

Sommaire

Introduction	11
Revue bibliographique	
I. Cellulases.....	14
1. Les enzymes et leur mode d'action.....	14
1.1. Endoglucanases.....	15
1.2. Exoglucanases.....	16
2. Substrat.....	16
3. Micro-organismes producteurs des cellulases.....	17
4. Production des enzymes cellulolytiques.....	18
5. Applications des cellulases dans différents domaines.....	19
5.1. Industrie du textile.....	19
5.2. Extraction de l'huile d'olive.....	19
5.3. Extraction des caroténoïdes.....	21
5.4. Industrie alimentaire.....	21
5.5. Industrie de l'alimentation animale.....	21
5.6. Industrie du papier.....	22
II. Pectinases.....	22
1. Substrat.....	22
2. Structure des substances pectiques.....	23
3. Enzymes pectinolytiques.....	24
3.1. Classification des enzymes pectinolytiques.....	24
3.1.1 Pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME).....	25
3.1.2. Dépolymérase.....	25
3.2. Régulation des enzymes pectinolytiques.....	27
4. Applications biotechnologiques.....	27
4.1. Extraction des jus de fruit.....	28
4.2. Traitement du textile.....	28
4.3. Extraction des huiles.....	28
III. Effet des agents physico-chimiques sur l'activité enzymatique.....	28
1. Effet de la température.....	29
2. Effet de du pH.....	29

Matériel et méthodes

I. Matériel biologique	32
II. Criblage des souches productrices d'enzyme.....	32
1. Activité cellulase	32
1.1. Milieu de la révélation	33
1.2. Révélation de l'activité cellulase	33
2. Activité pectinase	34
2.1. Milieu de la révélation de l'activité pectinase	34
2.1. Révélation de l'activité pectinase	34
3. Estimation des activités enzymatiques	34
III. Identification biochimique.....	35
1. Test de coloration de Gram.....	35
2. Test amylase	35
3. Test de croissance sur milieu 6,5% NaCl	36
4. Test Clarck et Lubs	36
5. Test de Citrate et Simmons	37
4 . Coloration des spores	37
5. Formation d'acide à partir d'arabinose	38
6. Test mannitol	39
IV. Identification moléculaire.....	39
1. Extraction de l'ADN	39
1.1. Préparation des solutions	39
1.2. Etapes de l'extraction	40
2. Amplification par PCR.....	41
2.1. Principe	41
2.2. Les conditions de la PCR.....	42
2.3. Révélation de l'ADN.....	43
2.4. Chargement des puits	43
3. Purification des produits PCR	43
3.1. Elimination du Triton-X	43
3.2. Elimination des amorces	43

4. Réaction de séquençage.....	44
5. Analyse informatique des séquences.....	47
V. Dosage des sucres réducteurs par la méthode du DNS.....	47
1. Principe du dosage par le DNS.....	47
2. Préparation du réactif du DNS	47
3. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose.....	48
4. Conduite du dosage.....	48
VI. Effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique	48
1. Préparation du surnageant.....	48
2. Effet de la température	49
3. Effet de différentes concentrations d'urée	49
4. Effet du pH.....	49
5. Effet du SDS et -mercaptoéthanol	49

Résultats et discussion

I. Mise en évidence des souches productrices des enzymes.....	51
1. Criblage des souches productrices de cellulase.....	51
2. Criblage des souches productrices des pectinases	52
II. Identification des souches actives.....	53
1. Identification biochimique	53
2. Identification moléculaire	55
III. Effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité des enzymes.	56
1. Effet de la température	56
1.1. Activité cellulase	56
1.2. Activité pectinase	58
2. Effet du pH.....	60
2.1. Activité cellulase	60
2.2. Activité pectinase.....	62
3. Effet de l'urée	63
3.1. Activité cellulase.....	63
3.2. Activité pectinase.....	65
4. Effet du SDS et du -mercaptoéthanol.....	66
Discussion.....	67

Conclusion et perspectives	55
Références bibliographiques	57

Introduction

Les préoccupations du public au sujet de l'environnement exercent d'avantage de pressions sur les industries afin qu'elles mettent l'accent sur la prévention contre les polluants. En réponse à ces pressions, les industries développent de nouveaux procédés biotechnologiques qui permettent de modifier et d'adapter des micro-organismes et des systèmes biologiques présents dans la nature afin de développer des produits non seulement plus rentables mais aussi respectueux de l'environnement.

Grâce à la grande spécificité d'action des enzymes, ces dernières sont devenues une alternative importante aux produits chimiques agressifs utilisés dans les différentes industries.

La conversion biotechnologique de la biomasse cellulosique est une approche durable pour le développement de bioprocessus et de nouveaux produits. Les cellulases et les pectinases microbiennes sont devenues des biocatalyseurs importants vue leur nature complexe et leur large applications industrielles.

L'hydrolyse de la cellulose par des enzymes est souvent la voie préconisée pour l'obtention des sucres fermentescibles pour les raisons suivantes :

- Les résultats de la plupart des évaluations économiques sont en faveur de l'hydrolyse enzymatique comparée à l'hydrolyse chimique.
- Elle génère peu d'effluents à traiter et pas de problèmes de corrosion,
- Elle présente des perspectives d'amélioration beaucoup plus grandes que l'hydrolyse chimique qui a fait l'objet de travaux depuis plusieurs dizaines d'années. (Daniel Ballerini., 2006).

Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'identification de certaines souches productrices des enzymes très convoitées dans le domaine agro-alimentaire et environnemental à savoir les cellulases et pectinases, puis de mettre en évidence leurs propriétés physico-chimiques via l'étude de l'effet de différents paramètres à savoir la température, le pH et l'urée dans la perspectives d'identifier des enzymes efficaces pour surmonter les défis actuels dans les différentes industries.

La production des enzymes comme la cellulase et la pectinase est influencée par plusieurs facteurs à savoir le type de la souche utilisée, les conditions de la culture et les paramètres

physico-chimiques. La relation entre ces différents facteurs a un impact important sur la production des enzymes. Dans la présente étude, la première étape est de sélectionner des souches productrices de la cellulase et la pectinase. Puis, de mettre en évidence l'effet de la température, le pH, et de différents dénaturants des protéines.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Rapport-Gratuit.com

I. Cellulases

Les cellulases sont des enzymes produites par des micro-organismes, durant leur croissance sur des matrices cellulosiques. Bien que ces enzymes sont produites par un large nombre de micro-organismes, mais, ils ne sont pas nombreux ceux qui sont capables de produire des quantités significatives des cellulases pour l'hydrolyse complète de la cellulose cristalline *in-vitro* (Saraswati Bai et *al.*, 2012).

1. Enzymes et leur mode d'action

La dégradation microbienne des déchets lignocellulosiques est assurée par l'action concertée de plusieurs enzymes, parmi lesquelles, les cellulases qui sont les plus importantes.

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose, appelées communément cellulases, sont soit sécrétées dans le milieu (cas essentiellement des champignons), soit associées à la surface externe des micro-organismes formant des systèmes complexes appelées cellulosomes (cas des bactéries anaérobies) (Daniel Ballerini., 2006).

Les cellulases ont d'abord été classées selon leur mode d'action catalytique. Actuellement, elles sont classées selon leurs structures, comme toutes les enzymes agissant sur les sucres. Ils existent trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose :

- Les **endoglucanases** (EG) ou 1,4- -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4) qui coupent la cellulose aléatoirement au niveau des zones amorphes de la cellulose, générant de nouvelles extrémités de chaînes,
- Les **exoglucanases**, comprenant les 1,4- -glucan glucanohydrolases (EC 3.2.1.74) ou cellodextrinases et les 1,4- -glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBH), qui agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose, libérant du glucose pour les glucanhydrolases ou du cellobiose pour les cellobiohydrolases,
- Les **-glucosidases** ou -glucoside glucohydrolases (EC 3.2.1.21) qui hydrolysent les cellodextrines solubles et le cellobiose en glucose (Ramesh et *al.*, 2011).

Les systèmes cellulolytiques sont des systèmes multi-enzymatiques possédant ces trois types d'action, étant ainsi capables de dégrader la cellulose figure 1 (Daniel Ballerini., 2006).

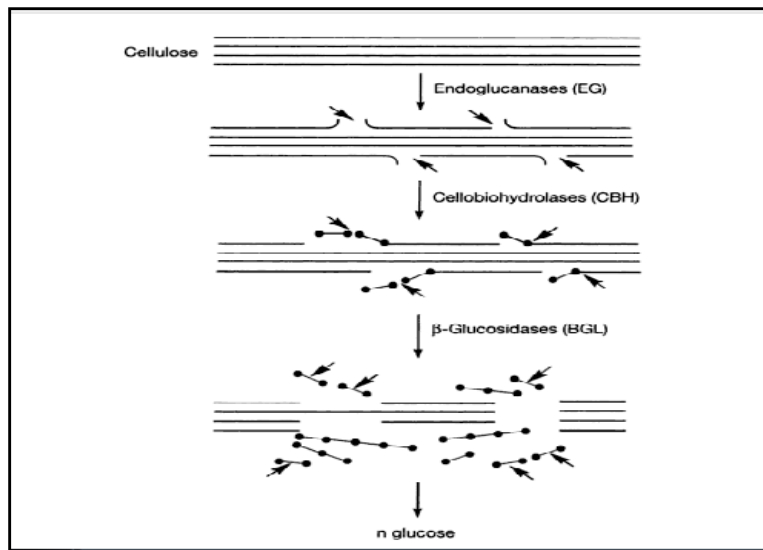


Figure 1 : mode d'action des cellulases sur les fibrilles de la cellulose.

1.1. Endoglucanases

Ces enzymes, les plus étudiées, sont généralement présentes dans le milieu de culture, mais également liées aux membranes (Fonty et al., 1988).

Chez *Ruminococcus albus* (Wood et al., 1982) plusieurs protéines de poids moléculaire variant de $5 \cdot 10^4$ à $1,6 \cdot 10^5$ Da, possédant une activité CMCase sont présentes dans le milieu de culture. Les cinétiques comparées de dégradation de la CMC par viscosimétrie et par dosage des sucres réducteurs libérés indiquent une nature commune à ces enzymes. Des protéines enzymatiques de bas poids moléculaire pourraient exister sous forme de complexes stables de haut poids moléculaire dans la paroi des bactéries et sous forme libre ou plus ou moins associée dans le milieu de culture.

Les enzymes liées à la paroi peuvent être facilement relarguées par lavages répétés avec du tampon. Les bactéries apparaissent lors de l'observation en microscopie à balayage, couvertes de protubérances qui sont éliminées par ces mêmes lavages dans du tampon. Elles sont communes à de nombreuses bactéries cellulolytiques et peuvent être associées à l'activité cellulolytique (Lamed et al., 1987).

L'activité endoglucanase associée aux cellules chez *Bacteroides succinogenes* est retrouvée associée à la membrane externe (Gaudet., 1987) et dans l'espace périplasmique des bactéries en phase exponentielle de croissance sur glucose ou sur cellobiose.

1.2. Exoglucanases

Chez *Ruminococcus albus*, après 50 h de culture sur cellulose, une cellobiohydrolase extracellulaire est active sur para nitrophenyl cellobiose (pNPC) et CMC, et peu active sur la cellulose (Ohmiya et al., 1982). Cette activité est portée par une protéine de 100 Kda pouvant exister sous forme de dimère. Une glucohydrolase active sur cellodextrine est associée aux cellules (Ohmiya et al., 1985). Elle est libérée par congélation-décongélation. Cette enzyme est importante puisqu'elle fournit directement à la bactérie du glucose à partir de polymères.

2. Substrat

Au niveau moléculaire, la cellulose est un polymère de glucose composé des unités anhydroglucosidiques reliées par des liaisons β -1,4-glycosidique. Le nombre des unités glucose dans la cellulose est variable de même que le degré de polymérisation allant de 250 à 10 000 qui dépendent grandement de la source et la méthode du traitement (Klemm et al., 2005).

La cellulose est le polymère le plus abondant dans la nature et représente une production annuelle en biomasse de $1,5 \times 10^{12}$ tonnes. Elle est considérée comme une source inépuisable en matières premières pour le développement de différents produits (Klemm D et al., 2002).

Dans la nature, la cellulose est présente à l'état pur dans quelques cas, mais majoritairement, elle est incorporée dans la matrice de biopolymères structuraux, hémicellulose primaire et la lignine. (Marchessault et al., 1993)

Le réseau cristallin de la cellulose est caractérisé par une perméabilité relative non seulement pour les grandes molécules comme les enzymes mais aussi dans certains cas pour des petites molécules comme l'eau. L'hétérogénéité de la structure polymérique de la cellulose rend les fibres partiellement hydratées, capables de s'élargir, permettant ainsi l'augmentation de la taille des cavités ce qui facilite la pénétration des molécules plus larges incluant les enzymes.

La nature cellulosique du substrat et son état physique (compacté ou non) sont des facteurs importants pour l'hydrolyse enzymatique. Bien que la biomasse lignocellulosique résiste à l'action microbienne, le traitement approprié de la perturbation de lignine et l'augmentation de l'accessibilité des enzymes pourraient élever le taux de la biodégradation. (Lynd et al., 2002).

3. Micro-organismes producteurs des cellulases

Dans la nature, la biodégradation de la cellulose est essentiellement réalisée par des micro-organismes (eubactéries et champignons) et elle a lieu aussi bien en aérobiose (par exemple à la surface du sol) qu'en anaérobiose (par exemple dans le rumen animal)(Daniel Ballerini., 2006) .

Clostridium thermocellum est la bactérie cellulolytique la mieux connue et la plus étudiée. Elle permet la conversion directe de la cellulose en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO₂) H₂). C'est l'une des rares bactéries qui produit des cellulases aussi efficaces dans l'hydrolyse de la cellulose cristalline (Johnson et al., 1982) que les cellulases de *Trichoderma reesei*.

Les micro-organismes cellulolytiques dégradent principalement les hydrates de carbone et sont généralement incapables d'utiliser les protéines et les lipides comme sources d'énergie pour leur croissance (Lynd et al., 2002) . Les bactéries productrices de la cellulase notamment *Cellulomonas cytophaga* et les champignons peuvent utiliser une variété des hydrates de carbone autre que la cellulose (Poulsen et al., 1988 ; Rajoka et al., 1997). Tandis que, les espèces anaérobies exigent une gamme restreinte d'hydrates de carbone, limitée à la cellulose ou aux produits de son hydrolyse (Ng T K, & Zeikus J G.,1982 ; Thurston et al., 1993) . L'habilité à sécréter des grandes quantités de protéines extracellulaires est une caractéristique de certains champignons. Les micro-organismes cellulolytiques les plus étudiés sont les espèces fongiques telles que *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicilium*, *Aspergillus*, et les espèces bactériennes comme les *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* et les actinomycètes.

Tableau 1 : micro-organismes producteurs de la cellulase. (Ramesh et al., 2011)

<p>Les champignons</p>	<p>Champignons de pourriture molle <i>Aspergillus niger</i>; <i>A. nidulans</i>; <i>A. oryzae</i>; <i>A. terreus</i>; <i>Fusarium solani</i>; <i>F. oxysporum</i>; <i>Hemicola insolens</i>; <i>H. grisea</i>; <i>Melanocarpus albomyces</i>; <i>Penicillium brasilianum</i>; <i>P. occitanis</i>; <i>P. decumbans</i>; <i>Trichoderma reesei</i>; <i>T. longibrachiatum</i>; <i>T. harzianum</i>; <i>Chaetomium cellulyticum</i>; <i>C. thermophilum</i>; <i>Neurospora crassa</i>; <i>P. fumigosum</i>; <i>Thermoascus aurantiacus</i>; <i>Mucor circinelloides</i>; <i>P. janthinellum</i>; <i>Paecilomyces inflatus</i>; <i>P. echinulatum</i>; <i>Trichoderma atroviride</i></p> <p>Champignons de la pourriture brune <i>Coniophora puteana</i>; <i>Lanzites trabeum</i>; <i>Poria placenta</i>; <i>Tyromyces palustris</i>; <i>Fomitopsis sp.</i></p> <p>Champignons de la pourriture blanche <i>Phanerochaete chrysosporium</i>; <i>Sporotrichum thermophile</i>; <i>Trametes versicolor</i>; <i>Agaricus arvensis</i>; <i>Pleurotus ostreatus</i>; <i>Phlebia gigantea</i></p>
<p>Les bactéries</p>	<p>Les bactéries aérobies <i>Acinetobacter junii</i>; <i>A. amitatus</i>; <i>Acidothermus cellulolyticus</i>; <i>Anoxybacillus sp.</i>; <i>Bacillus subtilis</i>; <i>B. pumilus</i>; <i>B. amyloliquefaciens</i>; <i>B. licheniformis</i>; <i>B. circulans</i>; <i>B. flexus</i>; <i>Bacteriodes sp.</i>; <i>Cellulomonas biazotea</i>; <i>Cellvibrio gilvus</i>; <i>Eubacterium cellulosolvans</i>; <i>Geobacillus sp.</i>; <i>Microbispora bispora</i>; <i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>; <i>Pseudomonas cellulosa</i>; <i>Salinivibrio sp.</i>; <i>Rhodothermus marinus</i></p> <p>Les bactéries anaérobies <i>Acetivibrio cellulolyticus</i>; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>; <i>Clostridium thermocellum</i>; <i>C. cellulolyticum</i>; <i>C. acetobutylium</i>; <i>C. papyrosolvans</i>; <i>Fibrobacter succinogenes</i>; <i>Ruminococcus albus</i></p>
<p>Les actinomycètes</p>	<p><i>Cellulomonas fimi</i>; <i>C. bioazotea</i>; <i>C. uda</i>; <i>Streptomyces drozdowiczii</i>; <i>S. lividans</i>; <i>Thermomonospora fusca</i>; <i>T. curvata</i></p>

4. Production des enzymes cellulolytiques

Les cellulases sont des enzymes inductibles, de ce fait, la problématique majeure de leur production et leur coût réside dans le choix de l'inducteur approprié, et le contrôle des voies de répression. A des concentrations réduites de la cellulose, la production du glucose nécessaire pour l'activation du métabolisme de la croissance cellulaire pourrait être insuffisante. D'autre part, la synthèse des cellulases est atténuée lorsque la production du glucose est plus importante que sa consommation. (Rajeev et al, 2005).

A l'échelle industrielle, l'induction des champignons à produire des cellulases est assurée par la culture de ces organismes en présence de la cellulose ou bien en présence d'un disaccharide comme le lactose.

5. Applications des cellulases dans différents domaines

Les cellulases microbiennes trouvent des applications dans différents domaines.

5.1. Industrie du textile

Les enzymes sont utilisées depuis des décennies par l'industrie des détergents, dans les produits destinés au nettoyage et à l'entretien des vêtements. Bien qu'employées dans le traitement des textiles depuis le début de ce siècle pour désamidonner, ce n'est que depuis huit à dix ans que les enzymes ont commencé à être étudiées de façon approfondie en vue d'une large application dans le textile. Une application qui remporte un grand succès est l'utilisation des cellulases pour user le denim. Dans ce cas, les enzymes sont employées à la place des pierres ponceuses ou avec celles-ci en vue de conférer au denim une apparence «usée» ou un aspect décoloré. Divers effets peuvent être obtenus en combinant différentes cellulases et procédés.

Parallèlement, vers la fin des années 80 et le début des années 90, d'autres textiles à base de cellulose destinés ou non à l'habillement ont commencé à être traités par la cellulase, qui confère un «toucher» de qualité et une finition nouvelle à la rayonne, au lin et au coton, tricotés ou tissés. Le traitement à la cellulase procure au textile les qualités suivantes: il empêche de pelucher et de boulocher, il augmente sa douceur, sa souplesse et son lustre, avive l'éclat de ses couleurs, le rend plus facile à travailler, améliore son tombant et lui donne un aspect délavé » à la mode. Les cellulases sont incorporées à l'heure actuelle dans plusieurs détergents pour éliminer le boulochage ou le peluchage en surface et maintenir l'éclat des couleurs lavage après lavage.

5.2. Extraction de l'huile d'olive

Durant les dernières décennies, l'extraction de l'huile d'olive a attiré l'intérêt du marché international vue les différentes vertus qu'elle assure pour la santé.

Classiquement, l'extraction d'une huile de graine est réalisée dans une suite d'étapes comprenant un prétraitement thermique, un pressage et une extraction finale à l'hexane.

L'huile brute ainsi extraite n'est pas comestible directement : elle est trouble, instable chimiquement, en particulier à l'oxydation, et elle contient un certain nombre de composés indésirables. L'opération qui permet de la rendre comestible, le raffinage, comprend l'élimination des gommes (phospholipides, lipides polaires), des acides gras libres (responsables de l'acidité), des composés colorés comme la chlorophylle, et finalement des molécules volatiles responsables des mauvaises odeurs (Hamm w et Hamilton rj ., 2000).

Cette suite d'opérations (dégommage, neutralisation, décoloration et désodorisation) fait appel à une succession de processus thermiques et mécaniques qui ne sont pas sans effet sur les molécules grasses et les composés mineurs nutritionnellement intéressants : ils altèrent donc la qualité originelle du produit, du moins en ce qui concerne quelques molécules-clés comme les anti-oxydants, les vitamines liposolubles...

Olivex est la première préparation enzymatique qui a été commercialisé (préparation constituée de la pectinase, cellulase et hemicellulase extraites à partir d'*Aspergillus oculeatus*) et destinée à l'amélioration de l'extraction de l'huile d'olive (Fantozzi, et *al.*, 1977). En outre, l'utilisation des enzymes de macération induit l'augmentation des antioxydants dans l'huile d'olive vierge et réduit également l'induction du rancissement (Galante et *al.*, 1998).

Les principaux avantages de l'utilisation de ces enzymes de macération durant l'extraction de l'huile d'olive sont (1) l'augmentation du rendement de l'extraction (jusqu'à 2 Kg de l'huile par 100 Kg des olives) sous des conditions froides ; (2) un meilleur fractionnement centrifuge du moût huileux ; (3) une huile avec des niveaux importants des antioxydants et vitamine E ; (4) diminution de l'induction du rancissement ; (5) faible teneur en huile dans les eaux usées (Galante et *al.*, 1998).

Ces enzymes peuvent aussi être utilisés lors du malaxage de la pâte d'olive. La présence d'activité parallèle de nature cellulase et hémicellulase dans la formulation enzymatique garantit une désintégration rapide et intense des parois cellulaires des membranes des olives, favorisant ainsi le passage des substances nobles (en particulier les polyphénols et des précurseurs aromatiques) dans le produit fini. Elles sont également utilisées pour diminuer la viscosité de la pâte d'olive lors de la production d'huile et pour intensifier le processus d'extraction des substances polyphénoliques contenues dans le fruit d'olive (Ranalli et *al.*, 2003).

5.3. Extraction des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments connus pour leurs propriétés intéressantes, telles que leur origine naturelle, une toxicité nulle, et une grande polyvalence, fournissant à la fois des colorants lipo-et hydrosoluble avec des couleurs allant du jaune au rouge (Inar., 2005).

Généralement, la combinaison des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques accélère le taux d'hydrolyse pour la réalisation de la liquéfaction. Les cellulases dégradent aléatoirement la cellulose pour produire du glucose tandis que les préparations commerciales de la pectinase à partir d'*Aspergillus niger* sont caractérisées par des activités pectinesterase (PE), polygalacturonase (PG), et pectine lyase (PL). L'utilisation des pectinases et les cellulases perturbent les parois cellulaires des légumes et des fruits, permettant la libération des caroténoïdes des chloroplastes dans les fluides cellulaires. Les pigments ainsi libérés sont liés à des protéines. Cette structure évite l'oxydation des caroténoïdes et préserve la stabilité des couleurs, tandis que l'extraction par les solvants rompt les liaisons entre les pigments et les protéines, facilitant ainsi l'oxydation et l'insolubilité de l'eau. (Inar., 2005 ; Bassi et al., 1993).

5.4. Industrie alimentaire

Les cellulases possèdent plusieurs applications potentielles dans la biotechnologie des aliments. La production des jus de fruit et légumes requiert l'amélioration des méthodes d'extraction, la clarification et la stabilisation. Ces cellulases font parti des enzymes de macération (cellulases, xylanases et pectinases) et sont utilisées pour l'extraction et la clarification des jus de fruits et légumes afin d'augmenter le rendement de la production (Minussi,et al., 2002). L'utilisation des enzymes de macération augmente à la fois la production et la performance du processus sans frais additionnels.

5.5. Industrie de l'alimentation animale

Les cellulases et hemicellulases attirent l'attention des industriels puisqu'elles procurent des avantages considérables à savoir l'augmentation de la valeur nutritionnelle des aliments de bétail et également la performance des animaux. Le prétraitement des graines et de l'ensilage agricole par des enzymes telles que les cellulases et xylanases pourraient augmenter la valeur nutritionnelle des aliments (Godfrey et West., 1996).

Ces enzymes peuvent également éliminer les facteurs affectant la qualité nutritionnelle présents dans les céréales fourragères, elles dégradent certains constituants alimentaire afin

d'améliorer la valeur nutritionnelle de l'aliment, dans ce cas d'autres enzymes de digestion sont nécessaires comme les protéases, amylases et glucanases. (Ramesh et *al.*, 2011).

5.6. Industrie du papier

Des scientifiques de la North Carolina State University travaillent sur la mise au point de procédés faisant appel à des enzymes microbiennes pouvant remplacer le désencrage chimique de la pâte. Ces recherches sont encore au stade expérimental en laboratoire, et il reste encore beaucoup de travail à faire avant que l'on puisse passer au développement du procédé à l'échelle commerciale. Néanmoins, le procédé pourrait révolutionner les méthodes de recyclage du papier. Dans les démonstrations en laboratoire, de la cellulase et de l'hémicellulase sont mélangées à la pâte à papier. Ces enzymes digèrent les molécules glucidiques, incluant celles auxquelles les particules organiques d'encre sont liées. (Kim Ah-You et *al.*, 2000).

Ensuite, lorsque la pâte est lavée et essorée, la plupart des particules d'encre sont éliminées. Ces particules résiduelles sont enlevées pendant l'étape de la flottaison standard. Il n'est pas nécessaire de traiter la pâte au moyen de soude caustique. Les enzymes résiduelles sont détruites lorsque le papier est séché. (Bioremediation of Hazardous Wastes, Wastewater, and Municipal Wastes. In : Business Communications Company, Report Number: C-110U. 1999).

II. Pectinases

Dans la nature, les micro-organismes sont dotés de fortes potentialités. Ils produisent une large gamme d'enzymes qui sont exploitées commercialement. Parmi ces enzymes, les pectinases dont les applications sont importantes à l'échelle industrielle. Ces enzymes sont largement distribuées dans les plantes supérieures et les micro-organismes. (Whitaker JR., 1990).

1. Substrat

Les substances pectiques est le nom générique des composés sur lesquelles les enzymes pectinolytiques sont actives. Elles sont constituées d'un complexe de macromolécules glycosidiques, de haut poids moléculaire, chargées négativement, acides et qui sont présentes dans le règne végétal.

Elles sont présentes en tant que composants majeurs de lamelle moyenne entre les cellules sous la forme de pectate de calcium et pectate de magnésium (Rastogi G., 1998) . Elles ont un rôle de « ciment » intercellulaire dans les tissus.

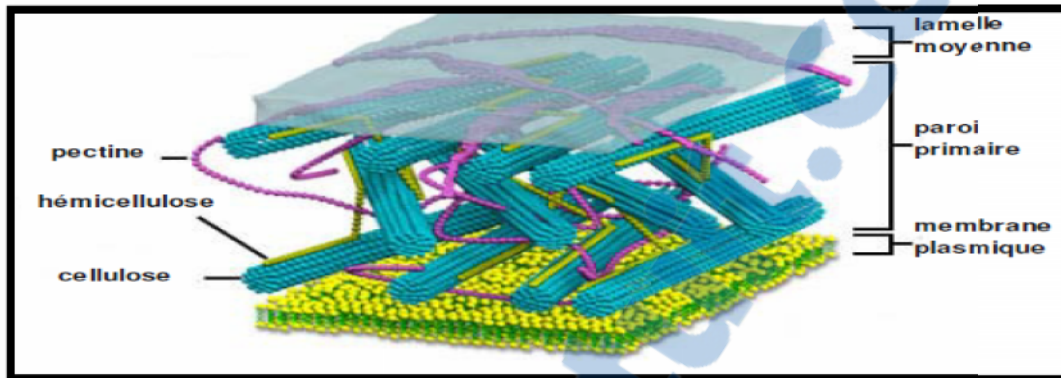


Figure 2: modèle simplifié de la paroi primaire. La cellulose interagit avec les hémicelluloses, les pectines formant une matrice occupant le reste de l’espace ((Michael W. Davidson.,2005).

Contrairement aux protéines, lipides et les acides nucléiques, les substances pectiques n’ont pas un poids moléculaire défini. Leur masse moléculaire varie de 25 à 360 KDa.

Tableau 2: Poids moléculaire de quelques substances pectiques
(Sakai et al., 1993)

Source	Poids moléculaire (KDa)
Bannane et citron	200-360
Poire et prune	25-35
Orange	40-50
Betterave sucrière	40-50

2. Structure des substances pectiques

Les substances pectiques sont divisées en quatre types :

- ❖ Propectine : est une substance pectique insoluble dans l’eau présente dans les tissus intacts. L’hydrolyse de la propectine produit essentiellement de la pectine ou les acides pectiques.

- ❖ Les acides pectiques : sont des polymères solubles des acides galacturoniques qui contiennent des quantités négligeables des groupements méthoxyl. Les sels des acides pectiques sont appelés pectates.
- ❖ Les acides pectiniques : chaînes des acides polygalacturoniques contenant entre 0 à 75% d'unité d'acides galacturoniques méthylées. Les sels des acides pectiniques sont des pectinates.
- ❖ La pectine (polyméthyle galacturonate) : est le polymère dans lequel, au moins, 75% des groupes carboxyle des unités galacturonate sont estérifiés avec du méthanol. Il confère une rigidité à la paroi cellulaire quand il est lié à la cellulose. (Ranveer et al., 2005).

3. Enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines. Le terme « enzyme pectinolytique » ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques (Figure 3) et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les enzymes pectolytiques (Combo et al., 2011).

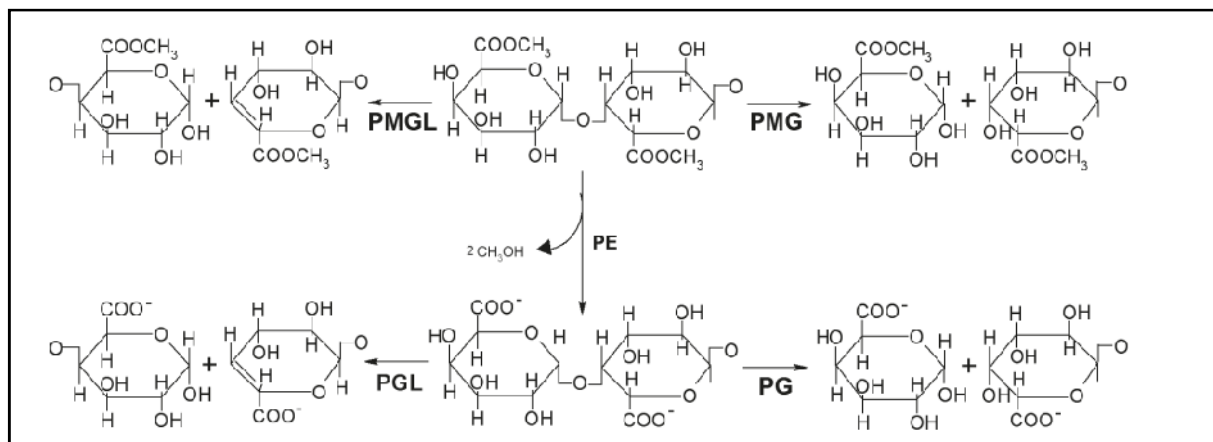


Figure 3 : Mode d'action des pectinases

PMGL : polyméthylgalacturonate lyase ; **PMG** : polyméthylgalacturonase ; **PE** : pectinestérase ;
PGL : polygalacturonate lyase ; **PG** : polygalacturonase.

3.1. Classification des enzymes pectinolytiques

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat (pectine, acide pectique, oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et

le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres *et al.*, 2006). Ces enzymes peuvent être divisées en deux grands groupes : les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME) et les dépolymérasés (polygalacturonases et lyases).

3.1.1 Pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME).

Les PE catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines HM, entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique. L'activité de la PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres ou encore en utilisant un régulateur de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variation du pH (Jayani *et al.*, 2005).

Leur pH optimum est compris entre 7 et 8, alors que les PE fongiques et bactériennes sont plus actives à pH 4-5. Les PE hydrolysent seulement les groupes esters adjacents à un groupe carboxyle libre et enlèvent ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée (Sakai *et al.*, 1993).

La PE est inhibée par l'augmentation du nombre des carboxyles libres le long des chaînes polygalacturoniques progressivement déméthylées. Cette inhibition est due à la répulsion exercée par la charge négative des carboxyles ionisés. La présence de cations (Ca^{2+} , Na^+) pourrait contrecarrer cette inhibition. Cette inhibition des PE serait également due aux chaînes latérales des sucres neutres dans la molécule de pectine (Sakai *et al.*, 1993).

3.1.2. Dépolymérasés

Les dépolymérasés sont des hydrolases (polygalacturonases et lyases) qui possèdent des activités endo- ou exo-galacturonases. Selon le modèle d'action, aléatoire ou terminal, les dépolymérasés peuvent être subdivisés, en fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, en quatre catégories différentes : les polygalacturonases (PG), les polyméthylgalacturonases (PMG), les polygalacturonate lyases (PGL) et les polyméthylgalacturonate lyases (PMGL). (Rexova *et al.*, 1976).

➤ Polygalacturonases (PG)

Les PG sont des enzymes pectolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques -(1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus

étudiées parmi la famille des enzymes pectolytiques. Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC 3.2.1.15) et des exo-PG (EC 3.2.1.67) (Jayani et al., 2005).

Deux méthodes ont été développées pour déterminer l'activité des PG et des PMG. On apprécie cette activité en mesurant la diminution de la viscosité ou l'augmentation du pouvoir réducteur du substrat (acide pectique ou pectine). La comparaison des mesures de la viscosité et du pouvoir réducteur au cours de la dépolymérisation des pectines et des acides pectiques permet de faire la part des activités « endo » et « exo ». Ainsi, avec une endo-PG, la viscosité diminue de moitié quand seulement 2 à 3% des liaisons glycosidiques sont rompues. Avec une exo-PG, le même abaissement de la viscosité n'est observé qu'après rupture de 20% des liaisons glycosidiques (Sakai et al., 1993 ; Jayani et al., 2005).

Les PG isolées des différentes sources microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action.

Tableau 3 : Propriétés biochimiques et physico-chimiques de quelques polygalacturonases (PG) . (De Vries et al., 2001 ; Jayani et al., 2005).

Source PG	Nature	Masse moléculaire (Kda)	pI	Activité spécifique (U·mg ⁻¹)	T _{op} (°C)	pH _{op}
<i>Aspergillus japonicus</i>	EndoPG I	38	5,6	-	30	4,0-5,5
	EndoPG II	65	3,3	-	30	4,0-5,5
<i>Aspergillus oryzae</i>	EndoPGA	41	-	-	45	5,0
<i>Thermococcus aurantiacus</i>	Endo	35	5,9	5890	55	5,0
<i>Aspergillus niger</i>	EndoPG I	61	-	982	43	3,8-4,3
	EndoPG II	38	-	3750	45	3,0-4,6
<i>Bacillus</i> sp. KSM-P410	Exo	45	5,8	54	60	7,0
<i>Penicillium frequentans</i>	Exo	63	-	2571	50	5,0
<i>Aspergillus awamori</i>	Endo	41	6,1	487	40	5,0
<i>Aspergillus alliaceus</i>	ExoPG I	40	5,7	-	45-50	3,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	Exo	38	-	209	69	11,0
<i>Aspergillus alliaceus</i>	EndoPG	40	5,9	-	35	5,5
<i>Sclerotinia borealis</i>	Endo	40	7,5	2 088	40-50	5,0
<i>Aspergillus niger</i>	ExoPG I	66	5,6	-	60	3,8
	ExoPG II	63	5,8	209	60	4,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endo	39	-	2870	45	5,5

➤ *Lyases ou transéliminases*

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique C-O par un mécanisme de β - élimination. Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petite taille. La méthode la plus commode pour suivre l'activité des lyases est

la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 235 nm due à la double liaison produite à l'extrémité non réductrice des composés insaturés. De plus, les méthodes de détermination de l'activité des PG peuvent également être utilisées pour les lyases. Les lyases sont classées en différents types sur base de leur mode d'action et en fonction du substrat sur lequel elles agissent.

Tableau 4 : Classification des lyases (Jayani et *al.*, 2005).

Enzyme	Numéro EC	Mécanisme d'action	Modèle d'action	Premier substrat	Produits
Endopolygalacturonase lyase	4.2.2.2	Trans-élimination	Aléatoire	Acide pectique	Oligogalacturonates insaturés
Exopolygalacturonase lyase	4.2.2.9	Trans-élimination	Avant-dernière liaison	Acide pectique	Digalacturonates insaturés
Endopolyméthyl-D-galactosiduronate lyase	4.2.2.10	Trans-élimination	Aléatoire	Polyméthyl-D-digalacturonates insaturés	Méthyloligogalacturonates insaturés
Exopolyméthyl-D-galactosiduronate lyase		Trans-élimination	Dernière liaison	Polyméthyl-D-digalacturonates insaturés	Méthylmonogalacturonates insaturés

La plupart des lyases sont d'origine microbienne. Les lyases bactériennes constituent le plus grand groupe d'enzymes pectolytiques. Les PGL sont activées par les ions Ca^{2+} et, dans certains cas, par d'autres ions divalents tels que Mg^{2+} , Co^{2+} et Sr^{2+} . Elles sont, par contre, inhibées par l'agent chélateur EDTA (Combo et *al.*, 2010).

3.2. Régulation des enzymes pectinolytiques

La production des enzymes pectinolytique est induite par de faibles concentrations d'acide galacturonique. Les concentrations élevées de sucres (5%), réduisent la production durant la phase stationnaire, ce qui indique que les concentrations élevées d'acide galacturonique ou l'un de ses métabolites présentent une auto-répression catabolique. En présence de glucose, la production d'enzymes se réduit à des niveaux de base. (Tsuymu et *al.*, 1997; Guevara et *al.*,1997).

4. Applications biotechnologiques

Au cours des années, les pectinases ont été utilisées dans plusieurs procédés industriels classiques, tels que l'industrie du textile, la transformation des fibres végétales, le thé, le café, l'extraction du pétrole, le traitement des eaux usées industrielles contenant des matières pectiques, etc.

4.1. Extraction des jus de fruit

L'extraction et la clarification des jus de fruits sont les applications les plus larges des pectinases. Les pectines contribuent à l'augmentation de la viscosité et la turbidité des jus. Le mélange des pectinases et amylases, est utilisé afin de clarifier ces jus. Il diminue le temps de filtration jusqu'à 50% (Blanco et *al.*,1999). Le Traitement des pulpes de fruits avec pectinases a également montré une augmentation du volume de jus de fruits à partir des bananes, les raisins et les pommes. La combinaison des pectinases avec d'autres enzymes comme les cellulases, les xylanases et les arabinases ont été utilisés pour augmenter l'efficacité de pressage des fruits pour l'extraction du jus (Gailing et *al.*, 2000).

4.2. Traitement du textile

Les pectinases sont utilisées en conjonction avec des amylases, lipases, cellulases et hémicellulases pour éliminer les agents d'encollage à partir du coton d'une manière sûre tout en respectant l'environnement, dans le but de remplacer la soude caustique. Bioscouring est un nouveau procédé pour l'élimination des impuretés non celluloses à partir de la fibre avec des enzymes spécifiques. Les pectinases ont été utilisées à cette fin sans aucun effet secondaire négatif sur la dégradation de la cellulose (Hoondal et *al.*, 2000).

4.3. Extraction des huiles

L'huile d'olive, de colza, de tournesol et les huiles d'agrumes peuvent être extraites par des enzymes comme les pectinases. En effet, ces enzymes réduisent les propriétés émulsifiantes des pectines et permettent la dégradation de la paroi cellulaire. Par conséquent, les huiles sont libérées facilement après le traitement enzymatique ce qui permet l'augmentation du rendement (Scott., 1978).

III. Effet des agents physico-chimiques sur l'activité enzymatique

La dénaturation fait perdre aux enzymes leur configuration spatiale. La modification de la structure entraîne une perte des caractéristiques biologiques de la protéine. La dénaturation se fait par des températures supérieures à 50°C à 60°C, un milieu acide, un agent dénaturant (l'urée ou un détergent comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) à concentration élevée).

1. Effet de la température

Généralement, les enzymes qui sont actives à des températures ambiantes, perdent leurs activités à des températures comprises entre 50 et 60°C. Tandis que, les enzymes thermostables obtenues à partir des micro-organismes peuvent résister à des températures qui dépassent 70°C (Rainer et Zarodszky., 1990).

Les enzymes actives à forte température sont dites enzymes thermostables. La thermostabilité et l'activité catalytique élevée sont des caractéristiques importantes car elles augmentent le taux d'activité et la durée de conservation de l'enzyme, tout en diminuant la consommation d'énergie et les coûts requis pour transformer les substrats. Par ailleurs, l'amélioration de l'activité enzymatique permet de transformer un plus grand volume de substrat.

Plusieurs cellulases thermostables sont produites à partir de bactéries cellulolytiques thermophiles comme *Clostridium thermocellum*, *Caldocellum saccharolyticum* et *Acidothermus cellulolyticus* (Gibbs *et al.*, 1995; Te'o *et al.*, 1995; Bergquist *et al.*, 1999).

La différence de stabilité entre les protéines (hyper)thermophiles et les protéines mésophiles correspondantes ne dépasse pas 100 KJ.mol⁻¹, ce qui équivaut à quelques interactions non covalentes. C'est sans doute pourquoi on n'a pas trouvé de différence significative entre les structures par rayons X des enzymes hyperthermophiles et celles de leurs homologues mésophiles. On observe bien quelques différences de structure secondaires, mais pas plus grandes qu'entre protéines homologues de mésophiles de parenté lointaine. Cependant, plusieurs de ces enzymes thermostables présentent à leur surface une surabondance de ponts salins, dont de nombreux sont arrangés en vastes réseaux.

Toutes les protéines thermostables ne présentent pas une telle abondance de ponts salins. Des comparaisons de structure suggèrent que ces autres protéines sont stabilisées par une combinaison d'effets mineurs, qui contribuent à augmenter la taille du cœur hydrophobe de la protéine et celle de l'interface entre ses domaines et (ou) ses sous-unités, ainsi que le compactage de l'intérieur de la protéine.(Donald Voet et Judith G. Voet ., 2005).

2. Effet de du pH

L'activité de toutes les enzymes varie en fonction de la concentration en ion H⁺. Elle présente en général un maximum pour un certain pH, dans des conditions déterminées. La plupart des enzymes présente un maximum d'activité entre pH 6 et 8. Certains cependant

requièrent des conditions sensiblement plus acides ou plus alcalines. La présence de résidus aminoacide ionisables dans la structure du site actif explique l'influence du pH sur la vitesse des réactions enzymatiques. En effet, l'état d'ionisation des groupes dissociables intervenant dans la formation et l'activité du complexe enzyme-substrat (ES) est fonction du pH. De plus, la dissociation d'un ou de plusieurs autres groupes du substrat ou de la protéine enzymatique peut aussi avoir une influence. (Donald Voet et Judith G. Voet., 2005)

Le pH a une influence sur la structure tertiaire de l'enzyme en modifiant les charges positives et négatives des acides aminés. La structure tertiaire change et l'activité enzymatique est modifiée.

Toutefois, dans la nature, il existe des protéines d'origine bactérienne résistant à des pH extrêmes. Ces enzymes sont dites alcalinophiles. Des bactéries telles que *Bacillus sp.* sont capables de produire des cellulases et pectinases alcalines (Lungisa Mayende et *al.*, 2006 ; Des Raj Kashyap et *al.*, 2003).

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique

Les souches utilisées sont en nombre de onze, sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau5 : Matériel biologique utilisé.

Souches étudiées	Références des souches
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P.a
<i>Escherichia Coli</i>	E.c
<i>Bacillus subtilus1</i>	B.s1
<i>Staphylococcus aureus</i>	S.a
<i>Bacillus subtilus2</i>	B.s2
La souche 6	S6
La souche 7	S7
La souche 8	S8
La souche 9	S9
La souche 10	S10
La souche 11	S11

II. Criblage des souches productrices d'enzyme

Les souches étudiées ont été aimablement fournies par le Professeur IBN SOUDA (FST-Fes). Ces souches étaient conservées dans le glycérol 20% à - 20°C (Après une incubation de 24 h à 37°C, on prélève 800µl de la culture et on ajoute 200µl de glycérol stérile. Les tubes sont homogénéisés puis conservés à -20°C). Afin de vérifier la purification des souches étudiées, ces dernières ont été ensemencées par épuisement sur milieu LB.

❖ Composition du milieu LB (Lysogeny broth)

- Peptone	10 g
- NaCl	10 g
- Extrait de levure	5 g
- Agar	20g

1. Activité cellulase

Le criblage des souches productrices des cellulases, est effectué sur un milieu contenant de la carboxyméthyle cellulose (CMC), comme seule source de carbone.

1.1. Milieu de la révélation

❖ Milieu minimum M9

- Na₂HPO₄ 6 g
- KH₂PO₄ 3 g
- NH₄Cl 1 g
- NaCl 0,5 g
- Eau distillée q.s.p 1000 ml

Après stérilisation dans l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C, ajouter les deux solutions suivantes :

- CaCl₂ 0,5 mol/l 1ml
- MgSO₄ 0,1 mol/l 1ml, puis ajouter le milieu solide

❖ Milieu solide

- Extrait de levure 0,2 g
- Glycérol 2 ml
- Agar 20 g
- CMC (CarboxyMéthylCellulose) 10 g (ajouter le CMC progressivement, sous agitation et à une température d'environ 60°C).

Stériliser le mélange pendant 15 minutes à 110°C.

1.2. Révélation de l'activité cellulase

A partir d'une culture sur milieu CMC-agar, une colonie est prélevée, ensuite déposée sur boîte contenant du CMC (Carboxyméthyl cellulose) gélosé.

L'activité cellulolytique est mise en évidence par la coloration au Gram Iodine (2g KI, 1g I₂, q.s.p 300ml d'eau distillée) (Maki et al ; 2011). Pour ce faire, un volume de 10 ml est coulé dans la boîte.

Les colonies développant une auréole montre que les souches en question possèdent une activité cellulase.

Le témoin positif utilisé est l'enzyme pure (cellulase), tandis que le témoin négatif est *Escherichia coli* (qui ne possède pas d'activité cellulase).

2. Activité pectinase

2.1. Milieu de la révélation de l'activité pectinase

La composition du milieu de la révélation de l'activité pectinase est la suivante :

❖ Milieu PGA agar

- Extrait de levure	5 g
- PGA (PolyGalacturonic Acid)	2,5 g
- Agar	20 g
- (NH ₄) ₂ SO ₄ (10%)	2 ml
- Mg SO ₄ (1M)	0,5 ml
- Glycérol	5 ml
- Eau distillée stérile q.s.p	1000 ml

❖ Tampon pH 8

- Na ₂ HPO ₄	15 g
- NaH ₂ PO ₄	0,7 g
- Eau distillée stérile q.s.p.	1000 ml

Mélanger 80% du milieu PGA-agar avec 20% du tampon pH 8. Finalement, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes

2.1. Révélation de l'activité pectinase

L'activité pectinase est mise évidence après croissance des différentes souches sur milieu PGA agar contenant l'acide polygalacturonique comme source ce carbone.

Après incubation de 24h à 37°C, le milieu agar est coloré avec une solution de Gram Iodine. Laisser le colorant agir pendant 10 minutes. L'activité hydrolysante des souches étudiées se manifeste par le développement d'une auréole autour de la colonie.

Les contrôles positif et négatif utilisés sont respectivement la pectinase pure et *Escherichia coli*.

3. Estimation des activités enzymatiques

L'estimation des activités enzymatiques est donnée selon une formule mathématique reposant sur le diamètre de la colonie DC et celui de l'halo DH (*Onsori et al*, 2004).

$$A = \text{Activité enzymatique} = \text{DH} - \text{DC}$$

III. Identification biochimique

1. Test de coloration de Gram

1.1. Réalisation du frottis

Sur une lame, on a déposé une goutte d'eau stérile. puis on a ajouté à l'anse de platine stérilisée une colonie isolée. La préparation est étalée et fixée à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15 minutes.

1.2. Réalisation de la coloration

- Coloration par cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau.
- Jeter le colorant et finir de le chasser par le lugol et laisser agir 1 minutes. Rincer à l'eau.
- Décoloration (rapide) à l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau.
- Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau. Sécher la lame
- Observer avec une goutte d'huile à immersion avec objectif 100 (grossissement $\times 1000$).

1.3. Lecture

Les bactéries Gram positif apparaissent en violet. Alors que, les bactéries Gram négatif en rose.

2. Test amylase

2.1. Composition du milieu de culture

- Peptone 6g
- KCl 0,5g
- Amidon 1g
- Agar 20g
- Eau distillée q.s.p 1000 ml
- Autoclaver le milieu 15 minutes à 110 °C.

2.2. Révélation de l'activité

La visualisation de l'activité amylasique est permise par la coloration du milieu agar par une solution de Gram Iodine.

3. Test de croissance sur milieu 6,5% NaCl

3.1. Composition du milieu

- Peptone 1g
- Extrait de levure 0,5g
- NaCl 6,5%
- Agar 2g
- Eau distillée q.s.p 100 ml

3.2. Lecture

Test positif : croissance de la bactérie sur la milieu

Test négatif : pas de croissance de la bactérie sur ce milieu

4. Test Clarck et Lubs

4.1. Principe

Le milieu Clark et Lubs permet de différencier grâce au rouge de méthyle le processus de fermentation, il est jaune au-dessus d'un pH 6,3 et rouge en dessous de 4,2. La production d'acétylméthylcarbinol se révèle par l'apparition d'une coloration rouge en surface du milieu.

4.2. Composition du milieu

- Peptone tryptique ou polypeptone 5 à 7 g
- Glucose 5g
- K_2HPO_4 5g
- Eau distillée q.s.p 1000 ml
- pH final à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

4.3. Procédure

Ensemencer 10 ml de milieu avec un inoculum léger provenant d'une culture pure de 18 à 24 heures. Incuber à $35 \pm 2^\circ C$ pendant au moins 48 heures et de préférence 5 jours.

❖ Réaction au **rouge de méthyle** : Après incubation, transvaser 2 ml du milieu dans un autre tube et ajouter 1 à 2 gouttes d'une solution à 0,5% de rouge de méthyl dans l'alcool à 60°. Une coloration rouge du milieu, correspondant à un pH inférieur à 4,2, est considéré comme positive. Une coloration jaune du milieu, correspondant à un pH supérieur à 6,3, est considérée comme négative.

❖ Réaction de **Voges-Proskauer** : Après incubation, transvaser 1 ml du milieu dans un autre tube et ajouter 0,5 ml d'une solution d'-naphtol à 6% dans l'alcool à 90° et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16%. Agiter fortement et attendre 15 minutes. l'apparition d'une coloration

rouge, indiquant la production d'acétylméthylcarbinol, est considérée comme positive.(Voges et Proskauer., 1898 ; Clark et Lubs ., 1915).

5. Test de Citrate et Simmons

5.1. Principe

Les bactéries capables d'utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone pourront se développer sur ce milieu. La fermentation du citrate de sodium entraîne alors une acidification qui provoque une coloration **bleue** du milieu en présence de bleu de bromothymol (indicateur de pH).

5.2. Composition du milieu

La gélose Simmons citrate est préparée selon la formule décrite par Simmons.

- Citrate de sodium	1 g
- Chlorure de sodium	5g
- Sulfate de magnésium	0,2 g
- Phosphate mono-ammonique	1g
- Phosphate dipotassique	1g
- Bleu de bromothymol	0,08g
- Agar	15 g

pH final = $6,8 \pm 0,2$

5.3. Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon. Mettre **24,2 grammes** de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile. Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition pendant 1 minute. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Répartir en tubes ou en flacons. Refroidir les tubes en position inclinée pour obtenir une pente longue sans culot.

4 . Coloration des spores

4.1. Principe

Certaines espèces bactériennes, et plus particulièrement le genre *Bacillus* (aérobie strict ou aéro-anaérobie) et *Clostridium* (anaérobie strict), ont la propriété de former des spores, forme de résistance de ces bactéries en particulier vis-à-vis de la chaleur et de la déshydratation, capables de redonner des bacilles.

La sporulation survient lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables : milieu pauvre, cultures âgées, déshydratation etc...

4.2. Procédure

La coloration des spores est réalisée par la méthode décrite ci-dessous :

Tout d'abord, on a chauffé la culture bactérienne à 90°C dans un bain-marie pendant 10 minutes. Après avoir refroidi la culture, on a réalisé un frottis bactérien. Puis, on a mis un bout de papier filtre sur le frottis sans dépasser les bords de ce dernier. Ensuite la lame est déposée sur un bécher contenant de l'eau bouillante. Après, on a recouvert le papier filtre d'une solution de vert de malachite 5%, et chaque fois, on ajoute le vert de malachite jusqu'à saturation du papier. L'opération doit durer 5 minutes, durant cette période de temps on a lavé soigneusement la lame et on a égoutté et ajouté la Fuschine. Finalement, on a observé avec une goutte d'huile d'immersion, objectif 100.

4.3. Lecture

Les endospores et les exospores apparaissent en vert, tandis que les bactéries en rose.

5. Formation d'acide à partir d'arabinose

5.1. Principe

Ce test a pour but de mettre en évidence la capacité des bactéries à produire des acides à partir de l'arabinose.

5.2. Composition du milieu

- | | |
|--------------------------------|--------|
| - Proteose peptone | 10g |
| - Extrait de viande | 1g |
| - Chlorure de sodum | 5g |
| - Arabinose | 5g |
| - Rouge de phenol | 0.018g |
| - pH final (à 25°C) = 7.4±0.2 | |

5.3. Procédure

Un inoculum est prélevé à partir d'une culture pure, puis transférer aseptiquement cet inoculum dans un tube stérile contenant le bouillon phenol red arabinose. Les tubes inoculés sont incubés à 37°C pendant 24h.

Le test positif consiste en un changement de la coloration du milieu de culture du rouge vers le jaune.

6. Test mannitol

6.1. But

Ce test permet de mettre en évidence la capacité des bactéries à utiliser le mannitol.

6.2. Composition du milieu

- Hydrolysate tryptique de caséine 10,0 g
- Mannitol 7,5 g
- Rouge de phénol 0,4 mg
- Nitrate de potassium 1,0 g
- Agar 3,5 g
- pH = 7,6

6.3. Procédure

Le tube est ensemencé par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit. Puis, le tube est incubé 24 h à 37°C.

6.4. Lecture

- Milieu jaune : Mannitol +
- Milieu rouge : Mannitol –

IV. Identification moléculaire

1. Extraction de l'ADN

1.1. Préparation des solutions

- Tampon de lyse
 - 100 mmol/l Tris-HCl,
 - 20 mmol/l EDTA,
 - 250 mmol/l NaCl
 - 2% SDS
 - 1mg/ml lysozyme

- Solution de Protéinase K
 - 20 mg/mL (solution mère à garder à – 20°C)

- La protéinase K doit être préparée avec de l'eau stérile à partir de la poudre, le mieux étant de se préparer une solution mère stock de 20 mg/ml qui n'est pas autoclavée. On garde les aliquotes de 0,25 ml congelés.

➤ Solution TE :

- 10 mmol/l Tris HCl, pH 7,4
- 1 mmol/l EDTA, pH= 8

➤ Solution de T.A.E

- 2,42g Tris base
- 5,71 mL Acide acétique glacial
- 10 mL EDTA (0,5 M)

➤ Préparation du gel d'agarose 1%

- 1g d'Agarose
- 100 de T.A.E
- Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition puis on le refroidi à 60°C, et on ajoute 2µL de B.E.T. La solution est coulée dans une cuve d'électrophorèse muni d'un peigne ensuite on laisse refroidir cette solution à la température ambiante.

1.2. Etapes de l'extraction

Première étape : lyse et digestion des cellules

Cette étape consiste à détruire les membranes des cellules pour en libérer le contenu, puis les protéines sont dégradées par la protéinase K. Cette enzyme est une protéase végétale très active même en présence d'EDTA, et qui n'a aucun effet d'hydrolyse sur les acides nucléiques (ADN). Elle hydrolyse les protéines de toutes origines en quelques heures, avec une préférence pour les liaisons peptidiques situées après les acides aminés hydrophobes (leucine, par exemple).

Afin de libérer le contenu des cellules bactériennes étudiées, la procédure est la suivante :

Tout d'abord, on procède à un choc thermique qui consiste à :

L'inoculum prélevé à partir d'une colonie est resuspendu dans 100 µl d'eau distillée stérile. On a homogénéisé le mélange obtenu, ensuite on a congelé les eppendorff contenant les cellules solubilisées dans de l'eau distillée à -20°C, après une heure d'incubation on a mis la préparation dans un bain marie à 100°C. Puis on a refait les deux étapes une deuxième fois.

Au mélange obtenu, on a ajouté 32 µl de lysozyme (25 mg/ml) et on a laissé digérer 30 minutes à 37°C. Ensuite, 768 µl du tampon de lyse sont ajoutés et incubés à 37 °C pendant une heure. Par la suite, 10 µl de la protéinase K (20mg/ml) sont additionnés et sont incubés à 65°C pendant deux heures.

Deuxième étape : extraction de l'ADN au chloroforme

Après avoir libéré le contenu cellulaire lors de l'étape précédente. Donc, il est nécessaire d'éliminer les protéines et les débris cellulaire afin de purifier l'ADN. Pour ce faire, on a ajouté à la phase aqueuse le chloroforme (50/50%) (v/v), puis on a centrifugé 8000 rpm pendant 10 minutes. Après la centrifugation, il ya apparition de deux phases :

- La phase supérieure (phase aqueuse) contient l'ADN. Elle est à récupérer en évitant d'aspirer l'interphase blanchâtre
- L'interphase blanchâtre qui contient les protéines et le culot qui contient le chloroforme contenant les constituants cellulaires et les lipides.

Il est préférable de répéter cette étape, pour une meilleure extraction.

Troisième étape : précipitation de l'ADN

L'ADN récupéré dans la phase aqueuse est précipité par l'ajout de NaCl (0,5 M concentration finale) et 2 volumes (par rapport au volume total) d'éthanol absolu 95%(v/v). Après une incubation à -20°C pendant 30 minutes, on a centrifugé à 12000 RPM pendant 10 minutes, puis on a éliminé le surnageant. Il convient ensuite de laver l'ADN afin d'éliminer les sels. Ce lavage est réalisé avec de l'éthanol à 70% (500 μl). Par la suite,on a centrifugé 8000 RPM pendant 10 minutes et resuspendre le culot dans 20 μl de TE (10 mmol/l Tris HCl pH 8, 1 mmol/l EDTA pH 8) . Après avoir extrait l'ADN, on a conservé les eppendorff contenant les extraits d'ADN purs à -20°C .

2. Amplification par PCR

2.1. Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique automatisée. En effet, la réaction de PCR se fait dans un thermocycleur. L'appareil contient un bloc chauffant où l'on insère les tubes contenant le mélange utilisé pour la réaction de PCR et où la température peut varier de 0°C à 100°C .

Le thermocycleur est alors programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR. Ainsi, chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie. Ces deux paramètres, température et temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier, et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces.

La réaction de la PCR s'effectue en trois étapes.

Après une étape de pré-dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, 35 cycles sont entrepris. Chaque cycle est donc constitué de trois périodes différentes:

Première étape : est une phase de dénaturation thermique de l'ADN, qui permet de séparer les deux brins d'ADN cible. Elle est réalisée à une température de 94°C pendant 30 secondes.

Deuxième étape : phase d'hybridation ou d'appariement des amorces, qui Consiste en une hybridation des amorces sens et antisens aux brins complémentaires grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Cette étape s'effectue à une température de 55°C pendant 30 secondes. La température est inférieure à la Tm (température de fusion) des amorces utilisées.

Troisième étape : phase d'élongation .Cette étape permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température de 72 °C pendant 1 min 45 secondes. ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel.

2.2. Les conditions de la PCR

Deux amorces universelles sont utilisées :

- ❖ **fD1** (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3')
- ❖ **Rs16** (5'TACGGCTACCTTGTTACGACTT3').

Les concentrations finales des réactifs sont décrites dans le tableau suivant

Tableau 6 : préparation du mixte de la PCR

Réactifs	Volume (µL)	Concentration finale
Tampon Taq (5x)	4	1x
MgCl ₂ (25mM)	1,2	1,5 mM
dNTPs (1mM)	4	0,2 mM
Fd 1 (10 µM)	2	1µM
Rs 16 (10µM)	2	1µM
Taq polymérase (5U/µL)	0,2	0,05 U/µL
H ₂ O pure	4,6	
ADN	2	
Volume final	20	

2.3. Révélation de l'ADN

L'ADN amplifié est mis en évidence par le biais de la migration de celui-ci sur un gel d'agarose 1% (1 g d'agarose, 100 ml de T.A.E (1x))

2.4. Chargement des puits

Sur un morceau de papier aluminium, mélanger 2 µL du produit d'amplification avec 2 µL de la solution de charge (2,5 mg de Bleu de Bromophénol, 300 µL de glycérol, 700 µL d'eau distillée stérile). Le mélange ainsi préparé est déposé dans les puits du gel.

3. Purification des produits PCR

Cette étape de l'identification moléculaire est réalisée au CURI de Fès (Centre Universitaire Régional d'Interface).

3.1. Elimination du Triton-X

Le Triton-X est un détergent ionique puissant qui entre dans la composition du tampon de la réaction PCR. Sa présence dans le produit d'amplification gêne le séquençage. Pour cette raison, son élimination est indispensable pour le bon fonctionnement du séquençage.

- Les produits d'amplification de chaque souche sont rassemblés (50 µl) dans un tube eppendorf (1,5 ml). Ensuite, le volume est complété à 360 µl par de l'eau bi-distillée stérile puis à 400 µl par NaCl 3 M.
- Après ajout de 800 µl d'éthanol absolu, une congélation à -20°C pendant 30 minutes est entamée suivie d'une centrifugation à 4°C durant 20 minutes à 10000 rpm.
- Le surnageant est éliminé, le culot est lavé dans un volume de 1ml d'éthanol à 70% puis re-centrifugé à la même vitesse pendant 5 minutes. Ce lavage est effectué deux fois.
- Le surnageant est éliminé et le culot est séché ensuite re-suspendu dans un volume de 20 µl de TE (pH=8) et conservé à 4°C.

3.2. Elimination des amorces

3.2.1. Fixation d'ADN

Dans chaque tube contenant 10 µl de produit PCR conservé dans du TE :

- Ajouter 100 µl de la solution Magnesil Yellow contenant des billes fixant l'ADN.

- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 45 secondes puis remélanger.
- Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes pendant 10 secondes puis jeter le surnageant.

3.2.2. Lavage

- Récupérer les tubes du portoir magnétique et ajouter 200 µl d'éthanol à 80%.
- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 60 secondes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- Récupérer les tubes du portoir magnétique puis ajouter 100 µl d'éthanol à 80% et procéder comme auparavant. Cette étape de lavage est répétée deux fois. Ensuite, les tubes sont séchés 5 à 10 minutes à température ambiante.

3.2.3. Elution d'ADN

- Replacer les tubes dans un portoir normal
- Ajouter 100 µl d'une solution water free nuclease .
- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 60 secondes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes.
- Transférer les tubes de nouveau dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes restantes puis récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes. Ces derniers sont conservés à 4°C.

4. Réaction de séquençage

Le séquençage est accompli sur les produits de PCR préalablement purifiés. Il est réalisé selon la technique automatisée de Sanger.

Cette méthode consiste à faire une amplification spécifique (PCR) dont laquelle on utilise des didésoxynucléosides triphosphates (ddNTP) généralement marqués par des fluorochromes.

L'incorporation de ce didésoxyribonucléotide par l'ADN polymérase bloque l'allongement de la molécule d'ADN en cours de copie. On a donc toute une famille de fragments d'ADN synthétisés avec des longueurs différentes selon qu'un désoxynucléoside monophosphate (dNMP) ou un didésoxy nucléoside monophosphate (ddNMP) a été, au hasard, incorporé. Mais dans tous les cas, toutes les molécules se terminent obligatoirement par un ddNMP.

Ces fragments nucléiques sont séparés par électrophorèse selon leur longueur, les plus petits migrent le plus vite. Le pouvoir discriminant du gel de polyacrylamide est tel qu'il permet de différencier des brins d'ADN ne différant en longueur que par un seul nucléotide.

La séquence de l'ADN amplifié est alors lue par un balayage automatique qui permet de distinguer grâce à des fluorochromes différentes les quatre bases A, T, C ou G. L'utilisation de logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire.

L'identification est réalisée par comparaison de cette séquence avec les bases de données des séquences connues.

4.1. PCR de séquence

4.1.1. Mélange réactionnel

Le mélange réactionnel utilisé pour la réalisation de la PCR est consigné dans le tableau 7.

Tableau 7 : Mélange réactionnel pour la PCR de séquençage

Réactifs	Volume (µl)
Big Dye (Tampon Taq , MgCl ₂ , Taq polymérase, dNTPs, ddNTPs,)	2
Fd 1 (10 µM) ou Rs 16 (10 µM) (Amorces)	2
H ₂ O pure	6
Produit PCR	10
Volume final	20

4.1.2. Amplification

Après une pré-dénaturation à 96°C pendant 5 minutes, 25 cycles successifs sont entrepris, chaque cycle comprenant:

- Dénaturation à 96°C pendant 10 secondes.
- Hybridation à 55°C pendant 10 secondes.
- Elongation à 60°C pendant 4 minutes.

4.2. Purification des produits de séquençage

Afin d'éliminer tout matériel nucléique (amorce, ddNTP, dNTP) qui peut gêner la lecture de la séquence, une purification est réalisée selon le protocole suivant :

- Dans un tube eppendorf de 0.5 ml, déposer 10 µl de produit de séquence.
- Ajouter 90 µl de la solution Magnesil Green (fourni par la société Génome biotechnologie) contenant des billes fixant l'ADN.
- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 5 minutes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- Récupérer les tubes du portoir magnétique et ajouter 100 µl d'éthanol 90%.
- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 5 minutes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- Récupérer les tubes du portoir magnétique puis répéter l'étape de lavage avec l'éthanol 90% une deuxième fois. Ensuite, les tubes sont séchés 5 à 10 minutes à température ambiante.
- Resuspendre les particules dans 20 µl de Formamide, laisser agir 1 à 2 minutes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis récupérer le surnageant contenant le Formamide et les produits de séquence dans de nouveaux tubes. Le séquençage peut ainsi être entamé.

5. Analyse informatique des séquences

La séquence ainsi obtenue par le séquençage est comparée à la banque de données. Après séquençage, les séquences du gène de l'ARNr 16S obtenues sont comparées à une base de données de séquences de ce même gène de différentes bactéries de référence. Le degré de parenté est alors déterminé en fonction des homologues de séquences. Cette comparaison est réalisée via le Centre National de l'Information pour la Biotechnologie (NCBI) en utilisant le programme BLAST

V. Dosage des sucres réducteurs par la méthode du DNS.

L'activité cellulase est mesurée via le réactif du DNS, par la méthode décrite par Miller (1969). Le dosage de l'activité cellulase est basé sur l'hydrolyse enzymatique des liaisons glycosidiques dans le carboxyméthyle cellulose (CMC).

1. Principe du dosage par le DNS

Le DNS (3,5-acide dinitrosalicylique) à chaud et en présence de sucres réducteurs développe un produit réduit de couleur rouge-brune l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique.

La technique du DNS est un moyen de détermination de la teneur en sucres réducteurs libres présents dans les échantillons à doser.

Quant au dosage des sucres totaux, il faut d'abord procéder à une hydrolyse acide des polysaccharides (dans ce cas le saccharose) par l'acide sulfurique (H_2SO_4) pour qu'ils se transforment en monosaccharides réducteurs.

2. Préparation du réactif du DNS

Mettre 30 g de tartrate double de Na et K dans un flacon de 100ml, ajouter 1,6 g de NaOH. Dissoudre complètement le mélange (en chauffant doucement) dans 250 ml d'eau distillée. Ajouter doucement 1 g de DNS. Couvrir avec du papier aluminium et attendre la dissolution du DNS. Laisser refroidir et compléter le volume à 100ml. Boucher hermétiquement et conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière.

3. Préparation de la gamme d'étalonnage du glucose

La gamme étalon du glucose est établie avec une solution de glucose à des concentrations allant de 10^{-4} à 10^{-2} mol/l.

La concentration du glucose en solution est mesurée par le DNS, à une densité optique de 540 nm.

4. Conduite du dosage

Les souches actives sont mises en culture dans du LB liquide, après une nuit d'incubation (DO= 1,5), prélever un volume de 2 ml, puis centrifuger cette culture à 12000 RPM, pendant 20 minutes. Ensuite le culot est partagé entre un tube test et un tube témoin.

Le tube test contient 500 μ l du surnageant et 500 μ l du Substrat. Alors que le tube témoin est constitué de 500 μ l du surnageant et 500 μ l du tampon acétate de sodium (0,1 M pH 4,8).

Le zéro du spectrophotomètre ou blanc contient 500 μ l du tampon acétate de sodium (0,1 M pH 4,8) et 500 μ l du Substrat (CMC à 1%).

L'ensemble des tubes est incubé à 45°C pendant 30 minutes. Après incubation, on ajoute dans chaque tube 2 ml du réactif DNS . Par la suite porter, les tubes à ébullition pendant 5 min.

La densité optique est mesurée à une longueur d'onde 540nm. La différence entre la DO du tube test et du tube témoin pour chaque souche donne, par projection sur la courbe étalon, la concentration en glucose produit en mg/ml.

VI. Effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité enzymatique

1. Préparation du surnageant

Les isolats révélant une activité enzymatique sont cultivés dans un milieu LB liquide pendant 24 heures à 37°C, sous agitation et maintenant la culture en aération. La culture est ensuite centrifugée à 7000 rpm pendant 30 minutes, à 4°C. Ensuite, le surnageant est récupéré, après, on a effectué un lavage du culot avec le milieu de culture LB. Ensuite centrifuger 7000 rpm pendant 30 minutes. Regrouper les deux surnageants obtenus dans un seul flacon, puis filtrer le surnageant à travers une membrane filtrante (0,22 μ m) en conditions stériles.

2. Effet de la température

La capacité des enzymes à résister à différentes températures est évaluée en procédant comme suit.

Tout d'abord, on a préparé un surnageant à partir d'une culture fraîche. Puis, le surnageant est réparti dans des tubes eppendorff. Chaque tube est incubé à une température déterminée (37°C, 55°C, 75°C, 85°C, 95°C et 100°C) pendant 30 minutes. Ensuite, on a prélevé 50µl du surnageant, puis on a mis ce volume dans un puits sur milieu CMC-agar pour l'activité cellulase et sur milieu PGA-agar pour l'activité pectinase (par la mesure du diamètre des auréoles).

3. Effet de différentes concentrations d'urée

Une gamme de différentes concentrations d'urée allant de 1 mol/l à 8 mol/l est préparée afin d'évaluer l'influence de l'urée sur l'activité des enzymes présentes dans les surnageants des isolats bactériens étudiés. L'évaluation de l'activité cellulase est mise en évidence via le dépôt d'un volume de 50 µl du surnageant traité sur milieu CMC-agar et PGA-agar .

4. Effet du pH

Pour mettre en évidence l'influence du pH sur l'activité des enzymes cellulases, on a préparé des surnageants, puis leur pH est ajusté à différentes valeurs (1, 2 à 5, 7 et 10) . on a Laissé agir une heure, ensuite on a inoculé les boîtes CMC-agar et PGA-agar avec 50 µL de chaque surnageant.

5. Effet du SDS et -mercaptoéthanol

Le SDS et le -mercaptoéthanol, sont des dénatrants des protéines. Pour évaluer leurs effets sur les enzymes étudiées, on a préparé des surnageants avec 1% SDS et 1% -mercaptoéthanol. Cette évaluation permet également de prévoir la nature des liaisons formant la structure de ces protéines.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Mise en évidence des souches productrices des enzymes

1. Criblage des souches productrices de cellulase

Parmi les onze isolats étudiés, cinq souches ont montré une activité cellulase. Cette activité de dépolymérisation de la carboxyméthylcellulose (CMC) est mise en évidence via le développement d'auréole autour des colonies sur milieu CMC agar.

Le test avec la Gram Iodine est sensiblement efficace pour un criblage préliminaire des isolats doués d'activité enzymatique. (Sasithon Krairitthichai et al., 2008)

Le diamètre des auréoles varie de 1,3 à 2,2 cm pour l'activité cellulolytique (figure 4). Dans un premier temps, c'est la différence entre la taille de la colonie et celle de l'auréole qui permet de faire un criblage des souches dont l'activité est importante. Afin de mettre en évidence que, les isolats possédant l'activité dépolymérisante qui nous intéresse, on a eu recours à utiliser des contrôles positifs et négatifs. Dans ce cas, le contrôle négatif utilisé est *Escherichia coli*, tandis que le témoin positif est l'enzyme (cellulase) pure, extraite à partir d'*Aspergillus niger* (Sigma).

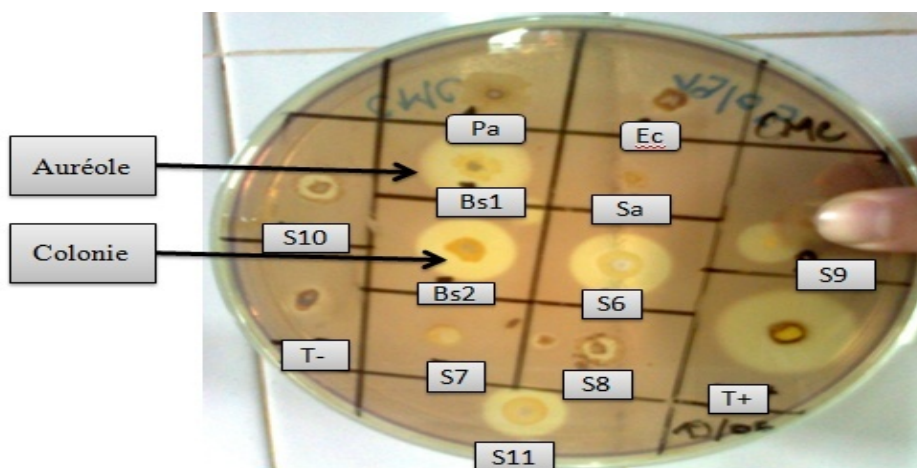


Figure 4: Mise en évidence de l'activité cellulase chez des souches bactériennes sur milieu CMC-agar.

Ec : *Escherichia coli* ; **Pa :** *Pseudomonas aeruginosae* ; **Sa :** *Staphylococcus aureus* ; **Bs1 :** *Bacillus subtilus1* ; **Bs2 :** *Bacillus subtilus 2* ; **S6 :** souche 6 ; **S7 :** souche 7 ; **S8 :** souche 8 ; **S9 :** souche 10 ; **S11 :** souche 11 ; **T+** Témoin positif ; **T-** Témoin négatif.

Les résultats de la révélation des activités cellulases sont décrits dans le tableau suivant :

Tableau 8 : tableau regroupant les souches productrices des cellulases

souches	<u>P.a</u>	<u>E.c</u>	<u>B.s1</u>	<u>S.a</u>	<u>B.s2</u>	S6	S7	S8	S9	S10	S11
Enzyme											
cellulases	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+

+ présence d'activité, - absence d'activité, ± faible activité

2. Criblage des souches productrices des pectinases

L'activité pectinolytique a été révélée chez 4 souches, dont le diamètre varie de 2 à 2,4 cm (figure 5). Ces isolats, possèdent à la fois une activité pectinase et cellulase.

Le témoin positif, est l'enzyme (pectinase) pure (Sigma) d'*Aspergillus niger*. Alors que le témoin négatif est *Escherichia coli*.

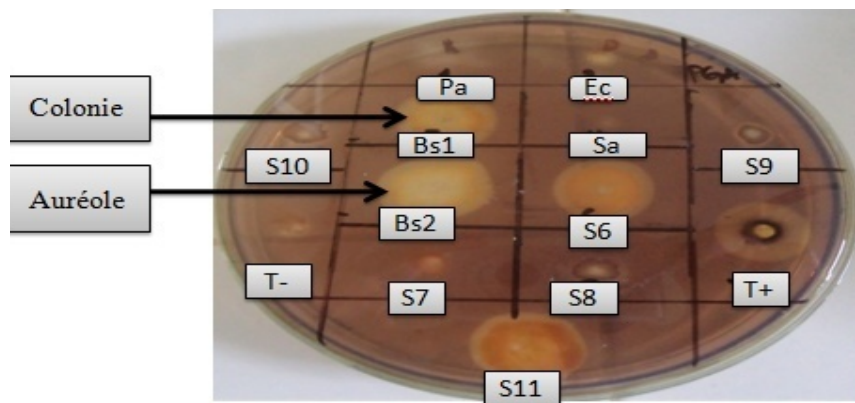


Figure 5: Mise en évidence de l'activité pectinase chez des souches bactériennes sur milieu PGA-agar.

Ec : *Escherichia coli* ; **Pa :** *Pseudomonas aeruginosae* ; **Sa :** *Staphylococcus aureus* ; **Bs1 :** *Bacillus subtilus1* ; **Bs2 :** *Bacillus subtilus 2* ; **S6 :** souche 6 ; **S7 :** souche 7 ; **S8 :** souche 8 ; **S9 :** souche 10 ; **S11 :** souche 11 ; **T+** Témoin positif ; **T-** Témoin négatif

Tableau 9 : tableau regroupant les résultats de la révélation des activités pectinases

souches	P.a	E.c	B.s1	S.a	B.s2	S6	S7	S8	S9	S10	S11
Enzyme											
pectinase	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	±

+ présence d'activité, - absence d'activité, ± faible activité

Les souches bactériennes qui ont montré des activités cellulases et pectinase, ont été repiquées sur des CMC- agar et PGA-agar dans des boîtes isolées afin de confirmer les résultats précédemment obtenus.

II. Identification des souches actives

1. Identification biochimique

La caractérisation biochimique des isolats révélant des activités pectinases et cellulases, montre que toutes les souches sont des bacilles Gram positif . La détermination des genres et des espèces ont été fait grâce à l'arbre d'identification proposé par Bergey (figure 6). Dans cette étude, trois souches (S6, S9 et S11) ont fait l'objet de cette identification. Les résultats de l'identification biochimique sont consignés dans le tableau 10.

Bacillus spp.

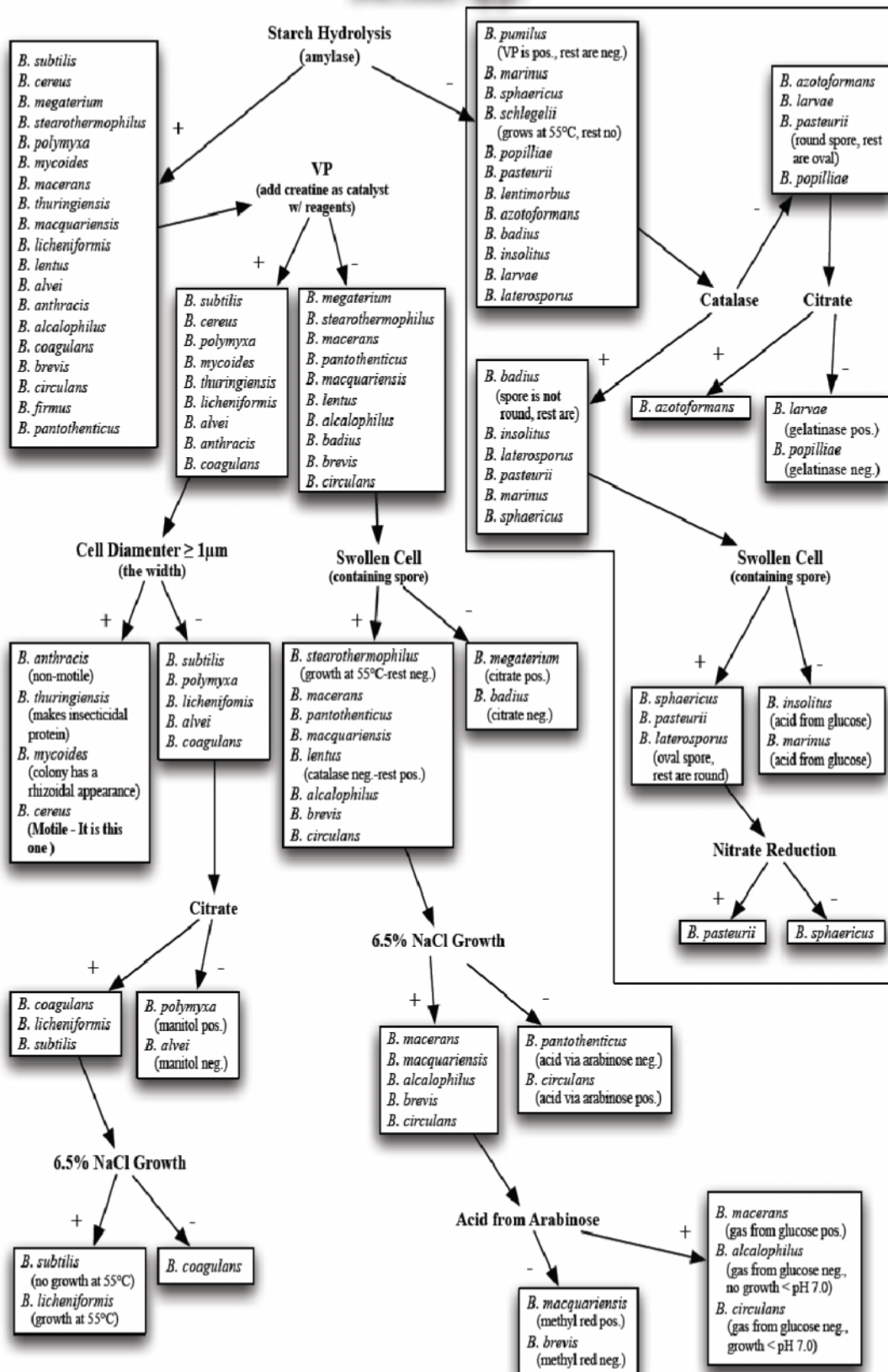


Figure 6 : arbre d'identification des Bacillus proposé par Bergey (David Hendricks Bergey, John G. Holt., 1957)

Tableau 10 : Etude des caractéristiques biochimiques des souches étudiées

Code De souche	Test de Gram	Amylase	VP	Citrate	Formation des spores	NaCl 6,5%	Diamètres des cellules	Rouge de methyl	Formation d'acide à partir d'arabinose	Mannitol
6	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
9	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
11	+	+	+	-	-	+		-		

+ résultats positif , - résultat négatif

L'analyse des résultats obtenus, a permis de prévoir que S6 est *Bacillus brevis* S9 est *Bacillus alvei* et S11 est *Bacillus baduis*

2. Identification moléculaire

La méthode d'identification biochimique des bacilles a permis d'identifier trois espèces différentes. Donc, pour vérifier la position taxonomique de ces souches, on a procédé à l'identification moléculaire.

2.1. L'amplification de l'ARN 16 S

L'ADN génomique a été extrait à partir des souches présentant des activités cellulolytiques et pectinolytiques. des amorces universelles RS16 et Fd1 sont utilisées dans la réaction de la PCR afin d'amplifier L'ARN 16S des trois souches.

La confirmation de l'amplification de l'ARN 16 S est validée par la présence d'une bande sur le gel d'agarose 1%.

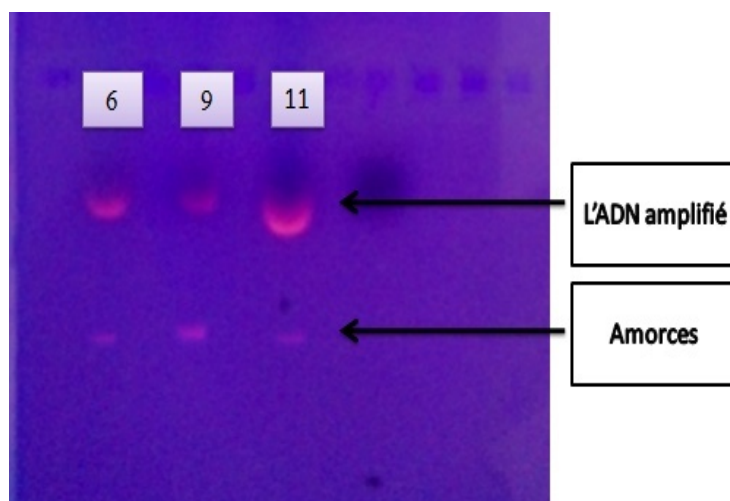


Figure 7 : Electrophorèse en gel d'agarose des produits PCR en utilisant les amorces fd1 et RS16.

Après avoir vérifié la présence de l'ADN sur le gel d'agarose, les extraits d'ADN des trois souches ont été envoyés au CURI pour être séquencés. Le résultat du séquençage a montré que les séquences ne sont pas bien lisibles, de ce fait, ces dernières ne pourraient pas être comparées à la banque de données.

III. Effets des paramètres physico-chimiques sur l'activité des enzymes.

1. Effet de la température

1.1. L'activité cellulase

Chaque enzyme a une température optimale (température pour laquelle son rendement est maximal). Cette température est généralement comprise entre 37°C et 40 °C.

Dans le but d'évaluer l'effet de la température sur l'activité des enzymes étudiées. Le surnageant du milieu de culture des souches qui ont révélé des activités enzymatiques ont été soumises, dans un premier temps à une gamme de températures allant de 20 °C à 75°C à un pH 7. Ensuite les souches qui ont révélé une stabilité à une température de 75°C, ont été testées à des températures plus élevées allant de 75 °C à 100°C pour *Bacillus subtilis* 1 (figure 8 (b)) et S6 (figure 8 (f)).

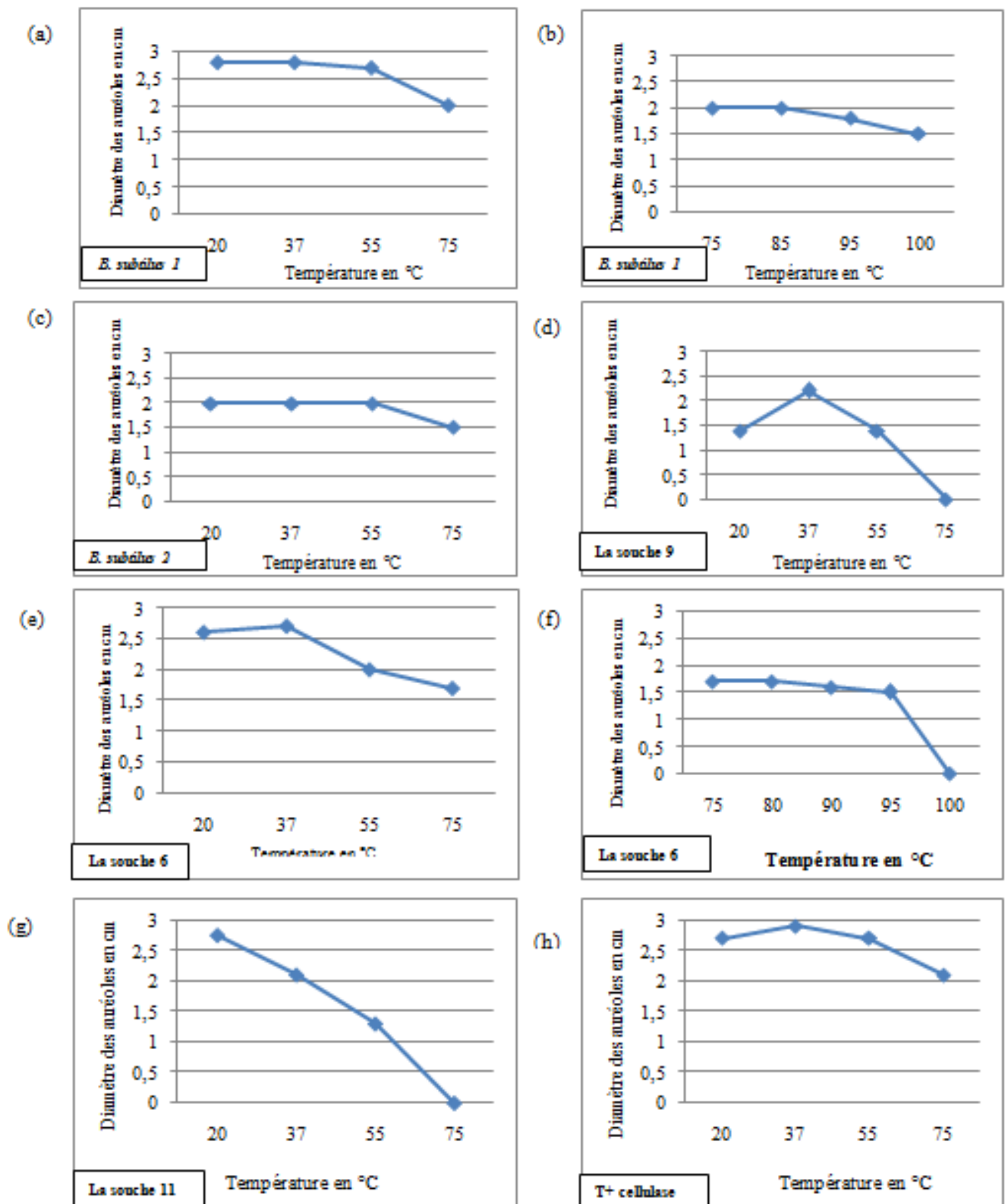


Figure 8 : Effet de la température sur l'activité des cellulases des souches :

B. subtilis 1 (a,b) ; *B. subtilis* 2 (c) ; S9 (d) ; S6 (e, f) ; S11 (g) et pour le témoin positif (h).

Les cellulases ont montré une activité optimale entre 20 °C et 55°C chez *Bacillus subtilus 1* (figure 8 (a)) et *Bacillus subtilus 2* (figure 8(c)). Puis, elles perdent leur activité progressivement, mais restent active jusqu'à 75°C pour *Bacillus subtilus 2*. Au-delà de cette température les cellulases ne restent plus actives pour cette dernière. Tandis qu'elles résistent à une température de 95 °C pour S6 (Figure 8 (f)) et 100°C pour *Bacillus subtilus 1* (Figure 8(b)). Afin de vérifier, la thermostabilité des ces deux souches, les surnageants de la culture de (*B.subtilus 1* et S6) ont été soumis à une température de 90°C, pendant différents intervalles de temps (30 min, 90 min et 120 min). Après une nuit d'incubation à 37°C, on a remarqué que les deux souches montrent une activité (présence d'une auréole) à cette température après 90 minutes pour S6 et 120 minutes pour *Bacillus subtilus1*. Cela pourrait mener à conclure que les cellulases de *Bacillus subtilus1* sont thermostables. Alors que, celles de *Bacillus subtilus2*, S6, S9 et S11 sont thermolabiles puisqu'elles perdent leur activité à des températures définies.

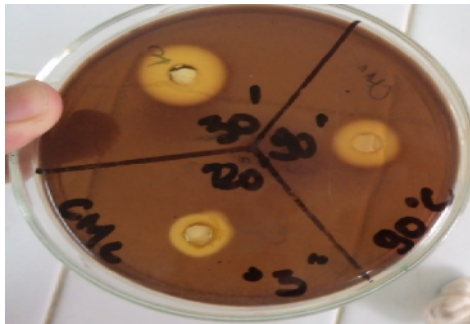


Figure 9 : effet du traitement de la cellulase par la température après différents laps de temps

1.2 Activité pectinase

Les souches bactériennes présentant une activité pectinolytique (Bs1, Bs2, S6) ont été soumis à un test de température afin d'évaluer leur thermostabilité. La gamme de température à laquelle les surnageants des cultures ont été soumis est comprise entre 20°C et 75°C (figures 9(a), 9(c), 9(e)). Ensuite, il nous a semblé intéressant de tester l'effet de températures plus élevées pour les enzymes qui ont montré une activité à 75 °C. (Figures 10(b), 10(d) et 10(f)).

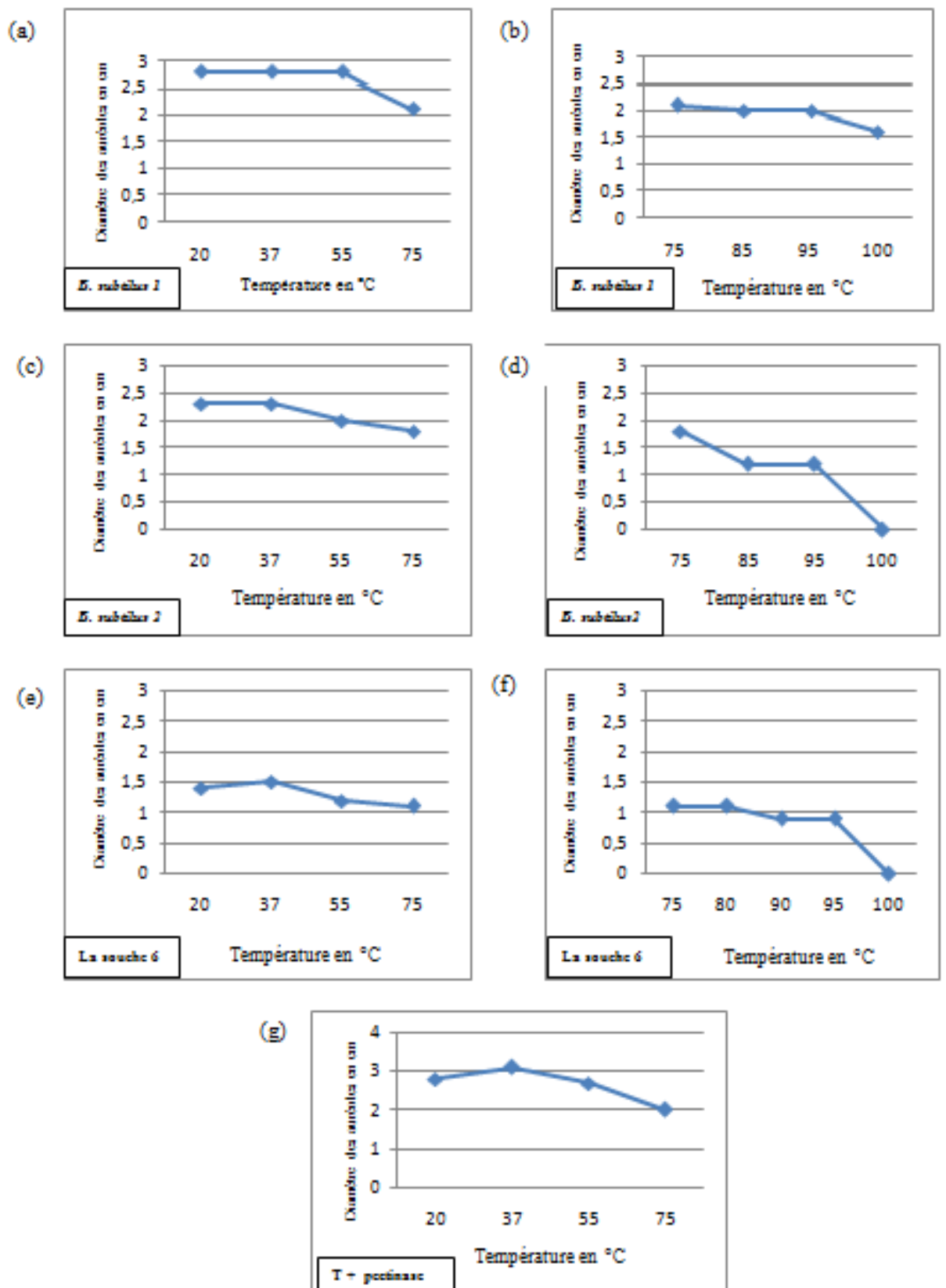


Figure 10 : Effet de la température sur l'activité des pectinases des souches : Bs1 (a,b) ; Bs2 (c,d) ; S6 (e,f) et le témoin positif (g)

Tout d'abord, on a remarqué qu'après une nuit d'incubation à 37°C, l'activité de la pectinase est optimale entre 20°C et 55°C pour *Bacillus subtilus* 1 et 2, tandis que l'optimum pour S6 est à 37 °C.

En augmentant la température au-delà de 75°C , on s'aperçoit que ces enzymes gardent leur activité jusqu'à une température de 95°C pour S6 et B.subtilus 2. Alors que les pectinases de *Bacillus subtilus* 1 résiste à une température qui atteint 100°C.

2. Effet du pH

2.1. Activité cellulase

Le pH est un paramètre environnemental important pour la production des cellulases et pectinases. En effet, différentes valeurs de pH sont testées sur ces deux enzymes dans le but de déterminer l'optimum de leur activité. Les résultats sont présentés dans la figure 11.

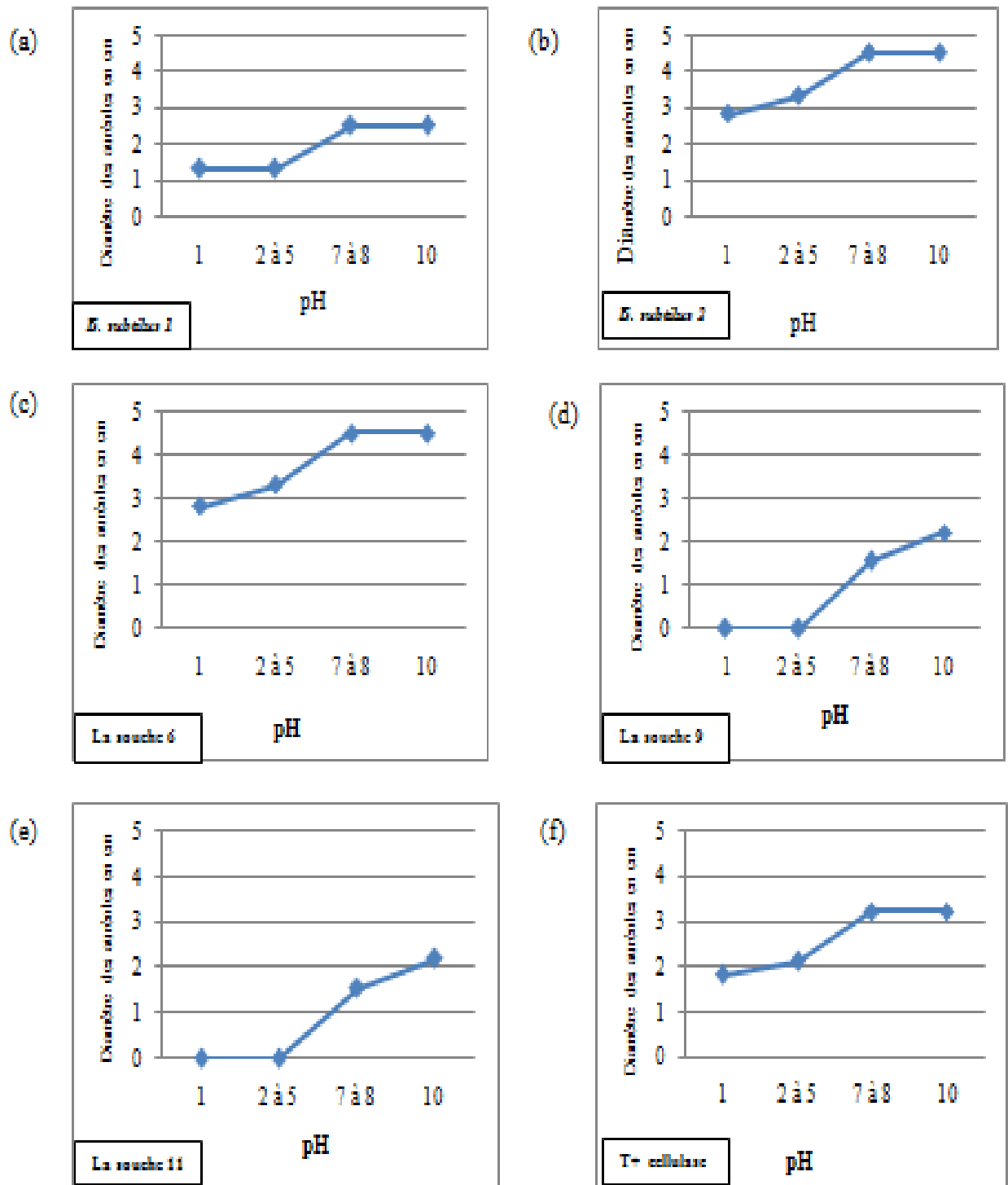
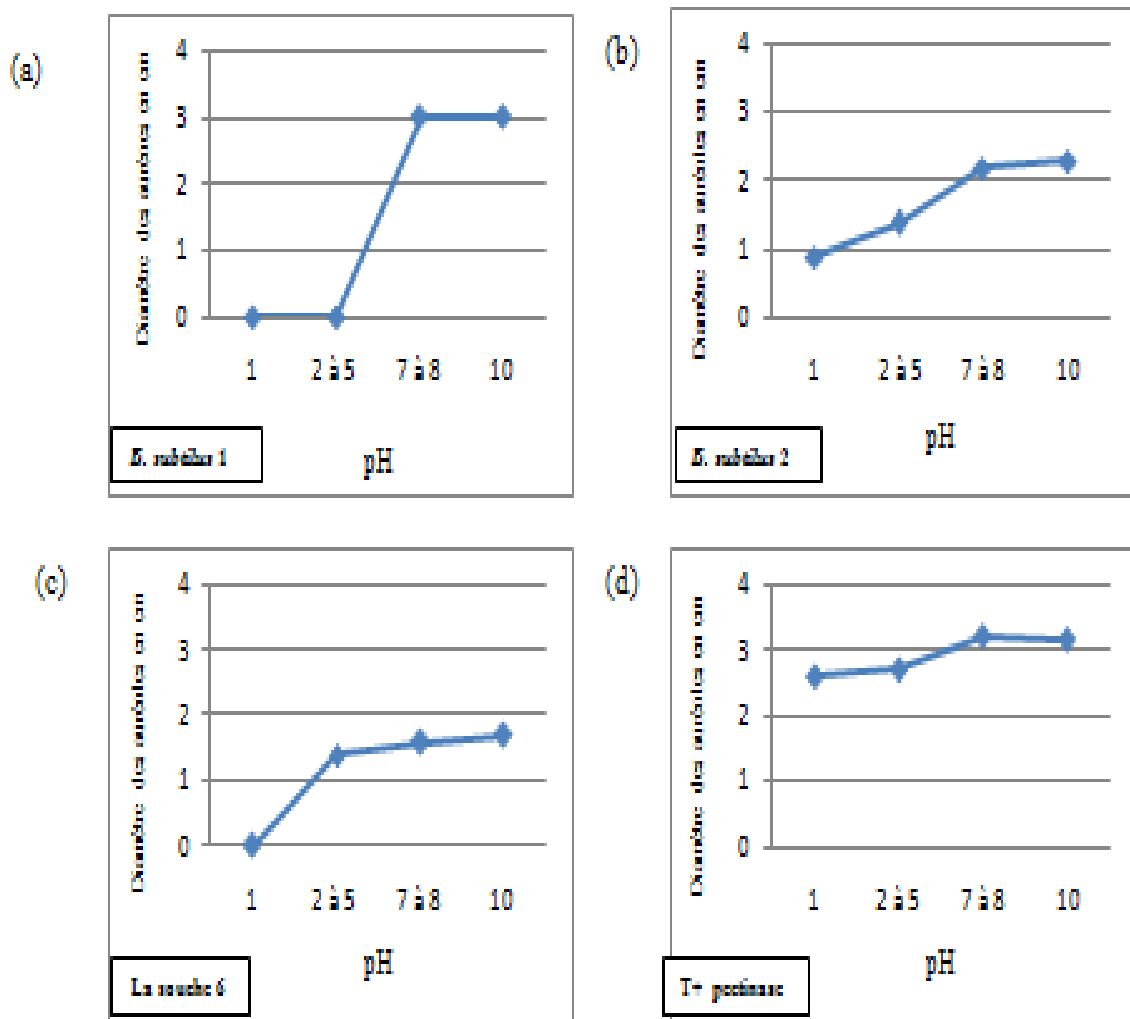


Figure 11 : Effet du pH sur l'activité de la cellulase des souches : *B.subtilis1* (a) ; *B.subtilis2* (b) ; S6(c) ; S9(d) ; S11(e) et pour le témoin positif (f)

Au pH initial (pH 7), les cellulases présentes dans les surnageants de toutes les souches sont actives. Ces enzymes restent stable jusqu'à un pH 10 pour *Bacillus subtilus* 1, 2 et S6. Donc, elles possèdent une fourchette d'activité large qui s'étend de 1 à 10. Alors que, pour S9 et S11, leur cellulases sont actives uniquement à pH basique, et atteignent leur optimum à pH 10, ensuite leur activité diminue pour s'annuler à partir d'un pH 5.

2.2. Activité pectinase

L'effet du pH est représenté dans la figure 12.



T+ Témoin positif

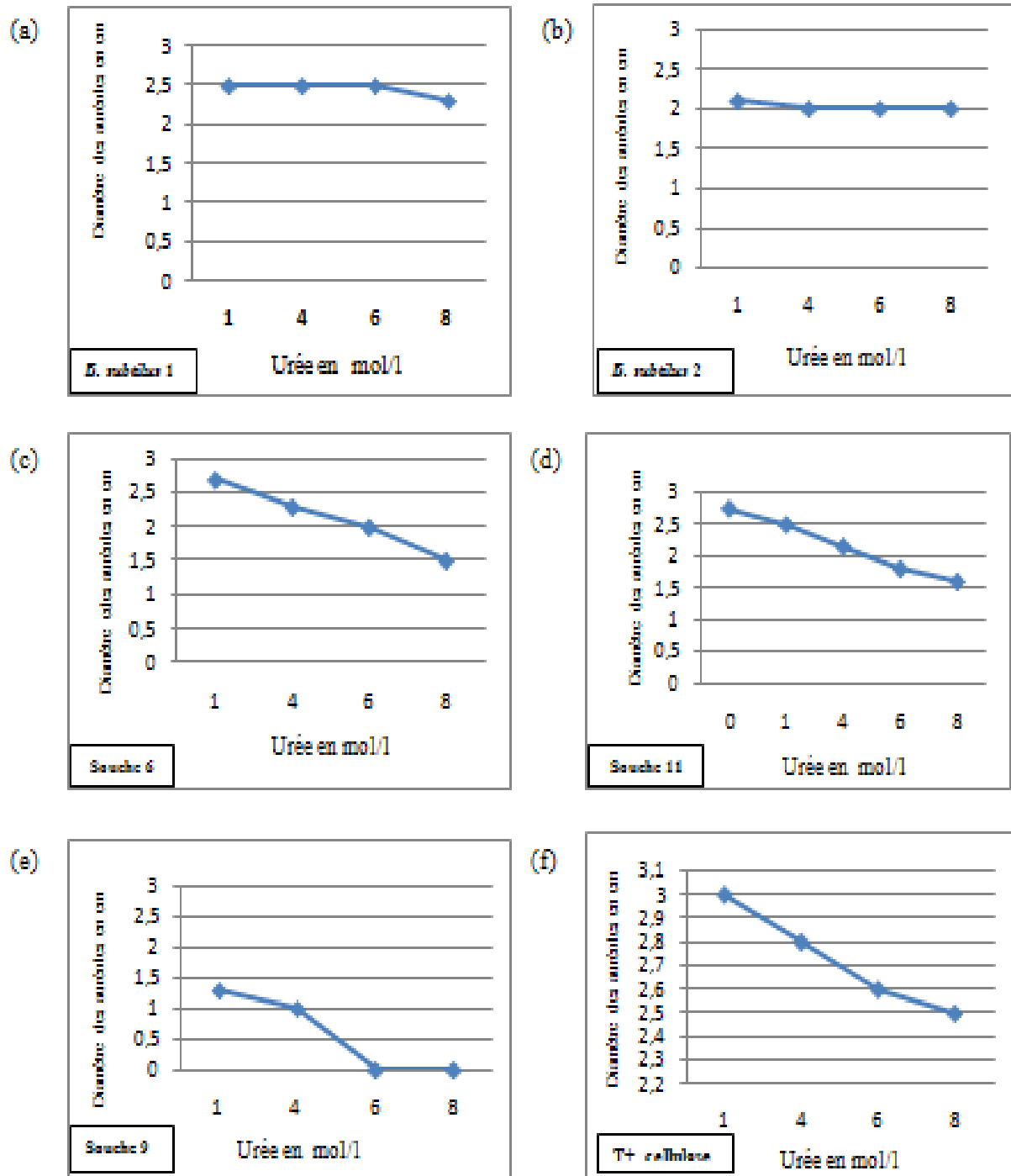
Figure 12 : Effet du pH sur l'activité de la pectinase de *B. subtilus*1(a) ; *B. subtilus*2(b) ; S6(c) et pour le témoin (d).

Les pectinases présentes dans les surnageants des trois souches montrent une activité optimale à pH basique dont l'optimum est à pH 10. En dehors de cette zone, les pectinases gardent leur activité jusqu'à un pH 1 pour *Bacillus subtilus* 2 et pH 2 pour la souche 6. Tandis que le témoin son optimum est à pH 7.

3. Effet de l'urée

3.1. Activité cellulase

L'urée est un agent chaotropique. A forte concentration, l'urée fragilise fortement les liaisons hydrogènes qui sont responsables du maintien de la structure des protéines. Donc, pour évaluer l'effet de l'urée sur l'activité des enzymes étudiées, quatre concentrations ont été testées sur les surnageants.



T+ Témoin positif

Figure 13 : Effet de l'urée sur l'activité de la cellulase de Bs1(a) ; Bs2(b) ; S6(c) ; S11(d) ; S9(e) et pour le témoin positif (f).

D'après les résultats représentés dans la figure 13, les cellulases de *B.subtilis* 1 et 2, montrent une activité importante même à des fortes concentrations d'urée (8 mol/l), donc l'urée n'influence pas grandement le fonctionnement de l'activité cellulase. Les S6 et S11, leur cellulases montrent une diminution significative de leur activité mais, elles restent toujours actives à une concentration de(8 mol/l). On remarque que ces cellulases reproduisent le même profil que celui du témoin. Alors que, pour S9, sa cellulase perd son activité à partir d'une concentration d'urée de (4 mol/l).

3.2. Activité pectinase

Dans le but de mettre en évidence l'effet de l'urée sur l'activité des pectinases présentes dans les surnageant des souches étudiées, une gamme de concentration d'urée allant de 1 mol/l à 8 mol/l est testée sur ces surnageants. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 14.

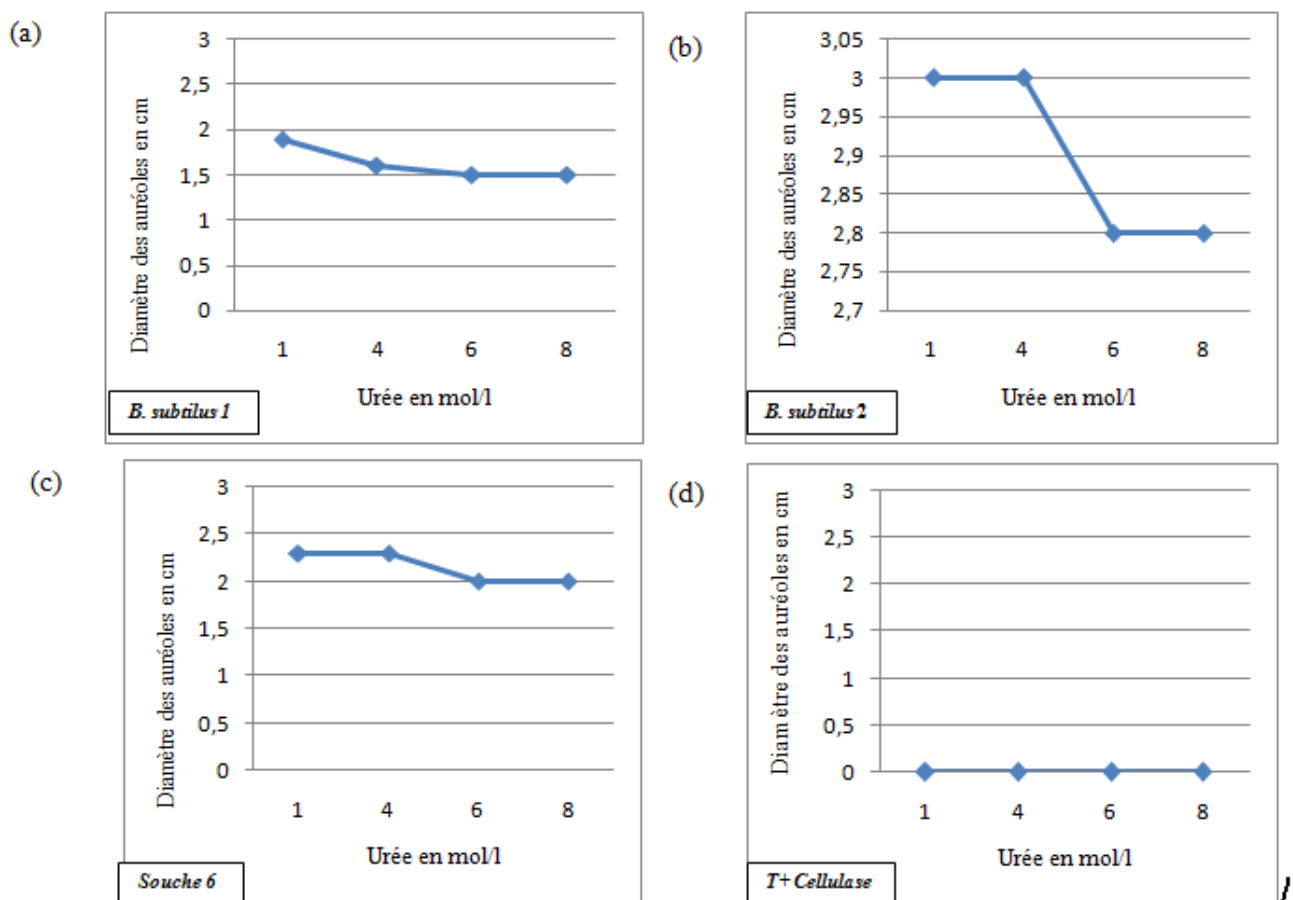


Figure 14 : Effet de l'urée sur l'activité de la pectinase de Bs1(a) ; Bs2(b) ; S6(c) et pour le témoin positif (d).

L'étude de l'effet de l'urée sur les surnageants préparés, a montré que pour *Bacillus subtilus* 1,2 et la souche 6, l'activité de la pectinase diminue progressivement mais l'enzyme garde son activité jusqu'à une concentration de 8 mol/l. tandis que, que le témoin positif perd son activité à partir d'une concentration de 1 mol/l.

4. Effet du SDS et du β -mercaptoéthanol

Le SDS est un détergent et un tensioactif ionique fort, il supprime les liaisons non-covalentes de la protéine, permettant la dénaturation de cette dernière. Donc, pour évaluer l'effet du SDS sur l'activité des enzymes étudiées. Une concentration de 1% SDS a été testée sur ces protéines. Alors que, le β -mercaptoéthanol est utilisé, pour réduire les ponts disulfures présents dans les protéines.

Les résultats montrent que, seulement les cellulases de *Bacillus* 1 et 2 qui résistent à l'action du SDS.

Concernant, l'activité pectinase on remarque qu'elles gardent son activité pour *Bacillus subtilus*1. Tandis que les surnageants des toutes les souches perdent complètement leur activité sous l'effet du SDS.

Le β -mercaptoéthanol n'a pas montré un effet sur l'activité des surnageants des souches, puisque les enzymes ont montré une activité hydrolysante des substrats.

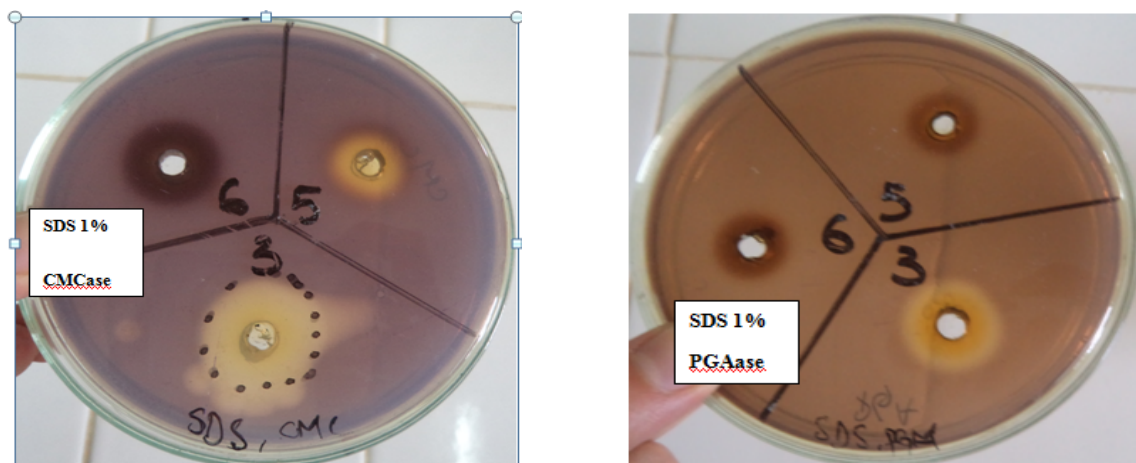


Figure 15 : effet du SDS sur l'activité cellulase et pectinase chez Bs1 (3), Bs2(5) et S6

Discussion

Les souches ayant développés une auréole (cellulases+, pectinases +) ont été criblées, pour réaliser la présente étude qui consiste à évaluer l'effet de différents paramètres physico-chimiques sur l'activité des enzymes relarguées dans le surnageant, puis prévoir la taxonomie des bactéries productrices de ces protéines à intérêt biotechnologique.

Les activités CMCase et PGAase ont été évalués sous l'effet de différentes températures afin de vérifier leur thermostabilité. L'activité cellulase a montré une meilleure activité entre 37°C et 55°C, pour la plupart des souches étudiées. Cette protéine garde son activité même après 90 minutes et 2 h d'incubation à 90°C, respectivement pour la souche 6 et 3. Plusieurs études ont été effectués dans ce sens, Abdelnasser *et al.*, 2007, Mortabit *et al.*, 2010, Hongliang *et al.*, 2011, ont reportés que les températures optimales d'activité de la cellulase extraite à partir des *Bacillus sp* sont respectivement 75°C, 55°C et 85°C.

L'activité pectinase est mise en évidence chez trois souches sous l'effet de différentes températures, dont l'optimum de température est compris entre 20°C à 55°C pour *Bacillus subtilus 1* et 37°C pour *Bacillus subtilus 2* et S6 ainsi que le témoin. Pourtant, on remarque que ces souches ont montré une activité inférieure à 95 °C.

En effet, la température optimale des enzymes n'est pas directement corrélée à la source de l'organisme (Hongliang *et al* ; 2011). Vue que la température de la source du biotope des micro-organismes producteurs de ces enzymes varie entre 45°C à 60°C.

Les microorganismes thermophiles cellulolytiques et pectinolytiques présentent un intérêt particulier en raison de leurs capacités à produire des cellulases et des pectinases thermostables. Ces enzymes sont généralement stables sous une variété de conditions sévères comprenant des pH fortement acides et alcalins, ainsi que des températures suffisamment élevées (Bhat M.K et Bhat S., 1997).

L'effet de la température sur l'activité des cellulases et pectinases a fait l'objet de plusieurs études antérieure, Mayende *et al.*, 2006, ont reporté que *Bacillus sp* peuvent sont de produire des cellulases et pectinases thermostables et alcalinophiles . Ces études sont conformes avec la présente, car toutes les souches testées sont des *Bacillus sp*, identifiées par des tests biochimiques.

La thermostabilité de ces enzymes est due probablement aux trois raisons suivantes ; La présence des interactions électrostatiques (Szilagyi A. et *al.*, 2000) la présence des régions sous forme de boucle (Thompson et *al.*, 1999) et les réticulations formées par les ponts dissulfures (Németh et *al.*, 2002).

Quant à l'effet du pH, le test a révélé que le pH optimum pour l'activité des cellulases et pectinases étudiées, est très alcalin par rapport au témoin utilisé (pH varie entre 7 et 8 pour les témoins positifs)

De nos jours, les pectinases sont largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme la clarification des jus, le textile et d'autres branches industrielles (Semenova et *al.*, 2003). L'activité pectinase étudiée a montré qu'elle possède une optimale à pH basique, par conséquent elle s'avère utile en tant qu'une enzyme pour l'industrie des détergents.

L'utilisation de ces des cellulases et pectinases thermostables au cours de l'étape de l'extraction de l'huile d'olive permet de préserver la qualité de l'huile en empêchant la dégradation des substances nobles, et l'oxydation (Ramesh et *al.*, 2006). Donc, on s'aperçoit que l'utilisation de ces enzymes lors de l'étape du malaxage constitue un outil important pour éviter la dégradation du goût, l'intensification de l'oxydation, la perte des substances volatiles et des vitamines , provoqués par l'augmentation de la température lors de cette étape.

Selon les revues bibliographiques, les enzymes cellulosiques et pectinolytiques trouvent une panoplie d'application dans différents domaines. Parmi, les plus importantes est l'utilisation de ces enzymes cellulases pour la transformation du matériel cellulosique. Cette biomasse végétale est la ressource durable la plus importante pour la production des combustibles, en raison de leur faible coût d'approvisionnement et leur abondance. L'obstacle technologique majeur de l'utilisation de ces ressources est l'absence de technologies de transformation à faible coût. Une stratégie prometteuse pour surmonter cet obstacle consiste en la production des enzymes cellulolytiques (Lynd et *al.* , 2002) capables d'hydrolyser la biomasse et fermenter les sucres résultants en une seule étape. Donc, on peut conclure, qu'une future utilisation de ces enzymes extraites à partir des isolats étudiés, pourrait être prévue au Maroc pour la production des combustibles.

La dénaturation des protéines par l'urée déplie complètement la structure de la protéine. Cette dénaturation a habituellement pour conséquence de rendre la protéine inactive (Peter H. et *al.*, 2007). Pourtant, l'analyse de l'effet de fortes concentrations d'urée sur les cellulases et

pectinases a révélé une diminution pas très significative de leur activité , il s'avère que ces enzymes adoptent une certaine structure qui les protège contre l'effet de cet agent chaotrope, ou bien ces protéines sont liées à d'autres molécules résistantes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les aspects biologiques du traitement de la biomasse cellulolytiques sont devenus les axes principaux de la recherche des cellulases, pectinase et les micro-organismes producteurs. Le problème majeur qui attire l'attention n'est pas limité à la production de la cellulase mais aussi à la compréhension du fonctionnement de ces enzymes.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la caractérisation de l'activité cellulase et pectinase et la détermination de l'effet de différents agents physico-chimiques sur leur activité, puis d'identifier les souches productrices de ces enzymes.

La production des enzymes a été détectée chez cinq souches parmi les onze étudiées. Cette évaluation a été permise grâce à la culture de ces isolats sur un milieu contenant le CMC pour la mise évidence de l'activité cellulolytique ainsi que l'activité pectinolytique sur milieu PGA.

Les résultats obtenus à partir de l'étude de l'effet de la température montrent que trois souches parmi celles qui sont actives, gardent leur stabilité à fortes températures qui peuvent atteindre 95°C et 100°C pour les cellulases et les pectinases relarguées par les souches dans le milieu de culture. De ce fait, ces enzymes sont considérées hyperthermophiles.

Quant au pH, les résultats révèlent que les pectinases et cellulases possèdent une large fourchette d'activité avec un optimum d'activité à pH 10 pour toutes les souches testées. Donc, on s'aperçoit que ces enzymes pourraient avoir une application intéressante dans différentes industries principalement dans l'industrie des détergents.

L'étude de l'effet de différents agents dénaturants a montré que même en fortes concentrations d'urée, la cellulase et la pectinase de toutes les souches gardent jusqu'à 50% de leur activité. Alors, que pour le SDS 1% on a remarqué que seulement la cellulase de *Bacillus 1* et 2 et la pectinase de *Bacillus 1* qui retiennent leur activité sous l'effet de cette concentration du SDS.

La majorité des enzymes extrémophiles impliquées dans la dégradation du matériel cellulosique ont été identifiées avec des outils bioinformatiques. Donc, il serait très utile de caractériser ces protéines à l'échelle biochimique afin de générer des opportunités pour l'utilisation des ressources renouvelables.

Les perspectives attendues sont :

- ❖ Identification moléculaire des souches productrices de ces enzymes potentielles .
- ❖ Optimiser la méthode du dosage des sucres réducteurs.
- ❖ Optimiser les conditions de la culture des bactéries productrices.
- ❖ Purifier les deux enzymes cellulase et pectinase
- ❖ Déterminer les gènes potentiels responsables de la synthèse de ces protéines, puis exprimer ces gènes dans des vecteurs appropriés, afin de déterminer les principales propriétés enzymatiques et biophysiques.
- ❖ Production des enzymes à grande échelle en vue d'une application dans les différentes industries.

Rapport-Gratuit.com

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelnasser Salah Sheble., Ibrahim and Ahmed I El-diwany., 2007. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 1(4): 473-478.

Bassi R., Pineau B., Dainese P., and Marquardt J., 1993. "Carotenoid-binding proteins of photosystem II," European Journal of Biochemistry, vol. 212, no. 2, pp. 297–303.

Bergquist P.L., Gibbs M.D., Morris D.D., Teo' V.S., Jsaul D.J. and Morgan H.W., 1999. Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. 28; 99-110.

Bioremediation of Hazardous Wastes, Wastewater, and Municipal Wastes. In : Business Communications Company, Report Number: C-110U. 1999.

Blanco P., Sieiro C., Villa TG., 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. FEMS Microbiol Lett;175:1–9.

Clark W.M. and Lubs H.A., 1915. The differentiation of bacteria of the Colon-Aerogenes family by the use of indicators. J. Inf. Dis., 17: 160-173

Combo A.M.M., Aguedo M. & Paquot M., 2011. Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 153-164

Cowling E B, 1975. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials, Biotechnol bioeng Symp,5 163-181.

Daniel Ballerini., 2006. les biocarburants ; état des lieux, perspectives et enjeux du développement, édition TECHNIP, page 270.

David Hendricks Bergey,John G. Holt., 1957. Identification flow charts. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition .

De Vries R.P., 2002. The -1,4-endogalactanase A gene from *Aspergillus niger* is specifically induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of pectic hairy regions. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4985-4993.

Des Raj Kashyap a., Sanjeev Kumar Soni a., Rupinder Tewari b., 2003. Enhanced production of pectinase by Bacillus sp. DT7 using solid state fermentation. Bioresource Technology 88 251–254.

Donald Voet., Judith G., Voet ., 2005 . Structure quaternaire, Biochimie, 2^e édition de boeck, page 265.

Fan L T., Lee Y H., Beardmore D H., 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose : Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis *Biotechnol Bioeng*, 22 177-199.

Fantozzi.P., Petruccioli G., and Montedoro G., 1977. “Trattamenti con additivi enzimatici alle paste di oliva sottoposte ad estrazione per pressione unica: influenze delle cultivars, dell’epoca di raccolta e della conservazione,” *Grasse*, vol. 54, pp. 381–388.

Fonty.G., Forno. E., Gaudet .Ph., 1988. Données nouvelles sur les bactéries cellulolytiques du rumen. *Repro . Nutr. Develop*, 28. Suppl. N°1 19-32.

Gailing MF., Guibert A., Combes D., 2000. Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. *Bioprocess Eng*; 22:69–74.

Galante Y. M., DeConti A., and Monteverdi R., 1998. “Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries,” in *Trichoderma and Gliocladium—Enzymes*, G. F. Harman and C. P. Kubicek, Eds., vol. 2 of *Biological Control and Commercial Applications*, pp. 311–326, Taylor & Francis, London, UK,.

GAUDET G.,1987. Bacteroides succinogenes cellular location of cellulolytic enzymes. In *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*, p. 62. FEMS S Symp., Paris, 7-9 septembre.

Ghose T.K. ;1987 . Measurement of cellulose activities.

Gibbs M.D., Reeves R.A. and Bergquist P.L., 1995. Cloning, sequencing and expression of a xylanase gene from the extreme thermophile *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B. 1 and activity of the enzyme on fiber-bound substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4403-4408.

Godfrey T. and West S., 1996 .“Textiles,” in *Industrial Enzymology*, pp. 360–371, Macmillan Press, London, UK, 2nd edition.

Guevara MA., Gonzalez-Jaen MT., Estevez P.,1997. Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.s.p. *radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. *Can J Microbiol*;43:245–53.

HAMM W et HAMILTON RJ., 2000. Edible oil processing. Sheffield, UK : Sheffield Academic Press.μ

Hongliang Wang., Fabio Squina., Fernando Segato., Andrew Mort., David Lee., Kirk Pappan., Rolf Prade1., Aug. 2011. High-Temperature Enzymatic Breakdown of Cellulose. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 5199–5206.

Hoondal GS., Tiwari RP., Tiwari R., Dahiya N., Beg QK.,2000. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*;59:409–18.

Inar I. C., 2005. “Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids,” *Process Biochemistry*, vol. 40, no. 2, pp. 945–949.

Jayani R.S., Saxena S., Gupta R ., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.*, **40**, 2931-2944.

Kim Ah-You., Moe Suleiman., John Jaworski., Mai 2000. La biotechnologie au service d’une production plus propre au Canada.

Klemm D., Schmauder H P., Heinza T., 2002. in *Biopolymers*, vol VI, edited by E Vandamme, S De Beats & A. Steinb_chel (Wiley-VCH, Weinheim), 209-292.

LAMED R., NAIMARK J., MORGENSTEIN E., BAYER E.A., 1987. Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. *J. Bacteriol.*, 169, 3792-3800.

Lynd Lee R., Paul J. Weimer., Willem H. van Zyl., Isak S. Pretorius., Sept. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology . *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, p. 506–577.

Maki Miranda L., Michael Broere., Kam Tin Leung., Wensheng Qin., 2011.Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *Int J Biochem Mol Biol*;2(2):146-154.

Marchessault R H., Sundararajan P R., 1993.Cellulose, in *The Polysaccharides vol 2*, edited by G O Aspinall (Academic Press, NewYork) 11-95.

Mayende L., B Wilhelmi, B Pletschke., 2006. Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus spp.* isolated from compost. *Soil Biology and Biochemistry*.

Miller GL., 1969. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 31:426-428.

Minussi R. C., G. M. Pastore., and N. Dur'an., , 2002. “Potential applications of laccase in the food industry,” *Trends in Food Science and Technology*, vol. 13, no. 6-7, pp. 205–216.

Mortabit D., Zayani M., Haggoud A., Houssaini Iraqui M., Houari A., Fikri K., Koraichi Ibensouda S., 2010. Carboxymethyl cellulose Production by Moroccan Bacillus Isolates. *Moroccan Journal of Biology* , 43-49.

Ng T K., & Zeikus J G., 1982. Differential metabolism of cellobiose and glucose by *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrodulfuricum*, *J Bacteriol*, 150 1391-1399.

Peter H. Raven., Peter H. Raven., Georges B. Johnson., Kenneth A. Mason., Jonathan B. Losos., Susan S. Singer., Georges B. Johnson., Kenneth A. Mason., Jonathan B. Losos., Susan S. Singe., 2007. *BIOLOGIE*. Edition eboeck ; Page 52

Poulsen O M et Petersen L W., 1988. Growth of *Cellulomonas* sp.ATCC 21399 on different polysaccharides as sole carbon source induction of extracellular enzymes. *Appl Microbial Biotechnol*,29 480-484

Rajeev K Sukumaran., Reeta Rani Singhanian., Ashok Pandey., November 2005. *Microbial cellulases – Production, applications and challenges*, *Journal of Scientific & Industrial Research* Vol. 64, pp.832-844.

Rajoka M I & Malik K A., 1997. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substates, *Biores Technol*, 59 21-27.

Ramesh Chander Kuhad., Rishi Gupta., and Ajay Singh., 2011 . **Microbial Cellulases and Their Industrial Applications.** SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research Volume, Article ID 280696, 10 pages doi:10.4061/2011/280696

Ranalli A., Pollastri L., Contento S., Lucera L., and Del Re P., 2003.“Enhancing the quality of virgin olive oil by use of a new vegetable enzyme extract during processing,” *European Food Research and Technology*, vol. 216, no. 2, pp. 109–115,

Ranveer Singh Jayani, Shivalika Saxena, Reena Gupta., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 40 2931–2944

Rastogi G. ,1998. Vishal’s objective botany. Meerut, India: Vishal Publishers.

Rexova Benkova´ L, Markovic´ O., 1976. Pectic enzymes. *Adv Carbohydrate Chem* ;33:323–85.

Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J., Vandamme E.J., 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 39, 213-279.

Salazar L., JayasingheU., 1999. Fundamentals of purification of plant viruses. In: Techniques in plant, virology, CIP., Training Manual, J.O., Virus Purification, International Potato Centre, Peru,:1–10.

Saraswati Bai1., M. Ravi kumar., D.J. Mukesh kumar., P. Balashanmugam., M.D. Bala kumaran., P.T. Kalaichelvan ., 2012. Cellulase Production by *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung. *Archives of Applied Science Research*, 4 (1):269-279.

Scott D.,1978. Enzymes, industrial. In: Grayson M, Ekarth D, Othmer K, editors. *Encyclopedia of chemical technology*. New York: Wiley;. p. 173–224.

Semenova, M.V., Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Okunev, O.N., Sinitsyn, A.P., 2003. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry (Moscow)* 68 (5), 559–569 (Transl. from *Biokhimiya* 68 (5), 686–697).

Szilagyi A., P.Zavodszky., 2000. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey, *Struct.Fold.Des.*8 (2000) 493–504.

Te'o V.S.J., Saul D.J., and Bergquist P.L., 1995. CelA, another gene coding for a multidomain cellulases from the extreme thermophile *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 291-296.

Thompson M.J., D. Eisenberg., 1999. Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability, *J. Mol.Biol.*290 595–604.

Thurston B., Dawson K A., Strobel H J., 1993. Cellobiose versus glucose utilization by ruminal bacterium *Ruminococcus albus*, *Appl Environ Microbial*, 59 2631-2637.

Tsuymu S., 1997. Self catabolite repression of pectate lyase in *Erwinia carotovora*. *J Bacteriol* 1979;137:1035–6. [142] Guevara MA, Gonzalez-Jaen MT, Estevez P. Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.s.p. *radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. *Can J Microbiol* 43:245–53.

Voges O. und Proskauer B., 1898. Beitrag zur Ernährungsphysiologie und zur differentialdiagnose der hamorrhagischen septicämie. Z. Hyg. Infekt. 28 :20-22.

Whitaker JR., 1990. Microbial pectinolytic enzymes. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. Microbial enzymes and biotechnology. 2nd ed. London: Elsevier Science Ltd. p. 133–76.

WOOD T. M., WILSON C. A., STEWART C. S., 1982. Preparation of the cellulase from the cellulolytic anaerobic rumen bacterium *Ruminococcus albus* and its release from the bacterial cell wall. Biochem. J., 205, 129-137.

Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. Appl Microbiol Biotechnol 56:17–34.

<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>, site « Molecular Expressions », Micheal W. Davidson, Florida State University (Etats Unis d’Amérique).