

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Microbiologie Appliqué
Option : Biotechnologie Microbienne



Réf:

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Isolement et sélection des souches xylanolytiques locales : caractérisation biochimique des xylanases produites par l'isolat SJ4.

Présenté par :

AIT HAMMACHE Sofiane
YAHIA Nadia

Soutenu le : **15 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mme IDRES.N	MAA	Présidente
Mme BOUCHERBA. N	MCA	Encadreur
Mlle DJINNI .I	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015



dedicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents ;

En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect je vous remercie pour votre soutien moral et financière tout le long de mon parcours merci pour votre confiance.

A mes chers frères Sofiane et Lounes que j'adore.

A mes chères sœurs : Louiza, Nacera, Faty, Fatiha et Hamama que j'aime trop.

Et à Toutes personnes qui me sont chères : Vouva, Faty.

Midou et Hamou. ainsi qu'à tous mes amis sans exception

A mon binôme « Sofiane » et à toute sa famille

Enfin à toute la promotion « Biotechnologie Microbienne »

2014/2015

Nadia

Je dédié ce modeste travail :

Aux êtres les plus chers dans ma vie : mes très chers parents à qui je dois tous les bonheurs du monde pour leurs sacrifices et leur patience pour que je sois l'homme dont les valeurs sont les leurs, je les remercie

amplement pour le soutien moral

et financier dans les moments les plus hostiles de ma vie.

A mes frères que j'estime beaucoup : Atmane et son épouse et à leur fille

Milina, ainsi qu'a Fatah.

A mes sœurs que j'apprécie énormément : Nadia et ses enfants Anis et

Ines, Sabrina et ma petite sœur Imene.

A LA MEMOIRE DE MON FRERE AHSEN QUE DIEU

L'ACEVILLE DANS SON VASTE PARADIS

A Tous mes cousins que j'ai toujours considéré comme mes frères : Farid,

Aziz, Zahir, Abdelkader et tout les autres.

A tous mes chers amis : yano, mohya, Fatima, Hamza, Alhou, Samir,

Ramzi, Slimane, Fakher et tous les autres.

A mon binôme et toute sa famille.

Enfin à toute la promotion Biotechnologie 2014-2015

Sofiane



Remerciements

*Tout d'abord nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la force,
le courage et la patience pour terminer ce travail.*

*Nous voudrions exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice Mm Boucharba et à
lui exprimer nos profondes gratitude d'avoir accepté de nous encadrer et de nous donner la
possibilité d'effectuer ce travail et pour sa patience avec nous, son aide, sa disponibilité,
nous la remercions vivement.*

*Nos remerciements s'adressent aussi aux membres de jury
d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*En premier lieu à Mme Idres N, qui a bien voulu nous faire l'honneur de présider ce
jury et examiner ce travail. Merci pour tous les conseils au labo.*

*Nos remerciements les plus sincères et les plus profondes sont adressés à Mlle Djinni,
qui a bien voulu nous faire l'honneur d'examiner ce travail.*

*Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de prêt
ou de loin à l'achèvement de notre Travail.*

Sommaire



Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
I-Paroi cellulaire végétale.....	3
I-1-Structure des parois végétales : la lignocellulose.....	3
I-1-1-Composition.....	3
I-1-2-Structure.....	4
I-2-Composition des hétéroxylanes.....	5
II-Enzymes xylanasiques.....	7
II-1-Classification.....	7
II-2-Sites d'action des enzymes xylanasiques.....	8
III- Les micro-organismes dégradant les hétéroxylanes.....	8
III-1-Les bactéries xylanolytique.....	9
IV- Les applications industrielles des xylanases.....	10
Chapitre II: Matériels et méthodes	
I-Prélèvement d'échantillons.....	11
II- Isolement et sélection des souches xylanolytiques.....	12
II-1 Sélection sur milieu de culture solide	12
II-1-1 Révélation qualitative de l'activité xylanasique.....	12
II-2 Sélection sur milieu de culture liquide et suivi de l'activité xylanasique.....	12
III-Caractérisation morphologique de la souche sélectionnée	13
III-1 Analyse phenotypique.....	13
III-1-1 Observations microscopiques.....	13
IV-Méthodes analytiques.....	13
IV-1 Estimation de la biomasse.....	13
IV-2 Mesure de l'activité xylanasique.....	13
IV-3 Dosage des sucres réducteurs.....	14
IV-4 Dosage des protéines par la microméthode.....	15
V- Mise en culture de la souche bactérienne sélectionnée dans un milieu culture liquide...16	

VI- Caractérisation des xylanases dans le surnageant de culture.....	16
VI-1 Affinité vis à vis du substrat.....	16
VI-2 Effets des ions métalliques et réactifs chimiques.....	16
VI-3 Effets des solvants organiques.....	16
VI-4 Effets de la concentration du substrat sur l'activité xylanasiq... ..	17
VII- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE).....	17
VII-1 Préparation des gels d'électrophorèse.....	17
VII-2 Préparation des échantillons.....	17
VII-3 Réalisation de l'électrophorèse.....	17
VIII- Coloration au bleu de Coomassie et réalisation du zymogramme.....	18

Chapitre III: Résultats et discussions

I- Isolement de souches xylanolytiques.....	20
I-1 Sélection sur milieu de culture solide.....	20
I-1-1 Révélation qualitative de l'activité xylanasiq... ..	20
I-2 Sélection sur milieu de culture liquide et suivi de l'activité xylanasiq... ..	21
II- Caractérisation morphologique de l'isolat SJ4.....	23
II-1 Identification phénotypique.....	23
II-1-1 Aspect des colonies.....	23
II-1-2 Observations microscopiques	24
III- Production des xylanases de l'isolat SJ4.....	24
IV- Caractérisation des xylanases.....	24
IV-1 Affinité vis-à-vis du substrat	24
IV-2 Effet des ions métalliques et réactifs chimiques.....	25
IV-3 Effet des solvants organiques.....	27
IV-4 Effet de la concentration du substrat sur l'activité xylanasiq... ..	29
V- Electrophorèse (SDS -PAGE) et zymogramme.....	29
Conclusion.....	32

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau N ^o	Titre	Page
I	Groupes d'hémicellulose de la paroi végétale.	5
II	Composition d'hétéroxylanes en monosaccharides de différentes origines.	6
III	Classification des différentes enzymes hémicellulosiques.	7
IV	Les bactéries productrices des xylanases	9
V	Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non-alimentaires.	10
VI	Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs	15
VII	Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode.	15
VIII	Estimation de la croissance des huit isolats et mesure de l'activité xylanasiq.	21
IX	Suivi des activités xylanasiq. des isolats ET2, SJ3, SJ4 et SJ5.	22
X	Effet des ions métalliques et des réactifs chimiques sur l'activité xylanasiq.	26
XI	Classement des solvants organiques selon leur hydrophobicité (du plus au moins hydrophobe).	27

Liste des figures

Figures	Titre	Page
01	Organisation des tissus de la paroi végétale.	4
02	Structure et organisation de la cellulose dans la paroi végétale.	4
03	Représentation schématique de la structure des hétéroxylanes des fibres de maïs.	6
04	Mode d'action des hémicellulases impliquées dans la dégradation des hétéroxylanes .	8
05	Site de prélèvement d'échantillon de sol	11
06	Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS.	14
07	Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse.	18
08	Révélation de l'activité xylanasiq ue avec le rouge de Congo.	20
09	Observation microscopique de la souche SJ4 (a) : Coloration de Gram (Grossissement X100) (b) : cellules à l'état frais (Grossissement X 40)	23
10	Aspect des colonies de l'isolat SJ4	24
11	Affinité de la xylanase ou les xylanases vis-à-vis de trois substrats.	25
12	effet des solvants sur l'activité xulanasique	28
13	Effet de la concentration du substrat sur l'activité xylanasiq ue.	29
14	Profil de migration des protéines sur SDS-PAGE.	30

Liste des abréviations

- ✚ CMC: Carboxymethylcellulose
- ✚ DNS: Acide 3,5Dinitrosalicylique
- ✚ EDTA: Acide ethylenediminetéacétique
- ✚ EC: Enzyme classification
- ✚ GH: glycosyle hydrolases
- ✚ KDa : kilo dalton
- ✚ km: constante de MikailisMenten
- ✚ MM7: milieu minimal à base de xylane, pH 7
- ✚ PAGE: polyacrylamide gel Electrophoresis
- ✚ PI: point isoélectrique
- ✚ rpm: Rotation par minute
- ✚ SDS: Sodium dodécylsulphat
- ✚ TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
- ✚ Tris: Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
- ✚ Vm: vitesse de catalyse enzymatique maximale

Introduction



Introduction

La biomasse végétale est une source abondante et renouvelable de biopolymères, parmi les quels la cellulose, l'hémicellulose ou encore la lignine. L' hémicellulose est, après la cellulose, le second polymère naturel le plus abondant sur Terre. En raison de leurs propriétés chimiques remarquables mais aussi de leurs activités biologiques diversifiées, l'hémicellulose est aujourd'hui considérée, au même titre que la cellulose et l'amidon, comme des polysaccharides d'intérêt industriel. Une des étapes clé de la transformation biologique de l'hémicellulose est l'étape d'hydrolyse de ce polymère par des préparations de xylanases (**Coughlan et al. 1993**).

Selon **Bhat (2010)**, le marché mondial des enzymes industrielles était de 2 billion en 2005, atteignant 5,1 billion de dollars Américain en 2009, les hydrolases constituent 75% du marché des enzymes, les protéases en tête sont suivies des glycosidases comme les cellulases, les amylases et les hémicellulases, dont les xylanases représentent la plus forte proportion.

Nombreuses sont les applications des xylanases en industrie, leur utilisation est d'un intérêt crucial, vue leur importance économique, dans la production du bioéthanol, comme source d'énergie renouvelable (**Gray et al. 2006**), et dans la fabrication d'un papier écologique de meilleur qualité (**Techapun et al. 2003**).

Pour répondre aux besoins de l'industrie, une xylanase idéale devrait avoir des propriétés particulières, telles qu'une bonne stabilité thermique à pH alcalin, une activité spécifique élevée et une forte résistance aux ions métalliques, aux produits chimiques ainsi qu' aux solvants organiques (**Gaurav et al., 2014**), c'est pour cela que la recherche de nouvelles souches productrices de xylanases performante reste un domaine de recherche privilégié.

Les potentialités de la nature à ce sujet sont inépuisables et les micro-organismes xylanasiques offrent une grande diversité. Néanmoins, il faut signaler que rares sont les xylanases qui sont potentiellement applicables en industrie (**Techapun et al. 2003**). Ce travail s'inscrit globalement dans cette problématique.

Pour réaliser notre travail, nous avons adopté une approche méthodologique qui consiste a :

- ✓ Isolement à partir du sol et une eau thermale des souches productrices de xylanases.
- ✓ Sélection d'une souche productrice de xylanases ayant l'activité la plus élevée.
- ✓ Caractérisation biochimique des xylanases.

Afin de mieux cerner notre étude, une synthèse bibliographique brève donne un aperçu général sur l'intérêt de la présente étude, rappelons qu'elle est une suite des travaux de Boucherba et ses collaborateurs.

Partie théorique

Partie théorique

I-Paroi cellulaire végétale

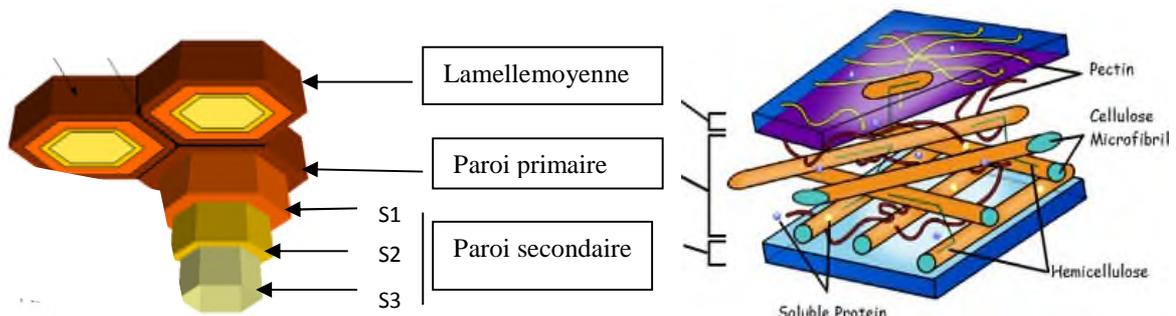
I.1 Structure de la paroi végétale : la lignocellulose

I.1.1 Composition

La paroi cellulaire végétale est une enveloppe qui contribue à la rigidité du végétal et c'est le socle de la croissance cellulaire. C'est aussi une barrière protégeant la cellule contre la déshydratation, les chocs osmotiques ou physiques et contre les infections microbiennes. Elle est composée majoritairement de lignocellulose qui est un assemblage complexe de cellulose, de lignine et d'hémicellulose. On y rencontre aussi des protéines, des lipides, des pigments et des minéraux. Sa structure observée au microscope électronique révèle trois niveaux d'organisation (**Shleser, 1994**) (**Fig.01**) :

- La lamelle moyenne : est une couche fine de 0,5 à 2,0 μm d'épaisseur, riche en substances pectiques, qui assure la cohésion entre deux cellules contiguës (**Aman, 1993**) ;
- La paroi primaire : c'est une couche très fine de 0,03 à 1,0 μm d'épaisseur, souple, hydrophile, de faible résistance mécanique, formée au cours de la croissance cellulaire et en majorité composée de microfibrilles de cellulose englobées dans une matrice amorphe riche en hémicelluloses, pectines et protéines;
- La paroi secondaire : c'est une couche épaisse, compacte, rigide et très résistante issue de cellules en fin de croissance. Elle est construite à partir de dépôts de microfibrilles de celluloses en couches orientées perpendiculairement les unes aux autres, d'où la différenciation en trois couches S1, S2 et S3 de la paroi secondaire (**Mc Neil et al., 1984**).

Alors que la cellulose et l'hémicellulose sont des polymères formés essentiellement de sucres, la lignine est un polymère aromatique synthétisé à partir de précurseurs phénylpropanoïdes. La composition de ces macromolécules varie considérablement non seulement d'une espèce à une autre mais aussi au sein d'une même plante en fonction de son âge, de son état de croissance et des facteurs environnementaux.



S1,S 2, S3 : couches de la paroi secondaire

Figure 01 : Organisation des tissus de la paroi végétale (Raven et al.,2007).

I.1.2 Structure

La cellulose représente 45% de la matière sèche du bois. C'est un polymère linéaire composé de résidus β -D-glucoses liés en β -(1,4) dont les longues chaînes forment des fibrilles dites élémentaires liées entre elles par des liaisons hydrogènes et des interactions de Van Der Waals. Leur assemblage avec la lignine crée des microfibrilles qui, lorsqu'elles se groupent, constituent des fibres de cellulose. Celles-ci forment à leur tour majoritairement la cellulose cristalline et une faible fraction de cellulose amorphe (fig.02). C'est dans cet état que la cellulose est la plus sujette à la dégradation enzymatique (Béguin et Aubert, 1994).

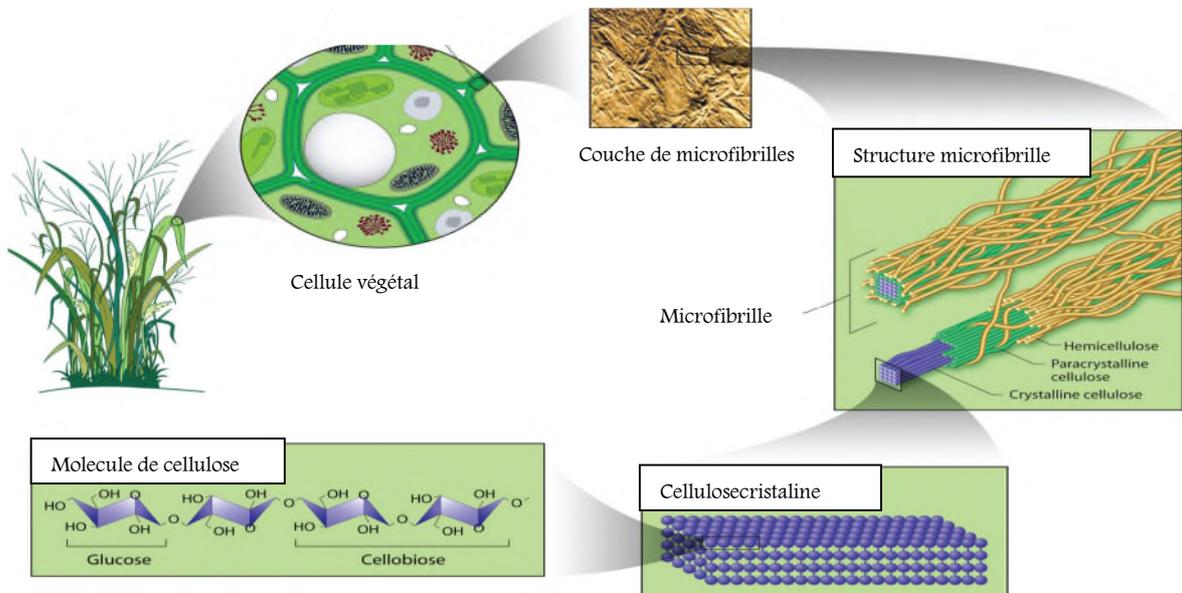


Figure 02: Structure et organisation de la cellulose dans la paroi végétale (Quiroz-Castañeda etFolch-Mallol, 2013).

La lignine constitue 20 à 30% de la matière sèche végétal, c'est un polymère complexe de nature phénolique associé à l'hémicellulose, la lignine confère aux cellules de la paroi végétale la rigidité, l'imperméabilité, la résistance aux attaques microbiennes et au stress oxydatif. Elle est issue de la polymérisation d'unités de phénylpropanes via des liaisons ester et aryl-éther (Tchunden, 1990).

L'hémicellulose représente 20 à 40% de la matière sèche, c'est le polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose, il s'agit d'un hétéropolysaccharide qui est associé à la cellulose et à la lignine. L'hémicellulose est constituée de différentes unités de sucres neutres présentes à des différentes proportions, ce qui rend son hydrolyse relativement plus facile que celle de la cellulose (Sun et al., 1996).

L'hémicellulose comprend un ensemble de polysides, le plus souvent hétérogène, formés par des résidus glucose, xylose, mannose, galactose, arabinose, fructose, acides glucuroniques et acides galacturoniques (Mirande, 2009).

Le tableau suivant représente les différents groupes d'hémicellulose présent dans la paroi végétale.

Tableau I : Groupes d'hémicellulose de la paroi végétale (Thiebaud, 1995).

Groupes	Hémicelluloses	Type de liaisons dans la chaîne principale
Xylanes	Arabinoxylanes 4-O-méthyl glucuronoxylanes Galactoarabinoxylanes Hétéroxylanes complexes	β (1-4)
Mannanes	Galactomannanes Glucomannanes Galactoglucomannanes	β (1-4)
Galactanes	acides de Galactanes	β (1-4), β (1-6)
Arabinogalactanes	Glucuronoarabinogalactanes	β (1-3), β (1-6)
Glucanes	Glucanes	β (1-6), β (1-4)

I.2 Composition des hétéroxylanes

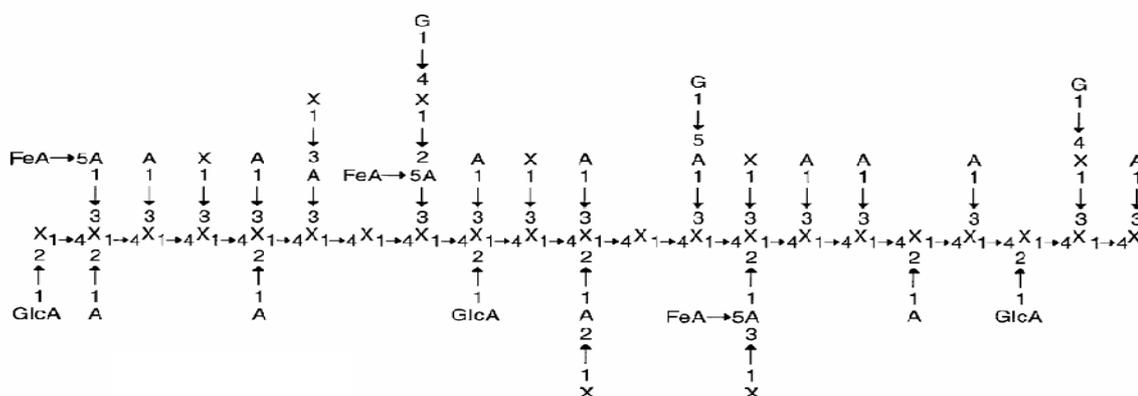
Les hétéroxylanes sont formés sur la base d'une chaîne de xylane linéaire

constituée de résidus D-xylopyranose liés entre eux par des liaisons β -(1,4) (**Fig.03**). Ces xylooses sont substitués à 80% en C-2 ou en C-3 par des composés variés tels que :

- Des résidus á L-arabinose en C-2 ou C-3, parfois même des di-substitutions sur la même position ou sur deux positions adjacentes ;
- Des acides glucuroniques ou leurs dérivés éther 4-O-méthyl en C-2 ;
- Des groupements acétyl, féruloyl et *p*-coumaryl ;
- Des chaînes latérales oligomériques contenant de l'arabinose, du xylose et parfois du galactose (**Brillouetetal., 1982 ; Saulnier et al., 1995**).

Bien entendu, la composition des hétéroxyanes varie considérablement en fonction de l'origine botanique (**Tableau II**). Le degré de polymérisation des xylanes de bois dur est plus élevé (150–200) que celui des xylanes de bois tendre (70–130).

De nombreuses liaisons s'établissent entre les hétéroxyanes via des ponts diféruliques, constituant un réseau dans lequel sont engagées les microfibrilles de cellulose. Ils forment aussi de nombreuses interactions, soit covalentes, soit non-covalentes avec la lignine, la cellulose et les autres composés qui servent au maintien de l'intégrité de la structure de la paroi végétale.



X : xylose, A : arabinose, G : galactose, GlcA : acide glucuronique, FeA : acide férulique.

Figure 03 : Représentation schématique de la structure des hétéroxyanes des fibres de maïs (**Saulnier et al., 1995**).

Tableau II : Composition d'hétéroxyanes en monosaccharides de différentes origines (d'après ^aKormenlink et Voragen, 1993 ; ^bGruppenetal., 1992 ; ^cShibuya et Iwasaki, 1985).

Origine	Xylose	Arabinose	Rhamnose	Mannose	Galactose	Glucose	Acides uroniques
Bouleau ^a	89,3	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	1,4	8,3

Blé ^b	65,8	33,5	n.d.	0,1	0,1	0,3	n.d.
Avoine ^a	81,4	9,7	n.d.	n.d.	1,1	3,4	4,3
Mélèze ^a	55,6	11,4	n.d.	n.d.	3,1	25,7	4,2
Riz ^c	46,0	44,9	n.d.	n.d.	6,1	1,9	1,1

n.d : non détecté

II-Enzymes xylanasiques

II-1-Classification

Ces enzymes sont regroupées dans deux classes selon l'action exercée par leur site catalytique, la classe des glycosyle hydrolases (GHs) hydrolysant des liaisons glycosidiques, la classe des carbohydrate esterases (CEs) attaquent les liaisons ester (collins et *al.*, 2002). Les similarités dans les séquences et l'hydrophobicité des acides aminés ont permis de classer les glycosyles hydrolases en 87 famille (Henrissat, 1991 ; Henrissat et Biaroch, 1993 et 1996), la plupart des xylanases connues appartiennent aux familles GH10 et GH11, le reste est distribué dans les familles GH5, GH8 et GH43 (shallom et shoham, 2003) (voir tableau III).

Tableau III: Classification des différentes enzymes hémicellulosiques (shallom et shoham, 2003).

Enzyme	Substrat	EC	Famille
Endo β (1-4) xylanase	β (1-4) xylane	3.2.1.8	GH 5
			8
			10
			11
			43
Exo β (1-4) xylosidase	β (1-4) xylooligomère xylobiose	3.2.1.37	GH 3
			39
			43
			52
			54
α-L Arabinofuranosidase	α-arabinofuranosyl (1-2) α (1-3) xylooligomère α (1-5) arabinane	3.2.1.55	GH 3
			43
			51
			54
			62
α-Glucuronosidase	Acide 4-O-méthyl α-glucuronique	3.2.1.139	GH67

Endo β (1-4) mannanase	(1-2) xylooligomère β (1-4) mannane	3.2.1.78	GH 5 26
β-glucosidase	β -glucopyranose (1-4) mannopyranose	3.2.1.21	GH 1 3
Endo-galactanase	β (1-4) galactane	3.2.1.89	GH53
Acetylxylyane estérase	2 ou 3-O-acétylxylyane	3.1.1.72	CE 1 2 3 4 5 6 7
Acetyl mannan esterase		3.1.1.6	
Acide ferulique et P-cumarique estérases	2- ou 3-O-acetyl mannan	3.1.1.73	CE 1

GH : glycosyle hydrolase ; CE : carbohydrate estérase.

II-2-Sites d'action des enzymes xylanasiques

Les enzymes xylanasiques agissent à différents sites au niveau du substrat, la figure suivante résume leur mode d'action.

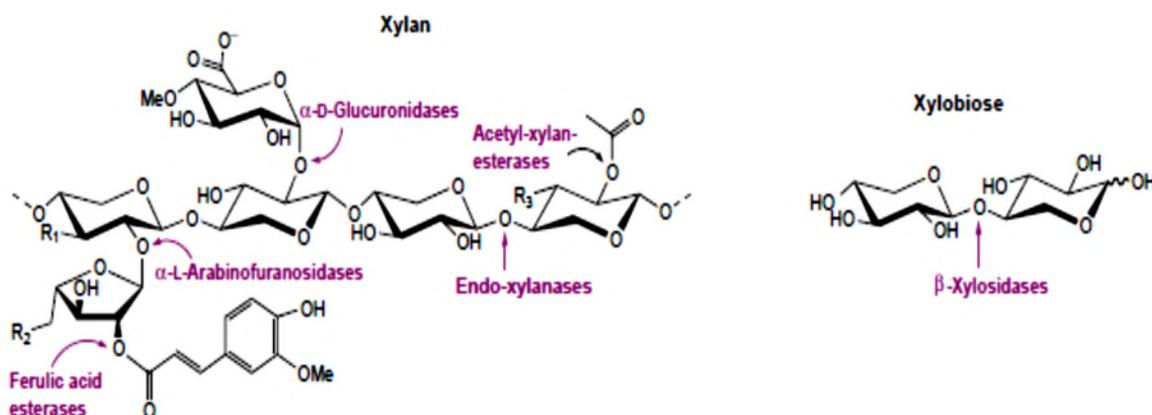


Figure 04: Mode d'action des hémicellulases impliquées dans la dégradation des hétéroxylanes (Paes et al., 2008).

III-Les microorganismes dégradant les hétéroxylanes

Les micro-organismes producteurs d'enzymes hémicellulolytiques existent dans des habitats naturels très diversifiés. La caractérisation de ces enzymes est particulièrement laborieuse à cause de la difficulté d'isoler les micro-organismes producteurs, on estime que plus de 99% d'entre eux ne peuvent pas être en effet cultivés avec les techniques de microbiologie standards (Amannet al., 1995). La dégradation des hétéroxylanes par

exemple, leur fournit une source de carbone alternative, ou bien elle fait partie d'un processus d'infection et de colonisation des cellules des plantes. Par ailleurs, certains de ces micro-organismes vivent en symbiose chez les animaux ruminants, leur présence étant indispensable à ces derniers pour digérer la cellulose ou les xylanes (**Prade, 1995**).

III-1-Les bactéries xylanolytique

Une grande variété de microorganisme (bactérie levure et moisissures) produisent des enzymes xylanasiq (collins et al., 2005) parmi les bactéries productrices de xylanases on peut cité quelques espèces présentées dans le tableau suivant.

Tableau IV : Propriétés physicochimiques et cinétiques de quelques bactéries productrices de xylanases.

Bactéries	MM (kDa)	Optimum		Stabilité		PI	V _{max} (μM/min/ mg)	Référence
		pH	T (°C)	Ph	T (°C)			
<i>Acidobacterium Capsulatum</i>	41	5	65	3-8	20- 50	7,3	403	Inagaki et al., 1998
<i>Arthrobactersp. MTCC 5214</i>	20	-	100	-	30- 80	-	3571	Khandepakar et Bhosle, 2006
<i>Bacillus sp. SPS-0</i>	-	6	75	6-9	85	-	-	Bataillon et al.,1998
<i>Enterobactersp. MTCC 5112</i>	43	9	100	-	50 48h	-	5000	Khandepakar et Bhosle, 2006
<i>Micrococussp. AR- 135</i>	56	7, 5- 9	55	6,5- 10	40	-	-	Gessesse et Mamo,1998
<i>Staphylococcus sp. SG- 13</i>	60	7, 5- 9, 2	50	7,5- 9,5	50	-	90	Gupta et al.,2000
<i>Alicyclobacillusacid ocaldarius</i>	-	5, 5	60	-	-	-	1460	Thompson et al.,2009

IV- Applications industrielles des xylanases

Le tableau ci-dessous résume les différentes applications des xylanases.

Tableau V : Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non-alimentaires (^aCollin *et al.*, 2005 ; ^bCourtin *et al.*, 2002 ; ^cDhiman *et al.*, 2008 ; ^dBarnard *et al.*, 2010 ; ^ePatra et Madhu, 2010)

Marché	Application	Fonction
Alimentation Humaine	Jus de fruits, nectars, huiles et vins	Amélioration de la macération et de la clarification des jus et réduction de la viscosité. Augmentation des taux d'extraction et de la filtration. ^a
	Panification	Elles sont Utilisées comme additifs dans les pâtes boulangères, permettent de solubiliser les hétéroxylanes de la farine de blé et améliorent la couleur, la structure et la texture du pain. ^b
	Fabrication dexylitol	Il est acariogène. Il rentre dans la composition du chewinggum, des bonbons, des boissons et des glaces.il est produit par la réduction chimique du xylose en conditions alcalines. ^{c et f}
Alimentation animale	Nourriture pour animaux monogastrique et ruminants	Diminution du contenu en polysaccharides non-amidon d'où une baisse de la viscosité et une meilleure disponibilité des protéines et de l'amidon qui accroît la digestibilité et la valeur nutritionnelle des aliment. ^a
Industries non-alimentaires	Pâte à papier	Amélioration de la viscosité et l'extensibilité, réduction de la consommation du chlore et d'autres agents chimiques lors du blanchissement, aussi la pollution de l'environnement est réduite. ^c
	Textiles	le prétraitement des fibres de jute de mauvaise qualité, il en est de même pour le flex de chanvre et la ramie (les xylanases thermostables éliminent le xylane pour donner des fibres de bonne qualité et sans compromettre la résistance) ^e .
	Bioconversion	La saccharification de la matière lignocellulosique par Les xylanases libère des sucres qui peuvent être utilisés pour produire d'autres produits comme les xylooligosaccharide et les acides organiques ^d .

		Traitement des déchets, Production de composés fermentescibles et des carburants renouvelables (bioéthanol). ^a
--	--	---

Matériels et méthodes



Partie expérimentale

Partie expérimentale

I- Prélèvement d'échantillons

Quatre échantillons de sol ont été collectés en Février 2015 au niveau d'un jardin amendé avec de la bouse de veaux, ce qui engendre une activité microbienne accrue, en l'occurrence, une activité xylanasiqye qui pourrait être favorisée par l'incorporation de bouse de veaux dans le sol. Ce typed'environnement est utilisé dans plusieurs travaux comme sources d'isolement de xylanases (**Viet et al., 1990 ; Nakamura et al., 1993 ; Dhillon et al., 2000 ; Techapun et al., 2003 ; Battan et al., 2007**).

Le site est situé dans la wilaya de Bejaia (Ihaddaden Ouffela, voir **Fig.05**). On élimine approximativement 3 centimètres de sol en surface, puis cinq carottes de sol sont prélevées à une profondeur de 10 cm à des points différents et distants, par la suite on a réalisé un échantillon aliquote en mélangeant l'ensemble des prélèvements, 12,5 g de sol sont mis en suspension dans 250 ml d'eau distillée stérile.



Figure 05: site de prélèvement d'échantillon de sol.

Un autre échantillon (100 ml) a été prélevé en même temps que le précédent à partir d'une source d'eau thermale (Hamman Boughrara) sise à Tlemcen, la température de cette eau est de 52 °C en été et 40 °C en hiver. L'échantillon a été transporté à température ambiante dans un tube.

II- Isolement et sélection de souches bactérienne xylanolytiques

Les suspensions de sol sont agitées pendant 20 minutes à 300 rpm avec un agitateur à mouvements orbitales (Heidolph Vibra max 100) et après décantation, on a réalisé une série de dilutions jusqu'à 10^{-3} à partir de la solution mère. 0,1ml de chaque dilution y compris la solution mère estensemencée en surface sur un milieu solide nommé MM7 à pH 7,0 ayant comme seule source de carbone le xylane (**Annexe II**) puis incubée à 37 °C, pendant 48 à 72 heures.

0,1ml d'échantillon d'eau de source thermale a servi pour ensemenecer deux boites de Petrie contenant le milieu MM7 à pH 7,0 puis incubées à 40 °C pendant 48 à 72 heures.

Le milieu MM7 contient le xylane de bouleau comme seule source de carbone (**Viet et al., 1991**).

II-1 Sélection sur milieu de culture solide

Les colonies qui ont montré un aspect et une couleur différents sont sélectionnées parmi l'ensemble des isolats obtenus sur milieu MM7, tous sont retenus pour le criblage sur milieu liquide, ils sont repiqués sur le milieu MM7 jusqu'à obtention de souches pures, puis conservées à 4°C sur des géloses nutritives.

II-1-1 Révélation qualitative de l'activité xylanasiq

La révélation de l'activité xylanasiq sur milieu de culture MM7 solide se fait par inondation de la boîte avec une solution de rouge de Congo à 0,1% pendant 30 min suivi d'un lavage avec du NaCl à 1M (**Gessesse et Gashe, 1997**).

II-2 Sélection sur milieu de culture liquide et suivi de l'activité xylanasiq

Les souches isolées à pH 7 sontensemencées dans des tubes avec 05 ml du milieu MM7 liquide, après 24 heures d'incubation à 37 °C, les surnageant de culture sont récupérés par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes.

Les souches sélectionnées ont fait l'objet d'un suivi de l'activité xylanasiqne en fonction du temps : 17 h, 24 h, 41 h, 48 h, 65 h et 72h.

L'activité xylanasiqne dans les surnageant est mesurée selon le test à l'acide dinitrosalicylique (voir méthodes analytiques).

III- Caractérisation morphologique de la souche sélectionnée

III-1 Analyse phénotypique

La caractérisation morphologique de l'isolat est effectuée selon les méthodes d'identification conventionnelles.

III-1-1 Observations microscopiques

Après 24 heures d'incubation la souche fait l'objet d'une coloration de Gram. Un état frais est observé puis photographié au grossissement X 40 à l'aide d'un microscope optique (OPTIKA).

La mobilité est déterminée par examen microscopique des souches à l'état frais entre lame et lamelle.

IV-Méthodes analytiques

IV-1 Estimation de la biomasse

La biomasse est estimée par mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimadzu UVmin-1240.

IV-2 Mesure de l'activité xylanasiqne

L'activité xylanasiqne est déterminée en présence du xylane de bouleau, qui est mis en suspension à raison de 1 % (m/v) dans du tampon phosphate sodique (50 mM à pH 7). Le mélange réactionnel est composé de surnageant de culture (100 µl) auquel est ajouté 900µl de xylane (1 % (m/v) à pH 7). Ce mélange est chauffé à 50°C pendant 10 min (Wang *et al.*, 2003).

Le dosage des sucres réducteurs est effectué selon la méthode de Miller (1959). La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1,5 ml d'une solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe III), puis le mélange est porté à ébullition pendant 5 min.

Le témoin correspond à la solution de xylane incubée sans le surnageant de culture à 50 °C pendant 10 min, puis 1,5 ml de DNS sont ajoutés et portés à ébullition pendant 5 min, par la suite 100 µl de surnageant sont additionnés. Après refroidissement, la lecture des absorbances est effectuée à 540 nm.

Une unité d'activité xylanasiqye est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une µmole de sucres réducteurs (équivalent en xylose) par minute, dans un ml du surnageant et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessous.

L'activité xylanasiqye est calculée selon Bailey et collaborateurs en 1992 comme suit:

$$\text{Activité xylanasiqye (U/ml)} = \frac{(C_x - C_t)D}{t}$$

C_x : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (µmole/ml).

C_t : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (µmole/ml).

D : facteur de dilution.

t: temps d'incubation (minutes).

IV-3 Dosage des sucres réducteurs

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé (**Fig.06**).

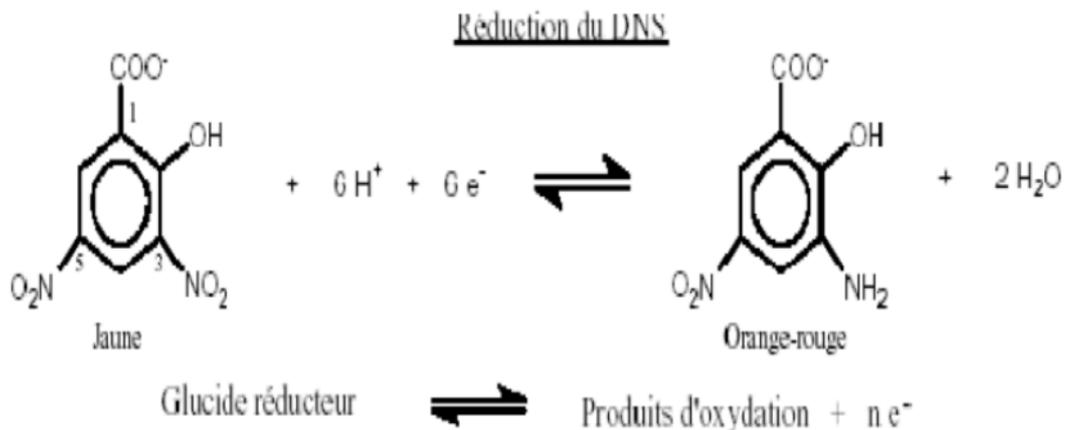


Figure 06:Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (**Bailey et al., 1992**).

La courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de xylose à des concentrations respectives de 0, 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 et 1,5 mg/ml (**Tableau VI**).

Tableau VI: Gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs (**Bailey et al., 1992**).

Tube	1	2	3	4	5	6
Xylose à 1,5 mg/ml (µl)	0	200	400	600	800	1000
Tampon phosphate sodique (µl)	1000	800	600	400	200	0
Concentration (mg /ml)	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5

A partir de chaque concentration, on prélève 100 µl, auxquels on rajoute 0,9 ml d'une solution de xylane à 1% et 1,5 ml de la solution de DNS, le chauffage est réalisé à 100 °C pendant 5 minutes puis les tubes sont refroidis pour effectuer les lectures d'absorbances à 540 nm. La courbe d'étalonnage est donnée en Annexe V.

IV-4 Dosage des protéines par la microméthode

Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 2 et 10 µg/ml. Le dosage consiste à ajouter 800µl d'échantillon, convenablement dilué, à 200µl de réactifs de BIORAD. Après homogénéisation du mélange, la densité optique est mesurée à 595 nm.

Gamme étalon :

Solution mère de l'albumine du sérum bovin (ASB) à 10 µg/ml

Tableau VII: Gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines par la microméthode

ASB (µg/ml)	0	2	4	6	8	10
ASB (µl)	0	160	320	480	640	800
Eau déminéralisée (µl)	800	640	480	320	160	0

La gamme d'étalonnage subit les mêmes traitements cités précédemment, la courbe d'étalonnage est donnée dans l'Annexe V.

V- Mise en culture de la souche bactérienne sélectionnée dans un milieu culture liquide

Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyer d'une capacité de 250 ml contenant un volume utile de 20 ml du milieu de culture MM7 liquide ajusté à pH 7,0, l'incubation se fait dans un bain Marie agitateur (KIKA LABORTECHNIK HS-B20 digital) à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

VI- Caractérisation des xylanases dans le surnageant de culture

Le milieu de culture des souches âgées de 24 à 48 heures est ensuite récupéré puis centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 min, le surnageant de culture est conservé à 4 °C.

VI-1 Affinité vis-à-vis du substrat

L'affinité a été déterminée vis-à-vis de trois différents substrats à citer : le xylane d'épeautre et d'avoine, le xylane de bouleau et la carboxyméthyl cellulose (CMC), le test d'activité xylanasiq ue est élaboré selon la méthode au DNS.

VI-2-Effets des ions métalliques et des réactifs chimiques

Les ions métalliques : Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, K⁺, sous forme de chlorure sont testés à une concentration de 5mM pour évaluer l'activité xylanasiq ue relative. Un volume de 1ml de chaque ion est additionné au mélange réactionnel contenant le xylane d'épeautre et avoine à 1%et le surnageant de culture (0,1 ml), le tout est incubé à 55°C pendant 10 min.

L'effet de l'éthylènediamine tétra acétate (EDTA, 5mM), du sodium dodécyl sulfate (SDS), est recherché dans les mêmes conditions réactionnelles.

Le β mercaptoéthanol a été testé dans les mêmes conditions réactionnelles avec une concentration de 20mM.

VI-3-Effets des solvants organiques

Un volume de 30 µl de chaque solvants organiques : acétone ; propanol ; éthanol ; méthanol ; chloroforme ; heptane ; cyclohexane et toluène est additionné au mélange

réactionnel contenant le xylane d'épeautre et d'avoine à 1 % et le surnageant de culture puis incubé à 55°C pendant 10 min.

VI-4-Effets de la concentration du substrat sur l'activité xylanasiq

L'activité xylanasiq a été testée à différentes concentration du substrat allant de 0,2 à 2%.

VII-Détermination des poids moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (selon le protocole de Laemmli, 1970)

VII-1 Préparation des gels d'électrophorèse

On ajoute du xylane d'épeautre et d'avoine à 0,1 % (m/v) à un gel de séparation de 12 % (**Annexe IV**), ce mélange est versé entre deux plaques misent dans un dispositif (Thermo Scientific) qui les maintient, le gel occupe deux tiers de la plaque. Après polymérisation, le gel de concentration à 7,5% (**Annexe IV**) est coulé au-dessus du gel de séparation, un peigne d'une épaisseur de 1,5 mm est inséré immédiatement jusqu'à complète polymérisation du gel de concentration.

VII-2 Préparation des échantillons

Le surnageant est concentré cinq fois avec un rotavapor de marque STUART puis 75 µl sont mélangées avec 25 µl du tampon d'échantillon (**annexeIII**).

Un kit de marqueurs protéiques de type Thermo Scientific est déposé dans les puits du gel afin d'estimer le poids moléculaire de la xylanase ou les xylanases de l'isolat le plus producteur.

VII-3 Réalisation de l'électrophorèse

Tout d'abord le peigne est retiré du gel et les plaques sont mises dans la cuved'électrophorèse (**Fig. 07**), le compartiment intérieur et extérieur sont remplis avec du tampon de migration (**annexe III**), Le kit de marqueurs utilisé contient 10 marqueurs ayant les poids moléculaires suivants : 11, 17, 26, 34, 43, 55, 70, 95, 130 et 250 KDa. L'échantillon (20µl à raison de 20 µg) et les marqueurs à raison de 10 µl sont déposés dans les puits, La migration se fait à 150V (43 mA) pendant 2 h.



Figure 07 : Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Thermo Scientific).

VIII- Coloration au bleu de Coomassie et réalisation du zymogramme

La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol est à 1cm du bord inférieur de la plaque, une fois la migration est terminée, la visualisation du profil de migration se fait après le traitement du gel comme suit :

- le gel est rincé à l'eau distillée et coupé en deux portions, le premier gel sert pour la réalisation de la coloration au bleu de Coomassie R250 et le deuxième gel pour la réalisation du zymogramme, pour la coloration au bleu de Coomassie le gel subi les traitements suivants :
 - Rinçage à l'eau distillée puis coloration dans la solution de bleu de Coomassie R250(**annexe III**) sous faible agitation pendant une nuit;
 - Lavage à l'eau distillée puis trempage dans la solution de décoloration (**annexe III**) avec un changement de bain (2 à 3 fois).

Les masses moléculaires des xylanases sont déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage « $R_f = f(\log PM)$ ». Le rapport frontal est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance de migration du bleu de bromophénol}}$$

Le deuxième gel destiné pour la réalisation du zymogramme, subit les traitements suivants:

- Immersion dans une solution de Triton X-100 à 2,5% (m/v) pendant 30min ;
- le gel est débarrassé du Triton X-100 par rinçage à l'eau distillée puis une incubation dans du tampon phosphate 50mM à pH 7 à 55°C pendant 20mn ;
- Coloration au rouge de Congo (0,1%) pendant 15 min ;
- Lavage avec une solution de NaCl à 1M ;
- Immersion dans de l'acide acétique à 0,5% (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste (**Gallardo et al., 2004**).

Résultats et discussions

I-Isolement de souches xylanolytiques

I-1 Sélection sur milieu de culture solide

Dix souches xylanolytiques sont isolées sur un milieu minimal MM7 (pH 7) à base de xylane de bouleau, dont 8 souches sont isolées à partir de sol de jardin (SJ1, SJ2, SJ3, SJ4, SJ5, SJ6, SJ7 et SJ8), ces dernières sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures, et 2 souches (ET1 et ET2) sont isolées à partir d'eau de source thermique, elles sont incubées à 40°C pendant 24 à 48 heures. Cette sélection sur milieu solide a pour but l'obtention de souches productrices de xylanases et révélation de l'activité xylanase (Fig.08).

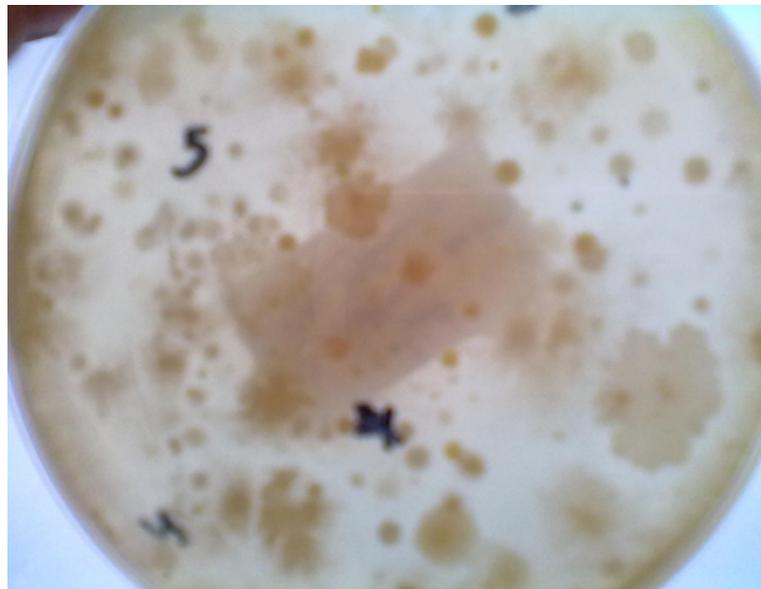


Figure 08: L'aspect des colonies de quelques isolats du sol de jardin.

I-1-1 Révélation qualitative de l'activité xylanase

Une activité xylanase est détectée par la formation de zones d'hydrolyse orange sur un fond rouge, l'hydrolyse du xylane de bouleau par les xylanases libère des xylooligosaccharides qui donnent une couleur orange après traitement avec du rouge de Congo suivi d'une décoloration avec du chlorure de sodium (Fig.08).

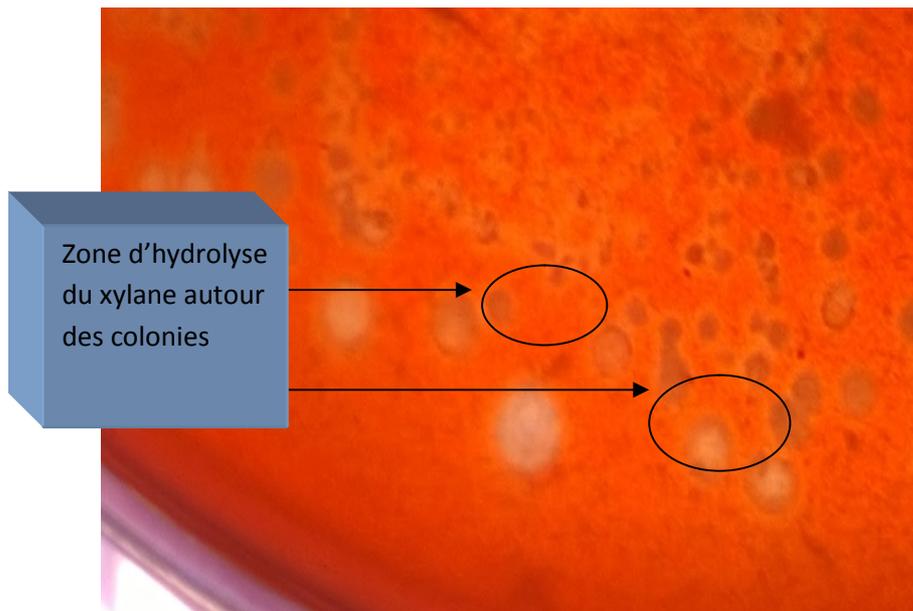


Figure 09: Révélation de l'activité xylanase avec le rouge de Congo.

I-2 Sélection sur milieu de culture liquide et suivi de l'activité xylanase

Cette sélection est basée sur la mesure de l'activité xylanase sécrétée dans un milieu de culture liquide MM7. La croissance bactérienne est suivie par mesure de la biomasse à 600 nm.

Les résultats des activités des dix souches sélectionnées sont rassemblés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Estimation de la croissance des huit isolats et mesure de l'activité xylanase.

Souches	Absorbance à 600 nm	Activité xylanase (U/ml) (à 50 °C et à pH 7)
ET1	0,36	0,33
ET2	0,50	1,57
SJ1	0,38	0,4
SJ2	0,66	0,29

SJ3	0,12	0,7
SJ4	0,64	2,2
SJ5	0,38	0,6
SJ6	0,45	0,4
SJ7	0,16	0,41
SJ8	0,26	0,3

Les souches ET2, SJ3, SJ4 et SJ5 révèlent des activités xylanasiques relativement importantes. Cependant la souche SJ4 présente la meilleure activité xylanasique (2,2 U/ml). Si on compare nos résultats avec ceux de Boucherba (2011), on remarque que l'activité de la SJ4 est sensiblement identique à l'activité de l'isolat SJ11 qui est de 2,33 U/ml, par contre elle est inférieure à l'activité xylanasique de l'espèce *Jonesia denitrificans* BN13 qui est de 3,79 U/ml.

A partir de ces résultats, les quatre souches ont fait l'objet d'un suivi de l'activité xylanasique après 17 h, 24 h, 41 h, 48 h, 65 h et 72 h (**Tableau IX**).

Tableau IX :Suivi des activités xylanasiques des isolats ET2, SJ3, SJ4 et SJ5.

Lecture	Souches	Activité xylanasique (U/ml)
Après 17 h	ET2	0,89
	SJ3	0,69
	SJ4	1,18
	SJ5	0,54
Après 24 h	ET2	1,79
	SJ3	0,62
	SJ4	4,38
	SJ5	0,6
Après 41 h	ET2	2,15
	SJ3	0,6
	SJ4	20,20
	SJ5	0,62
Après 48h	ET2	1,57
	SJ3	0,75

Après 65 h	SJ4	20,24
	SJ5	0,77
	ET2	1,3
	SJ3	0,51
	SJ4	20,22
Après 72h	SJ5	0,73
	ET2	1,67
	SJ3	0,66
	SJ4	18,98
	SJ5	0,26

L'isolat ET2 présente une activité plus importante que les isolats SJ5 et SJ3, l'activité est estimée à 2,15 U/ml au bout de 41 h. La souche SJ4 comme présentée dans la figure montre une forte activité xylanasiq ue qui atteint un maximum de 20,24 U/ml au bout de 48 heures. De ce fait la souche SJ4 est retenue comme étant la meilleure souche productrice de xylanase, et fera l'objet d'étude de ce travail.

II- Caractérisation morphologique de l'isolat SJ4

II-1 Identification phénotypique

II-1-1 – Aspect des colonies

Après 48 heures d'incubation l'isolat SJ4 sur milieu MM7, les colonies obtenues sont de couleur beige, bombé et arrondi avec un contour régulier (**Fig.09**)

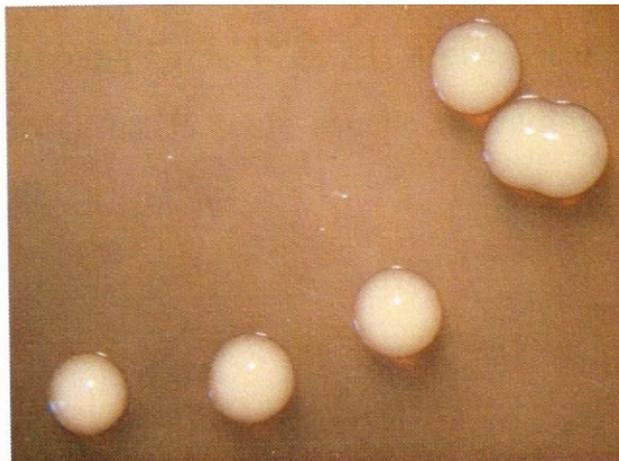
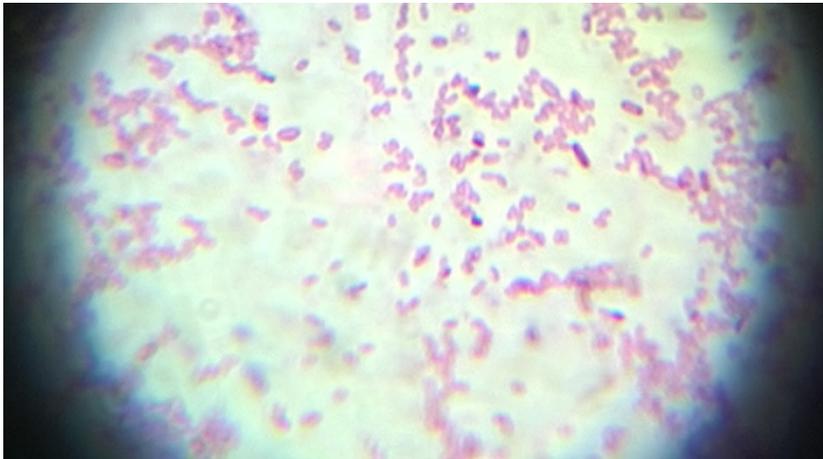


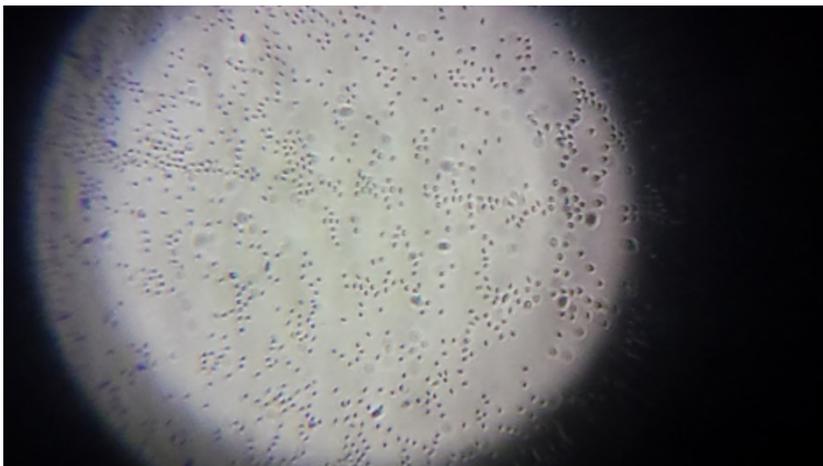
Figure 10: Aspect des colonies de l'isolat SJ4

II-1-2- Observations microscopiques

L'observation au microscope optique révèle des petits bacilles Gram négatif (**Fig.a**), à l'état frais la souche se présente sous forme de bacilles courts à extrémités arrondies (**Fig.b**).



(a) : Coloration de Gram



(b) : cellules à l'état frais
(Grossissement X 400)

(a) : Coloration de Gram (Grossissement X1000), (b) : cellules à l'état frais (Grossissement X 400).

Figure 11: Observation microscopique de la souche SJ4

III-Production des xylanases de l'isolat SJ4

37 ml du surnageant de culture contenant des xylanases extracellulaires ont été récupérés. Les résultats montrent une activité de 20,24 U/ml au bout de 48h, probablement l'isolat SJ4 était en fin de phase exponentielle ou au début de la phase stationnaire.

IV- Caractérisation des xylanases

IV-1 Affinité vis-à-vis du substrat

L'affinité vis-à-vis du xylane de bouleau (20,24U/ml), le xylane d'épeautre et d'avoine et la carboxyméthyle-cellulose (CMC) est illustrée dans la figure n° 11. La meilleure activité xylanasiqne est obtenue avec le xylane de bouleau, ce résultat est en accord avec les travaux de Bhosle et Giriyan (2004) et Xu et collaborateurs en 2005, ces derniers ont mesuré les activités xylanasiqnes chez l'espèce *Pseudomonas stutzeri* NRRL-B-30615 et l'espèce *Pseudomonas* sp WLUNO24.

La ou les xylanases de l'isolat SJ4 catalyse également le xylane d'épeautre et d'avoine (16,7 U/ml) La ou les xylanases de l'isolat SJ4 catalysent également le xylane d'épeautre et d'avoine (16,7 U/ml), Georis et collaborateurs (2000) ont rapporté un résultat de (31 U/ml) avec la même source de carbone avec l'espèce *Streptomyces actuosus* A-151.

La xylanase ou les xylanases semblent être bifonctionnelles c'est-à-dire capable d'hydrolyser la CMC cellulose néanmoins l'activité reste faible (3,99 U /ml).

Probablement Certaines xylanases ou l'ensemble de ces enzymes ne sont pas des vraies xylanases, elles pourraient être utilisées dans la bioconversion des hémicellulose afin de produire divers métabolites à savoir le bioéthanol.

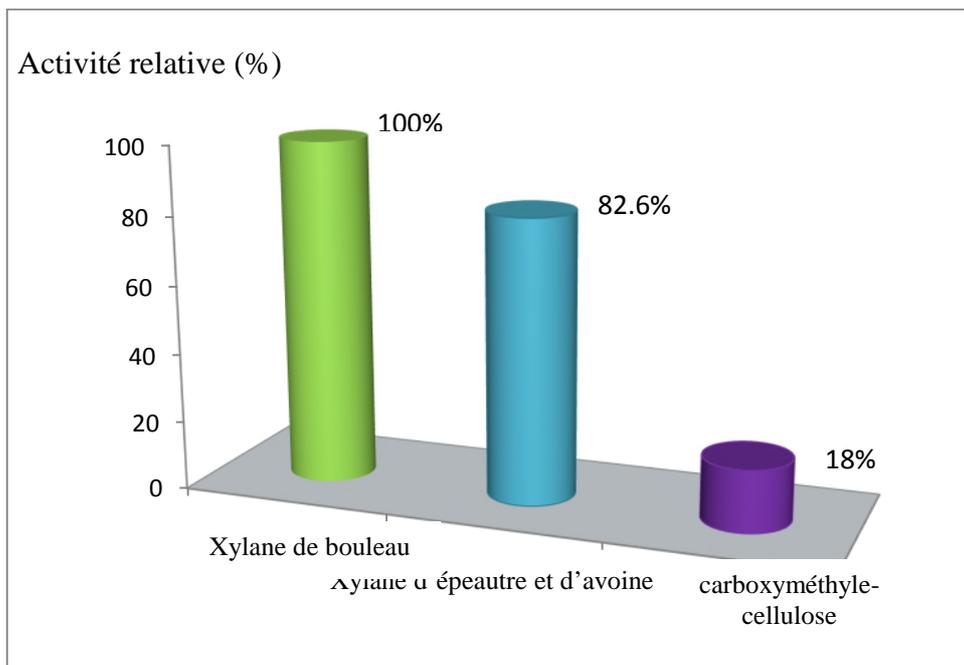


Figure12 : Affinité de la xylanase ou les xylanases vis-à-vis de trois substrats.

IV-2 Effet des ions métalliques et réactifs chimiques

Les résultats de l'effet des ions métalliques et d'autres agents chimiques sur l'activité xylanasique sont donnés dans tableau X. L'activité relative a été calculée en se référant à l'activité de l'enzyme incubée en absence des ions métalliques.

Tableau X : Effet des ions métalliques et des réactifs chimiques sur l'activité xylanasique

Les ions métalliques et réactifs chimiques (5mM)	L'activité relative (%)
Aucun	100
Mg ²⁺	88.2
Ca ²⁺	87.7
Fe ²⁺	88.2
K ⁺	88.2
Na ²⁺	94.14
SDS	82.97
EDTA	88.4
β-mercaptoéthanol (20mM)	82

Les résultats montrent qu'aucun des ions testé ne stimule l'activité, ceci a été également rapporté dans le cas des xylanases de *Bacillus stearothermophilus* T-6 (**Khasin et al., 1992**)

Parmi les ions testés, aucun n'inhibe l'activité xylanasique, Toutefois selon l'étude de Kiddinamoorthy et collaborateurs (2008), le Fe²⁺ inhibe les xylanases du *Bacillus* sp.GRE7 ainsi que celles produites par *Chizophyllum commune* (**Halgasova et al., 1994**).

Concernant l'effet des réactifs chimiques :

✓ Les xylanases de l'isolat SJ4 semblent résister au sulfate dodécyl sodique (SDS) alors qu'une inactivation totale a été rapportée chez les xylanases produites par plusieurs espèces microbiennes (**Fujimoto et al., 1995 ; Ishihara et al., 1997 ; Liu et al., 1998 ; Lama et al., 2004**).

✓ Le β -mercaptoéthanol est un agent réducteur, dans ce cas il diminue l'activité de 18% ce qui suggère, probablement, que la cystéine est présente dans le site actif de la xylanase ou à côté (**Yin et al., 2010**). Les xylanases produites par certaines espèces de *Bacillus* sont activées par cet agent réducteur (**Breccia et al., 1998 ; Bataillon et al., 2000 et Johnvesly et al., 2002 ; Boucherba et al., 2011**). Une inactivation totale a été rapportée chez les xylanases produites par plusieurs autres microorganismes (**Fujimoto et al., 1995 ; Ishihara et al., 1997 ; Liu et al., 1998 ; Lama et al., 2004**).

✓ L'éthylène diamine acétate (EDTA) a inhibé l'activité de 11.5 % ce qui suggère que l'enzyme peut être une métalloenzyme. Le même résultat a été rapporté chez *Bacillus pumilus* (**Solórzano et al., 2000**).

IV-3 Effet des solvants organiques

Les effets des différents solvants organiques sur l'activité xylanasiqne sont présentés dans la figure n°12, Les solvants ont été sélectionnés sur la base de leur hydrophobicité qui est mesurée par Log P (pour des valeurs qui vont de -0,82 à 4,46) (Tableau XI). Ce dernier est proportionnelle à l'hydrophobicité, il est défini comme étant le coefficient de partage du solvant dans un système à deux phases octanol-eau (**Laane et al., 1987**).

Tableau XI : Classement des solvants organiques selon leur hydrophobicité (du plus au moins hydrophobe).

Solvants organiques	Indice d'hydrophobicité (Log p)
Heptane	4.46
Cyclohexane	3.44
Toluène	2.69

Chloroforme	2.00
Propanol	0.25
Acétone	-0.24
Ethanol	-0.32
Méthanol	-0.82

La figure suivante représente l'activité xylanasique de la souche SJ4 testé avec différents solvants.

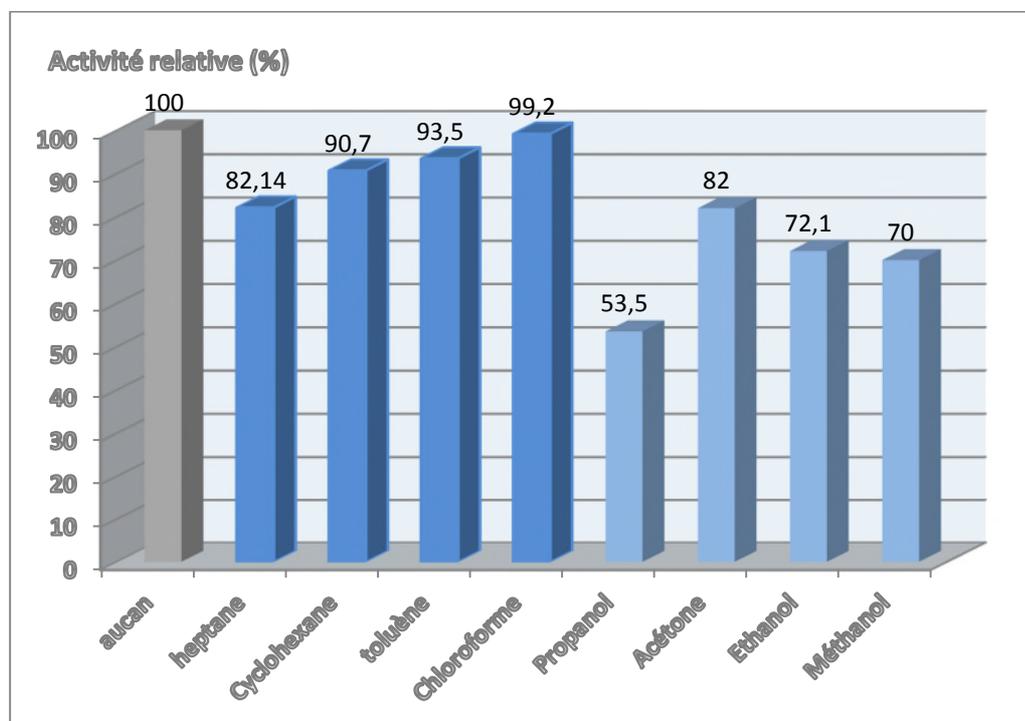


Figure 13 : Effet des solvants sur l'activité xylanasique de la souche SJ4.

Le propanol inhibe la ou les xylanases provoquant une diminution de l'activité de 46 %, le même résultat a été rapporté chez les xylanases d'*Aspergillus awamori* VTCC-F312 (Thiet *al.*, 2012).

Une stabilité presque maximale (99,2) a été observée en présence du chloroforme suivie du toluène (93,5). Le même résultat pour le chloroforme a été rapporté en utilisant les xylanases de la bactérie halophile CL8 (Wejse, 2003).

La toxicité d'un solvant organique est en corrélation négative avec le paramètre log P (Aono, 1991). Un solvant avec une valeur log p élevé (solvants hydrophobes) inactive moins l'enzyme que les solvants ayant un faible Log P (Laane et al., 1987) parce que ces derniers ont une plus grande tendance à dénuder l'eau liée (ce qui est essentiel pour l'activité catalytique) aux molécules d'enzymes. Ceci explique les résultats obtenus dans le tableau VIII où les solvants hydrophobes : heptane, Cyclohexane, toluène et Chloroforme ont donné une meilleure activité que les solvants hydrophiles Propanol, Acétone, Ethanol et Méthanol.

IV-4 Effets de la concentration du substrat sur l'activité xylanasiq

Les effets des différentes concentrations de substrat sur l'activité sont présentés dans la figure 13, la meilleure activité est obtenue à 0,4 %.

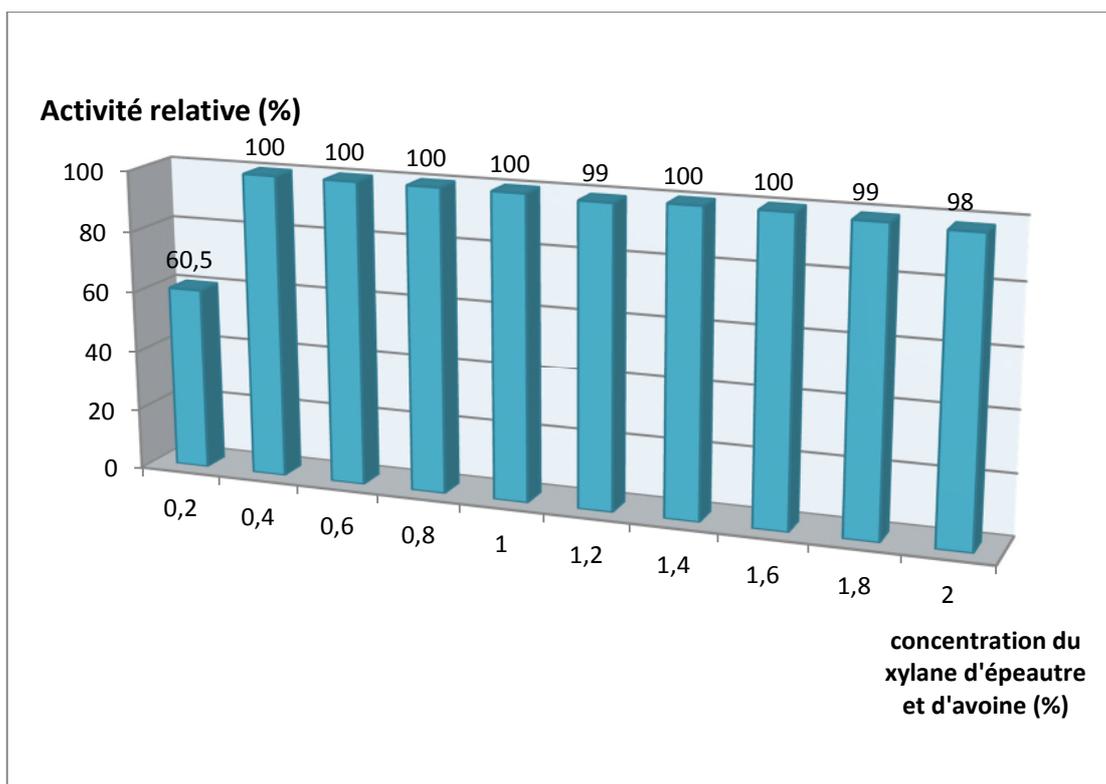


Figure 14 : Effet de la concentration du substrat sur l'activité xylanasiq.

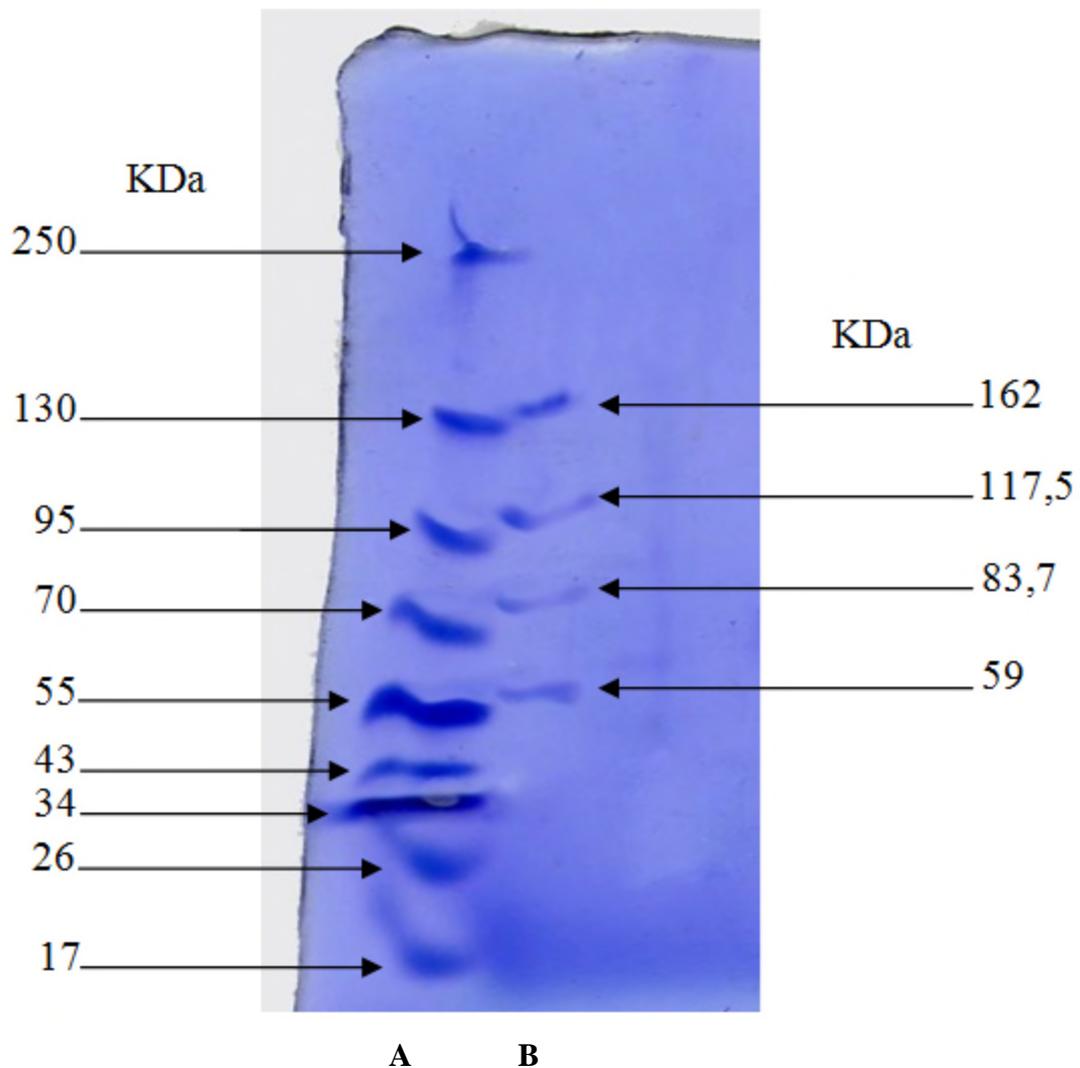
Dans le présent travail, la concentration du xylane d'épeautre et d'avoine était de 1%, cette concentration a été choisie selon la littérature scientifique. Les résultats de la figure 13 montre qu'on peut travailler avec une concentration de 0,4% ce qui nous

permettrait d'économiser le xylane, d'autre part, on conclut que cette concentration est bien la concentration saturante de l'enzyme.

V- Electrophorèse (SDS -PAGE) et zymogramme

Selon le profil de migration des protéines sur SDS-PAGE (**Fig.14**) qui montre la présence de quatre bandes protéiques dans le surnageant de culture. La courbe d'étalonnage (**Annexe VI**) révèle des protéines ayant des poids moléculaires de : 162 ; 117,5 ; 83,7 et 59 KDa.

Le profil du zymogramme était négatif vu que le gel a été mis par erreur dans la solution de coloration au bleu de Coomassie donc on ne peut pas révéler sur gel la présence de xylanases.



A: PM des marqueurs de taille, B: PM des 4 bandes protéiques obtenues.

Figure 15: Profil de migration des protéines sur SDS-PAGE.

Plusieurs microorganismes produisent de multiples isoenzymes qui diffèrent selon leurs propriétés physicochimiques, structurales, activité spécifique, rendement de production et de spécificités. La multiplicité peut être expliquée par la régulation, la spécificité aux substrats et les modifications post- traductionnelles de ces enzymes. Cette multiplicité des xylanases a été observée chez plusieurs microorganismes. **Shah et Madamwar (2005)** ont révélé chez *Aspergillus niger* et *Aspergillus foetidus* respectivement 15 et 3 xylanases. **Gawande et Kamat (1999)** ont rapporté également l'existence de 3 et 2 formes de xylanases chez deux souches d'*Aspergillus* sp.

Selon les travaux de Boucherba et collaborateur en 2014, la souche *Jonesia denitrificans* produit six xylanases possédant des poids moléculaires de : 250 ; 150 ; 70 ; 42 ; 40 et 26 KDa alors que dans le présent travail c'est 4 xylanases (si zymogramme positif) ayant des poids moléculaires de : 162 ; 117,5 ; 83,7 et 59 KDa.

Conclusion
Conclusion

Conclusion & perspectives

Dix souches ont été isolées sur milieu minimum à base de xylane, par la suite, une souche nommée SJ4 a été sélectionnée dans un milieu liquide, car elle présentait la meilleure activité xylanasiqque.

La mesure de l'activité xylanasiqque sécrétée dans un milieu de culture liquide a révélé une production de xylanase de 22,24 U/ml après 48heures d'incubation. L'affinité vis à vis du substrat a révélé que la meilleure production de xylanase est obtenue avec le xylane de bouleau comme seule source de carbone. L'étude de l'effet de la concentration du substrat a montré que la concentration saturante du substrat est de 0,4 % ce qui nous permettrait d'économiser le xylane épeautre.

L'étude de l'effet des ions métalliques montre qu'aucun ion testé ne stimule l'activité mais aussi, aucun ne provoque une inhibition importante ce qui implique que les xylanases résistent bien aux ions métalliques. Concernant l'effet des réactifs chimiques, Les xylanases de SJ4 semblent résister au SDS alors qu'une inactivation totale a été rapportée chez la plupart des xylanases.

L'étude de l'effet des solvants organiques montre que les xylanases restent plus au moins stable dans tous les solvants sauf pour le propanol qui inhibe ces xylanases en provoquant une diminution de l'activité de 46 %. La résistance des xylanases de la souche SJ4 aux solvants organiques peut intéresser les industries papetières ou les solvants sont très utilisés pour la dissolution des copeaux de bois.

Les résultats du SDS-PAGE ont révélé la présence de quatre protéines ayant des poids moléculaires de : 162 ; 117,5 ; 83,7 ; 59 KDa.

En perspective, on peut envisager les investigations suivantes :

- Le séquençage de l'ARN 16s a été entamé au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université Aix Marseille.
- La détermination des conditions optimales de culture et de production de xylanases, à savoir la composition du milieu de culture, le pH, la température et le temps

d'incubation, pour rendre possible une production élevée et peu coûteuse de ces enzymes.

- Une mise en culture de l'isolat dans un fermenteur de 1,5L et éventuellement dans un fermenteur pilote.
- Refaire le zymogramme et faire une focalisation isoélectrique afin de déterminer le point isoélectrique.
- Purifier et caractériser toutes les isoenzymes produites par la souche SJ4.

Références bibliographiques

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΩΝ

Références bibliographiques

A

- ❖ Aman P. (1993). Composition and structure of cell wall polysaccharides in forages. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD and Ralph J (Ed). p 183.
- ❖ Amann RI, Ludwig W et Schleifer KJ. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microb. Rev.* **59**, 143-169.
- ❖ Aono RK, Aibe AI et Horikoshi K. (1991). Preparation of organic solvent-tolerant mutants from *Escherichia coli* K-12. *Agric. Biol Chem.* **55**, 1935–1938.

B

- ❖ Bailey MJ, Biely P et Poutanen K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* **23**, 257-270.
- ❖ Barnard D, Casanueva A, Tuffin M et Cowan D. (2010). Extremophiles in biofuel synthesis. *Environ. Technol.* **31**, 871–888.
- ❖ Bataillon M, Cardinali APN et Duchiron F. (1998). Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus sp.* *Biotechnol Lett.* **20**, 1067-1071.
- ❖ Bataillon M, Nunes Cardinali AP, Castillon N, Duchiron F. (2000). Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus sp* Strain SPS-0. *Enzyme Microb Technol.* **26**, 187-92.
- ❖ Battan B, Sharma J, Dhiman SS, Kuhad RC. (2007). Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme Microb Tech.* **41**, 733-739.
- ❖ Béguin P, Aubert JP. (1994). The biological degradation of cellulose, *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 25-58.
- ❖ Bhat MK. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.* **18**, 355 – 383.
- ❖ Bhosle NB et Giriyan A. (2004). *Pseudomonas stutzeri* strain and process for preparation of xylanase. United State Patent 6833259. [http /www. freepatent sonline. com /6833259. html](http://www.freepatentonline.com/6833259.html).

- ❖ Breccia JD, Sineriz F, Baigori MD, Castro GR et Hatti-Kaul R. (1998). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*, Enzyme Microb Technol. **22**, 42-49.
- ❖ Brillouet J M, Joseleau J P, Utile J P et Lelievre D. (1982). Isolation purification and characterization of a complex heteroxyylan from industrial wheat bran, J. Agr. Food Chem. **30**, 488-495.
- ❖ Boucherba N, Benallaoua S, Copinet E, Hebal H et Duchiron F. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* BN13 isolated in Algerian soil. Process Biochem. **46**, 519- 525.
- ❖ Boucherba N, Gagaoua M, Copinet E, Bettache A, Duchiron F et Benallaoua S. (2014). Purification and Characterization of the Xylanase Produced by *Jonesia denitrificans* BN-13, Appl Biochem Biotechnol. **172**, 2694- 2705

C

- ❖ Carmen TA, Percy Olivera-Gonzales, Gretty KV et MARCEL gutierrez-Correa. (2014). Isolation and identification of cellulolytic and xylanolytic bacteria from Huancarhuaz Hot spring, peru. **19**, 2920-2930.
- ❖ Chaudhary P et Deobagkar D. (1997). Purification and characterization of xylanase from *Cellulomonas* sp. N.C.I.M. 2353. Biotechnol Appl Biochem. **25**, 127-133.
- ❖ Collins T, Gerday C et Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol Rev. **29**, 3-23.
- ❖ Collins T, Meuwis MA, Stals I, Claeysens M, Feller G et Gerday C. (2002). A novel Family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. J. Biol. Chem. **277**, 35133-35139.
- ❖ Coughlan M P. (1993).Enzymatic - Hydrolysis of hemicellulose — an Overview. Bioresour Technol. **39**,107 – 115.
- ❖ Courtin CM, Broekaert WF, Swennen K, Lescroart O, Onagbesan O, Buyse J, Decuyper E, Van de Wiele T, Marzorati M, Verstraete W, Huyghebaert G , et Delcour JA. (2008). Dietary Inclusion of Wheat Bran Arabinoxyloligosaccharides Induces Beneficial Nutritional Effects in Chickens. Cereal Chem. **85**, (5), 607-613.

D

- ❖ Dhillon A, Gupta JK, Jauhari BM et Khanna S A. (2000) cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Biores Technol.* **73**, 273.
- ❖ Dhiman SS, Sharma J et Battan B. (2008). Industrial applications and future prospectsof microbial xylanases: A review. *BioResources.* **3** (4), 1377-1402. from Bacillus sp YJ6. *Journal of agricultural and food chemistry* 2010. **58**, 557-562.

F

- ❖ Fujimoto H, Ooi T, Wang SL, Takizawa T, Hidaka H, et Murao S. (1995). Purification and properties of three xylanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biosci Biotech Biochem.* **59**, 53-40.

G

- ❖ Gallardo O, Diaz P, Pastor FI. (2004). Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: comparaison with alkaline pi-low molecular weight xylanases of family 11. *Current Microbiology.* **48**, 276-279.
- ❖ Gaurav Sanghvi, Mehul Jivrajani, Nirav Patel, Heta Jivrajani, Govinal Badiger Bhaskara et Shivani Patel. (2014). Purification and Characterization of Haloalkaline; ID198251, p 10.
- ❖ Gawande P et Kamat MY. (1999). Purification of *Aspergillus* sp. Xylanase by precipitation with an anionic polymer Eudrajit S100. *Process Biochem.* **34**, 577-580.
- ❖ Georis J, de Lemos Esteves F, Lamotte-Brasseur J, Bougnet V, Devreese B, Giannotta F, Granier B, et Frere J M. (2000). An additional aromatic interaction improves the thermostability and thermophilicity of a mesophilic family 11 xylanase: structural basis and molecular study, *Prot. Sci.* **9**, 466-475.
- ❖ Gessesse A, Mamo G. (1998). Purification and characterization of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus* sp. AR-135. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **20**, 210- 214.
- ❖ Gessesse A et Gashe BA. (1997). Production of alkali xylanase by an alkaliphilic *bacillus* sp. Isolated from an alkaline soda lake . *J Appl Microbiol*, **83**. 402-406.
- ❖ Gray KA, Zhao L et Emptage M. (2006). *Bioethanol. Curr Opin Cham Biol.* **10**, 141-146.

- ❖ Gruppen H, Hamer R J et Voragen A G J. (1992). Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 2. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans, *J. Cereal Sci.* **16**, 53-67.
- ❖ Gupta S, Bhushan B et Hoondai GS. (2000). Isolation, purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp. SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp. *J Appl Microbiol.* **88**, 325-334.

H

- ❖ Halgasova Nora, Kutejova Eva et Timko Jozef. (1994). Purification and some characteristics of the acetylxylan esterase from *Schizophyllum commune*. *Biochem J.* **298**, 751-755.
- ❖ Henrissat BA. (1991).classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarity. *Biochem. J.* **280**, 309-316.
- ❖ Henrissat B et Barioch. A. (1993). Newfamilies in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarity. *Biochem. J.* **293**,781-788.
- ❖ Henrissat. B et Barioch. A. (1996).Updating of the classification of glycosyl hydrolases.*Biochem. J.* **316**,695-696.

I

- ❖ Inagaki K, Nakahira K, Mukai K, Tamura T et Tanaka H. (1998). Gene cloning and characterization of an acidic xylanase from *Acidobacterium capsulatum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **62**,1061-1067.
- ❖ Ishihara M, Tawata S et Toyama S. (1997). Purification and some properties of a thermostable xylanase from *thermophilic fungus* strain HG-1. *J Ferment Bioeng.* **83**, 478-480.

J

- ❖ Joseleau JP, Comtat J et Ruel K. (1992). Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls, in: *Xylans and Xylanases* (édité par Visser J., Beldman G., A. K.-v. S. M., Voragen A. G. J.), Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, The Netherlands. pp. 1-15.
- ❖ Johnvesly B et Naik. (2001). Studies on production of thermostable protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus sp* JB-99 in a chemical defined media. *Process Biochem.* **37**, 139-144.

K

- ❖ Khandepakar RDS et Bhosle NB. (2006). Purification and characterization of thermo alkalophilic xylanase isolated from the *Entrobacter* sp. MTCC 5112. *Research Microbiol.* **157**, 315-325.
- ❖ Khasin A, Alchanati I, Shoham Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl Environ Microbiol.* **59**, 1725-1730.
- ❖ Kiddinamoorthy Jeyagowri, Anceno Alfredo, Haki Gulelat D, Rakshit Sudip K. (2008). Production, purification and characterization of *Bacillus* sp.GRE7 xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulp biobleaching. *World J Microbiol Biotechnol.* **24**, 605-612
- ❖ Kirk K. et Cullen D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi, in: *Environment friendly technologies for pulp and paper industry* (édité par Young R. A. et Akhtar M.), Wiley, New-York, USA, 273-307.
- ❖ Kormelink F J M et Voragen A G J. (1993). Degradation of different glucurono-arabinoxylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 688-695.

L

- ❖ Laane C, Boeren S, Vos K et Veeger C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng.* **30**, 81-7.
- ❖ Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A et Nicolaus B. (2004). Purification and characterization of thermostable xylanase and B-xylosidase by *Bacillus thermantarctius*. *Research microbiol.* **155**, 283-289.
- ❖ Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- ❖ Liu WH, Zhu W, Lu Y, Kong J et Ma G. (1998). Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochem.* **54**, 63-71.

M

- ❖ Mc Neil M, Darvill AG, Fry SC. et Albersheim P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants, *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 625-663.
- ❖ Mirande C. (2009). Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT et *Roseburia intestinalis* XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain. Thèse de Doctorat d'Ecologie. Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand, Faculté des Sciences de la Vie et de la Santé, 516P.

N

- ❖ Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, Aono R et Horikoshi K. (1993). Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain 41M-1. *Appl Environ Microbiol.* **59**, 2311-2316.

P

- ❖ Paes G, Skov L K, O'Donohue M J, Rémond C, Kastrup J S, Gajhede M et Mirza O. (2008). The Structure of the Complex between a Branched Pentasaccharide and *Thermobacillus xylanilyticus* GH-51 Arabinofuranosidase Reveals Xylan-Binding Determinants and Induced Fit. *Biochemistry.* **47**, (28), 7441-7451.
- ❖ Patra, AK, Madhu A. (2010). Studies on enzymatic pretreatment of linen. *Indian J. Fibre Text.* **35**, 337–341 P. L. Wejse, K. Ingvorsen, and K. K. Mortensen, “Purification and characterisation of two extremely halotolerant xylanases, from a novel halophilic bacterium,” *Extremophiles*, vol. **7**, no 5, pp.423–431.
- ❖ Prade RA. (1995). Xylanases: from biology to biotechnology, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13**, 101-131.
- ❖ Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **67**, (5): 577–59.

R

- ❖ Raven P H, Evert RF et Echnorn SE. (2007). In *Biologie végétale*, 7ème ed: Ed Boeck, D. 56p.

Q

- ❖ Quiroz-Castañeda Rosa Estela and Folch-Mallol Jorge Luis. (2013). Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars, In: Saulnier L, Marot C,

Chanliaud E, et Thibault JF. (Eds.), Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydr Polym.* **26**, 279-287.

S

- ❖ Saulnier L, Marot C, Chanliaud E, et Thibault J. (1995). Cell wall polysaccharide interactions in maize bran, *Carbohydr. Polym.* **26**, 279-287.
- ❖ Shah AR et Madamwar D.(2005). Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem.* **40**, 176-371.
- ❖ Shallom D et Shoham Y. (2003). Microbial hemicellulases, *Curr. Opin. Microbio.* **6**, 219-228.
- ❖ Shao W, DeBlois S et Wiegel JA. (1995).high molecular weight, cell-associated xylanase isolated from exponentially growing *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SLYS485. *Appl Environ Microbiol.* **61**,937-940.
- ❖ Shibuya N et Iwasaki T. (1985). Structural features of rice bran hemicellulose, *Phytochem.* **24**, 285-289.
- ❖ Shleser R. (1994). Ethanol production in Hawaii: processes, feedstocks, and current economic feasibility of fuel grade ethanol production in Hawaii. Final Report. **43** (2), 209-218.
- ❖ Sun RC, Lawther JM et Banks WB. (1996). Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. *Carbohydr Polym.* **29**, 325-331
- ❖ Solórzano J LL, Elba PS Bon, Maria de Fátima Ebole Santana, Nei Pereira Junior. (2000). thermal stability of xylanases produced by *aspergillus awamori*. *Braz J Microbiol.* **31**, no.3.

T

- ❖ Tchunden J. (1990). Cellulolyse Anaérobie Mésophile: Etude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. Cellulolyticum* ATCC35319. Thèse de Doctorat de biochimie appliqué. Université de Nancy. Faculté des sciences et technologies, Nancy, 09 P.

- ❖ Techapun C, Charoenrat T, Poosaran N, Watanabe M, Sasaki K. (2002). Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces sp.* Ab106. *J Biosci Bioeng.* **93**, 431–433.
- ❖ Techapun C, Poosaran N, Watanabe M et Sasaki K. (2003). Thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase produced from agricultural wastes and the priorities required for use in pulp bleaching bioprocesses. *Process Biochem.* **38**, 1327-1340.
- ❖ Thi Tuyen Do et Dinh Thi Quyen. (2012). Thi Hong Dam Purification and characterization of an acid-stable and organic solvent-tolerant xylanase from *Aspergillus awamori* VTCC-F312, *ScienceAsia.* **38**, 157-165.
- ❖ Thiebaud S. (1995). Valorisation chimique de composés lignocellulosique : obtention de nouveaux matériaux. Thèse de doctorat de science des agro-ressources. Institut national polytechnique de Toulouse, faculté des sciences et techniques, Toulouse, 194P.
- ❖ Thompson DN, Thompson VS, Schaller KD, Apel WA, Reed DW, Lacey JA. (2009). Thermal and acid tolerant β xylosidases, genes encoding, related organisms and methods. US Patent 0226978.

V

- ❖ Viet DN, Kamio Y, Abe N, Kaneko J et Izaki K. (1990). Purification and Properties of β -1,4- Xylanase from *Aeromonas caviae* W-61. *Appl Environ Microbiol.* **57**, 445–449.

W

- ❖ Wang SL, Yen YH, Shin IL, Chang AC, Chang WT et Wu WC. (2003). Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb Technol.* **33**, 917–925.
- ❖ Wejse PL. (2003). Purification and characterization of endo- β -1, 4-D-xylanase from a novel *halophilic bacterium*. Thesis PhD of Molecular Biology and Genetics. Aarhus University, Faculty of science, Aarhus, 187p.
- ❖ Winterhalter C et Liebel W. (1995). Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol.* **61**, 1810-1815.

X

- ❖ Xu ZH, Xu YLBX, Shi JS et Tao WY. (2005). Production of alkali-tolerant cellulase-free xylanase by *Pseudomonas sp.* WLUN024 with wheat bran as the main substrate. *World j. Microbial. Biotch.* **21**, 575-581.

Y

- ❖ Yin L J, Lin HH, Chiang YI and Jiang ST. (2010). Bioproperties and purification of xylanase from *Bacillus sp.* YJ6. *Journal of agricultural and food chemistry.* **58**, 557-562.

Annexes

Annexes I

Matériel utilisé :

- .Balance (Scouttmpro) (Ae ADAM AFA-120LC)
- .Bain Marie (raypa)
- .Bain Marie (julabotw 12)
- .Centrifugeuse (Sigma 2-16K)
- .Dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, Bio Rad)
- .pH-mètre (Boeco)
- .Spectrophotomètre (UVmini1240 SHIMADZU)
- .Un bain Marie agitateur (KIKA LABORTECHNIK HS-B20digital)

Produits utilisés :

- Xylane de bouleau (birchwood xylan) (SIGMA)
- Xylane d'épeautre et d'avoine (oat spel txylan) (SIGMA)
- Bleu de Coomassie G250 (Fluka)
- Bleu de Coomassie R250 (Fluka)
- Rouge de Congo (SIGMA)
- Marqueurs protéiques (Thermoscientific)

Annexes II :**I- Milieux de cultures :**

Gélose nutritive (GN) :

- ✓ Extrait de levure.....2 g.
- ✓ Extrait de viande.....1 g.
- ✓ Peptone.....5 g.
- ✓ NaCl.....5 g.
- ✓ Agar.....14 g.
- ✓ Eau distillée qsp 1000 ml.

Bouillon nutritif :

- ✓ Extrait de levure.....2 g.
- ✓ Extrait de viande.....1 g.
- ✓ Peptone.....5 g.
- ✓ NaCl.....5 g.
- ✓ Eau distillée..... qsp 1000 ml.

Milieu MM7 liquide

- ✓ Xylane de bouleau.....7g
- ✓ Extrait de levure.....2g
- ✓ NaCl.....2,5g
- ✓ NH₄C15g
- ✓ MgSO₄/7H₂O.....0,25g
- ✓ Na₂HPO₄.....30g
- ✓ KH₂PO₄.....15g
- ✓ Eau distilléeqsp 1L

Milieu MM7 solide

- ✓ Xylane de bouleau.....7g
- ✓ Extrait de levure.....2g
- ✓ NaCl.....2,5g

✓ NH ₄ C.....	15g
✓ KH ₂ PO ₄	15g
✓ Na ₂ HPO ₄	30g
✓ MgSO ₄ /7H ₂ O.....	0,25g
✓ Agar.....	15g
✓ Eau distillée.....	qsp1L

Annexes III:**Préparation des solutions et des tampons :**

-Les solutions :

Solution à base d'acide dinitrosalicylique (DNS)

- ✓ Acide dinitrosalicylique.....10g
- ✓ Soude.....16g
- ✓ Tartrate de potassium sodique.....300g
- ✓ Eau distillée.....qsp 1l

La solution est préparée dans l'obscurité puis filtrée et conservée dans un flacon couvert d'aluminium.

Solution de NaCl à 1M :

- ✓ NaCl.....58,44 g.
- ✓ Eau distillée.....1000 ml.

Solution de rouge de Congo à 0,1 % :

- ✓ Rouge de Congo.....1 g.
- ✓ Eau distillée.....1000 ml.

- Les tampons :

Tampon phosphate sodique 50 mM à pH 7 (1000 ml) :

- ✓ (A) Na_2HPO_4500 ml.
- ✓ (B) NaH_2PO_4500 ml.
- ✓ (A) + (B).....jusqu'à pH 6 ; 7 ; 8.

Tampon acétate :

Tampon acétate à pH 4 (50 ml) :

- ✓ Solution d'acide acétique à 0,2 M.....41 ml.
- ✓ Solution d'acétate de sodium à 0,2 M.....9 ml.

Tampon acétate à pH 5 (50 ml) :

- ✓ Solution d'acide acétique à 0,2 M.....14,8 ml.
- ✓ Solution d'acétate de sodium à 0,2 M.....35,2 ml.

Tampon tris-HCl à 50 mM :

Tampon tris-HCl à 50 mM à pH 9 (10 ml) :

- ✓ Solution tris-HCl à 50 mM.....10 ml.
- ✓ HCl.....quelques gouttes.

Tampon tris-HCl à 50 mM à pH 10 (10 ml) :

- ✓ Solution tris-HCl à 50 mM.....10 ml.
- ✓ HCl.....quelques gouttes.

Tampon de séparation

- ✓ Tris.....18,15g.
- ✓ SDS.....400mg.
- ✓ Eau distillée.....100ml.

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré

Tampon de concentration

- ✓ Tris.....12,11g.
- ✓ SDS (Sigma).....0,8mg.
- ✓ Eau distillée.....200ml.

Ajuster le pH à 6,8

Tampon de migration (X10)

- ✓ Tris.....30,3g.
- ✓ Glycine.....144g.
- ✓ SDS (Sigma).....10g.
- ✓ Eau distillée.....qsp 1L.

Ajuster le pH à 8,3

Le tampon de migration est réalisé par dilution 10 fois de cette solution.

Tampon échantillon (X4)

- ✓ Tris0,303g.
- ✓ SDS (Sigma).....0,8g.
- ✓ Eau distillée.....4ml.

Ajuster le pH à 6,75 avec du HCl concentré

- ✓ Glycérol.....4ml.
- ✓ β -mercaptoéthanol à 14,3M2ml.
- ✓ Bleu de bromophénol..... 0,1 mg.

(Aliquote de 1ml à -20°C)

Solution de coloration

- ✓ Bleu de Coomassie R250 (sigma).....0,5g.
- ✓ Méthanol225ml.
- ✓ Acide acétique.....50ml.
- ✓ Eau distillée.....qsp 500ml.

Le colorant est solubilisé dans le mélange méthanol/eau puis l'acide acétique est ajouté. La solution obtenue est filtrée sur filtre papier (prolabo).

Solution de décoloration

- ✓ Méthanol.....125ml.
- ✓ Acide acétique.....50ml.
- ✓ Eau distillée.....qsp 500ml.

Changement de bain deux à trois fois 8,3.

Annexes IV :**II-Préparation des gels :**

a- gel de séparation :

- ✓ Acrylamide/Bis.....7,5ml
- ✓ Tampon tris-HCl.....15,6ml
- ✓ Xylane.....800µl
- ✓ Eau distillée.....37,5ml
- ✓ TEMED.....60µl
- ✓ Persulfate d'ammonium.....210µl

b- gel de concentration :

- ✓ Acrylamide/Bis.....7,5ml
- ✓ Tampon tris-HCl.....7,5ml
- ✓ Eau distillée30ml
- ✓ TEMED.....30µl
- ✓ Persulfate d'ammonium a 10%.....300µl

Annexes V :

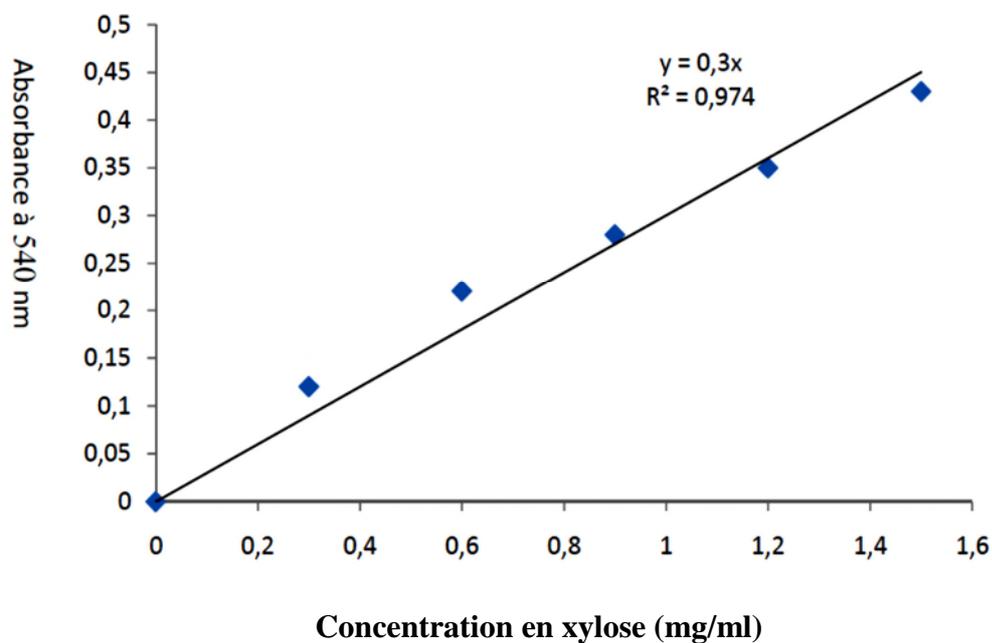


Figure 01 : Droite d'étalonnage pour le dosage du xylose

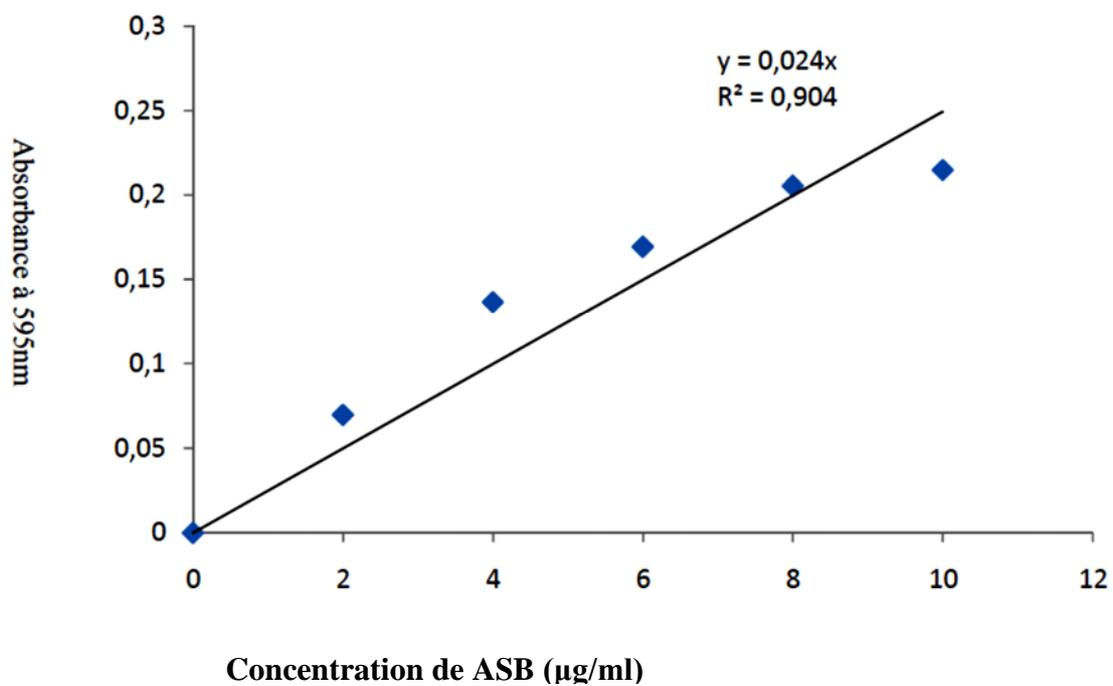


Figure 02 : Droite de Dosage des protéines par la microméthode.

Annexes VI :

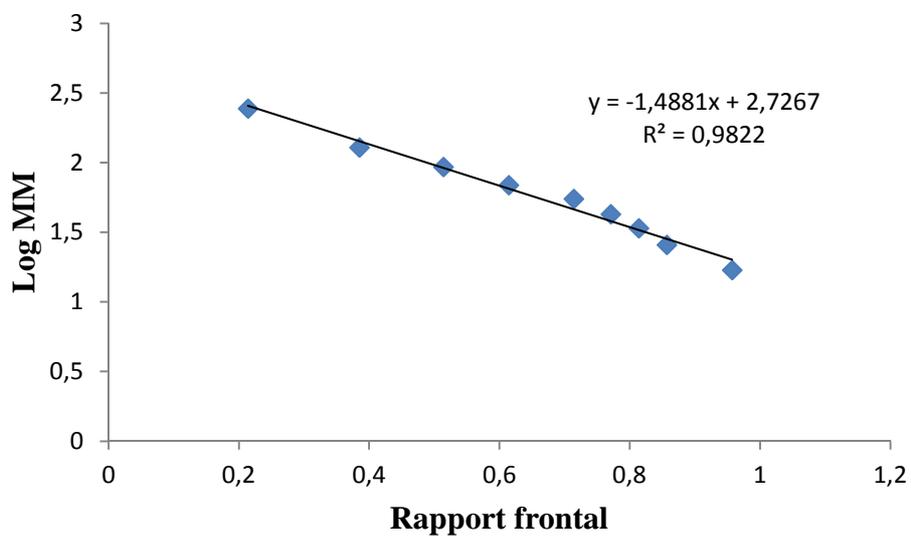


Figure n°03 : Droite d'étalonnage des marqueurs pour SDS-PAGE

Résumé

Dix souches xylanolytiques ont été isolées et sélectionnées sur milieu solide MM7 à base de xylane, à partir du sol de jardin et d'une source thermale, une deuxième sélection sur milieu liquide basée sur la mesure de l'activité xylanase dans le surnageant de culture liquides a abouti à la sélection de la souche la plus productrice, nommée SJ4, qui a fait l'objet d'une caractérisation des xylanases dans le surnageant de culture : affinité vis-à-vis du substrat, effet des ions métalliques, des réactifs chimiques et des solvants organiques ont été testés et enfin une détermination des poids moléculaires Par SDS-PAGE.

La meilleure activité est obtenue avec le xylane de bouleau et une faible activité est obtenue pour la CMC ce qui révèle l'existence d'une ou plusieurs xylanase bifonctionnelles. Les xylanases sont résistantes aux ions métalliques et aux réactifs chimiques testés.

Les xylanases sont plus au moins stables dans les solvants organiques testés sauf pour le propanol où une diminution de 46,5 % a été observée, la stabilité des xylanases est plus importante dans les solvants hydrophobes ou une stabilité maximale est observée avec le chloroforme (99,2 %).

Le profil de migration a révélé l'existence de quatre bandes protéiques dans le surnageant de culture, d'un poids moléculaire de : 162 ; 117,5 ; 83,7 et 59 kDa.

Mots clé : isolement, sélection, MM7, solvants organiques, ions métalliques, réactifs chimiques, SDS-PAGE.

Abstract

Ten xylanolytic strains were isolated and selected on MM7 solid medium containing xylan, from the ground garden and a hot spring, a second selection on liquid medium based on the measurement of xylanase activity in the supernatant liquid culture has resulted in the selection of the most productive strain, named SJ4, which has been a characterization of xylanases in the culture supernatant: affinity for the substrate, the effect of metal ions, reagent chemicals and organic solvents were tested and finally a determination of molecular weight by SDS-PAGE was done.

The best activity is obtained with birch wood xylan, and low activity is obtained for the CMC which reveals the existence of one or more bifunctional xylanase. Xylanases are resistant to metal ions and the tested chemical reagents.

Xylanases are, at least, stable in all organic solvents tested except for propanol where a reduction of 46.5% was observed, the stability of the xylanase is higher in hydrophobic solvents or maximum stability is observed with chloroform (99.2%).

Migration profiles showed the existence of protein bands shifts in the culture supernatant, a molecular weight: 162; 117,5; 83,7 and 59 kDa.

Keywords : isolation, selection, MM7, organic solvents, metal ions, chemical reagent, SDS-PAGE.