

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche
Scientifique

Université Abderrahmane Mira – Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques de l'Environnement

Mémoire de Fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Option : Environnement et sécurité alimentaire

Thème

Isolement et caractérisation de champignons cellulolytiques des sols de Béjaïa

Membres du jury

Président : Mr Sidi H.

Promoteur : Mr Ramdani N.

Examineurs : Mr Boulila A/G.

Mr Hamlat M.

Réalisé par :

Melle : HOCINI Aïda

Melle : MEZIANI Wassila

Promotion : 2013



Remerciements

Louange tout d'abord à Dieu, notre créateur qui nous a donné la force pour terminer ce modeste travail.

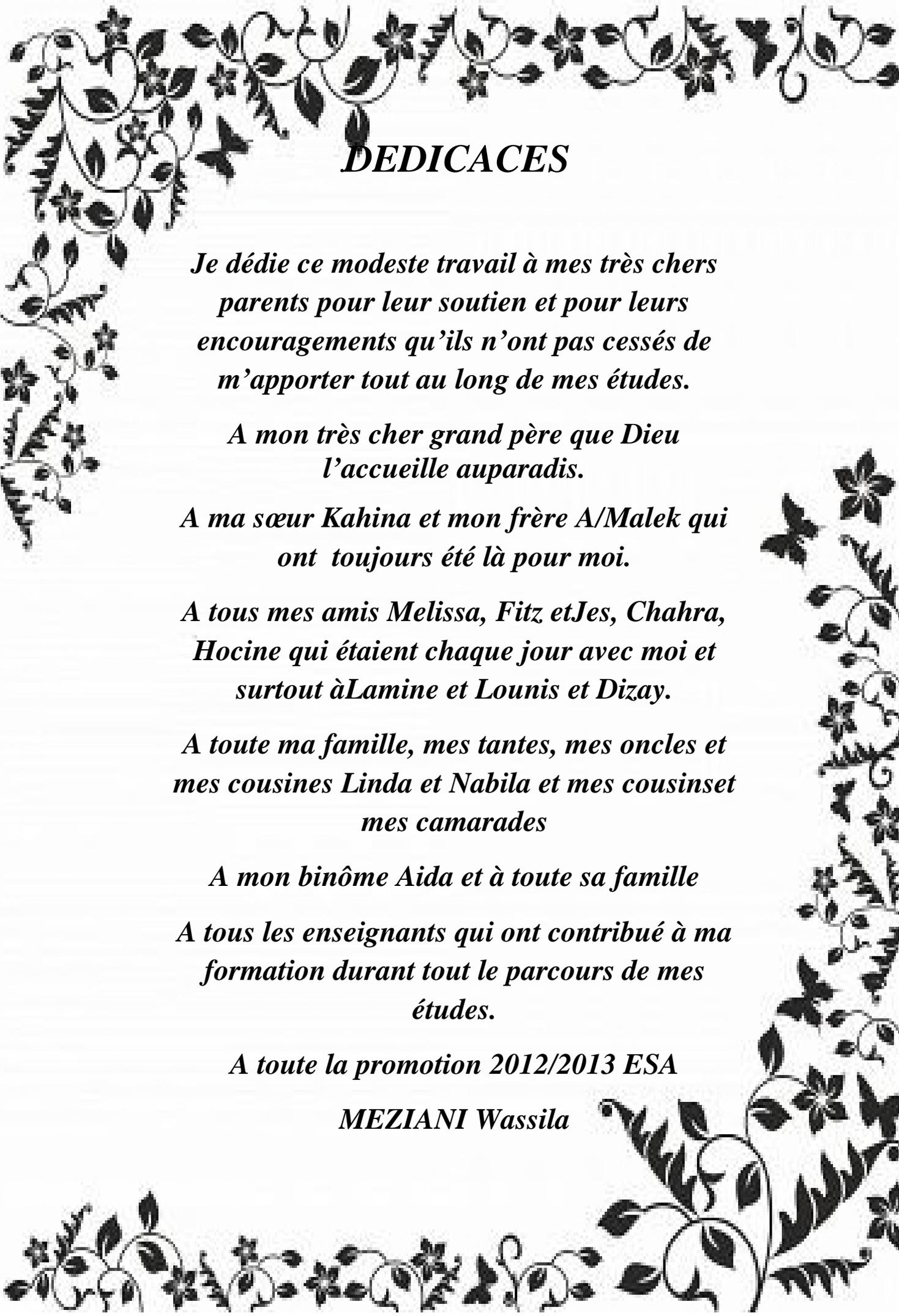
Toutes nos infinies gratitudees à notre promoteur, Monsieur RAMDANI.N, Maître-assistant à l'Université de Béjaïa, pour son encadrement, sa qualité humaine, sa patience et son dynamisme et de nous avoir guidé et conseillé pour mener à bien ce travail.

Nous remercions aussi les membres de jury qui nous ont fait l'honneur d'accepter le jugement de notre travail.

Notre sincère reconnaissance à nos enseignants du Département des Sciences Biologiques et de l'Environnement.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ici l'expression de notre profonde gratitude et respect.

Aida, Wassila



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents pour leur soutien et pour leurs encouragements qu'ils n'ont pas cessés de m'apporter tout au long de mes études.

A mon très cher grand père que Dieu l'accueille auparadis.

A ma sœur Kahina et mon frère A/Malek qui ont toujours été là pour moi.

A tous mes amis Melissa, Fitz et Jes, Chahra, Hocine qui étaient chaque jour avec moi et surtout à Lamine et Lounis et Dizay.

A toute ma famille, mes tantes, mes oncles et mes cousines Linda et Nabila et mes cousins et mes camarades

A mon binôme Aida et à toute sa famille

A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation durant tout le parcours de mes études.

A toute la promotion 2012/2013 ESA

MEZIANI Wassila



DEDICACES

Au nom de Dieu Tout Puissant, je dédie ce travail

*A ma chère mère, à mon cher père, les deux
personnes qui se sont beaucoup sacrifiées pour
moi, m'ont aidée et soutenue, sans eux je
n'aurais eu la volonté d'atteindre ce niveau*

*A mes deux chers frères Sofiane et Adel qui ont
toujours été là pour moi*

A mon fiancé Sid-Ali qui m'a toujours soutenu

A toute ma famille

*A toutes mes copines, camarades, cousines,
cousins et collègues*

A mon binôme Wassila et toute sa famille

*A tous les enseignants et les éducateurs qui ont
contribué à ma formation durant tout le parcours
de mes études jusqu'à ce jour ;*

*A toute la promotion de 2012 /2013
Environnement et Sécurité Alimentaire*

HOCINI Aida



SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
--------------------	----

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Partie I : La cellulose

I.1. Définition	03
I.2. Source et localisation de la cellulose	03
I.3. Structure moléculaire de la cellulose	03
I.4. Structure supramoléculaire de la cellulose	04
I.5. Propriétés de la cellulose	05
I.5.1. Solubilité	05
I.5.2. Substitution de la cellulose et solubilité	06
I.6. Dégradation biologique de la cellulose	06
I.7. Le papier	07
I.7.1. Généralités	07
I.7.2. Différents types de pâtes	07
I.7.2.1. Pâtes mécaniques	08
I.7.2.2. Pâtes chimiques	08
I.7.2.3. Pâtes mi- chimiques	08
I.7.3. Dégradation du papier	08
I.7.3.1. Les causes de vieillissement naturel du papier	08
I.7.3.2. Les facteurs de dégradation du papier	09

- La température et l'humidité-----	09
- La lumière-----	09
- Les micro-organismes-----	09
- Les insectes-----	10
- La pollution-----	10

Partie II : La Cellulase

II.1. Généralités-----	11
II.2. Nomenclature-----	11
II.3. Structure de la cellulase-----	11
II.4. Les différentes origines de la cellulase-----	12
II .4.1 Origine animale-----	12
II .4.2 Origine végétale-----	12
II .4.3 Origine microbienne-----	12
II.5. Quelques caractéristiques de la cellulase-----	13
II.5. 1. Réaction et spécificité-----	13
II.5. 2. Substrats naturels-----	13
II.5. 3. Activité enzymatique-----	13
II.5. 4. Poids moléculaire-----	13
II.5. 5. pH optimum-----	13
II.5. 6. Température optimale-----	14
II. 6. Mécanisme d'action de la cellulase-----	14
II. 7. Les enzymes cellulolytiques-----	14

Partie III : Les champignons

III.1. Généralités-----	17
III.2. Caractéristiques générales des champignons-----	17
III.3. Modes de reproduction des champignons-----	18

III.3.1. Reproduction asexuée	18
III.3.2. Reproduction sexuée	18
III.4. Mode de vie des champignons	18
- Le saprophytisme	18
- Le parasitisme	18
- La symbiose	18
III.5. Classification des champignons	19

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

II.1. Matériels	22
II.1.1. Origine et prélèvement des sols	22
II.1.2. Milieux de culture	22
II.1.3. Substrats celluloseux	22
II.2. Méthodes	23
II.2.1. Analyse physico-chimique des sols	23
II.2.1.1. Mesure du pH	23
II.2.1.2. Dosage du calcaire total	23
II.3. Test de biodégradation du papier dans les sols	23
II.4. Dénombrement et isolement des champignons	23
II.4.1. Préparation des suspensions- dilutions	24
II.4.2. Ensemencement	24
II.4.3. Méthode de dénombrement	24
II.4.4. Purification	24
II.4.5. Conservation des souches	25
II.5. Sélection des souches cellulolytiques	27

II.5.1. En milieu solide -----	27
II.5.2. En milieu liquide-----	27
II.6. Identification des champignons cellulolytiques -----	27
II.6.1. Etude Macroscopique -----	27
II.6.2. Etude Microscopique -----	28
II.7. Evaluation de l'activité cellulosique -----	28
II.7.1. Dosage des sucres réducteurs par le DNS -----	29

CHAPITRE III : Résultats et Discussions

III.1. Résultats des analyses du sol -----	30
III.2. Test de biodégradation du papier-----	30
III.3. Isolement et dénombrement des champignons -----	31
III.4. Sélection des souches cellulolytiques -----	32
III.5. Identification des champignons -----	36
III.5.1. Etude macroscopique -----	36
III.5.2. Etude microscopique-----	40
III.6. Evaluation de l'activité cellulolytique des souches-----	44
CONCLUSION-----	47
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	48

ANNEXES

RÉSUMÉ

Liste des figures

Figure 1 : Structure moléculaire de la cellulose (page 4)

Figure 2: structure micro fibrillaire de la cellulose (page 5)

Figure 3 : Procédé de dénombrement et d'isolement des champignons cellulolytiques (page 26)

Figure 4 : droite d'étalonnage de glucose (page 29)

Figure 5: Densité de champignons dans les sols (page 32)

Figure 6 : Les différents cas de figure observés sur le papier filtre Wattman N°1 après 7 jours d'incubation à 28°C.(page 33)

Figure 7 : Les différents cas de figure observés sur milieu solide avec Le réactif iodo-ioduré (solution de lugol) et le réactif rouge Congo (page 35)

Figure 8 : Les caractères macroscopiques de la souche fongiques (OG4a2V) de Oued Ghir (page 36)

Figure 9 : Les caractères macroscopiques de la souche fongiques (OG4a2O) d'Oued Ghir (page 37)

Figure 10: Les caractères macroscopiques de la souche fongiques (OG3b2) d'Oued Ghir (page 38)

Figure 11 : Les caractères macroscopiques de la souche fongiques (BM4a2) d'Oued Ghir (page 39)

Figure 12 : Les caractères microscopiques des souches fongiques (OG4a2V, BM4a2) (page 40)

Figure 13 : Les caractères microscopiques de la souche fongique (OG4a2O) (page 41)

Figure 14: Les caractères microscopiques de la souche fongique (OG₃b2) (page 42)

Figure 15: les activités CMC ase des souches (page 45)

Liste des tableaux

Tableau 1 : les résultats d'analyse du pH et du CaCO₃ (page 30)

Tableau 2 : résultats du test de biodégradation du papier dans le sol (page 31)

Tableau 3 : Observation des tubes pour la dégradation du papier (teste du papier) (page 33)

Tableau 4 : Résultats des activités CMC ases des souches (page 44)

INTRODUCTION

La diminution des ressources combustibles fossiles et des produits chimiques de base ont suscité un vif intérêt pour les ressources carbonées naturelles renouvelables. A ce titre, la cellulose, constituant majeur de la paroi des cellules végétales et polymère organique le plus abondant sur terre, a été au centre des recherches de nature très diverse pour la production d'énergie ou de matières premières nouvelles. Elle est considérée comme une source inépuisable dans un contexte mondial où la demande en produits écologiques et biocompatibles est particulièrement croissante.

La production annuelle mondiale de cellulose est estimée à $1,5 \cdot 10^{12}$ tonne (Berlioz, 2007), parfois transformée en matières tels que le papier. Ce dernier est utilisé à grande échelle dans plusieurs domaines, il est considéré comme un matériau de base servant à écrire, à imprimer, à emballer, il est également utilisé dans la fabrication de composants divers.

Par ailleurs, notre société se trouve actuellement confrontée aux problèmes d'économie d'énergie, de pollution et de prolifération des déchets de tous genres (déchets agricoles, rejets de l'industrie alimentaire, résidus forestiers et de l'industrie du bois, ainsi que les déchets urbains). Tous ces déchets constituent des sources potentielles de cellulose.

La valorisation de la cellulose est d'un intérêt considérable. Sa dégradation conduit à la production des composés chimiques et énergétiques qui jouent un rôle important dans le cycle de carbone et de l'énergie de la biosphère. Elle peut également permettre de répondre aux besoins d'énergie des pays en voie de développement qui n'ont pas les moyens de se procurer les combustibles dont ils ont besoin. D'où une nécessité de la transformer, soit par :

- une hydrolyse chimique du bois conduisant à des sucres fermentescibles ;
- une combustion directe pour la production d'énergie;
- une pyrolyse qui transforme la cellulose en combustibles tels que méthane, hydrogène, mono et dioxyde de carbone et éthylène
- une dégradation biologique (biodégradation ou bioconversion) qui se fait par hydrolyse enzymatique utilisant des cellulases et engendre une grande diversité de composés de faible poids moléculaire (hexoses, pentoses, di et tri-saccharides) ;

La biodégradation de la cellulose est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre. Elle est assurée exclusivement par des microorganismes du sol et plus particulièrement par les champignons qui sécrètent des enzymes hydrolytiques afin d'accéder à leur principale source de nutriments qui se trouve sous la forme de polymères glucidiques tel que la cellulose (Carlile et *al.*, 1997).

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose conduit à des sucres solubles puis, par fermentation, à des produits de métabolisme comme les acides, les alcools et à la production des protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.) utilisées dans l'alimentation animale (Pourquie et Vandecasteele, 1984).

De nombreux champignons sont cellulolytiques. Ils produisent des endoglucanases, des exoglucanases et des β -glucosidases qui seraient des enzymes aux propriétés très particulières (Bèguin, 1990). La biodégradation de la cellulose a lieu aussi en aérobiose (la surface du sol) qu'en anaérobiose (le rumen animal). Ainsi, la cellulose constitue une source d'énergie renouvelable (Zermane 2008).

Le présent travail a pour objectifs d'une part, l'isolement et la caractérisation des souches de champignons capables de dégrader la cellulose, à partir de deux sols de la région de Béjaïa et, d'autre part, d'évaluer leur activité cellulolytique en vue de sélectionner les souches cellulolytiques les plus performantes.

Partie I : La cellulose

I.1. Définition

Selon Marouf et Tremblin (2009) la cellulose est la molécule organique la plus abondamment synthétisée lors de la photosynthèse et la plus renouvelable sur la planète. C'est un polymère naturel qui joue un rôle essentiel dans la structure des plantes et elle représente le constituant majeur des fibres végétales (coton, lin, chanvre, jute, ramie, etc.) et des végétaux utilisés dans l'industrie du papier. Dans le bois, principale matière papetière, la cellulose représente 40 à 49% de la matière sèche chez les résineux ou conifères (pin, sapin, épicéa) et 30 à 40% chez les feuillus (peuplier, hêtre, charme). En effet, un arbre produit environ 10g de cellulose par jour

I.2. Source et localisation de la cellulose

Selon Marouf et Tremblin (2009) La cellulose est synthétisée dans le cytoplasme des cellules végétales, au niveau de la membrane cellulosique où elle est associée à des polymères de lignine. Elle se dépose à l'extérieur de la membrane plasmique pour former les parois cellulaires. Cet ensemble forme une structure compacte, quasiment imperméable et participe au soutien et à la rigidité des tissus.

La paroi cellulosique est formée de deux structures différentes :

- La lamelle mitoyenne qui constitue la paroi primaire et renferme près de 70% de lignine ;
- La paroi secondaire qui est constituée par 3 lamelles (S1 à S3). C'est la paroi la plus importante, elle résulte de l'incrustation de la cellulose par la lignine et par les hémicelluloses.

I.3. Structure moléculaire de la cellulose

La molécule de la cellulose est un homopolymère linéaire, de formule brute $(C_6H_{10}O_5)_n$ qui a été déterminée par Willtatter et Zechmeister en 1913 (Marouf et Tremblin, 2009). Elle résulte de la polycondensation de plus de 10000 unités de molécules de D-glucopyranose, liées les unes aux autres par des liaisons β -(1→4) glycosidique (substitution d'un groupe hydroxyle de l'hémiacétal d'un sucre avec un groupe hydroxyle d'un alcool d'un autre sucre) (figure 1).

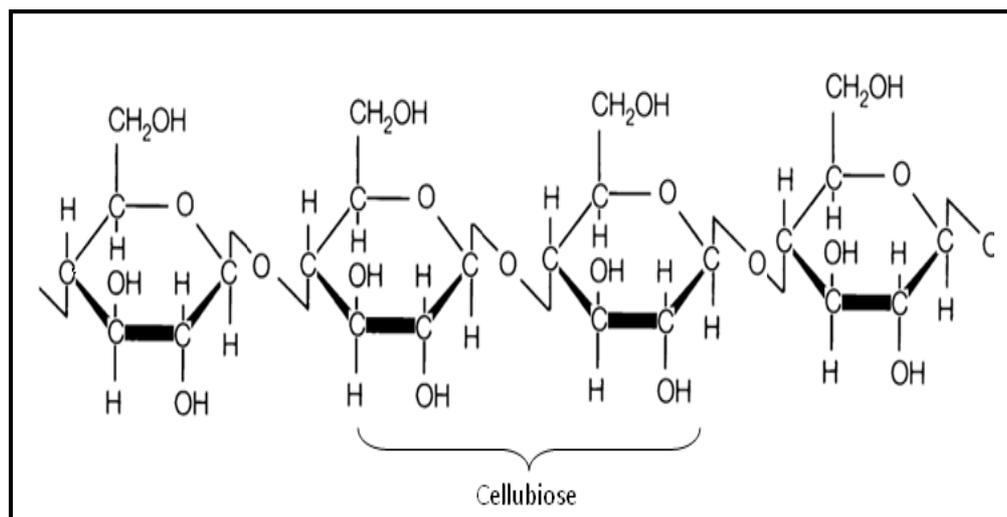


Figure 1 : Structure moléculaire de la cellulose

Sa masse moléculaire est très élevée, de l'ordre de 500 KDa et elle peut atteindre 5000 KDa. Deux unités de glucopyranose constituent une unité cellulose (dimère fondamental). L'élucidation de sa structure polymère date de 1926 avec les travaux de Staudinger (Berlioz, 2007 ; Marouf et Tremblin, 2009).

Selon Pourquie et Vondecastele (1984), à l'état naturel, les molécules de cellulose sont associées en une structure complexe à la fois fibrillaire et cristalline dont l'organisation exacte reste encore l'objet de plusieurs controverses.

I.4. Structure supramoléculaire de la cellulose

La présence de nombreux groupes hydroxyle (-OH) confère à la chaîne de cellulose une grande tendance à former des liaisons hydrogènes intramoléculaires et intermoléculaires. Ce type de liaisons est responsable de la formation de structures supramoléculaires. Les chaînes de cellulose s'agrègent, formant des fibres élémentaires qui se lient côte à côte par des liaisons hydrogènes constituant des microfibrilles rigides et insolubles. La structure supramoléculaire de la cellulose est illustrée par la figure 2 d'après Reguant et Rinaudo, (1999), cités par Arezki in Berki (2010).

Les cristaux de cellulose native forment des microfibrilles de 2 à 50 nm de large ; les zones amorphes correspondent principalement aux chaînes en surface des cristaux. Les microfibrilles sont de tailles et de sections variables selon les sources de la cellulose (Wertz, 2009).

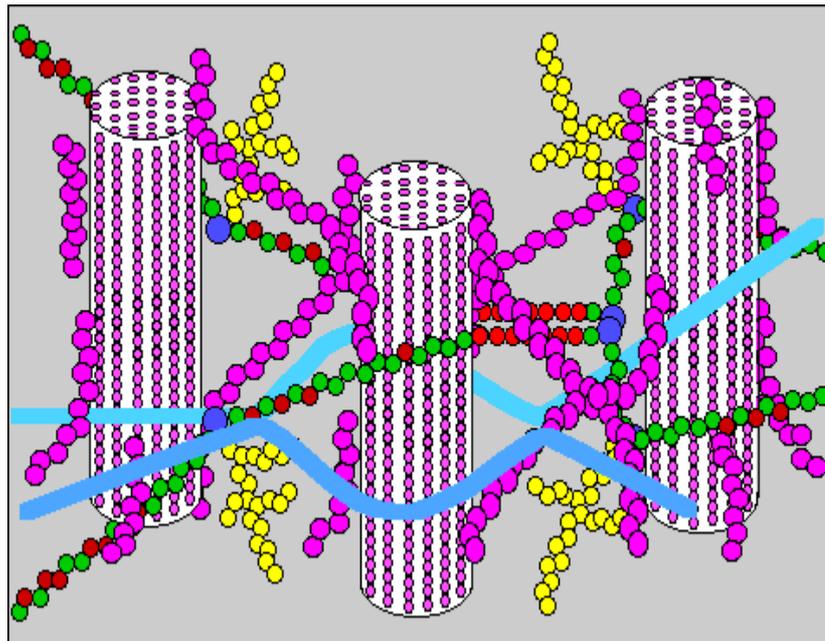


Figure 2: structure microfibrillaire de la cellulose Ruguant et Rinaudo

I.5. Propriétés de la cellulose

Au niveau des industries agroalimentaires, la seule propriété qui soit vraiment importante concerne la solubilité de la cellulose en présence d'eau. Cette solubilité se répercute sur son comportement en milieu hétérogène.

I.5.1. Solubilité

La cellulose est insoluble dans l'eau mais la présence des fonctions hydroxylées lui donne un caractère hydrophile ce qui lui permet de fixer un grand nombre de molécules d'eau et entraîne le gonflement de la cellulose : c'est un hydrocolloïde (Voet et Voet, 2005).

La cellulose peut être solubilisée dans les acides, les bases ou les complexes inorganiques (liqueur de Schweitzer). La solubilisation de la cellulose est possible par conversion de cette dernière sous la forme de dérivés esters ou éthers. Il y a de ce fait perte de la structure cristalline et solubilisation sous formes de solutions visqueuses dont la viscosité va dépendre du degré de polymérisation. La substitution des hydroxyles n'est pas nécessairement élevée, on définira un degré de substitution qui pourra varier de 1 à 3 (substitution des hydroxyles en C2, C3, C6) (Marouf et Tremblin , 2009).

I.5.2. Substitution de la cellulose et solubilité

Les principaux produits dérivés de la cellulose sont utilisés dans les industries agroalimentaires sont les suivants : cellulose microcristalline (36kDa) obtenue par traitement acide, elle est partiellement dépolymérisée et peu soluble. Les autres produits sont des éthers de la cellulose comme : la carboxyméthylcellulose (CMC), l'hydroxypropylcellulose (HPC), la méthylcellulose (MC), les éthers mixtes d'hydroxypropyl-méthylcellulose (HC-MC) et méthyl-éthylcellulose (MC-EC).

Dans le cas des éthers renfermant une chaîne latérale hydroxylée comme dans le cas de l'HPC, il est possible d'avoir des substitutions au niveau de cette chaîne latérale. Il faut distinguer dans ce cas le degré de substitution (DS) qui ne concerne que les hydroxyles du glucose et un module de substitution (MS) qui concerne à la fois les hydroxyles du cycle et ceux des chaînes latérales. Ainsi, une hydroxypropylcellulose pourra avoir un DS de 2 et un MS de 3 ce qui voudra dire qu'il y a 2 hydroxyles du cycle qui sont étherifiés par un radical hydroxypropyle et l'une des fonctions hydroxylée d'une chaîne latérale est elle-même substituée. Si les substitutions sont réparties de façon homogène, on obtiendra des solutions filantes, si la répartition est hétérogène on obtiendra des solutions granuleuses (Marouf et Tremblin, 2009).

I.6. Dégradation biologique de la cellulose

La biodétérioration et la biodégradation sont deux termes se rapportant aux dégradations biologiques.

- La biodétérioration est définie comme l'ensemble des modifications des propriétés physico-chimiques et mécaniques d'un matériau ou d'un matériel par l'action d'organismes vivants. Ces modifications sont inopportunes et préjudiciables à l'utilisation et/ou au bon fonctionnement du matériau ou du matériel.
- La biodégradation est définie comme l'ensemble des réactions de transformation ou de destruction des éléments constitutifs d'un matériau dû à l'action d'une ou plusieurs entités biologiques (Hilaire, 1994).

Différents organismes (bactéries, champignons, insectes) sont susceptibles de dégrader la cellulose par le biais de leurs métabolites. Dans le cas des champignons, il a été indiqué précédemment qu'ils peuvent dégrader les substrats en sécrétant des toxines, des pigments, ou encore des enzymes telles que les cellulases qui dégradent la cellulose.

La dégradation de la cellulose par les cellulases a été très étudiée en raison de l'importance de ces enzymes dans les industries pharmaceutiques, agro-alimentaires et textiles (Gusakov et al., 2000 ; Karmaker et Ray, 2011; Kovacs et al., 2008; Li et al., 2007; Singhanian et al., 2010).

Le mécanisme d'hydrolyse de la cellulose se ferait dans un premier temps via un premier acide aminé de la cellulase qui protone l'oxygène de la liaison glycosidique. Un second acide aminé de l'enzyme chargé négativement arrache un hydrogène à une molécule d'eau formant ainsi un ion HO^- qui agit comme un nucléophile sur un carbone d'une molécule de glucose (Li et al., 2007; Singhanian et al., 2010).

I.7. Le papier

I.7.1. Généralités

Le papier (du latin *papyrus*) est une matière fabriquée à partir de fibres cellulosiques végétales. Il se présente sous forme de feuilles minces et est considéré comme un matériau de base dans les domaines de l'écriture, du dessin, de l'impression, de l'emballage et de la peinture. Il est également utilisé dans la fabrication de composants divers, comme les filtres (Blet, 2011).

Le processus de fabrication du papier remonte à l'Antiquité ; il se fait en deux étapes :

- la désintégration de la matière première dans l'eau afin d'obtenir des fibres individuelles en suspension;
- la formation de feuilles feutrées lorsque cette suspension est disséminée sur une surface poreuse et adaptée, à travers laquelle l'eau peut s'égoutter (Blet, 2011).

1.7.2. Différents types de Pâtes

La pâte à papier est composée de la cellulose du bois, obtenue après élimination des parties dures du bois (la lignine). Le traitement chimique classique fait appel à des agents très corrosifs (soude, chlore, dioxyde de chlore etc.) et consomme beaucoup d'énergie (broyage,

cuisson sous pression). De plus, la production de pâte à papier pollue de grandes quantités d'eau et génère de mauvaises odeurs. Une amélioration du procédé de fabrication est très difficilement rentable car le papier est une matière première produite à très bon marché (Anonyme, 2007).

1.7.2.1. Pâtes mécaniques

Elles sont obtenues en râpant le bois à l'aide d'immenses meules appelées « défibreurs », qui arrachent les fibres. La pâte mécanique est essentiellement destinée à la fabrication de produits nécessitant moins de résistance, tels que le papier journal, certains papiers de presse magazine et certains cartons (Houtmeyers, 2006).

1.7.2.2. Pâtes chimiques

Elles sont obtenues en faisant cuire le bois à haute température dans des « lessiveurs » en présence de produits chimiques, pour dissoudre la lignine et libérer les fibres.

Les pâtes chimiques sont utilisées pour la fabrication de produits qui offrent une grande résistance. A la différence des pâtes précédemment présentées, la pâte chimique est utilisée pour fabriquer du papier de qualité supérieure, avec une durée de vie plus longue. Ce papier qui ne contient plus de lignine est appelé « papier sans bois » (Houtmeyers, 2006).

1.7.2.3. Pâtes mi- chimiques

Elles proviennent de bois (ou paille) ayant subi un traitement chimique modéré, complété par un traitement mécanique. Cette pâte à très haut rendement a des propriétés intermédiaires entre les pâtes mécaniques et chimiques.

Le bois est composé de 50 à 80% de cellulose et de 20 à 30% de lignine. La cellulose est faite de fibres, de longueurs variables, reliées entre elles par la lignine. Plus les fibres sont longues (c'est le cas des résineux, les sapins, en général), plus le papier sera résistant (Houtmeyers, 2006).

1.7.3. Dégradation du papier

1.7.3.1. Les causes de vieillissement naturel du papier

Selon Zermane (2008) le papier présente naturellement dans sa composition des éléments qui, en vieillissant, se dégradent et participent à la fragilisation des œuvres. Le papier est

essentiellement constitué de fibres de cellulose. Le processus naturel de vieillissement casse les molécules constituant les fibres du papier de façon lente et irréversible. Le degré et la vitesse de détérioration dépendent d'une part de l'instabilité chimique des matériaux constitutifs et d'autre part des facteurs extérieurs de dégradation comme l'environnement, les conditions de rangement et de manipulation

1.7.3.2. Les facteurs de dégradation du papier

selon Zermane (2008)

- La température et l'humidité

Les températures élevées accélèrent la dégradation des matériaux instables présents au sein des œuvres mais également parmi les techniques graphiques. Associées à une forte humidité, elles favorisent également le développement des micro-organismes responsables de la moisissure des matières organiques. A l'opposé, les températures basses rendent le papier friable. Les écarts trop brusques de température peuvent provoquer des dégradations physiques comme des fendillements ou des décollements. De même de trop grandes fluctuations du taux d'hygrométrie provoquent des variations dimensionnelles menant également à des fendillements et des décollements, ou bien encore à des déformations.

- La lumière

La lumière qu'elle soit naturelle (soleil) ou artificielle (lampe), dégage essentiellement deux types de rayonnements aussi dangereux l'un et l'autre pour les œuvres d'art :

- Les rayons infrarouges : présents en grande quantité dans la lumière naturelle, ils produisent une élévation de la température et ont un effet desséchant sur les matériaux organiques, tel que le papier, le vieillissement sera alors plus rapide.
- Les rayons ultraviolets : présents en grande quantité dans la lumière produite par des lampes halogènes ou à fluorescence, et dans une moindre mesure dans la lumière du soleil, ils provoquent, par exemple, le jaunissement des œuvres exposées.

- Les micro-organismes

Les micro-organismes susceptibles de s'attaquer aux œuvres sont des champignons (comme les moisissures) et des bactéries. La plupart des moisissures se développent entre 4 et 30°C et seulement lorsque l'humidité relative dépasse les 60%. Les dégradations observées sont

l'apparition de tâches indélébiles de couleurs diverses et un affaiblissement du papier, jusqu'à parfois leur destruction totale.

- **Les insectes**

Certaines conditions sont propices au développement des insectes. Ils s'attaquent alors aux objets ou documents contenant de la cellulose pour se nourrir. Ainsi, une température et une humidité élevées, une mauvaise ventilation, un nettoyage insuffisant et irrégulier, la présence de nourriture, la mauvaise étanchéité des portes et des fenêtres, le mauvais état du bâtiment et l'intégration dans l'environnement d'objets déjà contaminés sont les principales causes de développement des insectes. Les dégradations provoquées par les insectes sont progressives et peuvent aller de simples trous épars dans les objets à leur destruction totale. Les insectes utilisent les matériaux organiques pour se nourrir et pour faire leurs nids. Ils créent des dommages physiques pour déposer leurs œufs (galeries), et chimiques par l'intermédiaire de leurs larves. Ces dernières secrètent des substances qui dégradent la matière organique afin de la rendre comestible.

- **La pollution**

Elle se présente sous la forme de gaz et de particules solides, toutes deux dangereuses pour les œuvres. La pollution atmosphérique est une des premières causes externes d'altération chimique. Parmi les gaz polluants les plus corrosifs présents dans l'air d'une ville, il faut citer les composés soufrés (les dioxydes et les trioxydes de soufre), les composés azotés comme l'oxyde d'azote ou encore l'ozone. Ces composants réagissent avec l'humidité de l'air et forment des composés accélérant la dégradation des œuvres, comme par exemple l'acidité. Les particules minérales, métalliques ou organiques présentes dans l'air peuvent contribuer à catalyser certains processus de dégradation. Elles peuvent également favoriser la croissance de micro-organismes toujours présents dans l'atmosphère (pollen, spores...).

Partie II : La Cellulase

II.1. Généralités

Le terme général de « cellulase » est employé pour caractériser les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose (Jouany, 1994). Les cellulases sont un groupe d'enzymes cellulolytiques qui hydrolysent les liaisons β -(1→4)- glycosidiques présentes dans la cellulose (Voet et Voet 2005).

Ces enzymes sont produites typiquement par les bactéries, levures et protozoaires, qui jouent un rôle majeur dans la digestion des animaux, et la transformation de la matière organique végétale en humus dans le sol. Elles ont aussi des applications biotechnologiques et industrielles.

Selon Jean Pelmont (1995), les cellulases constituent des systèmes enzymatiques capables d'hydrolyser les macromolécules de cellulose en molécules de sucres suffisamment petites pour passer à travers les membranes cellulaires.

Des micro-organismes cellulolytiques sont doués d'un système enzymatique encore plus élaboré ; il s'agit d'un complexe multienzymatique extracellulaire situé à la surface des cellules et cellulosome. De tels complexes ont jusqu'à présent été décrits uniquement chez des microorganismes anaérobies, essentiellement des bactéries de l'ordre *Clostridium* (Desvaux, 2001).

II.2. Nomenclature

- Nom codifié de la Cellulase (EC : 3.2.1.4)
- Nom systématique: 1,4 - (1,3 ; 1,4) - β -D - Glucan4 -glucanohydrolase
- Nom recommandé: cellulase

II.3. Structure de la cellulase

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman et *al.*, 1985) et ne sont pas des métalloprotéines (Saha et *al.*, 1994). Elles ont généralement une structure modulaire avec deux domaines fonctionnels distincts : le site catalytique et le site de fixation du substrat, habituellement reliés entre eux

par un peptide glycosylé flexible riche en Ser / Pro et Thr appelé «linker » (Cavako-Paulo, 1998 ; Receveur et *al.*, 2002 ; Hasper et *al.*, 2002).

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

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

II.4. Les différentes origines de la cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature. Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes etc. De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale et microbienne (Bensmira, 2006). Ces origines sont :

II.4.1. Origine animale

Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif. Des cellulases ont été isolées à partir du suc digestif d'escargot comestible *Helix pomatia*, de la moule bleue *Mytilus edulis* et du mollusque marin *Littorina brevicula*.

II.4.2. Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits ou elles participent à la libération des arômes. Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces, des céréales tels que l'orge et le riz de la variété *Oryza sativa*. Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- β -glucanases.

II.4.3. Origine microbienne

Les bactéries et les moisissures utilisent la cellulose pour la production de quantités substantielles d'enzymes extracellulaires qui sont alors facilement récupérées du milieu de

culture après fermentation, ces enzymes peuvent être présentes sur la surface des cellules. Les cellulases bactériennes et fongiques sont les plus étudiées notamment en raison de leurs utilisations potentielles en biotechnologie.

II.5. Quelques caractéristiques de la cellulase

II.5.1. Réaction et spécificité

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

II.5.2. Substrats naturels

La cellulase peut avoir différents substrats naturels tels que : la cellulose, dont la dégradation complète nécessite une action complémentaire des enzymes cellulolytiques ; il en est de même pour d'autres substrats cellulosiques tels que les Xyloglucanes ainsi que le coton (Lynd et *al.*, 2002).

II.5.3. Activité enzymatique

L'activité cellulasique est exprimée en unités internationales. Elle correspond à la quantité d'enzymes dégradant la carboxymethylcellulose en carbohydrates réduits (1 micromole de glucose par minute) Elle varie de 60U à 1168 U et plus pour les enzymes immobilisées (Withers, 2001 et Teeri, 1997).

II.5.4. Poids moléculaire

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

II.5.5. pH optimum

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

II.5.6. Température optimale

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

II. 6. Mécanisme d'action de la cellulase

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

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

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

Quatre formes de synergisme ont été rapportées (Din et *al.*, 1994 ; Teeri, 1997) :

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

II. 7. Les enzymes cellulolytiques

Sous le nom de cellulase, sont regroupées plusieurs enzymes dont seule l'action synergique peut aboutir à l'hydrolyse complète de la cellulose cristalline. Elles peuvent être produites séparément ou sous forme de complexe (Jean Pelmont, 1995).

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

A. L'exo $\beta(1-4)$ glucanase ou Cellobiohydrolase (EC. 3.2.1.91)

Cette enzyme attaque les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libère exclusivement du cellobiose. L'enzyme seule n'est active ni sur la cellulose cristalline, ni sur la cellulose soluble (carboxyméthyle cellulose). Par contre, elle attaque l'action de l'endocellulase sur la cellulose cristalline, seuls quelques champignons filamenteux (*Trichoderma resei*, *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum pulverulentum*) semblent disposer d'une cellobiohydrolase (Scriban., 1999).

B. Endo $\beta(1-4)$ glucanase ou Endocellulase (EC. 3.2.1.4)

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

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

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

C. B(1-4) glucosidase ou Cellobiase (EC. 3.2.1.21)

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

De nombreux auteurs ont montré que la cellobiase est fortement inhibée par son produit d'hydrolyse le glucose. L'importance du rôle de la cellobiase lors d'une saccharification a été soulignée par plusieurs auteurs. En effet, en hydrolysant le cellobiose, la cellobiase permet

d'éviter l'inhibition de la cellobiohydrolase, ainsi la vitesse globale de la cellulolyse est étroitement dépendante de l'activité cellobiasique (Lynd et *al.*, 2002).

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

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

Partie III : Les champignons

III.1. Généralités

Les champignons constituent un ensemble très diversifié que l'on estime, bien que les chiffres soient approximatifs, à un million d'espèces. Cependant, seulement 14% de ces organismes ont été découverts (Hawksworth et Rossman, 1997 ; Hawksworth, 2001 ; Neubert et *al.*, 2006). Ils présentent des caractères communs aux plantes et aux animaux qui ne permettent pas de les classer dans l'un ou l'autre règne, ils forment donc un règne à part (Bouchet et *al.*, 1999).

III.2. Caractéristiques générales des champignons

Les champignons sont des eucaryotes et leurs noyaux sont minuscules. Ils sont dépourvus de chlorophylle et de pigments assimilateurs (Genevès, 1990 ; Genevès, 1992).

Ils sont Thallophytes, c'est à dire ne possédant pas de racines, ni de tiges, ni de feuilles. Ils se caractérisent par la formation de filaments (hyphes) libres ou entrelacés dont l'ensemble est désigné sous le nom de mycélium. Celui-ci peut être coenocytique (non cloisonné, c'est-à-dire hyphes résultant de divisions nucléaires répétées, sans divisions cellulaires concomitantes), soit cloisonné (Bouchet et *al.*, 1999 et Boiron , 2005).

Les champignons présentent des parois cellulaires mais à la différence de celles des plantes, elles sont composées de chitine et non de cellulose, la principale forme de stockage des glucides est le polysaccharide glycogène (Indge, 2004). Ils se reproduisent essentiellement par des spores uni- ou pluricellulaires. On distingue, selon leurs origines, les spores sexuées et les spores asexuées. La forme sexuée, ou téléomorphe, a pour fonction de maintenir l'espèce et apparaît souvent en fin de saison alors que la forme asexuée, dite aussi forme imparfaite ou anamorphe, assure la propagation. La nutrition s'effectue à travers des haustoria, c'est-à-dire des tubes suçoirs (Bouchet et *al.*, 1999).

III.3. Modes de reproductions des champignons

Les champignons présentent deux types de reproduction :

III.3.1. Reproduction asexuée

Les spores représentent le mode de reproduction asexué le plus commun chez les champignons : elles sont produites soit dans des sporanges, soit à partir de cellules d'hyphes appelées cellules conidiogènes (Raven et *al.*, 2000).

III.3.2. Reproduction sexuée

Elle est assurée par des gamètes ou des spores formées à la suite d'une méiose. Cette reproduction sexuée est très variable tant sur le plan de la diversité des organes que sur celui des cycles de développement. La fécondation peut s'effectuer chez un même individu (homothallisme) ou entre deux individus différents (hétérothallisme) (Sterullu, 1991).

III.4. Mode de vie des champignons

Indépendamment du classement hiérarchique en plusieurs groupes et sous-groupes, les champignons sont classés selon leur mode de vie en trois grandes catégories: les saprophytes, les parasites et les symbiontes.

- **Le saprophytisme :** les espèces saprophytes se développent aux dépens des substances mortes d'origines animale ou végétale (Bouchet et *al.*, 1999). Ces espèces jouent un rôle essentiel au sein des cycles biologiques en minéralisant les matières végétales ou animales mortes (Marouf et Reynaud, 2007).
- **Le parasitisme :** plusieurs champignons mènent une vie parasite vis-à-vis des substances organiques (Florent, 1993). Le parasitisme est généralement nuisible et souvent nocif. C'est le cas des espèces responsables de maladies sur les végétaux tel que l'oïdium (blanc) (Bouchet et *al.* ; 1999).
- **La symbiose :** Raven et *al.*, (2000) ; Marouf et Reynaud (2007), définissent la symbiose comme une association étroite et durable entre les organismes d'espèces différentes, pouvant appartenir à des règnes différents , vivant en équilibre les uns avec les autres et tirant les bénéfices mutuels de cette union, mais pouvant vivre séparément.
- *Les lichens :* sont constituées d'une association entre champignon (principalement du phylum Ascomycota) et une cyanobactérie. L'algue, capable de photosynthèse, va fournir les

molécules organiques carbonées au champignon qui en retour fournira les éléments minéraux à l'algue.

Les mycorhizes : sont constituées d'une association entre un champignon et la racine d'une plante. Les mycorhizes constituent la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire. On estime que 90% des végétaux contractent spontanément cette association. Les champignons vont développer un réseau de filaments mycéliens à partir de la racine et vont être impliqués dans la nutrition minérale des plantes. C'est d'ailleurs une association symbiotique qui aurait permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre.

III.5. Classification des champignons

Les champignons ont fait l'objet de classifications multiples et complexes. Elles sont en constante évolution. (Barnett et Barry, 1972 ; Botton et *al*, 1990 ; Bouchet et *al*, 1999).

On distingue globalement 03 divisions selon (Strullu, 1991 ; Davet, 1996) :

- Division 1 : GYMNOMYCOTA : champignons à zoïdes, cellules dépourvues de paroi (présence de myxamibes et de plasmodes);
- Division 2 : MASTIGOMYCOTA : champignons à zoïdes (présence de spores mobiles);
- Division 3 : AMASTIGOMYCOTA : champignons sans zoïdes (pas de cellules mobiles, pas de flagelles).

Les champignons sont subdivisés en quatre sous embranchements :

a) **ZYGOMYCOTINA ou ZYGOMYCÈTE** : elle est présentée essentiellement par les zygomycètes, elles comprennent environ 200 espèces, rassemblent des champignons saprophytes, ainsi que des champignons parasites d'insectes (Entomophthorales), de Nématodes et d'Amibes (Zoopagales), et de plantes. Les Zygomycètes sont caractérisées par un mycélium siphonné ou coenocytique, une reproduction asexuée le plus souvent par sporocystospore et une reproduction sexuée par fusion de gamétocyste.

b) **ASCOMYCOTINA ou ASCOMYCÈTE** : les Ascomycètes comprennent environ 15.000 espèces, auxquelles il faut ajouter un nombre à peu près équivalent d'espèces lichénisantes. Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure) ; une reproduction asexuée par des conidies et une reproduction sexuée par formation de spore méiotique (ascospores) dans des asques.

c) **BASIDIOMYCOTINA ou BASIDIOMYCÈTE** : Il existe environ 20.000 espèces, ce sont des champignons que l'on peut considérer comme les plus perfectionnés. Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure), une reproduction asexuée par des conidies et une reproduction sexuée par formation de méiospore (basidiospore) dans des basides.

d) **DEUTEROMYCOTINA ou DEUTEROMYCETES (champignons imparfaits)** : encore appelés Adéromycètes. Les Deutéromycètes ne constituent pas un groupe naturel, mais d'un ensemble artificiel regroupant environ 15.000 espèces (plus du quart des champignons actuellement connus). Ils sont caractérisés par un thalle en général cloisonné ou unicellulaire, ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme de reproduction sexuée ; la plupart présentent, néanmoins, des affinités d'Ascomycètes et ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées (conidie) ou par simple fragmentation du mycélium (arthroconidie). Les Deutéromycètes se divisent en trois sous-classes :

- Les **Blastomycètes** : Levures avec ou sans pseudomycélien.
- Les **Hyphomycètes** : Champignons filamenteux, stériles (**Agonomycétales**) ou produisant leurs spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simples ou agrégés (**Moniliales**).
- Les **Coelomycètes** : Conidies produites dans des pycnides (**Sphaeropsidiales**) ou dans des acervules (**Mélanconiales**).

e- **CHYTRIDIOMYCOTA OU CHYTRIDIOMYCETES** : sont les seuls champignons à posséder des spores uniflagellées (zoospores). La présence de spores flagellées semble restreindre ces organismes aux milieux aquatiques et dans les sols humides. Environ 1000 espèces ont été décrites au sein de cette classe, ce qui correspond à environ 1% des espèces décrites de champignons. La plupart sont des saprophytes, aérobies ou anaérobies; ils sont capables de dégrader un grand nombre de substrats. On recense également de nombreux pathogènes ou de parasites d'algues. Ils sont souvent microscopiques mais peuvent aussi produire un mycélium.

f- **OOMYCETES** : ce sont des champignons-algues et regroupent notamment les Diatomées et les algues brunes, jaunes et dorées. Ce sont des eucaryotes à mode de vie aquatique. Ils sont saprophytes, parfois parasites. Leur multiplication dominante est asexuée, assurée par des

planospores (cellules nageuses biflagellées hétérochontes) ou zoospores, produites au sein de sporocystes.

g- MYXOMYCETES : ce sont des champignons qui possèdent un plasmode et assurent leur nutrition par phagocytose. Certains sont classés dans les Protistes, d'autres ne peuvent que faire l'objet d'un règne autonome.

Remarque : Actuellement les espèces issues de la classe des Oomycètes et des Myxomycètes ne présentent pas les caractères énumérés précédemment et donc ne peuvent plus être considérés comme des champignons au sens strict (champignons vrais).

Matériels et Méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Origine et prélèvement des sols

L'isolement des colonies de champignons microscopiques à activité cellulolytique est effectué à partir de deux sols de la région de Béjaïa; il s'agit du sol de la décharge de Boulimat et du sol de jardin botanique d'Oued Ghir.

Une partie de ces sols a été séchée à l'air libre pendant une semaine pour subir certaines analyses physico-chimiques.

II.1.2. Milieux de cultures

Le milieu de base utilisé pour l'isolement des champignons cellulolytiques est CMC-agar, décrit par Mandels et Weber (1969) et dont la composition par litre d'eau distillée est la suivante : NaNO_3 , 2g ; KH_2PO_4 , 1g ; $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$, 1g ; KCl , 0.5g ; $\text{CuSO}_4 (5\text{H}_2\text{O})$, 0.001g ; MnCl_2 , 0.001g ; $\text{ZnSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$, 0.005g ; CMC, 2.5g ; Agar, 16g. Le milieu est ajusté à pH 5 et stérilisé à 120°C pendant 20 min.

Par ailleurs, nous avons utilisé trois autres milieux de culture :

- GEM (Gélose à l'Extrait de Malte) ;
- PDA (Potato Dextro Agar) ;
- Milieu Czapeck-Dox

Ces milieux dont la composition figure en annexe permettent la purification et la caractérisation des champignons.

II.1.3. Substrats cellulosiques

Afin de tester la capacité cellulolytiques de nos champignons, deux types de substrats cellulosiques ont été utilisés :

- Le papier filtre Whatman N° 1 qui contient de la cellulose insoluble associée à d'autres substances de nature non déterminée ;
- La CarboxyMéthylCellulose (CMC) soluble (Sigma).

II.2. Méthodes

II.2.1. Analyse du sol

Après séchage à l'air libre pendant une semaine et un léger broyage, les sols sont passés au tamis à mailles carrées de 2mm de diamètre pour éliminer la fraction grossière. La fraction fine du sol obtenue a subi deux types d'analyse physico-chimique, à savoir :

II.2.1.1. Mesure du pH

Le pH des sols est déterminé par l'emploi d'un pH-mètre à électrode de verre préalablement étalonné. La réaction du sol est déterminée sur une suspension aqueuse dans laquelle le rapport sol/eau égale à 1/2,5. Deux mesure de pH sont effectuées : pH_{eau} (acidité actuelle) et le pH_{KCL} (acidité potentielle).

II.2.1.2. Dosage du calcaire total

Les taux de CaCO_3 total des sols sont déterminés par la méthode volumétrique, en décomposant les carbonates de calcium par l'HCl et en mesurant le volume de CO_2 dégagé à l'aide du calcimètre de Bernard.

II.3. Test de biodégradation du papier dans le sol

Afin de déceler la présence de champignons capables de dégrader la cellulose dans les sols, nous avons procédé à un test préliminaire de dégradation du papier. Pour cela, les échantillons de sols ont été répartis séparément dans des boites de pétri en verre stérile. Ensuite des disques de papier filtre type Whatman N°1 de diamètre de 7 cm ont été déposés sur la surface des sols préalablement humidifiés. Les boites ainsi préparées sont incubées à une température ambiante du laboratoire pour une durée de 15jours.

II.4. Dénombrement et isolement des champignons

L'isolement et le dénombrement des champignons cellulolytiques ont été réalisés selon la technique des suspension- dilutions et étalement sur milieux gélosés, préconisés par Davet et Rouxel (1997).

II.4.1. Préparation des suspensions- dilutions

Pour chaque traitement, 10g de sol sont mis en suspension dans 90ml d'eau distillée stérile. La solution est agitée pendant 30 min sur un agitateur magnétique puis laissée décanter une à 2min. La suspension obtenue correspond à la solution mère (c'est la dilution 10^{-1}).

Un ml de la solution mère est versé dans un tube contenant 9ml d'eau distillée stérile, c'est la dilution 10^{-2} . Après agitation, 1ml de la solution 10^{-2} est prélevé stérilement, puis transféré dans un deuxième tube contenant comme le premier, 9ml d'eau distillée stérile. La dilution se fait ainsi jusqu'à 10^{-7} .

II.4.2. Ensemencement

A l'aide d'une pipette stérile, 0.1ml de chaque suspension-dilution est étalé sur le milieu CMC-agar avec trois répétitions. Les échantillons de culture ensemencés correspondent respectivement aux dilutions 10^{-2} , 10^{-4} et 10^{-6} . Les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C et leur lecture est effectuée toutes les 24 h pendant 7 jours. Ces opérations sont schématisées sur la figure3.

II.4.3. Méthode de dénombrement

Le dénombrement consiste à compter les colonies présentes sur les boîtes en Unité Formant Colonie (UFC). Le comptage se fait macroscopiquement. En tenant compte des caractéristiques des colonies sur son milieu approprié, seules les boîtes ayant 30 à 300 UFC sont retenues. Le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) est déterminé selon la formule :

$$UFC = \frac{\text{Nombre de colonies} \times \text{Facteur de dilution finale}}{\text{Poids sec du sol}}$$

II.4.4. Purification

Après incubation, une mycoflore variée s'est développée. La pureté des souches est vérifiée par repiquage successif sur différents milieux.

Le repiquage consiste à prélever avec une aiguille stérile un fragment mycélien à la marge du thalle, et de le transférer sur les milieux PDA, CMC-agar, GEM et Czapeck-Dox. L'inoculum est mis au centre de la boîte. Après cette opération, les boîtes de Pétri sont entourées du papier parafilm et sont mises à incuber à une température de 28°C. Après 72 heures, on observe l'apparition de colonies bien différenciées.

II.4.5. Conservation des colonies

Les colonies pures obtenues sont repiquées par des stries d'épuisement parallèles dans des tubes à vis contenant le milieu PDA ou CMC-agar incliné de manière à avoir des colonies abondantes. Après 7 jours d'incubation à 28°C, les tubes de collection sont conservés à 4°C en évitant le plus possible tout risque de contamination (Botton et *al.*, 1990).

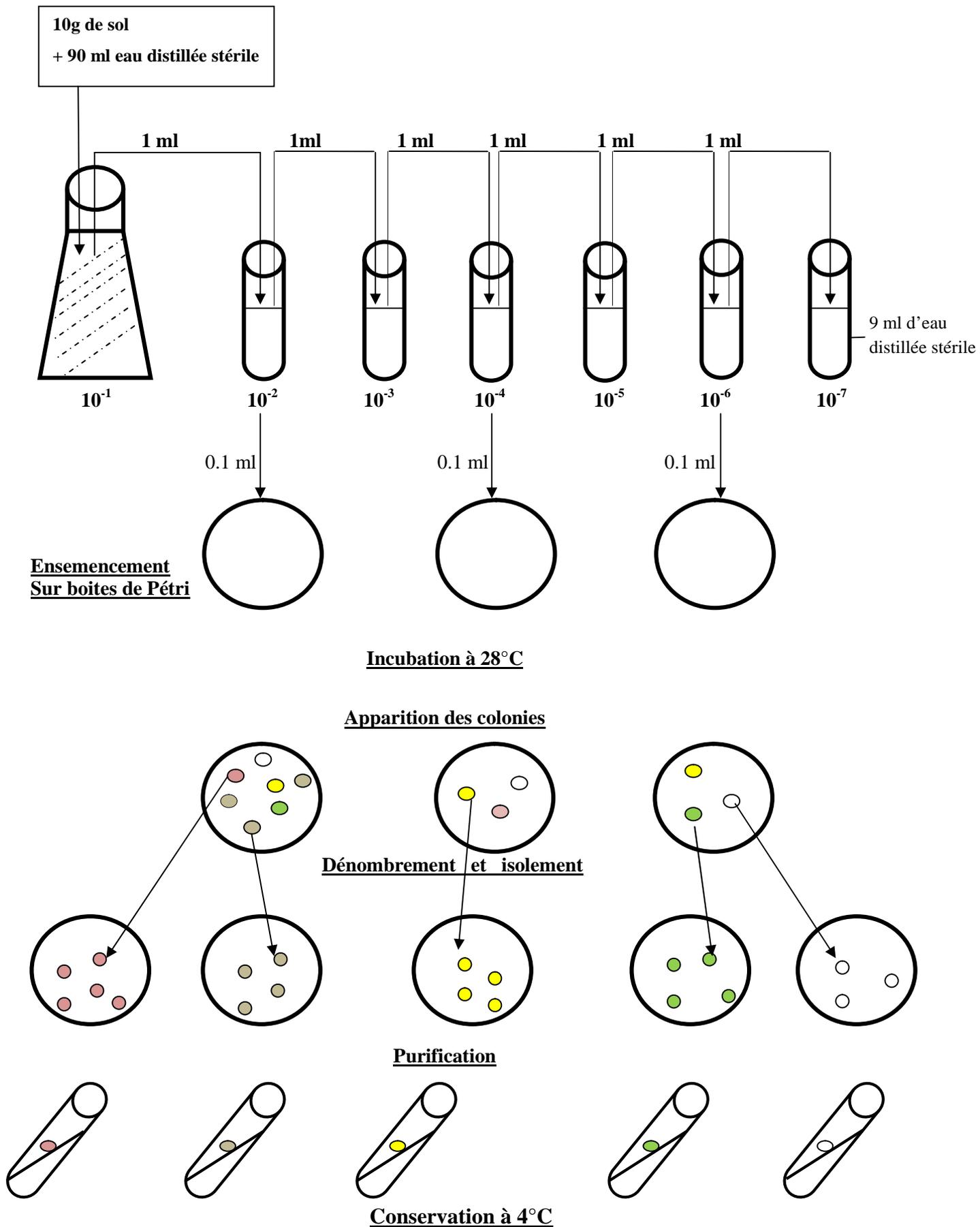


Figure 3 : Procédé de dénombrement et d'isolement des champignons cellulolytiques

II.5. Sélection des colonies cellulolytiques

L'isolement des champignons cellulolytiques a été réalisé selon une pression de sélection progressive. Celle-ci est effectuée selon deux étapes progressives :

II.5.1. En milieu solide

La technique la plus évidente serait de faire apparaître la capacité des champignons à assimiler la cellulose sur un milieu gélosé (CMC-agar) contenant 1% de carboxyméthyl cellulose, comme seule source carbonée et d'énergie. Le réactif iodo-ioduré (solution de lugol) ou le réactif rouge Congo sont utilisés pour mettre en évidence la zone d'hydrolyse de la cellulose qui apparaît autour de la colonie.

II.5.2. En milieu liquide

Le principe reste le même, un milieu liquide totalement dépourvu d'une quelconque source de carbone, exception faite pour les bandes de papier filtre Whatman n°1 qui servent de source de carbone, a été utilisé.

Les cultures de champignons sont incubées à 28°C en présence de bandelettes de papier Whatman n°1 (1 cm de largeur et 10 cm de longueur) stériles plongées dans 10 ml du milieu sans CMC minéral préalablement stérilisé. L'ensemencement se fait par 1 ml d'une préculture de chaque souche. Un blanc (sans inoculum) est soumis aux mêmes conditions. La dégradation du papier est observée visuellement et quotidiennement (Gunnar et *al.*, 1999).

II.6. Identification des champignons cellulolytiques

L'identification des champignons cellulolytiques est effectuée par deux techniques classiques selon Cahagnier (1998) et Guillaume (2006):

- une étude macroscopique
- une étude microscopique.

II.6.1. Etude Macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation des colonies à l'œil nu et à la loupe binoculaire. L'observation des caractères porte sur :

- l'aspect de la colonie (couleur de la surface et du revers de la boîte, texture de la surface des colonies, topographie...).
- l'aspect des bordures des colonies.
- La couleur du mycélium aérien
- Présence ou absence de gouttelettes sur le mycélium
- Production de pigment diffusible

- Vitesse de croissance (diamètre de la colonie à 7 jours : rapide ≥ 3 cm ; modérée : entre 1 et 3 cm et lente ≤ 1 cm).

II.6.2. Etude Microscopique

L'identification des champignons nécessite l'observation au microscope optique. Elle est basée sur les critères d'identification microscopique réalisés par Breton (1990) et Roquebert (1998) quand c'est possible à identifier. Pour cela, et à l'aide d'une aiguille stérile on prélève superficiellement un fragment de la culture que l'on dépose sur une lame. Le frottis ainsi préparé est ensuite coloré par l'une des solutions suivantes : bleu de coton, rouge Congo ammoniacal ou le KOH à 10%. Ensuite la lame est recouverte d'une lamelle, puis observée au microscope photonique à un grossissement G X 40.

L'observation des caractères porte sur :

- Hyphes : septés ou non, c'est-à-dire cloisonnés ou non
- Conidiophores : absents, simples, ramifiés
- Cellules conidiogènes : annellide, phialide...
- Conidies : uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue...)
- Organes de fructification : périthèces, cléistothèces (sexué), pycnides (asexué)
- Mycélium diffus, épais, coloré ou incolore,
- Présence de types de spores sexuelles (oospores, zygosporos, ascospores, basidiospores) ou asexuées,
- Type et apparence du système sporal,
- Présence de type de structure particulière.

II.7. Evaluation de l'activité cellulasique

Les cultures des différentes colonies ont été réalisées dans des tubes à essai contenant chacun 10ml de milieu CMC liquide additionné de 1 % de cellulose. Les tubes sont inoculés par 1 ml d'une préculture de chaque souche et incubés à 28°C sur agitateur pour une durée de 72h.

L'activité CarboxyMéthylCellulase (ou CMC-ase) est mesurée selon la méthode de Bernfeld (1955) cité par Bensmira (2006), utilisant l'acide 3,5-dinitro-salicylique (DNS), dont le principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés lors de l'hydrolyse de la cellulose.

A chaud et en milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (aussi appelé acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque) qui joue le rôle d'oxydant, le glucose étant le réducteur. L'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la concentration de l'ose si l'on opère dans des conditions physico-chimiques constantes.

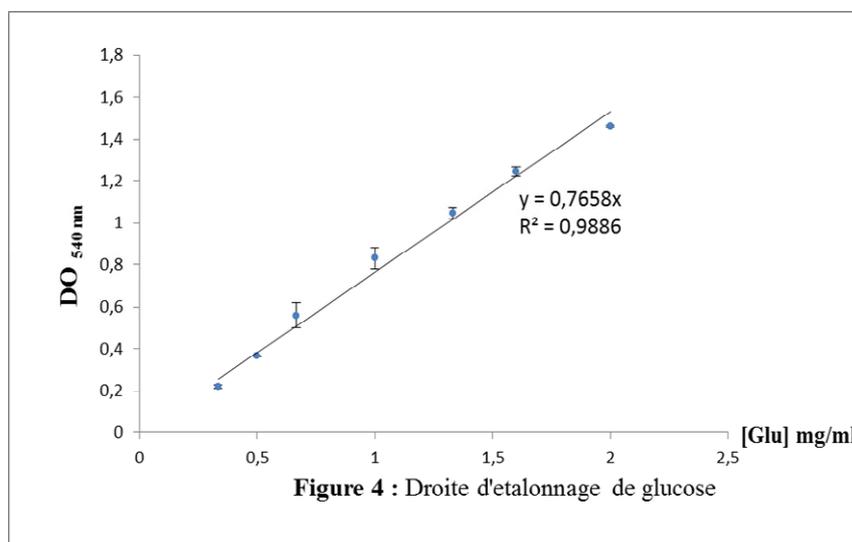
L'activité enzymatique (ou CMC-ase) est exprimée par l'unité internationale, définie comme étant une micromole de glucose libéré par minute et par millilitre ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$), à 50°C et à pH 5.

Remarque : Nous avons introduit dans cette étude une colonies de référence, *Trichoderma reesei*, connue pour son haut potentiel de dégradation de la cellulose.

II.7.1. Dosage des sucres réducteurs par le DNS

Dans les conditions standards, l'activité cellulasique a été mesurée dans $500\mu\text{l}$ de tampon citrate de sodium (50 mM, pH 4,8) contenant 0,2 % (m/v) de cellulose et $250\mu\text{l}$ de solution enzymatique. Le milieu réactionnel a été incubé à 50°C pendant 30 min. Ensuite, $1500\mu\text{l}$ de solution de DNS y ont été ajoutés. Le mélange a été homogénéisé et chauffé au bain-marie bouillant (100°C) pendant 5 min, puis refroidi dans de l'eau glacée. La densité optique a été mesurée au spectrophotomètre à 540 nm contre un témoin contenant les réactifs à l'exception de la solution enzymatique.

La quantité de sucres réducteurs libérés a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'une solution de glucose à 2 mg/ml (figure 4). La quantité de sucres réducteurs est exprimée en mg équivalent de glucose.



Résultats et Discussions

III.1. Résultats des analyses des sols

Les résultats relatifs à l'analyse du pH et du CaCO₃ (%) des sols étudiés figurent dans le tableau 1.

Tableau 1 : les résultats de l'analyse du pH et du CaCO₃

Echantillons	pH _{eau}	pH _{KCl}	(%) CaCO ₃
Sol de la décharge publique de Boulimat	7.2	7.0	4.70
Sol du jardin botanique d'Oued Ghir	7.8	7.3	27.1

En tenant compte de l'échelle de classification établie par Gaucher (*in*Soltner, 1988), le sol d'Oued Ghir est légèrement alcalin (pH_{eau}=7.8), avec une teneur élevée en calcaire total (27,1%) ; alors que le pH du sol de la décharge de Boulimat est neutre (pH_{eau}=7.2), avec une teneur en calcaire total très faible.

III.2. Test de biodégradation du papier

Les résultats relatifs au test préliminaire (tableau 2) montrent qu'il y a eu dégradation du papier dans les sols étudiés. Cette dégradation est beaucoup plus importante et rapide dans le sol de la décharge publique. La dégradation du papier s'explique probablement par la richesse des sols en matière organique, responsable de la stimulation des microorganismes cellulolytiques.

Tableau 2 : Résultats du test de biodégradation du papier dans les sols

Échantillons	Résultats du test de la biodégradation	Photo prise le premier jour du test 21/01/2013	Photo prise après 13 jours 02/02/2013
Sol de la décharge publique de Boulimat	++++		
Sol du jardin botanique d'Oued Ghir	++		

(++++) Dégradation très importante du papier

(++) Dégradation faible du papier.

III.3. Isolement et dénombrement des champignons

L'isolement des champignons sur milieu de culture gélosé, à partir d'un sol est une étape indispensable car elle permet, d'une part, d'effectuer un dénombrement des champignons par comptage des colonies isolées ainsi obtenues et, d'autre part, de vérifier la pureté des isolats d'un échantillon de sol pour réaliser des identifications.

La figure 5 indique la densité des populations analysées dans les deux sols étudiés. Le dénombrement des champignons montre que le sol de la décharge de Boulimat a une densité nettement supérieure ($6,7 \cdot 10^5$ UFC/g sol) à celle de l'Oued Ghir ($1,4 \cdot 10^5$ UFC/g sol). Il y a lieu de signaler que c'est les souches levuriformes qui prédominent surtout dans le sol de la décharge de Boulimat.

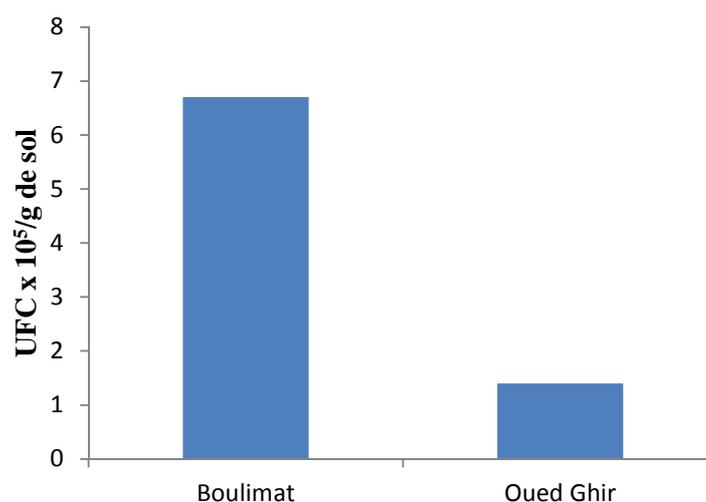


Figure 5 : Densité des champignons dans les sols

Par ailleurs, le travail effectué a permis d'isoler 30 souches dont 11 souches de moisissures (de couleur verte, blanches à beige et d'aspect poudreuses ou filamenteux) et 19 souches levuriformes (sèches ou visqueuses).

Les colonies sèches ou visqueuses de levures ont été éliminées volontairement par des repiquages consécutifs nécessaires à la purification des souches fongiques. La suite de notre étude ne s'est intéressée qu'aux formes filamenteuses.

III.4. Sélection des souches cellulolytiques

La quantification des cellulases fongiques sont des objectifs difficiles à atteindre (Stephen *et al.*, 2003). De ce fait, deux milieux différents ont été mis au point pour permettre une sélection primaire des souches cellulolytiques: un milieu minéral liquide contenant une bandelette de papier filtre et un milieu solide contenant de la carboxy méthyl cellulose, comme unique source de carbone. Ces deux tests nous ont permis de sélectionner les souches fongiques ayant un potentiel de dégradation de la cellulose.

L'analyse des résultats du tableau 3 montre que seules 4 colonies parmi les 11 colonies isolées, sont capables de dégrader le papier. Les colonies OG_{4a2}V et OG_{4a2}O ont révélé un potentiel cellulolytique important vis à vis du milieu liquide, par leur capacité à couper complètement le papier filtre. Par contre, les colonies OG_{3b2} et BM_{4a2} ont montré une croissance faible avec un mycélium peu développé (figure 6).

Tableau 3 : Observation des tubes pour la dégradation du papier (teste du papier)

colonies	Croissance sur le papier	Rupture du papier	Dégradation du papier
OG _{4a2} V	+++	+++	+++
OG _{4a2} O	+++	+++	+++
OG _{3b2}	++	--	--
BM _{4a2}	++	--	--
BM _{4d2}	--	--	--
BM _{6b2}	--	--	--
BM _{3c2}	--	--	--
OG _{4c2}	--	--	--
BM _{3a2}	--	--	--
BM _{6a2}	--	--	--
OG _{3a2}	--	--	--

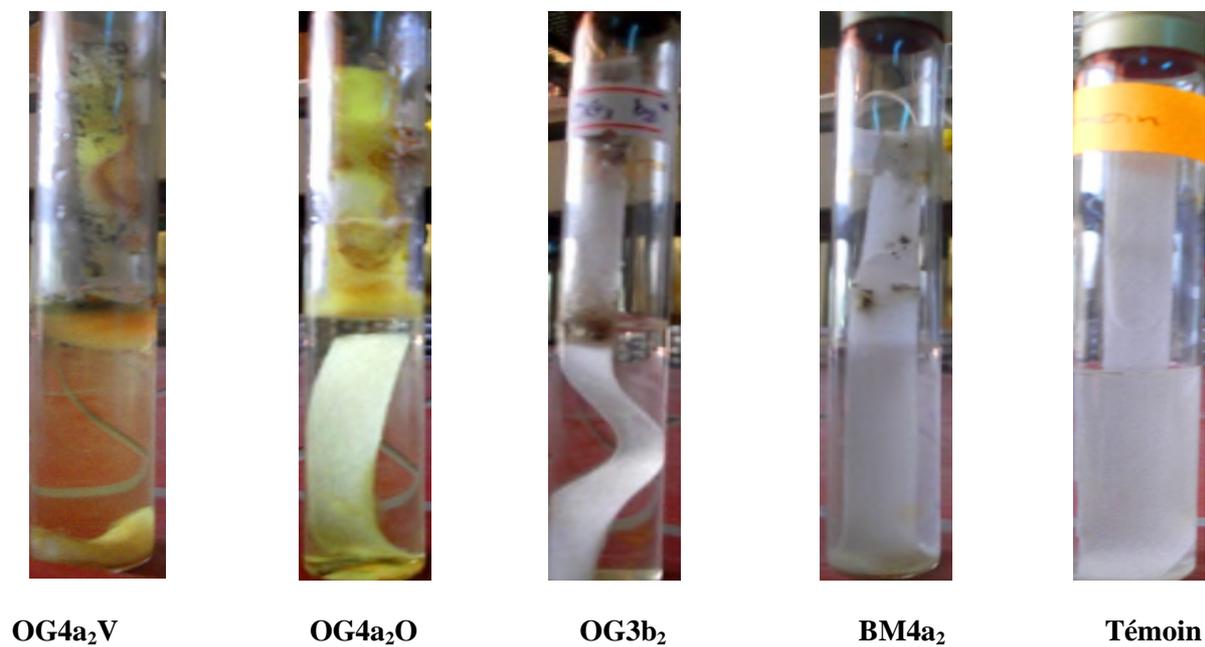


Figure 6: Les différents cas de figure observés sur le papier filtre Wattman N°1 après 7 jours d'incubation à 28°C.

Toutes nos observations ont été comparées à un tube témoin qui au bout du 30^{ème} jour d'incubation n'a pas changé d'état grâce à sa structure (cristaux très serrés). En effet, cette structure ne peut être endommagée que par l'action de l'exoglucanase (un sous-groupe de cellulase) (Nam Sun Wang, 2003). Les mycètes qui la produisent ont la capacité de dissoudre les fibres de cellulose du papier (ou du coton) et faire ainsi désagréger le matériau (Carlile et Watkinson, 1997), leur potentiel cellulolytique est déterminé par les différentes modifications apparentes sur le papier (Hee *et al.*, 1993).

La croissance mycélienne des souches fongiques sur la partie immergée du papier, est due probablement à l'absorption des spores par le papier filtre. Leur condensation vers son extrémité terminale entraîne une croissance par fixation au support cellulosique. Ce phénomène d'adhésion se traduit par :

- La présence d'enzymes cellulasiques à la surface des cellules fongiques (Wachinger *et al.*, 1989 ; Bond et Stutzenberger, 1989). Par cet effet de proximité, l'enzyme devient plus active lorsqu'elle est immobilisée à la surface du substrat, et la réaction de dégradation de la cellulose devient plus intense (Nam Sun Wang, 2003).
- La spécificité des mycètes filamenteux cellulolytiques, qui ont la capacité de pénétrer les substrats cellulosiques par les prolongements des hyphes, présentant ainsi leurs structures mycéliennes en cavités confinées dans les particules cellulosiques (Eriksson *et al.*, 1990).
- La formation d'un voile mycélien à la limite liquide/air s'expliquant probablement par l'effet du flottement des spores s'associant ainsi à la région cellulosique la plus proche (Nam Sun Wang, 2003)

Par ailleurs, la figure 7 montre que les quatre colonies OG_{4a2}V, OG_{4a2}, OG_{3b2} et BM_{4a2} ont pareillement révélé une capacité à assimiler la cellulose sur milieu solide à base de CMC.

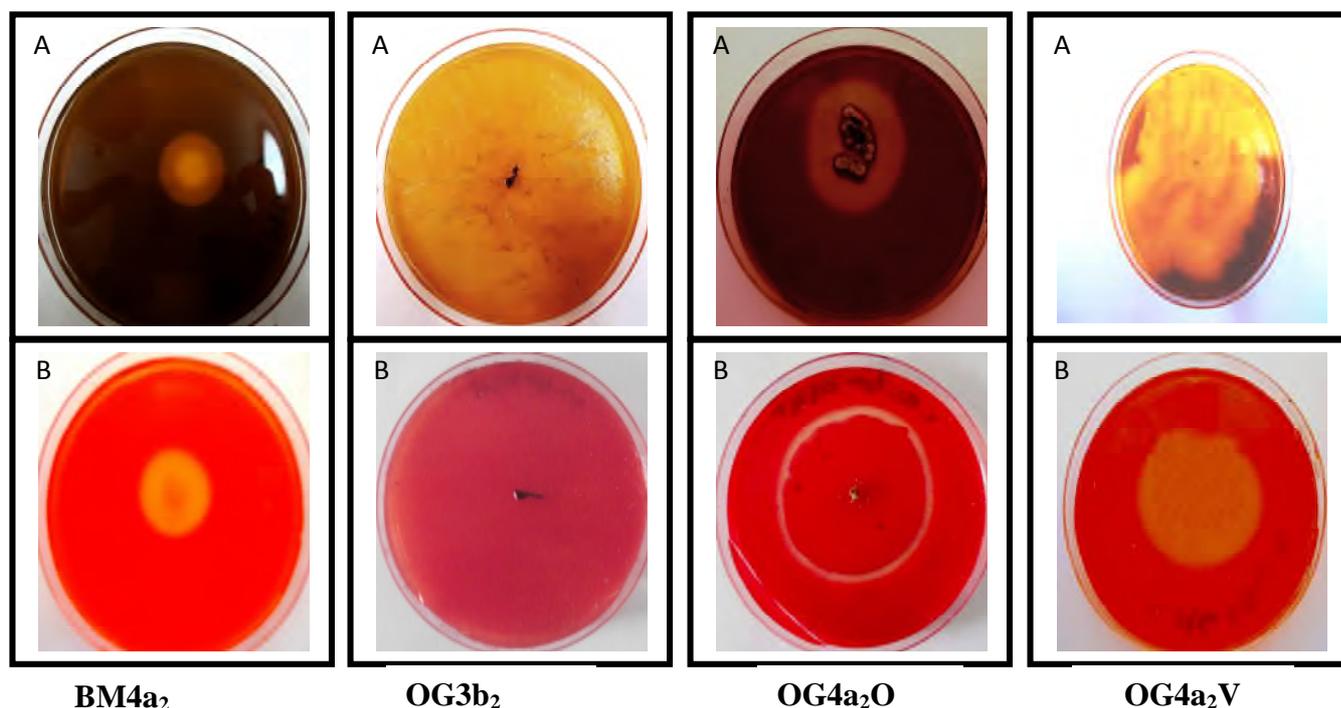


Figure 7: Les différents cas d'halos observés sur milieu CMC-agar

A- réactif iodo-ioduré (solution de lugol) **B-** réactif rouge Congo

Les colonies OG_{4a2}V et OG_{3b2} semblent présenter une activité cellulolytique très importante, avec une croissance rapide et un envahissement presque complet de la boîte après trois jours d'incubation. Il y a lieu de noter que l'importance et la rapidité de la croissance de la colonie OG_{3b2} ont empêché l'apparition des halos clairs autour des colonies ; alors que les colonies OG_{4a2}O, BM_{4a2} et OG_{4a2}V ont présenté des halos clairs et visibles autour des colonies, révélés aussi bien par le rouge Congo qu'avec la solution de lugol.

L'analyse de ces résultats laisse indiquer que les quatre colonies ont une capacité à assimiler la cellulose, comme seule source de carbone et d'énergie. Ces colonies possèdent donc des cellulases capables de scinder le polymère (la cellulose) en oligomères de petite taille assimilables par les champignons.

III.5. Identification des champignons

La caractérisation des champignons cellulolytiques est basée sur les critères d'identification cités dans le chapitre matériel et méthodes.

III.5.1. Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches sélectionnées sont étudiés sur les milieux PDA, Czapek-Dox, CMC-agar et GEM les plus communément utilisés. Les critères macroscopiques reposent sur l'observation de la couleur (recto et verso), la taille, le relief, l'aspect (filamenteux, collant), la transparence (opaque, translucide) et l'aspect de la pigmentation des colonies.

1- La coloie (**BM_{4a2}**), isolée du sol de Boulimat, présente des colonies d'aspect poudreux, un mycélium aérien de couleur vert olive et un mycélium du substrat vert. Une surface plane, ne présentant aucun pigment sur le revers de la boîte. Elle est caractérisée par une croissance très rapide sur les milieux utilisés, en envahissant la boîte au bout du 4^{ème} jour d'incubation.

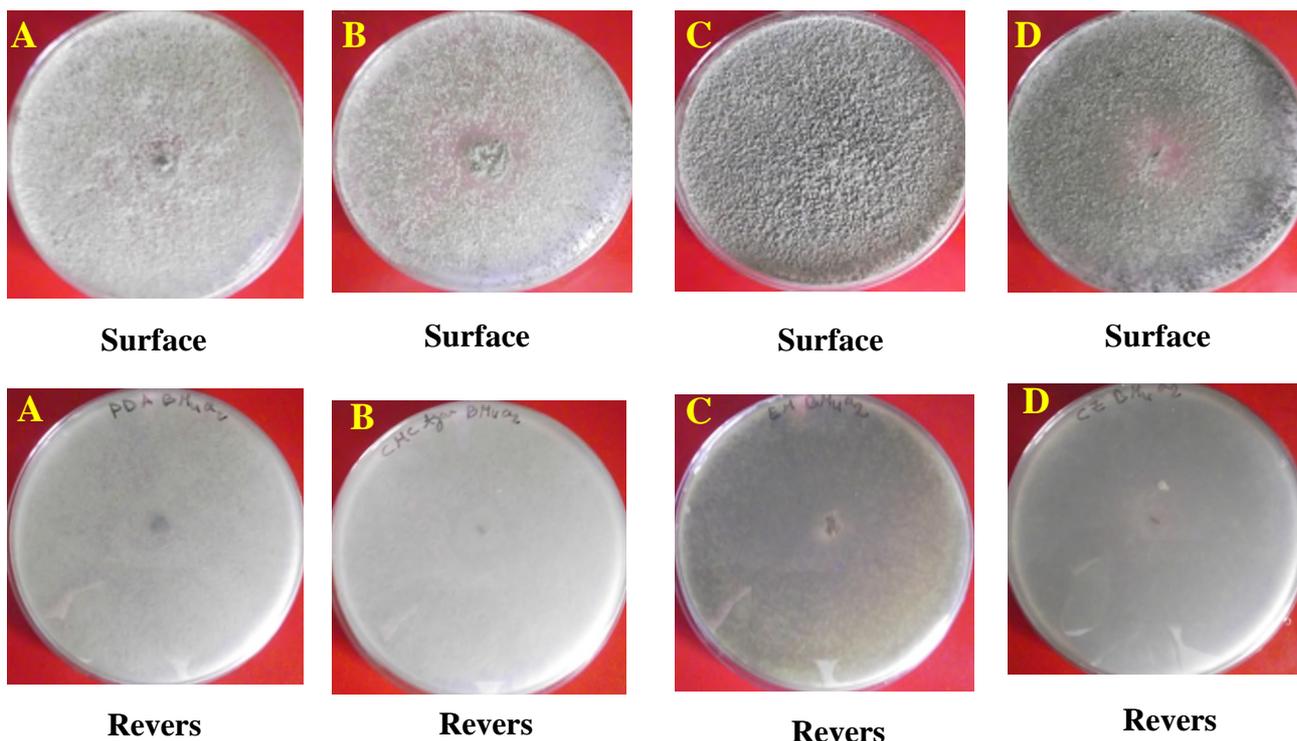


Figure 8 : Les caractères macroscopiques de la souche (**BM_{4a2}**)

A = Milieu PDA ; B =Milieu CMC-agar,C =Milieu CzapekDox ; D=Milieu GEM

2- La colonie (**OG_{4a2V}**), isolée du sol d'Oued Ghir, présente un mycélium aérien de couleur vert olive et un mycélium du substrat vert. Des colonies d'aspect poudreux, une surface plane, ne présentant aucun pigment sur le revers de la boîte. Sa croissance est très rapide sur les milieux utilisés, en envahissant la boîte au bout du 4^{ème} jour d'incubation.

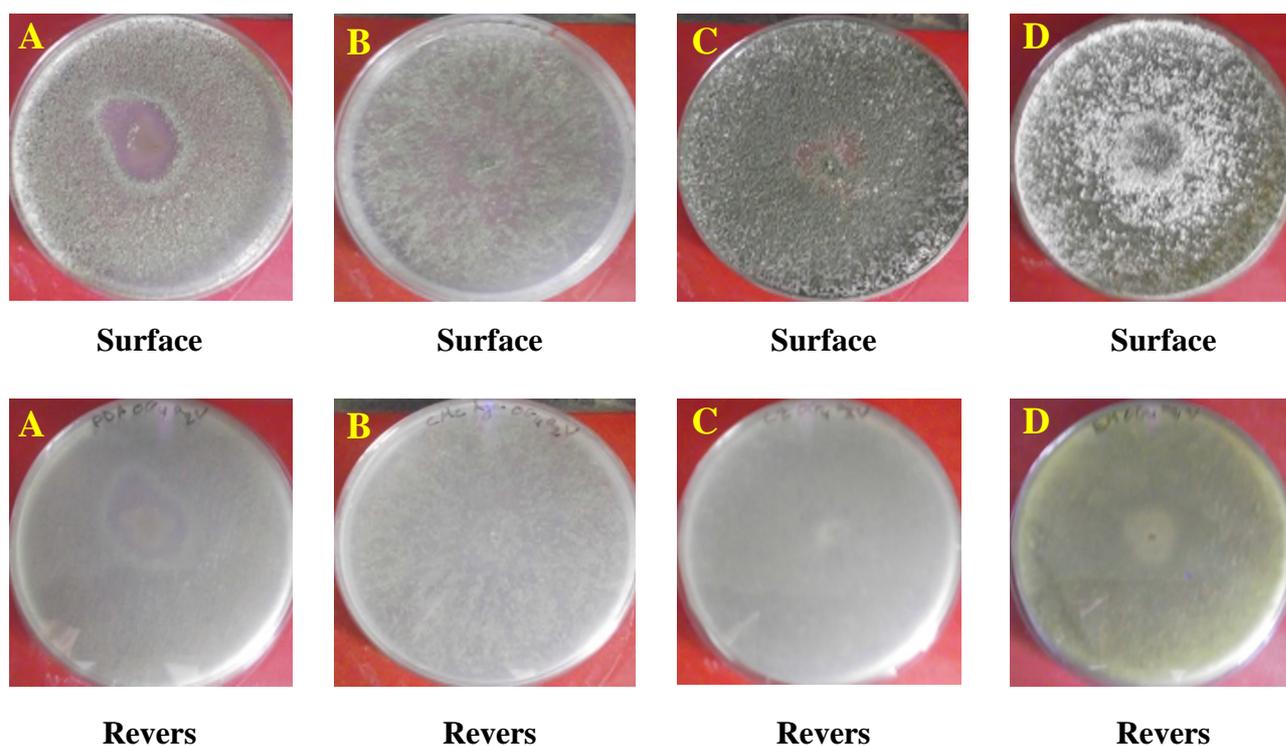


Figure 9 : Les caractères macroscopiques de la souche (**OG_{4a2V}**)

A = Milieu PDA ; B =Milieu CMC-agar,C =Milieu CzapekDox ; D=Milieu GEM

3- La colonie (**OG4a₂O**), isolée du sol d'Oued Ghir, présente des colonies plates d'aspect duveteux à poudreux, un mycélium aérien de couleur crème au centre et blanche en périphérie, avec apparition d'exsudats jaunes en vieillissant. Un mycélium du substrat extensif hyalin, jaune à brun-orange et plus ou moins immergé dans la gélose. Le revers est craquelé, de couleur jaune à brun-orange. Une surface bombée avec des rides partant du centre jusqu'à la marge. Une bonne croissance sur tous les milieux utilisés au bout de deux à trois jours d'incubation.

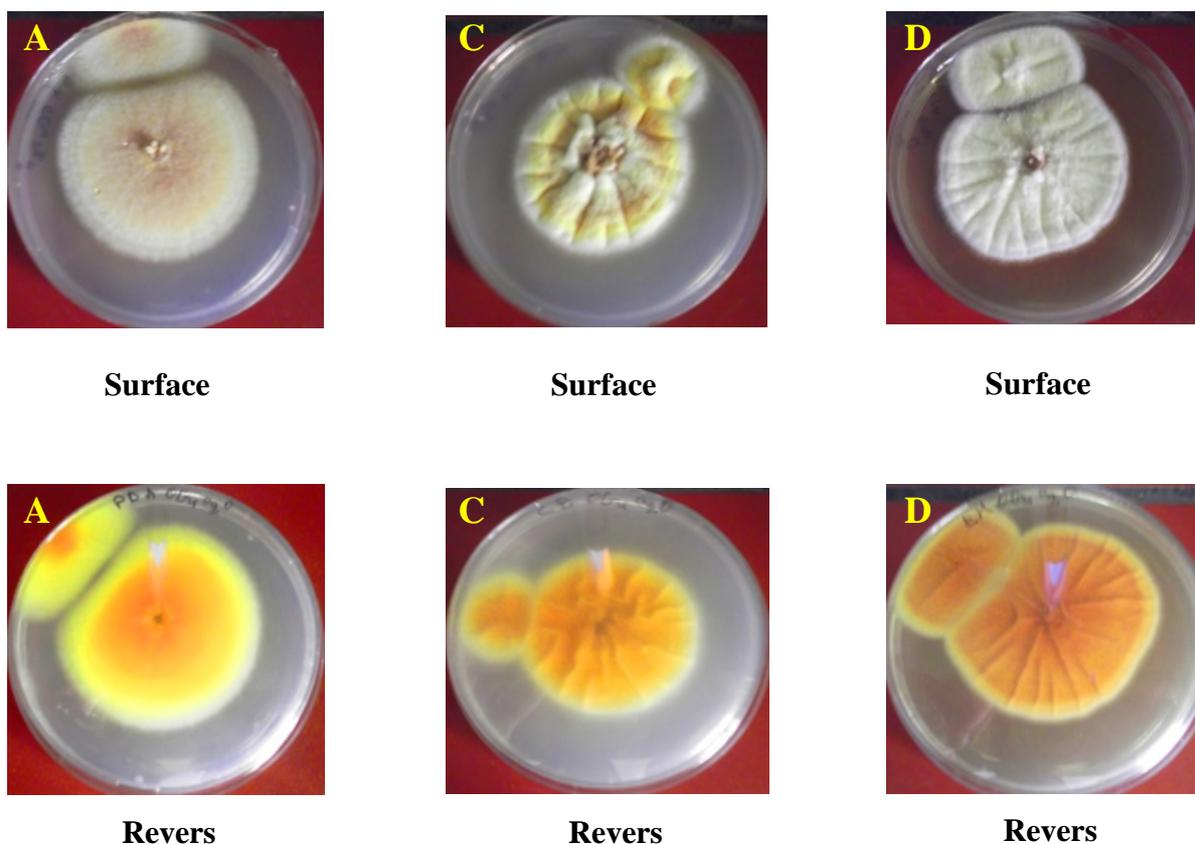


Figure 10: Les caractères macroscopiques de la souche (**OG4a₂O**)

A = Milieu PDA ; B = Milieu CMC-agar, C = Milieu CzapekDox ; D = Milieu GEM

- 4- La colonie (**OG_{3b2}**), isolée du sol d'Oued Ghir, présente des colonies cotonneuses, un mycélium aérien de couleur blanc beige à brun et un mycélium du substrat incolore. Une surface cotonneuse et des hyphes présentant un port élevé. Elle ne présente aucun pigment. Une croissance rapide sur les milieux utilisés, en envahissant la boîte au bout du 2^{ème} jour d'incubation.

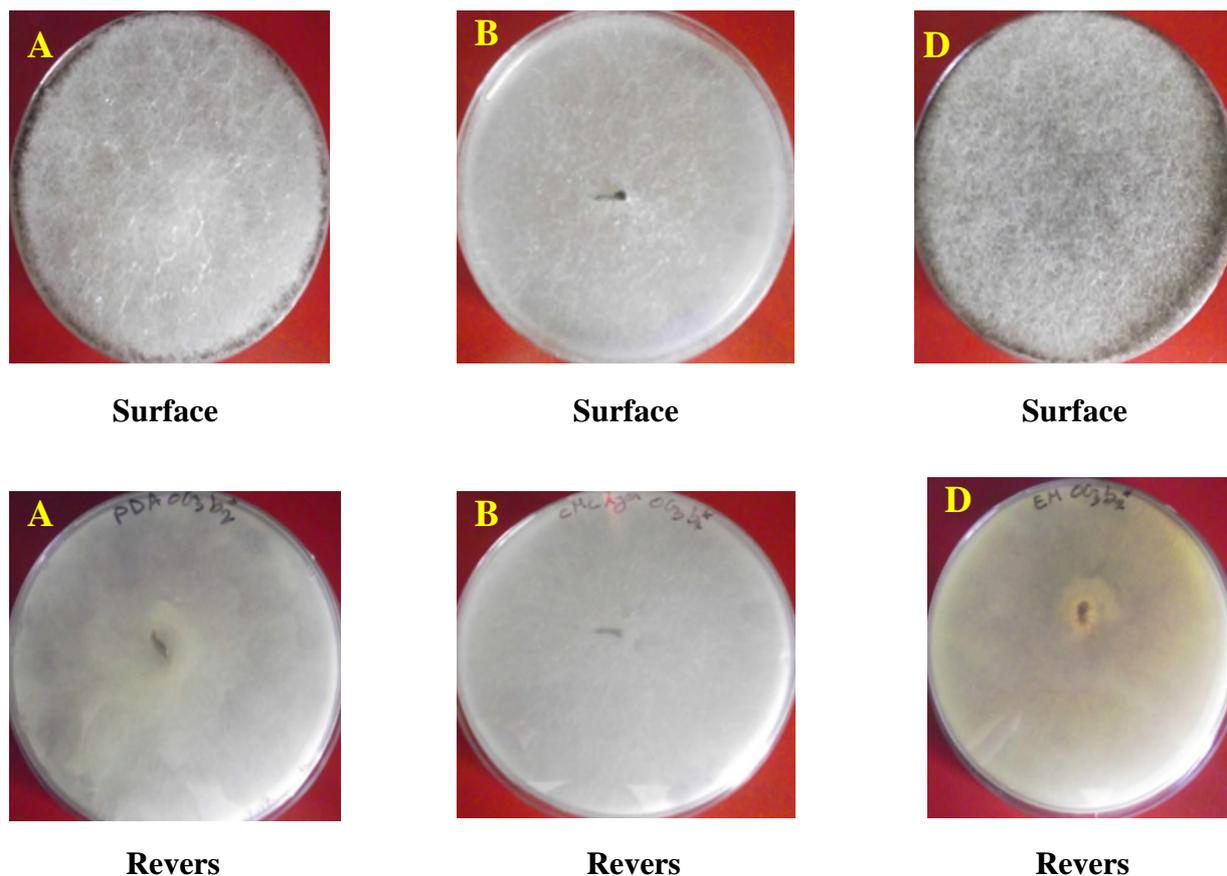


Figure 11: Les caractères macroscopiques de la souche fongiques (**OG_{3b2}**)

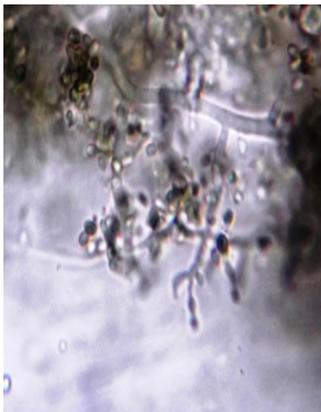
A = Milieu PDA ; B =Milieu CMC-agar, C =Milieu CzapekDox ; D=Milieu GEM

III.5.2. Etude microscopique

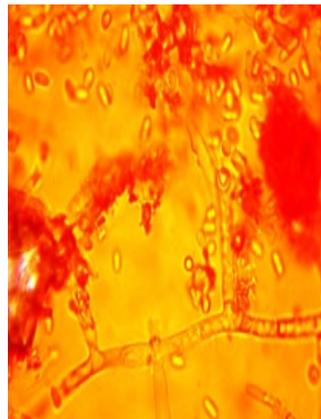
Les caractéristiques microscopiques des souches fongiques sélectionnées ont portées essentiellement sur la forme des conidiophores, des conidies et du mycélium.

- Les colonies (**OG_{4a2V}**, **BM_{4a2}**), bien qu'elles soient isolées de différents sols, ellesont les mêmes caractères, à savoir :
 - un conidiophore hyalin en touffe compacte, septé (cloisonné) et très ramifié, irrégulièrement verticillé avec des ramifications à angle droit par rapport à l'axe principal.
 - des phialides, ovoïdes à ellipsoïdales, isolées ou groupées en petit nombre (2-3) sont disposées sur les branches, généralement perpendiculaires à l'axe.
 - des conidies unicellulaires, rondes ou ellipsoïdales,formant des glomérules au sommet des phialides.

Ces critères permettent de rattacher nos deux colonies au genre **Trichoderma sp1**, **Trichoderma sp2**.



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du KOH



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du rouge Congo



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du bleu de coton

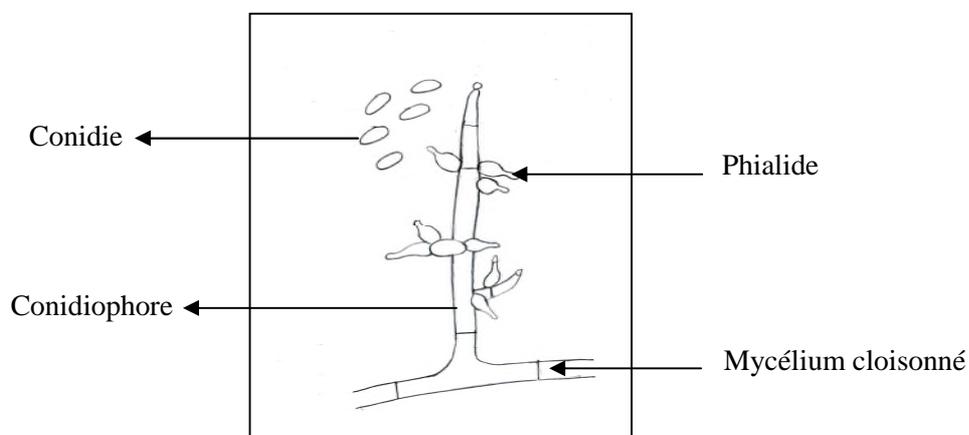
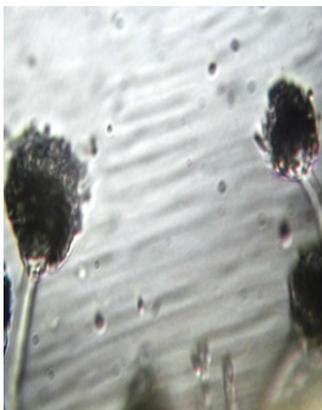


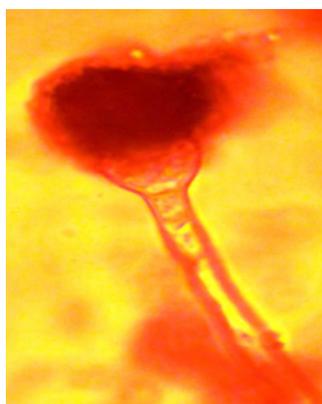
Figure 12 : Les caractères microscopiques des colonie (**OG_{4a2V}**, **BM_{4a2}**)

- La colonie (**OG4a₂O**) présente les caractéristiques suivantes :
- un mycélium cloisonné
 - des conidiophores nombreux, dressés et non ramifiés, terminés en vésicule et portent des vésicules hémisphériques
 - les têtes conidiennes sont bisériées, très longues et cylindriques
 - des phialides formés directement sur la vésicule
 - des conidies en chaînes divergentes, globuleuses jusqu'à ellipsoïdales

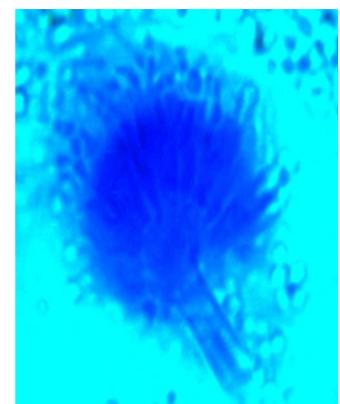
Cette souche semble appartenir à *Aspergillus terreus*.



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du KOH



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du rouge Congo



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du bleu de coton

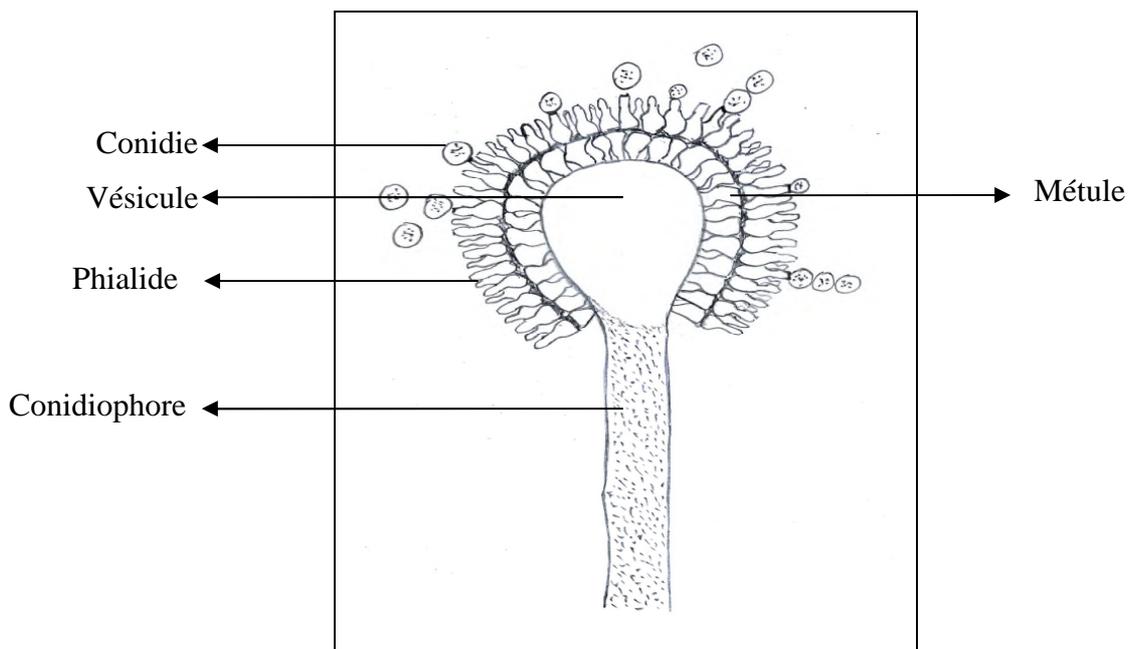


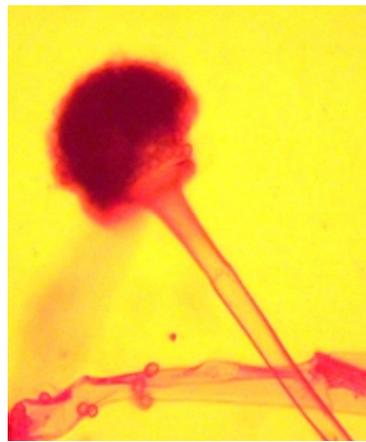
Figure 13 : Les caractères microscopiques de la colonie fongique sélectionnée(**OG4a₂O**)

- La colonie (**OG₃b2**) est caractérisée par :
- un mycélium ou des hyphes très larges et non cloisonnés.
 - un conidiophore séparé du conidiocyste par une membrane appelée columelle.
 - Un conidiocyste renfermant des conidiospores.
 - la présence de stolons et des rhizoïdes pigmentés.

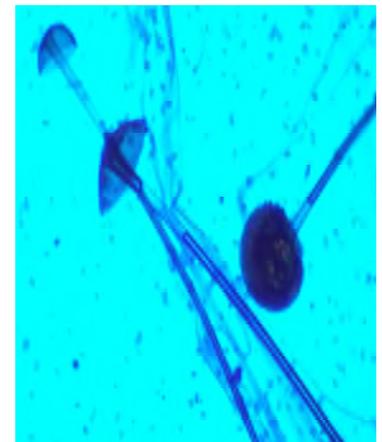
Ces critères ressemblent à ceux décrits pour le genre **Rhizopus**.



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du KOH



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du rouge Congo



Aspect microscopique de la colonie, colorée avec du bleu de coton

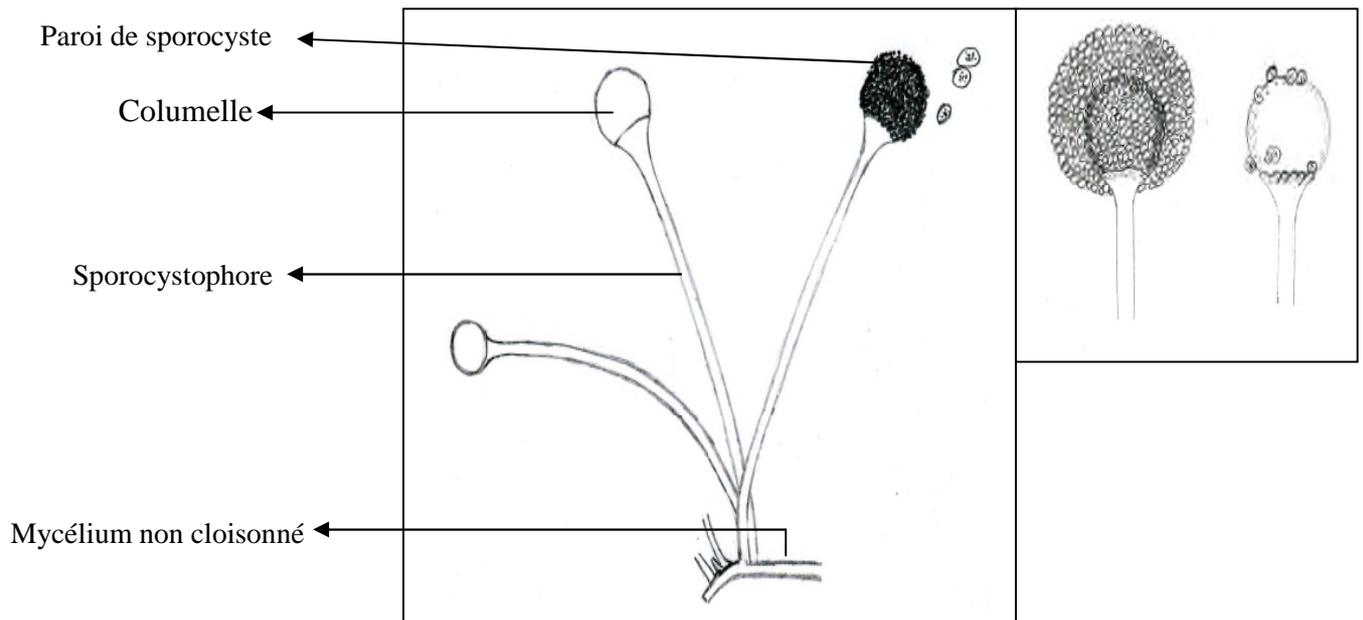


Figure 14 : Les caractères microscopiques de la colonie fongique sélectionnée (**OG₃b2**)

Les caractères morphologiques et microscopiques des quatre colonies citées précédemment correspondent parfaitement aux descriptions communément admises par Cahagnier, (1998) et Guillaume (2006). Ces caractères permettent de rattacher :

- les colonies (**OG4a2V**) et (**BM4a2**) au genre *Trichoderma*
- la colonie (**OG4a2O**) à *Aspergillus terreus*
- la colonie (**OG3b2**) au genre *Rhizopus*.

Trichoderma sont des champignons filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. La forme parfaite appartient à la classe des Ascomycètes (*Hypocrea*). Ce genre comprend 20 espèces environ, la plupart sont cellulolytiques. Les colonies sont laineuses, à croissance très rapide, de couleur blanche, jaune-verte ou verte, avec un mycélium hyalin presque invisible se colorant rapidement en vert par la sporulation et un revers clair. Ils possèdent des conidies hyalines globuleuses, des conidiophores très ramifiés de façon plus au moins orthogonale, portant de phialides courtes en forme de quilles. Ils ont un intérêt agro-alimentaire dans la production de cellulase et d'hémicellulase et comme exhausteur d'arômes. Certaines espèces sont utilisées en lutte biologique pour la protection d'arbres et cultures végétales contre l'attaque d'agents phytopathogènes (Cahagnier, 1998).

Aspergillus terreus fait partie du groupe phylogénétique des Ascomycètes, à filaments hyalins et cloisonnés. Il se distingue des autres espèces d'*Aspergillus* par la couleur brun-cannelle de ses colonies, par ses têtes aspergillaires en colonnes compactes et de diamètre uniforme et par l'existence de conidies solitaires à base tronquée qui sont produites directement sur le mycélium. Il pousse très rapidement sur tous les milieux usuels. Le mycélium est ras, cloisonné et incolore. Après sporulation les colonies deviennent duveteuses à poudreuses, et sont de teinte beige à brun-noisette caractéristique. Le verso des colonies est craquelé, incolore ou jaune à brun-orange. Il produit un exsudat abondant de couleur ambrée (Cahagnier, 1998 ; Guillaume, 2006).

Le genre *Rhizopus* fait partie des zygomycètes ayant un mycélium non cloisonné et produisant des spores non mobiles produites dans un sporange, porté par des sporangiophores insérés sur le mycélium par groupe de 3 ou 4. Au microscope, les rhizoïdes sont bruns ramifiés, localisés au niveau de l'insertion des sporangiophores sur le mycélium. Les columelles sont sphériques, affaissées en parapluies et les spores de forme irrégulière, allongées brunes striées. Le genre *Rhizopus* pousse très rapidement sur tous les milieux usuels. Il est caractérisé par des colonies laineuses de couleur gris plomb épaisse (Cahagnier, 1998 ; Guillaume, 2006).

III.6. Evaluation de l'activité cellulolytique des colonies

Pour évaluer l'activité cellulasique de nos colonies, nous avons introduit dans notre étude une colonie de référence, *Trichodermareseii*, connue parmi les colonies fongiques les plus performantes et les plus actives sur les substrats celluloliques.

Les champignons de notre collection ainsi que *Trichodermareseii* sont cultivés sur milieu liquide contenant la CMC comme seule source de carbone.

Bien qu'elle soit légèrement inférieure à la colonie de référence, *Trichodermareseii*(Tr), la colonie OG4a2V (*Trichoderma* sp.), semble présenter une activité cellulasique élevée par rapport aux colonies BM4a2, OG4a2O et OG3b2. Cette dernière montre une activité CMC-ase la plus faible (Tableau 4).

Tableau 4 : Résultats des activités CMC ases des souches

colonies	μmol de glucose/min/ml
Tr	0,296 *± 0.05
OG4a2V	0,277± 0.04
BM4a2	0,163± 0.07
OG4a2O	0,139± 0.05
OG3b2	0,03± 0.001

(*) : Représente la valeur moyenne de 3 répétitions ± écart-types

L'analyse des résultats obtenus (figure 15) montre que, parmi les 04 colonies de champignons sélectionnées, la colonie OG4a2V, se distinguent par son activité cellulolytique élevée, avec une activités CMC-ase de 0,277± 0.04 μmol de glucose/min/ml. Aussi, les colonies BM4a2 (*Trichoderma* sp.) et OG4a2O (*Aspergillus terreus*), possèdent également des activités cellulolytiques (CMC-ase) remarquables, évaluées respectivement à 0.163± 0.07 et 0.139± 0.05 μmol de glucose/min/ml. Par contre la souche OG3b2 (*Rhizopus* sp.), avec une CMC-ase de 0.03± 0.001 μmol de glucose/min/ml, possède une activité cellulolytique la plus faible, comparée à celle des autres moisissures.

Ces résultats permettent de conclure que la souche OG_{4a2V}, possède une performance de production de sucres réducteurs à partir de la CMC supérieure à celle des autres souches, à l'exception de la souche de référence.

Par ailleurs, la mise en évidence de l'activité CMC-ase dans les surnageants des cultures, particulièrement des colonies OG_{4a2V}, BM_{4a2} et OG_{4a2O}, laisse penser que les cellulases seraient extracellulaires, c'est-à-dire libérées par les champignons dans le milieu extérieur. Alors que le surnageant de la culture de la souche OG_{3b2} a révélé une faible activité cellulasique, due probablement à sa localisation endoplasmique ou périplasmique, ce qui rend sa détection difficile.

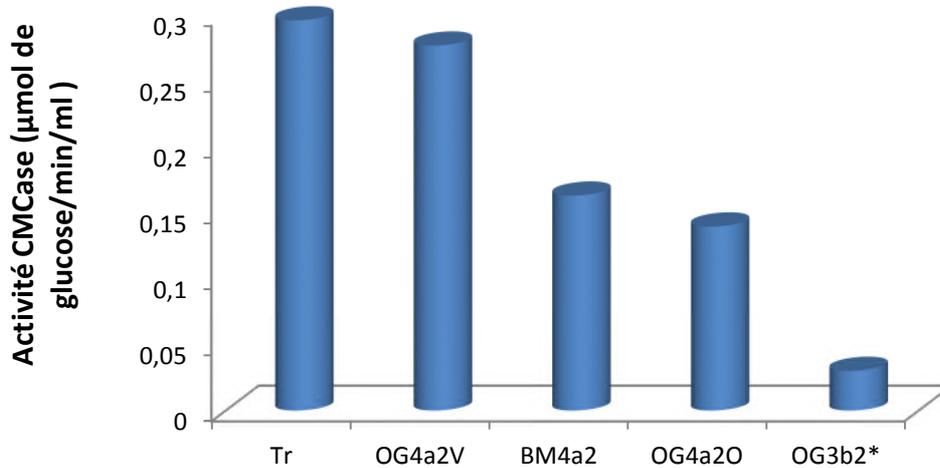


Figure 15: les activités CMC ase des colonies

Les résultats obtenus suite à la sélection des colonies cellulolytiques, nous montrent que ces colonies fongiques sont largement distribuées dans le domaine *Eucaryades* mycètes aérobies qui sont représentés parmi les subdivisions les plus cellulolytiques (Lynd *et al.*, 2002). Ainsi, les champignons de la classe des Ascomycètes, Basidiomycètes et Deuteromycètes, contiennent un grand nombre d'espèces cellulolytiques (Carlile et Watkinson., 1997), qui ont subi un nombre d'études considérable en ce qui concerne leurs enzymes cellulolytiques. Les plus étudiés étant: *Aspergillus* et *Trichoderma* (Kitamoto *et al.*, 1996 ; Lokington *et al.*, 1997 ; Riouet *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 2002) ; elles peuvent produire plusieurs types de cellulases (Scriban, 1999).

Les *Trichoderma* et les *Aspergillus* sont connus de longue date pour leurs activités cellulolytiques, elles sont considérées parmi les souches fongiques les plus cellulolytiques (Petersson *et al.*, 1981 ; Kubicek., 1998), par leur capacité à produire au moins 3 types de cellulases

(exoglucanases, endoglucanases et β -glucosidases) (Shoemaker *et al.*, 1983 ; Pentilla *et al.*, 1987 ; Chen *et al.*, 1987, Barnett *et al.*, 1991 ; Takashima *et al.*, 1999 ; Nogawa *et al.*, 2001). Ces enzymes peuvent être produites séparément ou sous forme de complexe.

D'autres études ont montré que ces microorganismes cellulolytiques possèdent au moins une endocellulase, parfois plusieurs tel que *Trichoderma koningii* qui possède quatre endocellulases à caractéristiques très différentes (Scriban, 1999), ce qui explique leur utilisation dans plusieurs industries : pharmaceutiques, agroalimentaires et chimiques (Demain, 2000).

CONCLUSION

La cellulose représente la principale source de carbone organique continuellement renouvelable grâce au mécanisme de la photosynthèse. Sa décomposition en composés de faible poids moléculaire tels que les sucres simples, permettrait de résoudre de nombreux problèmes tels que la pollution de l'environnement (par la biodégradation des déchets urbains, industriels et agro-industriels)

L'étude des sols a montré, selon le site considéré, un nombre variable de micro-organismes cellulolytiques : $6,7 \cdot 10^5$ UFC/g de sol pour le site de la décharge de Boulimat et $1,4 \cdot 10^5$ UFC/g de sol pour le site de l'Oued Ghir, avec une prédominance des formes levuriennes dans les deux sols.

Sur 11 souches de champignons filamenteux isolées des sols étudiés, 04 seulement sont capables de se développer sur la carboxyméthylcellulose et sur le papier filtre.

L'étude relative aux caractères macroscopiques et microscopiques nous a permis d'identifier les 04 souches sélectionnées à 03 genres différents. Les souches OG_{4a2V} et BM_{4a2} semblent appartenir au genre *Trichoderma* sp. ; alors que la souche OG_{4a2O} serait rattachée à *Aspergillus terreus*. Enfin, la souche OG_{3b2} serait s'apparente au genre *Rizhopus*.

L'activité enzymatique (CMC-ase) de la souche OG_{4a2V} a été évaluée à 0.277 ± 0.04 μmol de glucose/min/ml. Elle est supérieure à celle des autres souches BM_{4a} (0.163 ± 0.07 μmol de glucose/min/ml) et OG_{4a2O} (0.139 ± 0.05 μmol de glucose/min/ml). L'activité la plus faible a été observée chez la souche OG_{3b2} (0.03 ± 0.001 μmol de glucose/min/ml).

En outre, la capacité de libération de sucres réducteurs à partir de la CMC chez la souche de référence, *Trichoderma reesei* (Tr) est supérieure à celle des souches locales, avec une activité CMC-ase de 0.296 ± 0.05 μmol de glucose/min/ml.

En perspective, il est souhaitable de compléter ce travail par :

- l'enrichissement de la collection par d'autres espèces de champignons filamenteux à partir d'autres milieux environnementaux ;
- la détermination des paramètres physiologiques les plus convenables (pH et températures optimaux, tampon...) sur l'activité enzymatique de nos souches ;
- la localisation cellulaire des cellulases.

Références bibliographiques

Ando S., Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K. (2002).HyperthermostableEndoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1) p:430-433.

Anonyme; (2007). Le guide de l'éco-communication. Géoddition ADEME/, *Edition EYROLLES* .p220.

Arezki D., et Berki S. (2010). Extraction et caractérisation partielle des carboxyméthyl cellulases produites à partir d'*Aspergillus niger* et de *Trichoderma* sp. cultivés sur milieu solide. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée au génie biologique. Université A. Mira-Bejaia. Faculté des sciences de la nature et de la vie. 33p.

Barnett C.C., Berka R.M., Fowler T. (1991). Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Biotechnology*. 9 p: 562-567.

Barnett H.L., Barry B., Hunter (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3^{ème} Ed. *Burgess Publishing Company*, 160p.

Beldman G., Searle-Van Leewen M.F., Rombouts F.M., Voorzangen F.G.J. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterisation and comparison of aldetectable endoglucanases, exoglucanases and s-glucosidases. *Eur. J. Biochem*. 146. p: 301-308.

Blet Jean-Michel. 2011. Aide- Mémoire. Gestion des déchets 3eme Edition Dunod; Paris.

Balket Jean-Michel. Aide-mémoire. Gestion des déchets 3^{ème} édition Dunod ; Paris ; 2011. ISBN : 978-2-10-056434-7. pp 122.

Bensmira S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol Sebkhia de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire de Magistère en biochimie- microbiologie appliquée. Faculté des sciences. Université Mentouri-Constantine.p : 77.

Berlioz S. (2007). Etude de l'estérification de la cellulose par une synthèse sans solvant. Application aux matériaux nano composites. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier-Grenoble I. p : 294 .

Birsan, C., Johnson P., Joshi M., MacLeod A., McIntosh L., Monem V., Nitz M., Rose D.R., Tull D., Wakarchuck W. W., Wang Q., Warren R. A. J., White A., and Withers S.

G..(1998). Mechanisms of cellulases and xylanases. *Biochem. Soc. Trans*. 26.p:156-160.

Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. *Edition Nathan*. pp:13-69

Bond, K., and Stutzenberger F. (1989). A note on the localization of cellulosome formation in *Thermomonospora curvata*. *J. Appl. Bacteriol.* 67. p :605-609

Boraston A., Bary M., Bru E., Creagh A.L., Gilkes N., Guarna M., Jarvis E., Johanson P., Kormos J., Me Intosh L., Me Lean B., Sandercock L., Tomme P., Haynes C., Warren A., Kilburn D.(1998). The structure and function of cellulose binding domains. In: Claeyssens M., Nerinckse W., Piens K, editors, carbohydrases from *Trichoderma reesei* and other microorganisms: structure, biochemistry, genetics and applications. *The Royal Society of Chemistry*.p: 139-146.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Raymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P.(1990). Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p :34-428

Bouchet P.H., Giraud J.L., and Vihard J. (1999). Les champignons : mycologie fondamentale et appliquée. Masson (ed). p : 5-10.

Buchholz K. Rapp P., Zadrazil F. (1983). Methods of enzymatic analysis. Volume II. Edition Bergmaeyer, H.U. Verlag Chemie, Weinheim. p: 178-180.

Cahagnier B. (1998). Moisissures des aliments peu hydratés. *Collection sciences et techniques Agroalimentaires*. pp53-75

Carlile, M. J., and Watkinson S. C. (1997). The fungi, p:269-275. Academic Press, New York, N.Y.

Cavaco-Paulo A. (1998). Processing textile fibers with enzymes. In : Erikson K.E., Cavaco-Paulo A., editors. Enzyme application in fiber processing. *ACS.Symp.Ser.* 687.p :180-189.

Chen C.M., Gritzali M., Stafford D.W.(1987). Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Biotechnology*. 5 p: 274-278.

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

Davet R. (1997). La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker, Inc., New York.

Demain A.L. (2000). Microbiol Biotechnology (feature). *Trends in biotechnology*. 18(1), p: 26-31.

Desveaux M., (2001). La fermentation de la cellulose par *Clostridium cellulytium* : métabolisme modèle d'un *Clostridium* cellulolytique mésophile. Thèse de Doctorat en Biologie Structurale, Moléculaire et Cellulaire. Université Henri Poincaré, Nancy I. 188p.

Din N., Damude H. G., Gilkes N. R., Miller R. C., Warren R. A. J., and Kilburn D.G.(1994). C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, p: 1083-11387.

Din N., Jilkes N., Tekant B., Miller R., Warren A., Kilburn D., (1991). Non hydrolytic disruption of cellulose fibers by the binding of a bacterial cellulase .*Biotechnology*. 9,p:1096-1099.

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

Florent J.(1993). Les moisissures. In (Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel).Ed .*Lavoisier Tec et Doc*. Paris. pp. 112-162.

Fujita Y., Takashashi S., Ueda M., Tanaka A., Okada H., Morikawa Y., Kawaguchi T.,rai M., Fukuda H., Kondo A. (2002). Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes.*Appl. Environ.Microbiol.*68 (10).p: 5136-5141.

Genevès L. (1990). Champignons. In (Biologie Végétale : thallophytes et microorganismes) . Ed. DUNOD . Paris. pp. 59-90.

Genevès L. (1992). Les thallophytes . In (Reproduction et développement des végétaux) Ed. DUNOD . Paris, pp. 5-16.

Gebler J., Gilkers N.R., Claeysens M., Wilson D.B., Beguin P., Wakarchuk (1992).82 W.W.(1992). Stereoselective hydrolysis catalyzed by related bet-1,4-glucanases and beta-1,4-xylanases.*J.Biol.Chem.*267. p:12559-12561.

Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Markov A.V., Skomarovsky A.A., Sinitsyna O.A., Berlin A.G., Ankudimova N.V.(2000). Indigo-binding domain in cellulose molecule.*Biocatalysisfundamentals and applications*.

Guillaume Viviane(2006). Biologie Médicale pratique « Mycologie » ISBN : 2-8041-5028-3. pp 33.34.42. Edition de Boeck université Bruxelles.

Gunnar H., Anu N., Hongbin H., Bert P., Stahlberg J., Johansson and Pettersson G.(1999). Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur. J. Biochem.* 259, p: 88-95.

Soltaner D. (1988). Les bases de la production végétale (le sol, le climat, la plante). Tome 1 : le sol. 16^{ème} édition. Ed. Collection Sciences et Techniques Agricoles. Angers, France

Hasper A.A., Dekkers E., Mil M.V., Van de Vondervoort P.j.i., De Graaff L.H. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4).p: 1556-1560.

Hee D.B., Tim A., Yanke J., Cheng K.J. and Muir A.D.(1993). Effect of Condensed Tannins on Endoglucanase Activity And Filter Paper Digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (7). P: 2132-2138.

Henrissat B., Bairoch A.(1996). Updating the sequence-based classification of glycosylhydrolases.*Biochem J.*316, p: 695-696.

Hilaire D. Biodétérioration des matériaux. Eds EDP (1994).

Houtmayers J.(2006). Livre blanc du chlore.pp 2-7.

Indge B. (2004). La biologie de A à Z. 1100 définitions, édition : *Dunod*, Paris, P344.

Jouany J-P.(1994).Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. INRA station de recherches sur la Nutrition des herbivores. Theix 63122 St Genès Champanelle. Vol.7. No.3 ;p :207-225.

Karmaker M., Ray R.R.(2011).Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases.*Research Journal of Microbiology*pp: 41-53

Kitamoto N., Go M., Shibayama T., Kito Y., Ohmiya K., Tsukagoshi N., (1996).Molecular cloning, purification and characterisation of two endo-1,4- β - glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN 616.*Appl.Microbiol.Biotrechnol.*46.p: 538-544.

Kovacs K., Megyeri L., Szakaes G., Kubicek C.P., Galbe M., Zacchi G.(2008).*Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow.*Enzyme and Microbial Technology*,43, 48-55.

Kubicek C. P., and Penttilä M. E. (1998).Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (2 ed), p: 49-72. Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom.

Li C., Yoshimoto M., Fukunaga K., Nakao K. (2007).Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose.*Bioresource Technology*98, p:1366–1372.

Linker M., Teeri T.(1996). The cellulose binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose.*Proc.Nat. Acad. Sci.* 93.p: 12251-12255.

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

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

Mandels, M., Weber, J. (1969).The production of cellulases. In :cellulases and their applications. *Adv. Chem.Ser.* -9-5 : 391-414.

Marouf A. et Reynaud J.(2007). La botanique de A à Z. Edition : Paris. P342.

- Marouf A. et Tremblin G. (2009).** Abrégé de biochimie appliquée. Edition : EDP sciences. France.
- Nam Sun Wang.(2003).** Enzyme purification by salt precipitation (Ammonia Sulfate). Department of chemical engineering. University of Maryland Park of University.
- Nogawa, M., Goto M., Okada H., and Morikawa Y. (2001).** L-Sorbose induces cellulose gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 38. p:329-334
- Odier E., Rouau X.(1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. p : 199-214. Edition Gauthier-Villard, Paris.
- Ooshima H., Burns D. S., and Converse A. O. (1990).** Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. *Biotechnol. Bioeng.* 36. p:446-452.
- Penttilä M.E., Andre E.L., Saloheimo M., Lehtovaara P., Knowles J.K. (1987).** Expression of two *Trichoderma reesei* endo-glucanases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 3 p:175-185.
- Pelmont Jean (1995).** Enzyme. Catalyseurs du monde vivant. Nouvelle édition. pp : 421-422.
- Petterson G., Farger S.L., Bhikhabhai R., Leandoer K. (1981).** In the Ekman-Days. International Symposium on wood and pulping Chemistry, SCPI, Stockholm, 111. p: 39.
- Pourquie J ; Vandecasteele J-P. (1984).** Conversion des composés lignocellulosiques par hydrolyse enzymatique et fermentation acétone-butanol. In : *Biotechnologie*. Coord. Scriban R. 2^{ème} édition Technique et Documentation Lavoisier. Paris. P :575-591 .
- Raven P.H , Evert Ray F. et Eichhorn Susan E.(2000).** Biologie végétale, Edition : Paris P :968.
- Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformational flexibility of two domain fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry.* 277 (43). p: 40887-40892.
- Reinikainen, (1994).** The cellulose binding domain of cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei*. Espoo, Finland : VTT Publications 206. PhD. Thesis.
- Riou C., Salmon J.M., Vallier M.J., Gunata Z., Barre P.(1998).** Purification, characterisation, and substrate specificity of a novel high glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64. p: 3607-3614.
- Saha B.C., Freer S.N., Bothast R.J.(1994).** Production, purification and properties of a thermostable (beta)-glucosidase from a color variant strain from *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10). p : 3774-3780.
- Sanyal A., Kundu R.K., Dube S., Dube D.K. (1988).** Extracellular cellulolytic enzymes system of *Aspergillus japonicus*. Purification and characterisation of an inducible extracellular -glucosidase. *Enzyme. Microb. Technol.* 10. p: 91-99.

- Scriban R. (1999).** Biotechnologie. p:149-156-157. 5^{ème} édition. Technique et documentation-Lavoisier (éd.).
- Scriban R. (1993).** Biotechnologie. p:32-690. 4^{ème} édition. Technique de documentation-Lavoisier (éd.).
- Schamburg et Salzmänn(1991).** Cellulase. p:1-11. In: Enzyme HandBook. Volume IV Springer- Verlag Berlin.
- Singh A., Agrawal K.A., Abidi A.B., Darmwal N.S. (1990).** Properties of exoglucanase from *Aspergillus niger*. *J. Gen. App. Microbiol.* 36. p: 245-253.
- Singhania R.R., Sukumaran R. K., Patel A.K., Larroche C., Pandey A. (2010).** Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46, p: 541-549
- Sinnott M.L.(1990).** Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfer. *Chem.Rev.* 90. p: 1171-1202.
- Shoemaker S., Schweickart V., Ladner M., Gelfand D., Kwok S., Myamlo K., Innis M.,(1983).** Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Biotechnology.* 1. p: 691-695.
- Stephen R. Decker., William S. Adney., Jennings E., Vzant T.B., Himmel M.E.(2003).** Automated Filter Paper Assay for Determination of Cellulase Activity - *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volume 107, Issue 1.3, p: 689-704.
- Strullu D.G. (1991).** Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées .Edition : Tec et Doc. Lavoisier, Paris .P :248 .
- Takashima, S., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., and Uozumi T.(1999).** Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J. Biochem.* 125. p:728-736.
- Teeri, T. T. (1997).** Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15. p: 160-167.
- Voet D. et Voet JG.(2005).** Biochimie 2^{ème} édition, p364 ; 365 ;366. Edition de Boeck université Bruxelles. ISBN: 2-8041-4795-9.
- Wachinger, G., Bronnenmeier K., Staudenbauer W. L., and Schrempf H. (1989).** Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55. p:2653-2657.
- Wertz J-L. (2009).** Structure de la cellulose et différentes voies de bioraffinage. Valorisation de la biomasse. 6^{ème} rencontres de la biomasse. Gembloux. p :1-10.

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

Zermane F.(2008). Etude des caractéristiques culturales des Actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques des composés organiques de synthèse. Mémoire de Magistère en Microbiologie appliquée. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Mentouri-Constantine.126p.

Annexes

Composition des milieux

Gélose à l'extrait de Malt

Extrait de malt : 20g

Acide citrique : 5g

Agar : 20g

Eau distillée : 1000 ml

Le milieu est stérilisé à 120°C pendant 30 min.

Milieu PDA

L'infusion de pomme de terre se prépare en faisant bouillir dans l'eau 200 g de pommes de terre tranchées (lavées et pelées) pendant 30 minutes puis en laissant décanter le bouillon obtenu. Le bouillon est ensuite filtré à travers une gaze. On dilue ensuite en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final d'un litre. Puis on ajoute 20 g de saccharose et 15g d'agar en poudre avant une stérilisation par autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu Czapek

NaNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
FeSO, 7H ₂ O	0,01g
Saccharose	30g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH 5, stérilisation par autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

Asque : cellule dans laquelle se forment les ascospores.

Conidie : Spore de reproduction asexuée

Conidiospore : partie de mycélium ; plus ou moins longue portant des spores asexuées.

Columelle : stipe filament spécialisé partant la spore ou l'organe de reproduction asexuée

Hyphe : (féminin ou masculin) filament tubulaire cloisonné ou non cloisonné (septé ou non septé)

Levure : élément fongique unicellulaire qui se reproduit par bourgeonnement

Lignine : un des principaux composants du bois, avec la cellulose, l'hémicellulose et des matières extractibles

Matrice : (ou le tissu) dans laquelle des structures plus spécialisées sont incorporées.

Métule : chez les *Aspergillus* ayant une double rangée de phialides ; nom donnée à celles de la première rangée.

Molécules organiques : Une molécule organique est une molécule plus ou moins grosse faite à base d'atomes de carbone.

Moisissure : Désigne des champignons microscopiques. Elles se développent sous l'influence de l'humidité de l'air et d'une certaine température, sur les végétaux morts et sur les matières qui s'altèrent (joints de douche, de lavabo...).

Mycélium : ensemble des hyphes ou des filaments d'un champignon

Mycète : Organisme qui appartient au règne des Mycètes (champignons)

Parasitisme : désigne le fait pour un organisme vivant de se nourrir, s'abriter ou se reproduire en tirant profit d'un autre organisme (l'hôte).

Polymère : une macromolécule de grande taille formée par l'assemblage d'un grand nombre de molécules identiques

Résineux : Arbre forestier (gymnosperme) riche en matières résineuses, contenues dans les canaux résinifères. (Les principaux résineux sont le pin et le sapin, l'épicéa, le mélèze, l'if, le cyprès, le cèdre, le genévrier et le thuya.)

Rhizoïdes : Filament ramifiés dont l'aspect et la fonction évoquent des racines pénétrant dans le substrat (Mucorales).

Saprophyte : Un organisme est dit saprophyte s'il est capable de se nourrir de matière organique en décomposition

Sporocyste : chez les zygomycètes ; vésicule portée par un pédicelle sporocystophore renfermant les spores asexuée

Stolon : chez les Mucorales filament aérien long issu du substrat et capable de se refixer à distance grâce aux Rhizoïdes.

Spore : élément résultant de la reproduction du champignons

Symbiose : mode de vie association d'organisme différents s'apportant des avantages mutuels.

Thalle : organisme fongique uni ou multicellulaire formant une structure plus ou moins organisée

Zygomycète : Champignon siphomycète tel que les mucorales et les entomophtorales, caractérisé par un mycélium non cloisonné et une reproduction sexuelle par isogamie, conduisant à la formation de zygosporos.

Résumé

La cellulose est le polymère organique le plus abondant sur terre et est considérée comme une source inépuisable. Sa biodégradation est assurée par des micro-organismes cellulolytiques capables de produire des systèmes enzymatiques (appelés cellulase) dont le rôle principal est d'hydrolyser les macromolécules de cellulose.

L'objectif de notre travail est l'isolement et la caractérisation des champignons cellulolytiques à partir de deux sols.

La première partie de notre travail nous a permis d'isoler et d'identifier quatre espèces appartenant à trois genres différents capables de dégrader la cellulose. Ces espèces seraient rattachées aux genres suivants : *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Rhizopus*.

Dans la deuxième partie, on a confirmé nos résultats de sélection de souche cellulolytique par un test d'évaluation de l'activité cellulosique.

Mots clés : Cellulose, micro-organismes cellulolytiques, Cellulase, biodégradation.

Abstract

Cellulose is the most abundant organic polymer on earth and is considered an inexhaustible source. Biodegradation is provided by cellulolytic microorganisms capable of producing enzymatic systems (called cellulase) whose role is to hydrolyze the cellulose macromolecules.

The objective of our work is the isolation and characterization of cellulolytic fungi from two soils.

The first part of our work has enabled us to isolate and identify four species belonging to three different genera capable of degrading cellulose. These species are related to the following genus: *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Rhizopus*.

In the second one, we confirmed our results of strain selection cellulolytic by an evaluation of the test cellulase activity.

Keywords: Fungi, soil, cellulase, cellulose