



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم: ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : Biotechnologie des Mycètes, fermentation et production de substances
fongiques**

Intitulé :

***Etude de l'amélioration de la production d'éthanol par la technique de
fusion des protoplastes entre deux souches fongiques***

**Présenté et soutenu par : GARES Maroua
SAIDI Soundous**

Le : 22/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mme. MIHOUBI I.	Professeur - UFM Constantine1.
Rapporteur :	Mme. YUCEF ALI M.	MCB- UFM Constantine1.
Examineur :	Mme. LEGHLIMI H.	MCB- UFM Constantine1.

***Année universitaire
2015 - 2016***

Remerciement

Nos remerciements s'adressent d'abord à ALLAH le tout puissant et à son prophète MOHOMED (paix et salut sur lui) pour les chances qui nous sont offertes pour réaliser ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à Notre encadrante Madame YOUCEF-ALI Mounia, pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien, sa clairvoyance et ses compétences nous ont été d'une aide inestimable et pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieuses directives tout au long de l'élaboration de ce travail nous ont beaucoup impressionnées.

On exprime toute notre gratitude aux membres du jury Mme MIHOUBI .I et LEGHLIMI.H, qui ont su apprécier ce dernier. La pertinence de leurs critiques et suggestions nous a permis d'être à la hauteur de ce travail.

Nos remerciements vont aussi à tous les enseignants de département de microbiologie, particulièrement, les enseignants de biotechnologies des mycètes, fermentation et production de substances fongiques.

On ne terminera pas sans avoir exprimé des remerciements envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

- ❖ A la mémoire de grand-mère Saida.
- ❖ A ma très chère mère Necib ouahida :

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

- ❖ A mon très cher père Abdel madjid :

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

- ❖ A mes sœurs : Souha et Oulfa ainsi qu'à mes beaux-frères Zaki et Diaa :

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Vous êtes toujours dans mon cœur. Je vous remercie pour votre affection si sincère. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

- ❖ A mes chères ami(e)s : Maroua, Baraa , Hadjer , Maria ,Zinouba ,Romayssa, Amira,

- ❖ A mon amie intime Nanou

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

- ❖ A toute ma famille, qui porte le nom **Saidi** et **Necib**.

- ❖ A tout ceux qui ont participé à réalisation de ce modeste travail et tous ceux qui nous sont chers.

Soundous

Dédicace

❖ A ma très chère maman

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

❖ A très chère papa

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation .

❖ A mes très chères sœurs, Amel, Asma, et mes adorables nièces et neveux

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Malgré la distance, vous êtes toujours dans mon cœur. Je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

❖ A ma très chères sœur Sarah et mon beau-frère Amine

Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

❖ A mon très cher frère Fethi et ma belle-sœur nafissa

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie .

❖ A mes chères ami (e)s : Soundous , Nardjess , Soror , Loubna , Rayene , Douha , Hakim , Salah, Montassir ,Aghiles , Baraa , Maria , Maissa , Hadjer , Zinouba ,Amira.

❖ A mes chères cousines : Racha , Ines et rania .

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur

Maroua

Sommaire

Sommaire

1. Introduction.....	1
2. Revue bibliographique.....	3
2.1. Généralités sur les champignons.....	3
2.1.1. Caractères généraux	3
2.1.2. Structure de la paroi fongique.....	4
2.2. Le genre <i>Trichoderma</i>	5
2.2.1. Classification.....	5
2.2.2. Production d'enzymes par le genre <i>Trichoderma sp.</i>	6
2.3. Le genre <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.3.1. Classification.....	7
2.3.2. Morphologie.....	7
2.3.3. Physiologie et métabolisme.....	7
2.4. L'éthanol.....	8
2.4.1. Origines et applications industrielles de l'éthanol	9
2.4.2. Procédés de fabrication de l'éthanol.....	10
2.5. Technique d'amélioration de la production des métabolites secondaires.....	10
2.5.1. Amélioration par l'optimisation des conditions environnementales	10
2.5.2. Amélioration par modification des souches	11
2.5.2.1. Par Mutation.....	11
2.5.2.2. Par génie métabolique	12

2.5.3. Amélioration Par fusion des protoplastes	12
2.6. Les protoplastes chez les champignons	12
2.6.1. Des procédés de fusion des protoplastes.....	13
2.7. Isolement de protoplastes.....	14
2.7.1. La paroi cellulaire fongique et les enzymes digestives.....	14
2.7.2. Les Stabilisateurs osmotiques, la température et le pH.....	15
2.8. La régénération des protoplastes.....	16
2.9. Les applications de fusion des protoplastes.....	16
3. Matériel et méthodes	
3.1. Caractères cultureux et morphologiques des souches fongiques	19
3.1.1. La souche de <i>Trichoderma sp</i>	19
3.1.2. La souche de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.2. Libération des protoplastes	20
3.2.1. Libération des protoplastes de <i>Trichoderma sp</i>	20
3.2.2. Libération des protoplastes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.3. Récupération des protoplastes	21
3.4. Fusion des protoplastes obtenus.....	22
3.5. Régénération des protoplastes fusionnés	22
3.6. Conservation de la nouvelle souche.....	22
3.7. Production d'éthanol sur milieu cellulosique.....	23
3.7.1. Test de production d'éthanol par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (technique des cloches)	23

3.7.2. Production d'éthanol par fermentation.....	23
3.7.3. Récupération de l'éthanol et comparaison du rendement (technique d'hydrodistillation)	23
4. Résultats	
4.1. Caractères cultureux et morphologiques des deux souches fongiques	25
4.1.1. La souche de <i>Trichoderma sp.</i>	25
4.1.2. La souche de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	26
4.2. Libération des protoplastes	27
4.2.1. Libération des protoplastes de <i>Trichoderma sp.</i>	27
4.2.2. Libération des protoplastes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
4.3. Récupération des protoplastes	33
4.4. Fusion des protoplastes obtenus.....	33
4.5. Régénération des protoplastes fusionnés.....	34
4.6. Production d'éthanol sur milieu cellulosique.....	34
4.6.1. Test de production d'éthanol par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (technique des cloches)	34
4.6.2. Récupération de l'éthanol et comparaison du rendement (technique d'hydrodistillation)	35
5. Discussion.....	38
6. Conclusion et perspectives.....	42
Résumé.....	44
Références bibliographiques.....	47

Annexe

Liste des figures

Figure 1 Structures de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique d'une cellule fongique (Selitrennikoff, 2001).....	04
Figure 2 Technique d'observation microscopique des protoplastes « chambre humide » (1) : deux lamelles sont placées séparément de 1 cm, une goutte de la suspension de protoplastes à étudier est déposée entre les deux lamelles ; (2) : une troisième lamelle est placée à cheval sur les deux premières ;(3) : préparation prête à observer (Chongbiao <i>et al.</i> , 1993).....	21
Figure 3 Récupération d'éthanol par la technique d'hydrodistillation en utilisant le montage de « clewenger » (Grandbois, 2010).....	24
Figure 4 Aspects de la moisissure <i>Trichoderma sp.</i> sur : (A) gélose SAB ; (B) sous microscope optique (Grossissement X40).....	26
Figure 5 Aspect de la levure <i>S. cerevisiae</i> sur : (A) gélose OGA ; (B) sous microscope optique (Grossissement X40).....	26
Figure 6 Suivi microscopique de la libération des protoplastes de <i>Trichoderma sp.</i> au grossissement X40.....	28
Figure 7 Suivi microscopique de la libération des protoplastes de <i>S. cerevisiae.</i> au grossissement X40.....	31
Figure 8 Comparaison des protoplastes des deux souches (A) les protoplastes de <i>S. cerivisiae</i> (B) les protoplastes de <i>Trichoderma sp</i>	33
Figure 9 Les protoplastes fusionnés sous microscopie (Grossissement X40).....	34
Figure 10 Aspect de la souche ST sur : (A) milieu complet ; (B) sous microscope optique (Grossissement X40).....	34
Figure 11 Quantité de gaz dégagé dans la cloche du Durham par <i>S.cerevisiae</i> sur milieu à base de cellulose.....	35
Figure 12 Quantité d'éthanol produite sur milieu minimum à base de cellulose (A) : par <i>S. cerevisiae</i> ; (B) : par la souche ST.	36
Figure 13 Test de confirmation de la présence d'éthanol, présence de flamme.....	37

Liste des abréviations

PEG: Poly-Ethylène-Glycol

MEM: Extrait de levure extrait de malt dextrose

OGA : Gélose glucosée à l'oxytétracycline

YPG : Yeast Peptone Glucose

SAB : Sabouraud

Rpm : Rotation Par Minute

Introduction

1. Introduction

La fusion de protoplastes continue à être le domaine de recherche le plus dominant en biotechnologie moderne. Cette technique est devenue un moyen de base indispensable pour la recherche biologique, biochimique et biotechnologique.

Du fait de l'absence de la paroi cellulosique, les protoplastes constituent un système biologique unique pour réaliser des études physiologiques ou biochimiques, et des manipulations de l'ordre génétique. Par ailleurs, il est possible d'envisager la création de nouveaux types génétiques par fusion de protoplastes (hybridation somatique), soit pour améliorer les caractéristiques des deux cellules fusionnées ou mieux maîtriser ou accélérer leur production au service de la recherche, ou de la production industrielle.

Pour arriver à la fusion des protoplastes, il est important que la paroi des cellules fongiques soit dégradée. Ceci est réalisé par l'intermédiaire d'enzymes d'origine bactérienne qui agissent directement sur la paroi et conduisent à la libération des protoplastes.

De ce fait, l'objectif de ce travail se focalise sur l'amélioration de la production de métabolites secondaires (l'éthanol) par la fusion de protoplastes entre la levure *Saccharomyces cerevisiae*, productrice importante d'éthanol, et la moisissure *Trichoderma sp.* productrice d'hyper cellulase, à partir d'un substrat cellulosique (Demirbas, *et al.*, 2010).

La fermentation de sucre en éthanol n'est possible qu'à partir de sucres simples. Or, la biomasse cellulosique est composée de glucides complexes. Pour transformer le substrat complexe en substrat simple, des enzymes microbiennes peuvent être utilisées tel que les enzymes sécrétés par *Trichoderma sp.*. Ces enzymes sont efficaces pour transformer la cellulose en glucose, utilisable par la levure pour produire de l'éthanol.

La biomasse cellulosique représente une des ressources renouvelables la plus abondante sur terre, et certainement une des moins coûteuses. Sa conversion en éthanol à usage carburant devrait permettre de subvenir à une partie des besoins énergétiques, couverts jusqu'à présent essentiellement par les produits dérivés du pétrole, tout en générant de nouvelles opportunités pour le monde agricole (Ogier *et al.*, 1999).

La stratégie de notre travail repose sur quatre axes principaux :

- Libération des protoplastes de chaque souche fongique ;
- Fusion de protoplastes entre les deux souches fongiques ;
- Régénération et détermination des caractères morphologiques de la nouvelle souche obtenue;
- Production et quantification d'éthanol sur milieu cellulosique par *S. cerevisiae* et la nouvelle souche ST.

Ce travail comporte quatre parties. La première présente une revue de littérature qui donne une idée générale sur les deux souches utilisées, la technique d'amélioration des métabolites secondaires, ainsi que le procédé de fusion de protoplastes. La seconde partie est consacrée à la description du matériel et méthodes utilisés pour cet objectif. La troisième et la quatrième partie rapportent respectivement, les résultats obtenus et leur discussion par rapport à d'autres travaux scientifiques.

Revue
bibliographique

2. Revue bibliographique

2.1. Généralités sur les champignons

2.1.1. Caractères généraux

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur Terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ce sont des organismes eucaryotes à mode de reproduction sexuée ou asexuée. Les spores produites peuvent avoir un rôle dans la dispersion des champignons, mais peuvent également jouer un rôle dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Madelin, 1994). Leur mode de nutrition se fait par absorption en libérant dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur. Ces organismes sont dépourvus de chlorophylle et sont tous hétérotrophes ; le glycogène est le polysaccharide de réserve principal (Carlile et Watkinson, 1994 ; Redecker, 2002). Tous les champignons ont une paroi constituée de chitine, polysaccharide très résistant constitué de résidus N-acétylglucosamine (Carlile et Watkinson, 1994).

D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories : la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes (Redecker, 2002). Certaines espèces ont la capacité d'adopter les deux formes, levure et mycélienne, tandis que d'autres sont restreintes à l'une ou l'autre (Jennings et Lysek, 1996). La forme levure apporte un avantage pour la croissance dans les milieux où la pression osmotique est forte car cela diminue la surface de l'organisme. La forme mycélienne permet au champignon d'avoir une croissance radiale importante et de coloniser rapidement un milieu. Cette forme mycélienne assure donc une surface maximale de contact et permet une exploration et une recherche de nutriments dans les trois dimensions (Carlile et Watkinson, 1994 ; Jennings et Lysek, 1996).

D'un point de vue métabolique les champignons sont des chimiohétérotrophes, c'est à dire qu'ils utilisent du carbone organique comme source d'énergie (Carlile et Watkinson, 1994 ; Redecker, 2002). Ce sont des organismes aérobies pour la grande majorité, mais certaines levures peuvent être aéro-anaérobie et participer à des processus fermentaires (Carlile et Watkinson, 1994).

2.1.2. Structure de la paroi fongique

Les champignons, les végétaux et les animaux sont, au niveau cellulaire, tous des organismes vivants se différenciant principalement au niveau de la structure de l'enveloppe cellulaire et de la composition du cytoplasme. L'enveloppe de la cellule fongique est constituée d'une paroi et d'une membrane, tout comme la cellule végétale. La paroi fongique (figure 1) est composée de 80% de polysaccharides antigéniques et est formée de 3 couches (Selitrennikoff, 2001) :

1. La couche interne, constituée de chitine, assure le maintien et la rigidité de la paroi.
2. La couche intermédiaire, constituée de β -(1,3)-glucane, qui confère une certaine élasticité à la paroi, est aussi le lieu d'ancrage des manoprotéines.
3. La couche externe, constituée de manoprotéines.

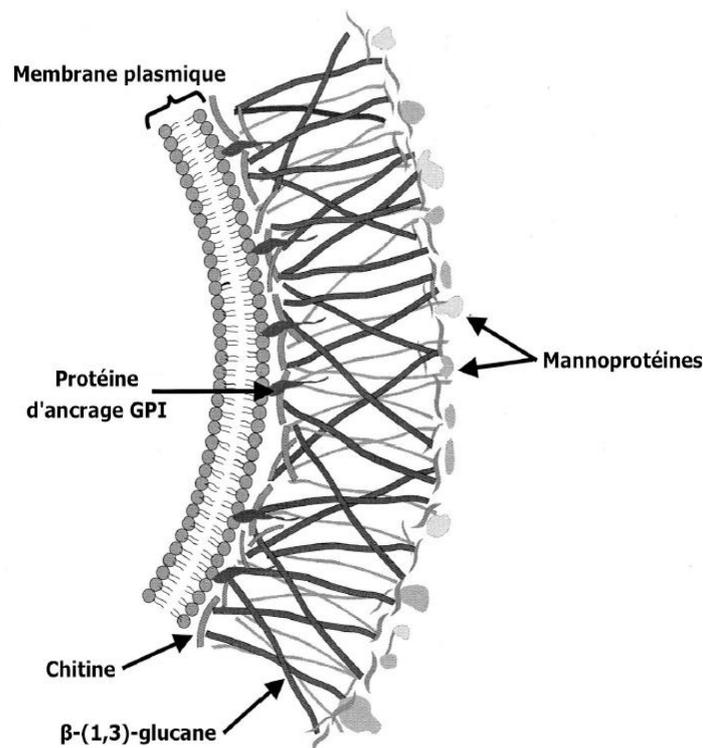


Figure1 Structures de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique d'une cellule fongique (Selitrennikoff, 2001).

La chitine est localisée entre la membrane et la paroi, elle permet ainsi le maintien de l'intégrité de la paroi et donc la survie des cellules. La membrane cellulaire est riche en stérols (ergostérol et zymostérol). De nombreux antifongiques interfèrent avec la synthèse de ces

stérols, spécifiques de la cellule fongique et absents des cellules animales. D'autres agissent également au niveau des constituants de la paroi, et dans certains cas à l'intérieur du cytoplasme ou du noyau.

2.2. Le genre *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1794 par Persoon (Roussos, 1985 ; Bissett, 1991). Il désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des «Gastéromycètes». Ces organismes cosmopolites appartiennent à un grand ensemble de champignons sans reproduction sexuée connue (Vining, 1990 ; Genilloud *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996). En milieu terrestre, leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font des *Trichoderma sp.* des agents potentiels en agroalimentaire et une matière de choix pour l'exploitation industrielle (Prieto *et al.*, 1997). Quelques-unes des quelques 35 espèces établies à ce jour sont d'intérêt économique, pour leur production d'enzymes cellulolytiques et utilisés comme agents de lutte biologique en raison de leur antagonisme vis-à-vis d'autres espèces fongiques (antibiose, mycoparasitisme, compétition, lyse, promotion de la plante hôte) (Fujita *et al.*, 1994 ; Schirmböck *et al.*, 1994 ; Roquebert, 1996 ; Prieto *et al.*, 1997 ; Grondona *et al.*, 1997 ; Verbist, 2000 ; Kubicek *et al.*, 2003).

2.2.1. Classification

Selon le catalogue of life 2015, la classification du genre *Trichoderma* est comme suit :

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Sous-division	Pezizomycotina
Classe	Sordariomycetes
Sous-classe	Hypocreomycetidae
Ordre	Hypocreales
Famille	Hypocreaceae
Genre	<i>Trichoderma</i>

2.2.2. Production d'enzymes par *Trichoderma sp.*

La mise en évidence de la production de métabolites secondaires par les *Trichoderma sp.* a été rapportée pour la première fois par Weidling (1934), concernant un antifongique (Papavizas, 1985). Depuis, les études successives ont démontré que ces micromycètes étaient virtuoses dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Vizscaino *et al.*, 2005), processus régi par des interactions biochimiques extrêmement complexes et parfaitement coordonnées (Vining, 1990).

La production des enzymes est variable d'une souche à l'autre principalement les xylanases ou les cellulases (Sandgren *et al.*, 2005), exploités dans divers domaines biotechnologiques (Kubicek *et al.*, 2003).

Le genre *Trichoderma sp.* appartient au grand ensemble des champignons imparfaits (Rifai, 1969) Ces espèces sont fréquemment Utilisées dans les processus d'hydrolyse de la cellulose. Elles produisent en effet des quantités importantes d'exo enzymes, capables d'hydrolyser complètement la cellulose en glucose. Les espèces suivantes : *T.reseei* (Ogawa *et al.*, 1982 ; Tallen et Andreotti, 1982 ; Mandels, 1981) , *T.viride* (Gong *et al.*, 1977 ; Weber et Griffin, 1973) ; Halliwell et Vincent, 1981), *T.pseudo-koningii* (Harrer *et al.*,1983), *T. longibrachiatum* (Sidhu et Sandhu, 1980) ainsi que *T.hazarium* (Roussos et Raimbault, 1982) sont les espèces les plus Utilisées pour l'étude du mécanisme du complexe enzymatique ainsi que pour la production de cellulase.

2.3. Le genre *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae est un micro-organisme unicellulaire connue depuis la plus haute Antiquité. Les Babyloniens, les Égyptiens et les Celtes, qui l'utilisaient pour la production de boissons et produits fermentés (vin, bière, pain) et joue un rôle très important dans l'industrie agroalimentaire comme agent de fermentation et pour l'élaboration de produits dérivés.

De nos jours, la levure est également largement utilisée comme usine cellulaire pour la production de molécules d'intérêt. Dans le domaine pharmaceutique et médical, elle est utilisée pour la production de vaccins, de probiotiques ou de protéines comme l'insuline (Roberts et Oliver, 2010). Elle joue également un rôle clé dans l'industrie chimique pour la synthèse de produits de commodité comme l'acide lactique pour la production des plastiques

et dans le domaine des énergies renouvelables et des biocarburants (bioéthanol). Le secteur des biotechnologies blanches présente aujourd'hui un très fort potentiel de croissance.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme modèle pour l'étude des processus cellulaires, et le premier eucaryote dont le génome a été complètement séquencé (Goffeau *et al.*, 1996). Du fait du niveau élevé de connaissances atteint chez cet organisme, *S. cerevisiae* est devenue il y a une dizaine d'années l'un des premiers organismes modèle pour la biologie des systèmes (Mustacchi *et al.*, 2006), une discipline dont l'objectif est d'obtenir une description quantitative des processus cellulaires et de prédire le fonctionnement de la cellule.

2.3.1. Classification

Selon le catalogue of life 2015, la classification de *S. cerevisiae* est la suivante :

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Sous-division	Saccharomycotina
Classe	Saccharomycetes
Sous-classe	Saccharomycetidae
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Saccharomycetaceae
Genre	<i>Saccharomyces</i>
Espèce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

2.3.2. Morphologie

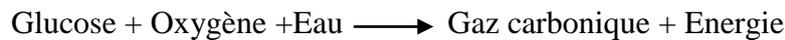
Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, ayant une forme sphérique ou ovale, largement étudiées en biologie cellulaire et moléculaire. Leur état physiologique et leur morphologie peuvent varier selon les conditions de l'environnement. Lorsqu'elles se trouvent dans des conditions favorables de culture (température, aération, pH, etc.) elles peuvent se diviser activement par bourgeonnement (Boze *et al.*, 2008). La taille d'une levure peut varier entre 1 et 9 µm en longueur et de 1 à 5 µm en largeur.

2.3.3. Physiologie et métabolisme

La composition biochimique de *S. cerevisiae* repose essentiellement sur les protéines, les lipides, les hydrates de carbone et les acides nucléiques (Fritsche, 1972). *S. cerevisiae* utilise plusieurs éléments, en faibles quantités, indispensables à son métabolisme tels que l'azote, le soufre, le phosphore, certains acides aminés, des vitamines et des oligo-éléments affectant ainsi les capacités fermentaires et la croissance de la levure (Birch et Walker, 2000 ; Dombek et Ingram, 1986 ; Ferreira *et al.*, 2004).

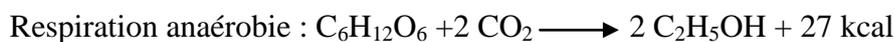
La levure a la particularité de pouvoir vivre en présence ou en absence d'air : ces deux processus énergétiques sont la respiration et la fermentation. Elle se nourrit de glucose et de fructose (sucres simples).

En présence d'air, la levure respire : elle dégrade les sucres simples (en C6) présents dans son milieu de vie, par un métabolisme oxydatif qui conduit à la formation d'eau, de gaz carbonique et une grande quantité d'énergie (vie, croissance et multiplication).



Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux cellules une importante multiplication.

En l'absence d'air, la levure fermente : grâce à ses enzymes (les zymases), elle dégrade les sucres simples (en C6) présents dans son milieu de vie, par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation de gaz carbonique, d'alcool et un peu moins d'énergie, Ce métabolisme fermentatif moins énergétique que le métabolisme oxydatif, affecte la multiplication cellulaire mais a l'avantage de permettre à la levure de survivre même en anaérobiose.



2.4. L'éthanol

L'éthanol, l'alcool ou encore l'alcool éthylique sont toutes les trois des appellations qui désignent la même molécule qui est composée de deux atomes de carbone (C), six atomes d'hydrogène (H) et d'un atome d'oxygène (O). Les formules brutes et semi-développées de la molécule d'éthanol sont respectivement le C_2H_6O , le C_2H_5OH et le CH_3-CH_2-OH .

L'éthanol est obtenu à partir d'un processus de fermentation anaérobie des sucres naturels (ex: grains de céréales), généralement retrouvés dans les produits biologiques, suivi d'une distillation sous l'action des levures pour la fabrication notamment de boissons alcoolisées tel que le vin ou encore la bière. C'est à partir du XIX^{ème} siècle que le mot « alcool » a commencé à faire référence uniquement à des composés chimiques ayant des caractéristiques communes, soit des oxydes d'alcanes ayant subi une substitution de l'atome d'hydrogène par un groupement hydroxyle (OH) au niveau d'un atome de carbone (Cnrs, 2007). En ce qui concerne ses propriétés physiques, l'alcool éthylique est un composé incolore, volatil, hygroscopique, miscible à l'eau et à l'alcool (Inrs, 1997). Reconnu pour ses qualités de solvant pour les graisses et les matières plastiques (Inrs, 1997), son odeur est détectable à des concentrations variant entre 10 et 350 ppm.

L'éthanol est un composé qui est chimiquement stable. Il possède toutes les propriétés qui caractérisent les alcools notamment une réaction d'oxydation lorsqu'il est maintenu à l'air libre pour former de l'acide acétique. Par contre, dans des conditions d'oxydation extrême, il se transforme en dioxyde de carbone (CO₂) et en eau (H₂O).

2.4.1. Applications industrielles de l'éthanol

Aujourd'hui, les applications industrielles utilisant l'éthanol sont nombreuses. Au-delà du fait que l'éthanol serve à l'éclairage et au chauffage, il constitue le principe actif de base des boissons alcoolisées, il entre dans la synthèse de produits chimiques tels que les peintures, les vernis, les encres, les matières plastiques, les adhésifs, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques (Csst, 2007). Réputé pour ses qualités de solvant, il est également utilisé dans l'industrie du nettoyage contre les graisses et les matières plastiques. L'éthanol est également utilisé comme matière première pour la synthèse de solutions d'insecticides. En pharmacologie, il est utilisé pour ses propriétés de désinfectant et d'agent antiseptique (Csst, 2007).

Depuis les années 70, l'éventail des applications industrielles de l'éthanol s'est étendu à l'industrie des carburants au point de vouloir en faire, dans des pays comme le Brésil, la principale source d'énergie pour les moteurs à essence. À titre d'information, il est important de souligner que son utilisation en tant que carburant remonte à l'année 1876 lorsque le premier moteur à combustion utilisant de l'essence à l'éthanol a vu le jour grâce au scientifique allemand Nicolaus August Otto (Centre info-énergie, 2007). En 1880, Henry Ford

équipe ses quadricycles avec des moteurs semblables pour faire de l'éthanol, en 1908, le principal combustible de son modèle « T ». C'est ainsi que la première usine de fermentation d'éthanol, à des fins de production de carburant, voit le jour dans l'État du Kansas aux États-Unis (Centre info-énergie, 2007). Dans les années 1930, l'éthanol ou encore le gazohol (mélange d'éthanol et d'essence), produit à partir de maïs, est offert dans plus de 2 000 stations réparties dans le Mid West américain (Centre info-énergie, 2007). Pour des raisons de coûts de production, les années 40 marquent le retour des carburants, fabriqués à base de pétrole, comme source d'énergie pour les véhicules.

2.4.2. Procédés de fabrication de l'éthanol

La production d'éthanol passe par une fermentation anaérobie des sucres suivie d'une distillation. Bien que ces deux étapes soient communes aux différentes filières, les procédés de fabrication diffèrent selon le type de biomasse. Par opposition aux molécules les plus fermentescibles, les sucres aux structures complexes requièrent des traitements préalables avant de pouvoir se rendre disponibles pour subir une fermentation.

2.5. Technique d'amélioration de la production des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont généralement produits en faible quantité (1 à 20 mg/l) par les souches sauvages, alors qu'une production ne devient rentable qu'à partir d'une synthèse de 5 g/l. L'amélioration du rendement repose sur l'optimisation des procédés de fermentation et la modification des souches, par recherche de mutants spontanés, par mutation dirigée lorsque les bases génétiques de la biosynthèse du métabolite sont connues, ou encore par construction de souches par croisement, fusion de protoplastes ou manipulation génétique.

2.5.1. Amélioration par l'optimisation des conditions environnementales

Des conditions environnementales spécifiques peuvent affecter la production des métabolites secondaires, telles que la composition du milieu de la culture, l'activité de l'eau, la valeur du pH qui joue un rôle primordial dans la production des métabolites secondaires. De faibles variations de pH peuvent avoir des effets marqués sur la productivité de la souche. Et aussi la température, la teneur en oxygène, et la présence d'organismes compétitifs (Davis, 2001 ; Johanning, *et al.*, 2002).

2.5.2. Amélioration par modification des souches

Les stratégies d'améliorations visent à accroître la concentration finale en produit, à réduire la production des co-métabolites indésirables. Pour l'amélioration, ils sont utilisés : la mutagenèse aléatoire et le génie métabolique

2.5.2.1. Par Mutation

La modification et l'amélioration des souches microbiennes par mutation sont typiquement réalisées par exposition (in vivo ou in vitro) à une variété d'agents physiques ou chimiques appelés mutagènes. La plupart de ces mutagènes causent quelques dommages à l'ADN par suppression, addition, transversion ou substitution de bases ou par rupture du double brin d'ADN (Parekh *et al.*, 2000). L'objectif des mutagenèses, pour améliorer des souches, est de maximiser la fréquence des mutations désirées. Le meilleur exemple est l'amélioration des souches de *Penicillium* pour la production de la pénicilline. Cette production est de 50 g/l, avec une amélioration d'au moins 4000 fois par rapport à la souche sauvage (Peberdy, 1985).

D'autres exemples cités dans la littérature montrent que des souches fongiques ou d'actinomycètes sont aujourd'hui capables de produire des métabolites à des quantités aussi élevées que 80 g/l (Crueger et Crueger, 1984; Rowlands, 1984; Vinci et Byng, 1998).

L'efficacité de la mutation aléatoire est dépendante de plusieurs autres facteurs: le type de culture utilisée (tels que les spores ou la conidie), les doses d'agents mutagènes et le temps d'exposition, le type et le dommage à l'ADN, les conditions du traitement et du post-traitement, la fréquence de traitement de l'agent mutagène, et l'ampleur de l'augmentation du rendement détectable (Vinci et Byng, 1998).

Les irradiations aux UV, les rayons gamma ou l'agent mutagène N-Methyl, N-nitrosoguanidine (MNNG) ont été utilisés pour améliorer le rendement de plusieurs métabolites secondaires produits par *A. niger* (Gupta et Sharma, 1995). Une suspension de spores d'*A. ochraceus* NRRL 3174 a été exposée aux UV ($\lambda = 254$ nm) à température ambiante montrant une chute de la viabilité et une rupture des brins d'ADN (Dose *et al.*, 1996).

2.5.2.2. Par génie métabolique

C'est l'amélioration des potentialités d'une cellule par la manipulation de fonctions enzymatiques bien ciblées, grâce à l'emploi de la technologie de l'ADN recombiné, il repose sur une connaissance précise des fonctions cellulaires à modifier, ainsi que des gènes qui leur sont associés pour pouvoir réaliser des manipulations de gènes de structure du métabolisme primaire et des manipulations des gènes de régulation .

2.5.3. Amélioration Par fusion des protoplastes

Les protoplastes des champignons, il y a une vingtaine d'années ont été soulevés dans le centre d'intérêt de nombreux biologistes. Pour les généticiens les protoplastes étaient un progrès révolutionnaire dans tous les systèmes fongiques où le croisement sexuel n'était pas possible et des mécanismes parasexuels n'ont pas fonctionné. Avec le temps l'enthousiasme d'hybrider de différentes espèces a changé à une vision plus réaliste. Une autre méthode de manipulation génétique des champignons s'est développée, qui était la transformation de protoplastes fongiques. Après élimination de la paroi cellulaire, uniquement la barrière de la membrane cellulaire doit être surmontée par l'ADN étranger. La fusion de protoplastes et la transformation ont été utilisés à la fois pour améliorer la productivité des souches industrielles de champignons (Dilip, 2004).

2.6. Les protoplastes chez les champignons

Chez les champignons, les protoplastes peuvent être définis comme des cellules sphériques dont les parois cellulaires sont enlevées de chitine par les enzymes digestives appropriées (Bachmann et Bonner, 1959). Sur la base de la littérature considérable qui a accumulée au cours des 40 dernières années, des études des protoplastes dans les champignons peuvent être divisées dans deux sections principales : (a) production des protoplastes stables et complets, et (b) l'utilisation des protoplastes. Les applications réussies de telles manipulations des protoplastes a conduit à une meilleure compréhension de nombreux phénomènes biochimiques, physiologiques et génétiques dans les champignons.

La technique de la fusion de protoplaste en particulier, continue à contribuer positivement à notre compréhension de la biologie fongique dans les sujets s'étendant du métabolisme secondaire à l'incompatibilité végétative. Cependant, au mieux de notre connaissance, le sujet de la fusion de protoplaste n'a pas été passé en revue ces derniers temps. Une autre technique

impliquant les protoplastes, celui de la transformation de l'ADN, a également été très utile dans le domaine de recherche de champignons, en particulier dans les champignons où les crois sexuelles ne sont pas réalisables (champignons imparfaits).

2.6.1. Quelques procédés de fusion des protoplastes

C'est le processus par lequel les membranes de protoplaste fondent (plasmogamy) pour avoir un cytoplasme commun et multinuclées.

Fusion Spontanée : les protoplastes isolés fusionnent spontanément et ce phénomène est appelé fusion spontanée. Au cours du traitement enzymatique de protoplastes à partir des cellules adjacentes, elles fusionnent par leur plasmodesmes pour former des protoplastes multinuclées.

Fusion induite : Les protoplastes isolés ne peuvent pas fusionner les uns avec les autres car la surface du protoplaste isolé porte des charges négatives (-30 mV à -10mV) autour de la membrane plasmique extérieur. Donc, ce type de fusion à besoin d'une fusion induisant des produits chimiques qui réduisent effectivement l'électro négativité du protoplaste isolés et leur permettent de se fondre les uns avec les autres (Narayanswamy S 1994).

- Trois voies de fusion des protoplastes :

Fusion mécanique : Dans ce processus, les protoplastes isolés sont mis en contact physique intime sous microscope en utilisant un micro manipulateur ou une micropipette de perfusion.

Chemofusion : C'est la technique la moins coûteuse, plusieurs produits chimiques ont été utilisés pour induire la fusion des protoplastes tel que le nitrate de sodium, le polyéthylèneglycol PEG, les ions de calcium (Ca ++). Les fusogènes chimiques conduit à une agglutination des protoplastes suivie par fusion de ces derniers (Pacha C.R *et al.*, 2007) (Jogdand S.N.2001).

Afin de convertir les matières cellulosiques en éthanol, Srinivasan R et T Panda (1994) ont utilisé cette technique de fusion (chemofusion) entre les protoplastes de *Trichoderma reesei* QM 9414 et *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3288.

Electro-fusion : Cette technique, la plus récente, utilise des champs électriques intenses et de courte durée, qui en déstabilisant les membranes et entraînent la fusion des protoplastes.

L'électro fusion est facile à contrôler ayant une fréquence de fusion jusqu'à 100%. Donne une reproductibilité moins cytotoxique. Mais l'équipement est sophistiqué et coûteux.

2.7. Isolement de protoplastes

L'approche de base pour la préparation de protoplastes des champignons filamenteux a peu changé au fil des années. Essentiellement, il consiste à traiter les hyphes avec des enzymes qui digèrent les matières de paroi cellulaire. Les principaux facteurs influençant sur le processus d'isolement des protoplastes sont résumées ci-dessous.

2.7.1. La paroi cellulaire fongique et les enzymes digestives

La paroi cellulaire fongique est une structure robuste qui donne à la cellule sa forme et la protège dans les milieux habituellement hypotoniques, elle joue un rôle important dans les interactions cellule-cellule en raison de la présence d'antigènes extérieurs, et qui agit comme un site d'enzymes extracellulaires avec une activité hydrolytique ou métaboliques (Farkas, 1985). D'une manière générale, une paroi fongique est composé de 70% ou plus de polysaccharides (homo et hétéro) et des quantités variables des protéines, des lipides et des mélanines (Bainbridge *et al.*, 1979; Bartnicki-Garcia 1968; Rosenberger 1976). Les polysaccharides sont classifiés en polysaccharides squelettiques composés principalement de chitine et R-glucane, et le mur-matrice polysaccharides composés principalement des protéines-polysaccharides (Frakas 1985).

De nombreux laboratoires ont préféré faire leurs propres préparatifs lytiques, ces préparations ont été laborieuses, variées dans leurs activités lytiques et ont donné des rendements variables des protoplastes (Villanueva et Garcia 1971). En 1981, les résultats d'une étude approfondie qui implique la comparaison des activités de plusieurs polysaccharases commerciales: Novozyme 234, Cereflo 200L, cellulase, hélicase, chitinase, D-glucuronidase, et D-glucanase pour leur capacité à libérer les protoplastes fongiques ont été rapportés (Hamlyn *et al.*, 1981). Les enzymes, individuellement ou en combinaison, varient dans leur capacité à produire des protoplastes en fonction du type de champignon, en général, Novozyme 234 (Novo), un mélange enzymatique de la chitinase, la cellulase, et des activités de la protéase provenant d'espèces *Trichoderma*, était le nombre suffisant plus efficaces et les produits du protoplastes en 2-3 h (Hamlyn *et al.*, 1981). Novozyme 234 est également disponible à partir d'autres sources commerciales comme Sigma et continue à être largement utilisé pour les protoplastes

fongique par exemple dans *P. chrysogenum* (Hong et Robbers 1985), *A. flavus* (Keller *et al.*, 1992), *A. nidulans* (Bird Bradshaw et 1997), et *Lentinuslepideus* (Kim *et al.*, 2000a).

2.7.2. Les Stabilisateurs osmotiques, la température et le pH

Les stabilisateurs osmotiques sont nécessaires pour maintenir la morphologie des protoplastes, qui est par ailleurs maintenue par une seule membrane cellulaire. Au cours des dernières décennies et demi, une large gamme de sels inorganiques (KCl, CaCl₂, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, MgSO₄, NaCl) et les composés organiques (sucres et alcools de sucre) ont été utilisés dans cette capacité (Davis 1985 et Villanueva et Garcia 1971). Les données expérimentales sur une gamme des systèmes ont suggéré que, des sels minéraux généraux (en 0,6M) fonctionnent mieux pour les champignons filamenteux tandis que le sucre et les alcools de sucre sont plus appropriés pour les levures (Peberdy 1979b). En outre, selon la préparation enzymatique, des stabilisants peuvent effectivement aider à la lyse de la paroi. Par exemple, une combinaison de CaCl₂ et KCl a considérablement augmenté la libération des protoplastes de *A. Niger* et *A. fumigatus* lorsque la chitinase a été inclus comme enzyme lytique, mais si CaCl₂ seul a été utilisé comme stabilisant, le rendement en protoplastes a effectivement diminué (Thomas, 1981 ; Thomas et Davis 1980).

D'autres variables telles que le pH et la température influencent également sur la production des protoplastes et spécifiquement sur les activités des enzymes lytiques. Le pH optimal et les températures doivent être déterminées expérimentalement pour chaque champignon, mais il semble que toute une gamme de 20-40°C fonctionnent bien avec la plupart des champignons filamenteux (Davis B 1977 ; Petrini 2001; Thomas, 1981).

Des températures supérieures à 40°C peuvent inhiber l'activité des enzymes lytiques tandis que des températures plus basses peuvent affecter la stabilité de la membrane des protoplastes (Kovac et Subik 1970). En ce qui concerne le pH du milieu d'incubation, en général, des milieux acides (pH inférieur à 4) ont tendance à diminuer l'activité lytique des enzymes digestives, bien que le pH optimal varie d'un organisme à un autre. Des détails supplémentaires sur ces facteurs et leurs effets secondaires sur le métabolisme des protoplastes ont été examinées par Davis, (1985) et Peberdy, (1979 b).

2.8. La régénération des protoplastes

Ce processus se rapporte à la capacité des protoplastes de revenir à la forme filamenteuse normale en synthétisant d'abord la paroi cellulaire. La réussite de toute expérience impliquant des protoplastes est dépend en grande partie, si elles peuvent se régénérer par le cytokinèse et former une croissance coloniale visible sur un support solide osmotiquement équilibré. Au cours des années, la plupart des études sur la dynamique de la régénération de la paroi cellulaire ont été menées en la levure, à cause de la capacité de certains de subir un changement à la levure mycélienne (Y/M), ce qui rend possible des études comparatives. Ces études ont cherché à comprendre les événements spécifiques de la synthèse de polymères de la paroi dans la régénération de protoplastes et les facteurs de régulation qui contrôlent leur séquence. Les données provenant des études antérieures ont indiqué que la première structure à assembler sur la surface des protoplastes de régénération est le réseau microfibrillaire de la chitine et du glucane synthétisé probablement par des enzymes associées à la membrane plasmique (Van der Valk et Wessels 1976; 1977), et cet événement est généralement suivi par l'ensemble de la matrice amorphe (Necas 1971; Peberdy 1979 a). Dans une autre étude sur le *Candida albicans*, l'étape zymogène (lorsque les protoplastes se forment) a été associée à l'incorporation des quantités plus élevées de chitine synthétase dans la membrane cellulaire (Elorza *et al.*, 1983). La synthèse des protéines a été initiée dans les 40 premières minutes, et après quelques heures, la chitine est le polymère le plus abondant dans la paroi aberrante des protoplastes en régénération (Elorza *et al.*, 1983). Plus récemment, des mesures quantitatives de la fluorescence émise par chaque protoplaste du *C. albicans* ont indiqué que la chitine et mannoprotéines sont parmi les premiers éléments à fixer sur les protoplastes régénérant suivies par les glucanes (Rico *et al.*, 1997).

La base génétique de la régénération de protoplastes est une série d'interactions complexes de plusieurs facteurs et une meilleure compréhension de ce processus, il faudra attendre d'autres recherches.

2.9. Les applications de fusion des protoplastes

Par fusion de protoplaste, il est possible de transférer certains gènes utiles telle que la résistance aux maladies, fixation de l'azote, taux de croissance rapide, plus de taux de formation de produit, qualité de la protéine, résistance au gel, résistance à la sécheresse, la résistance aux herbicides, la chaleur et la résistance au froid d'une espèce à une autre. La

fusion de protoplastes un des outils importants dans l'amélioration des souches pour amener les recombinaisons génétiques et le développement des souches hybrides. La fusion de protoplaste a été employée pour combiner des gènes de différents organismes pour créer des souches avec les propriétés désirées. Ce sont les techniques puissantes pour l'ingénierie des souches microbiennes pour les propriétés industrielles souhaitables. Cette technique continue pour être domaine de recherche existant en biotechnologie moderne et l'un des outils de recherche les plus fréquemment utilisés par les cultivateurs de tissu, les biologistes moléculaires, les ingénieurs et les chercheurs biochimiques et les biotechnologues.

La fusion de protoplastes devient un outil important de la manipulation génétique, car il répartition des obstacles à l'échange génétique imposée par les systèmes de reproduction classiques. La technique de la fusion des protoplastes a un grand potentiel pour l'analyse génétique et d'amélioration de la souche. Il est particulièrement utile pour les microorganismes utiles industriellement (Murlidhar et Panda, 2000). Cet avis décrit la technologie de la fusion de protoplastes et de ses applications biotechnologiques. Dans ce qui suit, quelques exemples de l'application de la technique de la fusion des protoplastes :

- **Transfert de cyto-organelles entre les différentes espèces des champignons :**

-Mitochondries : Une oligomycine résistant a été transféré entre deux espèces *d'Aspergillus* (Croft et al., 1980).

-Transfert des éléments génétiques cytoplasmiques (Ferenczy, 1985).

- **Amélioration des souches dans les champignons filamenteux**

-Des nouvelles souches de fusion pour une utilisation dans l'industrie laitière (Reymond et Fevne, 1986).

-Renforcement la stabilité des souches fusant (Tahoum, 1993).

- **Développement des souches hyperproducteurs**

-Une nouvelle souche produisant de l'acide citrique à partir de la xylose (Nippon, 1983).

-Des nouvelles souches de production d'éthanol à partir de cellulose (Kumari et Panda, 1994).

-Augmentation de la production d'antibiotiques dans des variantes de *Penicillium sp.* (Sotnikova et al., 1988).

-La production d'enzymes accrue que la souche parentale (Dasetal., 1989).

-Génération des hybrides interspécifiques avec une activité cellulolytiques élevée (Kim *et al.*, 1987).

-La production d'acide citrique : majoration suivant la fusion des protoplastes (Kirimura *et al.*, 1988).

La fusion des protoplastes peut être utilisé pour produire à haut rendement des souches stables des champignons qui peuvent se développer sur le substrat disponible à bon marché tels que les déchets agro pour produire des produits, y compris les antibiotiques de sorte que le coût du produit est considérablement réduite au profit de l'humanité. La technique de fusion peut être utilisée pour produire des nouvelles classes des molécules importantes sur le plan thérapeutique. Plus de recherche doit être effectuée pour le développement des techniques de mutation et de dépistage actuellement disponibles pour accélérer les études de fusion.

*Matériel et
méthodes*

3. Matériel et Méthodes :

Ce travail est réalisé au niveau du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri, Constantine1. Il repose sur l'étude de l'amélioration de la production de métabolites secondaires, particulièrement, l'éthanol sur un milieu riche en cellulose. La technique de fusion de protoplastes est appliquée pour cet objectif et ce, entre deux souches fongiques; *Saccharomyces cerevisiae* et *Trichoderma sp.* fournies par le même laboratoire.

3.1. Caractères cultureux et morphologiques des souches fongiques

3.1.1. La souche de *Trichoderma sp.*

Les caractères cultureux de *Trichoderma sp.* à savoir ; la vitesse de croissance, la couleur, l'aspect, la texture, sont déterminés après ensemencement de la souche sur gélose SAB, et incubation pendant 5 jours à 30°C.

Cependant, les caractères morphologiques de la même souche sont étudiés sous microscope optique, en se basant sur la technique de coloration avec le lactophénol bleu coton. Pour ce faire, un échantillon de la culture de *Trichoderma sp.* âgée de 5 jours est prélevé superficiellement à l'aide d'une anse de platine puis déposé sur une lame, en ajoutant deux gouttes de lactophénol bleu coton. En fin, la lame est recouverte par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air. L'observation de la souche en question, est faite à l'aide d'un microscope optique à différents grossissements (Botton *et al*, 1990).

3.1.2. La souche de *Saccharomyces cerevisiae*

L'aspect macroscopique de *S. cerevisiae* est observé directement sur la gélose OGA après 24 h d'incubation. Cependant, l'étude microscopique est effectuée pour déterminer la forme des cellules, en appliquant la technique d'observation à l'état frais. Cette dernière consiste à déposer une goutte d'eau distillée stérile sur la lame, puis apporter et dissocier dans la goutte un prélèvement de la colonie levurienne, recouvrir la lame par une lamelle puis observer au microscope optique à différents grossissements (Carip, 2008).

3.2. Libération des protoplastes

3.2.1. Libération des protoplastes de *Trichoderma sp.*

La libération des protoplastes des microorganismes est une technique délicate qui nécessite la dégradation de la paroi microbienne par l'implication d'enzymes. Dans ce travail, les enzymes utilisées sont obtenues à partir d'une bactérie fournie par le LaMyBAM; il s'agit de *Bacillus subtilis*. Cette dernière est connue par sa capacité de production de cellulase et de protéase (Youcef-Ali *et al.*, 2014).

Pour ce faire, une inoculation de la bactérie est effectuée sur milieu liquide YPG à 28°C pendant 3 jours. Après incubation, la culture obtenue est centrifugée à 3700 rpm pendant 15 min, le surnageant obtenu est filtré à travers un microfiltre stérile de 0.45µm pour être utilisé par la suite dans la libération des Protoplastes (Robinson et Deacon, 2001).

Par ailleurs, une culture agitée de 4 jours de *Trichoderma sp.* est effectuée sur milieu liquide MEM dans une fiole de 250 ml à 30°C. Après le temps d'incubation, une filtration à travers du papier filtre stérile est indispensable pour récupérer la biomasse, suivie d'un rinçage avec un volume de 100 ml d'une solution MgSO₄ (0.6M). La biomasse est transférée dans un erlen de 250 ml contenant un volume de 40 ml d'un stabilisateur osmotique MgSO₄ (0.98M) additionné à un volume de 35 ml du surnageant bactérien et 50 ml du milieu MEM (le pH du mélange est fixé à 5.8). Cette préparation est incubée sous agitation permanente à 28°C jusqu'à libération de protoplastes. Un suivi microscopique de la présente expérience est effectué chaque 30 minute en utilisant le Lactophénol bleu coton pour faciliter l'observation. Cette dernière s'effectue dans une chambre d'incubation composée d'une lame en verre et trois lamelles selon la figure 1 afin de conserver l'intégrité des protoplastes (Robinson et Deacon, 2001) (figure 2).

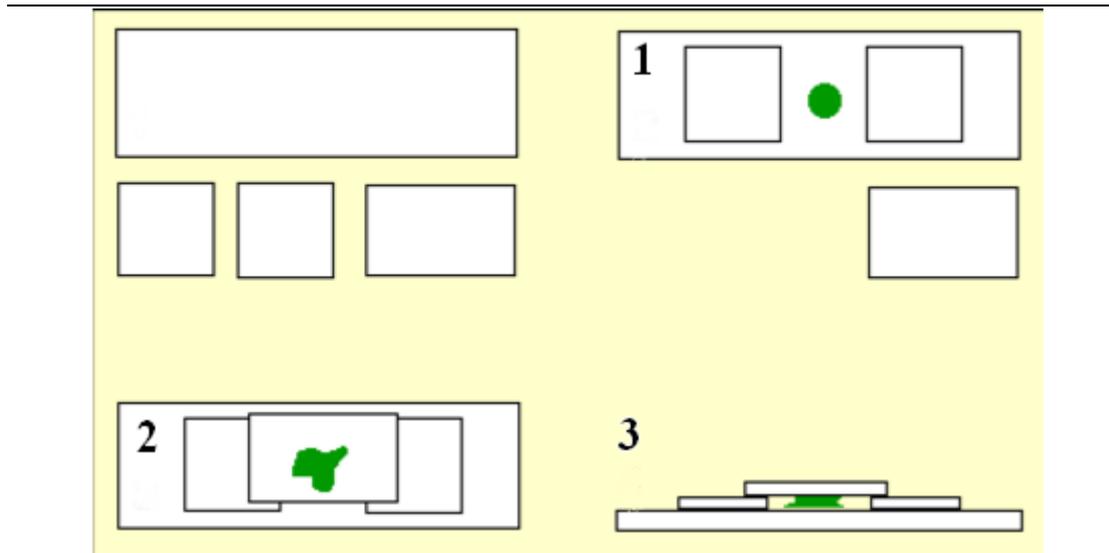


Figure 2 Technique d'observation microscopique des protoplastes « chambre humide »: (1) : deux lamelles sont placées séparément de 1 cm, une goutte de la suspension de protoplastes à étudier est déposée entre les deux lamelles ; (2) : une troisième lamelle est placée à cheval sur les deux premières ;(3) : préparation prête à observer (Chongbiaoet al., 1993).

2.2. Libération des protoplastes de *Saccharomyces cerevisiae*

Une culture levureienne est préparée en ensemençant des colonies de *S. cerevisiae* dans une fiole contenant 100 ml du milieu MEM puis incubée pendant 3 jours à 30°C sous agitation permanente. Après incubation, une centrifugation à 3700 rpm pendant 15 min est effectuée pour récupérer la biomasse (le culot), suivie d'un rinçage avec un volume de 100 ml d'une solution $MgSO_4$ (0.6M). Une centrifugation supplémentaire est effectuée afin de récupérer le culot. Ce dernier est transféré dans un erlen de 250 ml contenant un volume de 40 ml d'un stabilisateur osmotique $MgSO_4$ (0.98M) additionné à un volume de 35 ml du surnageant bactérien et 50 ml du milieu MEM (pH 5.8). Un suivi microscopique de la présente expérience est effectué chaque 30 min en utilisant le Lactophénol bleu coton pour faciliter l'observation (Robinson et Deacon, 2001).

3.3. Récupération des protoplastes

Pour la récupération des protoplastes libérés dans le milieu de culture, une filtration de la culture des protoplastes de *Trichoderma sp.* est faite sur papier Wathman de 0.45 μ m (pour séparer la biomasse des protoplastes en les rinçant avec du KCl 0.6M

(50ml) au cours de la filtration. Cependant, La culture de *Saccharomyces cerevisiae* a subit une centrifugation à 3700 rpm pendant 10 minute, le surnageant obtenu est mélangé avec 50 ml de KCl (0.6 M) et est soumis à une deuxième centrifugation (3700 rpm pendant 10 minute). Les échantillons obtenus sont centrifugés à 1800 rpm, à 4°C pendant 10 minutes. Cette opération sert à récupérer les protoplastes contenus dans les culots, ces derniers sont conservés dans un volume de 2 ml de stabilisateur osmotique NaCl 0.7M pour passer à la fusion entre les deux types des protoplastes (Lalithakumari, 2000).

3.4. Fusion des protoplastes obtenus

Un volume de 4 ml est obtenu après avoir effectué le mélange composé de 2 ml de protoplastes de chaque souche. Ce mélange est soumis à une centrifugation à 3500 rpm pendant 5 minutes, le culot obtenu est repris dans 1 ml de tampon de fusion le Poly-Ethylène-Glycol (PEG-6000) (30%) (Annexe 2). Après une incubation de 30 minutes à 30°C le processus de fusion est arrêté en ajoutant 5 ml de NaCl 0.7M. Une autre centrifugation à 3500 rpm pendant 10 minutes est effectuée pour la récupération finale des protoplastes contenus dans le culot (Larpent, 1997). Un examen microscopique est réalisé pour s'assurer de la fusion des protoplastes traités.

3.5. Régénération des protoplastes fusionnés

Pour pouvoir assurer la régénération des protoplastes fusionnés, une culture de ces derniers est faite par étalement sur un milieu gélosé complet (annexe 1) additionné de stabilisateurs osmotiques (MgSO₄ et KCl) (Larpent, 1997). L'aspect macroscopique et microscopique de la nouvelle souche obtenue (résultat de protoplastes fusionnés), est déterminé après 5 jours d'incubation à 30°C.

3.6. Conservation de la nouvelle souche

Les jeunes colonies sont prélevées à partir d'une boîte de Pétrie contenant le milieu de culture complet favorable pour leurs développement, puisensemencés dans des tubes inclinés contenant le même milieu, les tubes sont stockés au frigo à + 4° C.

3.7. Production d'éthanol sur milieu cellulosique

3.7.1. Test de production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* (technique des cloches)

Ce test a pour but d'étudier la capacité de *Saccharomyces cerevisiae* (souche commerciale) à dégrader la cellulose, contenue dans le milieu de culture, utilisée par la suite pour la production d'éthanol.

Pour ce faire, un volume de 2 ml de la suspension levurienne est ajouté à 8 ml du milieu minimal (annexe1) contenant la cellulose (papier) comme source de carbone (au lieu du glucose). Cette préparation, faite dans un tube à essai muni d'une cloche de Durham, est incubée à 30°C pendant 3 jours. Le test est considéré positif, s'il y a dégagement de gaz dans la clochette, perçu par la bulle d'air (Wickerham, 1951). Pour rappel, la production d'éthanol s'accompagne par la libération du CO₂, traduit par le dégagement du gaz dans les cloches.

3.7.2. Production d'éthanol par fermentation

Pour la production d'éthanol, la préparation de pré-culture est indispensable. Deux pré-cultures sont faites dans le présent travail, une à partir de *S. cerevisiae* seule (témoin) et l'autre à partir de la nouvelle souche (codée ST, voir partie résultat). Les deux préparations sont faites sur milieu MEM.

Cependant, deux nouveaux erlens contenant le milieu minimum à base de cellulose, sont préparés pour être inoculés avec un volume de 11 ml de chaque pré-culture préparée précédemment. Ces cultures sont incubées à 30°C pendant 3 jours (Yuan *et al.*, 2008).

3.7.3. Récupération de l'éthanol et comparaison du rendement (technique d'hydrodistillation)

L'hydrodistillation est un procédé très ancien permettant de séparer des substances d'une mixture liquide. En chauffant le liquide, les constituants se vaporisent selon leur température d'ébullition respective. Un condenseur permet de refroidir ces vapeurs

afin de récupérer ces substances dans des récipients appropriés (figure 3). Cette technique est couramment utilisée pour séparer et purifier l'éthanol du milieu de fermentation, sachant que la température d'ébullition de l'éthanol est de 78°C, et celle de l'eau est de 100°C.

Après écoulement de la fermentation, les cultures obtenues (*Saccharomyces* et ST) sont introduites dans le ballon, à col rodé, placé dans le dispositif précédent. Après chauffage à 78° C, les vapeurs d'éthanol commencent à monter dans la colonne de vigreux, et passent dans le réfrigérant à eau pour être récupéré par la suite dans l'eren approprié.

Pour la réussite de la manipulation, il est important que la température de chauffage n'arrive pas à 100°C sinon il y'aura une évaporation d'eau et l'éthanol produit ne sera plus pure (Grandbois, 2010).

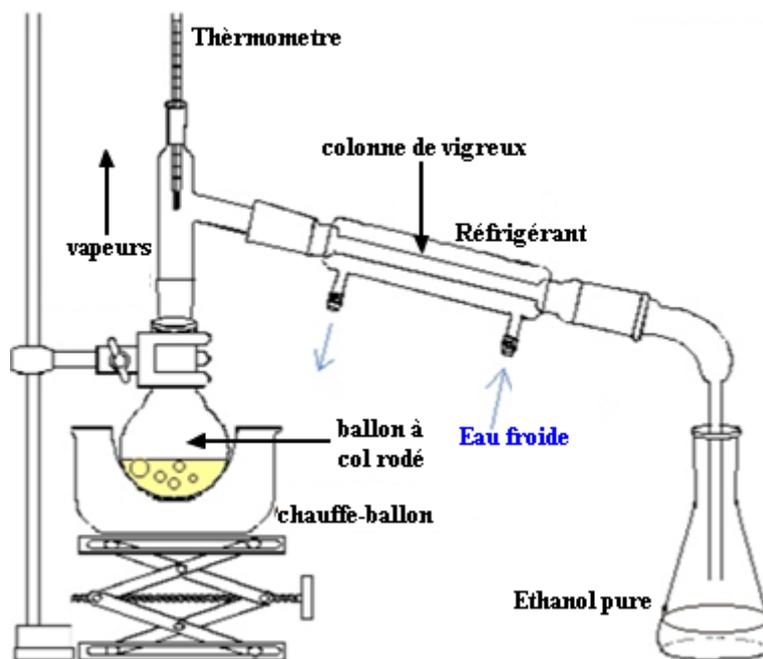


Figure 3 Récupération d'éthanol par la technique d'hydrodistillation en utilisant le montage de « cleverger » (Grandbois, 2010)

La confirmation de la présence d'éthanol dans la culture est faite par un test de présence de la flamme après contact du liquide (supposé être éthanol) avec le feu.

L'éthanol produit (ml/litre) (dans les deux expériences) est mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée. Le rendement de l'éthanol est interprété en g/litre, sachant que 1ml d'éthanol pur est égal à 0.789 g/l.

Résultats

4. Résultats

Le présent travail porte sur la technique de fusion de protoplastes entre deux souches fongiques afin de contribuer à l'amélioration de la production d'éthanol. Cette technique est appliquée sur *Saccharomyces cerevisiae* et *Trichoderma sp.*.

4.1. Etude morphologique des deux souches fongiques

L'étude morphologique de *S. cerevisiae* et de *Trichoderma sp.* a englobé un examen macroscopique sur gélose et un examen microscopique, comprenant une coloration avec du Lactophénol bleu coton pour la moisissure et une observation à l'état frais pour la levure.

4.1.1. Caractères morphologique de *Trichoderma sp.*

L'aspect macroscopique de *Trichoderma sp* est apprécié à partir de cultures sur milieu OGA appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques sont compactées en touffes et colorées en fonction de la pigmentation des phialide. Trois jours après sa germination, la conidie donne naissance à un mycélium d'abord blanc et stérile en forme de cercle. Deux jours plus tard, une couleur verte est visible sur les parties aériennes du mycélium, correspondant à la conidiogénèse. En forme de cercle les colonies sont d'aspect grumeleux, de couleur blanche et verte par endroit réparti de façon hétérogène et le revers est de couleur crème (figure 4).

L'étude microscopique a montré que le mycélium de *Trichoderma sp* composé d'hyphes jaunes, non septés, ramifiés à parois lisses à leur tour et des spores sous forme ronds et lisses.

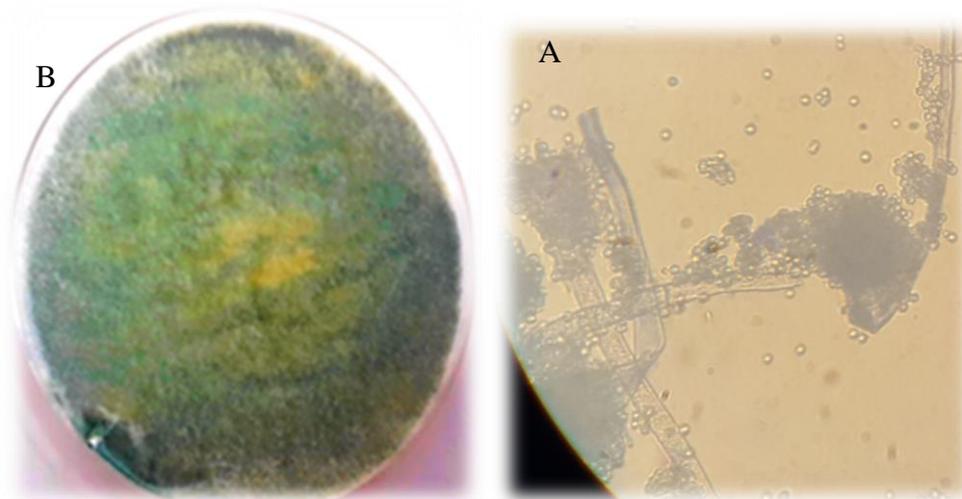


Figure 4 Aspects de la moisissure *Trichoderma sp.* sur : (A) gélose SAB ; (B) sous microscope optique (Grossissement X40).

4.1.2. Caractères morphologique de *saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* apparait sur le milieu OGA sous forme de petites colonies séparées, blanches et crémeuses, le revers est incolore. Cependant, l'examen microscopique de cette levure a révélé qu'elle est sous forme de grandes cellules rondes (figure 5).

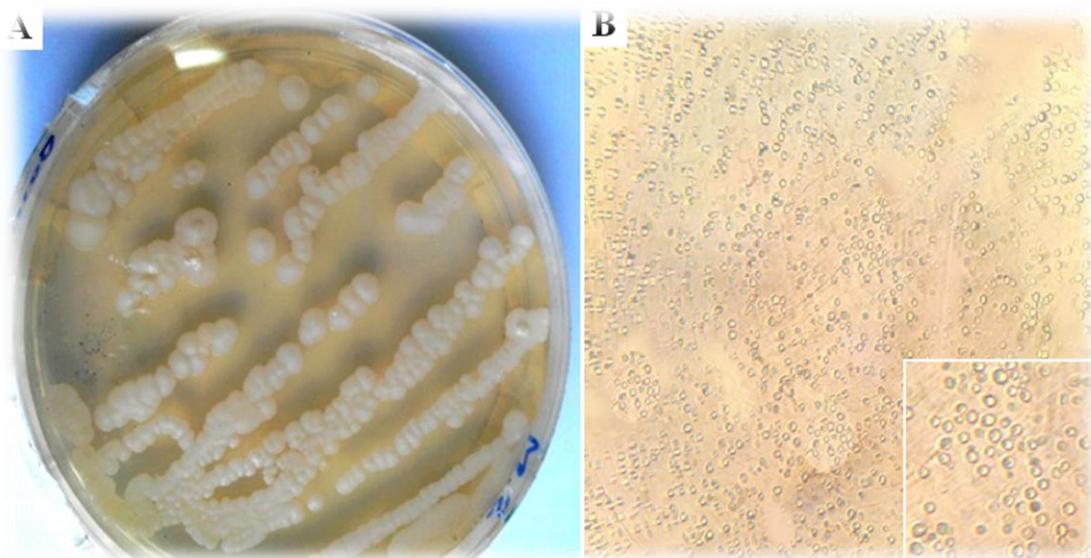
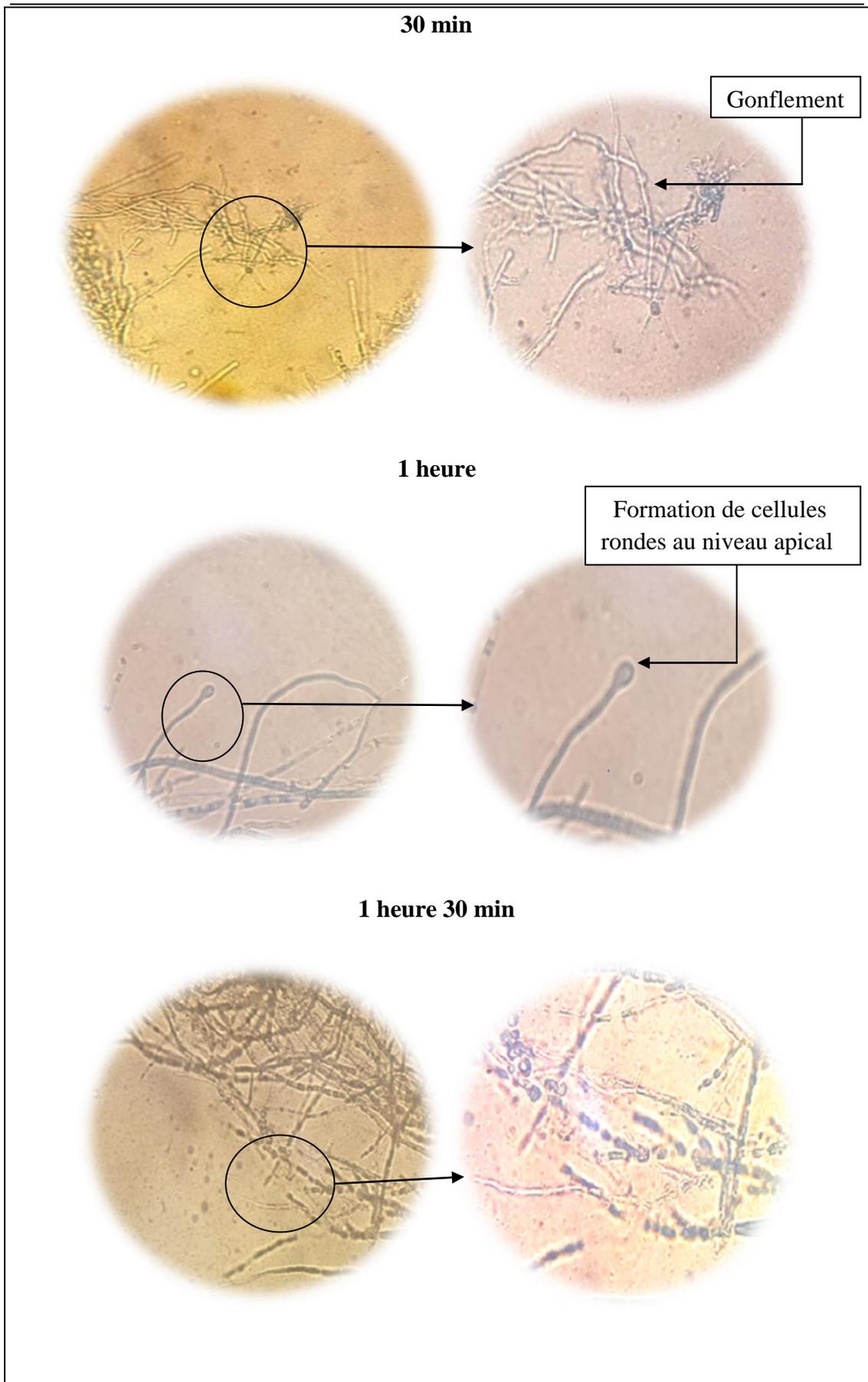


Figure 5 Aspect de la levure *S. cerevisiae* sur : (A) gélose OGA ; (B) sous microscope optique (Grossissement X40).

4.2. Libération des protoplastes

4.2.1. Libération des protoplastes de *Trichoderma sp.*

La culture de *trichoderma sp.* est réalisée sur un milieu de culture MEM en utilisant le $MgSO_4$ (0.98M) comme stabilisateur osmotique, le suivi microscopique a montré qu'après 30 minutes d'incubation, un épaississement dans la partie apicale du filament apparait ce changement est absent dans la culture témoin (*Trichoderma sp.* sur milieu MEM). Après une heure d'incubation, l'examen microscopique a montré la formation de cellules rondes au niveau apical du thalle. La troisième observation microscopique (après une heure et demis) a montré le même résultat. Des observations microscopiques successives chaque 30 minute, montrent un début de libération de protoplastes au niveau de la partie centrale de l'hyphe. Après trois heures d'incubation, une libération totale des protoplastes dans le milieu de culture est observée (figure 6).



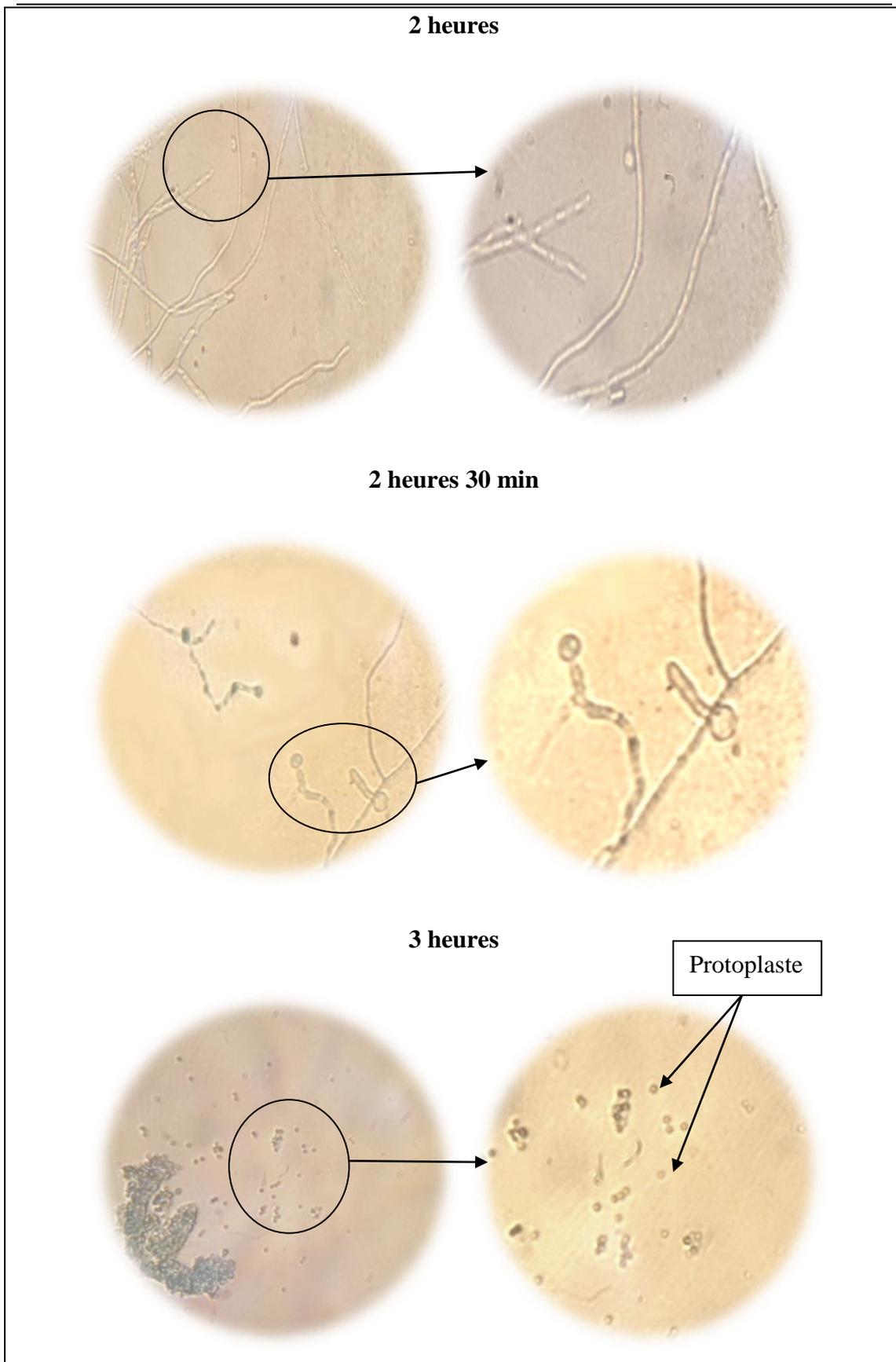
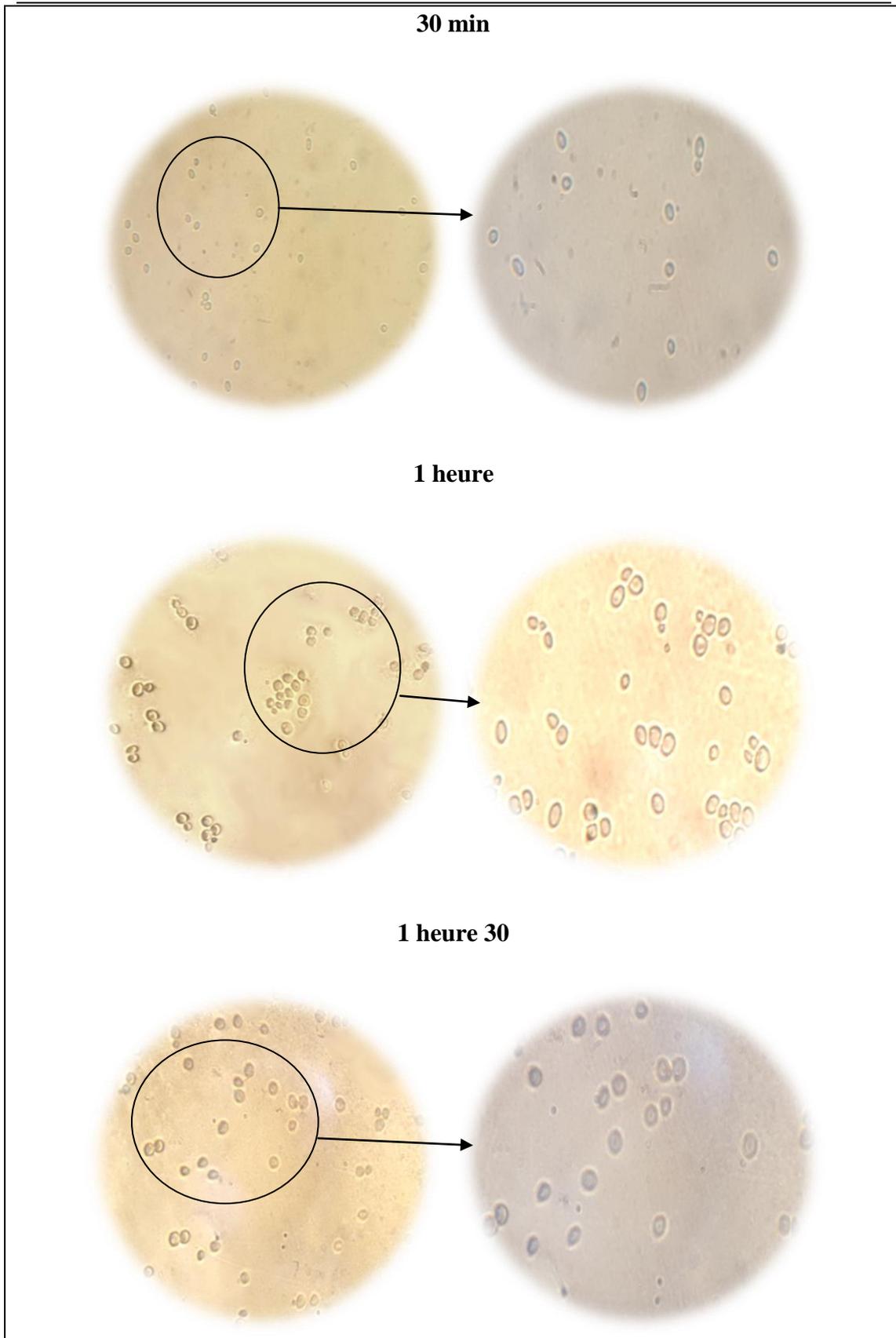


Figure 6 Suivi microscopique de la libération des protoplastes de *Trichoderma* sp. au grossissement X40.

4.2.2. Libération des protoplastes de *Saccharomyces cerevisiae*

Le suivi microscopique, effectué après 30 minutes d'incubation, n'a montré aucun changement par rapport au témoin (culture de *S. cerevisiae* sur milieu MEM). Après une heure d'incubation, un changement de diamètre des levures est observé. La troisième observation microscopique a montré le même résultat. Un suivi microscopique successif, chaque 30 minute, est effectués jusqu'à la libération totale des protoplastes dans le milieu de culture (figure 7).



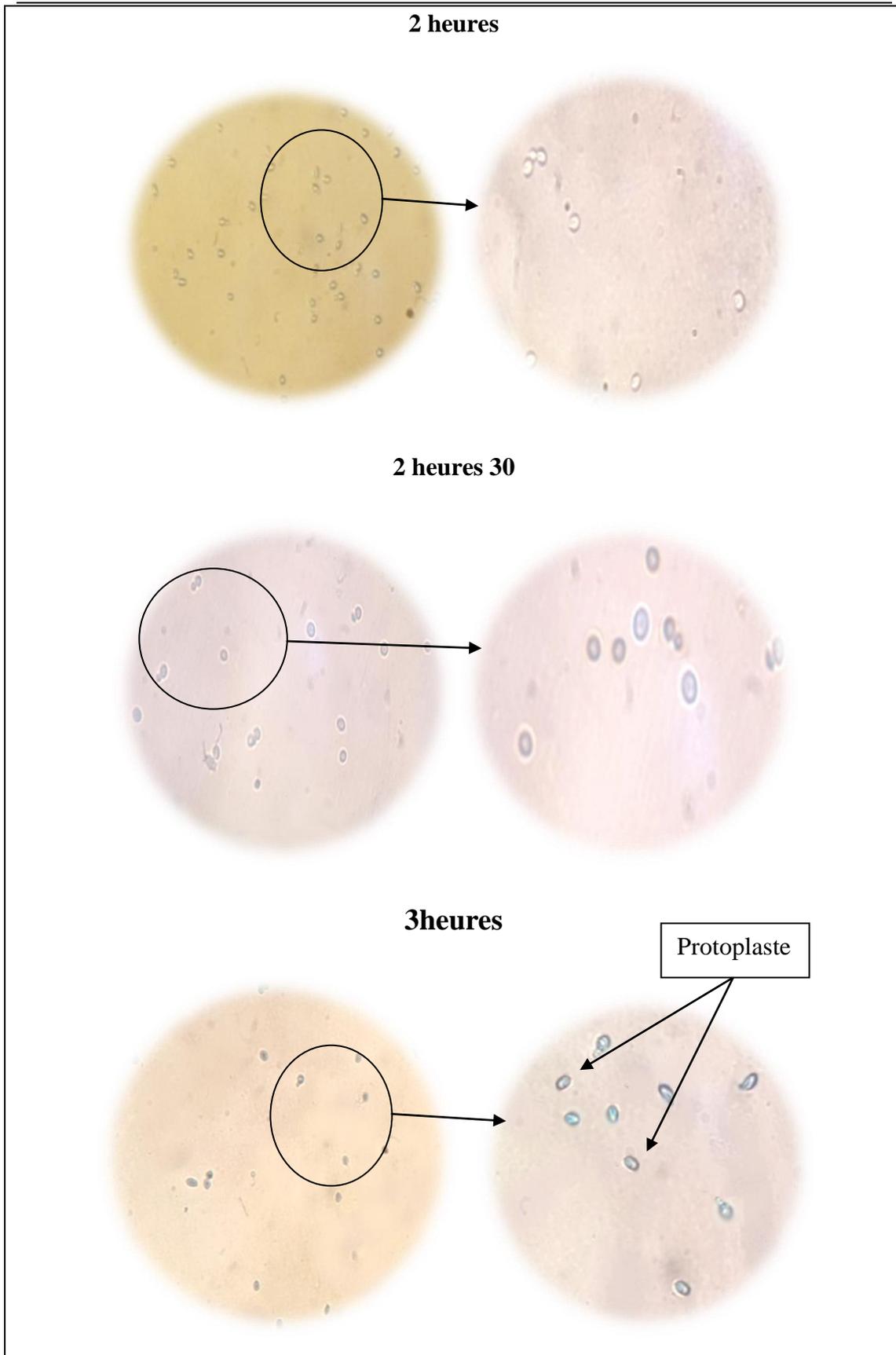


Figure 7 Suivi microscopique de la libération des protoplastes de *S. cerevisiae*. au grossissement X40.

4.3. Récupération des protoplastes

Après récupération des surnageants de culture de *Trichoderma sp.* et de *S. cerevisiae* contenant les protoplastes, un examen microscopique à différents grossissements, nous a permis de comparer les protoplastes libérés de *Trichoderma sp.* qui sont de grande taille, contrairement à ceux de *Saccharomyces cerevisiae* qui s'avèrent d'une petite taille (figure8).

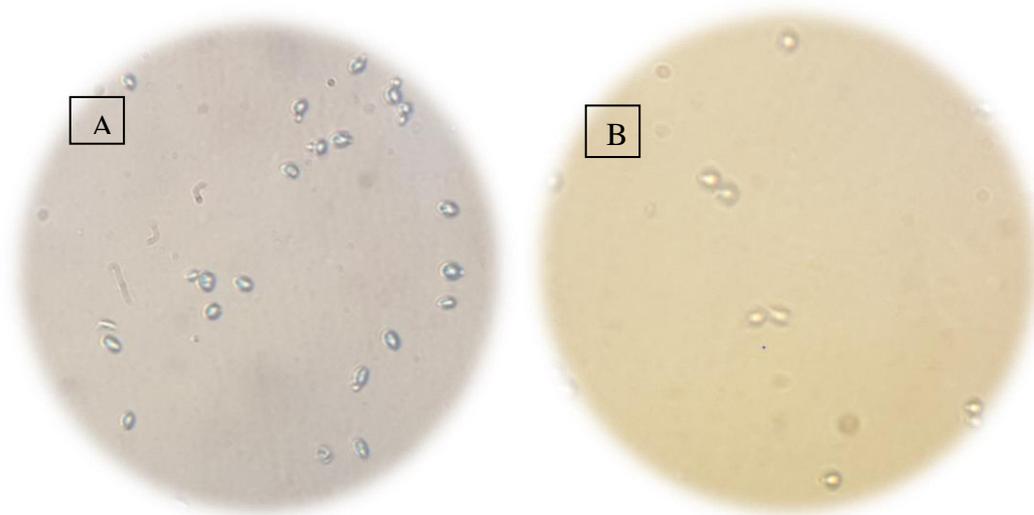


Figure 8 Comparaison des protoplastes des deux souches (A) les protoplastes de *S. cerevisiae* (B) les protoplastes de *Trichoderma sp.*.

4.4. Fusion des protoplastes obtenus

Après écoulement du temps d'incubation, nécessaire à la fusion des protoplastes de *Trichoderma sp.* et de *Saccharomyces cerevisiae*, un examen microscopique a montré l'efficacité de la technique appliquée pour cet objectif. Sous microscope, les cellules de protoplastes se rapproches les unes des autres, tout en fusionnant leurs membranes cytoplasmiques (figure 9).

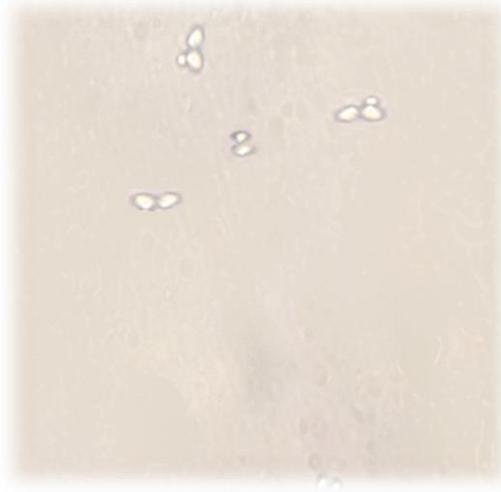


Figure 9 Les protoplastes fusionnés sous microscopie (Grossissement X40).

4.5. Régénération des protoplastes fusionnés

La régénération des protoplastes obtenus, effectué sur milieu complet, à 30°C pendant 5 jours, nous a permis de visualiser le développement d'une nouvelle souche codée ST. Cette dernière se présente sous forme de petites colonies crémeuses brillantes, de couleur beige. L'examen microscopique de la souche ST a révélé qu'elle est sous forme de cellules rondes, de petite taille (figure 10).

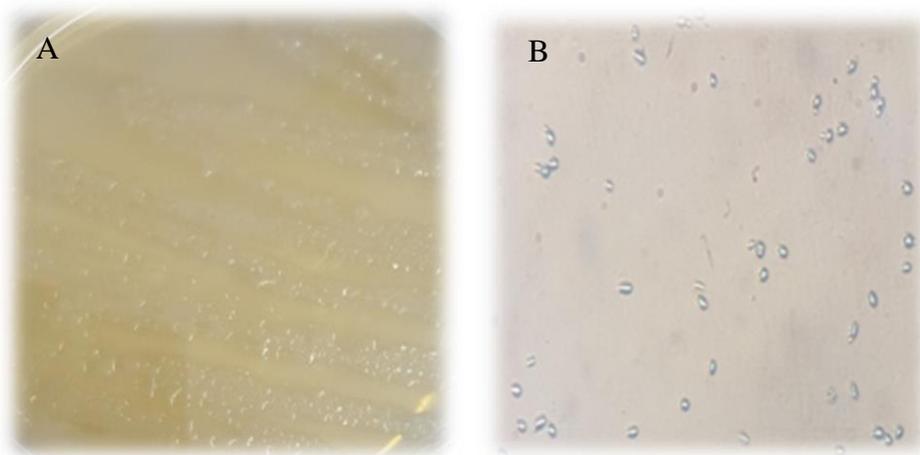


Figure 10 Aspect de la souche ST sur : (A) milieu complet ; (B) sous microscope optique (Grossissement X40).

4.6. Production d'éthanol sur milieu cellulosique

4.6.1. Test de production d'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* (technique des cloches)

Après inoculation de la levure dans un milieu minimum à base de cellulose et incubation à 30°C durant 3 jours, le résultat a montré la présence de bulle de gaz dans la cloche de Durham signifiant la présence d'éthanol. Cette constatation confirme la capacité de *S. cerevisiae* à dégrader la cellulose en glucose pour l'utiliser dans la production d'éthanol (figure 11).

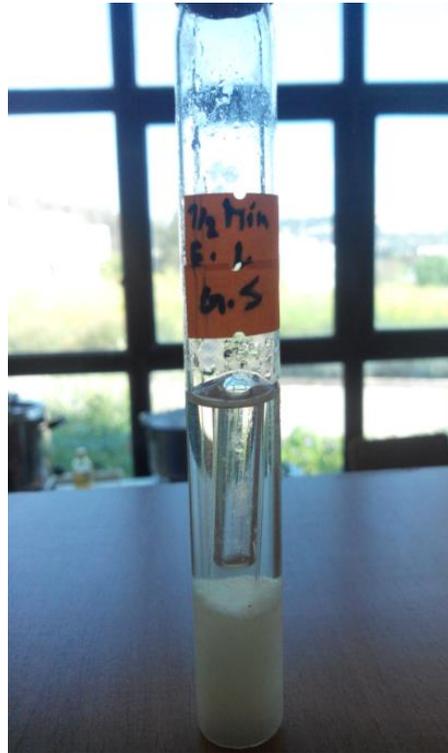


Figure 11 Quantité de gaz dégagé dans la cloche du Durham par *S.cerevisiae* sur milieu à base de cellulose.

4.6.2. Récupération de l'éthanol et comparaison du rendement (technique d'hydrodistillation)

Le résultat obtenu a montré l'efficacité des protocoles utilisés dans ce travail, Ceci est assuré par la comparaison de la quantité finale d'éthanol obtenue après la purification de ce dernier à partir du milieu de fermentation à une température d'ébullition qui ne dépasse pas les 78°C.

En effet, la quantité d'éthanol produite par *S. cerevisiae* sur milieu de culture préparé à base de cellulose comme seule source de carbone est de 3.8 ml (figure 12), En terme de quantité, la production d'éthanol par la souche ST sur ce substrat est supérieure à celle produite par *S. cerevisiae* estimée à 6.3 ml (figure13).

Le rendement de l'éthanol en g/litre selon la formule citée dans la partie matériel et méthodes est de 29.88 g/l pour *S. cerevisiae*, et de 49.70 g/l pour la souche ST.

La confirmation de la présence d'éthanol pure est faite par un test de présence de la flamme après contact du liquide, supposé être de l'éthanol, avec le feu. Ce test est considéré positif (figure) ce qui prouve que le produit obtenu est bien de l'éthanol.

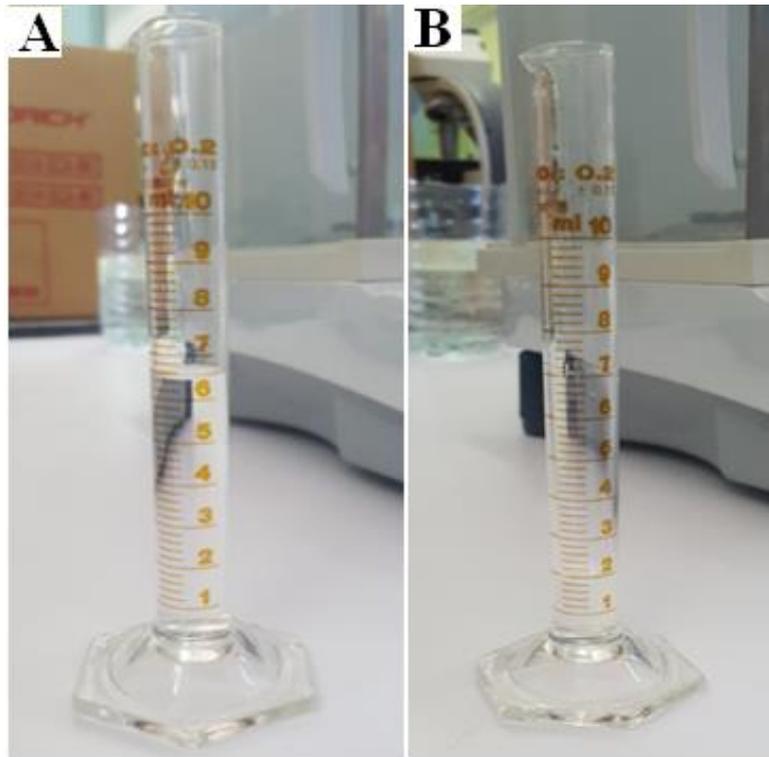


Figure 12 Quantité d'éthanol produite sur milieu minimum à base de cellulose (A) : par *S. cerevisiae*; (B) : par la souche ST.

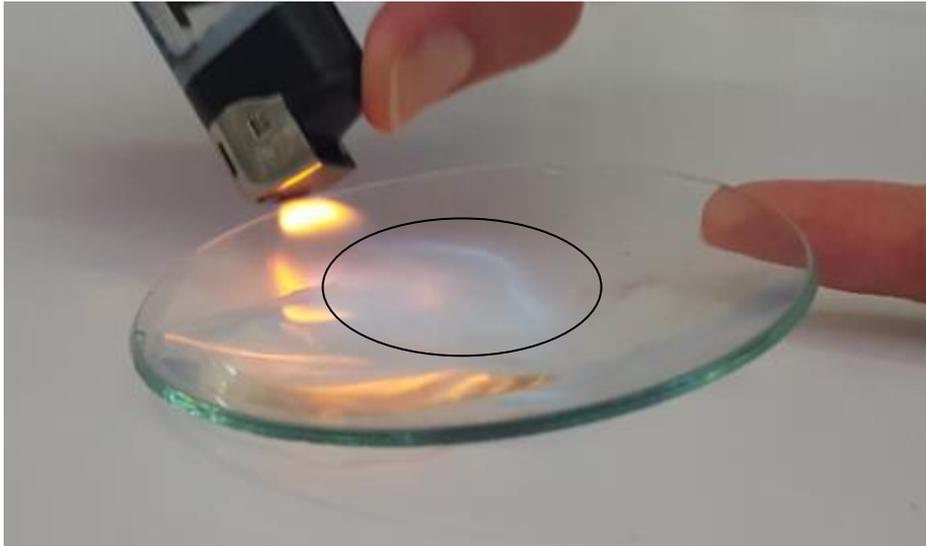


Figure 13 Test de confirmation de la présence d'éthanol, présence de flamme.

Discussion

5. Discussion

La technique de fusion de protoplastes a été récemment démontrée par une méthode efficace pour l'amélioration du rendement des micro-organismes industriellement importants. Plusieurs rapports ont suggéré la possibilité d'améliorer les caractéristiques de certains micro-organismes tels que *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, Ainsi que certaines souches de levures, notamment *Saccharomyces cerevisiae*.

L'éthanol est produit par la fermentation de sucres par la levure *S. cerevisiae*, ceci n'est possible qu'à partir de sucres simples essentiellement, le glucose. La cellulose est composée de glucides complexes, pour la transformer en substrat simple, un complexe d'enzymes cellulolytiques microbien doit être présent. Ces enzymes sont efficaces pour transformer la cellulose en glucose, utilisable par la levure pour produire de l'éthanol (Kolot, 1980).

Les cellulases sont synthétisées par deux types de micro-organismes, les bactéries et les moisissures. Parmi les moisissures mises en évidence pour la production d'enzymes cellulolytiques, un organisme a été plus particulièrement étudié : *Trichoderma sp.* connu par son complexe cellulasique performant.

Dans ce but, on peut proposer une stratégie pour combiner les propriétés de *Trichoderma sp.*, hyper productrice de cellulase, et de *Saccharomyces cerevisiae*, producteur commercialement important d'éthanol à partir de sucres. Par conséquent, une culture mixte de protoplastes de *Trichoderma sp.* et de *S. cerevisiae* a été tentée dans le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), ce qui a donné lieu à l'étude de l'amélioration de la production d'éthanol à partir de matières cellulosiques.

Pour rappel, la stratégie de notre travail repose sur 4 axes principaux :

- Libération des protoplastes de chaque souche fongique ;
- Fusion de protoplastes entre les deux souches fongiques ;
- Régénération et détermination des caractères morphologiques de la nouvelle souche obtenue;
- Production et quantification d'éthanol sur milieu cellulosique par *S. cerevisiae* et la nouvelle souche ST.

Dans le présent travail, la libération des protoplastes de *Trichoderma sp.*, commence au niveau de la partie apicale de l'hyphe, et après un bon moment elle engendre le centre. Cependant, et pour *S. cerevisiae*, la libération s'accompagne par un changement de sa forme qui devient ronde. Dilip, (2004) indique dans son travail que la libération des protoplastes chez les moisissures débute au niveau de l'apex car il représente la partie jeune du filament puis passe à la partie centrale qui est la partie vieille de la moisissure, ces constatations sont similaires à celles retrouvées dans plusieurs travaux réalisés sur différentes souches tels que *Pleurotus pulmonarius* et *Pleurotus florida* (Zhao et Chang, 1993); *Trichoderma viride* (Mrinalini et Lalithakumari, 1998); *Trichoderma harzianum* (Lalithakumari et Mathivanan, 2003) et *Aspergillus sp.* (Rupinder, *et al.*, 2005). Par contre, pour les levures une petite lésion au niveau de la paroi s'élargit jusqu'à la libération totale des protoplastes (Dilip, 2004).

Pour la libération des protoplastes, il est important que la paroi cellulaire des micro-organismes soit dégradée. Donc, diverses enzymes doivent être utilisées pour cet objectif. En effet, depuis plusieurs années, la préparation de jus digestif de l'escargot *Helix pomatia* a été utilisé pour dégrader la paroi et obtenir les protoplastes de *Neurospora crassa* (Emerson et Emerson, 1958), de *Geotrichum candidum* (Ferenczy *et al.*, 1974) et *Aspergillus nidulans* (Ferenczy *et al.*, 1975). Aussi, des enzymes Mycolytique, obtenues à partir de bactéries ; *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* (Doi *et al.*, 1971; Kitamura *et al.*, 1974) et de champignons ; *Trichoderma* (de Vries et Wessels, 1973 ; Benitez *et al.*, 1975 a,b) et *Aspergillus* (Isaac et Gokhle, 1982) sont également des sources utilisées pour produire les protoplastes des champignons. Dans ce travail, les enzymes utilisées pour le but de la libération des protoplastes sont issues d'une bactérie *Basillus subtilis* (Youcef Ali *et al.*, 2014), connue pour sa capacité de sécrétion d'enzymes à large spectre d'activité biologique.

Cependant, puisque, les protoplastes sphériques sont osmotiquement fragiles et s'éclatent facilement (Robinson et Deacon, 2001), des stabilisateurs organiques ou inorganiques doivent être ajoutés au milieu pour aider à maintenir leur morphologie (Dilip, 2004). En effet, Chauhan et ses collaborateurs(2006) confirment que si les cellules fongiques sont placées dans une solution hypotonique (plus diluée), les cellules traitées aux enzymes digestives de la paroi perdent leur résistance à la pression osmotique interne et éclatent. Pour cela, dans ce travail les cellules fongiques sont incubées en présence d'enzymes lytiques dans une solution isotonique de $MgSO_4$ (stabilisateur osmotique) et sont transformées en protoplastes qui survivent aussi longtemps que l'isotonie est maintenue. Le même principe est suivi par

plusieurs recherches qui s'intéressent à la libération des protoplastes fongiques tels que les travaux de Gupta *et al.*, (1997), Chitnis et Deshpande, (2002). D'autres travaux ont été fait par Das *et al.*, 1989, Mrinalini et Lalithakumari, 1998, Lalithakumari, (2000), qui ont utilisé le KCl comme stabilisateur osmotique au lieu du $MgSO_4$.

D'autres paramètres tels que le pH et la température influencent également sur la production des protoplastes et spécifiquement sur les activités des enzymes lytiques et de stabilisateurs osmotiques. Dans ce travail, ces paramètres ont été choisis d'après l'étude effectuée par Robinson et Deacon, (2001) ; qui ont étudié les variations de chaque paramètre de libération : température, pH, stabilisateur osmotique, quantité de biomasse et l'âge de la culture fongique.

En effet, une température plus élevée que l'optimale peut provoquer l'agglutination des organites dans les protoplastes isolés, tandis que la basse température affecte la stabilité de la membrane des protoplastes. La température à laquelle les champignons perdent leur paroi cellulaire par enzymolyse varie entre 24°C et 35°C. La valeur du pH est également un facteur important qui affecte la libération de protoplastes à cause de son effet sur l'activité enzymatique (Chauhan *et al.*, 2006).

Cependant, la technique de la fusion de protoplastes peut se produire naturellement, mais la fréquence est faible. En ce qui concerne la fusion induite, le Poly-éthylène-Glycol (PEG), un fusagen connu pour les protoplastes végétaux (Kao et Michaylink 1974), peut être adapté avec succès pour les champignons (Anne et Peberdy, 1976). En effet, le PEG est impliqué dans la formation des liaisons hydrogènes par lui-même ou en présence de Ca^{++2} ions entre les membranes cellulaires (Peberdy, 1979b).

Afin de déterminer les conditions optimales pour la fusion des protoplastes induite, une étude approfondie a été réalisée par Anne et Peberdy, (1975) en utilisant des auxotrophes de *Penicillium chrysogenum*. Les mêmes auteurs ont rapporté que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le PEG 6000 à 30% (p/v) est additionné au Ca^{++2} sous forme de $CaCl_2$ (10 mM) en milieu alcalin. Aujourd'hui, presque tous les laboratoires utilisent ces conditions avec des modifications occasionnelles pour des fusions de protoplastes réussies (Brauer et Robbers 1987; Martinkova *et al.*, 1990 ; Couteaudier *et al.*, 1996; Ogawa *et al.*, 2000 ; Lalithakumari, 2000; Lalithakumari et Mathivanan, 2003). Une fois que les produits de fusion sont obtenus, ils sont récupérés et analysés en utilisant plusieurs techniques sélectives.

Cependant, le succès de toute expérience impliquant des protoplastes dépend de leur capacité de se régénérer par le cytokinèse et former une croissance coloniale visible sur un milieu gélosé osmotiquement équilibré. Dans ce travail, le milieu utilisé pour ce but est le milieu complet additionné de KCl et MgSO₄, ce choix est fait en se référant au travail d'Anjanikumari et Panda, (1994) et Ahmed, (2006).

La recombinaison entre *S. cerevisiae* et *Trichoderma sp.* est traduite par un développement d'une nouvelle souche, codée ST. Cette dernière se présente, sur gélose, sous forme de colonies beiges crémeuses brillantes, sous microscope elle apparaît sous forme de cellules rondes, de petite taille.

En complément, l'étude de la production d'éthanol sur milieu à base de cellulose par la souche de *S. cerevisiae* et par la souche ST, a montré une différence remarquable dans la quantité d'éthanol produite (presque le double) à savoir ; 3,8 ml pour *S. cerevisiae* et 6,3 ml pour la souche ST. En contre partie, Anjani et Panda, (1994) ont tenté de fusionner des protoplastes fongiques pour le même objectif, mais aucune amélioration n'a été observée par rapport à la quantité d'éthanol produite, selon les mêmes auteurs, cela est dû aux paramètres de fermentation qui ne sont pas, peut être, optimale pour la nouvelle souche obtenue. La littérature consultée ne fournit pas assez d'informations sur la production d'éthanol par des souches recombinées.

Dans notre travail, l'amélioration de production d'éthanol par la souche ST signifie la réussite de recombinaison des propriétés de *Trichoderma sp.* et de *S. cerevisiae* désirés. En effet, *Trichoderma sp.* a la capacité de dégrader la cellulose par son complexe enzymatique. La cellulase permet de dégrader la cellulose en des dimères de glucose dit cellobiose (n+2 unité de glucose) liées les uns aux autres avec des liaisons β 1-4, ensuite, la β -glucosidase casse ces liaisons pour libérer les unités de glucose. Nous considérons que nos résultats sont importants et précieux du point de vue biotechnologique et nécessitent une étude plus approfondie pour les mettre plus en valeur.

*Conclusion et
perspectives*

6. Conclusion et perspectives

Dans ce travail, la libération de protoplastes des deux souches fongiques en l'occurrence ; *Saccharomyces cerevisiae* et *Trichoderma sp.* est effectuée par l'action du filtrat de culture d'une souche de *Bacillus subtilis* (Youcef Ali *et al.*, 2014), riche en enzymes, sur la paroi fongique additionné au stabilisateur osmotique ($MgSO_4$) dans le milieu de culture MEM. Les protoplastes, ainsi, libérés de *Trichoderma sp.* sont de grande taille, contrairement à ceux de *Saccharomyces cerevisiae* qui s'avèrent d'une taille moins importante. L'examen microscopique, effectué chaque 30 minutes, nous a permis de suivre ce phénomène depuis le commencement du changement morphologique des cellules fongiques jusqu'à la libération complète de leurs protoplastes.

Dans une deuxième étape, la fusion des protoplastes de *Trichoderma sp.* et de *Saccharomyces cerevisiae*, réalisée avec du Poly-éthylène-glycol (PEG), a montré que sous microscope les cellules de protoplastes se rapproches les unes des autres, tout en fusionnant leurs membranes cytoplasmiques. Il s'est avéré que l'utilisation du PEG est efficace pour la réussite de la fusion, car il déstabilise de façon réversible les membranes plasmiques, tout en permettant le transfert de matériel cytoplasmique au travers de la membrane.

Les protoplastes isolés sont susceptibles de régénérer une nouvelle paroi et donc de redonner des cellules complètes, cela nécessite des milieux nutritifs complexes. Dans notre travail, la régénération des protoplastes est effectuée sur milieu complet additionné de stabilisateurs osmotiques ($MgSO_4$ et KCl), l'examen macroscopique a permis de visualiser le développement d'une nouvelle souche codée ST, qui se présente sous forme de petites colonies visqueuses de couleur beige. Cependant l'examen microscopie a révélé qu'elle est sous forme de cellules rondes, de taille petite.

Enfin, et dans le but d'une amélioration de production de métabolites secondaire à savoir, l'éthanol, une fermentation sur milieu à base cellulosique est lancée avec *S. cerevisiae* d'une part, et la nouvelle souche ST d'autre part. En effet, la quantité d'éthanol produite par *S. cerevisiae* sur un milieu de culture à base de cellulose est de **29.88g/l**, par contre la quantité d'éthanol produite par la souche ST sur le même milieu est estimée à **49.70 g/l**. Ces constatations indiquent que la nouvelle souche a réuni les caractéristiques métaboliques de *Trichoderma sp.* (production de l'enzyme cellulase et transformation de la cellulose en glucose fermentescible) et celles de *S. cerevisiae* (production d'éthanol à partir du glucose). De ce fait, la nouvelle souche ST a montré qu'elle est capable de dégrader la cellulose du

milieu en glucose et l'utiliser par la suite pour la production d'éthanol avec des quantités beaucoup plus importantes que celle produites avec la souche commerciale; *S. cerevisiae*.

Perspectives

Au terme de cette recherche nous pouvons nous fixer les points suivants comme perspectives :

- Identification complète de *Trichoderma sp.* et de la nouvelle souche ST par voie moléculaire ;
- Utilisation des techniques de marquage génétique pour perfectionner la fusion de protoplastes fongiques ;
- Exploitation de déchets cellulosiques dans le but d'une production industrielle d'éthanol par la souche ST;
- Détection et quantification d'éthanol par des techniques plus performantes (HPLC, CPG...).

Résumé

ملخص

ينتج عن تحطيم الجدار الخلوي للفطر من نوع *Trichoderma sp.* و الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*، تحرير البروتوبلاست و ذلك عن طريق إنزيمات مستخلصة من بكتيريا *Bacillus*. بالنسبة لفطر *Trichoderma sp.*، التحرير يبدأ بانتفاخ في المنطقة القمية الحديثة متنوع بتشكيل خلايا مستديرة في نفس المنطقة. بعد ساعتين، لوحظ بداية تحرير بروتوبلاست في المنطقة المركزية للخيوط الفطرية. من جهة أخرى، يتم تحرير بروتوبلاست الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* بعد التغيير في قطر الخلية في وسط الزرع.

إن اندماج البروتوبلاست بين الفطر *Trichoderma sp.* و الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* يتم بواسطة بولي-اتيلان-جليكول PEG مما سمح بالحصول على خلية جديدة المرمزة ب-ST. هذه الأخيرة تتطور في وسط زرع كامل على شكل مستعمرات لزجة ذات لون بيج، تحت المجهر تظهر على شكل خلايا صغيرة و مستديرة.

إن دراسات الإنتاج للإيثانول عن طريق الخميرة و عن طريق الخلايا الجديدة، بهدف المقارنة في الإنتاج و ذلك في وسط زرع غني بالسيليلوز. وتشير النتائج التي توصلنا إليها بعد 3 أيام من التخمير، خميرة *Saccharomyces cerevisiae* تقوم بتحليل السيليلوز إلى جلوكوز وتنتج كمية الإيثانول ما يعادل 29.88 غ / لتر، في حين تنتج سلالة ST كمية أكبر بكثير، تقدر بـ 49.70 غ / لتر. هذه النتائج مشجعة وأثبتت فعالية تقنية اندماج البروتوبلاست بهدف تحسين النواتج الأيضية الثانوية هامة في المجال الصناعي بما ذلك؛ الإيثانول.

كلمات البحث: *Trichoderma sp.* ، *Saccharomyces cerevisiae*. الاندماج البروتوبلاست، الإيثانول، السيليلوز.

Abstract

The destruction of the cell wall of *Trichoderma sp.* and *Saccharomyces cerevisiae* causes the release of their protoplasts, and this is by the action of enzymes secreted by *Bacillus* used in this work. Indeed, the liberation of *Trichoderma sp.*'s protoplasts begins with a thickening in the apical part of the filament, followed by the formation of round cells. After 2 hours, the protoplast's liberation begins at the central part of the hyphae followed by a total release of protoplasts in the culture medium. On the other hand, the release of *S. cerevisiae* protoplasts begins with a change in its diameter followed by complete liberation of protoplasts in the culture medium.

However, protoplast fusion between the two fungal strains in question, made with Poly Ethylene Glycol (PEG), allowed us to obtain a new strain, coded ST. Those new cells appear on the complete medium, as small slimy colonies of beige color. Under the microscope, it appeared as small round cells.

Moreover, the study of ethanol production by commercial strain *S. cerevisiae* and ST strain, in purposes of performance comparison, is made on a cellulose medium. Our results show that after 3 days of fermentation, *S. cerevisiae* has degraded cellulose to glucose and produced an quantity of ethanol equal to 29.88 g / l, while the ST strain has produced a higher quantity, estimated at 49.70g / l. These results are encouraging and demonstrate the effectiveness of protoplast fusion with an aim of improving the production of secondary metabolites, including; ethanol.

Keywords: *Trichoderma sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, protoplast fusion, ethanol, cellulose..

*Références
bibliographique*

Anjani J Kumari and T.Panda. Division of biochemical engineering department of chemical engineering. Madras, India 1994

Anjanikumari, J. and Panda, T. Analysis of factors responsible to the regeneration to intact cells from sphaeroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eng* 1994,10, P 15-20.

Anne J and Peberdy JF (1976). Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. *Arch Microbiol* 105:201–205.

Bachmann BJ and Bonner DM (1959). Protoplasts from *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 78:550–556.

Bainbridge BW, Valentine BP, and Marksham P (1979). The use of temperature sensitive mutants to study wall growth. In: Burnett JH, Trici APJ eds. *Fungal Walls and Hyphal Growth*. Cambridge: Cambridge University Press. Pp 71 91.

Bartnicki-Garcia S (1968). Cell wall chemistry and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* 23:87–108.

Benitez T, Villa TG, and Acha IG (1975b). Chemical and structural differences in mycelial and regeneration walls of *Trichoderma viride*. *Arch Microbiol* 105:277–282.

Bird D and Bradshaw R (1997). Gene targeting is locus dependent in the *filamentous fungus Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 255:219–225.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990), *Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle*, Ed. Masson, Paris

Brauer KL and Robbers JE (1987). Induced parasexual processes in *Claviceps* sp. Strain SD58. *Appl Environ Microbiol* 53:70–73.

CENTRE DE LA SANTÉ ET DE LA SÉCURITÉ AU TRAVAIL (2007). Répertoire Service du répertoire toxicologique.

http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=893&nom=%C9thanol (15 of 15)2007-08-30 03:28:07 Site internet consulté le 2 septembre 2007.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (2007). Petit glossaire des termes chimiques.

<http://www.cnrs.fr/chimie/communication/chimiepour tous/az/dico.htm> Site internet consulté le 1er septembre 2007.

Chauhan A and VARMA A. (2006). *Microbes: health and Environment* ; I. K.International. Pvt. Ltd. P 243-253.

Couteaudier Y, Viaud M, and Riba G (1996). Genetic nature, stability, and improved virulence of hybrids from protoplast fusion in *Beauveria*. *Microb Ecol* 32:1–10.

Croft, J.H.; Dales, R.B.G.; Turner, G.; Alison, E.: *The transfer of mitochondria between species*. Symp. Biol. Hung., Adv. Protoplast Res. 22 (1980) 85±92

Das, A; Gokhale, D.V.; Peberdy, J.F.: Protoplast fusion and genetic recombination in inter and intrastain crossing in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11 (1989) 2±5

Davis B (1985). Factors influencing protoplast isolation. In: Peberdy JF, Ferenczy L eds. *Fungal Protoplasts*. New York: Marcel Dekker Inc. Pp 45–72.

Dilip K. A (2004). *Handbook of fungal Biotechnology*. CRC Press. P 9-20

Doi K, Doi A, and Fukui T (1971). Joint action of two glucanases produced by *Arthrobacter* in spheroplast formation. *J Biochem* 70:711–714.

Elorza MV, Rico H, Gozalbo D, and Sentandreu R (1983). Cell wall composition and protoplast regeneration in *Candida albicans*. *Antonie Leeuwenhoek* 49:457–469.

Emerson S and Emerson MR (1958). Production, reproduction and reversion of protoplast-like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:669–671.

Farkas V (1985). The fungal cell wall. In: Peberdy JF, Ferenczy L eds. *Fungal Protoplasts*. New York: Marcel Dekker Inc. Pp 3–30.

Ferenczy L, Kevei F, and Zsolt J (1974). *Fusion of fungal protoplasts*. *Nature* 248:793–794.

Ferenczy, L.: Transfer of cytoplasmic elements by protoplast fusion. *Mycol. Ser.* 6 (1985) 307±321

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

Grandbois, S. MontautL. Righetti, J. Barillari, R. Iori, P. Rollin, J. Nat. Prod. 2009, 72, 889

Gupta, U., Cheema, G. S., Sodhi, H. S. and Phutela, R. P. 1997. Protoplast isolation and regeneration in *Agaricus bisporus* strain MS 39. *Mush. Res.* 6: 59-62.

Hamlyn PF, Bradshaw RE, Mellon FM, Santiago CM, Wilson JM, and Peberdy JF (1981). Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microbiol Technol* 3:321–325.

Hong SL and Robbers JE (1985). Genetics of ergoline alkaloid formation in *Penicillium roquefortii*. *Appl Environ Microbiol* 50:558–561.

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE ET DE LA SÉCURITÉ (1997) Fiche toxicologique n°48, Édition 1997 de l'INRS. Cahiers de notes documentaires. [RE-005509] <http://www.inrs.fr/htm/ethanol.html>, fichier pdf, 5 p. Site internet consulté le 29 septembre 2007.

Isaac S and Gokhle AV (1982). Autolysis: a tool for protoplast production from *Aspergillus nidulans*. *Trans Br Mycol Soc* 78:389–394.

Jogdand S.N. 2001. Protoplast Technology, Gene Biotechnology, Himalaya Publishing house 3rd ed 171-186.

Keller NP, Cleveland TE, and Bhatnagar D (1992). Variable electrophoretic karyotypes of members of *Aspergillus section Flavi*. *Curr Genet* 21:371–375.

Kim, J.H.; Chang, S.Y.; Choi, Y.K.: Cell fusion of cellulolytic *fungi Aspergillus sps.* *Hanguk Kvnhakhoechi* 415 (1987) 80±86

Kluyveromyces marxianus from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J Appl Microbiol.* 105: 2076-2083.

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

Kumari, J.A.; Panda, T.: Intergeneric hybridization of *T. reesei* and *S. cerevisiae* by protoplast fusion. *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 870±882

Lalithakumari D. Fungal protoplast - A Biotechnological tool. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.; 2000. pp. 101–112.

Lalithakumari, D., Mathivanan, N., 2003. Strain improvement in filamentous fungi by protoplast fusion. In: Mathivanan, N., Prabavathy, V.R., Gomathinayagam, S. (Eds.), *Innovative Methods and Techniques for Integrated Pest and Disease*

Management. Centre for Advanced Studies in Botany, University of Madras, Chennai, India, pp. 76–97.

Martinkova L, Musilkova M, Ujcova E, Machek F, and Seichert L (1990). Protoplast fusion in *Aspergillus niger* strains accumulating citric acid. *Folia Microbiol* (Praha) 35:143–148.

Mrinalini C, Lalithakumari D (1998). Integration of enhanced biocontrol efficacy and fungicide tolerance in *Trichoderma* spp. by electrofusion. *J. Plant Dis. Protect.* 105: 34-40.

Mueller GM, Schmit JP. *Fungal biodiversity.* 2007;16(1):1–5. doi: 10.1007/s10531-006-9117-7

Murlidhar RV and TPanda,2000.,Fungal protoplast fusion : *A revisit.Bioprocess Biosyst Engg* ,22,429-431.

Narayanswamy S, 1994, Plant cells and tissue cultures. Plant Protoplast: Isolation, Culture and Fusion ,391-469.TATA MCGraw Hill Publishing Company ,New Delhi,India.

Necas O (1971). Cell wall synthesis in yeast protoplasts. *Bacteriol Rev* 35:149–170.

Nippon Flour Mills Co. Ltd. A new *Candida* strain capable of producing citric acid from xylose, Japan Kokai Tokyo Koho Jp. 60 75 852 [85 75 282], (CI CI2NI/16), 27 April 1985, Appl. 83/182, 586. 30 Sept. 1983, p. 4

Ogawa K, Yoshida N, Gesnara W, Omumasaba CA, and Chamuswarng C (2000). Hybridization and breeding of the benomyl resistant mutant, *Trichoderma harzianum* antagonized to phytopathogenic fungi by protoplast fusion. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:833–836.

Pasha C,R.C.Kuhad and C.VRao,2007,Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevesie* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates.*J Appl Microbiol* ,103,1480-1489.

Peberdy JF (1979a). Wall biogenesis by protoplasts. In: Burnett JH, Trinci APJ eds. *Fungal Walls and Hyphal Growth*. Cambridge: Cambridge University Press. Pp 49–70.

Peberdy JF (1979b). Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion. *Ann Rev Microbiol* 33:21–39.

Petrini L (2001). Production and regeneration of protoplast from *Gremmeniella abietina* and *Ascocalyx abietis*. *Acta Biol Hung* 52:307–313.

Reymond, P.; Fevne, M.: Researches on penicillin productivity of *Penicillium chrysogenum*, protoplast fusion of their hybrids and unforced selection. *Enzyme Microbiol. Technol.* 8 (1986) 41±44

Rico H, Carrillo C, Aguado C, Mormeneo S, and Sentandreu R (1997). Initial steps of wall protoplast regeneration in *Candida albicans*. *Res Microbiol* 148:593–603.

Rifai, M A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia.Papers.* 116: 1-56.

Robinson H et Deacon J.D. (2001). Protoplast. Preparation and transient Transformation of *Rhizoctonia solani*. *Myccol. Res.*105(11) : 1295-1303

Roquebert M F. (1996). Les moisissures, nature biologie et contamination.

Rosenberger RF (1976). The cell wall. In: Smith JE, Berry DR eds. *The Filamentous Fungi*. Vol. 2. London: Edward Arnold. Pp 328–344.

Roussos S., Raimbault M. (1982). Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. Production nde la cellulase de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu liquide. *Ann Microbioln* (Inst. Pasteur). 133 B: 465-474.

Roussos S., Raimbault M. (1982). Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. Production de la cellulase de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu liquide. *Ann Microbiol* (Inst. Pasteur). 133 P 465-474.

Selitrennikoff, C. P., 2001. Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67,P 2883-2894.

Sotnikova, I.V.; Telesnina, C.N.; Lebed, E.S.; Dmitrieva, S.V.; Zhukov, V.G.: Antibiotic production in variants of *Penicillium chrysogenum* isolated after protoplasting stage and exposure to mutants at the protoplasting stage. *Antibiot. Khimioter.* 33 (1988) 211±217

Srinivas R and T.Panda,1997,Localization of carboxymethyl cellulase in the intergeneric fusants of *Trichoderma reesei* QM 9414 and *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3288.*Bioprocess Biosystems Engg* ,18,71-73.

Tahoun, M.K.: Gene manipulation by protoplast fusion and *penicillin* production by *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 39 (1993) 445±453

Thomas KR and Davis B (1980). The effect of calcium on protoplast release from species of *Aspergillus*. *Microbios* 28:69–80.

Trichoderma lignorum on *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology*. 24: 1153- 1156.

Van der Valk P and Wessels JGH (1976). Ultrastructure and localization of wall polymers during regeneration and reversion of protoplasts of *Schizophyllum commune*. *Protoplasma* 90:65–87.

Villanueva JR and Garcia AI (1971). Production and use of fungal protoplasts. In: Booth C ed. *Methods in Microbiology*. Vol. 4. New York: Academic press. Pp 665–718.

Vining L C. (1990). Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 395- 27.

Vizcaino J A., Sanz L., Cardoza R E., Monte E., Gutierrez S. (2005). Detection of putative peptide synthetase genes in *Trichoderma* species: Application of this method to the cloning of a gene from *T. harzianum* CECT 2413. *FEMS Microb Lett.* 244: 139–148.

Weidling R. 1934. Studies on lethal principle effective in the parasitic action

Wickerham, L.J. (1951). Taxonomy of yeast. Technical Bulletin No. 1029, United States. Department of Agriculture, Washington, D.C.

YOUCEF-ALI.M. KACEM CHAOUCH.N , DEHIMAT.L, BATAICHE.I, KARA ALI.M; 2014, Etude de l'activité anti-*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides. P : 97 .

Yuan, W.J., Zhao, X.Q., Ge, X.M. et Bai, F.W. 2008. Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J Appl Microbiol.* 105: 2076-2083.

Zhao, J. and Chang, S. T. 1993. Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushrooms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 538-543.

Annexe

1. Milieux de culture

Milieu liquide MEM (extrait de levure extrait de malt dextrose)

La composition en g/L

- Extrait de levure	5
- Extrait de malt	5
- Dextrose	5
- pH	5.6

Milieu liquide minimal MM :

La composition en g/L

- Na NO ₃	1
- KCl	0.5
- MgSO ₄	0.5
- Fe SO ₄ (7H ₂ O)	0.01
- KH ₂ PO ₄	1
- Cellulose (papier wathman)	8
- pH	5.5

Milieu liquide YPG (yeast peptone glucose)

La composition en g/L

- Extrait de levure	10
- Peptone	10
- Glucose	20

Gélose sabouraud SAB

Ce milieu est recommandé pour la culture des champignons grâce à la présence de trois peptone et du glucose ; ainsi que le pH acide (6.5). (Delarras)

La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est

- Peptone de viande (bovin ou porcin)	3
- Peptone de caséine (bovin)	3

- Peptone de soja	3
- Extrait de levure	2
- Extrait de malt	1
- Glucose	19
- Phosphate monopotassique	0.5
- Phosphate disodique	0.5
- Agar	13

Milieu de culture OGA (Gélose glucosée à l'oxytétracycline)

Ce milieu est utilisé pour **la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures**. Il peut être appelé Oxytétracycline Glucose Yeast Agar ou O.G.Y.A.

La composition du milieu (en g/l d'eau distillée).

- Extrait de levure déshydratée	5
- Glucose	20
- Agar	16 à 24
- pH	6,8

Milieu minimum à base de papier cellulosique (wathman) (g/l)

La composition chimique du milieu (en g/l d'eau distillée).

- NaNO ₃	1.6
- K ₂ HPO ₄	1.8
- MgSO ₄	0.8
- KCl	0.4
- Peptone	0.4
- Papier wathman découpé	8
- Agar	14

Les morceaux du papier wathman sont ajoutés à 400 ml d'eau distillée et bien broyés à l'aide d'un ultraturax, ensuite additionnés à la solution de 600 ml contenant les composés ci-dessus, sans papier wathman, le tout est bien mélangé et porté pour l'autoclavage à 121° pendant 15 minutes. Le pH est de 7 (ariffinet *al.*, 2006)

Milieu complet additionné des stabilisateurs osmotiques

La composition en (g/l)

-	Extrait de levure	2.5
-	Extrait de MALT	5
-	Glucose	10
-	Gélose	20
-	KCl	1
-	MgSO ₄	1

2. Solutions et colorants

Stabilisateur osmotique (MgSO₄)

La composition en M/L

- MgSO ₄	0.98
- Na ₂ HPO ₄	8.4
- NaH ₂ PO ₄	1.6
- pH	5.5

Solution de rinçage (MgSO₄)

La composition en M/L

- MgSO ₄	0.6
---------------------	-----

Solution de polyéthylène glycol 6000 (30%) (PEG)

- PEG 3000	60g
- Eau distillé	100 ml

Solution de fusion

- Solution de PEG 6000 (30%)	1ml
- CaCl ₂	0.01M
- Glycine	0.05M

Solution NaCl

La composition en g/l

- NaCl	10.908g
--------	---------

Solution de rinçage (KCl)

La composition en M/L

- KCl	0.6
-------	-----

Lactophénol bleu coton

La composition en g/l

- Phéno
l en cristaux 20 g- Acide lactique 20 g
- Glycérine 40 g
- Eau bidistillée 20 g
- Bleu de méthyle 0,5 g

Les produits doivent être dissous dans l'ordre indiqué et en agitant modérément à l'aide d'une baguette de verre. La dissolution du bleu de méthyle peut prendre un certain temps (laisser reposer 24 h puis agiter à nouveau). Il est impossible de filtrer le mélange, qui est trop épais. Placer sur l'agitateur magnétique durant 2 à 6 heures.

Thème : Etude de l'amélioration de la production d'éthanol par la technique de fusion des protoplastes entre deux souches fongiques

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des Mycètes, fermentation et production de substances fongiques

Résumé

La destruction de la paroi fongique de *Trichoderma sp.* et de *Saccharomyces cerevisiae* a abouti à la libération de leurs protoplastes et ce, par l'action des enzymes secrétées par le *Bacillus* utilisé dans ce travail. En effet, et pour *Trichoderma sp.* cette libération commence par un épaississement dans la partie apicale du filament suivi par la formation de cellules rondes au niveau apical du thalle. Après 2 heures de temps, un début de libération de protoplastes au niveau de la partie centrale de l'hyphe est observé suivi par une libération totale des protoplastes dans le milieu de culture. D'un autre côté, la libération des protoplastes de *S. cerevisiae* commence par un changement de son diamètre suivi par une libération totale des protoplastes dans le milieu de culture.

Cependant, la fusion des protoplastes entre les deux souches fongiques en question, effectuée avec du Poly-Ethylène-Glycol (PEG), nous a permis d'obtenir une nouvelle souche, codée ST. Cette dernière se présente sur milieu complet, sous forme de petites colonies visqueuses, de couleur beige. Morphologiquement et sous microscope, elle apparue sous forme de petites cellules rondes.

Par ailleurs, l'étude de la production d'éthanol par la souche commerciale *S. cerevisiae* et la souche ST, dans un but de comparaison de rendement, est faite sur un milieu riche en cellulose. Nos résultats montrent qu'après 3 jours de fermentation, *S. cerevisiae* arrive à dégrader la cellulose en glucose et produit une quantité d'éthanol égale à **29.88 g/l**, tandis que la souche ST produit une quantité nettement supérieure, estimée à **49.70g/l**. Ces résultats sont encourageants et témoignent de l'efficacité de la fusion de protoplastes dans un but d'amélioration de métabolites industriellement importants, notamment ; l'éthanol.

Mots clés : *Trichoderma sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, fusion de protoplastes, éthanol, cellulose.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri, Constantine1.

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mme. MIHOUBI I.	Professeur - UFM Constantine1.
Rapporteur :	Mme. YUCEF ALI M.	MCB- UFM Constantine1.
Examineur :	Mme. LEGHLIMI H.	MCB- UFM Constantine1.

Date de soutenance : 22/06/2016