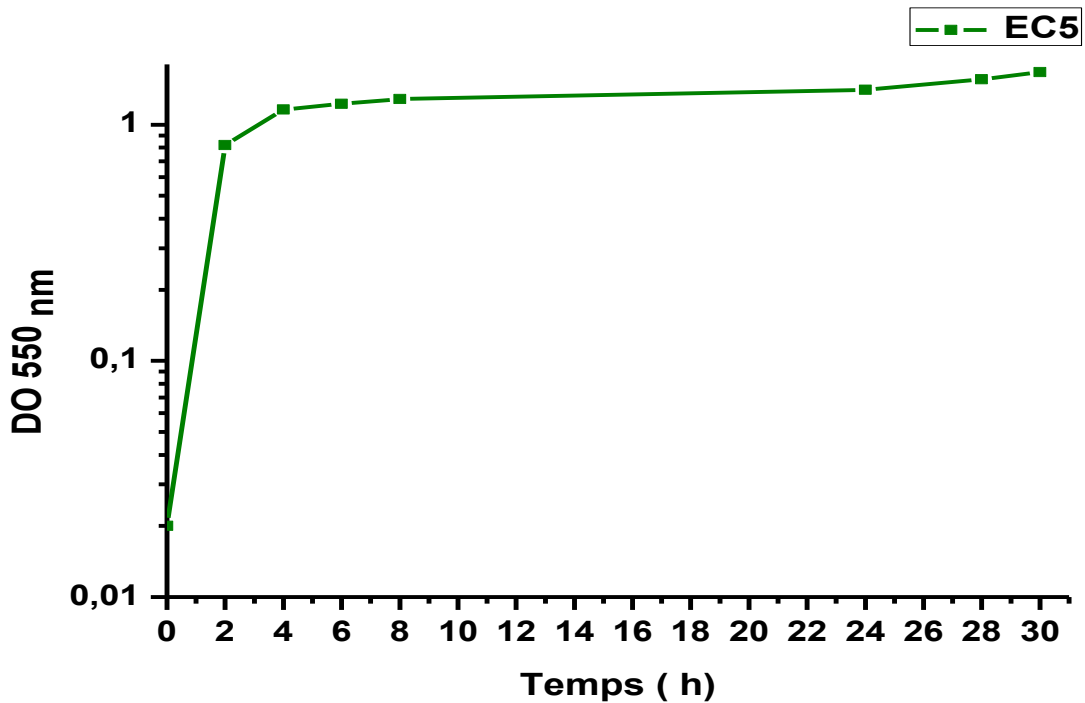
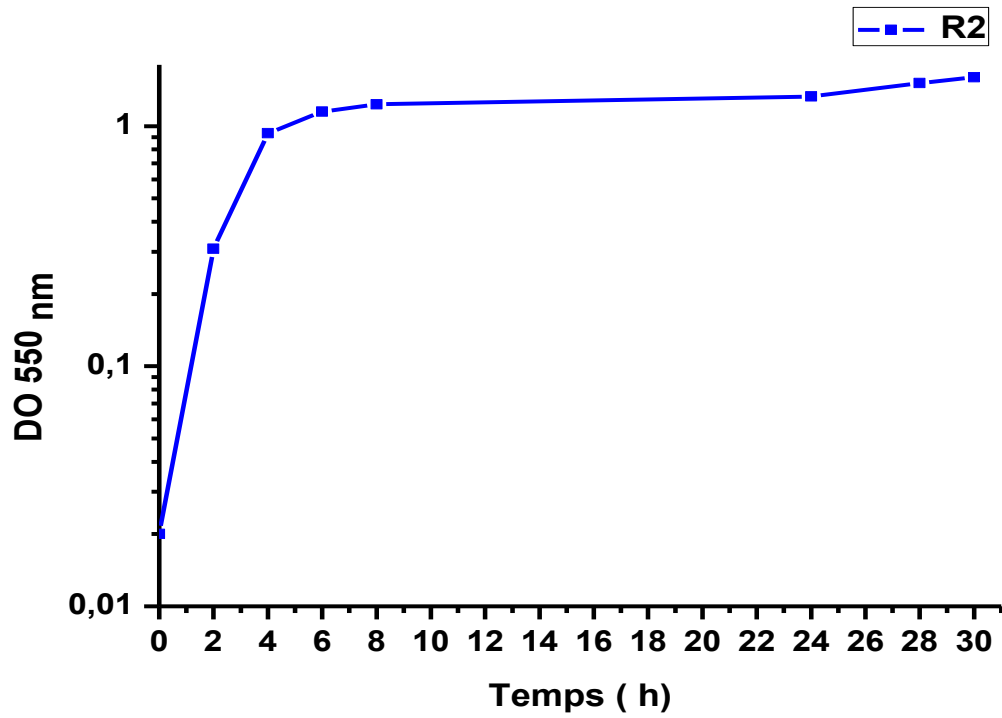


Figure 26 : Étude du suivie de la cinétique de croissance de l'isolat EC5, dans le milieu de culture Mendel (Boucif Meriem )



**Figure27 :** Étude du suivie de la cinétique de croissance de l'isolat R2, dans le milieu de culture Mendel (Boucif Meriem )

### 3.3) Estimation de l'activité enzymatique

#### 3.3.1) La courbe standard de Glucose

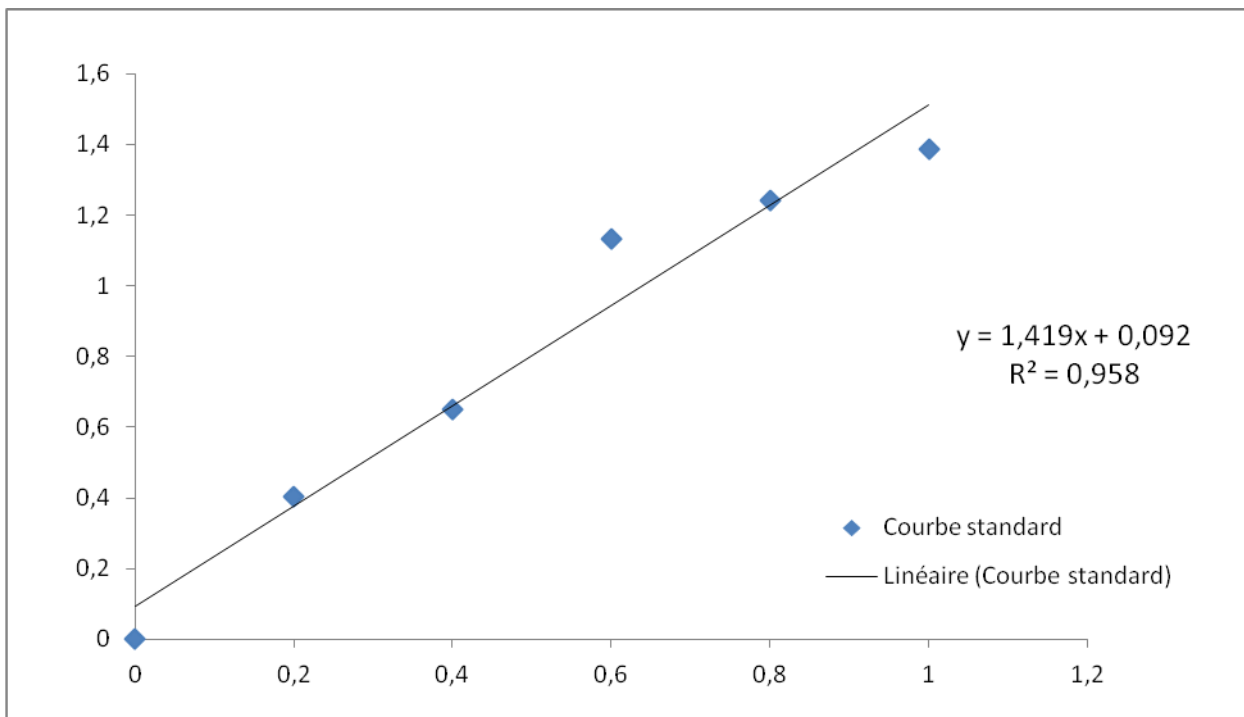
La courbe standard de glucose a été préparée par des étalons dilués et traités avec le réactif de DNS, la lecture de leurs absorptions a été effectuée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm, les valeurs obtenues ont été utilisées pour tracer une courbe de tendance (**Figure 34**), dont la formule de la droite obtenue est :

$$y = 1,419x + 0,092$$

$$R^2 = 0,958$$

(y : DO 540 nm, x : concentration en glucose).

(R<sup>2</sup> : Coefficient de détermination).



**Figure 28 :** Courbe standard de Glucose par méthode DNS (Boucif Meriem)

### 3.3.2) Estimation de l'activité enzymatique des 6 souches les plus performantes

L'estimation de l'activité enzymatique des 6 souches les plus performantes a été préparée par des solutions de cellulose ajuster dans du tampon phosphate et traité avec le réactif de DNS (**Annexe 2**), la lecture de leurs absorptions a été effectuée par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm, les valeurs obtenues ont été utilisées pour tracer des courbes de tendance pour chaque souche étudié dans les figures suivantes :

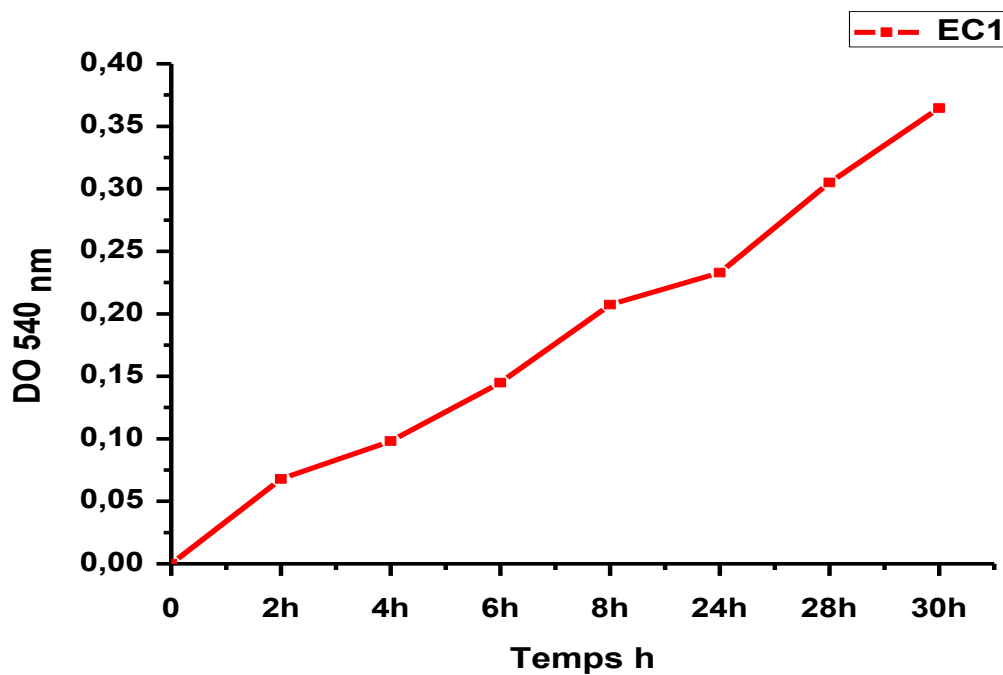


Figure 29 :L'activité enzymatique de la cellulase chez EC1 (Boucif Meriem)

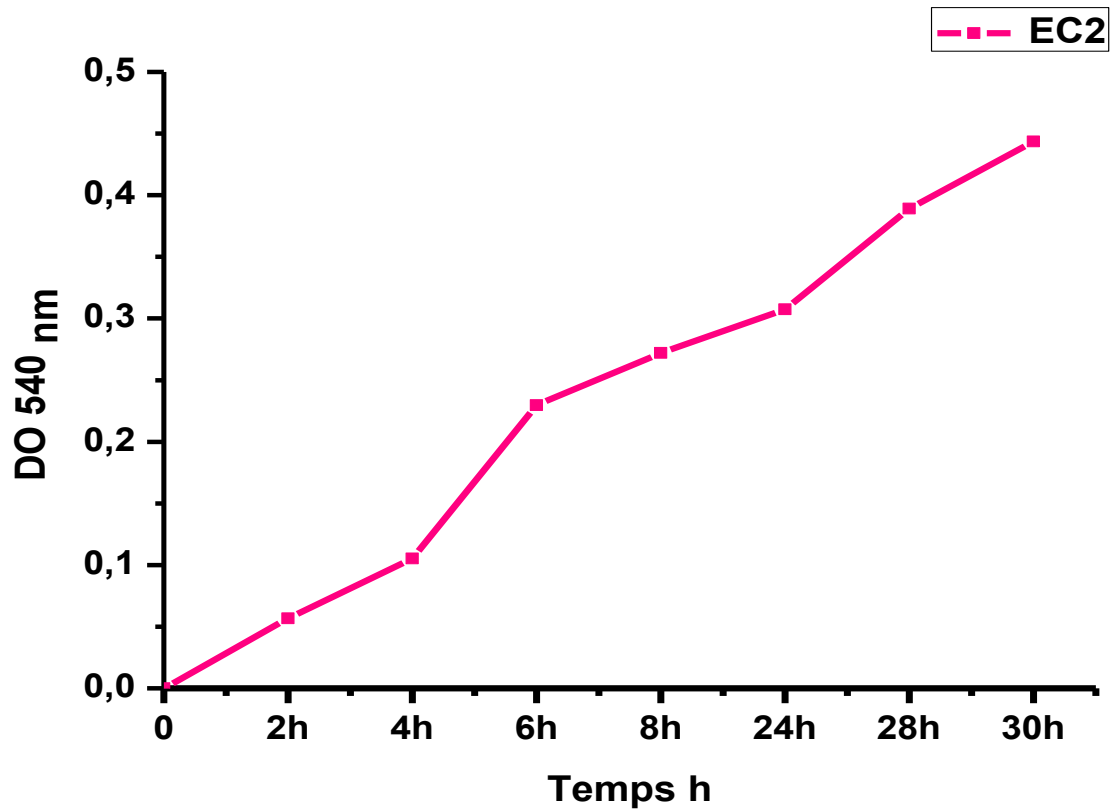


Figure 30 : L'activité enzymatique de la cellulase chez EC2 ( Boucif Meriem)

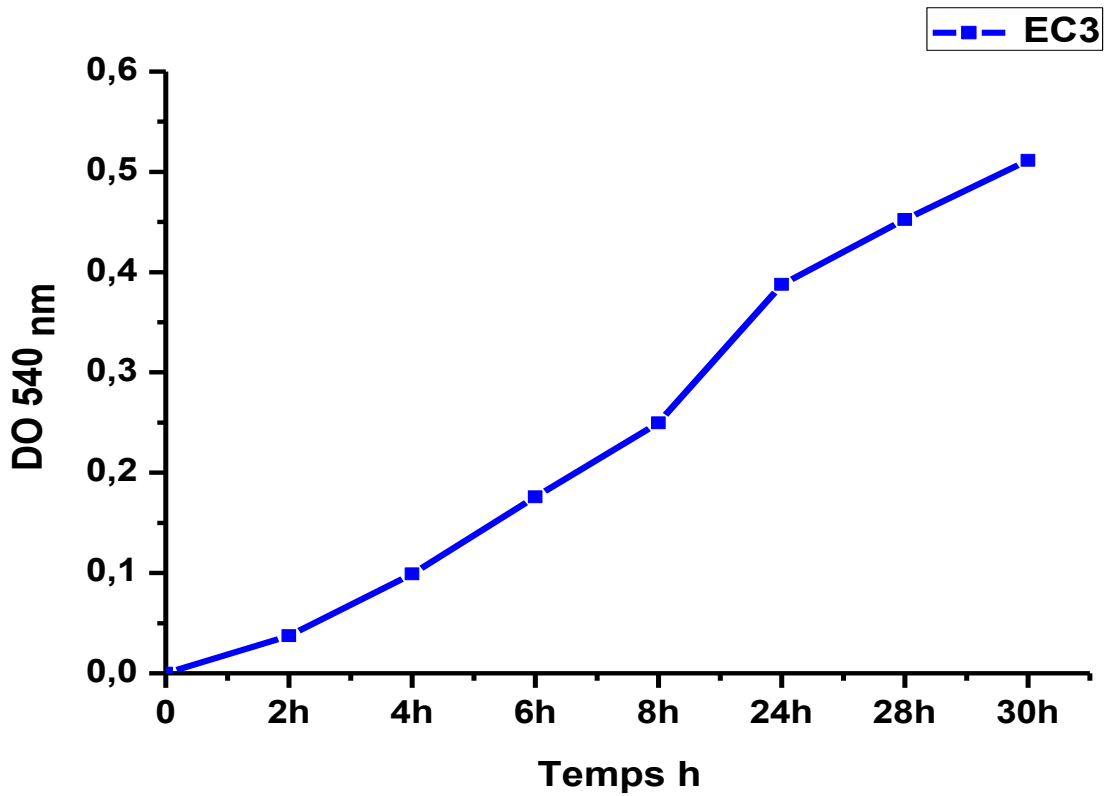


Figure 31 : L'activité enzymatique de la cellulase chez EC3 (Boucif Meriem)

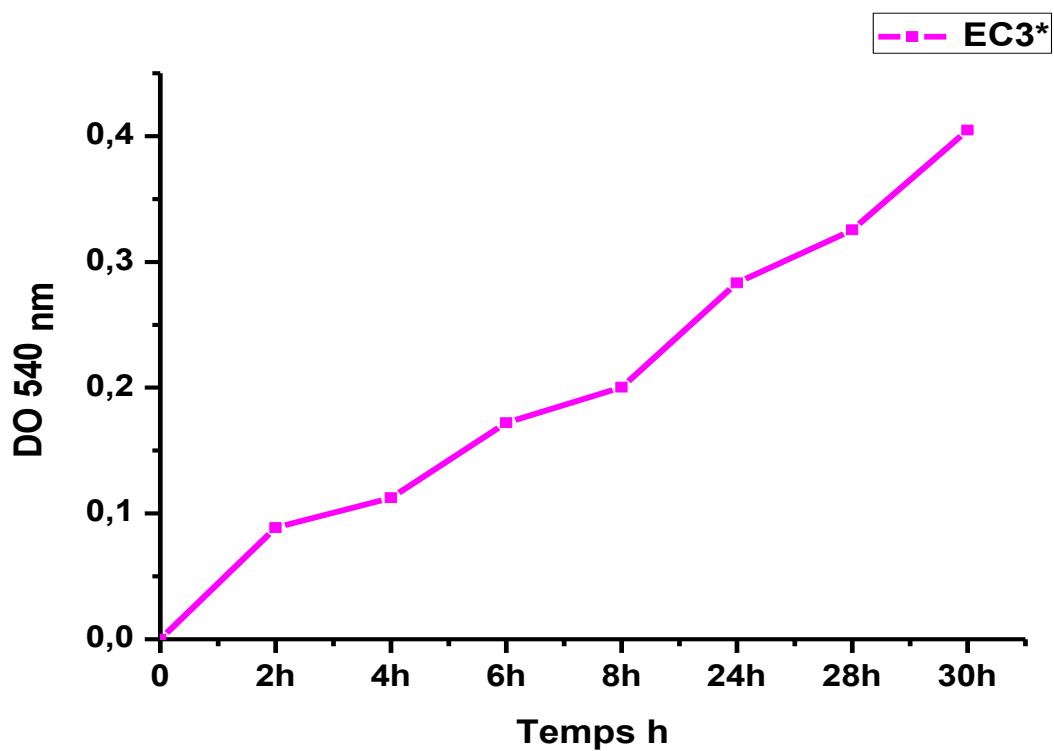


Figure 32 : L'activité enzymatique de la cellulase chez EC3\* (Boucif Meriem )

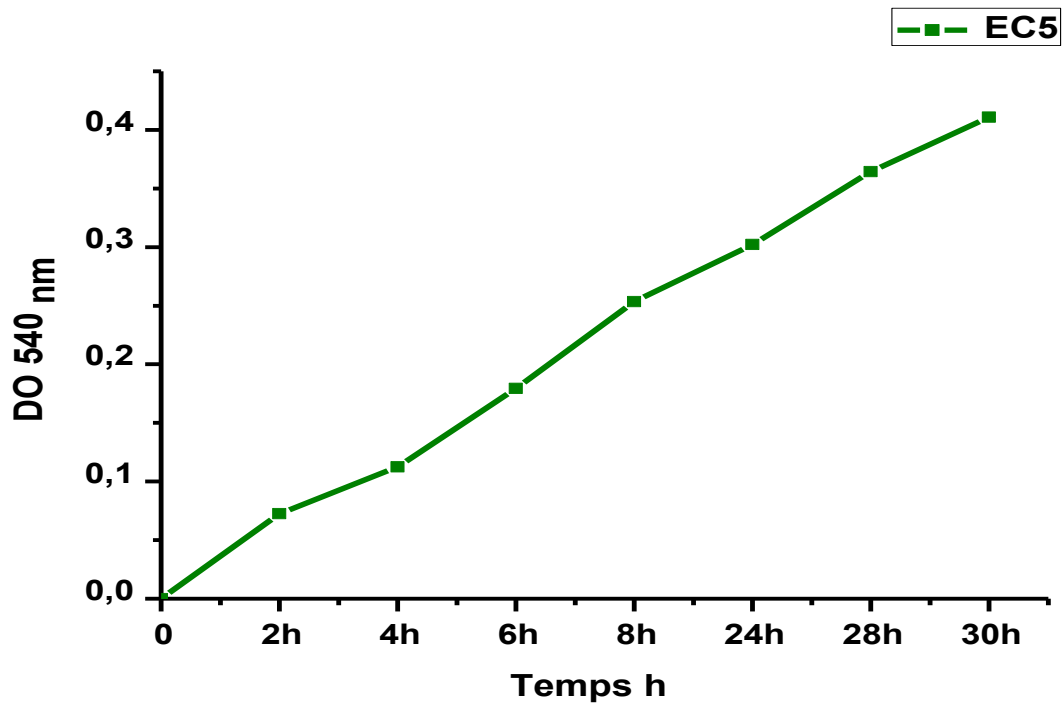


Figure 33 : L'activité enzymatique de la cellulase chez EC5 (Boucif Meriem )

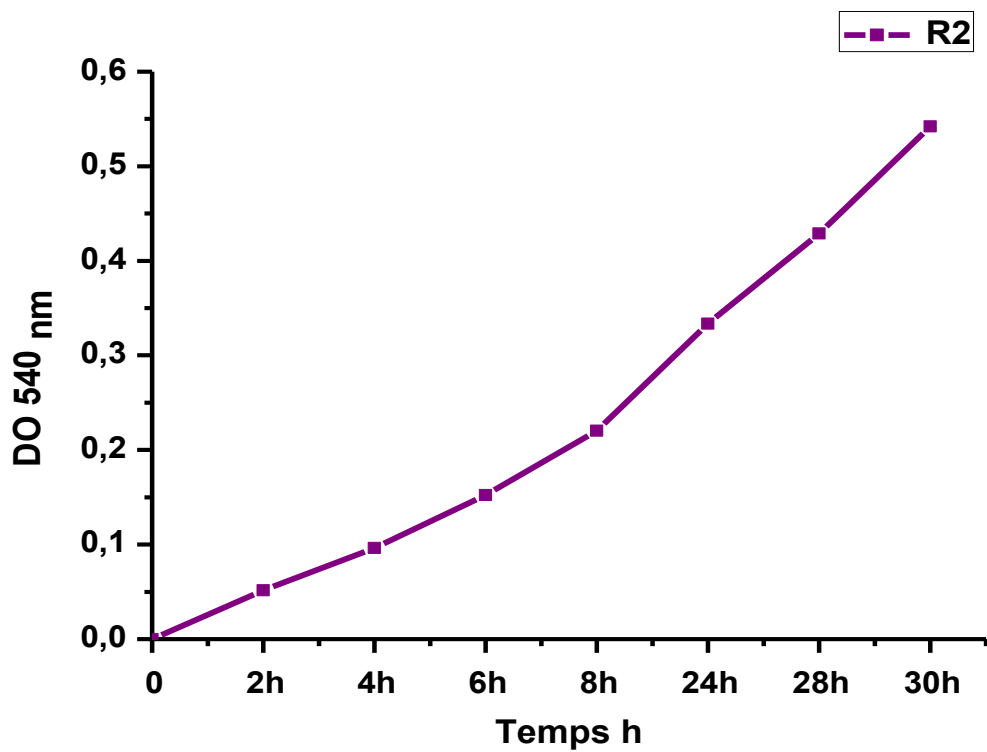


Figure 34 : L'activité enzymatique de la cellulase chez R2 ( Boucif Meriem)

### 3.3.3) Optimisation du pH

Le pH optimale pour l'activité enzymatique de la cellulase a été déterminé par l'incubation de la source d'enzyme dans un substrat de cellulose 2% additionné dans du tampon phosphate 0.05M a différent pH (5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8) et incubé a 50° pendant 30 min, l'estimation de la cellulase a été déterminé en utilisant la méthode de DNS. Les résultats trouvés sont révélée dans les courbes suivantes :

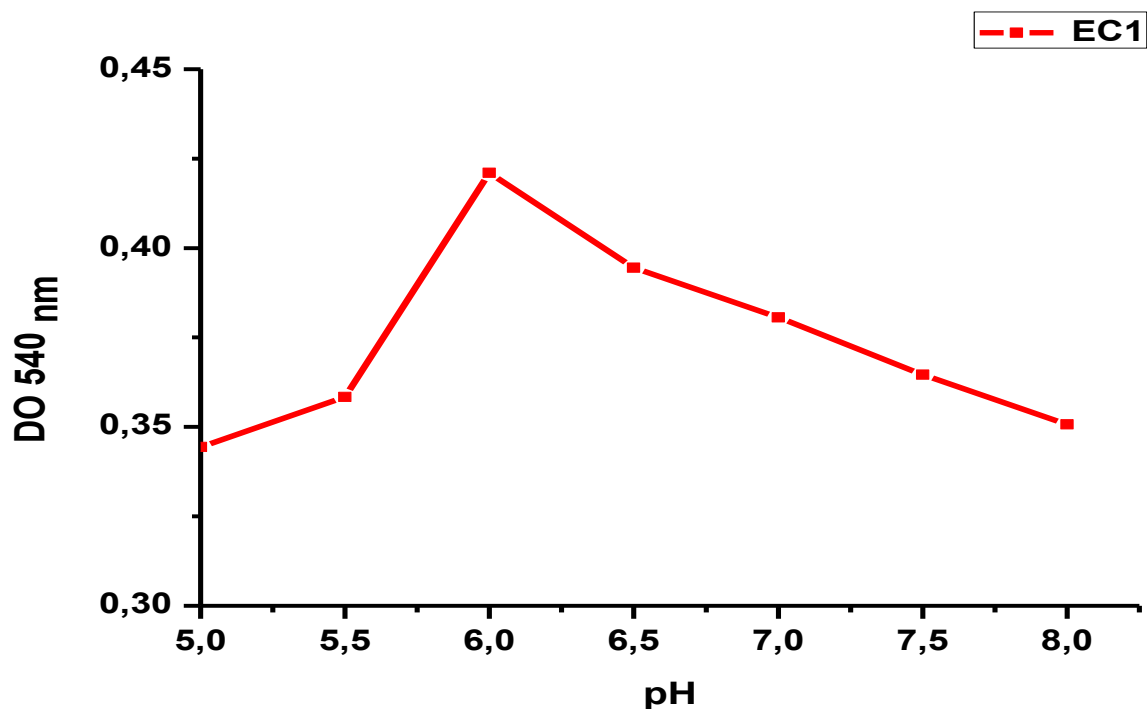


Figure 35 : Optimisation du pH chez l'isolat EC1 (Boucif Meriem)

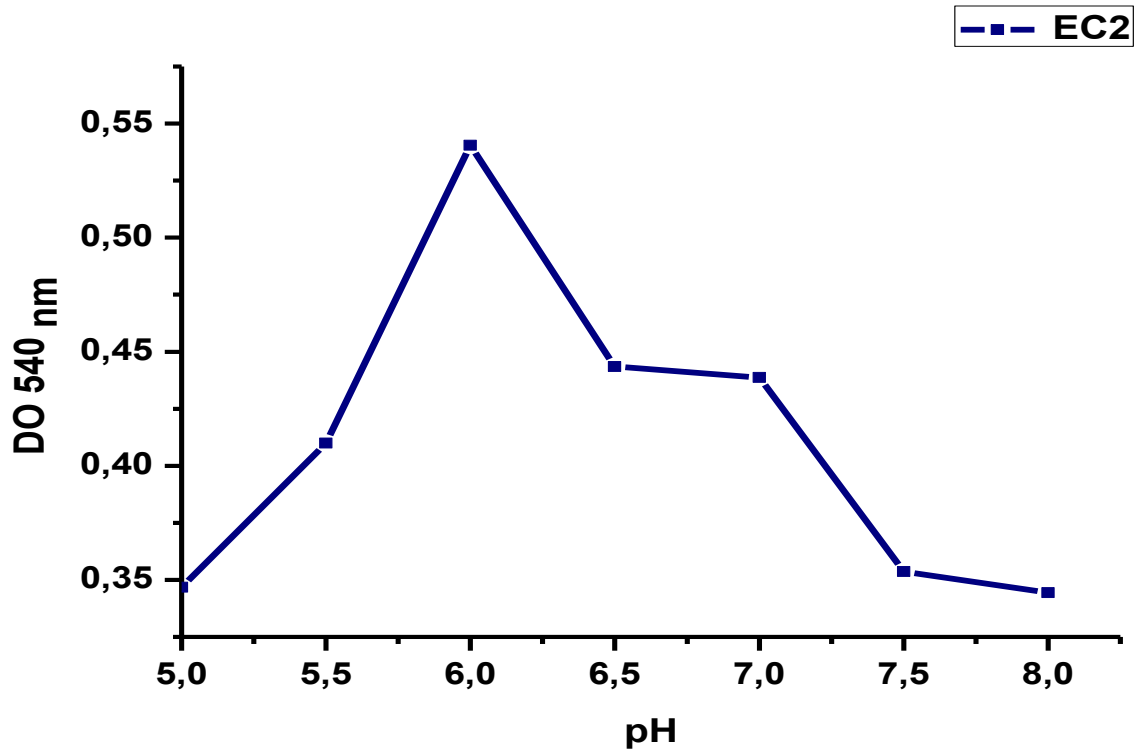


Figure 36 : Optimisation du pH chez l'isolat EC2 (Boucif Meriem)

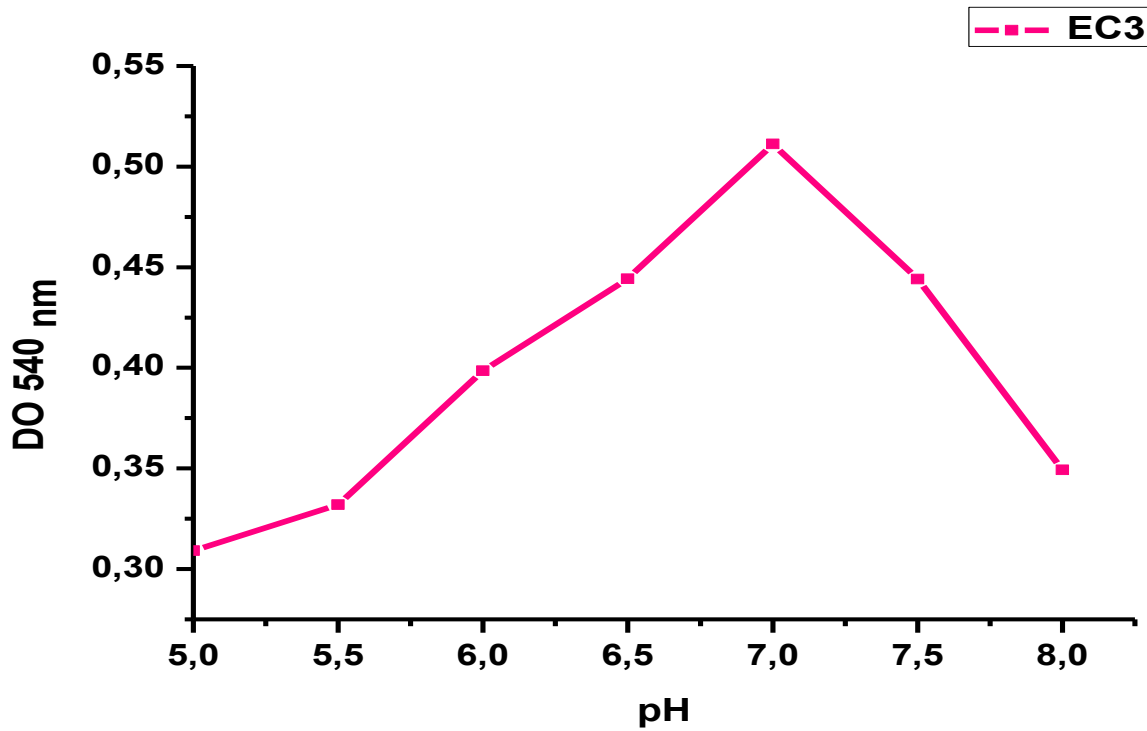


Figure 37 : Optimisation du pH chez l'isolat EC3 (Boucif Meriem)

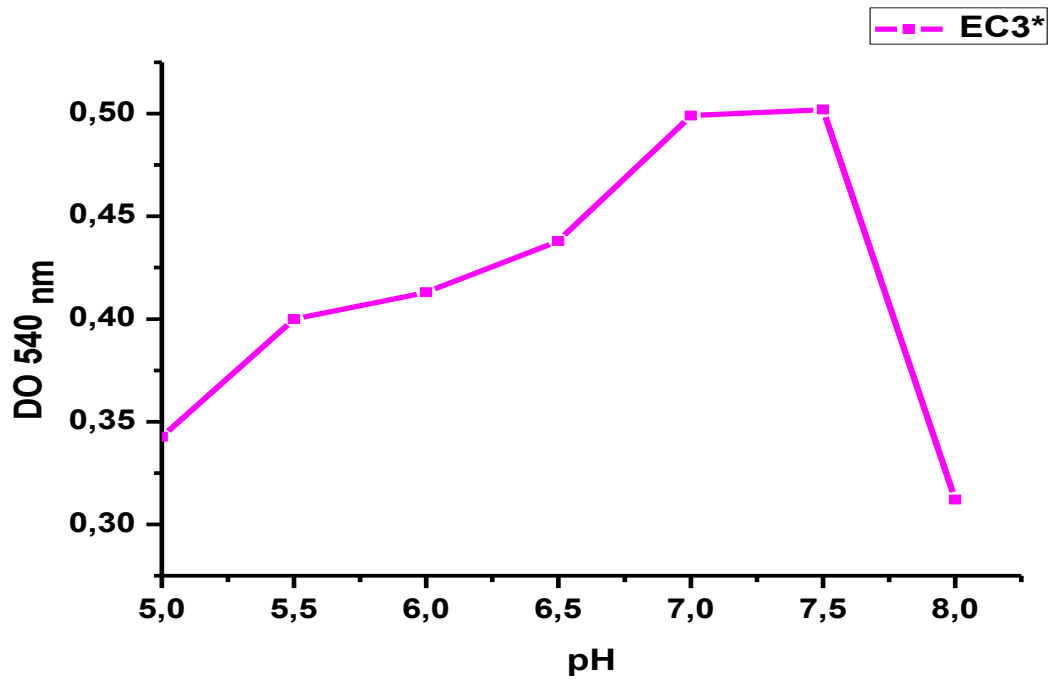


Figure 38 : Optimisation du pH chez l'isolat EC3\* (Boucif Meriem )

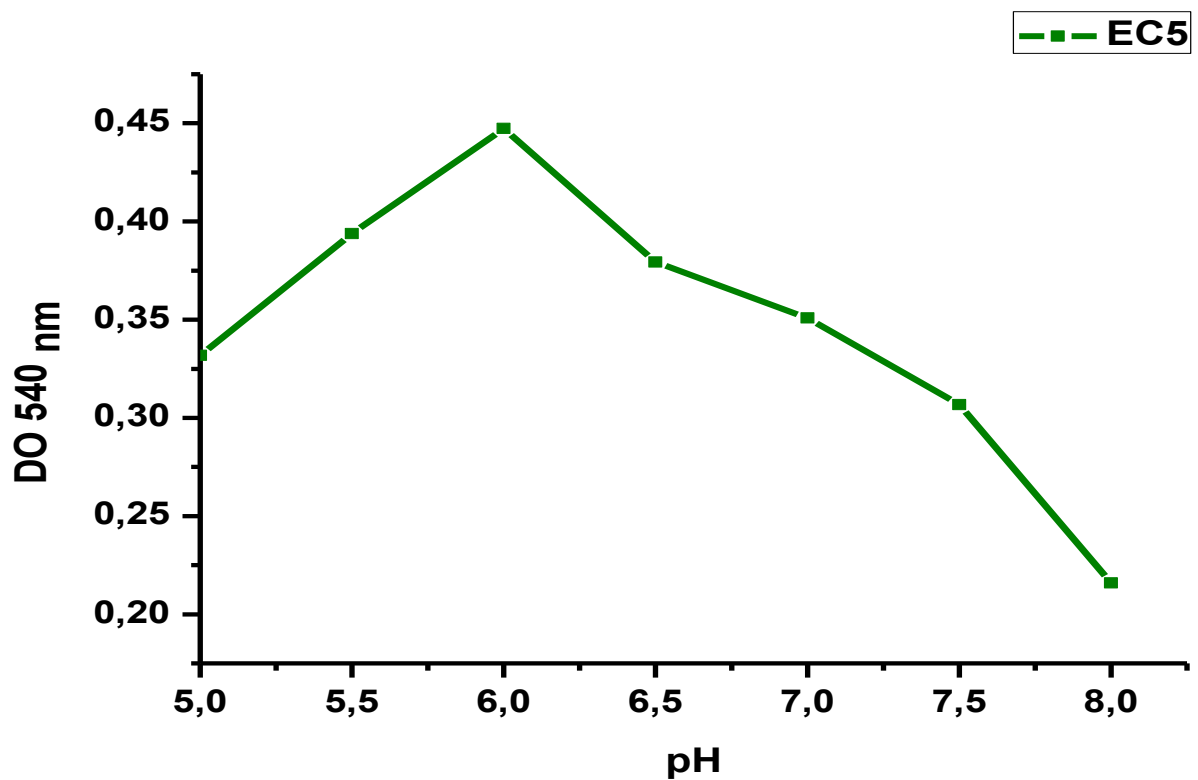


Figure 39 : Optimisation du pH chez l'isolat EC5 (Boucif Meriem )

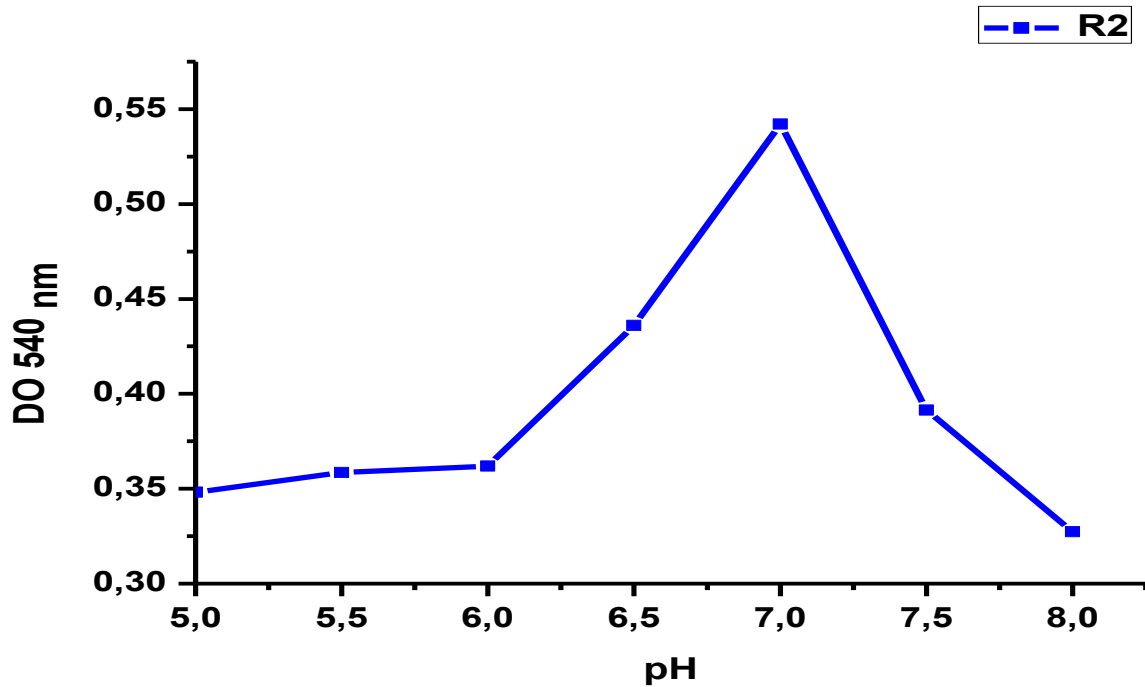


Figure 40 : Optimisation du pH chez l'isolat R2 (Boucif Meriem)

### 3.3.4) optimisation de la Température\_

Dans le but d'explorer la température optimale de l'activité enzymatique de la cellulase, le surnageant contenant l'enzyme est incubé en présence du substrat de cellulose à une concentration de 2%, additionné dans une solution tampon de 0.05M phosphate à différentes température (30°C, 40°C, 50°C, 60°C) pendant un intervalle de temps de 30 min. L'activité de la cellulase est dosée par la méthode de DNS. Les résultats obtenus ont montré que l'activité enzymatique est maximale à une température de 50°C. Cependant, une faible activité enzymatique est observée lors de l'incubation aux différentes températures (30°, 40°, 60°C).

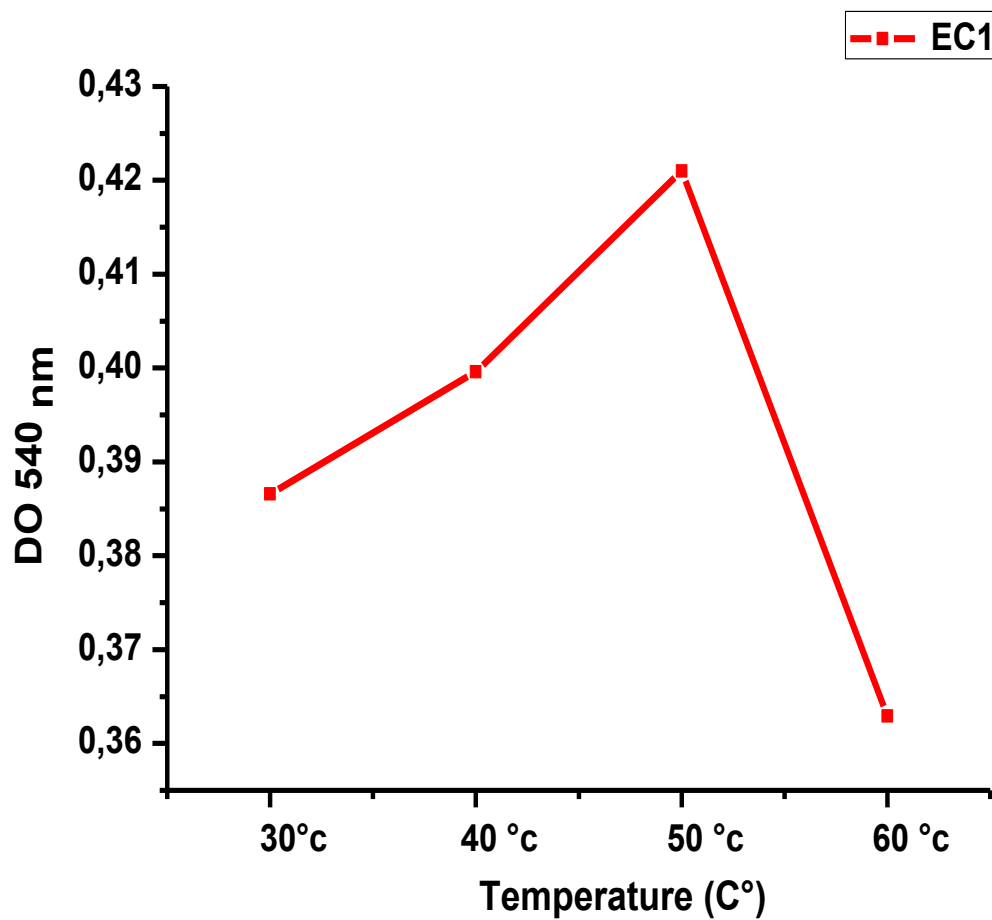


Figure 41 : Optimisation de la T° chez l'isolat EC1 (Boucif Meriem )

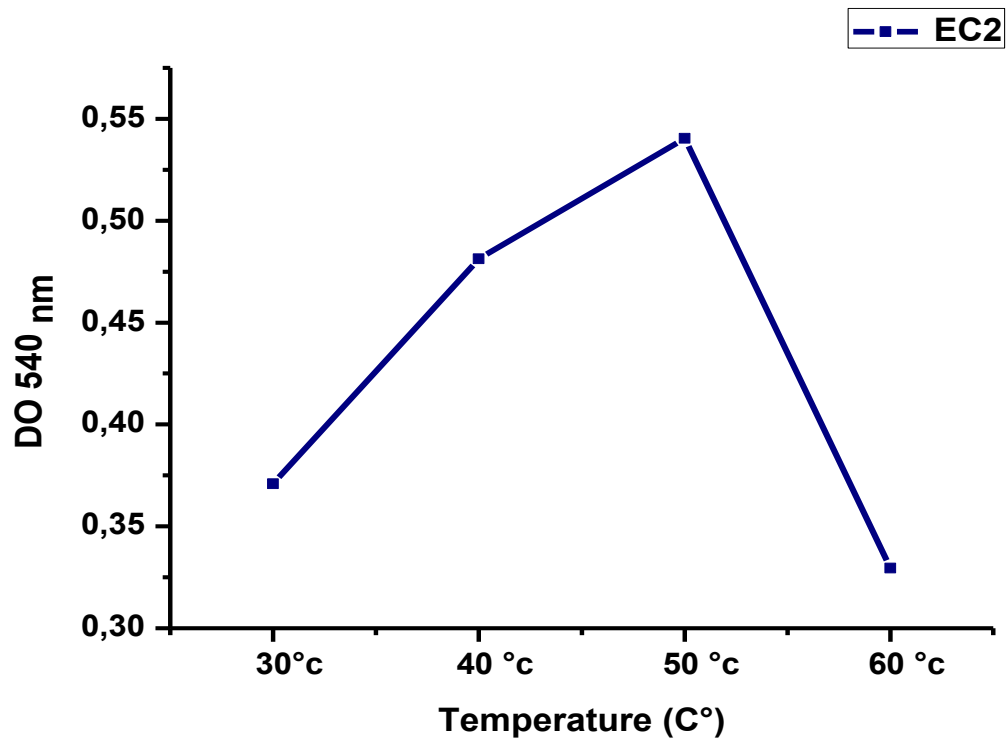


Figure 42 : Optimisation de la T° chez l'isolat EC2 (Boucif Meriem )

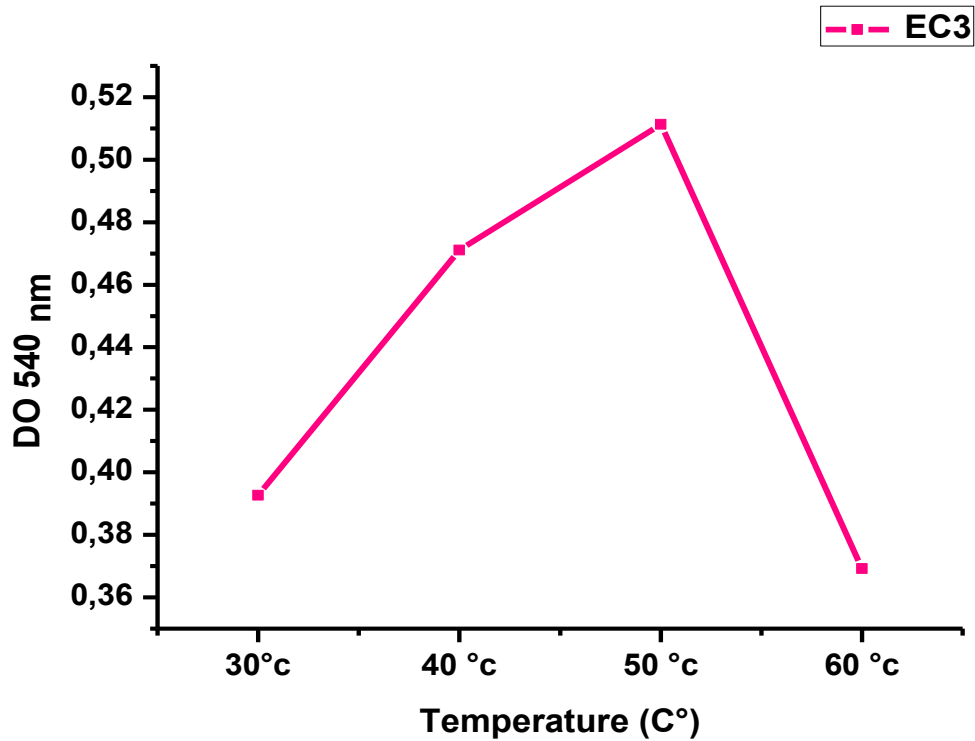


Figure 43 : Optimisation de la T° chez l'isolat EC3 (Boucif Meriem)

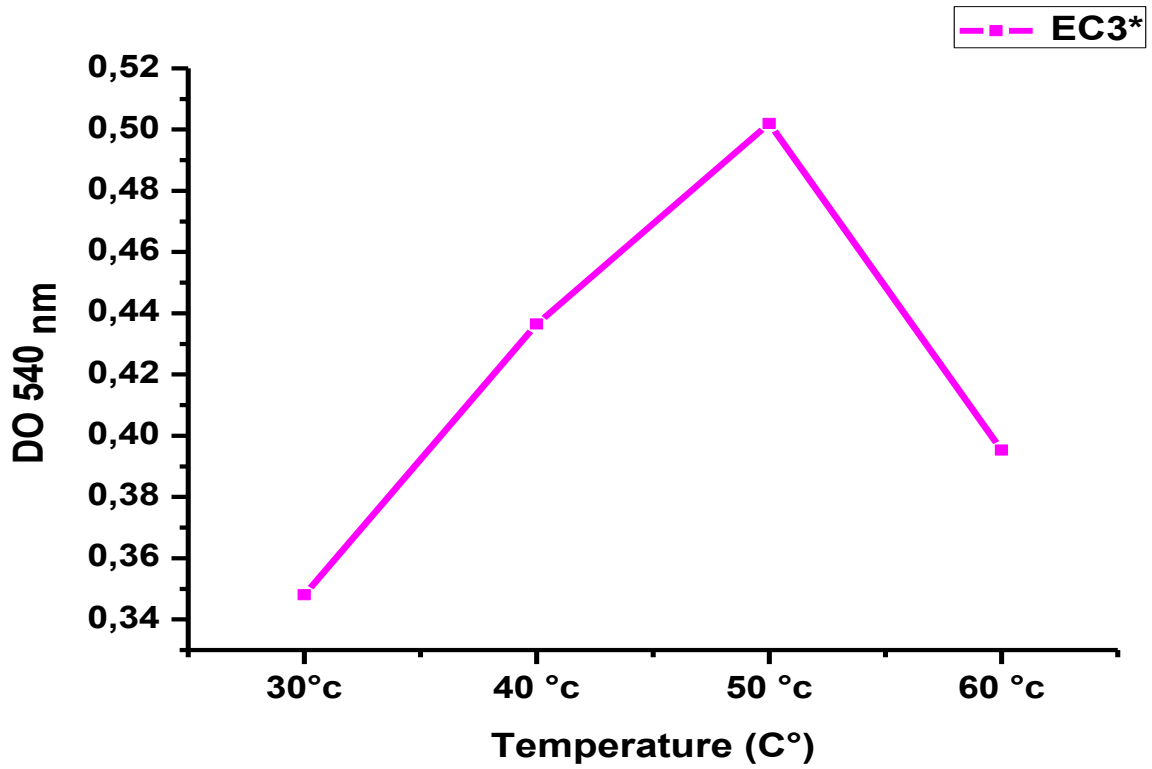


Figure 44 : Optimisation de la T° chez l'isolat EC3\* (Boucif Meriem )

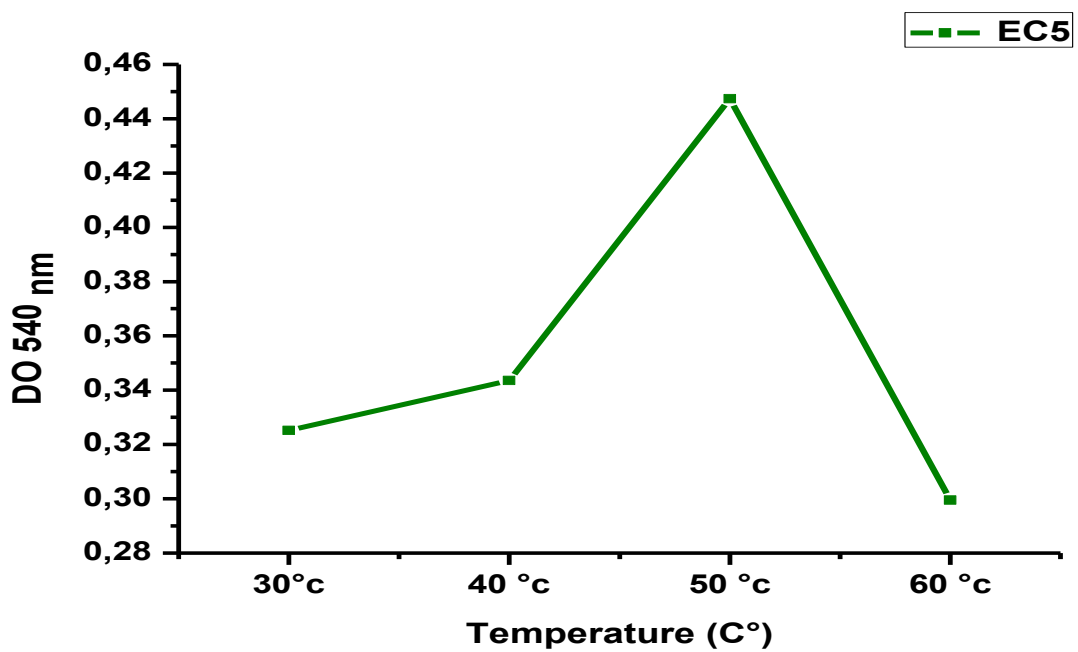


Figure 45 : Optimisation de la T° chez l'isolat EC5 (Boucif Meriem )

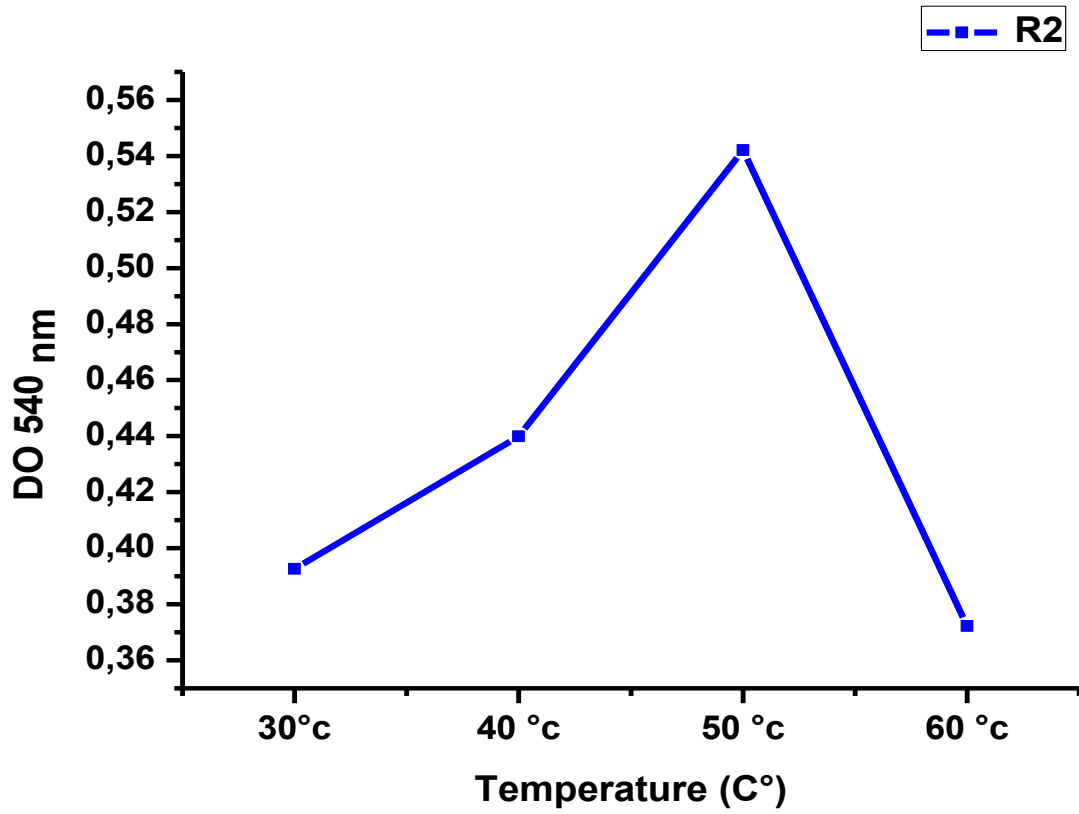


Figure 46 : Optimisation de la T° chez l'isolat R2 (Boucif Meriem )

### 3.4) Identification phénotypique des candidats les plus performants

#### 3.4.1) Aspects macroscopique et microscopique des colonies

L'observation de l'aspect des 6 colonies sélectionnées productrices de la cellulase (EC1, EC2, EC3, EC3', EC5, R2), inoculées sur le milieu Mendel, incubées à une température de 30°C, pendant 24 heures est illustrée dans le **(tableau 5)**.

	Les souches bactériennes					
Caractères	EC 1	EC 2	EC 3	EC 3'	EC 5	R 2
Couleur des colonies	Blanchâtre	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse	Vert très claire	Blanche
Aspect des colonies	Colonies de taille moyenne, irrégulières translucides et brillantes.	Colonies très petites, rondes, translucide.	Colonies taille moyenne, rondes, translucide	Colonies, taille moyenne rondes, translucide	Colonies, taille moyenne rondes.	Colonies, taille moyenne, opaque, régulières.

**Tableau 5 :** Aspect macroscopique des souches les plus performantes sur le milieu Mendel (Boucif Meriem )

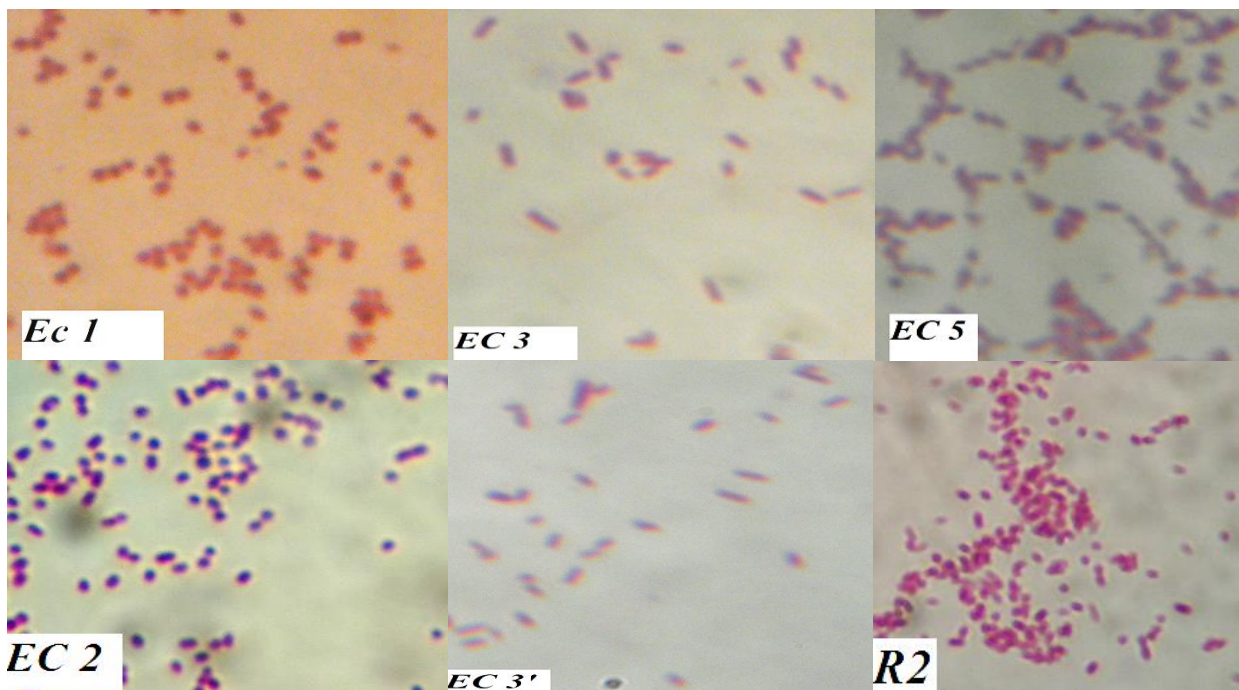
### 3.4.2) Observation microscopique à l'état frais

L'observation microscopique des bactéries à l'état frais a montré que les 3 isolats sont très mobiles.

### 3.4.3) Observation microscopique à l'état fixé

L'observation des frottis fixés et colorés par coloration de Gram sous microscope optique ( $G \times 100$ ) a permis de distinguer la forme et le mode d'assemblage des 6 isolats sélectionnés producteurs de la cellulase.

Les souches EC1 sont des Cocci à Gram négatif de taille moyenne, mono et diplocoque, aussi groupées en amas ; EC 2 sont des Cocci à Gram positif, de taille moyenne, mono et diplocoque, groupées en amas ; EC3 et EC3' sont des bacilles de taille moyenne à Gram négatif, isolées en paire et en chênette ; EC5 sont des petites bacilles à Gram négatif, groupés en amas ; R2 sont des bacilles Gram à positif (**Figure 47**).

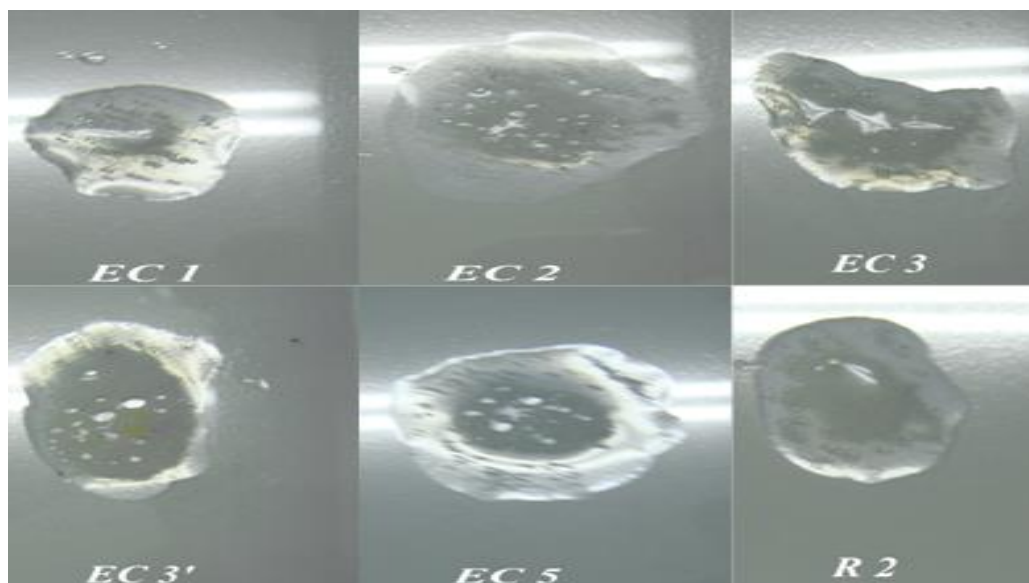


**Figure 47 :** Aspects microscopique des 6 isolats sélectionnés productrices de la cellulase. Après coloration de Gram ( $G \times 1000$ ). (Boucif Meriem )

### 3.4.4) Détermination du type respiratoire, testes de catalase et d'oxydase

Le type respiratoire des bactéries est déterminé sur milieu de culture Viande-foie. Le développement des 4 isolats EC2, EC3, EC3', R2 sur toute la longueur des tube à essai contenant la gélose de Viande-foie caractérise le type respiratoire par des bactéries aéro-anaérobies facultatif avec production de Gaz. Cependant, le développement des deux isolats EC 1, EC5 sur la partie supérieure du gélosé viande-foie contenue dans le tube à essai est spécifique pour les bactéries aérobies strictes. Par ailleurs, les 6 isolats ont manifesté une réaction au catalase positive (Figure 48).

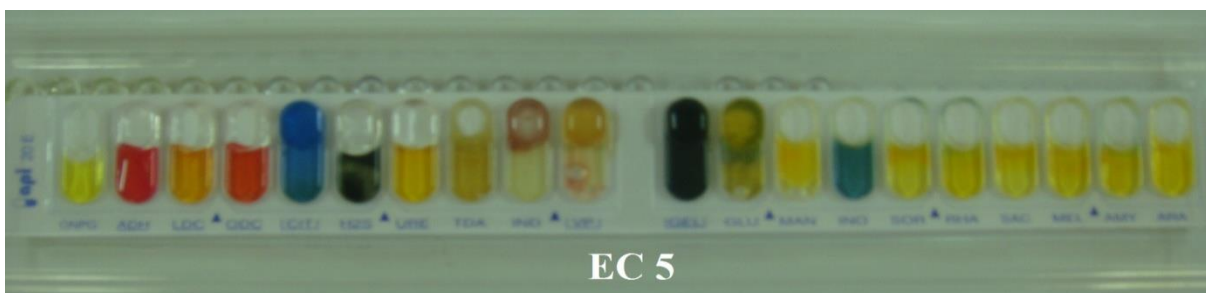
Les 4 isolats EC3, EC3', EC5, R2, ont manifesté une réaction positive vis-à-vis le test d'oxydase, traduite par une coloration violette. Cependant, la souche EC2 est oxydase négative.



**Figure 48 :** L'effervescence obtenue de la réaction d' $H_2O_2$  avec la catalase bactérienne (Boucif Meriem ).

### 3.4.5) Identification biochimique par la galerie Api 20E

Lors de l'inoculation des 6 isolats sélectionnés productrices de la cellulase sur les galeries Api 20E et incubation à une température de 30°C, pendant 24 heures, les résultats obtenus ont été interprétés selon un tableau de lecture des profils biochimique de la galerie.



**Figure 49 :** Aspects des galeries Api 20 E, après 24h d'incubation inoculées par les 4 isolats sélectionnés productrices de la cellulase (Boucif Meriem ).

Les résultats notés positif ou négatifs sont introduits dans la grille des résultats du **programme ABIS 8 on-line** qui compare les résultats insérés avec celle qui sont enregistrés dans les matrices d'identification pour chaque espèce et donne une identification probable du taxon recherché, avec son score d'identification suivi par des autres taxons suspectés

Strain name / code (optional)	Positive Negative Unknown			Acid production from	Positive Negative Unknown		
EC2	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Amygdalin	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alpha-hemolysis *	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Arabinose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Beta-hemolysis *	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Arbutin	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth in air	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Fructose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth in air + 5% CO <sub>2</sub>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Glucose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Anaerobic growth	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Inulin	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth at 10 °C	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Lactose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth at 45 °C	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Mannitol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth with 6.5% NaCl	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Mannose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Voges-Proskauer	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Raffinose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Hydrolysis of hippurate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Rhamnose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Esculin (beta glucosidase)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Ribose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pyrrolidonylarylamidase	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Sorbitol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alkaline phosphatase (PAL)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Sucrose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Arginine dihydrolase (ADH)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Trehalose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alpha Galactosidase	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Xylose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Beta Galactosidase	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Beta Glucuronidase	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>				

**Figure 50 :** Capture de fenêtre de la grille d'identification du programme ABIS 8 on-line contenant les résultats obtenus pour la souche EC2 (Boucif Meriem ).

EC3\*d [x]

Strain name / code (optional)

Back Refresh Specs Continue

	Positive	Negative	Unknown		Positive	Negative	Unknown
Motility	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Gas from D-Glucose	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pigment	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Acid production from:			
Catalase production (24 h)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Alpha-Methyl-D-Glucoside	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Oxidase (24 h)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Adonitol	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
ONPG (β-galactosidase)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	L-Arabinose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Arginine dihydrolase (ADH)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Cellobiose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lysine decarboxylase (LDC)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Dulcitol	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ornithine decarboxylase (ODC)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Glycerol	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Nitrates reduction	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Glucose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Methyl red	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	myo-Inositol	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Voges - Proskauer (VP)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Lactose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Indole production	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Maltose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Hydrogen sulfide (H <sub>2</sub> S)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Mannitol	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Acetate utilization	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Mannose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Malonate utilization	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Melibiose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Citrate utilization (Simmons)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Mucate	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tartrate (Jordans)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Raffinose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Esculin hydrolysis	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	L-Rhamnose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Gelatin hydrolysis	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Salicin	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Urea hydrolysis	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Sorbitol	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Deoxyribonuclease	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Sucrose (Saccharose)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lipase (corn oil)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Trehalose	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Phenylalanine deaminase	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Xylose	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>

**Figure 51** : Capture de fenêtre de la grille d'identification du programme **ABIS 8 on-line** contenant les résultats obtenus pour la souche **EC3\* (Boucif Meriem )**.

R 2							
Strain name / code (optional)		Positive	Negative	Unknown	Positive	Negative	Unknown
Gram positive staining	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Egg-yolk reaction	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Motility	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Nitrates reduction	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth on usual media *	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Voges - Proskauer test (VP)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Hemolysis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Acid production from:			
Para-central or central spore	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	N-acetyl D-glucosamine	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Sub-terminal or terminal spore	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	L-Arabinose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Swelling the sporangium	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Cellobiose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth at 45 °C	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Fructose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Growth at 65 °C	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D-Glucose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth at pH 5.7	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Glycerol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Growth on 7% NaCl media	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Glycogen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Anaerobic growth	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	meso-Inositol	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Growth in Lysozyme (0.001%)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Lactose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Casein hydrolysis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Mannitol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Esculin hydrolysis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D-Mannose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Gelatin hydrolysis	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Maltose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Starch hydrolysis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Melezitose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Tyrosine degradation	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Melibiose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Beta-galactosidase (ONPG)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Raffinose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Catalase	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Rhamnose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Oxidase	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Ribose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Urease	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Salicin	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Arginine dehydrolase (ADH)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Sorbitol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Lysine decarboxylase (LDC)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Sucrose (Saccharose)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ornithine decarboxylase (ODC)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Starch	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Indole production	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Trehalose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>

**Figure 52** : Capture de fenêtre de la grille d'identification du **programme ABIS 8 on-line** contenant les résultats obtenus pour la souche **R 2 (Boucif Meriem)** .

EC 5

Strain name / code (optional)

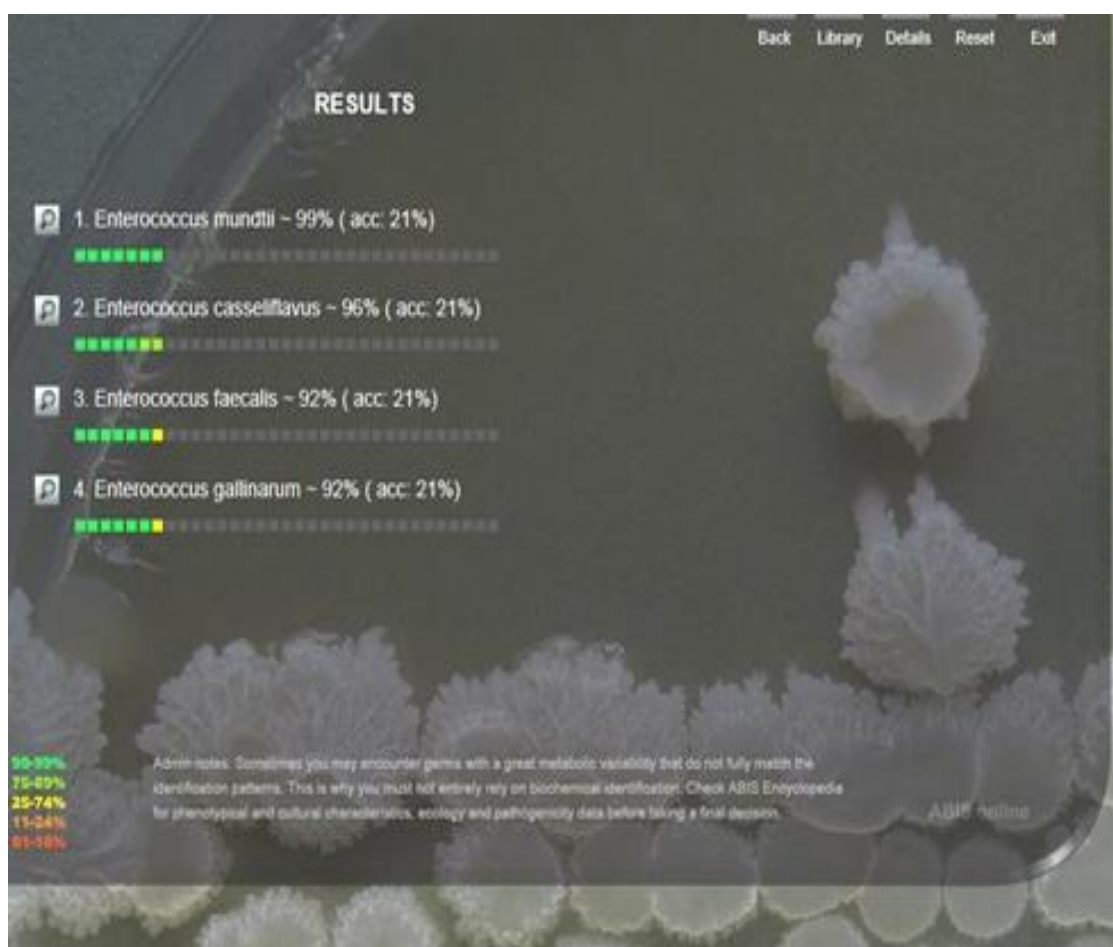
Back Refresh Specs Continue

	Positive	Negative	Unknown		Positive	Negative	Unknown
Motility	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Gas from D-Glucose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pigment	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Acid production from:			
Catalase production (24 h)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Alpha-Methyl-D-Glucoside	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Oxidase (24 h)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Adonitol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
ONPG ( $\beta$ -galactosidase)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	L-Arabinose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Arginine dihydrolase (ADH)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Cellobiose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Lysine decarboxylase (LDC)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Dulcitol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Ornithine decarboxylase (ODC)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Glycerol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Nitrates reduction	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Glucose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Methyl red	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	myo-Inositol	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Voges - Proskauer (VP)	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Lactose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Indole production	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Maltose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Hydrogen sulfide (H <sub>2</sub> S)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Mannitol	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Acetate utilization	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D-Mannose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Malonate utilization	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Melibiose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Citrate utilization (Simmons)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Mucate	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Tartrate (Jordans)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Raffinose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Esculin hydrolysis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	L-Rhamnose	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Gelatin hydrolysis	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Salicin	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Urea hydrolysis	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	D-Sorbitol	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Deoxyribonuclease	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Sucrose (Saccharose)	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lipase (corn oil)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Trehalose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Phenylalanine deaminase	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	D-Xylose	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>

**Figure 53 :** Capture de fenêtre de la grille d'identification du **programme ABIS 8 on-line** contenant les résultats obtenus pour la souche **EC5 (Boucif Meriem )**

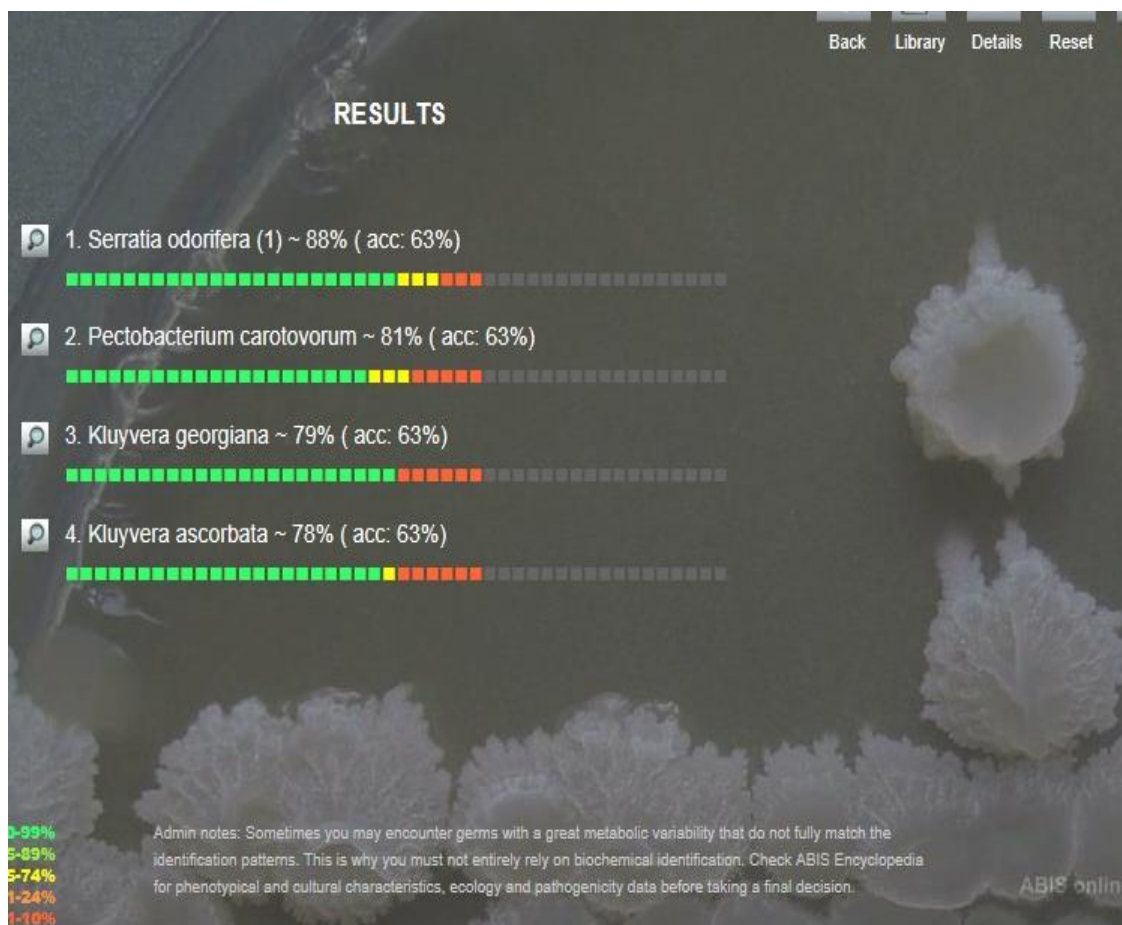
### 3.4.6) L'interprétation heuristique du profil biochimique des galeries

- **La souche EC 2** : Le programme a identifié cette souche comme étant *Enterococcus mundtii* avec un score d'identification de 99 % atteint, aussi comme suggestion *Enterococcus casseliflavus* 96% , *Enterococcus faecalis* 92%, *Enterococcus gallinarum* 92% (**Figure 60**).



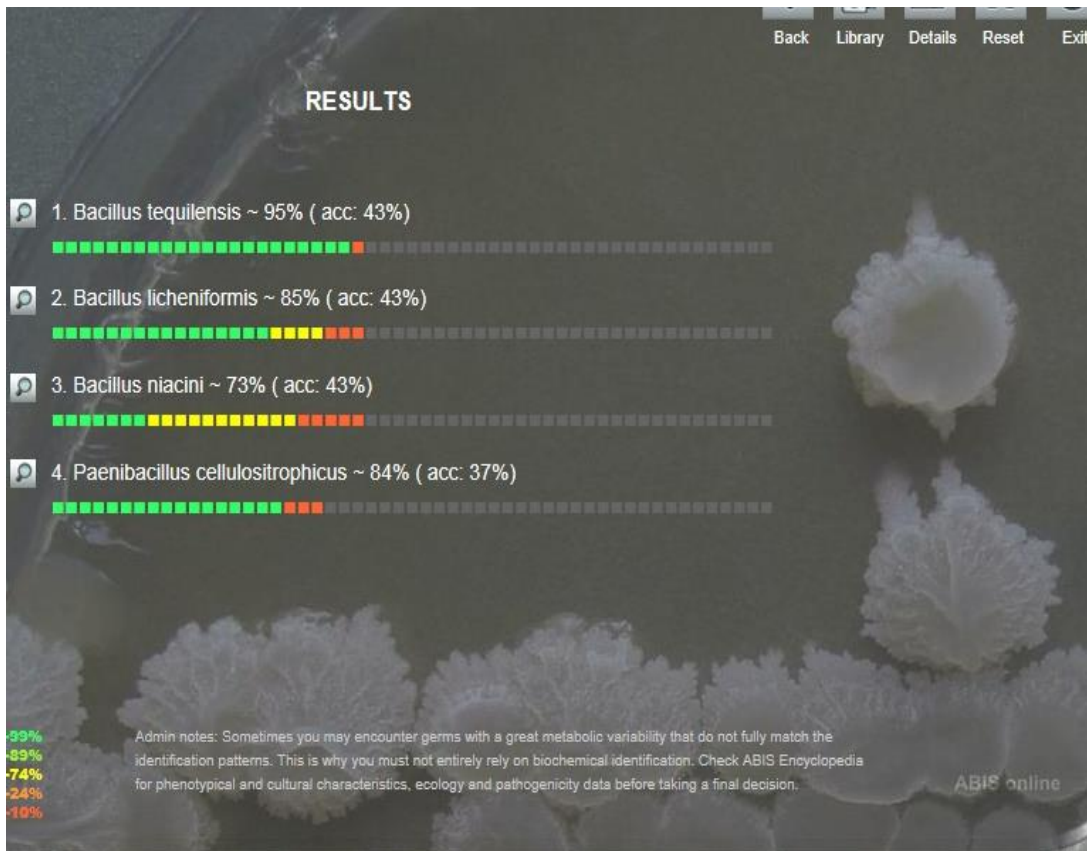
**Figure 54** : Capture de la fenêtre d'affichage de l'identification probabiliste de la souche EC2 donné par **programme ABIS 8 on-line (Boucif Meriem )**.

- **La souche EC3\*** : Cette souche a été identifiée comme étant *Serratia odorifera* avec un score d'identification de 88%, aussi comme suggestions *Pectobacterium carotovorum* 81%, *Kluyvera georgiana* 79%, *Kluyvera ascorbata* 78% (**Figure 61**).



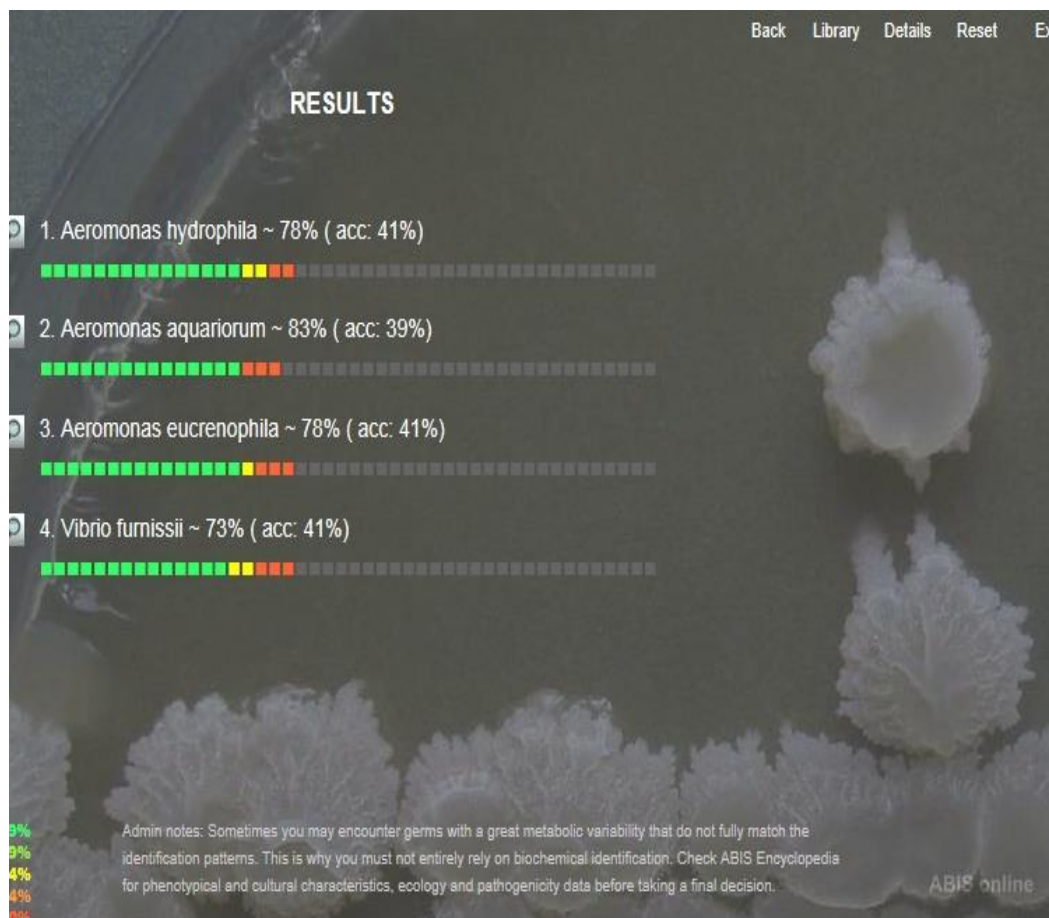
**Figure 55** : Capture de la fenêtre d'affichage de l'identification probabiliste de la souche EC3\* donné par programme ABIS 8 on-line (Boucif Meriem ).

- **La souche R 2** : La programme suggère que cette souche est *Bacillus tequilensis* et donne un score d'identification de 95%, avec des suggestions pour *Bacillus licheniformis* 85%, et *Paenibacillus cellulositrophicus* 84 %, et *Bacillus niacini* 73%. **(Figure 62).**



**Figure 56** : Capture de la fenêtre d'affichage de l'identification probabiliste de la souche R2 donné par **programme ABIS 8 on-line (Boucif Meriem )**.

- La souche EC5 : Le programme suggère que cette souche est *Aeromonas aquariorum* avec un score d'identification de 83% avec des suggestions pour *Aeromonas hydrophila* 78%, *Aeromonas eucrenophila* 78% et *Vibrio furnissii* 73%. (Figure 63).



**Figure 57 :** Capture de la fenêtre d'affichage de l'identification probabiliste de la souche EC3 donné par **programme ABIS 8 on-line (Boucif Meriem)**.

# *Discussion*

## *Discussion*

L'objectif de la présente étude est de démontrer l'isolement, le screening et l'identification des bactéries cellulolytiques capable de dégrader la cellulose avec une forte activité enzymatique de la cellulase à partir des différents échantillons rhizosphérique et racinaires. **(Doi, 2008).**

18 souches bactériennes caractérisées par leurs capacités à dégrader la cellulose ont été isolées à partir des racines et des rhizosphères des arbres forestier qui perçues comme une des sources optimales pour l'isolement des bactéries cellulolytiques a cause des fortes conditions de croissance trouvé dans l'environnement forestier **(Doi, 2008).**

On a utilisé 2 stratégies d'isolement basées sur la sélection des bactéries rhizosphérique afin d'obtenir des bactéries capable de dégrader la cellulose, à partir des racines et à partir du sol entourant la racine ; car il est généralement admis que la rhizosphère est le volume du sol entourant de près les racines (1-3 mm autour de la racine ainsi que la terre qui adhéré a la racine ) en partant du fait que la superficie de la racine contenant des bactéries cellulolytiques **(Killham et al., 1993).**

Le screening des souches les plus performantes a été effectué en testant les 18 isolats pour la synthèse de métabolite particulier, pour leurs capacités à utiliser la cellulose comme seule source d'énergie et donc la dégradation de la cellulose.

Ces 18 souches on été testé pou l'évaluation du taux de dégradation de la cellulose en se basent par le protocole établie par **(Andro et al., 1983)**, donnent une formation de zone d'hydrolyse indiquant ainsi la dégradation de la cellulose **(Chastruss, 1998)**, et Les colonies bactériennes ayant la plus grande zone claire ont été sélectionnées pour l'identification et la production de cellulase **(Ray et al., 2007)**

Les résultats obtenus ont montré qu'il ya une différence significative de dégradation de la cellulose chez les 18 isolats, qui varie de 14 mm a 55mm vers une dégradation maximales attribuer a la souche EC3' avec une zone d'hydrolyse de 55mm, EC 3 (47mm), EC 5(47 mm), R2 (40mm), EC2 (29mm), EC1 (29mm).D'autre recherche on montré que les zones d'hydrolyses varie d'une souche a une autre et estimer entre 5 et 40 mm (**Subodhk, 2012**), et entre 28 et 50 mm (**Pratima, 2011**).

Le suivie cinétique réaliser pour les 6 isolats les plus performant pour une durée de 30h montrant une croissance significatives des souches, avec une charge bactérienne maximale de 1.14 (EC1), 1.54(EC2), 1.45 (EC3), 1.45 (EC3'), 1.49 (EC5) et 1.46 (R2).

Le temps nécessaire pour atteindre la moitié de la charge maximale et estimer de 1.12h (EC1), 2.02(EC2), 2.41(EC3), 2.97 (EC3'), 1.49 (EC5) et 2.72pour (R2).

La souche EC2 a une croissance maximale supérieure aux autres isolats puis EC5, EC3, EC3', R2, EC1, mais EC1 apparait comme la plus rapide avec une vitesse de croissance pour atteindre la demi charge égale a 1.12h ; EC 5= 1.49 h ; EC2= 2.02 h ; EC3=2.41h ; R2= 2.72h ; EC3'=2.97.

La courbe standard a été estimée par la mesure du taux de glucose à différentes concentrations selon la méthode de DNS (**Nurulniza, 2009**),

L'estimation de l'activité enzymatique et l'évaluation du taux de production de la cellulase par les souches bactériennes isolées a été effectuée en se basant sur le protocole établi par (**Miller, 1959**), l'intensité du complexe coloré formé suite à la dégradation de la cellulose est mesurée avec spectrophotomètre à 540 nm.

Les résultats obtenus ont montré qu'il y a une différence significative de production de la cellulase et par la suite la dégradation de la cellulose chez les 6 souches les plus performantes qui varie de 0.23 IU pour(EC1), 0.26 IU (EC3'), 0.23 IU (EC 5), 0.29 IU(EC2), 0.30IU (EC3), et une production maximale attribuée a la souche(R 2) 0.32 IU, pour un pH optimum estimer respectivement a pH = 6, 6, 7,

7.5, 6, 7. L'estimation de la cellulase chez *Cellulomonas* a été décrite comme 0.20IU/ml (Conink *et al.*, 1986) et de 0.20 IU/ml mais après l'ajout des différents métales ions il ya une augmentation de l'activité qui arrive a 0.45 IU/ml/48h a 35°C (Irfan *et al.*, 2012).

L'optimisation du pH a montré que le pH optimale pour l'activité de la cellulase a été estimé de pH=6 pour (EC1), pH=6 (EC5), pH=7.5 (EC3'), pH=7 (EC3), pH=6 (EC2) et une production maximale attribuée a la souche (R2) au pH=7.

Le pH optimum pour les souches suivantes et *Cellulomonas* pH=7.5 (Yin *et al.*,2010), *Bacillus subtilis* pH=6.5 ( Kim *et al.*,2009), *Bacillus circulans* pH=4.5-7 ( Kim CH *et al.*,1995), *Bacillus strains* pH=5-6.5 (Mawadza *et al* , 2000) , *Aspergillus neiger*pH=6-7 ( Akiba, 1995), *Micrococcus circinelloides* pH=4-7 (Saha , 2004) et *Lysobacter sp* pH= 5-7 (Ogura , 2006).

L'optimisation de la température a montré qu'à 50°C ya une production maximale de la cellulase pour chaque isolat : (EC1), (EC2), (EC3), (EC3'), (EC5) et, (R2) .Les recherches on démontrés aussi une température optimale de 60°C pour *Cellulomonas* (Yin *et al.*, 2010), *Bacillus subtilis* 50°C et *Bacillus strain* 70°C (Yin *et al.*, 2010).

Selon le programme ABIS 8 on-line La souche EC 2 est une *Enterococcus mundtii* avec un score d'identification de 99 % atteint, la souche EC3' est une *Serratia odorifera* avec un score d'identification de 88%, la souche R2 est une *Bacillus tequilensis* et donne un score d'identification de 95%, et la souche EC5 est une *Aeromonas aquariorum* avec un score d'identification de 83%, ainsi le score d'identification est au bon *Match*.

# *Conclusion générale*

# Conclusion

L'étude de la dégradation de la cellulose consiste à l'heure actuelle un enjeu majeur. En effet, les utilisations et les applications de la cellulose et de ces dérivées dans des applications biotechnologique divers, y compris les prospectives pour la transformation des polymères végétaux en biocarburants, biogaz, biodiesel, bioéthanol et d'huiles essentielles fait d'elle une source de matière première inépuisable, renouvelable et bon marché ; un objectif essentiel d'importance mondiale au 21<sup>ème</sup> siècle pour l'humanité tout entière.

Dans cette présente étude, 18 souches bactériennes rhizosphérique ont été isolées et testées in vitro pour leur capacité de dégradation de la cellulose.

Lors de l'utilisation de la galerie Api 20 E, les 4 souches sélectionnées performantes ont été identifiées comme étant : *Enterococcus mundtii*, *Serratia odorifera*, *Aeromonas aquariorum* et *Bacillus tequilensis* avec une activité enzymatique de la cellulase maximale a 0.29 IU/ml/30min à pH=6, 0.27 IU/ml/30min à pH=7.5, 0.23 IU/ml/30min à pH=6 et 0.32 IU/ml/30min à pH=7 respectivement a une T° optimale de 50°C.

Ce travail pourra faire l'objet de d'autres études approfondies sur la purification de cette enzyme et la caractérisation des gènes impliqués dans la production de cette enzyme et l'optimisation des différents paramètres pour une production à grand échelle.

# *Référence Bibliographique*

## Référence Bibliographique

### Référence Bibliographique

Bayer E A, Kenig R., Lamed R (1983). Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. Bacteriol. 156: 818-827.

Bhat M.K. [2000]. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Adv.,

Bhat, M.K., Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnol. Adv. 15 (3-4), 583–620.

Browns, P. B. The Chemistry of Lignin; Academic Press: New York, 1952; p 242.

Cavaco-Paulo A. [1998] Mechanism of cellulase action in textile processes. (Elsevier) Carbohydrate Polymers, 37: 273-277.

Das Gupta, P. C.; Sarker, P. B. J. Text. Res. 1954, 24, 750–760.

Exam. Roll. No. 438 (An M.Sc. Thesis), Chittagong University, 1979

Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280, 309–316.

Herzog, R. O.; Jancke, W. Z. Physik 1920, 3, 106.

Hibbert, H. J. M. Chem. Soc. 1939, 61, 509.

Hiller, L. A.; Passu, J. R. J. Text. Res. 1946, 16 (10), 494.

Johnson. E.A., Sakajon.M., Halliwell. G., Demain. A L. (1982). Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulose system from *Clostridium thermocellum* Appl Environ Microbiol . 43 (5): 1125-1132.

Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: engineering, production and applications. Renew. Sust. Energ. Rev. 33, 188–203

Lamed. R., Setter.E., Kening.R., Bayer.E A. (1983) . The cellulosome a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. Biotechol Bioengin Symp . 13: 163-181

Lavelle P and Spain A.V., [2001]. Soil Ecology. Kluwer Academic Publishers, London, 22-48.

## Référence Bibliographique

Maki ML, Broere M, Leung KT and Qin W [2011] Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int J Biochem Mol Biol.* 2(2): 146–154.

mmanuel G, Dhanusa R, Prema P and Palavesam A, [2006]. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal of Environment Science and Technology.* 3(1): 25-34.

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

Muhammad I, Safdar A, Quratulain S, Muhammad N, [2012]. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Turkish Journal of Biochemistry.* 37(3):287–293.

Pierre Lieutaghi ( 2004 ) . *Le livre des arbres, arbustes arbrisseaux*, 1322 pages. Acte sud . ISBN 2-7427-4778-8.

Richmond P.A., [1991]. Occurrence and functions native cellulose. In: Haigler, CH, Weimer, JP (Eds.) *Biosynthesis and Biodegradation of cellulose.* Dekker, New York, 5-23

Sadhu S, Maiti T. K., [2013] Cellulase production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal* 3(3): 235-258.

Sadov, F.; Korchagin, M.; Matesky, A. *Chemical Technology Fibrous Materials*; Mir Publishers: Moscow, 1973; pp 340–343.

Saha S, Roy R.N., Sen S.K. and Ray A.K., [2006] Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica*(Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella*(Valenciennes). *Aquaculture Research* 37(4):380-388.

Sakthivel M, Karthikeyan N, Jayaveny R and Palani P, [2010] Optimization of culture conditions for the production of extracellular cellulase from *Corynebacterium lipophiloflavum*. *Journal of Ecobiotechnology* 2 (9): 06-13.

Sarker, P. B. *Nature* 1950, 16, 357.

Schellhorn . H. E., Forsberg. C.W.(1984). Multiplicity of extracellular B(1,4)- endolucaases of *Bacteroides succinoenes* S85. *Can Microbiol.* 30(7): 930-937.

## Référence Bibliographique

Shankar T, Mariappan V. and Isaiarasu L. [2011] Screening Cellulolytic Bacteria from the Mid-Gut of the Popular Composting Earthworm, *Eudriluseugeniae*(Kinberg). *World Journal of Zoology* 6 (2): 142-148

Shanmugapriya K, Saravana P.S., Krishnapriya, Manoharan M, Mythili A and Joseph S [2012] Isolation, screening and partial purification of cellulase from cellulase producing bacteria. *International Journal of Advance Biotechnology and Research* 3(1): 509-514

Tiemann, F.; Haarmann, W. *Chem. Ber.* 1975, 8, 509.

Vidaud . C .1984. Contribution a l'étude de l'introduction du système .

Zhang Y-H.P. and Lynd L.R., [2004]. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7):797- 824.

### Site internet consulté :

Référence Internet 1 : [www.gizmag.com](http://www.gizmag.com)

Référence Internet 2 : [www.studyblue.com](http://www.studyblue.com)

Référence Internet 3 : [www.eureka.mpronovost.ep.profweb.qc.ca](http://www.eureka.mpronovost.ep.profweb.qc.ca)

Référence Internet 4 : [www.pharmanatur.com](http://www.pharmanatur.com)

Référence Internet 5 : [www.Futura-sciences.com](http://www.Futura-sciences.com)

Référence Internet 6 : [www.crdp.ac-besancom.fr](http://www.crdp.ac-besancom.fr)

Référence Internet 7 : [www.flora-phyto.com](http://www.flora-phyto.com)

Référence Internet 8 : [www.infojardin.com](http://www.infojardin.com)

Web master 1 : [www.plant.USDA.goy](http://www.plant.USDA.goy)

Web master 2 : [www.tela-botanica.org](http://www.tela-botanica.org)

Web masrer 3 : [www.Futura-sciences.com](http://www.Futura-sciences.com)

Web master 4 : [www.plantesbotanique.org](http://www.plantesbotanique.org)

Web master 5 : [www.nafa.goy.com](http://www.nafa.goy.com)

Web master 6 [www.montarz.com](http://www.montarz.com)

*Annexe*

# Annexe 1

## Milieux de Culture

### 1. Bouillon nutritive :

Composition par litre :

Extrait de Vande	1g
Extrait de Levure	2g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g

pH= 7.4

### 2. Milieu Mendel Medium :

Composition par litre :

Sulfate d'ammonium	1.4g
Di-hydrogenophosphate de Potassium	2g
Urea	0.3g
Chlorure de Calcium	0.3g
Sulfate de Magnesium	0.3g
Sulfate de Fer	0.005g
Sulfate de manganèse	0.0016g

Sulfate de Zinc	0.0014g
Cobalt Chloride	0.002g
Peptone	0.75g
Tween 80	2ml
Cellulose	1.5g
Agar	15g
pH= 6	

### 3.Solution Rouge Congo à 1% :

Eau distillée	100 ml
Rouge Congo	2.5g

### 4.Solution Cellulose 1% :

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30.75 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19.35 ml
Cellulose	0.05g
PH=7	

### 5.Préparation du DNS :

Composition par 1 litre:

Hydroxide de sodium	10 g
Tartrate double de potassium et de sodium	182 g
Acide dinitrosalicylic	10 g
Phenol	2 g
Sulfite de sodium	0.5 g

# Annexe 2

## Estimation du taux de Glucose libéré :

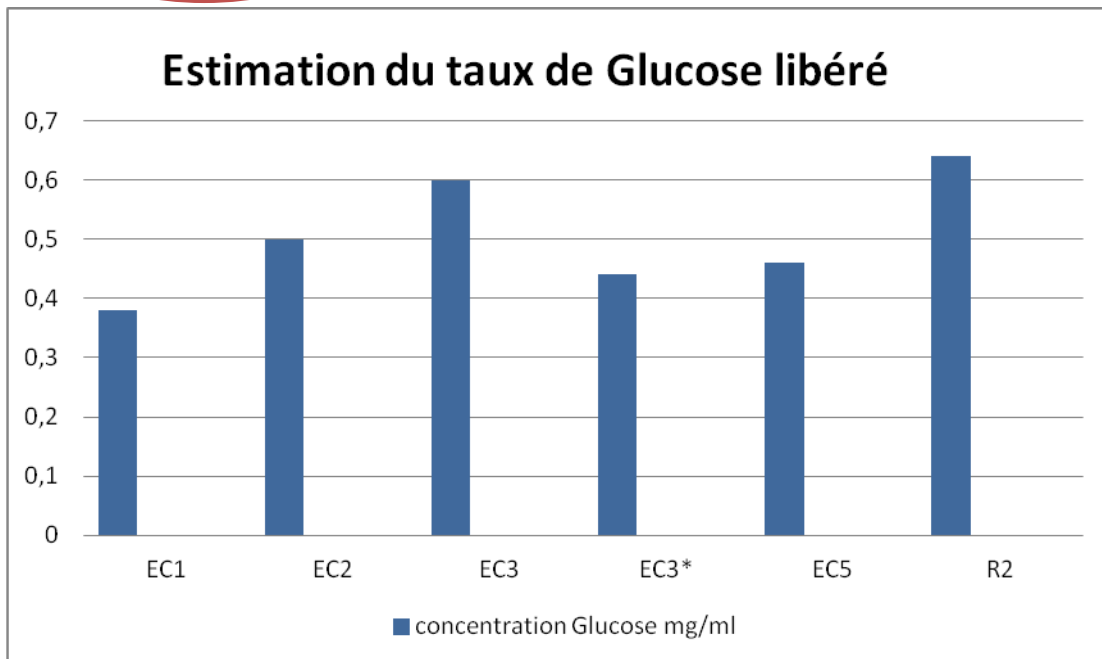
L'estimation du taux de glucose libéré en utilise l'équation de la courbe standard de glucose

$$y = 1,419x + 0,092$$

(y : DO 540 nm, x : concentration en glucose).

$$R^2 = 0,958$$

(R<sup>2</sup> : Coefficient de détermination).



### Calculs:

$$\text{Reducing sugar } (\mu\text{mole}) = \frac{\text{OD} \times 1000}{m \times \text{JMR}}$$

OD = Absorbance of the sample

m = Slope of glucose standard curve

JMR = Glucose molecular weight = 116.17

$$\text{Cellulase Activity (U/mL)} = \frac{\text{Reducing sugar } (\mu\text{mole})}{\text{Volume of sample (mL)} \times \text{incubation time (min)}}$$

# Annexe 3

## Tableaux des résultats

**Tableau 8 :** L'activité enzymatique de la cellulase pour les 6 isolats à PH=7

EC / IU Heures	2h	4h	6h	8h	24h	28h	30h
Ec1	0.0678	0.0782	0.1449	0.2073	0.2330	0.3050	0.3646
Ec2	0.0066	0.0853	0.2296	0.2719	0.3074	0.3890	0.4435
Ec3	0.0175	0.0992	0.1234	0.2390	0.3877	0.4523	0.5113
Ec3*	0.0887	0.1124	0.1720	0.2003	0.2832	0.3255	0.4048
Ec5	0.1166	0.1263	0.1793	0.2533	0.3023	0.3644	0.4109
R2	0.0514	0.0703	0.1960	0.2203	0.3336	0.4289	0.5421

**Tableau 9 :** Effet du PH sur l'activité enzymatique de la cellulase

Ec / PH	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8
Ec1	0.3444	0.3584	0.4210	0.3945	0.3806	0.3646	0.3507
Ec2	0.3467	0.4099	0.5404	0.4435	0.4387	0.3536	0.3444
Ec3	0.3091	0.3320	0.3985	0.4443	0.5113	0.4440	0.3493
Ec3*	0.3427	0.3999	0.4130	0.4380	0.4991	0.5020	0.3120
Ec5	0.3319	0.3938	0.4474	0.3793	0.3509	0.3068	0.2159
R2	0.3481	0.3585	0.3619	0.4360	0.5421	0.3914	0.3273

**Tableau 10 :** Effet de la T ° sur l'activité enzymatique de la cellulase

Ec / T °	30 °	40 °	50 °	60 °
Ec1	0.3866	0.3996	0.4210	0.3629
Ec2	0.3709	0.4812	0.5404	0.3295
Ec3	0.3926	0.4711	0.5113	0.3692
Ec3*	0.3480	0.4365	0.5020	0.3953
Ec5	0.3252	0.3436	0.4474	0.2995
R2	0.3926	0.4399	0.5421	0.3722

**Tableau 11 :** Suivie cinétique des 6 souches les plus performantes isolés du sol

Do550nm	T =0	2h	4h	6h	8h	24h	28h	30h
Ec 1	0.02	0.8090	0.8800	0.9793	1.1545	1.1988	1.2058	1.2183
Ec 2	0.02	0.7980	0.9020	1.0713	1.3269	1.4468	1.5529	1.6982
Ec 3	0.02	0.5300	0.9002	1.0660	1.1500	1.3113	1.5402	1.6083
Ec 3*	0.02	0.4040	0.8490	0.9200	1.0007	1.4032	1.4388	1.5603
Ec 5	0.02	0.8200	1.1600	1.2232	1.2845	1.4062	1.5568	1.6679
R 2	0.02	0.3081	0.9356	1.1482	1.2327	1.3301	1.5093	1.5968

# Annexe 4

## Identification des souches supposées par le système API20E

### Inoculation d'une galerie API 20 E

- À partir d'une culture pure de 18 à 24 heures, faire une suspension bactérienne ayant une concentration de  $10^8$  bactéries/ml (standard M<sup>c</sup> Farland No 5, ou ajustement de la densité optique à 0.1) dans 5 ml de saline stérile (Na Cl à 0,85%).
- Bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5-10 secondes. La suspension bactérienne doit être utilisée dans les 15 minutes suivant sa préparation.
- Déposer soigneusement 150 µl de la suspension bactérienne dans chaque cupule de la galerie en utilisant un embout stérile.
- Ajouter de nouveau 150 µl de la suspension bactérienne aux cupules CIT, VP et GEL (total = 300 µl) par puits.
- Après l'inoculation, remplir les cupules ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE d'huile minérale.
- Placer les galeries dans une chambre humide (boîte de plastique avec couvercle contenant un papier humide) et incuber à 30°C pendant 18 à 24 heures.

## Lecture des galeries

- Faire la lecture des galeries sous une hotte chimique.
- Consigner les réactions sur la fiche de résultats (fournie avec le kit):

Lire et consigner toutes les réactions avant l'addition des réactifs pour la réduction des nitrates et de l'indole car ces réactions dégagent des produits gazeux qui peuvent interférer avec les autres épreuves de la galerie. Ne pas remplacer le couvercle en plastique après l'addition des réactifs.

- La lecture des galeries se fait généralement au bas de chaque cupule sauf CIT, IND.
- Lire en suivant l'ordre ci-dessous (consulter le tableau des résultats annexé à cette technique) :
- **VP** - Ajouter 1 goutte d'hydroxyde de potassium (40%) (VP1), Ajouter 1 goutte d'alpha-naphtol (6%) (VP2), attendre 10 minutes et pendant ce temps, faire la lecture des autres cupules sauf **TDA et IND** en inscrivant la couleur et la réaction (+ ou -) sur une fiche de résultats.
- Lire la réaction du VP.
- **GLU** - Avant l'addition des réactifs, observer s'il y a présence de bulles (+ ou -) qui indiquent une réduction du nitrate à l'état gazeux (N<sub>2</sub>).
- ✓ Ajouter 2 gouttes d'acide sulfanilique (0,8%)
- ✓ Ajouter 2 gouttes de NN-dimethyl-alpha-naphthylamine (0,05%)
- ✓ Attendre 2-3 minutes

Pendant ce temps, faire les réactions TDA et IND.

- **TDA** - Ajouter 1 goutte de chlorure ferrique (10%), lire la réaction immédiatement.
- **IND** - Ajouter 1 goutte du réactif de Kovac, lire la réaction immédiatement.
- Lire la réaction **GLU**. Si la réaction est négative, ajouter de la poudre de zinc. Attendre 10 minutes et faire la lecture de cette dernière réaction.

# Annexe 5

## **Identification probalistique avec le logiciel on-line "Abis 8"**

Le programme ABIS 8 online à été utilisé pour interpréter les résultats des galeries API et ce de manière probalistique.

### **Présentation du programme ABIS 8 on-line :**

ABIS en ligne est un logiciel développé comme un outil de laboratoire pour l'identification bactérienne. Il est ouvert au public, mais l'utiliser nécessite toujours un nom d'utilisateur.

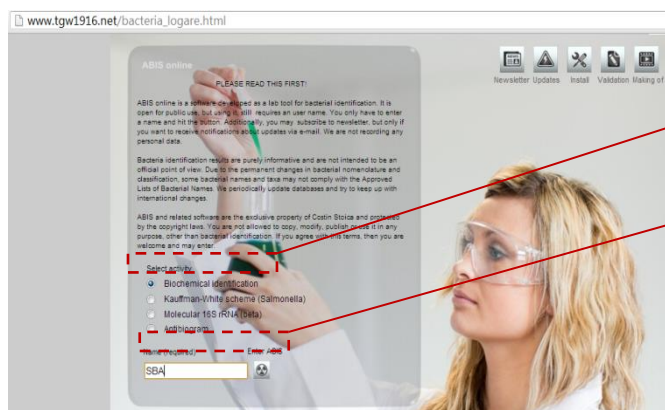
Les résultats d'études réalisées par les auteurs montrent qu'ABIS 6 en ligne est capable d'identifier des taxons de manière correcte. Dans la plupart des cas, les résultats sont identiques à ceux trouvés par APIWEB. Parfois la probabilité d'identification fut de 5-10% inférieur par rapport à ceux d'APIWEB lorsqu'il est utilisé en mode normal et 5% supérieure ou égale lorsqu'il est utilisé en mode d'identification forcé. Le mode forcé est suggéré par le programme quand les tests disponibles sont insuffisants.

### **Utilisation du programme ABIS 8 on-line :**

Comme le suggère son nom, c'est un programme utilisable en ligne, c'est à dire l'utilisateur dois y accéder via une connexion internet. L'URL ou le lien internet est le suivant: [http://www.tgw1916.net/bacteria\\_logare.html](http://www.tgw1916.net/bacteria_logare.html)

L'interface d'usage est plutôt simpliste: en accédant à la page du programme, on vous suggère de lire les conditions d'usage qui stipule que ce programme ne doit être utilisé à aucune autre fin que celle de l'identification bactérienne, dégageant les éditeurs de toutes responsabilités d'un usage autre que celui mentionné plus haut. Par la suite, on vous demande de choisir le type d'identification voulue (biochimique dans le cas de cette étude) et de mettre un nom d'utilisateur.

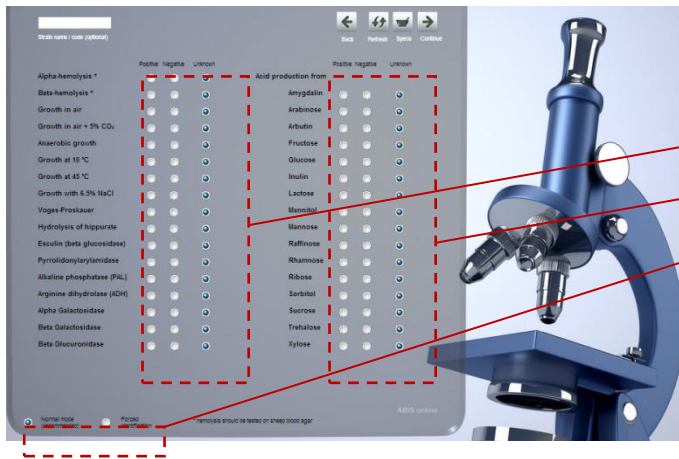
Après cette étape, une page s'affiche avec les principaux groupes bactériens identifiables avec le programme. Selon les premiers tests conventionnels, tel que la coloration de gram, et le type respiratoire, le choix du groupe est sélectionné en cliquant sur le lien portant le nom du groupe ciblé (ex: Streptococcus, un groupe comprenant les taxons appartenant aux genres *Streptococcus*, *Gemella*, *Enterococcus*...).



a. Choix du type d'identification et insertion du nom d'utilisateur



b. Choix du groupe bactérien en question



*c. Edition des résultats, choix du mode d'identification*



*d. Lecture des résultats de l'identification (avec % de correspondance)*

Figure: utilisation du programme ABIS 8 on-line

Par la suite s'affiche une page avec un champ pour le nim de la souche/isolat, en plus des différents tests et caractères cultureux et biochimiques sur lesquelles l'identification est basée, dès lors l'utilisateur clique sur le choix correspondant à ses résultats: positif, négatif ou inconnu, avec en bas la sélection soit du mode normal "*normal mode*" (recommandé), soit du mode forcé "*forced mode*".

En cliquant sur "continue" les résultats de l'identification s'affichent (en % de correspondance). Si par suite à l'utilisation du "normal mode" les tests sont jugés insuffisants par le logiciel, celui-ci suggèrera de refaire l'interprétation avec un mode forcé "*forced mode*".