

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE**
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
Option : Biochimie Appliquée

Thème

Mise en évidence des activités cellulolytiques issues de deux souches fongiques : *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* cultivées sur des sous produits agricoles.

Réalisé par : -AMMARKHODJA Liza.
 -DJAFOUR Imane.

Devant le jury composé de :

Mr TITOUCHE Yacine	Maitre assistant Classe A	UMMTO	Président
Melle DERMECHE Samia	Maitre assistante Classe A	UMMTO	Promotrice
Mme ISSELNANE Souad	Maitre assistante Classe B	UMMTO	Co-promotrice
Mme ZENNIA Saliha	Maitre de conférences Classe B	UMMTO	Examinatrice

Remerciements

Nos remerciements vont en premier lieu à Dieu qui nous a donné le courage, la force et la santé pour réaliser ce travail.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et remercier toutes personnes, qui grâce à leur aide, notre travail a vu le jour :

Notre promotrice Melle DERMECHE S, Maitre-assistante Classe A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour son suivi, sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils au cours de la réalisation de ce travail.

Notre Co-promotrice Mme ISSELNANE S, Maitre-assistante Classe B à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour son suivi, sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils au cours de la réalisation de ce travail.

Nous adressons notre reconnaissance à Mr TITOUCHE Y, Maitre assistant-Classe A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, d'avoir accepté de présider le jury.

Nous tenons à remercier également Mme ZENNIA S, Maitre de conférences Classe B à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, qui nous fait l'honneur d'être l'examinatrice de ce mémoire.

Dédicaces

A la mémoire de ma mère qui est toujours dans mon esprit, j'aurais tant aimé que tu sois là.

A tous les membres de ma famille : mon père, mon cher frère Yacine, ma chère sœur Hanane, Hayat, Saliha, ma chère grand-mère et mes deux anges Ilyas et Aline.

A toute ma famille, mes amis et mes camarades.

Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Imane.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents :

Ma mère et mon père, qui ont œuvré pour ma réussite, leur soutien, tous leurs précieux conseils, pour toutes leur assistance et leur présence dans ma vie, reçoivent à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mes frères et soeurs (viva , mimane , dida, et cici) qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A Mes chers proches, et tous mes amis et camarades.

Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Liza.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Résumé.....	01
Abstract.....	02
Introduction.....	03
I-Synthèse bibliographique.....	06
1-La cellulose.....	07
1-2-Structure de la cellulose	07
1-3-Les dérivés de la cellulose.....	09
2-Les cellulases.....	10
2-1-Définition	10
2-2-Structure.....	10
2-3-Caractéristiques des cellulases.....	11
2-4-Mode d'action	12
2-5-Mécanisme d'action des cellulases.....	13
2-6-Microorganismes cellulolytiques.....	14
2-7- Applications industrielles des cellulases	15
3-Le Xylane.....	16
3-1-Structure du xylane.....	16
4- Les enzymes xylanolytiques.....	18

4-1-structure des xylanases.....	18
4-2- Mode d'action des enzymes xylanolytique.....	19
4-3- Applications biotechnologiques des xylanases	20
5-La biomasse lignocellulosiques.....	22
5-1- Valorisation de la biomasse lignocellulosique.....	22
6-Présentation des sous produits agricoles utilisés.....	23
6-1-Le grignon d'olive.....	23
6-2-La sciure de bois	24
6-3- Les cladodes du figuier de barbarie (<i>Opuntia ficus-indica</i>).....	25
7-Présentation des champignons utilisés.....	26
7-1- <i>Aspergillus Niger</i>	26
7-2- <i>Penicillium sp</i>	27
8-Les oxydations et la antioxydants.....	27
9-Les composés phénoliques.....	27
II-Matériel et méthodes.....	30
1-Matériel, appareillage et verrerie.....	31
1-2-Sous produits agricoles utilisés.....	32
1-2-3-Souches fongiques utilisées	32
1-2-3-Substrats et milieux de cultures	32
2-Prétraitements des sous produits agricoles utilisés en fermentation à l'état solide.....	33
3-Inoculation des cultures.....	33
4-Characterisation des sous produits agricoles utilisés	34

4-1-Mesure de la matière sèche totale du grignon d'olive et des cladodes du figuier de barbarie avant et après culture par <i>Aspergillus Niger</i>	34
4-2-Teneur en cendres (matière minérale) du grignon d'olive, des cladodes et la sciure de bois.....	35
5-Détermination de la teneur en protéines.....	35
6-Mesure de l'activité enzymatique à 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C.....	36
7-Extraction des polyphénols totaux du grignon d'olive et des cladodes à l'acétate d'éthyle avant et après culture par <i>Aspergillus Niger</i>	39
8-Dosage des composés phénoliques par colorimétrie.....	39
9-Test de l'activité anti-oxydante du grignon d'olive et des cladodes avant et après fermentation.....	40
10-Méthodes électrophorétiques.....	40
11-Zymogramme des enzymes cellulolytiques.....	43
12-Analyses statistiques.....	43
III-Résultats et discussion.....	46
1- Caractérisation des sous produits agricoles utilisés: le grignon d'olive, la sciure de bois et les cladodes	47
2- Mise en évidence de l'activité enzymatique sur milieu solide	47
3- Développement des souches sur milieu liquide MW et hydrolyse de la cellulose en milieu liquide.....	50
4-Recherche de l'activité cellulolytique des deux souches fongiques fermentées sur les trois sous produits agricoles avant et après prétraitement à la soude.....	52

4-1-Production d'enzymes cellulolytiques.....	56
4-2-L'étude des variations de la température.....	59
5-Influence de la culture d' <i>Aspergillus Niger</i> sur la matière sèche totale des deux sous produits agricoles : le grignon d'olive et les cladodes du figuier de barbarie.....	60
6-Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS des différents extraits de culture des deux souches ??.....	60
7-Recherche d'activité cellulolytique	63
8-Dosage des polyphénols du grignon d'olive et les cladodes avant et après fermentation par <i>Aspergillus Niger</i>	65
9-Activité anti-oxydante de composés phénoliques extraits à partir du grignon d'olive et des cladodes avant et après fermentation par <i>Aspergillus Niger</i>	66
Conclusion.....	69

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
BSA	Bovine Serum Albumin
DNS	Acide 3,5 dinitrosalicylique
DO	Densité Optique
MW	Mendel et Weber
nm	Nanomètre
PAGE	PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
PDA	Potato Dextrose Agar
PM	Poids moléculaire
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	N,N,N'N' –Tetraméthyl- éthylène diamine
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
KDa	kilodalton
DP	Degré de Polymérisation
SSF	Solide State Fermentation (Fermentation à l'état solide).
UI	Unité International
R	Réductrice
NR	Non réductrice
PH	potentiel Hydrogène
CI	Concentration Inhibitrice

Liste des figures

Figure 01: Structure chimique du polymère de la cellulose	8
Figure 02: Liaisons intra et intermoléculaires de la cellulose	8
Figure 03: Structure fibrillaire de la cellulose.....	9
Figure 04: Structure chimique de la carboxymethylcellulose	9
Figure 05: Structure cristalline d'une endoglucanase (A) et une exoglucanase (B)	11
Figure 06: Structure cristalline de la β -glucosidase de <i>Bacillus polymyxa</i>	11
Figure 07: Mode d'action des trois principaux types d'enzymes constituant le complexe cellulosique	13
Figure08 : Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose.....	14
Figure 09 : Exemple de la structure du xylane d'origine végétale	17
Figure 10 : Structure des xylanases de la famille 10.....	18
Figure 11 : Structure des xylanases de la famille 11.....	19
Figure 12 : Mode d'action des enzymes xylanolytiques.....	20
Figure 13 : Morphologie superficielle de la sciure de bois.....	25
Figure 14 : <i>Opuntia ficus-indica</i> : fruits et cladodes.....	25
Figure 15: Aspect de la pré-culture d' <i>Aspergillus Niger</i> sur milieu PDA.....	32
Figure 16: Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et <i>al</i> (1951)	36
Figure 17: Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 30°C	37
Figure 18: Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 40°C	37
Figure 19: Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 50°C	37
Figure 20: Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 60 °C	38
Figure 21: Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 70°C	38
Figure 22: Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 80°C	38
Figure 23: Courbe d'étalonnage par l'acide gallique	39
Figure 24: Courbe de référence par l'acide ascorbique à des concentrations connues	40
Figure 25: Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS.....	42
Figure 26: Diagramme récapitulatif de la mise en évidence des enzymes recherchées.....	44

Figure 27 : Diagramme récapitulatif de la caractérisation des sous produits agricoles utilisés	45
Figure 28 : Photographie de la culture du disque d' <i>Aspergillus Niger</i> sur milieu solide MW contenant le rouge Congo.....	48
Figure 29 : Photographie de la culture du disque de <i>Penicillium sp</i> sur milieu solide MW contenant le rouge Congo.....	48
Figure 30 : Photographie de la culture du disque d' <i>Aspergillus Niger</i> sur milieu solide MW après coloration et décoloration	49
Figure 31 : Photographie de la culture du disque de <i>Penicillium sp</i> sur milieu solide MW après coloration et décoloration	49
Figure 32 : Photographie de la culture des deux champignons, A : <i>Aspergillus Niger</i> et B : <i>Penicillium</i> en milieu liquide MW contenant le rouge Congo.....	50
Figure 33 : Histogramme présentant la teneur en protéines des surnageant issus de la culture par les deux souches <i>Aspergillus Niger</i> et <i>Penicillium sp</i> sur milieu liquide MW	51
Figure 34 : Histogramme présentant l'activité cellulolytique d' <i>Aspergillus Niger</i> et de <i>Penicillium sp</i> à 50 °c.....	52
Figure 35 : Histogramme présentant l'activité cellulolytique d' <i>Aspergillus Niger</i> et de <i>Penicillium sp</i> à 60 °c.....	52
Figure 36 : Photographie de la culture d' <i>Aspergillus Niger</i> en fermentation à l'état solide sur grignon d'olive traité et non traité à la soude (NaOH, 2N).....	53
Figure 37 : Photographie de la culture de <i>Penicillium sp</i> en fermentation à l'état solide sur grignon d'olive traité et non traité à la soude (NaOH, 2N).....	54
Figure 38 : Photographie de la culture d' <i>Aspergillus Niger</i> en fermentation à l'état solide sur la sciure de bois traitée et non traitée à la soude (NaOH, 2N)	54
Figure 39 : Photographie de la culture de <i>Penicillium sp</i> en fermentation à l'état solide sur la sciure de bois traitée et non traitée à la soude (NaOH, 2N)	55
Figure 40 : Photographie de la culture d' <i>Aspergillus Niger</i> en fermentation à l'état solide sur les cladodes traité et non traité à la soude (NaOH, 2N)	55
Figure 41 : Photographie de la culture de <i>Penicillium sp</i> en fermentation à l'état solide sur les cladodes traité et non traité à la soude (NaOH, 2N).....	56

Figure 42 : Histogramme présentant la teneur en protéines des extraits obtenus à partir de la culture sur tous les substrats avant et après traitement.....	57
Figure 43 : Histogramme présentant l'activité cellulolytique d' <i>Aspergillus Niger</i> et de <i>Penicillium sp</i> cultivées sur tous les substrats avant et après prétraitement à 50 °c	58
Figure 44 : Histogramme présentant l'activité cellulolytique d' <i>Aspergillus Niger</i> et de <i>Penicillium sp</i> cultivées sur tous les substrats avant et après prétraitement à 60 °c	58
Figure 45 : Graphe en aire 3D représentant les activités enzymatiques en fonction des variations de température	59
Figure 46 : Profil électrophorétique de quelques extraits.	61
Figure 47 : Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur du xylane	62
Figure 48 : Zymogramme de xylanase en conditions dénaturantes (SDS)	62
Figure 49 : Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur l'avicel	63
Figure 50 : Profil d'une PAGE-SDS de l'extrait lyophilisé de cellulose avicel	63
Figure 51 : Profil du zymogramme réalisé	64
Figure 52 : Histogramme montrant les concentrations des poly phénols des grignons et des cladodes avant et après culture.....	65
Figure 53 : Courbes représentant l'activité anti-oxydante des polyphénols extraits à partir du grignon d'olive et de l'acide ascorbique comme courbe de référence.....	66
Figure 54 : Courbes représentant l'activité anti-oxydante des polyphénols extraits à partir du grignon d'olive fermenté par <i>Aspergillus Niger</i> et de l'acide ascorbique.	67
Figure 55 : Courbes représentant l'activité anti-oxydante des polyphénols extraits à partir des cladodes et de l'acide ascorbique comme courbe de référence.....	67
Figure 56 : Courbes représentant l'activité anti-oxydante des polyphénols extrait à partir des cladodes fermentés par <i>Aspergillus Niger</i> et de l'acide ascorbique comme courbe de référence	68

Liste des tableaux

Tableau I : Teneur en cellulose de quelques composés végétaux	7
Tableau II : Quelques microorganismes cellulolytiques	14
Tableau III : Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non alimentaire.....	21
Tableau IV : Composition chimique de la biomasse lignocellulosique.....	22
Tableau V : Composition chimique du grignon d'olive.....	24
Tableau VI : Teneur du bois sans traitements en cellulose, hémicellulose, lignine et extractives.....	25
Tableau VII : Composition chimique des cladodes	26
Tableau VIII : Structure des squelettes des polyphénols	28
Tableau IX : Le matériel, l'appareillage et la verrerie utilisés	31
Tableau X : Caractéristiques du grignon d'olive, de la sciure de bois et des cladodes.....	47
Tableau XI : Matière sèche totale du grignon d'olive et des cladodes avant et après culture.....	60
Tableau XII : Légende de la figure 47	61
Tableau XIII : Légende de figure 50.....	64

Liste des annexes

Annexe I : Préparation des milieux de culture.

Annexe II : Préparation des solutions.

Annexe III : Extraction des enzymes à partir des cultures en fermentation à l'état solide.

Annexe IV : Détermination de la teneur en protéines.

Annexe V : Dosage de l'activité enzymatique.

Annexe VI : Electrophorèse en conditions dénaturantes et dissociantes en présence du SDS et du beta-mercaptoéthanol.

Annexe VII : Zymogramme des enzymes cellulolytiques.

Annexe VIII : Dosage des poly phénols.

Annexe IX : Test de l'activité anti-oxydante au DPPH.

Annexe X : Analyse statistique.

Résumé

Dans la nature la biodégradation de la cellulose est essentiellement réalisée par des microorganismes. Le but de ce travail est la mise en évidence de l'activité cellulolytique de deux souches fongiques : *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* après fermentation à l'état solide sur des sous-produits agricoles : le grignon d'olive, les cladodes et la sciure de bois avec 10g de chaque substrat humidifié à 75% par le milieu liquide mendel et weber's, afin de leur valorisation et leur bioconversion. Des prétraitements alcalins par NaOH 2N ont été réalisés pour chaque sous produit afin d'optimiser la production de cellulases. Les contrôles électrophorétiques de quelques extraits obtenus après six jours de fermentation a révélé la présence de bandes : une de 45,6KDa et des bandes de 48KDa, 45,5KDa, 33KDa, 31.6KDa, 21,7KDa, 19.5KDa, 18,8KDa pour les deux extraits issus de la culture d'*Aspergillus Niger* sur grignon d'olive et sur grignon d'olive alcalinisé respectivement, et des bandes de 48,4KDa, 48KDa, 33,5KDa, 30,3KDa pour le témoin *Aspergillus Niger* cultivé sur milieu liquide mendel et weber's contenant 0.5g de cellulose pure dans 250ml du milieu liquide. Les protéines de 21,7KDa, 30,3KDa, 33,5KDa, de 48KDa et de 48,4KDa pourraient être des cellulases, tandis que la protéine de 31.6KDa peut correspondre à une xylanase. Le dosage de l'activité enzymatique à des différentes températures 30°C, 40°C, 50°C, 60 °C, 70°C, 80°C a montré que la température optimale de l'activité est à 50°C et 60°C, avec une activité maximale de 0,202 U.ml⁻¹ donnée par *Aspergillus Niger* à 50°C, et une valeur maximal de 0,198 U.ml⁻¹ donnée par *Penicillium sp* à 60°C. L'étude de l'activité anti-oxydante des poly phénols par le test au DPPH des extraits du grignon et des cladodes avant et après fermentation avec la souche *Aspergillus Niger* a donné des concentrations inhibitrices (CI50) de 70± 1,96µg/ml pour le grignon fermenté, 168±4,71µg/ml pour les cladodes et 170±6,21 ; µg/ml pour les cladodes fermentés.

Mots clés : Cellulose, cellulases, *Aspergillus Niger*, *Penicillium sp*, sous produits agricoles.

Summary

During the biodegradation process of cellulose it is essentially completed by microorganisms. The objective of this study is to demonstrate the cellulolytic activity of two fungal strains: *Aspergillus Niger* and *Penicillium sp* after solid state fermentation on agricultural by-products: olive pomace, cladodes and sawdust, with 10g of each substrate, 75% humidified by the Mendel and Weber's liquid medium, in order to reach valorization and bioconversion. Alkaline pretreatment with 2N NaOH were carried out for each by-product in order to optimize the production of cellulase. The electrophoretic methods on some extracts obtained after six days of fermentation revealed the presence of the profiles: one of 45.6KDa and 48KDa, 45.5KDa , 33KDa, 31.6KDa, 21.7KDa, 19.5KDa, 18.8KDa for the two extracts from the *Aspergillus Niger* culture on olive-pomace and on alkaline olive-pomace respectively, also 48.4KDa profiles , 48KDa, 33.5KDa, 30.3KDa for the *Aspergillus Niger* control grown on Mendel and Weber's liquid medium containing 0.5g of pure cellulose in 250ml of the liquid medium. The proteins of 21.7KDa, 30.3KDa, 33.5KDa, 48KDa and 48.4KDa could be cellulases, whereas the protein of 31.6KDa may resemble to a xylanase. The determination of the dosage of the enzymatic activity at different temperatures 30 ° C., 40 ° C., 50 ° C., 60 ° C. 70 ° C., 80 ° C. showed that the optimum temperature of the activity is at 50 ° C. and 60 ° C. with a maximum activity of 0.202 U.ml⁻¹ given by the *Aspergillus Niger* strain at 50 ° C. and a given maximum value by the fungus *Penicillium sp* of 0.198 U.ml⁻¹ at 60 ° c. The study of the antioxidant activity of the polyphenols by the DPPH test of the extracts of the olive pomace and the cladodes before and after fermentation with the *Aspergillus Niger* strain gave inhibitory concentrations (IC 50) of 70±1.96 µg / ml for the fermented olive pomace, 168±4.71µg / ml for cladodes and 170±6.21µg / ml for fermented cladodes.

Keywords: Cellulose, cellulases, *Aspergillus Niger*, *Penicillium Sp*, agricultural by-products.

Introduction

Introduction

La disponibilité d'énormes quantités de matériaux cellulosiques dans le monde souligne la nécessité d'explorer les potentiels des décomposeurs naturels des polymères de la paroi cellulaire végétale. L'objectif est la transformation de ces sous-produits en produits de valeurs tels les biocarburants, produits chimiques, et même des produits pour l'amélioration des aliments pour les animaux. Les sous-produits de matières cellulosiques peuvent être classés comme sous produits agricoles, industriels et municipaux. Ces sous-produits solides sont habituellement rejetés indifféremment ou déversés dans différents sites où certains sont brûlés, enterrés ou laissés se décomposer, ce qui provoque parfois une pollution environnementale.

L'hydrolyse des matériaux cellulosiques implique l'action synergique du complexe enzymatique des cellulases. Ces enzymes sont produites par plusieurs bactéries, champignons et actinomycètes, mais les champignons sont les plus connus pour la sécrétion de cellulases à des quantités abondantes. Parmi ces champignons on peut citer *Aspergillus* et *Penicillium* qui sont largement exploités pour la production commerciale de cellulases.

Les enzymes de l'industrie sont produites en fermentation sur milieu solide pour la facilité de sa manipulation et du bon contrôle des facteurs environnementaux tels la température, l'aération, l'agitation et le pH. Cependant, la fermentation à l'état solide (SSF) est la mieux adaptée pour l'amélioration du rendement, ce qui réduit le coût de production d'enzymes en raison de la capacité de ces champignons filamenteux de bien se développer et de coloniser divers substrats.

Dans ce contexte de valorisation par fermentation, la présente étude est menée sur le grignon d'olive, les cladodes du figuier de barbarie et la sciure de bois lesquels sont des sous produits agricoles qui peuvent être utilisés en biotechnologie comme substrats cellulosiques pour la production d'enzymes cellulolytiques par la culture des deux champignons filamenteux : *Aspergillus Niger* et *Penicillium Sp* producteurs de cellulases en fermentation à l'état solide. En outre, un grand nombre de polyphénols sont reconnus pour leurs propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique et antimicrobienne. Ces composés phénoliques étant des métabolites secondaires des végétaux peuvent être extraits à partir du grignon d'olive, des cladodes et de la sciure du bois.

Le présent travail sera alors réparti en deux parties :

- Une partie relative à l'étude bibliographique : dans une première partie sur deux polysaccharides présents en abondance sur terre : la cellulose et le xylane, suivie d'une partie parlant sur deux types d'enzymes : les enzymes cellulolytiques et les enzymes xylanolytiques, et une dernière partie récapitulant des généralités sur les sous produits agricoles et les champignons utilisés dans la présente étude et les composés phénoliques.
- Une autre partie sera réservée à l'étude expérimentale subdivisée en deux chapitres : l'un présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail et l'autre consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Chapitre I
Synthèse
bibliographique

I-Synthèse bibliographique

I-1-La cellulose

La cellulose est l'un des polymères les plus abondants sur terre. Elle existe dans le bois, le chanvre le coton et dans d'autres plantes, elle renforce la structure des plantes, cette molécule est aussi synthétisée par les algues et quelques bactéries (SIRO et PLACKETT, 2010). La cellulose représente le polysaccharide le plus important de la biomasse, elle est présente dans les parois cellulaires végétales et les parties ligneuses (VALENTINI, 2008). Le tableau suivant montre la teneur en cellulose de quelques composés végétaux.

Tableau I : Teneur en cellulose de quelques composés végétaux (KLEMM *et al*, 2005).

Source	Cellulose (%)
Bois dur	43-47
Bois tendre	40-44
Coton	95
Chanvre	70
Epis de maïs	47
Tige de maïs	35
Paille de blé	30

I-1-2-Structure de la cellulose

I-1-2-1-Structure moléculaire

La cellulose est un polymère linéaire qui contient jusqu'à 15000 résidus de D-glucose reliés par des liaisons β (1-4) (VOET.D et VOET.J.G, 2005). Les unités du glucose sont reliées par des liaisons glycosidiques entre les carbones C1 et C4 des unités glucopyranose par des liaisons β (1-4). Chaque unité de glucose est tournée 180° par rapport aux molécules voisines formant ainsi une molécule dissaccharidique de cellobiose. Cette rotation de 180° fait que la cellulose soit très symétrique puisque la chaîne a un nombre égal de groupements hydroxyles de chaque côté. (ZHANG et LYND, 2004), ces derniers sont positionnés sur les carbones C2, C3 et C6 (KLEMM *et al*, 2005 ; JOSHUA *et al*, 2015).

Comme illustré par la Figure 01, le polymère de la cellulose contient une extrémité réductrice (R) qui correspond à l'unité glucopyranose dont le carbone anomérique n'est pas

engagé dans une liaison avec une autre unité glucidique. L'unité glucose située au coté opposé de la chaîne est appelée extrémité non-réductrice (NR) car son carbone anomérique est engagé dans une liaison glycosidique (MAZZA, 2009).

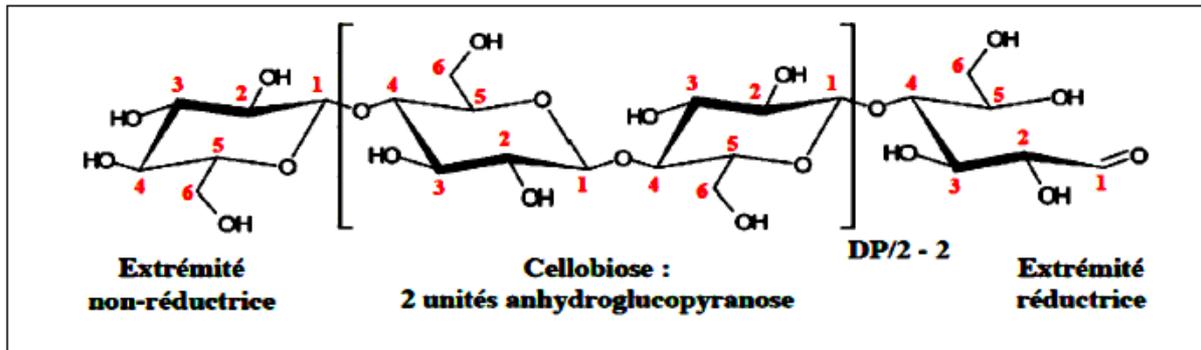


Figure 01 : Structure chimique du polymère de la cellulose. DP : degré de polymérisation.

La cellobiose est l'unité de répétition de la cellulose, elle est constituée de deux motifs de glucose orientés à 180° l'un par rapport à l'autre autour de la liaison glycosidique C1-O-C4 (BENHAMOU, 2016).

I-1-2-2-Structure supramoléculaire

Le polymère de cellulose se caractérise par la formation de liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires, cela est permis par les trois groupements hydroxyles présents dans sa structure chimique donnant une structure très organisée (BENHAMOU, 2016), cette dernière est illustrée par la figure 02 :

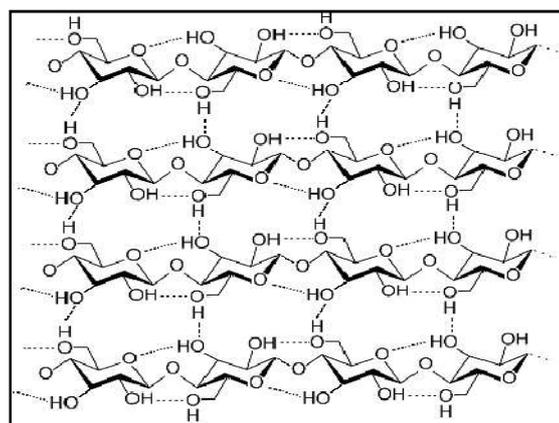


Figure 02 : Liaisons intra et intermoléculaires de la cellulose.

Ces liaisons hydrogènes sont responsables de la structure naturelle de la cellulose qui consiste en des microfibrilles dont les agrégations forment des fibrilles puis des fibres rigides

et résistantes qui confère la résistance aux végétaux et les rend insolubles dans l'eau malgré leur caractère hydrophile (VOET.D et VOET.J-G , 2005) (Figure 03).

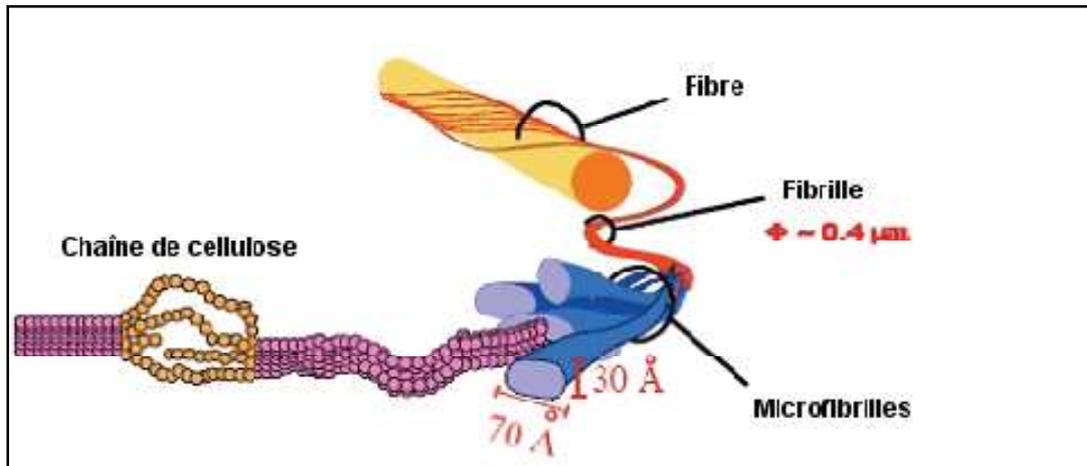


Figure 03 : Structure fibrillaire de la cellulose (KRASSIG et SCHURZ, 2002).

I-1-2-3-La cellulose cristalline

La cellulose est formée naturellement de régions cristallines et de régions amorphes avec des proportions variables, Les liaisons hydrogènes sont plus nombreuses dans la première. Le taux de cristallinité de la cellulose est de 40 à 70% (JOHSNY et SABAPATHI, 2015).

I-1-3-Les dérivés de la cellulose

La substitution des groupes hydroxyles de la cellulose conduit à la formation de plusieurs dérivés (NIRMALE *et al*, 2017).

I-1-3-1-La carboxyméthylcellulose

La carboxyméthylcellulose est un dérivé de la cellulose contenant des groupements carboxyméthyles liés à certains groupes hydroxyles, c'est un polymère anionique soluble dans l'eau avec de nombreuses applications dans divers industries, la substitution est généralement effectuée par le sel de sodium (NIRMALE *et al*, 2017). (Figure 04).

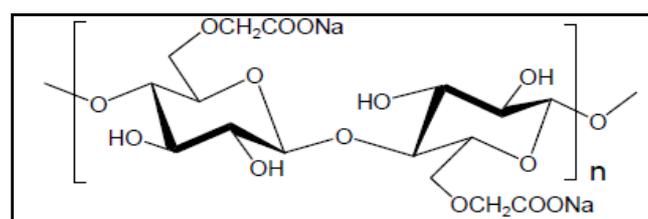


Figure 04 : Structure chimique de la carboxyméthylcellulose.

I-1-3-2-L'acétate de cellulose

L'acétate de cellulose est un dérivé de la cellulose obtenu par une acétylation, les fibres de cellulose natives sont converties progressivement en acétate de cellulose sous l'action d'un mélange d'acide acétique glacial et d'anhydride acétique en présence d'un catalyseur tel que l'acide sulfurique ou l'acide perchlorique, utilisé dans la fabrication de fibres, de matières plastiques et de films (membranes de filtration) (TAYEB, 2014).

I-1-3-3-La cellulose microcristalline (l'avicel)

La cellulose microcristalline est un dérivé de la cellulose, il est obtenu suite à une hydrolyse acide par un minéral acide de la cellulose naturelle de forme native, les régions non cristallines sont donc hydrolysées, les régions cristallines sont ainsi libérées (VANHATALO *et al*, 2016).

I-2-Les cellulases

I-2-1-Définition

Les cellulases sont un groupe d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader les matières lignocellulosiques. (ACHARYA, 2008), ce sont des enzymes synergiques utilisées pour dégrader la cellulose en glucose ou en d'autres composés oligosaccharides par l'hydrolyse de sa liaison glycosidique β (1-4). Elles sont produites par divers champignons, bactéries, protozoaires, plantes et animaux (XU, 2002).

Il existe trois principaux types d'enzyme cellulolytiques qui peuvent dégrader la cellulose: l'endo-1,4- β -D-glucanases (EC 3.2.1.4), la cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) et la β -glucosidase (EC 3.2.1.21) (Xu, 2002).

I-2-2-Structure

Les cellulases sont classées en 115 familles en se basant sur les similitudes de leurs séquences d'acides aminés et leurs structures cristallines (SCHULEIN, 2000), toutes les cellulases clivent la liaison glycosidique β (1-4) mais elles présentent des variétés topologiques (ZHANG.X et ZHANG.P, 2013).

Les cellulases fongiques ont une architecture simple contenant deux domaines : un domaine catalytique et un domaine de liaison à la cellulose, ces deux domaines sont reliés

avec une liaison peptidique. L'ancrage du domaine de liaison permet au domaine catalytique d'effectuer sa fonction catalytique, le domaine de liaison n'est pas impliqué dans la réaction mais son élimination réduit considérablement l'activité enzymatique vis-à-vis du substrat (JUTURU *et al*, 2014). La structure de l'exoglucanase présente un site actif qui comporte une boucle étendue formant un tunnel (ZHANG.X et ZHANG.P, 2013). (Figures 05 et 06).

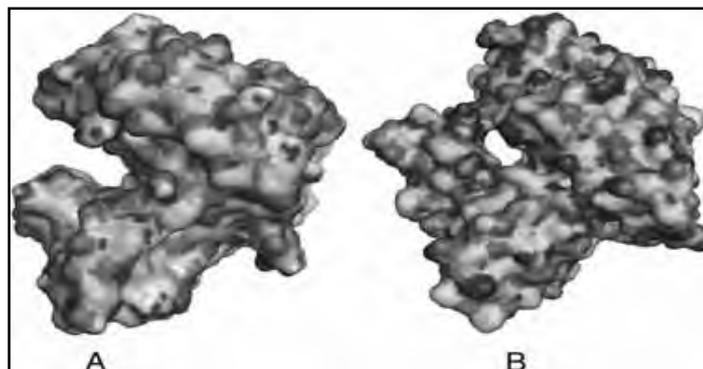


Figure 05 : Structure cristallines d'une endoglucanase (A) et une exoglucanase (B).

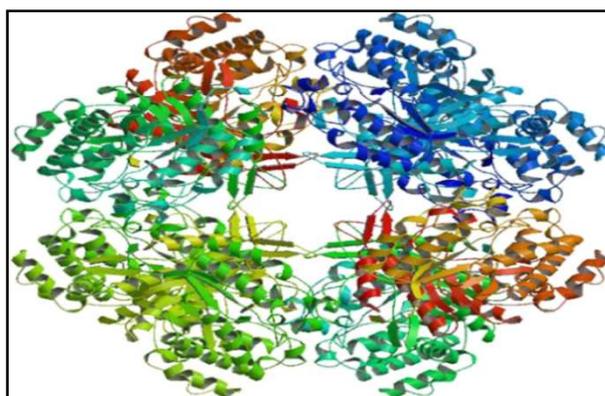


Figure 06 : Structure cristalline de la β -glucosidase de *Bacillus polymyxa*.

I-2-3-Caractéristiques des cellulases

I-2-3-1-Le pH

Les cellulases commerciales ont un pH d'activité compris entre 4.2 et 5 avec un pH optimum d'activité de 4.8, c'est la valeur la plus communément utilisée. Le pH des β -glucosidases varie selon son origine donc selon le microorganisme producteur, celle issue d'*Aspergillus Niger* est généralement utilisée à un pH allant de 3 à 6 avec un pH optimum se rapprochant de 4 (SHANMUGAPRIYA *et al*, 2012).

I-2-3-2-La température

La température optimale des cellulases la plus utilisée est de 50°C (SHAHSAVARANI *et al*, 2012). La température varie selon l'origine de la cellulase, les cellulases produites par *Aspergillus Niger* ont des températures d'activité allant de 35 à 70 °C, présentant une activité maximale à 60 °C, elle est considérée comme une température optimale d'activité pour les cellulases issues de cette souche (JENG *et al*, 2011).

I-2-3-3-Le poids moléculaire

Le poids moléculaire des cellulases diffère selon le microorganisme producteur, il en est de 32.5KDa pour celles issues des souches bactériennes selon les résultats des PAGE-SDS et les zymogrammes (SHANMUGAPRIYA *et al*, 2012).

Les cellulases produites par le genre *Penicillium* ont des poids moléculaires de 35KDa, 37KDa, 48KDa et de 71KDa (PICART *et al*, 2007). Deux cellulases extraites du termite *Macrotermes subhyalinus* ont des poids moléculaires de 27KDa et 63KDa (SEA *et al*, 2006). Dans une étude, des cellulases de 26KDa, 46KDa, et de 56KDa ont été révélées par une PAGE-SDS (HURST *et al*, 1977).

I-2-4-Mode d'action

Le complexe cellulastique est composé de trois types d'enzymes qui peuvent présenter différents modes d'action.

L'endo-cellulase (EC 3.2.1.4) coupe les liaisons internes de la chaîne cellulosique aléatoirement au niveau des zones amorphes pour perturber la structure cristalline de la cellulose, puis exposer les chaînes polysaccharidiques en diminuant le degré de polymérisation du substrat cellulosique, ce qui entraîne la libération de cellodextrines, du cellobiose et du glucose. L'attaque de l'endocellulase a pour effet de créer de nouvelles extrémités non réductrices qui sont des sites réactifs pour la cellobiohydrolase (HASPER *et al*, 2002).

La cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) dite aussi exoglucanase, attaque les liaisons glycosidiques $\beta(1-4)$ des chaînes de cellulose par les extrémités non réductrices et libère des résidus de cellobiose. L'enzyme seule n'est pas active, ni sur la cellulose cristalline, ni sur les celluloses solubles, par contre, elle attaque les celluloses partiellement dégradées (SCRIBAN, 1993), les exoglucanases libèrent le cellobiose (TEERI, 1997; Xu, 2002).

La cellobiase (EC 3.2.1.21) ou β -glucosidase, hydrolyse les liaisons glycosidiques β (1-4) du cellobiose pour donner deux molécules de glucose (ONSORI *et al*, 2005) (Figure 07).

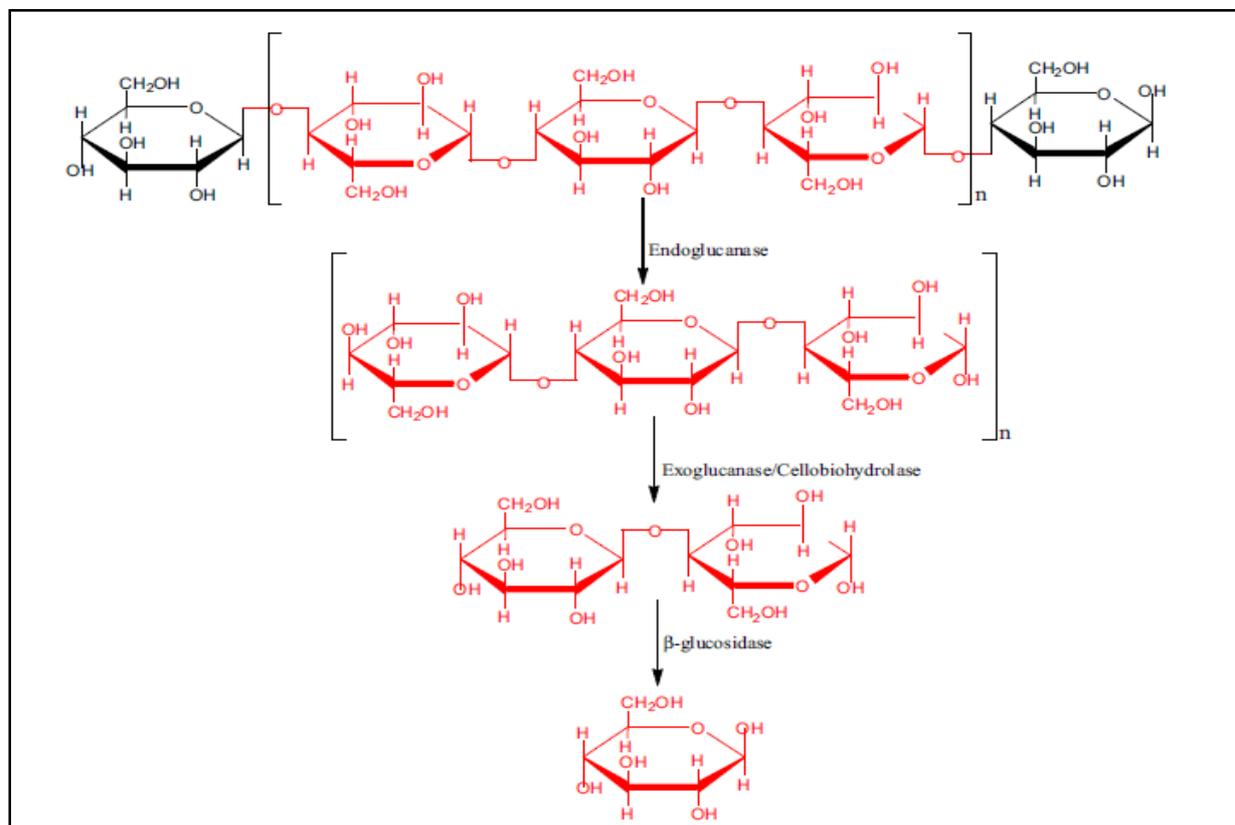


Figure 07 : Mode d'action des trois principaux types d'enzymes constituant le complexe cellulosique (JUTURU *et al*, 2014).

I-2-5-Mécanisme d'action des cellulases

Les cellulases clivent les liaisons glycosidiques en utilisant une catalyse de type base/acide. L'hydrolyse est effectuée par deux résidus catalytiques de l'enzyme: un donneur de proton qui est le premier acide aminé de la cellulase, et une base nucléophile qui attaque le centre anomérique du substrat et libère le premier fragment du substrat (DAVIES et HENNIISAT,1995) puis l'autre fragment fixé à l'enzyme sera stabilisé par un acide aminé chargé négativement qui arrache un hydrogène à une molécule d'eau et forme alors un groupement hydroxyle qui va agir comme nucléophile sur un carbone d'une molécule de glucose, c'est ainsi que se rompt la liaison glycosidique, puis l'autre fragment du substrat sera libéré (MUNOZ *et al*, 2001). (Figure 08).

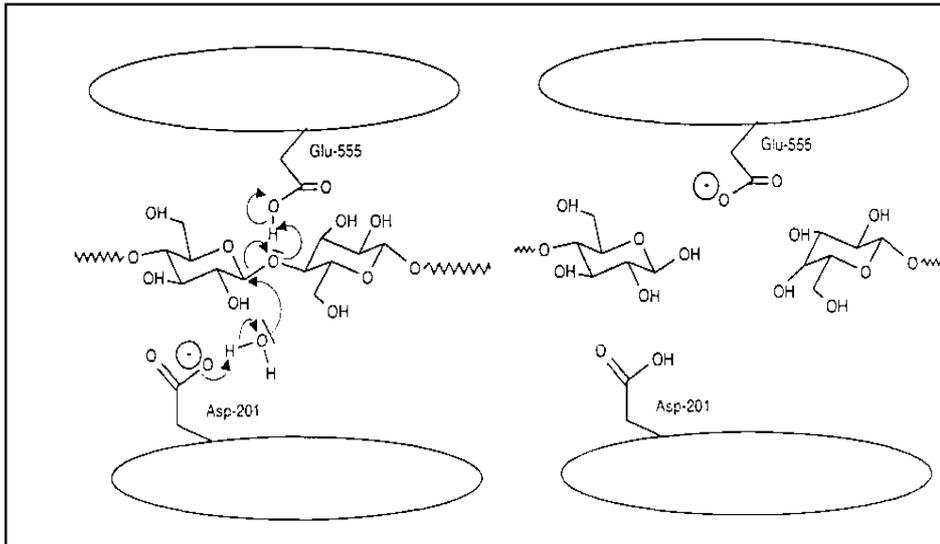


Figure 08 : Mécanisme d'hydrolyse de la cellulose par la cellulase (BEGUIN et AUBERT, 1994).

I-2-6-Microorganismes cellulolytiques

Les cellulases sont produites par de nombreux microorganismes : par les bactéries, les actinomycètes et les champignons (KUHAD *et al*, 2011). Le tableau suivant résume quelques microorganismes cellulolytiques.

Tableau II : Quelques microorganismes cellulolytiques (KUHAD *et al*, 2011).

Champignons	<i>Aspergillus Niger</i> ; <i>A. Nidulans</i> ; <i>A. terreus</i> ; <i>Fusarium solani</i> ; <i>Penicillium brasilianum</i> ; <i>P. occitanis</i> ; <i>P. decumbans</i> ; <i>Trichoderma reesei</i> ; <i>C. thermophilum</i> ; <i>Neurospora crassa</i> ; <i>P. fumigosum</i> ; <i>Trichoderma atroviride</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Sporotrichum thermophile</i> .
Bactéries	<i>Acinetobacter junii</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. circulan</i> ; <i>B. flexus</i> ; <i>Pseudomonas cellulosa</i> ; <i>Clostridium thermocellum</i> ; <i>C.cellulolyticum</i> ; <i>C. acetobutylium</i> ; <i>C. papyrosolvens</i> ; <i>Fibrobacter succinogenes</i> .
Actinomycètes	<i>Cellulomonas fimi</i> ; <i>Streptomyces drozdowiczii</i> ; <i>Thermomonospora fusca</i> .

I-2-7- Applications industrielles des cellulases

Les cellulases ont un large spectre d'applications dans diverses industries, elles sont appliquées dans l'industrie alimentaire et brasserie (JUTURU *et al*, 2014), mais aussi production et transformation des aliments pour animaux, production de détergents, la blanchisserie, le textile et la fabrication de la pâte à papier (ZHANG.X et ZHANG.P, 2013).

Leur biotechnologie a débuté vers les années 1980 dans l'industrie animale, puis dans l'industrie du textile et celle des détergents et papetière (CHESSON, 1987). Actuellement, elles occupent environ 20 % du marché mondial des enzymes (BHAT, 2000 ; LEKCHIRI *et al*, 2006).

I-2-7-1-Application dans l'industrie agroalimentaire

Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des différentes suspensions riches en fibres cellulosiques manipulées par l'industrie agroalimentaire (SCRIBAN, 1993). Les cellulases sont employées avec d'autres enzymes pour dégrader les parois végétales dans le traitement des fruits et de légumes et aussi dans l'industrie des boissons (LEGHLIMI, 2013).

I-2-7-2-Dans l'industrie du textile et des détergents

Les cellulases sont habituellement utilisées dans le traitement et la finition du textile, les nœuds des fils de cellulose, développant un aspect lisse et brillant du tissu et lui assurant une luminosité de couleur (JUTURU *et al*, 2014).

I-2-7-3-Dans l'industrie du papier ou papetière

L'ajout de cellulases aux suspensions de pâtes ou aux pâtes de papiers de recyclage durant le lavage, améliore significativement leur filtrabilité, cela conduit à des économies importantes en matière de consommation d'eau (SCRIBAN, 1999).

I-2-7-4-Dans la nutrition animale

Les enzymes cellulosiques sont utilisées comme additifs pour l'alimentation de bétails et de volailles. L'addition de cellulases aux aliments pour volailles ou porcins améliore la digestibilité des fractions cellulosiques, et permet alors de réduire à la fois les consommations de sources d'énergie comme l'amidon et l'excrétion de cellulose non digérée. (GUSAKOV *et al*, 2000).

I-2-7-5-Production de biocarburants

Le pétrole et le charbon sont les sources principales d'énergie, mais ces derniers ont de nombreux effets néfastes sur l'environnement tels que la pollution atmosphérique, le réchauffement de la planète et l'émission de gaz à effet de serre. Dans le but de réduire ces

effets néfastes sur l'environnement, des sources énergétiques alternatives sont mises en évidence. Le rendement énergétique de l'éthanol obtenu à partir de la biomasse végétale est presque égal à celui de l'essence, il est obtenu à partir de substrats fermentescibles tels la canne à sucre, la betterave sucrière, le maïs, l'orge, le blé, ..., ce biocarburant est appelé carburant de première génération, et le carburant de deuxième génération est obtenu à partir de la cellulose des résidus agricoles tel que la paille ou les cannes de maïs ou résidus forestiers (PIMENTEL et PATZEK, 2005).

I-2-7-6-Dans l'industrie agricole

Diverses préparations enzymatiques qui consistent à des combinaisons de cellulases, d'hémicellulases et de pectinases présentent des applications dans l'agriculture pour améliorer le développement des cultures et le contrôle des maladies des plantes. Les enzymes cellulosiques comme les β -glucanases de certains champignons sont utilisées contre les maladies végétales, car elles sont capables de dégrader les parois cellulaires des agents pathogènes des plantes (KUHAD *et al*, 2011).

I-3- Le xylane

Le xylane est le deuxième polysaccharide le plus abondant dans la nature, représentant environ un tiers du carbone organique renouvelable sur terre, il constitue le principal composant de l'hémicellulose. Il est principalement présent dans les parois des cellules végétales avec la cellulose et la lignine, ces trois constituants interagissent via des liaisons covalentes et non covalentes. Le xylane est trouvé à l'interface, entre la lignine et la cellulose, il assure la cohésion des fibres et l'intégrité de la paroi cellulaire des plantes (VERMA *et al*, 2012).

I-3-1- Structure du xylane

Le xylane est un hétéropolysaccharide complexe hautement ramifié dont la structure varie entre les différentes espèces végétales (BEG *et al*, 2001). Il est composé de résidus de β -xylopyranose (HALTRICH *et al*, 1996).

Les xylanes sont formés d'une chaîne principale d'unités D-xylopyranosyl liées par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$. Cette liaison confère à la chaîne une conformation relativement étendue. La chaîne décrit une hélice gauche à 3 résidus xylose par tour (ATKINS, 1992). Cette conformation en hélice est plus flexible que celle de la cellulose ; car cette structure n'est stabilisée que par une seule liaison hydrogène entre l'hydrogène du groupement

hydroxyle en position 3 d'un résidu xylose et l'oxygène en position 5 du cycle suivant. (MARCHESSAULT et LIANG, 1962).

I-3-2-Les branchements

La plupart des xylanes sont des hétéropolysaccharides, contenant un ou plusieurs sucres substitués sur la chaîne principale de xylose, ces ramifications diffèrent en composition, en taille, en lieu de fixation sur la chaîne principale, selon l'espèce et l'origine végétale (MOINE, 2005).

Le degré de substitution de la chaîne principale des xylanes détermine ses propriétés physico-chimiques, telles que sa solubilité et sa capacité de se lier à la cellulose (MOINE, 2005). Des exemples des structures du xylane sont donnés dans la figure 09.

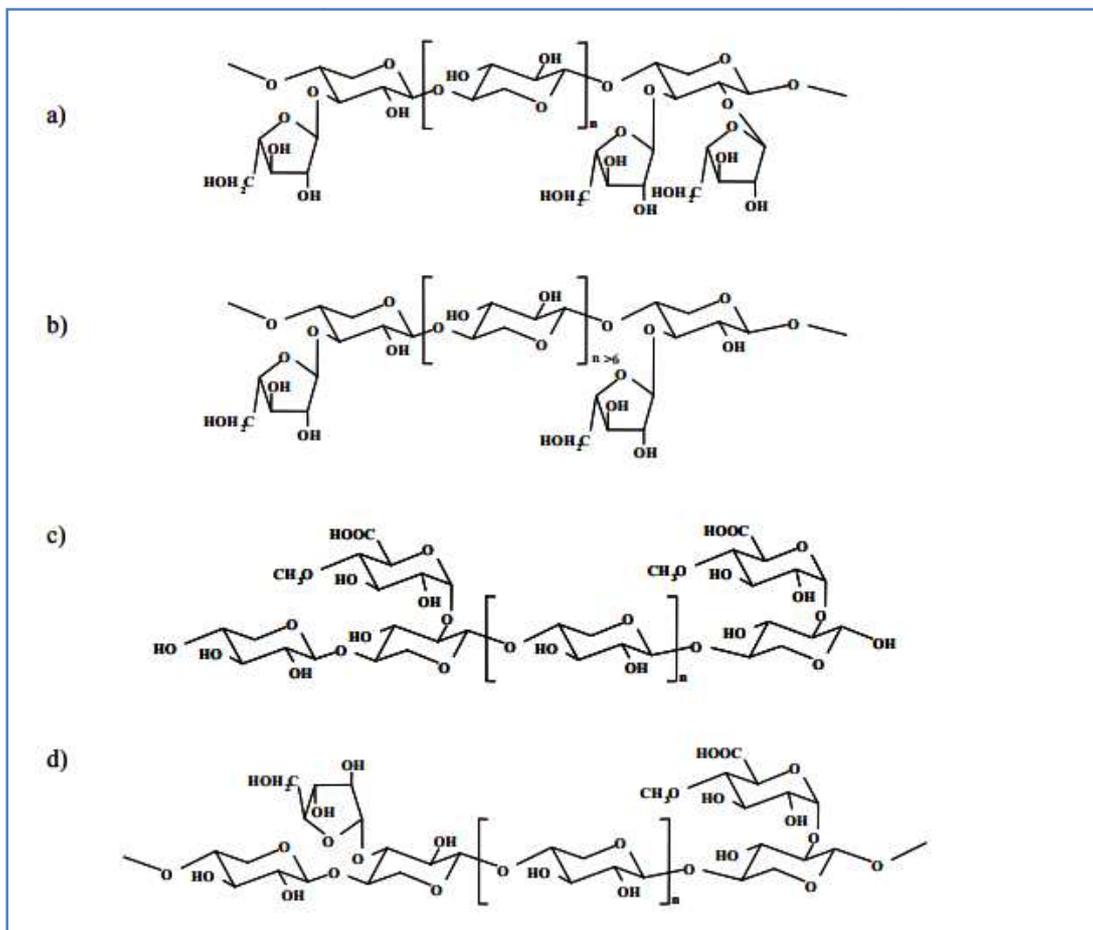


Figure 09 : Exemples de structures de xylanes d'origine végétale. a) arabinoxylane fortement substitué ; b) arabinoxylane faiblement substitué ; c) 4-O-méthylglucuronoxylane ; d) arabino-4-O-méthylglucuronoxylan (MOINE, 2005).

I-4-Les enzymes xylanolytiques

1-4-1- Structure des xylanases

Les xylanases sont classées en six familles glycosyl hydrolases : 5, 7, 8, 10,11 et 43, les plus étudiées appartiennent aux familles 10 et 11 (NINAWA *et al*, 2008).

1-4-1-2- Famille 10

Les xylanases de cette famille possèdent généralement un haut poids moléculaire et un faible point isoélectrique. Ce domaine constitue un repliement en (β/α), et un site actif qui se trouve au centre d'une crevasse longue, délimitée par des boucles à la surface du domaine (BOONMAK *et al*, 2010). La figure 10 représente la structure des xylanases de cette famille.

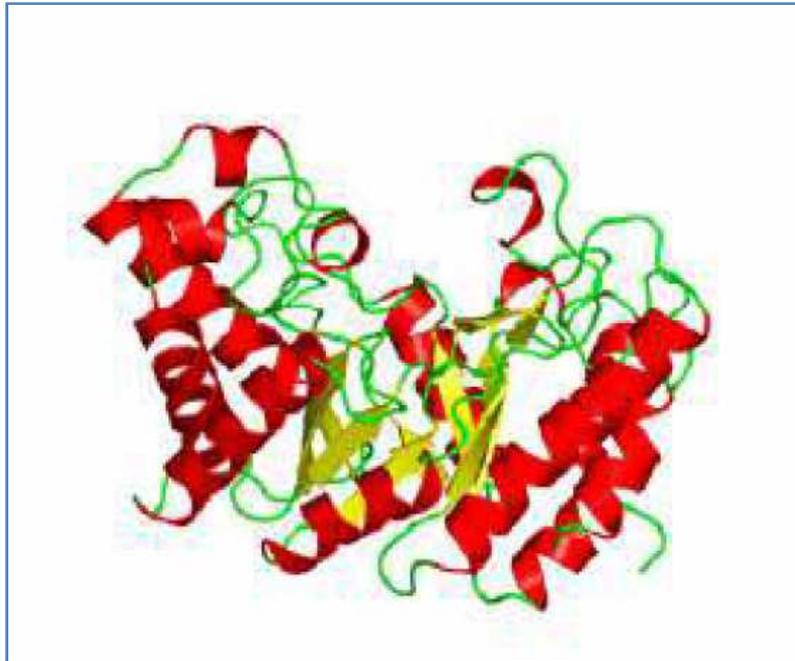


Figure 10 : Structure des xylanases de la famille 10 (LESKINEN *et al*, 2005).

1-4-1-3-La famille 11

Ce sont les endo-xylanases, elles ont une faible masse moléculaire, et peuvent avoir un point isoélectrique soit alcalin, soit acide (COLLINS *et al*, 2005).

Le domaine catalytique de ces enzymes a une structure ouverte de type feuillet β formant deux couches qui entourent le site catalytique (SOMOGYI *et al*, 2011). La structure de ce domaine catalytique a été assimilée à une main droite avec sa paume et ses 4 doigts où la boucle représente le pouce comme l'illustre la figure 11 (NANMORI *et al*, 1990).

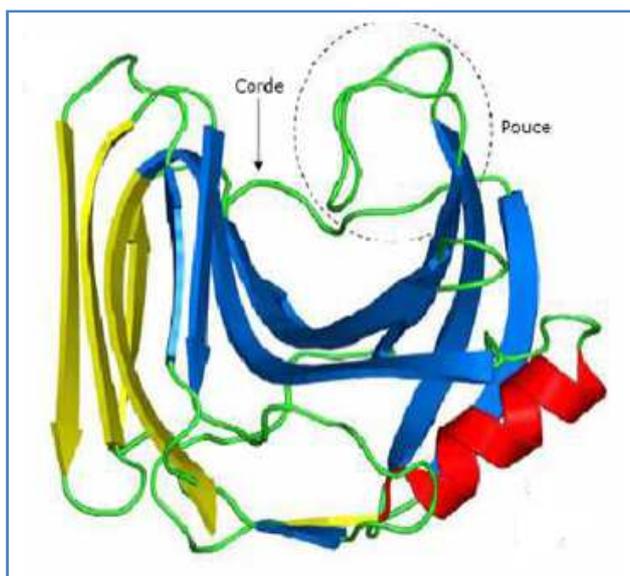


Figure 11 : Structure des xylanases de la famille 11 (*Thermobacillus xylanilyticus*). (NANMORI *et al*, 1990).

1-4-2-Mode d'action des enzymes xylanolytiques

L'hydrolyse complète du xylane nécessite l'action d'un complexe de plusieurs enzymes hydrolytiques avec divers modes d'action (BEG *et al* 2001). Le système enzymatique xylanolytique est composé d'un répertoire d'enzymes hydrolytiques, y compris l'endoxylanase (endo-1,4- β -xylanase : E.C.3.2.1.8), la β -xylosidase (xylan-1,4- β -xylosidase : E.C.3.2.1.37), l' α -glucuronidase (α -glucosiduronase : E.C.3.2.1.139), la larabinofuranosidase (α -Larabinofuranosidase : E.C.3.2.1.55) et l'acétylxylanestérase (E.C.3.1.1.72) (JUTURU *et al*, 2011). Toutes ces enzymes agissent de manière coopérative pour convertir le xylane en ses sucres constitutifs. Les xylanases et les endoxylanases sont les plus importantes en raison de leur implication directe dans le clivage des liaisons glycosidiques et dans la libération des xylooligosaccharides courts (VERMA *et al*, 2012). L'hydrolyse complète des xylanes requiert l'action combinée d'endo- et d'exoenzymes, elles hydrolysent les liaisons au sein de la chaîne principale et libèrent aussi les constituants des chaînes latérales (KO *et al*, 1992).

Les enzymes qui attaquent les liaisons intérieures de type $\beta(1,4)$ -xylosidiques appelées les endo- β -1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) libèrent des oligomères de petites tailles, les exoxylanases et les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysent les petits oligomères libérées par les endoxylanases en xylose (BIELY *et al*, 1985).

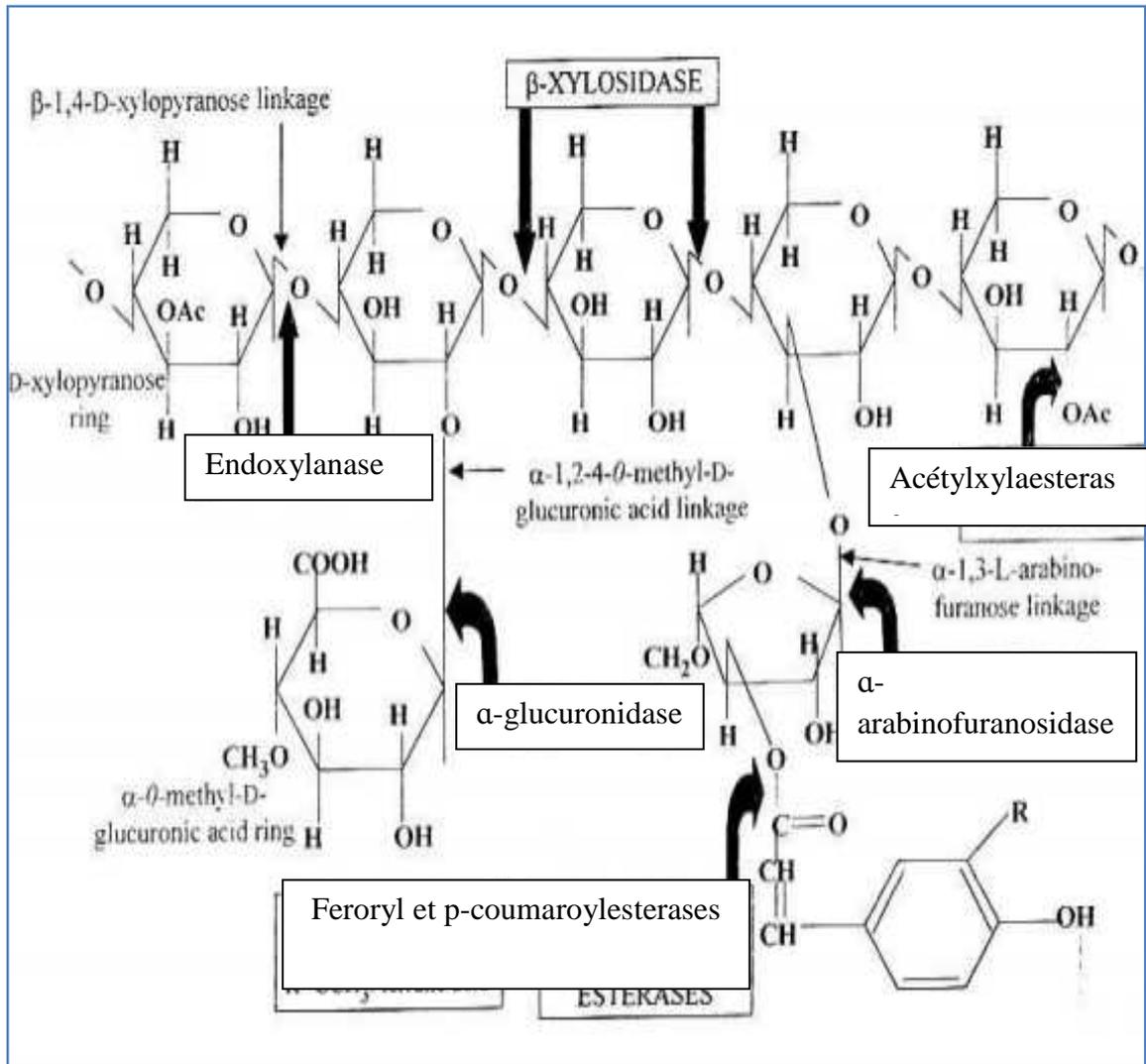


Figure 12 : Mode d'action des enzymes xylanolytiques sur la chaîne principale et sur les ramifications du xylane (BEG *et al*, 2001).

I-4-3-Applications biotechnologiques des xylanases

Les applications des xylanases sont multiples, elles sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau III : Applications actuelles des xylanases dans les industries alimentaires et non alimentaire (GABERIEL, 2005).

Industrie	Application	Fonction
Alimentation humaine	-nectar, purée, huiles	- Amélioration de la macération et de la clarification des jus, réduction de la viscosité
	-panification	- Les xylanases sont utilisées comme additifs pour améliorer la qualité boulangère (l'élasticité et la résistance des farines)
	-jus de fruit	- Dans la clarification des jus.
	-amidon	- Séparation facilitée de l'amidon et du gluten par réduction de la viscosité
	-la bière	- Fermentation alcoolique des sucres, essentiellement le maltose. Ces enzymes assurent donc une filtration et une bonne clarification des bières.
Alimentation animale	-Nourriture pour animaux monogastriques et ruminants	- Baisse de la viscosité et une meilleure disponibilité des protéines et de l'amidon qui accroît la digestibilité et la valeur nutritionnelles des aliments
Industrie non alimentaire	- Pâtes et papiers	- Blanchiment des pats krafts, séparation des encres, donc réduction de l'utilisation chlorés et alcalins. -Amélioration des procédés mécaniques de pulping qui aboutit a une baisse de consommation en énergie
	-Textiles	- Préparation des fibres par trempage et macération remplaçant les procédés chimiques.
	-Bioconversions	- Traitement des déchets, Production des composés fermentescibles, carburants renouvelables (bioéthanol), chimie fine (tensio-actifs).

	-Synthèse des alkyl-xylosides	- Les alkyl-xylosides sont des dérivés du xylose, ils sont des agents tensioactifs.
--	-------------------------------	---

I-5-La biomasse lignocellulosique

La biomasse est l'ensemble des matières organiques renouvelables issues de différentes sources : forestières, agricoles ou industrielles (SAUVAGEON, 2012), La biomasse lignocellulosique est composée essentiellement de trois composants : les polysaccharides dont la cellulose, la lignine et les extractibles (SUN et CHENG, 2002).

La cellulose, l'hémicellulose et la lignine représentent environ 90% de la matière sèche des matières lignocellulosiques, les 10% restants représentent les minéraux inorganiques et les extractibles (cires, composés phénoliques,..) (MOHAN *et al*, 2006). Le tableau ci-dessous montre la composition de certains matériaux lignocellulosiques.

Tableau IV : Composition chimique de la biomasse lignocellulosique (SUN et CHENG, 2002).

Matériau lignocellulosique	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)
Bois dur	40-55	24-40	18-25
Bois tendre	45-50	25-35	25-35
Herbes	25-40	35-50	10-30

I-5-1-Valorisation de la biomasse lignocellulosique

Les sous produits agricoles sont une cause principale de la pollution environnementale, leur bioconversion peut éliminer les dommages causés (MILALA *et al*, 2005), ils sont utilisés en fermentation à l'état solide avec plusieurs champignons cellulolytiques tel que *Trichoderma* et *Aspergillus*, ils sont valorisés par bio-raffinerie ou raffinerie végétale qui valorise l'ensemble de la plante pour concevoir des produits de haute valeur (BRIENS *et al*, 2008).

I-5-1-1-Pour la production du bioéthanol

La biomasse lignocellulosique est une source de sucres fermentescibles qui servent pour la production des essences liquides comme le bioéthanol, ces sucres polymérisés qui sont la cellulose et l'hémicellulose permettent de fournir le bioéthanol par la fermentation du glucose après plusieurs étapes de traitements d'hydrolyse physique, chimique et biologiques dites bio-raffinerie. Le bio-raffinage est un processus de transformation de la biomasse en produits bio-basés utilisés en alimentation, en produits chimiques et matériaux. Le bioéthanol a été utilisé pour substituer les essences dans de nombreux pays (MOOD *et al*, 2013).

La production du bioéthanol à partir de ces matières comprend quatre étapes :

- 1-le prétraitement : pour décomposer la structure des matériaux lignocellulosiques ;
- 2-l'hydrolyse enzymatique : pour dépolymériser la cellulose en glucose ;
- 3-la fermentation : pour métaboliser le glucose en éthanol ;
- 4-distillation-rectification-déshydratation : afin de séparer et purifier l'éthanol pour répondre aux spécifications du carburant (MARGEOT *et al*, 2009).

I-5-1-2-Pour la production de cellulases fongiques

Les cellulases sont des enzymes qui hydrolysent la cellulose des sous produits agricoles pour produire des unités de glucose, ces sous produits peuvent servir de substrats pour produire les cellulases ainsi réduire leur coût de leur importation (MILALA *et al*, 2005).

Les sous produits agricoles sont riches en carbohydrates, en lipides et en protéines, ils sont donc utilisés comme le composant majeur du milieu de la fermentation pour la production des enzymes comme les cellulases (LAU *et al*, 2012). La fermentation à l'état solide est généralement utilisée, car elle s'avère la plus efficace en cas de substrats insolubles dans l'eau et la plus économique car des faibles volumes sont utilisés, haute température et une stérilisation avec un équipement basé sur la pression (BONNIN *et al*, 2002).

I-5-1-3-Autres utilisations

Les matières cellulosiques sont utilisées pour : la production des solvants, acides organiques, protéines et lipides ; la production d'aliments riches en énergie pour les animaux et pour la conservation des fourrages (KUHAD *et al*, 2011).

I-6-Présentation des sous produits agricoles utilisés

I-6-1-Le grignon d'olive

Le grignon d'olive est le résidu sec issu lors de l'extraction de l'huile d'olive, il est composé de la pulpe, du noyau et du tégument de l'olive, avec un taux d'humidité entre 24 et 40%, une teneur en gras entre 3 et 7% selon le procédé d'extraction utilisé. (TOUATI, 2012).

I-6-1-1-Composition

Le grignon est composé d'une fraction riche en lignine et une autre en glucides comme la cellulose et l'hémicellulose. Le tableau suivant résume la composition chimique du grignon d'olive (CHOUCHENE, 2010).

Tableau V : Composition chimique du grignon d'olive (CHOUCHENE, 2010).

Matière sèche	Matières minérales	Matières azotées totales	Cellulose brute	Matières grasse
75-80%	3-5%	5-10%	35-50%	8-15%

I-6-1-2-Valorisation

Les grignons d'olives sont une biomasse qui présente des problèmes environnementaux dans les pays méditerranéens d'où l'importance de leur valorisation afin d'éliminer ces déchets (CHOUCHENE, 2010).

Les grignons d'olive peuvent être valorisés et utilisés dans plusieurs domaines :

- en alimentation : par la séparation du noyau de la pulpe, la pulpe étant utilisée en alimentation et le noyau en biocombustible ;
- en biotechnologie : comme substrat pour la culture des champignons filamenteux producteurs d'enzymes ;
- en compostage : généralement pour la fertilisation des sols. (ROUSSAS *et al*, 2009).

I-6-2-La sciure du bois

La sciure de bois (Figure 05) est un sous produit généré par la transformation industrielle du bois, il est composé de fibres de structure complexe (BENYOUCEF et HARRACHE, 2014), essentiellement de la cellulose, l'hémicellulose, la lignine et d'autres extractives (RAMAGEA *et al*, 2017), il contient en faibles proportions des composés organiques tels que les sels minéraux et les résines. Les sciures de bois peuvent être valorisées pour plusieurs usages tels que la valorisation énergétique comme combustible. (BENYOUCEF et HARRACHE, 2014). Le tableau VI donne la teneur du bois en certains composés.



Figure 13 : Morphologie superficielle de la sciure de bois « *Pinus sylvestris* » (BENYOUCEF et HARRACHE, 2014).

Tableau VI : Teneur du bois sans traitements en cellulose, hémicellulose, lignine et extractives. (ELOUMI *et al*, 2016).

Composé	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)	Extractives (%)
Bois sans traitement	40	28	25	5

I-6-3-Les cladodes du figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*)

Les cladodes sont des articles du figuier de barbarie, aplatis en forme de raquettes, ayant une couleur verte, de longueur de 30 à 50cm, et de largeur de 15 à 30 cm (HABIBI, 2004). (Figure06). La plante du figuier de barbarie « *Opuntia ficus-indica* » est originaire des régions arides et semi-arides du Mexique puis elle a été introduite en Afrique du nord, c'est une plante robuste avec un tronc épais, il mesure jusqu'à 5 mètres de hauteur (HABIBI, 2004).

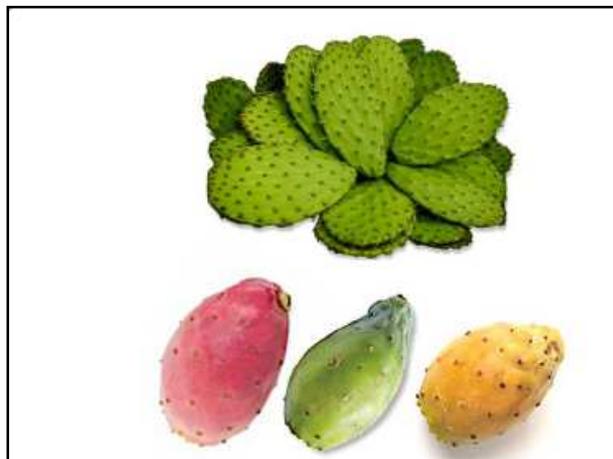


Figure14 : *Opuntia ficus-indica* : fruits et cladodes (ULISES *et al*, 2014).

I-6-3-1-Composition

Les cladodes sont composés principalement de l'eau de 80 à 95%, de faible quantité de carbohydrates (3 à 7%), de fibre (1 à 2%) et de 0.5 à 1% de protéines. (ULISES *et al*, 2014). Ils contiennent une quantité importante en matière minérale, de graisse et de cires, de lignine, polysaccharides et de cellulose (MELAININE *et al*, 2001). Les cladodes mexicains ont une teneur de 8 à 9 mg /100g en composés phénoliques (BOUTAKIOUT, 2015). Le tableau suivant résume la composition chimique des cladodes.

Tableau VII : Composition chimique des cladodes (MELAININE *et al*, 2001).

Composant	(% en poids sec)
Cendres	19.6
Graisses et cires	7.2
Cellulose	17.5
Autres polysaccharides	28.6

I-4-3-2-Valorisation

Les cladodes sont utilisés dans divers domaines :

- en agroalimentaire : par la transformation des cladodes en cladodes au vinaigre, confiture de vinaigre (BOUTAKIOUT, 2015)... ;
- en cosmétique et pharmaceutique comme les crèmes dermiques et les champoings (BOUTAKIOUT, 2015) ;
- en production d'aliments : sous forme de gélules ou de capsules pour le traitement des maladies comme l'obésité et le cholestérol (BOUTAKIOUT, 2015).

I-7- Présentation des champignons utilisés

I-7-1-*Aspergillus Niger*

Le genre *Aspergillus* est le groupe des champignons filamenteux avec un grand nombre d'espèces comme *Aspergillus Niger*. *Aspergillus Niger* est un champignon qui pousse sur la matière organique que l'on retrouve dans le sol, la litière et sur la matière végétale en décomposition. *Aspergillus Niger* se développe à des températures entre 6 °C et 47 °C avec une température optimale entre 35 °C et 37 °C. Il est capable de pousser à des pH allant de 1,8 jusqu'à 9,8 (SCHUSTER *et al*, 2002).

Aspergillus Niger est un microorganisme très important en biotechnologie utilisé pour produire les enzymes extracellulaires et l'acide citrique, et il est également utilisé dans la biotransformation et le traitement des déchets (SCHUSTER *et al*, 2002).

I-7-2-Penicillium

Le genre *Penicillium* comprend environ 225 espèces, c'est un champignon très proche des *Aspergillus*. C'est un champignon filamenteux qui a été utilisé en alimentation et en pharmaceutiques vu l'intérêt des métabolites qu'il produit (HOCQUETTE *et al*, 2005).

C'est un genre diversifié dans le monde entier et ses espèces jouent un rôle important en tant que décomposeurs des matières organiques, il se retrouve dans une large gamme d'habitat tel que le sol, la végétation et divers produits alimentaires où il provoque des pourritures destructrices en produisant des mycotoxines (VISAGIE *et al*, 2014).

I-8- Les oxydations et les antioxydants

I-8-1-Généralités

L'oxydation est une réaction chimique qui fait partie d'une réaction d'oxydoréduction, elle transfère un électron vers un agent oxydant, ce qui peut générer des radicaux libres entraînant des réactions destructrices. Les antioxydants sont un moyen de défense contre les radicaux libres, un antioxydant est une substance capable de retarder ou d'empêcher l'oxydation des substrats à faible concentration (RAHAL *et al*, 2014).

I-8-3-Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche externe, dans le phénomène d'oxydation, les radicaux libres ont un électron célibataire sur un atome d'oxygène (BOUTALIOU, 2015). L'oxygène moléculaire est indispensable pour la vie mais il peut entraîner des dommages dans le corps et cela par la formation de radicaux libres ou les espèces oxygénées actives qui sont soit l'anion peroxyde ($O_2^{\bullet-}$) ou le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) ou bien des molécules tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (HALENG *et al*, 2007).

I-8-4-Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la formation des espèces oxygénées actives et la capacité du corps à leur neutralisation, ce déséquilibre conduit à des dommages oxydatifs et des dégâts irréversibles pour les cellules. Le mode de vie et les habitudes alimentaires favorisent l'apparition des espèces réactives de l'oxygène qui ont pour conséquence l'apparition des pathologies comme le vieillissement et les cancers (HALENG *et al*, 2007).

I-9-Les composés phénoliques

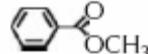
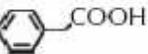
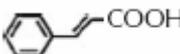
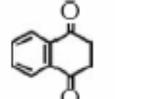
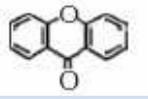
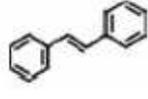
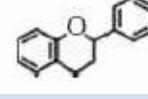
I-9-1-Généralités

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux, ce sont des produits phytochimiques c'est-à-dire des produits chimiques synthétisés par les plantes qui peuvent avoir un effet sur la santé mais ne sont pas des nutriments essentiels. (EL GHARAS, 2009). Les polyphénols sont caractérisés par leur pouvoir antioxydant et leur capacité d'interagir avec les protéines ainsi la prévention de l'oxydation des lipoprotéines (CHEYNIER, 2005), ils sont aussi considérés comme des chélateurs de métaux, des antimutagènes, des anticarcinogènes et des agents antimicrobiens (EL GHARAS, 2009).

I-9-2-Classification

Les composés phénoliques sont divisés en plusieurs classes (EL GHARAS, 2009). Le tableau ci-dessous représente les classes et les structures des poly phénols.

Tableau VIII : Structure des squelettes des poly phénols (CROZIER *et al*, 2006).

Nombre de Carbones	Squelette	Classification	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	
8	C6-C2	acétophénonnes	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	
9	C6-C3	Coumarines	
10	C6-C4	Naphthoquinones	
13	C6-C1-C6	Xanthones	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	

I-9-3-Applications

Les polyphénols sont utilisés dans divers domaines industriels :

-en agroalimentaire : dans le développement de certains conservateurs alimentaires et cela grâce à l'effet antimicrobien de certains polyphénols, utilisés aussi dans la stabilisation des denrées alimentaires pour la lutte contre la peroxydation lipidique grâce aux propriétés antioxydantes des composés phénoliques (BOUTAKIOUT, 2015).

-dans l'industrie pharmaceutique : les polyphénols rentrent dans la composition de certains produits pharmaceutiques anti-infectieux (MOURE *et al*, 2001).

-en cosmétiques : pour des applications locales (MOURE *et al*, 2001).

Chapitre II
Matériel et méthodes

II-Matériel et méthodes

La partie expérimentale de notre travail a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et de Biotechnologies (LABAB) et du laboratoire de recherche de microbiologie de l'université MOULOUD MAMMARI de TIZI OUZOU.

Au cours de notre travail la mise en évidence des activités enzymatiques à partir des sous produits agricoles a été effectuée par des méthodes microbiologiques, biochimiques et biotechnologiques.

II-1-Matériel, appareillage et verrerie

Le tableau suivant représente le matériel, l'appareillage et la verrerie utilisés dans ce présent travail

Tableau IX: Le matériel, l'appareillage, et la verrerie utilisés.

Appareillage	Verrerie et autre matériel
<ul style="list-style-type: none">▪ Bain marie (MEMMERT) ;▪ Autoclave (PBINTERNATIONAL) ;▪ Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA 3-18 K, SIGMA 4-16K) ;▪ Etuve (28-30 °C, BINDER) ;▪ Réfrigérateur ;▪ Congélateur ;▪ Balance analytique à affichage digital (0.01g) (DENVER INSTRUMENT) ;▪ Balance de précision à 0.01mg (SARTORIUS) ;▪ Spectrophotomètre UV-visible (SCHIMADZU) ;▪ pH mètre (HANNA instrument) ;▪ Agitateurs : à barreaux magnétiques, chauffants ou non chauffants et vortex ;▪ Hotte ;▪ Broyeur électrique ;	<ul style="list-style-type: none">▪ Erlenmeyers de 250 ml et 500 ml ;▪ Eprouvettes ;▪ Fioles jaugées ;▪ Bêchers ;▪ Flacons de 180ml, 250 ml et 500ml ;▪ Cristallisoirs ;▪ Boîtes de Pétri en plastiques de 90 mm de diamètre ;▪ Pipettes graduées ;▪ Disques de filtration ;▪ Pipettes pasteurs ;▪ Micropipettes ;▪ Tubes à essai ;▪ Tubes de centrifugation ;▪ Spatules ;▪ Papier aluminium ;▪ Papier film ;▪ Mortier.

<ul style="list-style-type: none">▪ Enceinte de filtration ;▪ Lyophilisateur.	
--	--

II-1-2-Sous produits agricoles utilisés

Le grignon d'olive, la sciure de bois et les cladodes du figuier de barbarie sont les trois sous produits agricoles utilisés au cours de notre travail, le grignon d'olive est récupéré dans une huilerie au système tri-phasique.

II-1-3-Souches fongiques utilisées

Deux souches fongiques utilisées qui sont : *Aspergillus Niger* et *Penicillium Sp*, ces deux souches ont été collectées au laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB). L'aspect de la souche *Aspergillus Niger* sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) après 6 jours d'incubation à 28°C est montré dans la figure suivante :



Figure 15 : Aspect de la préculture d'*Aspergillus Niger* sur milieu PDA.

II-1-4-Substrats et milieux de cultures

La production des enzymes cellulolytiques par les deux souches fongiques *Aspergillus Niger* et *Penicillium Sp* a été réalisée comme suit :

-Sur milieu liquide Mendel et Weber (MW) (annexe I): utilisant le substrat pur, la cellulose avicel qui est soumise à la biodégradation fongique ;

-en fermentation à l'état solide (SSF) utilisant trois substrats solides qui sont des sous produits agricoles : la sciure de bois, le grignon d'olive et les cladodes du figuier de barbarie humidifiés à 75 % par le milieu liquide Mendel et Weber (MW).

La mise en évidence de la production des cellulases et des activités enzymatiques sont menées comme suit :

-Sur milieu solide Cellulose-MW-Agar (annexe I) : c'est un milieu de culture sur boîte de Pétri contenant la cellulose avicel, le milieu Mendel et Weber et l'agar en utilisant le rouge Congo comme indicateur coloré de la dégradation ;

-sur milieu liquide Mendel et Weber et en fermentation à l'état solide (SSF).

- PAGE SDS : pour la révélation de la présence de bandes qui correspondent aux cellulases.

II-2-Prétraitements des sous produits agricoles utilisés en fermentation à l'état solide

Le grignon d'olive et la sciure de bois étant des produits solides ont été soumis à un broyage à l'aide d'un broyeur électrique, tandis que les cladodes ont été coupés en morceaux très fins à l'aide d'un couteau puis écrasés à l'aide d'un mortier.

Des prétraitements alcalins par la soude (NaOH, 2N) (annexe II) sont effectués pour 10 g de chaque sous produit avant l'inoculation avec 100 ml de la solution NaOH, 2N suivie d'une agitation pendant une heure puis lavés avec 100ml d'eau distillée. Les substrats sont soumis à une stérilisation à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes avant l'inoculation.

II-3-Inoculation des cultures

II-3-1-Milieu solide

A partir des pré-cultures des deux champignons sur milieu PDA (annexe I) après 6 jours d'incubation à 28 °C, des disques sont prélevés soigneusement dans des conditions stériles à l'aide des pipettes Pasteur stériles. Un disque de chaque souche est déposé au centre de la boîte contenant le milieu Mendel et Weber additionné de la cellulose avicel et l'agar puis incubés à 28 °C. Après 6 jours d'incubation, les boîtes sont colorées avec 10ml de la solution du rouge Congo (2,5 g/l) pendant 15 min puis décolorées par 15 ml d'une solution d'NaCl (1N) (Annexe II), d'autre part un disque de chaque souche est déposé au centre des boîtes Pétri contenant le milieu Mendel et Weber additionné de la cellulose avicel, l'agar et le rouge Congo (2,5 g/l) (annexe II).

II-3-2-Milieu liquide

Vingt quatre disques (d'environ 5 mm) de biomasse fongique des deux souches sont prélevés des pré-cultures par des pipettes Pasteur stériles puis plongés dans des erlenmeyers de 250 ml contenant le milieu liquide Mendel et Weber (MW) et la cellulose avicel.

Les erlenmeyers sont ensuite bouchés par du coton, stérilisés à l'autoclave (120°C pendant 20 min) puis incubés à 28°C.

Après 6 jour d'incubation les cultures sont soumises à une centrifugation à 4000 G pendant 15 min à 4°C afin d'extraire et récupérer les enzymes produites dans le surnageant.

II-3-3-Fermentation des sous produits agricoles à l'état solide (SSF)

Dix grammes de chaque sous produits sont mis dans des erlenmeyers de 500ml puis stérilisés à l'autoclave. Les substrats sont ainsi humidifiés à 75% par le milieu liquide Mendel et Weber (MW) stérile. Vingt quatre disques de biomasse fongique de chaque souche ont été ajoutés dans les erlenmeyers sur les substrats humidifiés, puis incubés à 28 °C.

Après 6 jours d'incubation, les enzymes sont extraites par une solution tampon : le tampon citrate-phosphate à pH 5 (annexe III), 50 ml du tampon sont ajoutés pour chaque erlenmeyer, ces derniers sont agités pendant une heure et ensuite centrifugés à 4000G pendant 15 min à 4°C. Les extraits sont filtrés afin d'éliminer les spores et les bactéries et conservés au réfrigérateur à 4°C, puis lyophilisés.

II-4-Caractérisation des sous produits agricoles utilisés

II-4-1-Mesure de la matière sèche totale du grignon d'olive et des cladodes du figuier de barbarie avant et après culture par *Aspergillus Niger*

La matière sèche totale correspond au résidu sec ou l'extrait sec, ce sont les matières restantes après séchage à 100 °C jusqu'à l'obtention d'un résidu sec à un poids constant. Dix grammes de chaque produit est soumis à une évaporation à 100°C. La teneur en matière sèche est exprimée ensuite en g/g (matière sèche/matière initiale ou exprimés en pourcentage par la formule suivante :

$$MS = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100 (\%)$$

MS : matière sèche totale (%) ;

m_2 : masse de la coupelle et de ma matière sèche (g) ;

m_1 : masse de la coupelle et l'échantillon (g) ;

m_0 : masse de la coupelle (g).

II-4-2-Teneur en cendres (matière minérale) du grignon d'olive, des cladodes et la sciure de bois

Un poids de cinq gramme de chaque sous produit est calciné dans un four à 180 °C pendant 24 heures. La teneur en cendres est exprimée en g/g ou en pourcentage par la formule suivante

$$TC = \frac{m_c}{M} \times 100\%$$

TC : taux de cendres (%) ;

m_c : la masse des cendres (g) ;

M : le poids initial du substrat (g).

II-5-Détermination de la teneur en protéines

La détermination de la teneur en protéines a été réalisée suivant la méthode de Lowry *et al* (1951).

II-5-1-Principe de la méthode

Les extraits conservés au réfrigérateur à 4°C sont soumis à un dosage de protéines par la méthode de Lowry *et al* (1951), qui est une méthode de dosage colorimétrique, le réactif Folin-Ciocalteu additionné d'une solution protéique diluée est plus au moins réduit par les protéines (par les groupements oxydés des acides aminés), les groupements phénoliques du tryptophane, de la tyrosine, de la cystéine et l'histidine. Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : le bleu de molybdène dont l'intensité peut être mesurée à 750nm au spectrophotomètre.

La densité optique (DO) est lue au spectrophotomètre à 750nm ce qui permet de déterminer la concentration des protéines des extraits dosés en se référant à une courbe

d'étalonnage $DO = f(C)$ établie avec des solutions à des concentrations protéiques connues. L'albumine sérique bovine est utilisée comme protéine de référence. Le mode opératoire est donné dans l'annexe IV.

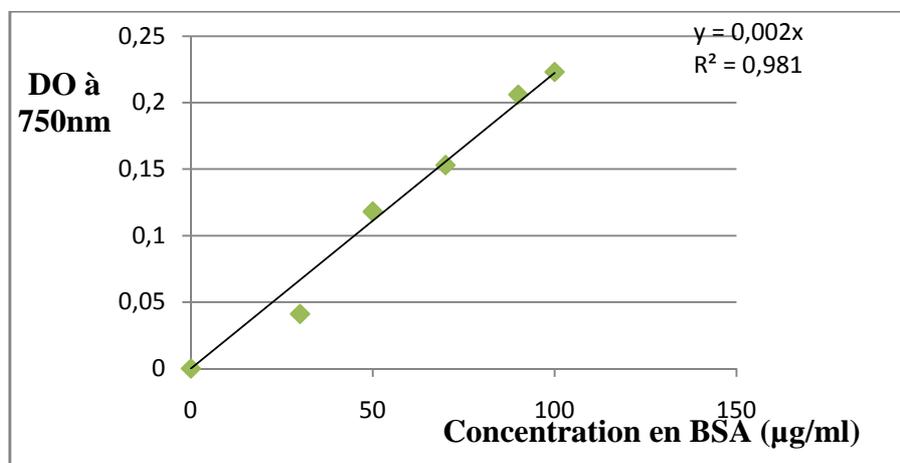


Figure 16: Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al* (1951) ; R^2 : coefficient de corrélation

II-6-Mesure de l'activité enzymatique à 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C

II-6-1-Principe

La mesure de l'activité enzymatique est réalisée en utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) qui est jaune en milieu chaud et alcalin, en présence des sucres réducteurs il est réduit en acide 3-amino 5-nitrosalicylique de couleur rouge orangé. Dans le dosage de l'activité cellulasique, on utilise les propriétés réductrices du glucose libéré de la cellulose. Le composé obtenu peut être dosé par spectrophotomètre à 540nm.

Les activités enzymatiques sont calculées en unité internationale à partir des concentrations du glucose obtenu après dosage comme suit :

$$U.ml^{-1} = \text{nombre de } \mu\text{moles de glucose} / \text{temps d'incubation (minutes)}.$$

Des courbes étalons ont été réalisées pour chaque température $DO = f(C)$. Le mode opératoire est donné dans l'annexe V.

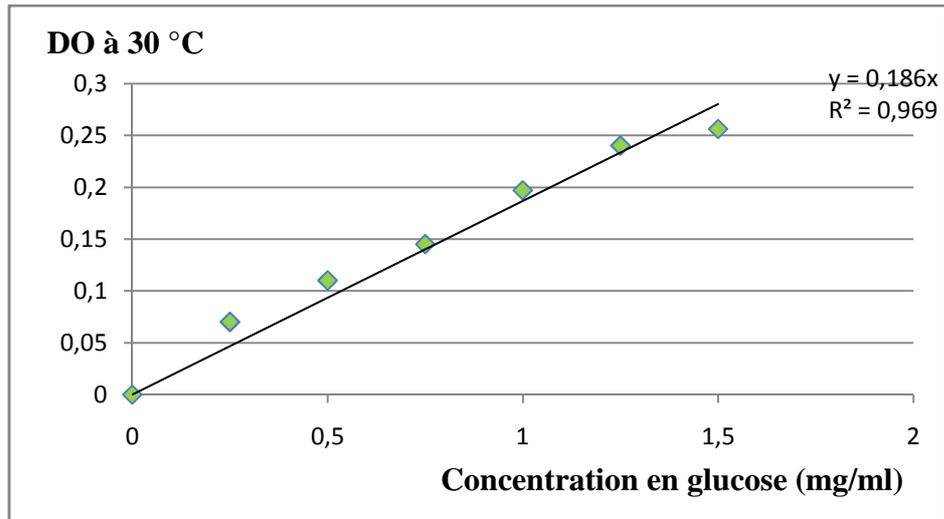


Figure 17 : Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 30°C.

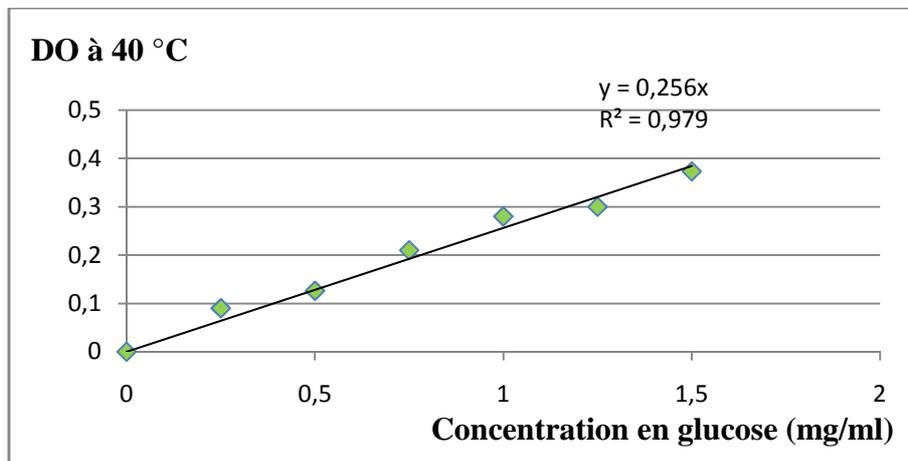


Figure 18: Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 40°C.

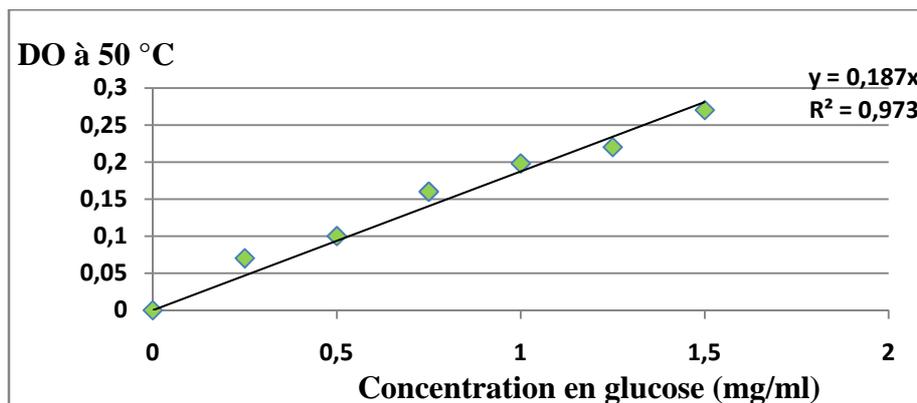


Figure 19: Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 50°C.

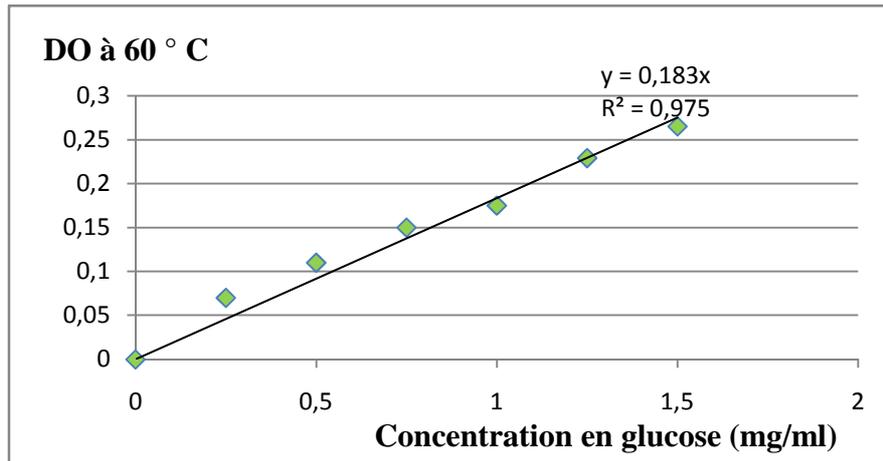


Figure 20 : Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 60 °C.

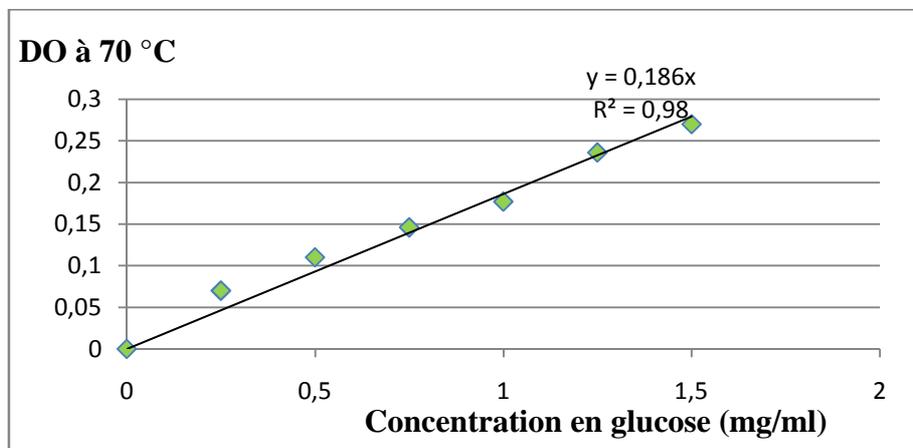


Figure 21 : Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 70°C.

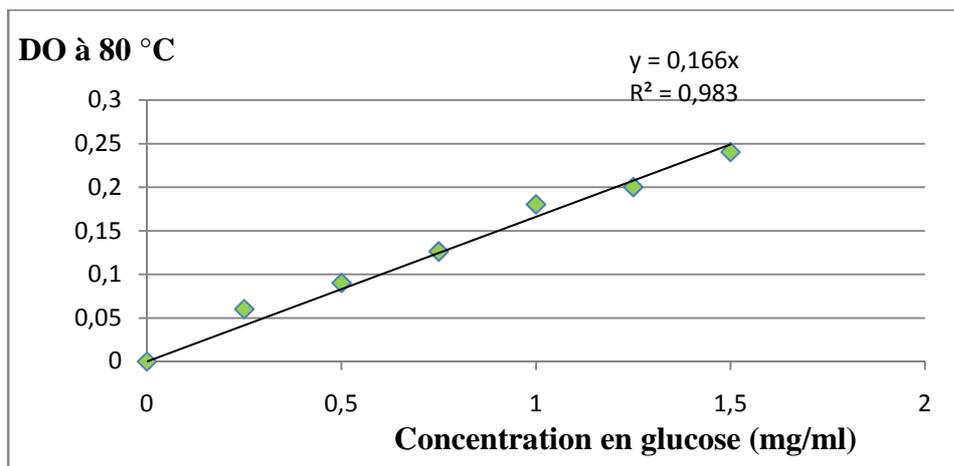


Figure 22 : Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose à 80°C.

II-7-Extraction des polyphénols totaux du grignon d'olive et des cladodes à l'acétate d'éthyle avant et après culture par *Aspergillus Niger*

Un poids de chaque substrat (20g) avant et après culture par *Aspergillus Niger* en fermentation à l'état solide est additionné de 100 ml de solvant « acétate d'éthyle », l'ensemble est homogénéisé, puis une centrifugation 4000G pendant cinq minutes est effectuée, on obtient ainsi deux phases : le surnageant qui est riche en polyphénols et les substrats en culot. Le surnageant subit une évaporation dans une hotte pendant 24 heures, l'extrait sec est ainsi récupéré dans un volume minimum d'éthanol.

II-8-Dosage des composés phénoliques par colorimétrie

Les polyphénols obtenus à partir des substrats avant et après culture sont dosés par la méthode du Folin-Ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965).

II-8-1-Principe de la méthode

La méthode est basée sur la réduction du Folin-Ciocalteu par les groupements réducteurs des composés phénoliques conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers absorbent à 760nm. L'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les échantillons. Le mode opératoire est donné dans l'annexe VII.

Une gamme étalon DO= f(C) a été réalisée par l'acide gallique :

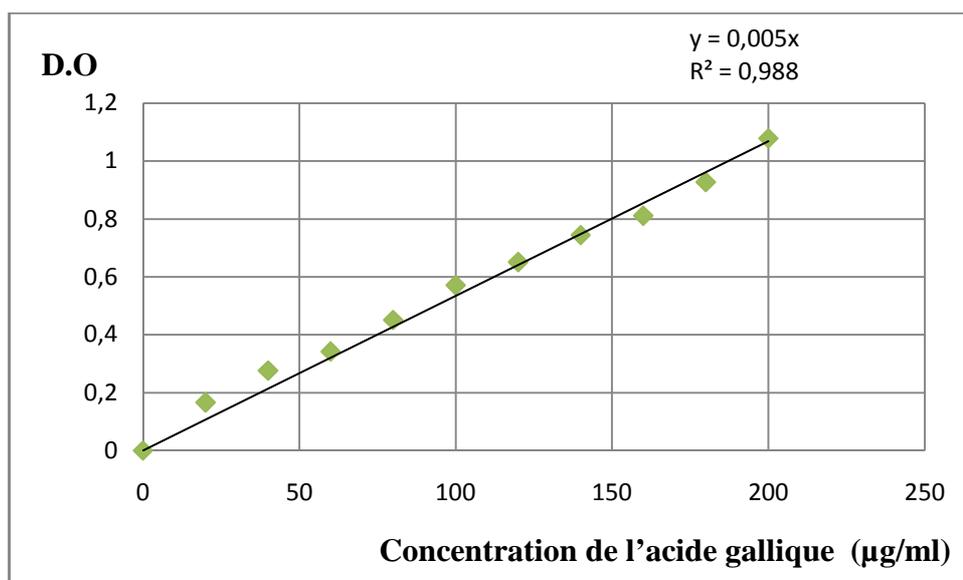


Figure 23 : Courbe d'étalonnage par l'acide gallique.

II-9-Test de l'activité anti-oxydante du grignon d'olive et des cladodes avant et après fermentation

Cette méthode utilise le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), c'est un radical libre de couleur violette qui est réduit en un composé de couleur jaune en présence des composés anti-radicalaires, il est capable d'arracher les atomes d'hydrogènes labiles des groupements OH les plus réactifs, il possède un atome non apparié, il se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables de couleur violette qui absorbe à 517nm. (MOLYNEUX, 2004). Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [1 - (\text{Abs Échantillon} - \text{Abs Contrôle négatif})] \times 100$$

Où: I %: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%);

Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif

Une courbe de référence a été réalisée par une solution d'acide ascorbique à des concentrations connues. Le mode opératoire est donné dans l'annexe IX.

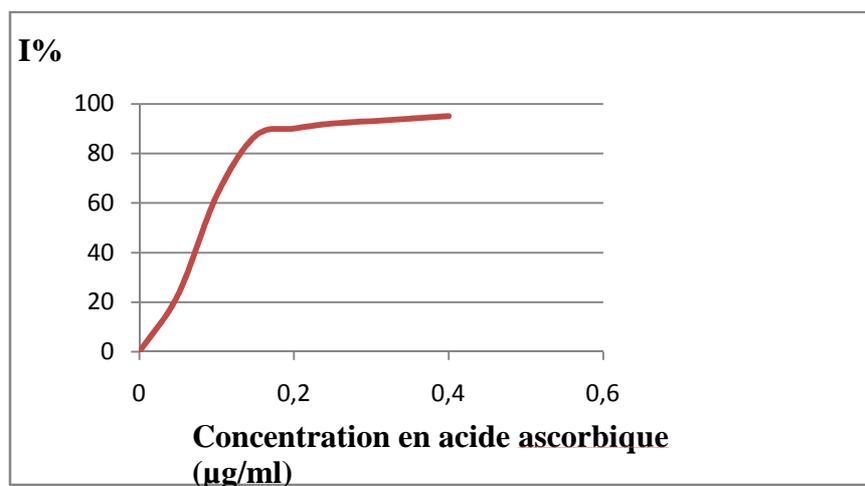


Figure 24 : Courbe de référence par l'acide ascorbique à des concentrations connues

II-10-Méthodes électrophorétiques

II-10-1-Principe

L'électrophorèse est une méthode d'analyse et de fractionnement d'un mélange protéique sous l'action d'un champ électrique, basé sur la migration différentielle des protéines due à la présence des radicaux amines et carboxyliques dans la molécule selon le poids moléculaire.

II-10-2-La séparation sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est considérée comme l'une des méthodes de séparation les plus précises, reproductibles et sensibles, réalisée sur des supports solides, parmi ces supports le gel de polyacrylamide, qui correspond à un mélange d'acrylamide et d'un agent pontant le bisacrylamide (N, N' méthylène-bis -acrylamide) l'ensemble est additionné à des agents initiateurs (persulfate d'ammonium et TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyl -éthylène diamine).

II-10-3-Conduite de l'électrophorèse

Le gel de polyacrylamide est coulé entre une plaque en verre et une plaque en alumine, séparées par un espaceur et enfin un peigne est introduit, permettant la formation des puits après polymérisation du gel.

Les échantillons sont déposés dans des puits à l'aide d'une micro seringue, à raison de 20 à 25 μ l, ils sont préalablement dissous dans un tampon approprié et additionnés du bleu de bromophénol qui est un indicateur coloré qui détermine le front de migration des protéines et permet de repérer la fin de l'électrophorèse, l'unité d'électrophorèse est mise sous tension, courant et voltage constant : 20mA 200V .

II-10-4-Révélation des bandes de migration électrophorétiques

A la fin de la migration, les gels de l'électrophorèse sont révélés au bleu de coomassie en trois étapes comme suit :

1-La fixation : elle se fait par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA), pendant 30 min ;

2-la coloration : le gel est immergé deux à quatre heures dans une solution de coloration contenant du bleu de coomassie 0,2%(p/v) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée, méthanol et TCA 2% (p/v) ;

3-la décoloration : se réalise par immersion du gel coloré dans le mélange eau /méthanol/acide acétique.

II-11-5-Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence du SDS et du 2- β -mercaptoéthanol (2-BME) (PAGE- SDS)

II-11-5-1-Principe

Des échantillons protéiques sont préparés dans le tampon du gel de concentration, d'eau distillée, d'un détergent anionique le SDS (10%) et d'un agent réducteur qui est chargé de rompre les liaisons disulfures : le 2-β Mercaptoéthanol, dans ce cas la plupart des polypeptides se dissocient, cela permet la fixation du SDS sur leurs zones hydrophobes, les polypeptides acquièrent une forte charge négative et ne seront séparés que selon leurs poids moléculaires, puis chauffés à 100 °c pendant 5min et à la fin rajouter du glycérol .

Suivant le protocole de LAEMMLI et FAVRE (1973), un gel de concentration a été réalisé dont l'objectif est la concentration des protéines, pour une migration homogène dans le gel de séparation.

La détermination du poids moléculaire des protéines d'intérêt est effectuée en faisant migrer en parallèle des protéines étalons de poids moléculaires connus, qui est le kit de protéines étalons, préparé au laboratoire de LABAB. Le kit comprend les protéines suivantes : L'albumine sérique bovine (67000 Da), l'ovalbumine (45000 Da), la chymotrypsinogène (23000Da), la β -lactalbumine (18000Da) et l'α -lactalbumine (14000Da). Ce dernier est utilisé pour la réalisation d'une courbe de calibration : $\text{Log PM} = f(\text{distance parcourue})$
Mode opératoire dans l'annexe VI.

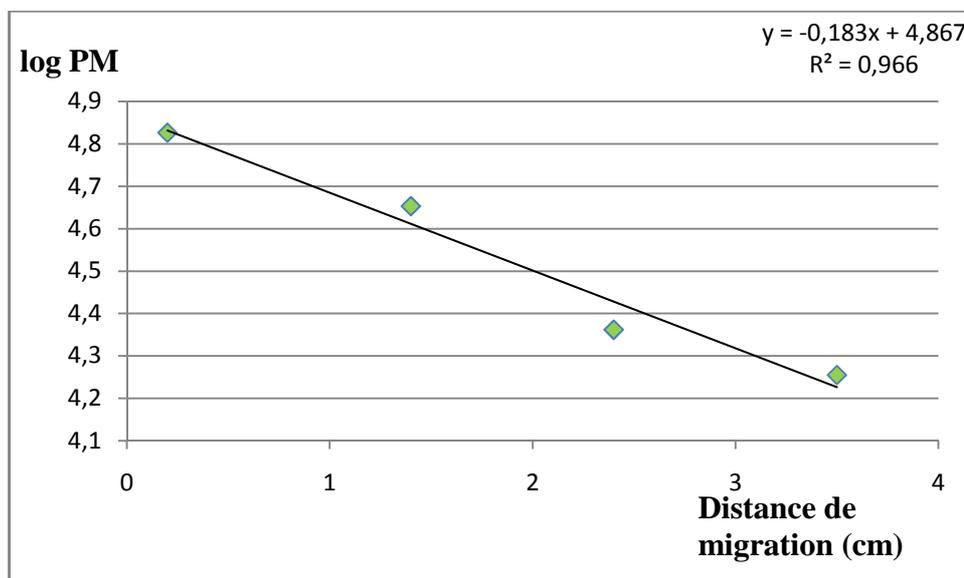


Figure 25 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS.

II-11-Zymogramme des enzymes cellulolytiques

II-11-1-Principe

C'est une technique électrophorétique, qui permet de mettre en évidence l'activité cellulolytique sur le gel d'électrophorèse contenant de la cellulose pure. C'est alors la dégradation de la cellulose qui révèle la présence d'activité ou pas, après incubation du gel à une température de 45 °C, le gel est coloré au rouge Congo puis lavé avec une solution NaCl (1N) , l'apparition des zones claires indique une activité cellulolytique. Le mode opératoire est donné dans l'annexe VII.

III-12-Analyses statistiques

Une analyse statistique a été effectuée par le logiciel « statistica » en utilisant :

- 1- « Le test de student pour deux échantillons appariés » qui permet de savoir si deux échantillons appariés peuvent bien provenir de la même population, il s'agit du même échantillon sur lequel on mesure deux fois la variable quantitative dans des conditions différentes;
- 2- « Le test de student pour deux échantillons indépendants » qui permet de savoir si deux échantillons indépendants peuvent bien provenir de la même population, il s'agit de comparer les moyennes de la variable quantitative étudiée sur les deux populations selon un certain facteur.

Les tableaux obtenus sont donnés dans l'annexe X.

Les deux diagrammes ci-dessous récapitulent la méthodologie et les différentes étapes suivies dans la partie expérimentale.

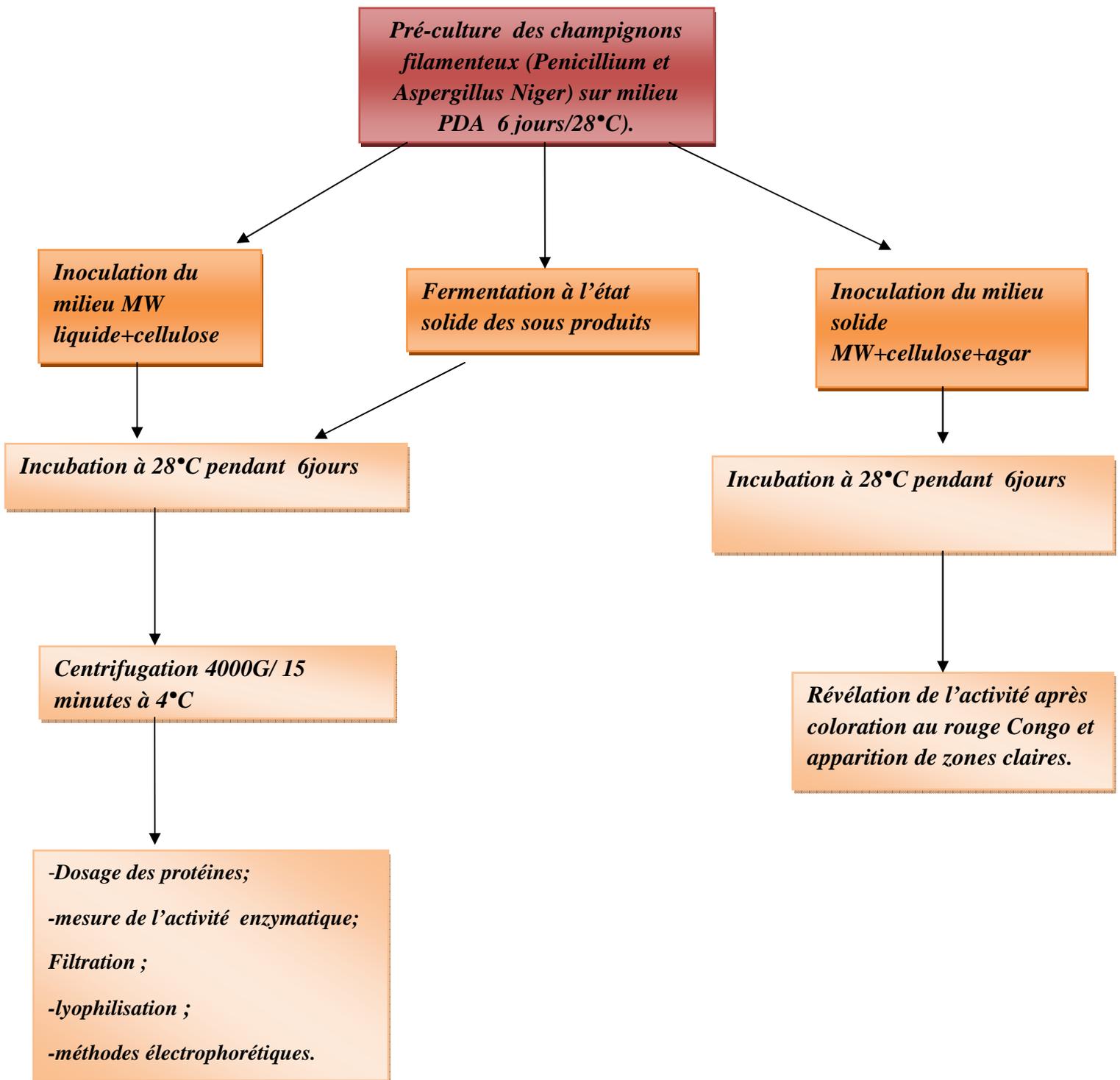


Figure 26 : Diagramme récapitulatif de la mise en évidence des enzymes recherchées.

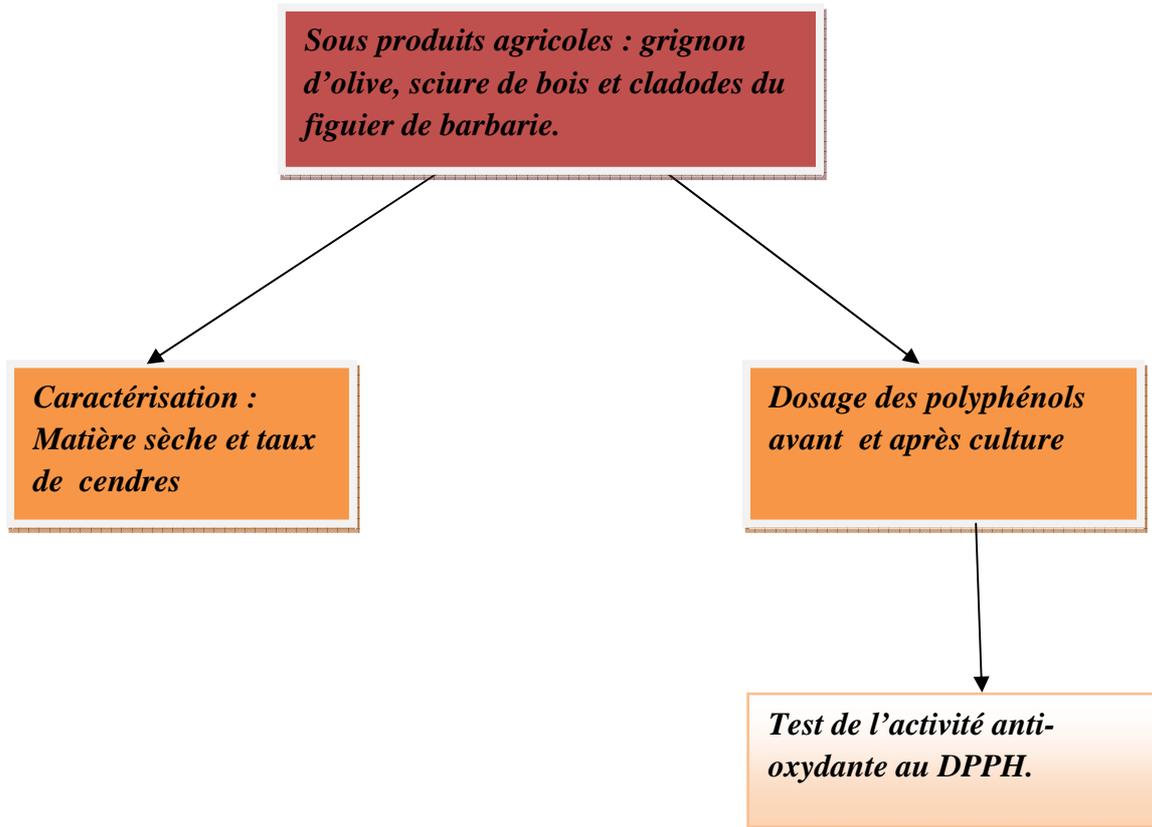


Figure 27 : Diagramme récapitulatif de la caractérisation des sous produits agricoles utilisés.

Chapitre III

Résultats et discussion

III-Résultats et discussion

III-1-Caractérisation des sous produits agricoles utilisés : le grignon d'olive, la sciure de bois et les cladodes

Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau suivant :

Tableau X : Caractéristiques du grignon d'olive, de la sciure de bois et des cladodes.

Caractéristiques	Matière sèche(%)	Taux d'humidité (%)	Matière volatile(%)	Matière minérale (%)
Sous produit agricole				
Grignon d'olive	83.2	16.8	81	2.2
Sciure de bois	89.7	10.3	87.4	2.3
Cladodes	11.5	88.5	9.48	2.02

D'après les résultats, la sciure de bois est la plus riche en matière sèche et en matière volatile, les cladodes présentent le plus grand taux d'humidité et le taux le plus faible en matière sèche et en matière volatile.

Les trois sous produits agricoles contiennent des valeurs proches en matière minérale, ces valeurs sont proches de celles trouvées dans des études réalisées par BENYOUCEF et HARRACHE (2014) et TOUATI (2013) ayant trouvé une teneur de 1.5% en matière minérale pour la sciure de bois et valeur de 1.5 à 2% pour le grignon d'olive.

III-2-Mise en évidence de l'activité enzymatique sur milieu solide

La première étape de la mise en évidence des activités cellulolytiques des deux champignons filamenteux *Penicillium sp* et *Aspergillus Niger* consiste à observer l'apparition des zones claires sur boîtes de Pétri contenant le milieu solide MW additionné d'agar avec la cellulose avicel comme source de carbone en utilisant deux méthodes de révélation. Dans la première méthode le rouge Congo est additionné au milieu solide comme indicateur coloré de la dégradation avant la culture. Ces zones claires apparaissent normalement comme un halot clair autour du disque de la biomasse fongique après six jours d'incubation à 28°C, ces zones correspondent aux zones d'hydrolyse.

Les résultats obtenus par la première méthode indiquent la présence de zones claires plus au moins apparentes autour des colonies d'*Aspergillus Niger* et une zone claire très fine pour *Penicillium sp* comme le montre les deux figures ci-dessous :

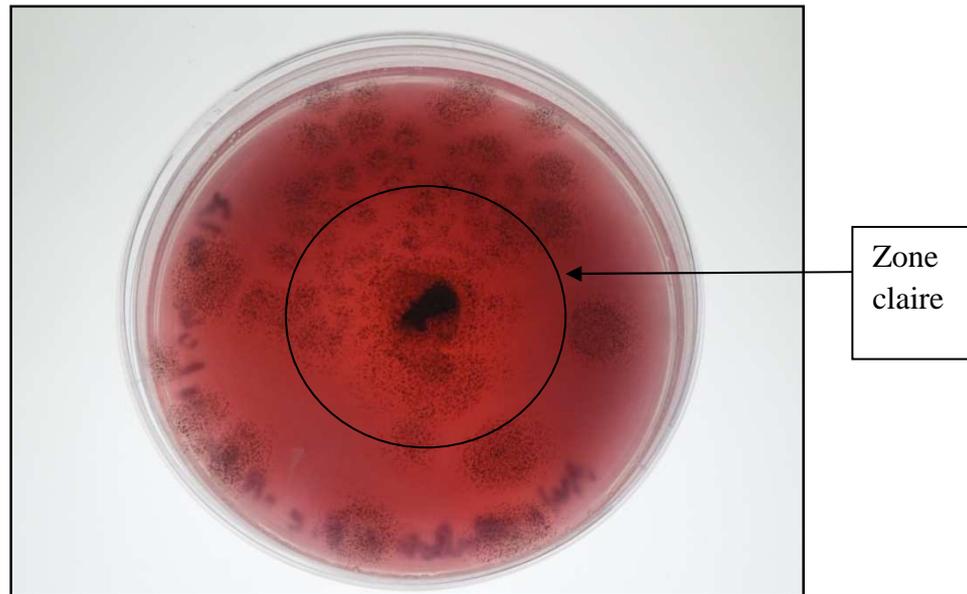


Figure 28 : Photographie de la culture du disque d'*Aspergillus Niger* sur milieu solide MW contenant le rouge Congo.

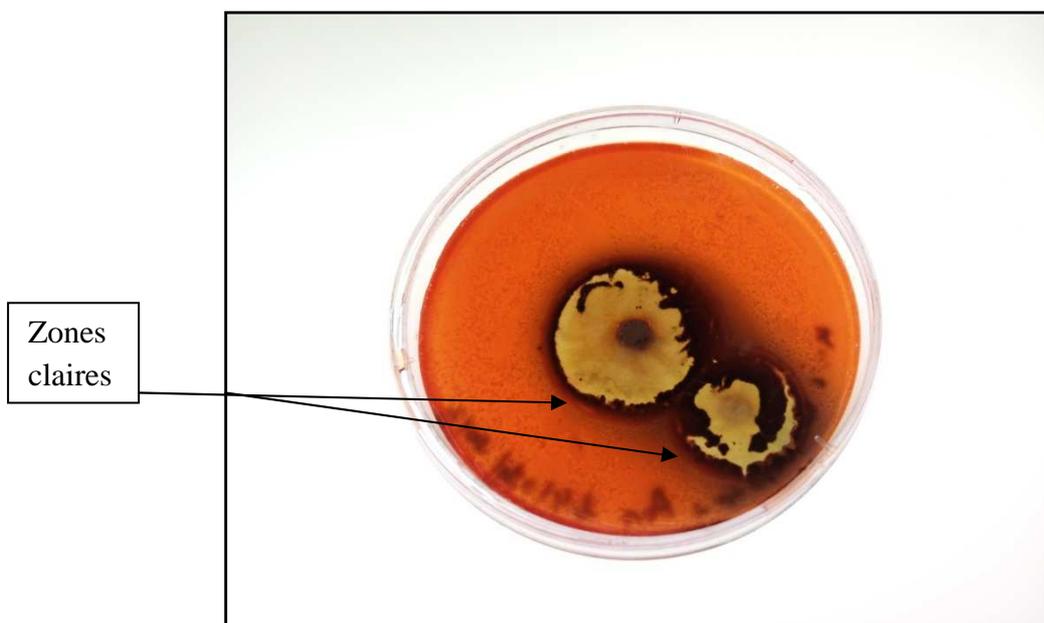


Figure 29 : Photographie de la culture du disque de *Penicillium sp* sur milieu solide MW contenant le rouge Congo.

La deuxième méthode est celle utilisant le milieu solide MW sans l'ajout de l'indicateur coloré, la coloration du milieu avec un volume du rouge Congo (2,5g/l) est donc réalisée après culture pendant 15 minutes puis décoloré avec une solution d'NaCl (1N) jusqu'à l'apparition des zones claires et cela pour les deux champignons. Les résultats de cette

deuxième méthode montrent l'apparition de zones claires plus importantes que celles obtenues par la première méthode comme le montre les deux figures suivantes :



Figure 30 : Photographie de la culture du disque d'*Aspergillus Niger* sur milieu solide MW après coloration et décoloration.

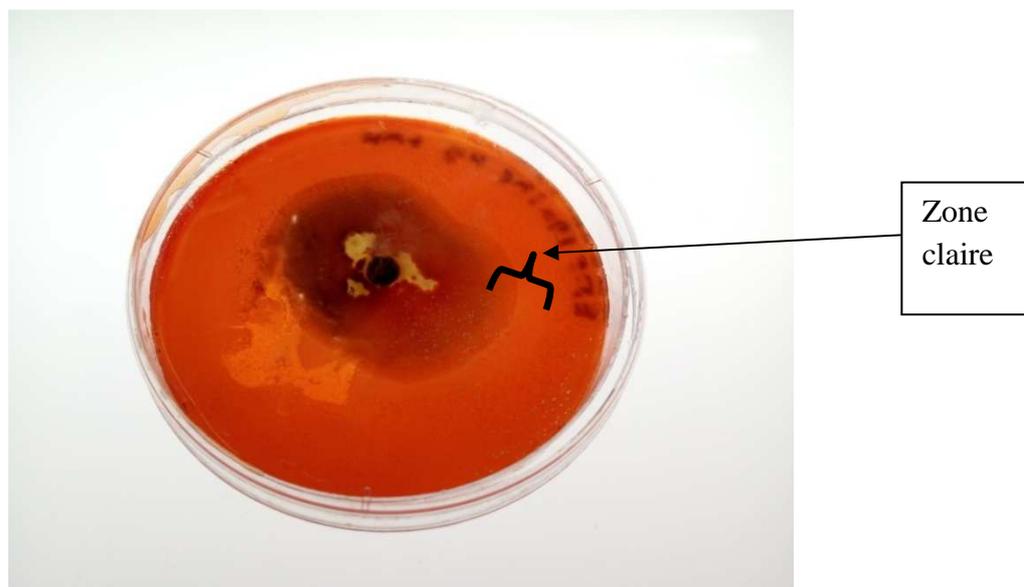


Figure 31 : Photographie de la culture du disque de *Penicillium Sp* sur milieu solide MW contenant le rouge Congo.

Cette méthode optant pour une coloration après culture est rapide et simple pour la sélection des souches fongiques productrices des cellulases, elle s'avère donner de meilleurs résultats en la comparant à la première méthode, cette méthode est rapporté par LEITE *et al*

(2016), qui ont obtenu des activités cellulases et xylanases chez *Aspergillus Niger* lors de sa culture en fermentation à l'état solide en utilisant le grignon d'olive comme substrat.

D'après les résultats obtenus les deux champignons se développent différemment sur ce milieu solide. La souche *Aspergillus Niger* présente un développement plus important que la souche *Penicillium sp* et le diamètre (estimé visuellement) de la zone d'hydrolyse obtenu par *Aspergillus Niger* est plus important que celui obtenu par *Penicillium Sp*. Ces résultats coïncident avec l'étude menée par SALIU et SANI (2012) sur l'hydrolyse des engrais du maïs par les cellulases produite par *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* qui ont obtenu une zone d'hydrolyse de 30 mm par *Aspergillus Niger* et de 16mm par *Penicillium Decumbens*.

III-3-Développement des souches sur milieu liquide MW et hydrolyse de la cellulose en milieu liquide

La croissance des deux souches fongiques *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* est visualisée sur milieu liquide MW en utilisant comme source de carbone la cellulose avicel, par formation d'un mycélium et de spores à la surface du milieu où le voile mycélien d'*Aspergillus Niger* apparait plus dense que celui de *Penicillium sp*. Les deux figures suivantes montrent l'aspect des cultures après six jours d'incubation à 28°C pour les deux champignons. :

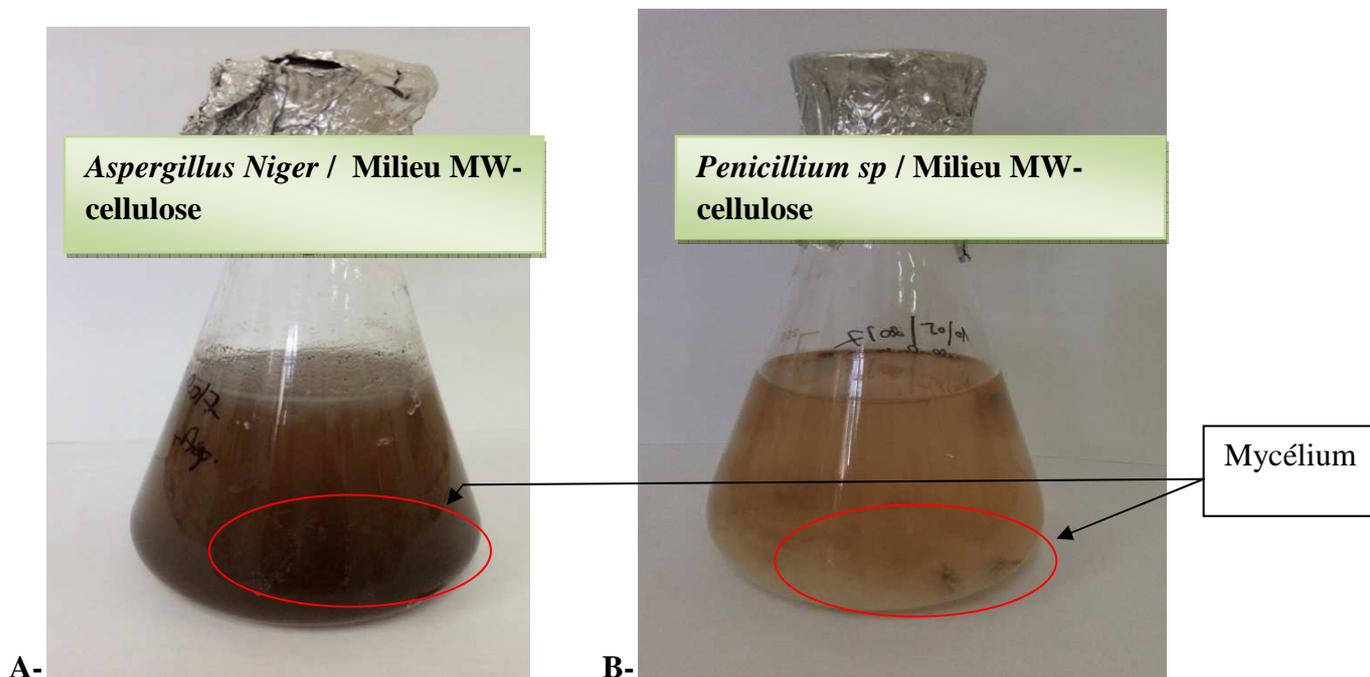


Figure 32 : Photographie de la culture des deux champignons, A : *Aspergillus Niger* et B : *Penicillium sp* en milieu liquide MW-cellulose.

Cette croissance confirme que le dérivé de cellulose (l'avicel) est bien dégradé par les deux souches. La production de protéines, contenus dans le surnageant après centrifugation des deux cultures et l'activité de la biodégradation de ce substrat par ces deux souches ont été mesurées par dosage de protéines et des sucres réducteurs libérés lors de la culture. Les résultats obtenus montrent que la souche fongique *Aspergillus Niger* donne une quantité plus importante en protéines avec une valeur de 115 $\mu\text{g/ml}$ comparée à celle obtenue par *Penicillium sp* qui correspond à 25 $\mu\text{g/ml}$ comme le montre la figure ci-dessous :

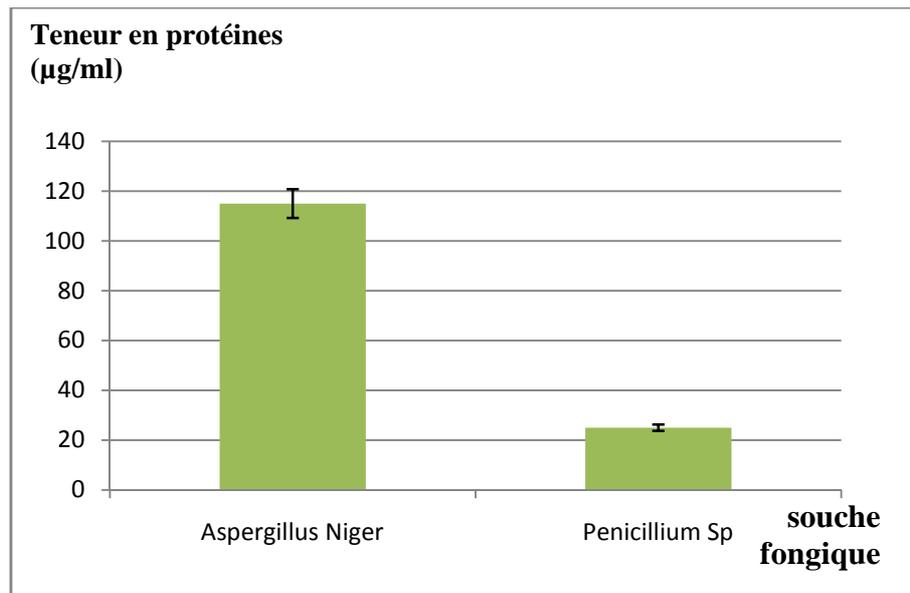


Figure 33 : Histogramme présentant la teneur en protéines des surnageant issus de la culture par les deux souches *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* sur milieu liquide MW

Les deux souches fongiques cultivées en milieu liquide MW ont donné des activités enzymatiques vis-à-vis de la cellulose en libérant du glucose, cette activité est montrée par le dosage des activités à différentes températures, les activités ont été beaucoup plus élevées en les comparant aux valeurs retrouvées dans les témoins négatifs comme le montrent les deux figures ci-dessous. La souche *Aspergillus Niger* présentant une température optimale d'activité à 50°C trouvée après l'étude des variations de la température a donné une activité de 0.168 U.ml^{-1} , supérieure à celle de *Penicillium sp* qui est de 0.96 U.ml^{-1} , à cette température. Par contre, la souche *Penicillium sp* a donné une activité maximale à 60°C avec une valeur de 0.128 U.ml^{-1} , qui est légèrement supérieure à celle donnée par *Aspergillus Niger* à cette température qui est de 0.106 U.ml^{-1} , cela est montré par les deux figures ci-dessous.

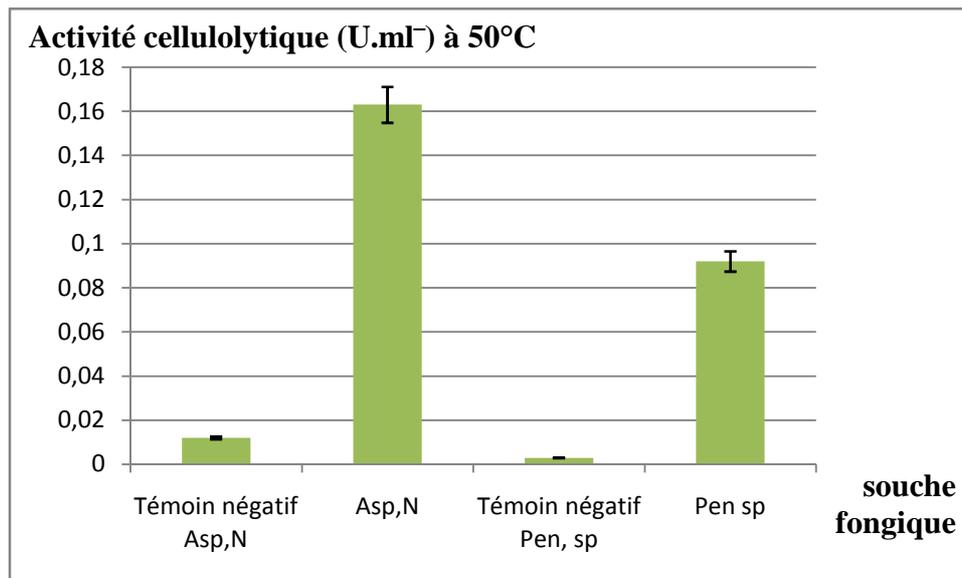


Figure 34 : Histogramme présentant l'activité cellulolytique d'*Aspergillus Niger* et de *Penicillium sp* à 50 °C.

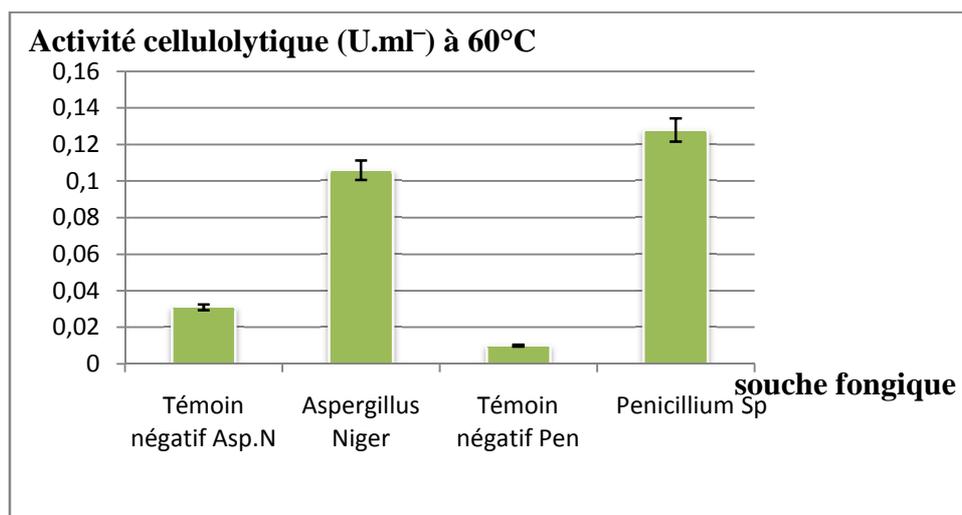


Figure 35 : Histogramme présentant l'activité cellulolytique d'*Aspergillus Niger* et de *Penicillium sp* à 60 °C

D'après ces résultats, la souche *Aspergillus Niger* présente une meilleure activité que *Penicillium sp* et dégrade mieux le substrat, ce qui correspond aux résultats de l'étude menée par SALIU et SANI (2012). En effet, ces derniers ont obtenu une activité de l'ordre de 0.1698 U.ml⁻¹ pour *Aspergillus Niger* plus élevée comparée que celle obtenue par *Penicillium Decumbens* qui était de 0.1111 U.ml⁻¹ à 50°C.

III-4-Recherche de l'activité cellulolytique des deux souches fongiques fermentées sur les trois sous produits agricoles avant et après prétraitement à la soude

Après six jours d'incubation à 28°C, les deux souches *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* se sont développées différemment sur les trois sous produits agricoles utilisés comme substrats.

La souche *Aspergillus Niger* s'est bien développée sur le grignon d'olive par apparition d'une quantité importante de spores où le grignon prend une couleur sombre (Figure 37). Par contre, ce champignon se développe moins sur le grignon d'olive traité à la soude (NaOH, 2N) où la quantité des spores est réduite, cela est peut être dû à l'alcalinité du milieu après le prétraitement, sachant que le pH optimum du champignon *Aspergillus Niger* est de 4,8.

La souche *Penicillium sp* a une faible croissance sur le grignon d'olive traité et non traité à la soude comme l'illustre la figure 38.

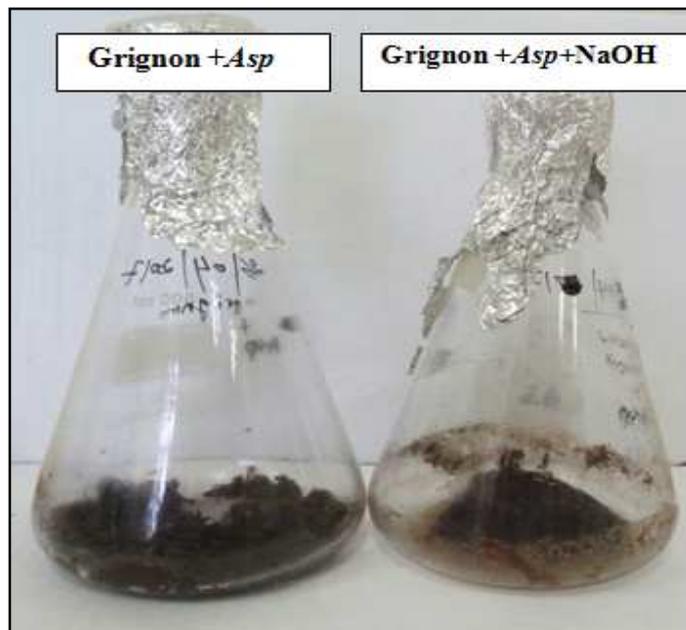


Figure 36 : Photographie de la culture d'*Aspergillus Niger* en fermentation à l'état solide sur grignon d'olive traité et non traité à la soude NaOH 2N.

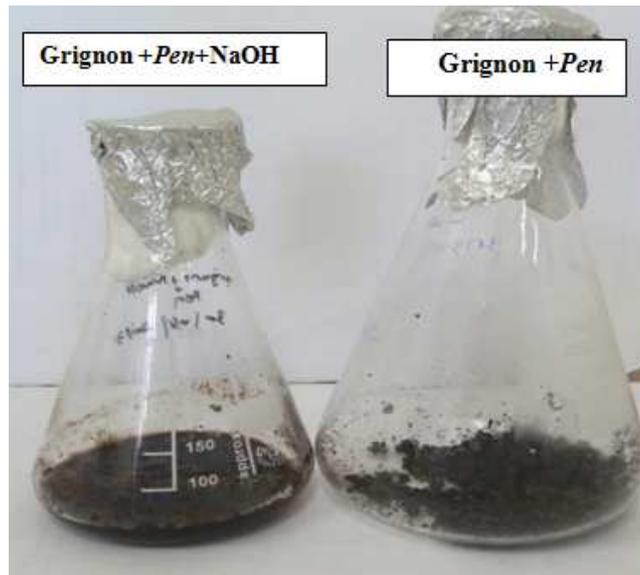


Figure 37 : Photographie de la culture de *Penicillium sp* en fermentation à l'état solide sur grignon d'olive traité et non traité à la soude (NaOH, 2N).

La photographie présentée dans la figure ci-dessous, montre le développement de la souche *Aspergillus Niger* sur la sciure de bois non traitée à la soude par apparition de spores qui donnent une couleur grisâtre au milieu, la croissance est moindre sur la sciure de bois traitée. Par contre, le développement de *Penicillium sp* sur la sciure de bois traitée et non traitée est faible (Figure 40).

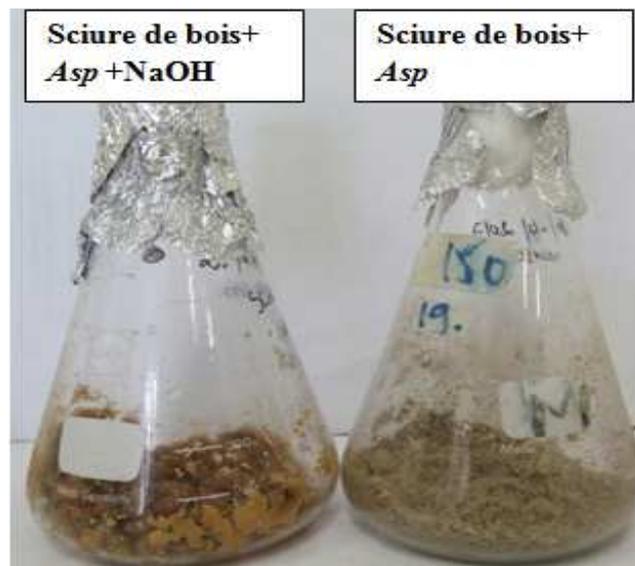


Figure 38 : Photographie de la culture d'*Aspergillus Niger* en fermentation à l'état solide sur la sciure de bois traitée et non traitée à la soude ((NaOH, 2N)

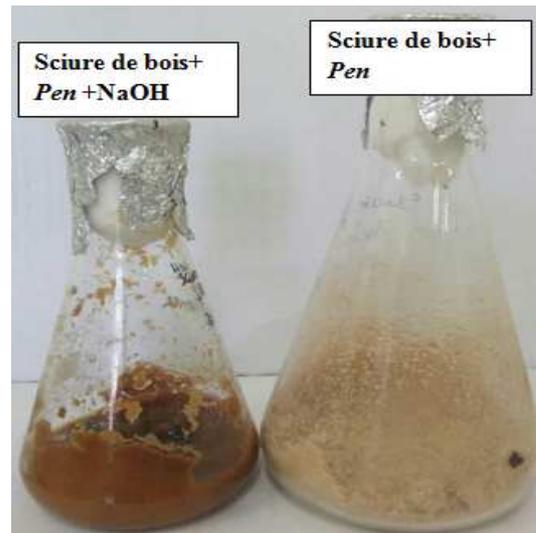


Figure 39 : Photographie de la culture de *Penicillium sp* en fermentation à l'état solide sur la sciure de bois traitée et non traitée à la soude (NaOH, 2N)

Les deux figures ci-dessous montrent que les deux souches *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* se développent bien sur les cladodes du figuier de barbarie par l'apparition d'un mycélium blanchâtre pour la souche *Penicillium sp* et une quantité importante de spores pour la souche *Aspergillus Niger* qui donnent une couleur noir, mais la croissance est moindre sur les cladodes traités à la soude.

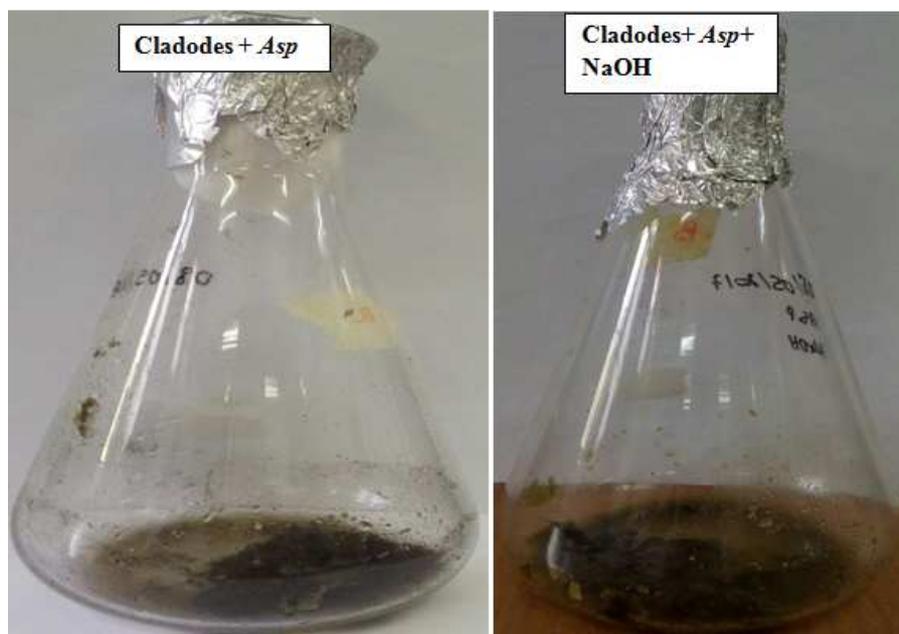


Figure 40 : Photographie de la culture d'*Aspergillus Niger* en fermentation à l'état solide sur les cladodes traités et non traités à la soude (NaOH, 2N).

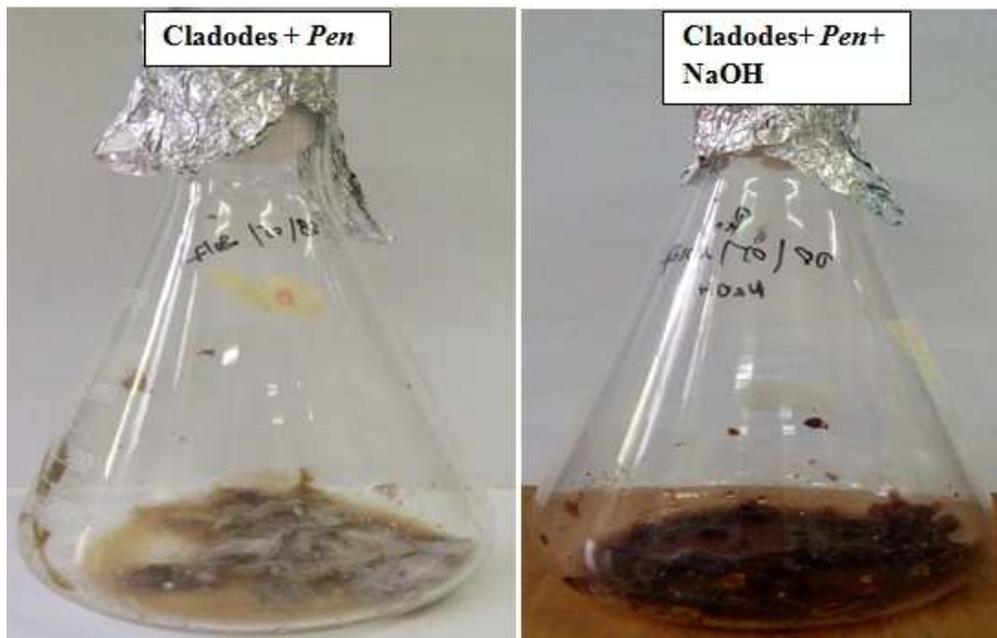


Figure 41: Photographie de la culture de *Penicillium sp* en fermentation à l'état solide sur les cladodes traités et non traités à la soude (NaOH, 2N).

III-4-1-Production d'enzymes cellulolytiques

L'activité enzymatique des deux souches et la quantité de protéines présente dans les extraits des cultures récupérés après centrifugation, ont été mesurées par dosage. La teneur en protéines diffère d'un extrait à un autre, elle varie selon la souche cultivée et la composition du milieu.

Le traitement à la soude influence sur la production de protéines. Après l'analyse statistique par le test de student pour deux échantillons appariés qui donne une p-value supérieure au risque d'erreur et la comparaison des moyennes, on déduit que le prétraitement influence négativement sur la production des protéines par *Aspergillus Niger*, contrairement à celle de *Penicillium sp* qui est influencée positivement sur tous les substrats avec une valeur maximale de 5250 $\mu\text{g/ml}$ notée pour les protéines produites sur le grignon d'olive alcalinisé avec NaOH (2N). Les résultats du dosage des protéines sont exprimés dans la figure suivante.

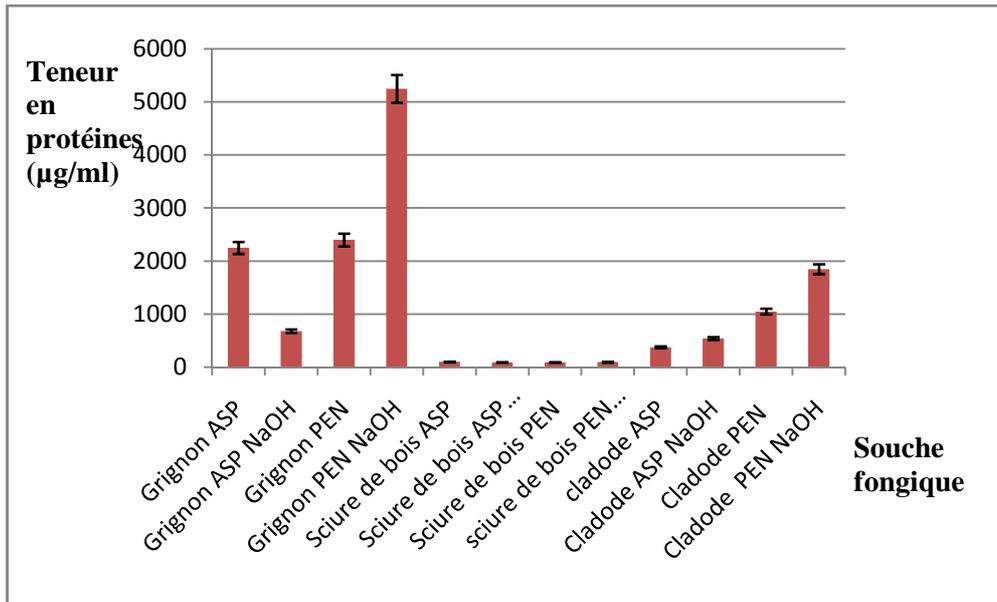


Figure 42 : Histogramme présentant la teneur en protéines des extraits obtenus à partir de la culture sur tous les substrats avant et après traitement.

D'après les résultats la fermentation à l'état solide sur le grignon d'olive donne le taux le plus élevé en protéines qui sont 2250 µg/ml, 2400 µg/ml et 5250µg/ml avec les deux souches fongiques, suivi par les cladodes du figuier de barbarie avec des valeurs de 540µg/ml 1850µg/ml, et en dernier la sciure de bois qui donne des taux très faibles en protéines qui sont de 100 µg/ml, 95 µg/ml et 90µg/ml. Il en ressort que les deux sous produits agricoles, cladodes et grignon, sont deux sources intéressantes pour la production des enzymes en fermentation à l'état solide avec les deux champignons *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp.*

Comparativement aux témoins, le prétraitement alcalin améliore l'activité enzymatique produite sur tous les extraits issus des deux souches. Cette amélioration souligne que, le prétraitement à la soude NaOH initie le processus de transformation de la cellulose I (native) en cellulose II (la cellulose cristalline la plus importante) qui est la mieux dégradée par les champignons selon KLEMM *et al* (2005). Ces résultats sont conclus à partir de l'analyse statistique par le test de student pour deux échantillons appariés ayant donné une p-value supérieure au risque d'erreur sélectionné.

D'après les résultats obtenus suite au dosage des activités enzymatiques et l'analyse statistique, le maximum d'activité est noté à 50°C avec la souche *Penicillium sp* cultivée sur les cladodes du figuier de barbarie prétraité à la soude avec une valeur de 0.246 U.ml⁻¹, suivi par une valeur de 0.202 U.ml⁻¹ avec *Aspergillus Niger* cultivée sur le grignon d'olive non

traité. A 60 °C, une activité maximale de 0.198 U.ml⁻¹ est notée pour *Penicillium sp* sur le grignon d'olive prétraité à la soude (NaOH, 2N).

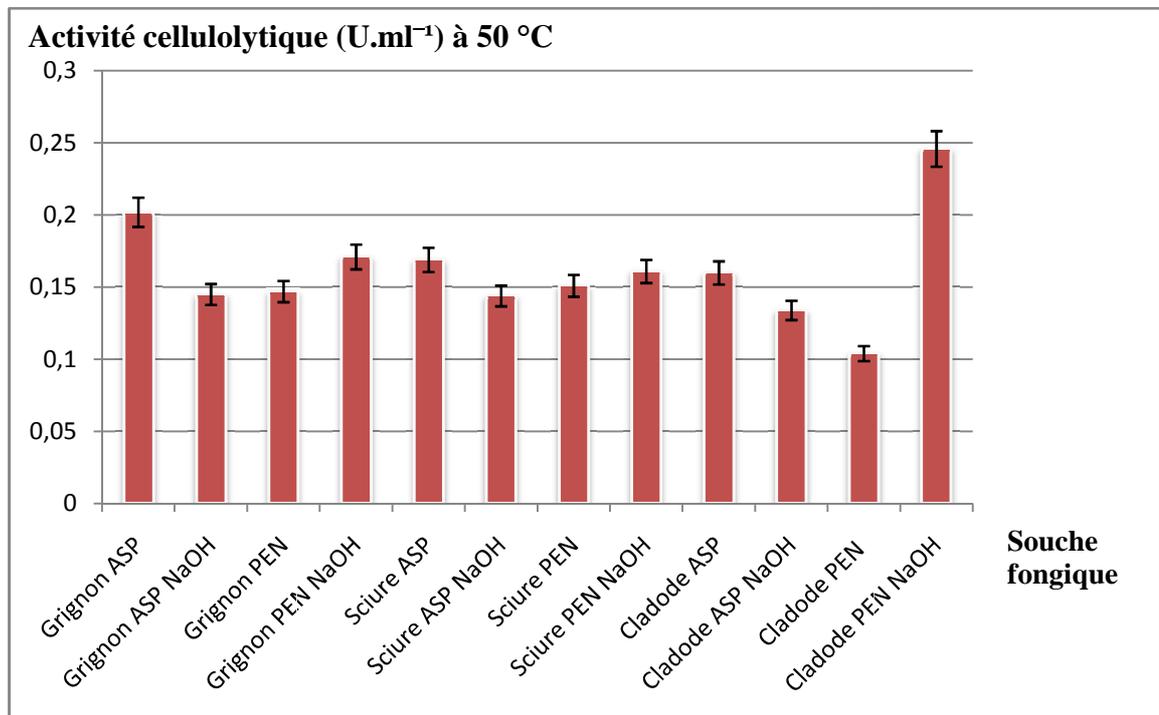


Figure 43 : Histogramme présentant l'activité cellulolytique d'*Aspergillus Niger* et de *Penicillium sp* cultivées sur tous les substrats avant et après prétraitement à 50 °C.

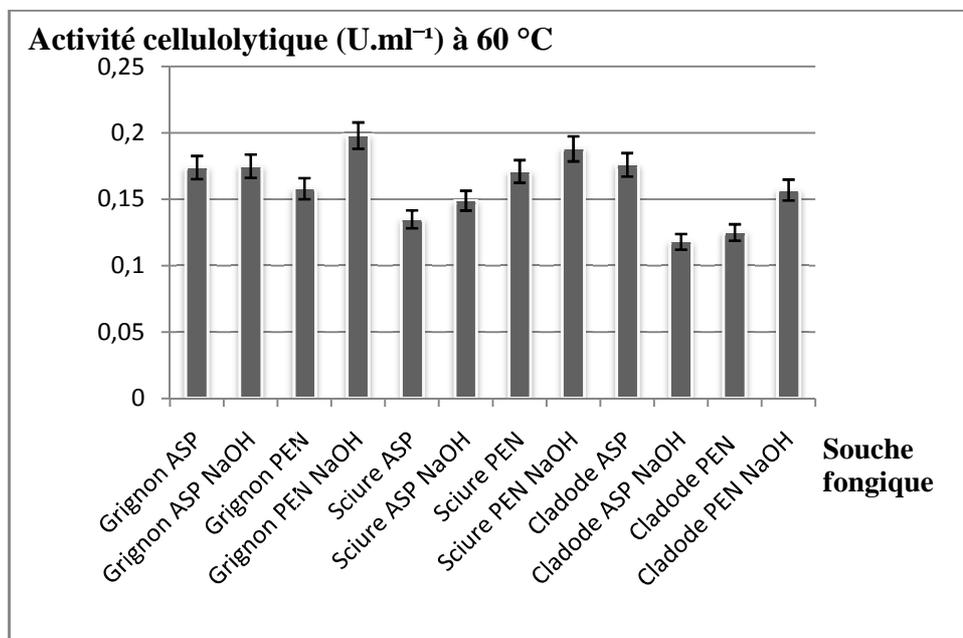


Figure 44 : Histogramme présentant l'activité cellulolytique d'*Aspergillus Niger* et de *Penicillium sp* cultivées sur tous les substrats avant et après prétraitement à 60 °C.

Le prétraitement alcalin à la soude (NaOH, 2N) améliore l'activité enzymatique, cela concorde avec l'étude réalisée par ACHARYA *et al*, (2008) qui ont travaillé sur l'optimisation de la production des cellulases par *Aspergillus Niger* en utilisant des sous produits agricoles. Ces auteurs ont trouvé que le prétraitement par NaOH, 2N donne de meilleurs résultats.

III-4-2-L'étude des variations de la température

Les dosages des activités enzymatiques ont été réalisés pour tous les extraits à différentes températures 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, et 80°C, dans le but de trouver la température optimale des deux souches fongiques où l'activité enzymatique peut atteindre son maximum, les résultats du dosage de l'activité enzymatique sont présentés dans la figure ci-dessous.

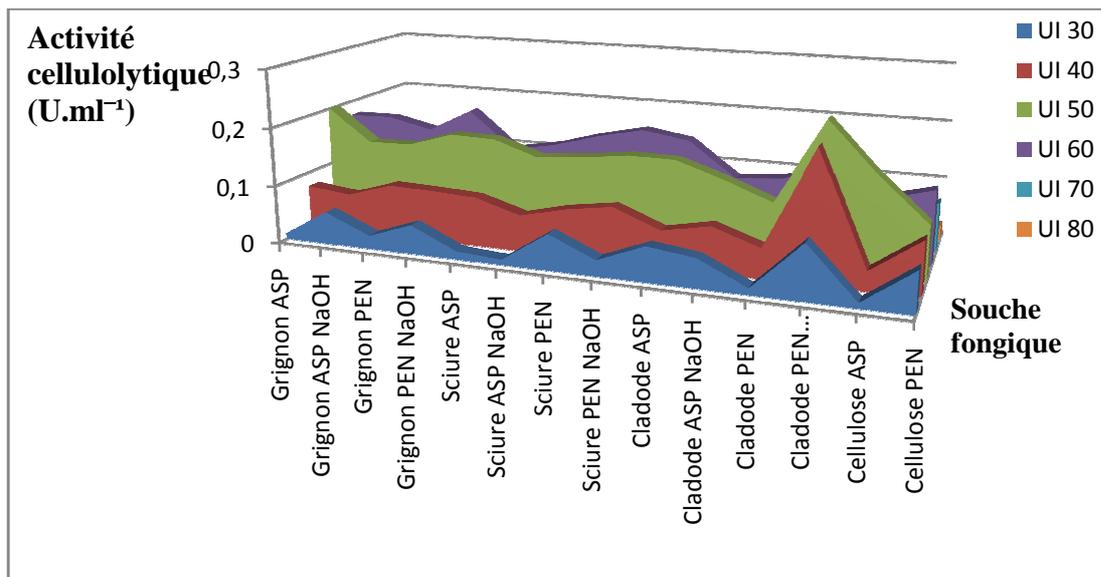


Figure 45: Graphe en aire 3D représentant les activités enzymatiques en fonction des variations de température.

Les résultats montrent bien que les enzymes issues des deux souches : *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* sont plus actives à 50°C et 60°C respectivement, car l'activité enzymatique atteint son maximum à ces deux températures. L'étude réalisée par PICART *et al* (2007) approuve ces résultats car ils ont trouvé que l'activité cellulolytique de *Penicillium Sp* est optimale à 65°C. Une température optimale à 50 °C pour l'activité enzymatique de la souche *Aspergillus Niger* est aussi signalée par SALIU et SANI (2012).

Les deux champignons *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* présentent des températures optimales d'activité à 50°C et 60 °C trouvées après l'étude des variations de la température. Les deux tests statistiques de student pour deux échantillons indépendants et deux échantillons appariés pour les deux souches à 50°C et à 60°C a donné des p-value supérieures au risque d'erreur et montrent qu'*Aspergillus Niger* présente un maximum d'activité à 50°C, alors que *Penicillium sp* à 60°C.

III-5-Influence de la culture d'*Aspergillus Niger* sur la matière sèche totale des deux sous produits agricoles : le grignon d'olive et les cladodes du figuier de barbarie

Les résultats de la mesure de la matière sèche du grignon d'olive et des cladodes du figuier de barbarie avant et après culture sont montrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XI : Matière sèche totale du grignon d'olive et des cladodes avant et après culture

Matière sèche	Avant culture	Après culture
Grignon d'olive	83,2%	79%
Cladodes	11,5%	5,44%

Le test statistique de student pour deux échantillons appariés a donné une p-value inférieure au risque d'erreur sélectionné, donc la culture d'*Aspergillus Niger* sur ces deux sous-produits agricoles possède un effet de dégradation du substrat, le grignon d'olive étant dégradé après culture à 5,5% et les cladodes à 52,7%.

III-6-Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS des différents extraits de culture des deux souches

Dans le but de confirmer la présence et de déterminer le PM de cellulases dans les extraits de cultures fongiques, on a procédé à une analyse par électrophorèse PAGE-SDS de quelques lyophilisats des extraits ayant donné une concentration élevée en protéines.

Le contrôle électrophorétique a donné le profil suivant qui révèle la présence d'une bande de 45.5KDa et des bandes de 48KDa ; 45,5KDa ; 33KDa ; 31,6KDa ; 21,7KDa ; 19,5KDa, 18,8KDa pour les deux extraits issus de la culture d'*Aspergillus Niger* sur grignon d'olive et sur grignon d'olive alcalinisé respectivement et des bandes de 48,4KDa ; 48KDa ; 33.5KDa; 30,3KDa et 19KDa pour le témoin *Aspergillus Niger* cultivé sur milieu liquide MW.

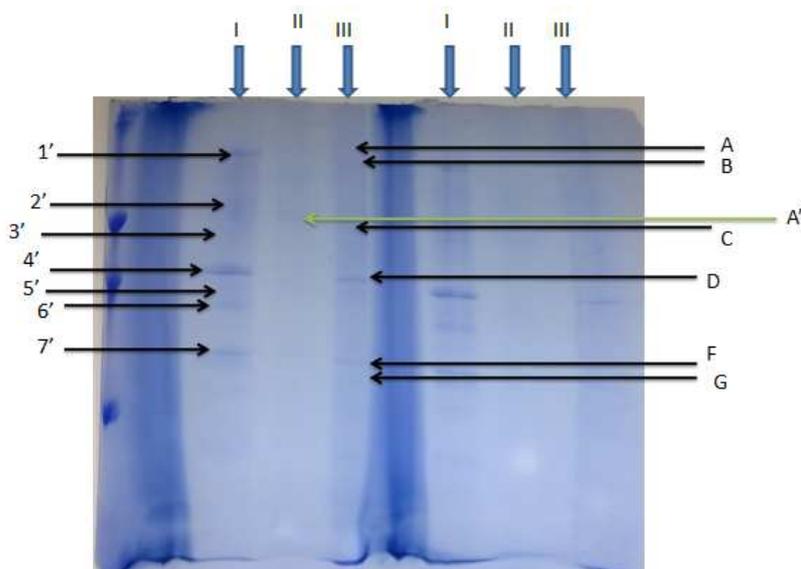


Figure 46 : Profil électrophorétique de quelques extraits. (Légende présentée dans le tableau ci-dessous)

Tableau XII : légende de la figure 46

I	II	III
Grignon ASP NaOH	Grignon ASP	Cellulose ASP
1'-48kDa	A'-45,6kDa	A-48,4kDa
2'-45,5kDa		B-48kDa
3'-33kDa		C-33,5kDa
4'-31,6kDa		D-30,3kDa
5'-21,7kDa		E-19kDa
6'-19,5kDa		
7'-18,8kDa		

Les bandes de 21,7KDa ; 30,3KDa ; 33KDa et de 45,5KDa peuvent bien correspondre à des cellulases selon le travail de NCUBE *et al* (2012) où ils ont réalisé un zymogramme pour mettre en évidence la présence d'enzymes à activité cellulolytique, ont trouvé six bandes actives de 20KDa à 43KDa qui sont des cellulases, et sur notre profil on voit la présence d'une bande de 31,6KDa qui selon les même auteurs peut correspondre à une xylanase, cela peut être confirmé aussi par le profil électrophorétique et du zymogramme préalablement réalisé dans le travail de ATTEK et BENOUALI (2016) sur la mise en évidence des activités cellulolytiques, xylanolytiques avec la même souche. Leurs résultats sont présentés par les profils ci-dessous.

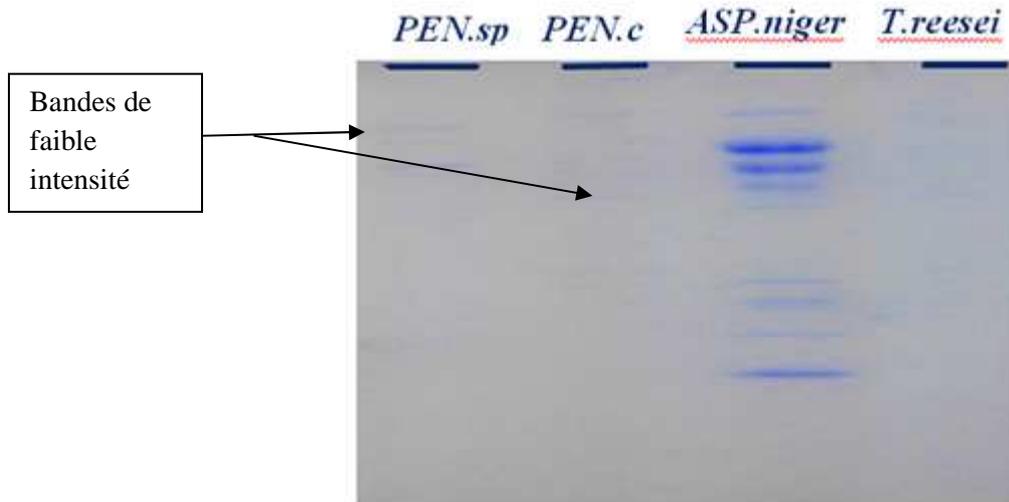


Figure 47 : Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur du xylane (ATTEK et BENOUALI, 2016).

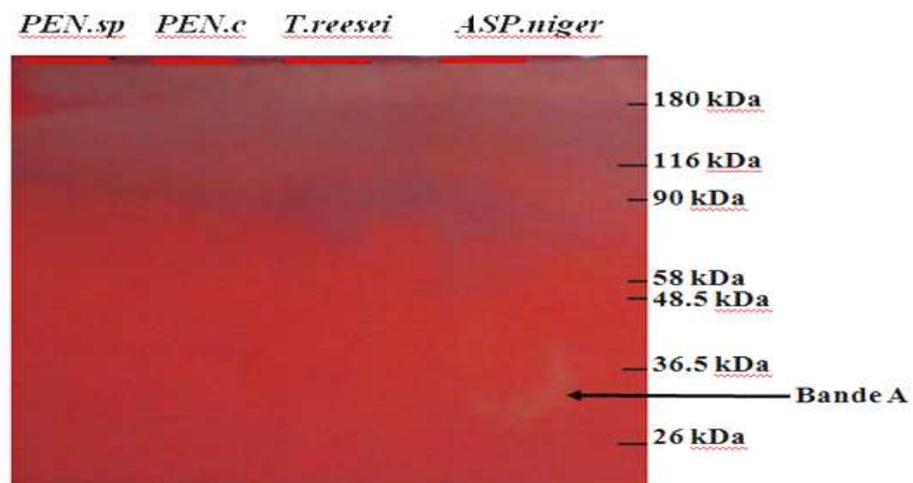


Figure 48 : Zymogramme de xylanase en conditions dénaturantes (SDS) (ATTEK et BANOUALI, 2016).

La bande A qui représente une zone de dégradation de xylane correspond à un poids moléculaire de 31,6KDa (ATTEK et BENOUALI, 2016), qui est égal à celui de la bande trouvée sur le profil électrophorétique du présent travail.

Les bandes de 33KDa et 48KDa peuvent aussi correspondre à des cellulases suivant les résultats du travail de SHANMUGAPRIYA *et al* (2012) et celui de SUN *et al* (2008) qui ont trouvé une cellulase de 45KDa. Selon le travail réalisé par ATTEK et BANOUALI (2016), des bandes de 39,8 kDa et 36,5 kDa sont obtenues pour l'extrait de la culture d'*Aspergillus Niger* en milieu liquide MW contenant la cellulose avicel, les résultats

sont présentés dans le profil électrophorétique ci-dessous, ces bandes sont proches de celles obtenues par notre analyse électrophorétique.

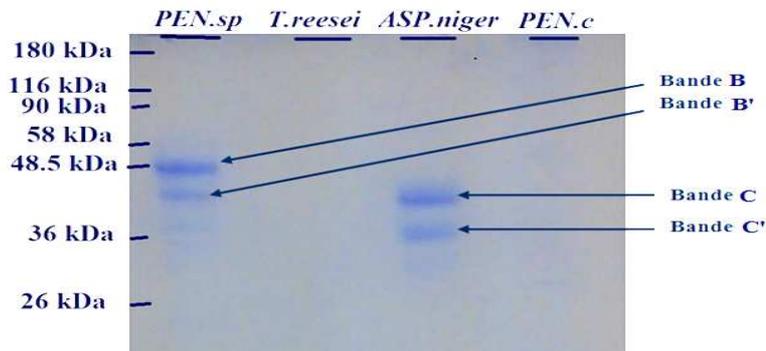


Figure 49 : Profil électrophorétique en SDS-PAGE avec β -ME des protéines du surnageant obtenu après culture sur l'avicel. (Alpha 2 macroglobuline from equine serum : 180 kDa ; β -galactosidase from *E.Coli* : 116 kDa ; Lactoferrin from humain milk : 90 kDa ; Pyruvate kinase (rabbit muscle) : 58 kDa ; Fumarase (porcine heart) (ATTEK et BANOUALI, 2016).

III-7-Recherche d'activités cellulolytiques

Un zymogramme a été réalisé durant notre travail afin de mettre en évidence la présence d'enzymes à activité cellulolytique et une PAGE-SDS est réalisée en parallèle pour trouver le poids moléculaire des enzymes actives. Les deux profils ci-dessous montrent les résultats obtenus :

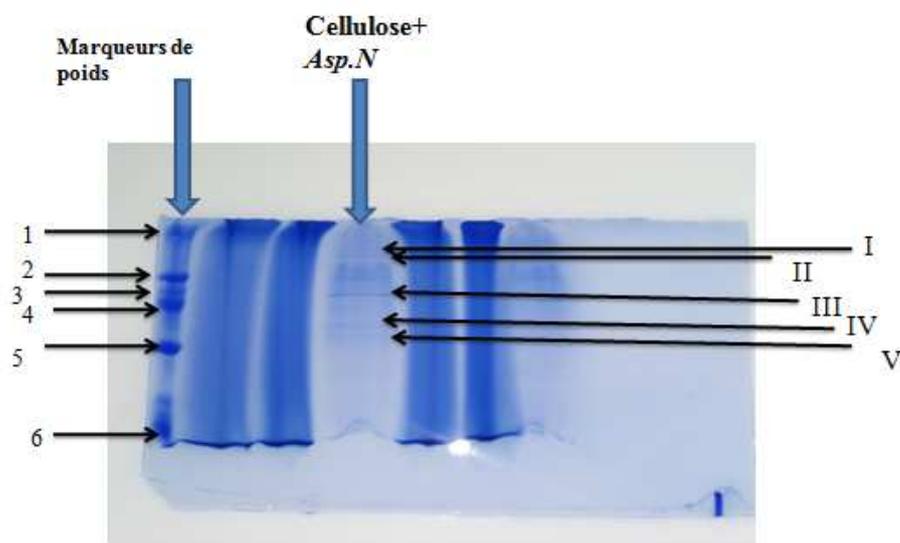


Figure 50: Profil d'une PAGE-SDS de l'extrait lyophilisé de cellulose avicel (légende présentée dans le tableau ci-dessous).

Tableau XIII : Légende de la figure 50

Marqueurs de poids	Cellulose+ <i>Asp.N</i>
1-14KDa	I-20,98KDa
2-18KDa	II-28,09KDa
3-23KDa	III-30,54KDa
4-45KDa	IV-40,88KDa
5-67KDa	V-54,73KDa

Le profil de cette PAGE présente des bandes bien visibles pour le lyophilisat issu de la culture d'*Aspergillus Niger* en milieu liquide MW/cellulose avec des poids moléculaires de 20,98KDa, 28,09KDa, 30,54KDa et de 40,88KDa, ces derniers peuvent bien correspondre à des cellulases, donc la souche *Aspergillus Niger* est une souche productrice d'enzymes cellulolytiques.

Le zymogramme réalisé ne montre pas de zones claires qui présentent une activité cellulolytique.



Figure 51 : Profil du zymogramme réalisé.

III-8-Dosage des polyphénols du grignon d'olive et des cladodes avant et après fermentation par *Aspergillus Niger*

Les résultats des dosages sont représentés dans la figure suivante :

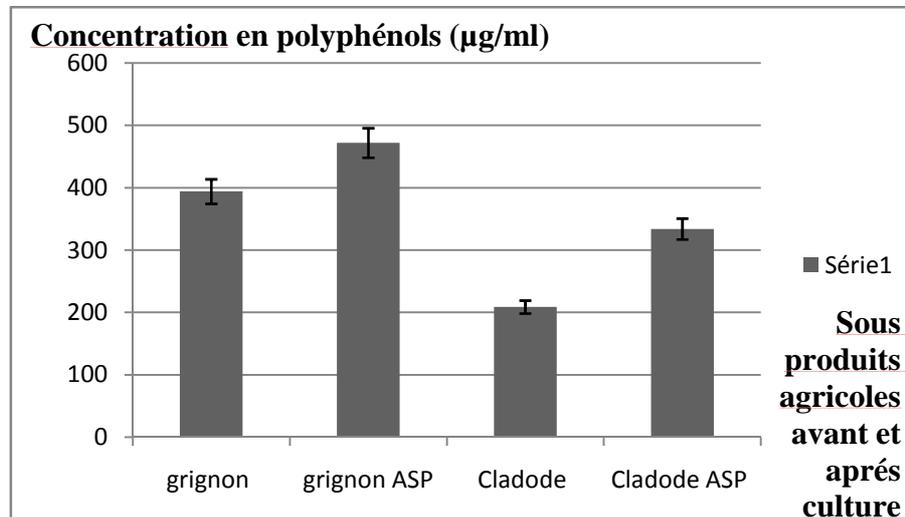


Figure 52 : Histogramme montrant les concentrations des polyphénols des grignons et des cladodes avant et après culture.

Ces résultats montrent que le grignon d'olive et les cladodes sont riches en composés phénoliques, comme le montre les résultats de deux études réalisées par ZAIDI *et al* (2009) et BOUTAKIOUT (2015), sur le grignon d'olive et les cladodes du figuier de barbarie respectivement.

Après une analyse statistique des résultats des dosages par le test de student pour deux échantillons appariés, on a obtenu une p-value supérieure au risque d'erreur proposé (5%). Il a été constaté que la fermentation par *Aspergillus Niger* a un effet sur la teneur en polyphénols, cette fermentation augmente les concentrations des polyphénols qui sont de 394 µg/ml et 208.8 µg/ml pour le grignon et les cladodes respectivement avant fermentation qui augmentent jusqu'à 471 µg/ml et 334 µg/ml.

D'après ZAIDI *et al* (2009), une fraction importante de composés phénoliques solubilisés par les solvants sont fortement liés à la cellulose soit 2/3 des composés phénoliques totaux, donc cette augmentation des concentrations après culture peut être due à la libération des polyphénols liés à la cellulose ou autre types de polysaccharide ou encore de lipides suite à leur dégradation par des cellulases, lipases, estérases ou autres glucanases produites par le champignon *Aspergillus Niger*.

III-9-Activité anti-oxydante de composés phénoliques extraits à partir du grignon d'olive et des cladodes avant et après fermentation par *Aspergillus Niger*

Les tests de l'activité anti-oxydante ont été effectués par le DPPH sur les extraits des polyphénols obtenus à partir du grignon d'olive et des cladodes du figuier de barbarie, avant et après fermentation par le champignon *Aspergillus Niger*. Une courbe de référence avec l'acide ascorbique a été réalisée. Ce dernier donne une concentration inhibitrice de $80\mu\text{g/ml}$ (CI 50= $80\pm 1,38\mu\text{g/ml}$). Les résultats obtenus à partir des extraits des sous produits ont donné des activités antioxydantes et des concentrations inhibitrices exprimées dans les figures suivantes.

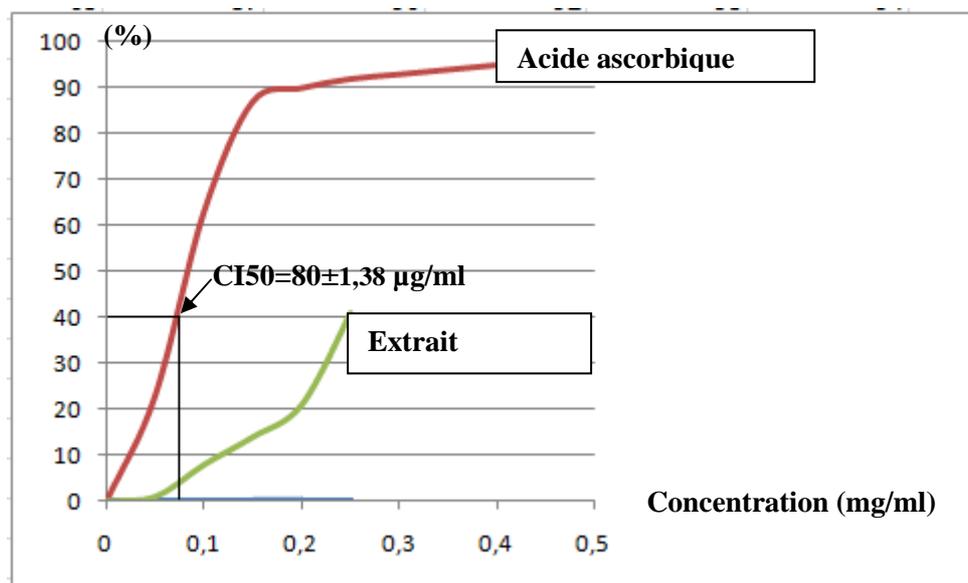


Figure 53 : Courbes représentant l'activité anti-oxydante des polyphénols extraits à partir du grignon d'olive et de l'acide ascorbique comme courbe de référence.

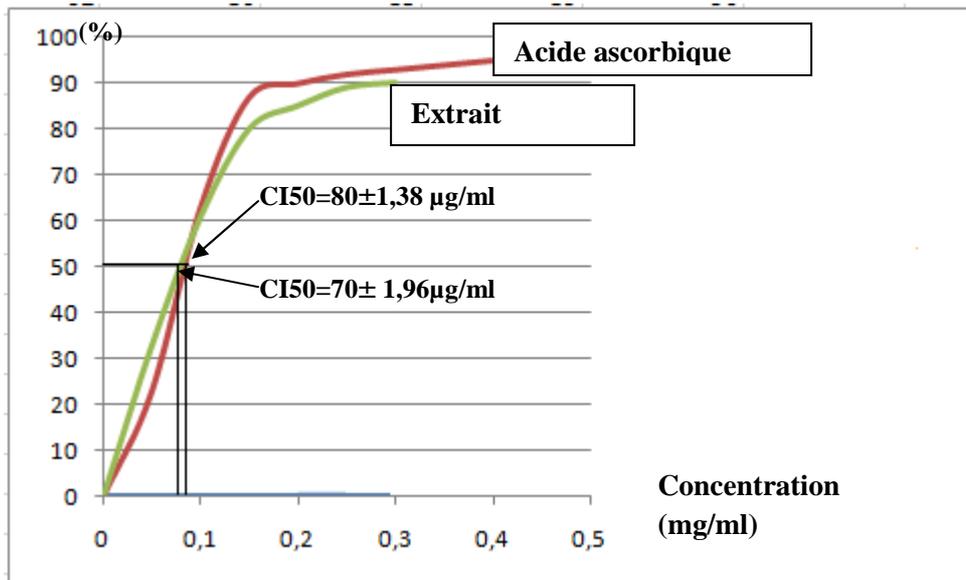


Figure 54 : Courbes représentant l'activité anti-oxydante des polyphénols extraits à partir du grignon d'olive fermenté par *Aspergillus Niger* et de l'acide ascorbique.

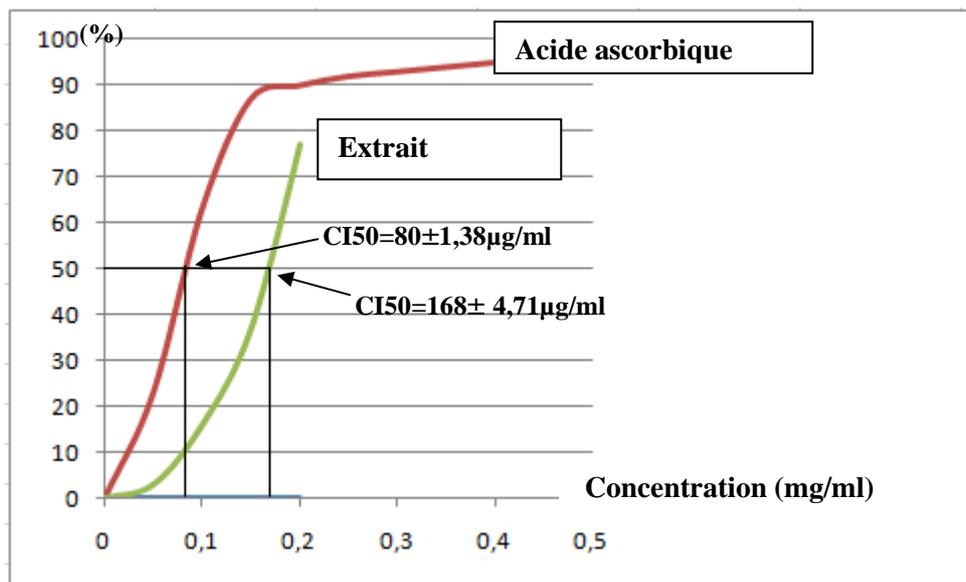


Figure 55 : Courbes représentant l'activité anti-oxydante des polyphénols extraits à partir des cladodes et de l'acide ascorbique comme courbe de référence.

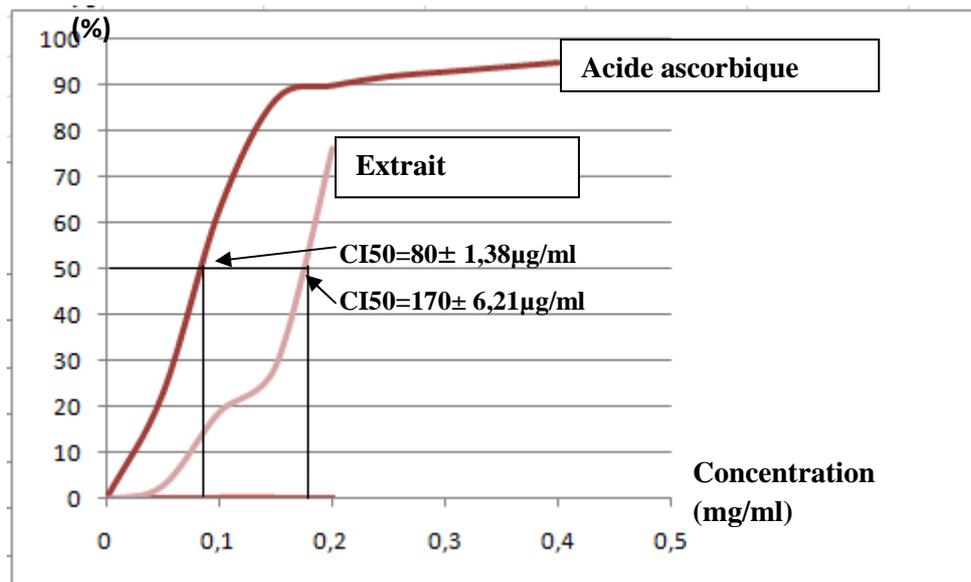


Figure 56 : Courbes représentant l'activité anti-oxydante des polyphénols extraits à partir des cladodes fermentés par *Aspergillus Niger* et de l'acide ascorbique comme courbe de référence.

L'activité anti-oxydante et les concentrations inhibitrices diffèrent d'un extrait à un autre, l'extrait issu du grignon non fermenté donne de faibles activités anti-oxydantes, car la réaction antioxydante est très lente, elle n'atteint pas les 50% d'inhibition nécessaires pour le piégeage des radicaux libres du DPPH, contrairement à celui du grignon fermenté par *Aspergillus Niger* qui donne une meilleure concentration inhibitrice avec une valeur de $CI_{50}=70 \pm 1,96 \mu\text{g/ml}$, qui est proche de celle de l'acide ascorbique ce qui est peut-être dû selon ZAIDI *et al* (2009) à la libération des polyphénols liés à la cellulose après production de cellulases par *Aspergillus Niger*. La valeur CI_{50} de l'extrait des cladodes non fermentés est presque égale (la différence n'est pas significative statistiquement) à celle de l'extrait des cladodes fermentés par *Aspergillus Niger* avec des concentrations inhibitrices de $CI_{50}=168 \pm 4,71 \mu\text{g/ml}$ et $CI_{50}=170 \pm 6,21 \mu\text{g/ml}$ respectivement, ces deux extraits donnent des pouvoirs antioxydants relativement faibles que celui de l'acide ascorbique, ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par HALMI (2015) ($CI_{50}=292 \mu\text{g/ml}$) sur une étude menée sur l'approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus indica*.

Conclusion

Ce travail avait pour objectif de valoriser quelques sous produits agricoles qui se présentent en abondance dans notre région : le grignon d'olive, les cladodes du figuier de barbarie et la sciure de bois, en particulier le grignon d'olive qui représente une grande quantité de déchets néfastes pour l'environnement d'où la nécessité de sa valorisation.

Au cours de cette étude ces sous produits agricoles ont été utilisés comme substrats pour la culture de deux champignons filamenteux : *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp*, dans le but de produire des enzymes à activité cellulolytique qui sont des enzymes recherchées dans diverses industries. Ces deux champignons filamenteux montrent qu'ils dégradent la cellulose après leur culture sur milieu solide Mendel et Weber contenant la cellulose avicel, en utilisant le rouge Congo comme indicateur de la dégradation.

Les résultats obtenus après dosage des protéines et d'activités enzymatiques des extraits brutes issus des différentes fermentations, montrent que des sous produits prétraités à la soude (NaOH) donnent de meilleurs résultats pour la plupart des cultures en les comparant à ceux non traités. En effet, le NaOH exerce son effet sur la cellulose en initiant le processus de sa transformation de l'état natif à l'état cristallin où la cellulose est la mieux dégradée par les champignons.

Après l'étude des variations de la température lors du dosage de l'activité enzymatique, les deux souches fongiques *Aspergillus Niger* et *Penicillium sp* présentent des activités cellulolytiques maximales de 0,202 UI.ml⁻¹ et 0,198 UI.ml⁻¹ respectivement à des températures différentes, qui sont : 50°C pour la souche *Aspergillus Niger* 60°C pour la souche *Penicillium sp*.

Pour la mise en évidence de la présence de cellulases dans les extraits obtenus, ces derniers sont soumis à un contrôle électrophorétique dans des conditions dissociantes et dénaturantes. Le profil obtenu a révélé la présence de plusieurs bandes pour l'extrait grignon d'olive prétraité à la soude et fermenté par le champignon filamenteux *Aspergillus Niger*, et pour l'extrait du témoin *Aspergillus Niger* sur milieu liquide Mendel et Weber (MW). Les bandes au poids moléculaires de 21,7KDa ; 30,3KDa ; 33,5KDa et de 48,4KDa peuvent correspondre à des cellulases en se référant à des travaux réalisés sur cette enzyme. On peut conclure que le grignon d'olive peut être utilisé comme un bon substrat pour la production de cellulases et de xylanases.

La caractérisation des sous produits agricoles utilisés est réalisée par la mesure de leur teneur en matière sèche et en cendres, puis à une extraction des composés phénoliques à partir du grignon d'olive et les cladodes du figuier de barbarie avant et après fermentation par la souche *Aspergillus Niger*, les résultats du dosage montrent que ces deux sous produits sont riches en composés phénolique. L'activité anti-oxydante de ces derniers effectuée par le test au DPPH révèle des résultats satisfaisants notamment pour les polyphénols extraits du grignon d'olive après fermentation par le champignon *Aspergillus Niger* qui a donné une concentration inhibitrice de $70 \pm 1,96 \mu\text{g/ml}$, et ceux des cladodes non fermentés et fermentés par *Aspergillus Niger* avec des valeurs presque similaires qui sont de $168 \pm 4,71 \mu\text{g/ml}$ et de $170 \pm 6,21 \mu\text{g/ml}$ respectivement.

Les résultats obtenus par ce travail ouvrent d'autres perspectives qui consistent à l'augmentation de la quantité du substrat, la taille de l'inoculum et le temps de fermentation pour l'optimisation de la production de cellulases. Il serait aussi intéressant de procéder à la purification des enzymes ainsi qu'à l'analyse des polyphénols par des méthodes biochimiques performantes.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1-ACHARYA P B, ACHARYA D K and MODI H A. (2008). Optimization for cellulase production by *Aspergillus Niger* using sawdust as substrate African Journal of Biotechnology. 7. (22). 4147-4152.

2-ATKINS E. (1992). Three-dimensional structure, interactions and properties of xylans, Progress in Biotechnology. (Xylans Xylanases). 39-50.

3-ATTEK Y., BENOUALI Y.(2016). Mise en évidence des activités cellulolytiques, xylanolytique et amylolytique issues de différentes souches fongiques .Mémoire de fin d'étude. Université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Algerie.

4-BEG K., KAPOOR M., MAHAJAN L., HOONDAL G S.(2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology.(56). 326–338.

5-BEGUIN P and AUBERT J.P. (1994). The biological degradation cellulose. FEMS (Federation of European Microbiological Societies). Microbiology Reviews. 13. 25-58.

6-BENHAMOU K. (2016). Extraction de nanofibrilles de cellulose à structure et propriétés contrôlées : caractérisation, propriétés rhéologiques et application nanocomposites. Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes, France.

TATEB (2014).

7-BENYOUCEF S et HARRACHE DJ. (2015) Caractérisation de la microstructure de sciure de bois de pin sylvestre "*Pinus sylvestris*" [Microstructure characterization of scots pine "*Pinus sylvestris*" sawdust] J. Mater. Environ. Sci. 6. (3). 765-772.

8-BHAT M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in Biotechnology. Biotechnol Adv. 18, 355-383

9-BIELY P., PULS J., SCHNEIDER H. (1985). Acetyl xylan esterases in fungal xylanolytic systems. *FEBS. Lett.* 186.80-84.

10-BONNIN E., SAULNIER L., BRUNEL M., MAROT C., LESAGE-MEESSEN L., ASTHER M and THIBAUT J F. (2002). Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme and Microbial Technology*. 31. (7), 1000–1005

11-BOONMAK C., LIMTONG S., JINDAMORAKOT S., AMIN S., YONGMANITICHAI W., SUZUKI K I., Nakase T., Kawasaki H.(2010). *Candida xylanilytica* sp. Nov a xylan degrading yeast species isolated from Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. (61), 1230–1234.

12-BOUTAKIOUT A. (2015). Etude physico-chimique, biochimique et stabilité d'un nouveau produit : jus de cladode du figuier de Barbarie marocain (*Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha*). Thèse Doctorat. *Université de Sultan Moulay Slimane*. Béni Mellal. Maroc.

13-CHESSON A. (1987). Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: Hresign W, Cole DJA, editors. *Recent Advances in Animal Nutrition*. London. UK. 71-89.

14-CHEYNIE R. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 81. 223S–229S.

15-CHOUCHE A. (2010). Etude expérimentale et théorique de procédés de valorisation de sous-produits oléicoles par voies thermique et physico-chimique. Thèse doctorat. Université de Haute Alsace – Mulhouse. France.

16-COLLINS T., GERDAY C., FELLER G.(2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol Rev*. (29). 3-23.

17-CROZIER A., CLIFFORD M N and ASHIHARA H. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In : CROZIER A., CLIFFORD M N., ASHIHARA H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* Blackwell Publishing Ltd. UK. 1-22.

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

- 19- HENRISSAT B., DAVIES G.** (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3: 853-859.
- 20-DE VRIES R P and VISSER J.** (2001). *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *MMBR*.65. (4).497–522.
- 21-EGBUTA M A., MWANZA M and BABALOLA O O.** (2017). Health Risks Associated with Exposure to Filamentous Fungi. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14, 719.
- 22-EL GHARRAS H.** (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 2512–2518.
- 23-ELOUMI A., BOUZIDI M., BELGHITH H., LACOSTE C et BRADAI C.** (2016). Potentiel des traitements enzymatiques de la sciure de bois sur le comportement des composites bois / PEHD. VIIIème Journées d’Etudes Techniques Hammamet, Tunisie.
- 24-EL-SAYED S. ABDEL-HAMEED A B., MOHAMED A., NAGATY C, MAHMOOD S., SALMAN A, SALIH A and BAZAID A.** (2014). Phytochemicals, nutritional and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chemistry*. 160. 31–38.
- 25-GABERIEL P .**(2005). Etude Structure /fonction d’hemicellulases thermostables : la xylanase GH-II et l’arbinofuranosidase GH-51 de *Thermobacillus xylanilyticus*. These de Doctorat. Universite de Reims Champagne- Ardenenne.France.
- 26-GOPALAN N and NAMPOOTHIRI K M.** (2016). Biotechnological Production of Enzymes Using Agro-Industrial Wastes: Economic Considerations, Commercialization Potential, and Future Prospects In : *DHILLON S G.,KAUR S.* Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (NIIST), Trivandrum, India
- 27-GUSAKOV A.V., SINITSYN A.P., MARKOV A V., SKOMAROVSKY A.A., SINITSYNA O.A., BERLIN A.G and ANKUDIMOVA N.V.** (2000). Indigo-binding domain in cellulase molecule. *Biocatalysis fundamantals and applications*. 11. (6).77-80.

28-HABIBI Y. (2004) : Contribution à l'étude morphologique, ultra structurale et chimique de la figue de barbarie. Les polysaccharides pjarétaux : caractérisation et modification chimique ; thèse doctorat. Université Joseph Fourier et Université Cadi Ayyad.

29-HALENG J., PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J.O., CHARLIER C et CHAPELLE J P. (2007). Le stress oxydant. Rev Med Liege. 62. (10). 628-638

30-HALTRICH D, NIDETZKY B, KULBE K D, STEINNER W, ZUPANCIC S.(1996). Production of fungal xylanases. Bioresource Technology.(58).137–161.

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

32-HOCQUETTE A., GRONDIN M., BERTOUT S et MALLIE M. (2005). Les champignons des genres *Acremonium*, *Beauveria*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scedosporium* et *Scopulariopsis* responsables de hyalohyphomycoses *Acremonium*, *Beauveria*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scedosporium* and *Scopulariopsis* fungi responsible for hyalohyphomycosis. Journal de Mycologie Médicale. 15 136–149.

33- HURST , PAUL L., JAN NIELSEN, PATRICK A. SULLIVAN MAXWELL G and SHEPHER D. (1977). Purification and Properties of a Cellulase from *Aspergillus niger* Enzyme Research

34-JENG W Y., WANG N C., LIN M H., LIN C T., LIAW Y C., CHANG W J., LIU C I., LIANG P H and WANG A.H.J. (2011). Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. Journal of Structural Biology.173, 46–56.

35-JOHSY G and SABAPATHI S.N. (2015) : Cellulose nanocrystals : synthesis, functional properties, and applications. Nanotechnology, Science and Applications. 8, 45-54.

36-JOSHUA T., NAMARA M.C., JACOB., MORGAN and ZIMMER J. (2015) : A Molecular Description of cellulose Biosynthesis. Annual Review of Biochemistry. 84, 895–921.

37-JUTURU V and WU J C. (2014). Microbial cellulases : Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33. 188–203.

38-JUTURU V., WU C.(2014).Microbial cellulases: Engineering, production and applications.*Renewable and Sustainable Energy Reviews* 188-203.

39-JUTURU V., WU J C.(2011).Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications.*Biotechnology Advances*. 1220.1219-1227

40-KLEMM D., SCHMAUDER H P and HEINZE T. (2005). Cellulose. *Biopolymers Online*. 6 (10), 275-287

31-KO E P., AKATSUKA H., MORIYAMA H., SHINMOO A., HAYA Y., KATSUBE Y., URABE I.,OKADA H. (1992). Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus punilus*. *J.Biochem*. 288. 117-121.

42-KUHAD R C., GUPTA R and SINGH A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications *Review Article*. *Enzyme Research*.

43-LAU M.W., BALS B.D., CHUNDAWAT S.P., JIN M., GUNAWAN C., BALAN V and DALE B.E. (2012). An integrated paradigm for cellulosic biorefineries: utilization of lignocellulosic biomass as self-sufficient feedstocks for fuel, food precursors and saccharolytic enzyme production. *Energy & Environmental Science* 5. (5), 7100–7110

44-LEGHLIMI H.(2013).cellulase de souche fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales).selection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de doctorat. Université de Constantine 1.Algerie.

45-LEITE P., SALGADO J M., VENANCIO A., DOMINGUEZ J M and BELO I. (1977) Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation *Biochem. J.* 165, 33-41.

46-LEKCHIRI S., MOUEQQIT M et LEKCHIRI A. (2006). Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.

47-LESKINEN S., MANTYLA A., FAGERSTROM R., VEHMAANPERA J., LANTTO R., PALOHEIMO M., SUOMINEN P. (2005) .Thermostable xylanases, Xyn10A and Xyn11A, from the actinomycete *Nonomuraea flexuosa*: isolation of the genes and characterization of recombinant Xyn11A polypeptides produced in *Trichoderma reesei*. Appl Microbiol Biotechnol. (67). 495-505.

48-MARCHESSAULT R H., LIANG C Y. (1962).The infrared spectra of crystalline polysaccharides, VIII Xylans, J. Polym. Sci.(59). 357-378.

49-MARGEOT A., HAHN-HAGERDAL B., EDLUND M., SLADE R and MONOT F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. Current Opinion in Biotechnology. 20. 372–380.

50-MAZZA M. (2009). Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO₂ supercritique. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.France.

51-MELAININE M.E., DUFRENSE A., DUPEYE D., MAHROUZ R.V and VIGNON M.R. (2001) : Structure et morphologie des raquettes et des épines du figuier de barbarie. Phys. Chem. News. 4, 126-130.

52-MILALA M.A, SHUGABA A., GIDADO A., ENE A.C and WAFAR J.A. (2005). Studies on the Use of Agricultural Wastes for Cellulase Enzyme Production by *Aspegillus niger*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1. (4). 325-328.

53-MING W L., BRYAN D B., SHISHIR P S C., MINGJIE J., CHRISTA G., VENKATESH B., DANIEL A J and DALE B E. (2012). An integrated paradigm for cellulosic biorefineries: utilization of lignocellulosic biomass as self-sufficient feedstocks for fuel, food precursors and saccharolytic enzyme productionEnergy Environ. Sci. 5, 7100–7110.

54-MOHAN D., PITTMAN C U and STEELE P H. (2006). Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. *Energy & Fuels*. 20, 848-889.

55-MOINE C.(2005). Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicellulose du bois.(obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes).Thèse de doctorat.Université de Limoges.France.

56-MOOD S H., GOLFESHAN A H., TABATABAEI M., JOUZANI G S., NAJAFI G H., GHOLAMI M and ARDJMAND M .(2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 27. 77–93

57-MOURE A., CRUZ J M., D FRANCO., DOMINGUEZ J M., SINEIRO J., DOMINGUEZ H., NUNEZ M J and PARAJO J C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Review. Food Chemistry.*72. 145-171

58-MUNOZ I G., UBHAAYASEKERA W., HENRIKSSON H., SZABO I., PETTERSSON G., JOHANSSON G., MOWBRAY S L and STAHLBERG J. (2001). Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: Crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH 58) at 1.32Å^o resolution and homology models of the isozymes. *J. Mol. Biol.* 314.1097-1111.

59-NANMORI T., WATANABE T., SHINKE R., KOHNO A., KAWAMURA Y. (1990). Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J Bacteriol.* 172. 72-6669.

60-NCUBE T., HOWARD R L., ABOTSI E K., ELBERT L., VAN RENSBURG J and NCUBE I .(2012). *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation *Industrial Crops and Products.* 37. 118–123.

61-NINAWE S., KAPOOR M., KUHAD R.C. (2008) Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresour Technol.* (99).1252-8.

62-NIRMALE T.C., KALE B.B and VARMA A.J. (2017) : A review on cellulose and lignin based binders and electrodes : Small steps towards a sustainable lithium ion battery. *International journal of biological macromolecules.* 17, 1-40.

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

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

65-OSUNA-MARTINEZ U., REYES-ESPARZA and RODRIGUEZ-FRAGOSO L .(2014). Cactus (*Opuntia ficus-indica*): A Review on its Antioxidants Properties and Potential Pharmacological Use in Chronic Diseases. *Nat Prod Chem Res.* 2:6

66-PICART P., DIAZ P and PASTOR F.I.J. (2007). Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Letters in Applied Microbiology.* 45. 108–113.

67-PRAS O. (2011). Utilisation de cellulose pour l'élaboration de matériaux photoluminescents ou conducteurs. Thèse Doctorat. Autre. Université Grenoble Alpes., Française. France

68-RAHAL A., KUMAR A., SINGH V., YADAV B., TIWARI R., CHAKRABORTY S and DHAMA K. (2014). Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay *Review Article. BioMed Research International.* 2014. 1-19.

69-RAMAGEA M H., BURRIDGE H., BUSSE-WICHERC M., FEREDAYA G., REYNOLDSA T., SHAHA D U., WUD G., YUC L., FLEMINGA P., DENSLEY-TINGLEYE D., ALLWOODE J., DUPREEC P., LINDENB P.F and SCHERMANE O. (2017). The wood from the trees: The use of timber in construction. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.*, 68, 333–359.

70-ROUSSAS S., PERRAUD-GAIME I., LAKHTAR H., AOUIDI F., LABROUSSE Y., BELKACEM N., MACARIE H et ARTAUD J. (2009). Valorisation biotechnologique des sous-produits de l'olivier par Fermentation en Milieu Solide. *Olivebioteq.* 293-300.

71-SAUVAGEON T. (2012). Optimisation d'une hydrolyse enzymatique dans le processus de transformation de matériel ligno-cellulosique en bioéthanol. Projet de fin d'étude. Université de Lorraine. France.

72-SCHULEIN M (2000). Protein engineering of cellulases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1543. 239-252.

- 73-SCHUSTER E., DUNN-COLEMAN N., FRISVAD J C andVAN DIJCK P W.** (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59. 426–435.
- 74-SCRIBAN R.** (1993). *Biotechnologie.* 4^{ème} édition. Technique et Documentation-Lavoisier, Paris. France.
- 75-SCRIBAN R.** (1999). *Biotechnology.* 5^{ème} Ed. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris. France.
- 76-SEA T B., SAKI S J., COULYBALY A., YEBOUA A F and DIOPOH K J.** (2006). Extraction, purification et caractérisation de deux cellulases du termite, *Macrotermes subhyalinus* (Termideae). *Agronomie Africaine.* 18,57-65.
- 77-SEVERIAN D et DEKKER M.** (2009) . Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO₂ supercritique .thèse de doctorat. Université de Toulouse.France.
- 78-SHAHSAVARANI H., HASEGWA D., YOKOTA D., SUGIYAMA M., KANEKO Y., BOONCHIRD C and HARASHINI S.** (2012) Enhanced bio-ethanol production from cellulosic materials by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high temperature resistant *Sacchaomyces cerevisiae* TJ 14. *The society of biotechnology Japan.* 115, 20-23.
- 79-SHALLOM D., SHOHAM Y.**(2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology.* (6).219–228.
- 80-SHANMUGAPRIYA K , SARAVANA P, KRISHNAPRIYA, MANOHARAN M, MYTHILI A and SUNU J.** (2012). Isolation, screening and partial purification of cellulase from cellulase producing bacteria. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research.* 1(3). 509-514.
- 81-SIRO I and PLACKETT D.** (2010) : Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose* (2010). 17, 459-494.
- 82-SOMOGYI M.**(1945). A new reagent for the determination of sugars. *J Biol Chem.*(160). 61-73.

- 83-SRIYAPAI T., OMYOONSAP P., MATSUI K., KAWAII F., CHANSIRI K.**(2011). Cloning of a thermostable xylanase from *Actinomadura* sp S14 and its expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng.*12.24
- 84-SUN Y and CHENG J.** (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresource Technology*, 83. 1–11.
- 85-TAYEB H.** (2013). Acétate de cellulose : propriétés et applications. Mémoire de Master. Université Abou-Bakr Belkaid. Tlemcen.Algérie.
- 86-TEERI T T.** (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech.* 15. 160-165.
- 87-TEERI T T.** (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech.* 15. 160-165.
- 88-TOUATI L.** (2012). Valorisation des grignons d'olive Etude de cas : Essai de valorisation en biocarburant. Mémoire de Magister. Université M'HAMED BOUGARA.Boumerdes. Algérie.
- 89-ULISES O.M, REYES J.E, and LOURDES R.F.** (2014). Cactus (*Opuntia ficus-indica*): A Review on its Antioxidants Properties and Potential Pharmacological Use in Chronic Diseases. *Natural Products Chemistry & Research.*6(2). 2-8.
- 90-VALENTINI F.** (2008) : L'indispensable en biochimie. Bréal 2005.Rome.
- 91-VANHATALO K. LUNDIN T, KOSKIMA A., LILLANDT M and DAH O.** (2016). Microcrystalline cellulose property–structure effects in high-pressure fluidization: microfibril characteristics. *J. Mater. Sci.* , 51, 6019-6034.
- 92-VERMA D., SATYANARAYANA T.**(2012). Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. *Bioresource Technology.*(17).360–367.
- 93-VISAGIE C M, HOUBRAKEN J., FRISVAD J C., HONG S B., KLAASSEN C H W., PERRONE G., SEIFERT K A., VARGA J., YAGUCHI T and SAMSON R A.** (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* *STUDIES IN MYCOLOGY* 78. 343–371.
- 94-VOET D et VOET J.G.** (2005) : Biochimie. Boeck. 2^{ème} Ed.

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

96-ZAIDI F., HASSISSENE N., ALLOUACHE H., KICHOU M., OURDANI S., REZKI K., BELLAL M. M., GRONGNET J F et YOUYOU A. (2009). Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue Méd. Vét.* 160, 2, 67-73.

97-ZHANG X.Z and ZHANG Y.P. (2013). CELLULASES : CHARACTERISTICS, SOURCES, PRODUCTION, AND APPLICATIONS. In: Yang S T., El-Ensashy H., Thongchul N. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers.*

98-ZHANG Y.H and LYND L.R. (2004) .Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. *Biotechnol Bioeng.* 88. (7). 797-824.

Annexes

Annexe I : Préparation des milieux de culture.

1-Le milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

- Nettoyer 200g de pomme de terre, les faire cuire dans l'eau distillée ;
- récupérer le jus après cuisson ;
- ajouter 20g de glucose et 15g d'agar dans un bécher et ajouter 300ml d'eau distillée, agiter le contenu à l'aide d'un agitateur ;
- ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à un litre ;
- mettre le milieu au bain marie à 100°C pendant 20 min pour faire fondre l'agar jusqu'à l'obtention d'un milieu translucide ;
- répartir le milieu dans des petits flacons de 180ml ;
- stériliser à 120°C pendant 20min avec une pression d'1,5 bars afin de stériliser le milieu ;
- couler le milieu PDA dans plusieurs boites de pétri.

2-Le milieu Mendel et Weber (MW)

La composition chimique est la suivante :

- (NH₄)₂SO₄ : 0,3g/l ; KH₂PO₄ :1,4 g/l ; MgSO₄7H₂O : 0,4 g/l ; Peptone : 0,3 g/l ; extrait de levure : 0,75 g/l ; Fe₂SO₄ 7H₂O : 0,25 g/l ; MnSO₄ 7H₂O : 0,005 g/l ; ZnSo₄ 7H₂O: 0,001 g/l ; CoCl₂ : 0,001 g/l; Tween80: 2ml.

3-Le milieu solide Mendel et Weber

- Peser les composés du milieu Mendel et Weber
- ajouter une petite quantité d'eau distillée pour les produits déjà pesés dans un bécher puis agiter la solution pour les solubiliser;
- ajouter à la solution 10g de cellulose avicel et 10g d'agar, ajuster jusqu'à un litre avec de l'eau distillée ;
- répartir le milieu dans des petits flacons de 180ml ;
- stériliser le milieu.

4-Le Milieu liquide MW contenant la cellulose avicel

Un volume de 250 ml du milieu est additionné de 0,5g de la cellulose avicel.

Annexe II : Préparation des solutions

1-Eau physiologique

- 09 grammes de chlorure de sodium (NaCl) ;
- 1000ml d'eau distillée.

2-solution de NaCl (1N)

- 58.8 grammes d' Nacl ;
- 1000ml d'eau distillée.

3-solution du rouge congo

- 2,5 grammes de la poudre du rouge Congo ;
- 1000 ml d'eau distillée.

4- Solution de NaOH (4N)

- 16 grammes de NaOH ;
- 100 ml d'eau distillée.

5-Solution de NaOH (2N)

- 80 grammes de NaOH ;
- 1000ml d'eau distillée.

Annexe III : Extraction des enzymes à partir des cultures en fermentation à l'état solide

1-Solution tampon citrate-phosphate pH=5

-Solution acide citrique $C_6 H_8 O_7$ (0,1 M) (A)

21,01g.....1000ml d'eau distillée

-Solution phosphate dissodique (0,2M) (B)

5,25g.....1000ml d'eau distillée

-Composition du tampon : 49ml (A) + 51ml (B).

2-Méthode

-Ajouter 50ml de la solution tampon pour chaque culture après 6 jours d'incubation à 28°C ;

-soumettre à une agitation pendant une heure ;

-centrifugation à 4000G pendant 15 minutes à 4°C ;

-filtration de l'extrait obtenu.

Annexe IV : Détermination de la teneur en protéines

1-Solutions

Solution alcaline A :

- NaOH (0,1N) : 4g.....1000ml

-Na₂CO₃ (2%) :2g.....100ml d' NaOH (0,1N)

Solution cuivrique B :

-CuSO₄, 5H₂O (0,5%).....2ml

-Tartrate double de sodium et de potassium (1%).....2ml

Solution C :

-Solution A.....50ml

-Solution B.....1ml

Solution mère de BSA :

-BSA.....10mg

-Eau distillée.....100ml

2-Gamme étalon :

A partir de la solution mère de la BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

Tube	1	2	3	4	5	6
Concentration (µg/ml)	0	30	50	70	90	100
Volume à prélever de la solution mère (µl)	0	150	250	350	450	500
Volume d'eau distillée (µl)	500	350	250	150	50	0
Volume à prélever de la solution c (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Incuber 5 à 10 minutes à température ambiante						
Volume à prélever du réactif Folin-ciocalteu(µl)	250	250	250	250	250	250
Incuber 30 minutes à l'obscurité						
Densité optique à 750 nm						

Annexe V : Dosage de l'activité enzymatique.

1-Solutions

1-1-Tampon citrate de sodium 50Mm à pH=4,8

-Solution A :

Acide citrique.....21,01g/l.

-Solution B :

Citrate de sodium (C₆H₅O₇, 2H₂O).....29,41g/l.

-composition du tampon : 23ml A+ 27ml B.

1-2-Réactif DNS

1-Solution A :

NaOH 2N.....80g/l

Pour 20 ml de la solution NaOH 2N ajouter 1g du DNS en poudre, bien homogénéiser.

2-Solution B :

Dissoudre 3g de tartrate double de sodium et de potassium dans 50 ml d'eau distillée, bien homogénéiser.

Mélanger les deux solutions et ajuster jusqu'à 100ml avec de l'eau distillée.

1-3-Solution mère de glucose

Glucose.....100mg

Tampon citrate de sodium.....10ml

1-4-Solution d'avicel 2%

Avicel.....2g

Tampon citrate de sodium.....100ml

2-Gamme étalon

La méthode de préparation de la gamme étalon est montée dans le tableau suivant :

Tube	1(blanc)	2	3	4	5	6	7
Volume à prélever du tampon citrate de sodium (µl)	2000	1975	1950	1925	1900	1870	1850
Incubation 30 minutes au bain marie aux températures 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C							
DNS (ml)	3	3	3	3	3	3	3
Incubation 05 minutes au bain marie 0 100°C							
Prélever 0,5 ml de chaque tube							
Eau distillée (ml)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
lire les DO à 540 nm							

Annexe VI : Electrophorèse en conditions dénaturantes et dissociantes en présence du SDS et du beta-mercaptoéthanol

1-Solutions

Solution d'acrylamide (A)

- Acrylamide.....37,5 g
- Bis-acrylamide.....01g
- Eau distillée.....100ml

Tampon du gel de séparation (S)

- Tris.....18,15 g
- Eau distillée.....100ml
- Ajuster à pH 8.8 avec de l'Hcl 4N

Tampon du gel de concentration (C)

- Tris6g
- Eau distillée.....100ml
- Ajuster à pH 6,8 avec de l'Hcl 4N

Tampon d'électrode (pH 8,4)

- Tris.....1,2g
- Glycine.....5,76g
- SDS.....0,2g
- Eau distillée.....200ml

Tampon d'échantillon

- Solution (C).....500µl
- Eau distillée.....250µl
- SDS 10%.....250µl
- β-2-mercaptoéthanol.....50µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800µl du tampon d'échantillon, soumettre à un chauffage à 95 °c pendant 4 à 5 min puis refroidir dans un bain d'eau froide, puis ajouter 200µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques grains de bleu de bromophénol

1-2- Coloration au bleu de coomassie R250

-Solution de fixation

- TCA12g
- Eau distillée.....100ml

-Solution de coloration

- Bleu de coomassie R250.....0,5g
- TCA.....4g
- Méthanol.....100ml
- Eau distillée.....100ml

-Solution de décoloration

- Acide acétique.....37,5ml
- Eau distillée.....312,5ml
- Méthanol.....150ml

-Solution de persulfate d'ammonium

- Persulfate d'ammonium.....0,1g
- Eau distillée.....1ml

2-Conduite de l'électrophorèse

-Préparation du gel de séparation T=15%

- Solution (A).....2,85ml
- Solution (S).....1,87ml

Eau distillée.....	2,65 ml
SDS 10%.....	75µl
Persulfate d'ammonium.....	80µl
TEMED.....	11µl

Couler le gel de séparation 1.5cm du sommet de la plaque.

-Préparation du gel de concentration T=4%

Solution (A).....	500µl
Solution (S).....	1,25 ml
Eau distillée.....	3,2 ml
SDS 10%.....	50µl
Persulfate d'ammonium.....	80µl
TEMED.....	11µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé puis introduire le peigne.

Annexe VII : Zymogramme des enzymes cellulolytiques

1-Solutions

-Tampon acétate de sodium 0.1N, pH 5,2

Solution A : Acide acétique (0,1N) : 5,776ml.....1000ml d'eau distillée

Solution B : Acétate de sodium : 8,2g.....1000ml d'eau distillée

Composition du tampon : 10,5ml (A) + 39,5ml (B)

-Rouge congo 2%

2g du rouge congo dans 100ml d'eau distillée.

-Nacl (2N)

117,6g Nacl.....1000ml d'eau distillée

-Rouge congo 0,2%

0.2g du rouge congo.....100ml d'eau distillée

-Cellulose avicel 0,1%

0,1g.....100ml d'eau distillée

2-Méthode

Les échantillons de protéines ont été mélangés avec le tampon d'échantillon sans β -2-mercaptoéthanol ou tout agent réducteur et sans chauffage, puis chargés sur gel de concentration 5%. La cellulose avicel 0,1% (p / v) a été incorporé dans le gel de séparation 12% pendant sa préparation. Après électrophorèse, le gel avec le SDS a été trempé dans 0,1 M tampon d'acétate de sodium, pH 5,2 contenant 0,1% Triton X-100 pendant 30 min pour éliminer le SDS dans le gel. Pour permettre aux protéines de renaturer, le gel a été incubé dans le même tampon sans Triton X-100 pendant 1 h. Le gel a été ensuite coloré à 0,2% rouge Congo pendant 1 h et décoloré avec NaCl (2N), jusqu'à ce que la zone claire apparait.

Annexe VIII : Dosage des poly phénols

1-Solutions

-Solution de carbonate de sodium (7%)

- 7 grammes de la poudre de NaCO_3 ;
- 100 ml d'eau distillée.

-Solution mère de l'acide gallique

- 200 μg de l'acide gallique.....1ml d'eau distillée

2-Gamme étalon

Une gamme étalon est réalisée par l'acide gallique après la réalisation des dilutions à partir de la solution mère comme le montre la figure suivante :

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
--	---	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

volume à prélever de la solution mère (µl)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Volume d'eau distillée (µl)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0
prélever 125 µl de la solution mère											
ajouter 500 µl d'eau distillée											
ajouter 125µl du réactif Folin-Ciocalcu											
incuber 6minutes à température ambiante											
ajouter 1,25 ml de la solution carbonate de sodum (7%)											
ajuster à 3ml avec de l'eau distillée											
incuber 60minutes à l'obscurité											
Densité optique à 760nm											

Annexe IX : Test de l'activité anti-oxydante au DPPH

1-Solutions

Solution mère de l'acide ascorbique

- 0,04 grammes : d'acide ascorbique ;
- 100ml d'éthanol.

Solution du DPPH

- 2mg de la poudre de DPPH ;
- 50 ml d'éthanol.

2-Courbe de référence

Concentration (µg/ml)	0	50	100	150	200	250	300	350	400
Volume à prélever de la solution mère (µl)	0	125	250	375	500	625	750	875	1000
Volume à prélever de l'éthanol (µl)	1000	875	750	625	500	375	250	125	0

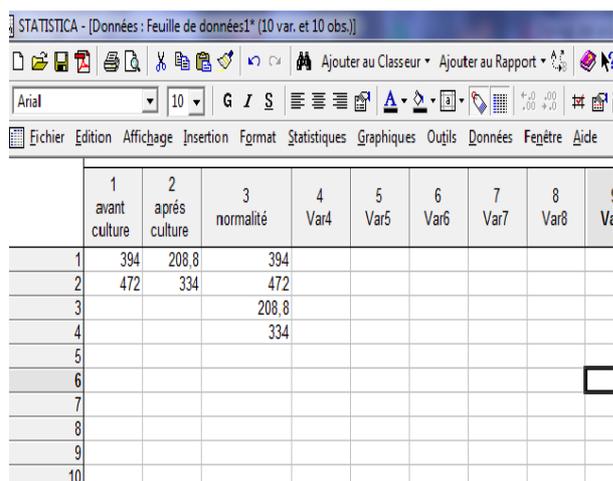
Prélever 50 µl de chaque tube

Volume à prélever de la solution de DPPH (ml)									
	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Incubation 30 minutes à l'obscurité puis lire la DO à 517 nm

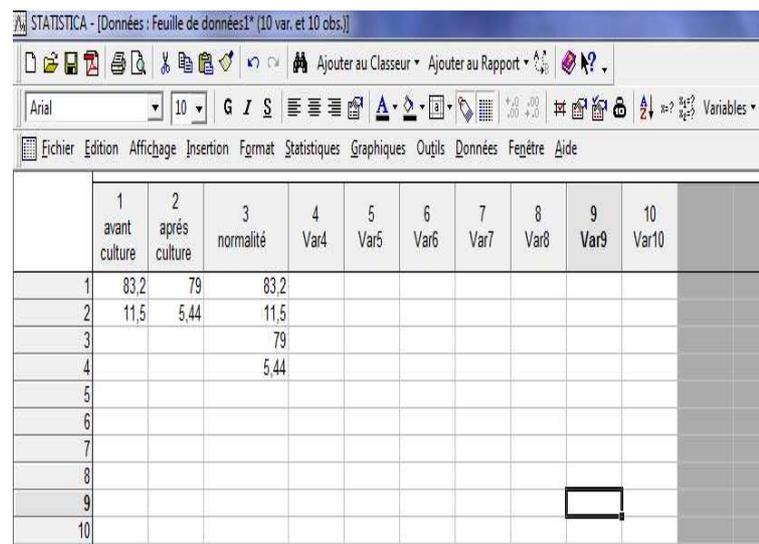
Annexe X : Analyse statistique

Une analyse statistique a été réalisée par le logiciel « statistica » en effectuant le test de student pour deux échantillons appariés pour la mesure de la matière sèche et pour le dosage des polyphénols. Les données insérées sont représentés dans les figures suivantes



	1 avant culture	2 après culture	3 normalité	4 Var4	5 Var5	6 Var6	7 Var7	8 Var8	9 Var9	10 Var10
1	394	208,8	394							
2	472	334	472							
3			208,8							
4			334							
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Figure 01 : Données du dosage des polyphénols sous logiciel statistica.



	1 avant culture	2 après culture	3 normalité	4 Var4	5 Var5	6 Var6	7 Var7	8 Var8	9 Var9	10 Var10
1	83,2	79	83,2							
2	11,5	5,44	11,5							
3			79							
4			5,44							
5										
6										
7										
8										
9										
10										

Figure 02: Données De la mesure des polyphénols sous logiciel statistica.

	1	2	3	4	5
	asp.n	pen.sp	normalité	Var4	Var5
1	0,202	0,147	0,202		
2	0,145	0,171	0,145		
3	0,169	0,151	0,169		
4	0,144	0,161	0,144		
5	0,16	0,104	0,16		
6	0,134	0,246	0,134		
7	0,163	0,092	0,163		
8			0,147		
9			0,171		
10			0,151		
11			0,161		
12			0,104		
13			0,246		
14			0,092		

Figure 03 : Données des activités enzymatiques à 50°C.

	1	2	3	4	5
	asp.n	pen.sp	normalité	Var4	Var5
1	0,174	0,158	0,174		
2	0,175	0,198	0,175		
3	0,135	0,171	0,135		
4	0,149	0,188	0,149		
5	0,176	0,125	0,176		
6	0,118	0,157	0,118		
7	0,106	0,128	0,106		
8			0,158		
9			0,198		
10			0,171		
11			0,188		
12			0,125		
13			0,157		
14			0,128		

Figure 04 : Données des activités enzymatiques à 50°C.

	1	2	3	4	5	6
	asp.n50°C	asp.n60°C	normalité	Var4	Var5	Var6
1	0,202	0,174	0,202			
2	0,145	0,175	0,145			
3	0,169	0,135	0,169			
4	0,144	0,149	0,144			
5	0,16	0,176	0,16			
6	0,134	0,118	0,134			
7	0,163	0,106	0,163			
8			0,174			
9			0,175			
10			0,135			
11			0,149			
12			0,176			
13			0,118			
14			0,106			

Figure 05 : Données des activités enzymatiques à 50°C et 60°C pour *Aspergillus Niger*.

	1	2	3	4	5	6	7
	pen.sp50°C	pen.sp60°C	normalité	Var4	Var5	Var6	Var7
1	0,147	0,158	0,147				
2	0,171	0,198	0,171				
3	0,151	0,171	0,151				
4	0,161	0,188	0,161				
5	0,104	0,125	0,104				
6	0,246	0,157	0,246				
7	0,092	0,128	0,092				
8			0,158				
9			0,198				
10			0,171				
11			0,188				
12			0,125				
13			0,157				
14			0,128				

Figure 06 : Données des activités enzymatiques à 50°C et 60°C pour *Penicillium sp.*

	1	2	3	4	5	6
	asp.n	asp.n NaOH	normalité	Var4	Var5	Var6
1	0,202	0,145	0,202			
2	0,169	0,44	0,169			
3	0,16	0,246	0,16			
4			0,145			
5			0,44			
6			0,246			
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						

Figure 07 : Données des activités enzymatiques avant et après traitement pour *Aspergillus Niger*.

	1	2	3	4	5	6
	pen.sp	pen.sp NaOH	normalité	Var4	Var5	Var6
1	0,158	0,198	0,158			
2	0,171	0,188	0,171			
3	0,125	0,157	0,125			
4			0,198			
5			0,188			
6			0,157			
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						

Figure 08: Données des activités enzymatiques avant et après traitement pour *Penicilium sp.*