



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE 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 والحياة

Département : Microbiologie

قسم المكر وبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé

**Optimisation de la production de cellulase par
Trichoderma longibrachiatum cultivée sur son de blé**

Présenté et soutenu par :

YAICHE SABRINA

Le 26/06/2018

AIDOUNI BOUCHRA

Jury d'évaluation :

Présidente : Melle ALMI HIBA. (Maître de conférences B- UFM Constantine).

Rapporteur : Mme LEGHLIMI HIND. (Maître de conférences B - UFM Constantine).

Examinatrice : Melle BELMESSIKH AICHA. (Maître Assistante A- UFM Constantine).

**Année universitaire
2017/2018**

Remerciements

Notre premier remerciement va au bon Dieu le tout puissant qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

Le travail a été réalisé au laboratoire de Zoologie, faculté des sciences de la nature et de la vie. Nous tenons à remercier les responsables de ce laboratoire.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances et notre profond respect à notre encadreur, **Mme. LEGHLIMI. H.** Maître de Conférences à UFM Constantine, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont on a pu bénéficier.

Nous souhaiterons également remercier notre présidente de jury, **Melle. ALMI. H.** Maître de Conférences à UFM Constantine, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.

Nous remercions par la même occasion **Melle BELMESSIKH. A.** Maître Assistante à UFM Constantine d'avoir acceptée d'évaluer notre travail.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

À MES CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie

A mes adorables Sœurs :Manel ;Asma et Mélissa.

A mon frère Didine.

A mes nièces :Ania et Mélina.

A mon neveu :Racim.

*A Mes très chères
amies :Anfel ;Maissa ;Souheila ;Rayene ;meriem ; Wafa et
boutheina .*

A mon binôme

A toute ma famille

Et a tous ceux que j'aime.

Sabrina

Dédicaces

Je dédie ce travail ...

Au meilleur papa du monde, mon héros, l'homme qui s'est sacrifié pour me voir réussir dans ma vie, et pour me rendre heureuse.

A mon paradis sur terre, ma femme unique, ma vie et la source de

mon bonheur « ma mère », qui m'a guidé vers le bon chemin, et qui a fait le possible pour me voir réaliser mes rêves.

Aux personnes qui m'ont énormément aidée et encouragée : Mes sœurs « Doria et Anouaar » et mon petit ange « AYMENE », que Dieu les garde et les protège.

A mes grands pères et mes grandes mères,

A mes adorables copines « Khadidja, Rayan, Zeineb et Wafa », celles qui ont toujours été présente pour moi et toujours m'aidée, écoutée et encouragée tout au long de mon parcours.

À mon binôme Sabrina, On a vécu cette aventure ensemble, on a passé des bons moments ensemble. On a appris que tout est possible quand on a la bonne volonté.

A toute la promotion de Biotechnologie des Mycètes 2017-2018

A toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont apportée leur aide

A tous, du fond de mon cœur je vous dédie ce travail

A tous nos professeurs qui nous enseignent et tous ceux qui nous sont chers.

Bouchra

Table des matières

Table des matières

Résumés

Les abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Revue bibliographique

Chapitre 01 : La cellulase et les souches cellulolytiques.....3

1. Définition de la cellulose.....3

2. Etude de la cellulase.....5

2.1. Nomenclature.....5

2.2. Définition de la cellulase.....5

2.3. Enzymes cellulolytiques.....5

2.3.1. Les endoglucanases (EGs) ou 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4)5

2.3.2. Les exoglucanases ou 1,4- β -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBHs)6

2.3.3. Les β -glucosidases (BGs) ou cellobiases ou β -D-glucoside glucohydrolases (EC3.2.1.21)6

2.4. Mécanisme de dégradation de la cellulose.....6

2.5. Origines de la cellulase.....8

2.5.1. Origine animale.....8

2.5.2. Origine végétale.....9

2.5.3. Origine microbienne.....9

2.6. Applications industrielles de la cellulase.....12

3. Champignons du genre *Trichoderma*.....14

3.1. Introduction.....14

3.2. Morphologie.....14

3.3. Taxonomie.....15

Chapitre 02 : La fermentation solide et la matière première.....	16
1- La fermentation solide.....	16
1-1- Définition.....	16
1-2-Domains d'applications de la fermentation solide.....	17
1-3- Avantages et inconvénients des fermentations solides.....	18
1-3-1-Avantages.....	18
1-3-2- Inconvénients.....	19
2- Matière première.....	19
2-1- Description générale du blé.....	20
2-2-production de blé.....	20
2-2-1- Production du blé dans le monde.....	20
2-2-2-Production de blé en Algérie.....	21
2-3- Description d'un des constituants de la plante (son de blé)	22
2-3-1- Structure macroscopique et microscopique du son de blé.....	22
2-3-2- Composition chimique du son de blé.....	23
2-3-3- Utilisations principales du son de blé.....	24
2-3-4- Rôle du son de blé.....	25

Matériel et méthodes

1-Microorganisme.....	26
1-1 Préparation de l'inoculum	26
1-2- Conservation de la souche.....	26
2-Etude de la production des enzymes cellulolytiques par fermentation sur milieu solide.....	27
2-1- Matière première.....	27
2-2- Conduite de la fermentation solide.....	27
2-2-1-Effet de la température d'incubation et du taux d'inoculum sur la production des enzymes.....	27
2-2-2- Plan d'expériences pour l'optimisation de la production des enzymes.....	27
2-2-3- Analyse statistique des matrices du plan de plackett-Burman.....	29
3- Mesures et dosages effectués après fermentation.....	30

3-1- Dosage des activités cellulolytiques.....	30
3-2- Mesure de l'humidité.....	32

Resultats

1-Effet de la température d'incubation.....	33
2- Effet de la Densité de l'inoculum.....	34
3- Optimisation de la production des enzymes selon le plan statistique de Plackett et Burman.....	36
3-1- Effets des facteurs testés sur la production l'activité papier filtre.....	36
3-2- Effet des facteurs testés sur la production de l'activité endoglucanase.....	37
3-3- Traitement statistique des résultats.....	37
3-4- Expression des résultats sous forme d'équations.....	39

Discussion.....	40
------------------------	-----------

Conclusion générale	43
----------------------------------	-----------

Références bibliographiques	44
--	-----------

Annexes	54
----------------------	-----------

Résumé

Résumé

La production des enzymes cellulolytiques par *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée sur milieu à base de son de blé à 70% d'humidité par fermentation solide. L'influence de la température (28°C, 30°C, 37°C et 44°C) et du taux d'inoculum (1.5×10^7 , 2×10^7 et 2.5×10^7 spores par grammes de substrat) sur la production des enzymes APF et endoglucanase est testée. Les milieux de production sont préparés par l'emploi d'un plan factoriel de Plackett-Burman à N=8 essais, et N-1 facteurs : cinq réels de production (carboxyméthyl cellulose, sulfate d'ammonium, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) et deux erreurs. Ce plan est choisi afin de sélectionner les facteurs favorisant la production des enzymes. Les activités APF et endoglucanase sont mesurées à leurs valeurs maximales à la température de 30°C, et avec un taux d'inoculum de 2×10^7 spores par gramme de substrat (30.83 U/gds et 225,8 U/gds, respectivement). L'analyse statistique du plan Plackett-Burman, a permis la sélection de trois facteurs ayant un effet significatif sur la production de l'activité papier filtre, de façon positive significative par le $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($p=0,125$), de façon négative significative par le sulfate d'ammonium ($\text{NH}_4 \text{SO}_4$) ($p=0,128$) et le $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($p=0,165$). Pour ce qui est de la production de l'endoglucanase, elle est corrélée positivement d'une façon significative avec le CMC ($p=0,288$), très significative pour le sulfate d'ammonium ($p=0,153$).

Mots clés : Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, son de blé, optimisation, plan Plackett-Burman.

Abstract

The production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma longibrachiatum* is performed on medium based on wheat bran to 70% moisture by solid fermentation. The influence of temperature (28 ° C, 30 ° C, 37 ° C and 44 ° C) and the inoculums ratio (1.5×10^7 , 2×10^7 and 2.5×10^7 spores per gram of substrate) on APF enzyme production and endoglucanase is tested. Production media are prepared by using a factorial design of Plackett-Burman N = 8 assays, and N-1 factors: five actual production (carboxymethyl cellulose, ammonium sulfate, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) And two errors. This plan is chosen to select the factors favoring the production of enzymes.

APF and endoglucanase activities are measured at the maximum value at the temperature of 30 ° C, and with an inoculums rate 2×10^7 spores per gram of substrate (30.83 U / gds and 225.8 U / gds, respectively). Statistical analysis of Plackett-Burman plan allowed the selection of three factors having a significant effect on the production of filter paper activity, significant the positive way by $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($P = 0.125$) significantly negatively by ammonium sulfate (NH_4) SO_4 ($P = 0.128$) and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($P = 0.165$). Pan respect of the production of the endoglucanase, is positively correlated a significantly with CMC ($p = 0.288$), very significant for ammonium sulfate ($p = 0.153$).

Keywords: Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, solid state fermentation, wheat bran, optimization, Plackett-Burman plan.

ملخص

يتم إنتاج الإنزيمات السليلوزية بواسطة *Trichoderma longibrachiatum* في وسط يحتوي على نخالة القمح 70٪ رطوبة بالتخمير الصلب. يتم اختبار تأثير درجة الحرارة (28 درجة مئوية ، 30 درجة مئوية ، 37 درجة مئوية و 44 درجة مئوية) ونسبة اللقاح ($1,5 \times 10^7$ ، 2×10^7 و $2,5 \times 10^7$ لكل جرام من الركيزة) على إنتاج إنزيمات الـ APF والـ endoglucanase . يتم تحضير وسائط الإنتاج باستخدام تصميم عاملي لـ Plackett-Burman ن=8 فحوصات ، ون-1 عوامل : خمسة للإنتاج الفعلي (السليلوز كاربوكسيميثيل ، كبريتات الأمونيوم ، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ و $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) واثنين من الأخطاء. يتم توظيف هذه الخطة لاختيار العوامل التي تحفز إنتاج الإنزيمات. أقصى قيمة لقياس الأنشطة APF و endoglucanase تكون عند درجة حرارة 30 درجة مئوية، ومع معدل التلقيح 2×10^7 جراثيم لكل جرام من الركيزة (30,83 U / gds و 225,8U / gds، على التوالي). التحليل الإحصائي لخطة Plackett-Burman يسمح باختيار ثلاثة عوامل لها تأثير كبير على إنتاج ورق الترشيح ، بطريقة إيجابية بواسطة $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (ع=125،0) و بطريقة سالبة بشكل ملحوظ بواسطة كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ (ع=128،0) و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (ع=165،0) فيما يتعلق بإنتاج endoglucanase ، فإنه يرتبط بطريقة إيجابية مع CMC (ع=0,288) ، و بطريقة إيجابية بشكل كبير مع كبريتات الأمونيوم (ع=153،0).

كلمات مفتاحية السيلولوز : ، الترايكوديرما *longibrachiatum* ، التخمر في الحالة الصلبة ، نخالة القمح ، التحسين ، خطة Plackett-Burman.

Abréviations

APF : Activité papier filtre

CMC: Carboxyméthylcellulose

DNS: Acide dinitrosalicylique

EG: Endoglucanases

PDA: Potato dextrose agar

FMS : Fermentation sur milieu solide

Gds : Gramme de substrat

T : *Trichoderma*

U : Unité

Liste des figures

Figure 01 : Structure de la cellulose. a/Représentation de la chaîne de cellulose ; b/Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose.....	04
Figure 02 : La cellulolyse (Gusakov, 2011). (EG : endoglucanase, CBHI : cellobiohydrolase de type I, CBHII : cellobiohydrolase de type II, BG : β glucosidase).....	08
Figure 03 : Aspect microscopique de <i>Trichoderma</i>	15
Figure 04 : Les 5 sections systématiques de <i>Trichoderma sp.</i>	16
Figure 05 : Modèle proposé pour la diffusion des microorganismes filamenteux dans le substrat solide	17
Figure 06 : Croquis d'une plante de blé	20
Figure 07 : Illustration générale du fractionnement du blé.....	22
Figure 08 : Structure anatomique du son de blé	22
Figure 09 : Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé industriel ...	23
Figure 10 : <i>Trichoderma longibrachiatum</i> cultivée sur milieu PDA, après 3, 5 et 6 jours d'incubation à 30°C.....	26
Figure 11 : Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase	32
Figure 12 : Effet de la température d'incubation sur la production de l'activité Papier filtre (APF) après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types. N=3.....	33
Figure 13 : Effet de la température d'incubation sur la production de l'activité endoglucanase après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types. N=3.....	34
Figure 14 : Effet du taux d'inoculum sur la production de l'activité Papier filtre (APF) après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types. N=.....	35

Figure 15 : Effet du taux d'inoculum sur la production de l'activité endoglucanase après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types. N=3.....35

Liste des tableaux

Tableau 01 : Exemples de microorganismes producteur de la cellulase	10
Tableau 02 : Applications industrielles de la cellulase	13
Tableau 03 : Position taxonomique des <i>Trichoderma</i>	15
Tableau 04 : Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide.....	18
Tableau 05 : Production mondiale du blé	21
Tableau 06 : Compositions chimiques des sons de blé de différentes origines	23
Tableau 07 : Composition en sucre du son désamidonné	24
Tableau 08 : Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 7 facteurs avec 8 expériences	28
Tableau 09 : Les facteurs testés et leurs concentrations correspondantes	29
Tableau 10 : Activités enzymatiques produites selon le plan de Plackett et Burman	36
Tableau 11 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production l'activité papier filtre (APF).....	38
Tableau 12 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de l'endoglucanase	38
Tableau 13 : Sous modèles de régressions retenus pour le rendement en activité cellulolytiqu.....	39



Introduction générale

La microbiologie est qualifiée aujourd'hui de «participant majeur de l'industrie globale, spécialement des industries pharmaceutiques, alimentaires et chimiques ». Dans ce contexte, les moisissures représentent un groupe de microorganismes physiologiquement différents des autres groupes. Elles disposent de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement, elles sont de plus en plus utilisées dans la production d'enzymes.

Les enzymes sont définies comme des protéines biocatalyseurs, dans la nature, produites par des cellules vivantes pour provoquer des réactions biochimiques spécifiques, formant généralement des parties des processus métaboliques de la cellule. Les enzymes sont hautement spécifiques dans leur action sur les substrats.

Toute fois , la production des enzymes hydrolases particulièrement les amylases et les cellulases par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, et cellulolytiques, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vue composition en élément nutritifs nécessaires au développement de microorganismes et à la production des enzymes, d'autre part.

La production de cellulases par les microorganismes s'est bien développée ces dernières années. Cependant, elle utilise des procédés de fermentation faisant intervenir des substrats relativement onéreux, tels que l'extrait de levure, le glucose ou le maltose. Par ailleurs, un grand nombre de milieux de culture à base de substrats autres que le son de blé ont été mis au point telle que l'utilisation de lactosérum par exemple (Acourène, 2001). Il est désormais admis que la fermentation à l'état solide (FMS) est le processus le plus économique pour la production d'enzymes cellulolytiques par des moisissures (Iwashita *et al.*, 2002).

En effet, en industrie, il ne s'agit pas seulement de sélectionner une souche hautement productrice, mais il est également nécessaire de définir les conditions de culture optimale. Le milieu doit être complet et contenir tous les éléments nécessaires à la croissance du microorganisme et il est en outre indispensable que ces éléments soient apportés à des concentrations optimales.

Dans notre recherche, le milieu qui sera employé pour la production de la cellulase est à base de son de blé.

La stratégie de notre travail consiste à l'utilisation du son de blé provenant de l'unité de production de Hamma BOUZIANE. Constantine, comme substrat de fermentation en milieu solide pour la production de la cellulase par la moisissure *Trichoderma longibrachiatum*.

Pour cela nous nous sommes fixés plusieurs objectifs:

- Effet de la température d'incubation et du taux d'inoculum (concentration en spores) sur la production des enzymes recherchées, qui s'avère aussi intéressant dans ce cadre.
- Optimisation du milieu de base (son de blé) est réalisée par l'utilisation du plan statistique de Plackett et Burman (1946), afin de sélectionner les facteurs à effets positif et significatif sur la production des enzymes cellulolytiques.



**Revue
bibliographique**

Chapitre 01 : La cellulase et les souches cellulolytiques

1. Définition de la cellulose

La cellulose est le plus important polysaccharide de la planète. Elle représente entre 20 et 50% de la matière sèche des parois cellulaires végétales (Gidenne, 2003 ; Percival *et al.*, 2006) et confère à la plante une grande résistance à la flexion et à la traction. D'un point de vue biochimique, la cellulose est un homopolysaccharide linéaire et insoluble, composé d'unités D-anhydroglucopyranose reliées entre elles par des liaisons osidiques de type β -1,4. Selon l'origine végétale, son degré de polymérisation varie de 100 à 10 000 unité, et peut atteindre 15 000 unités dans le cas du coton (Percival *et al.*, 2006 ; Lopes, 2008 ; Chundawat *et al.*, 2011). Les unités de base constituant ce polysaccharide sont alternativement inversées de 180° par rapport au plan de la molécule, faisant du cellobiose le plus petit motif de répétition de cette structure. Les chaînes de glucanes ou fibrilles élémentaires, composées de ce motif, sont regroupées pour former des microfibrilles de 3 à 5 nm de diamètre, dont le nombre peut varier de 36 chaînes de glucanes à plus de 200 chaînes chez les algues. Ces chaînes sont reliées entre elles par des liaisons répétitives de type Van der Waals et de type hydrogènes, à la fois intermoléculaires, entre l'O3 et l'O5, et intramoléculaires (Figure 1) (Cosgrove, 2005 ; Chundawat, 2011). Les microfibrilles de cellulose sont composées de trois groupes de chaînes de glucanes différant selon leur degré d'organisation :

- des chaînes cristallines rigides avec un degré d'organisation important (6 chaînes).
- des chaînes sous-cristallines avec un degré d'organisation modéré (12 chaînes).
- des chaînes de surface sous-cristallines avec un faible degré d'organisation (18 chaînes).

Le cœur de cette structure est hydrophobe (interactions hydrophobes entre les feuillets de cellulose), rigide et hautement résistant à l'hydrolyse chimique et enzymatique, tandis que la surface est amorphe. Cette structure confère solidité, stabilité, rigidité, mais aussi élasticité à la fibre de cellulose. Enfin, la cellulose existe sous, deux formes thermodynamiques (type I ou II), différant selon l'orientation des chaînes de glucanes :

- La cellulose type I : représente la forme native et la plus répandue avec des chaînes de glucanes exclusivement parallèles. Elle se compose de deux formes : la forme Ia composant majoritairement les algues et les bactéries, et la forme Ib composant majoritairement les plantes (Brown et Malcom, 1999).
- La cellulose type II : qui est une forme modifiée obtenue après traitement chimique (à la soude par exemple).

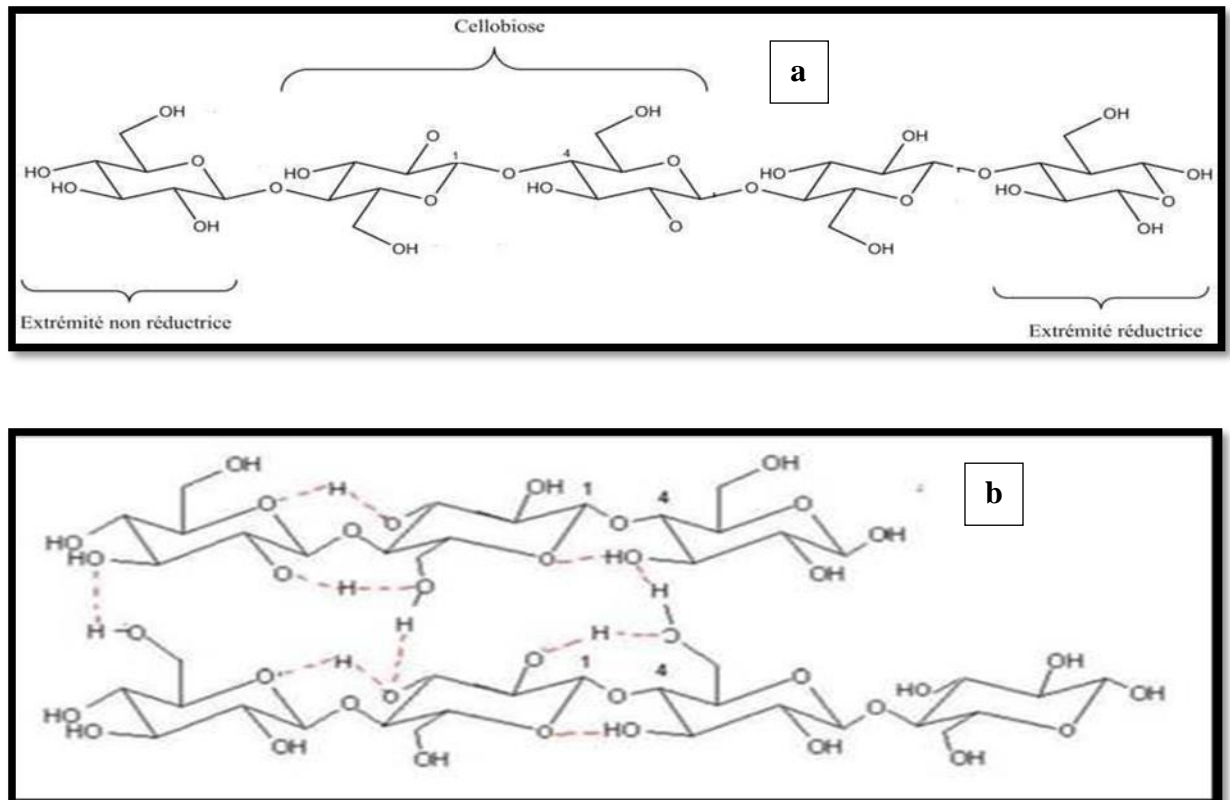


Figure 1 : Structure de la cellulose. a/ Représentation de la chaîne de cellulose ; b/ Liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires au sein de la fibre de cellulose (Stryer *et al.*, 2003).

Par ailleurs, la cellulose est le produit de l'utilisation de l'énergie solaire et du dioxyde de carbone par les végétaux via la photosynthèse. C'est le bio polymère le plus abondant, et la seule source de carbone renouvelable sur terre (Romero *et al.*, 1999). Sa décomposition en sucres simples, permettrait de résoudre de nombreux problèmes, comme la pollution de l'environnement (par la bioconversion des déchets urbains, industriels et agroindustriels) ainsi que des problèmes énergétiques (par la production d'énergie : alcool, méthane) (Roussos et Hannibal, 1984). Sa biodégradation est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre, assurée par des microorganismes cellulolytiques sécrétant des cellulases (Lekchiri *et al.*, 2006).

2. Etude de la cellulase

2.1. Nomenclature

Nom codifié : EC. 3.2.1.4

Nom systématique : 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 –glucanohydrolase

Nom recommandé : Cellulase

Synonymes : Endoglucanase, Endo-1,4- β -Glucanase, Cellulase carboxyméthylrique, β -1,4-endoglucanhydrolase, Celludextrinase, Avicelase, ect. (Schamburg et Salzman, 1991).

2.2. Définition de la cellulase

Les cellulases des champignons filamenteux se présentent sous la forme de complexes enzymatiques sécrétés dans le milieu de culture. Ces enzymes sont des protéines modulaires constituées d'un module catalytique, permettant l'hydrolyse d'une liaison osidique, d'où l'appellation de glycosides hydrolases, et d'un module de liaison ou CBM (*Carbohydrate Binding Module*), permettant à la fois de localiser et de déstructurer le substrat, facilitant ainsi l'interaction enzyme-substrat. Ces deux modules sont reliés entre eux par un pont peptidique (Lopes, 2008 ; Saddler *et al.*, 2010 ; Ballerini, 2011).

2.3. Enzymes cellulolytiques

Le système cellulolytique de référence est celui de *Trichoderma reesei* et repose principalement sur l'action complémentaire de trois types d'enzymes :

2.3.1. Les endoglucanases (EGs) ou 1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolases (EC 3.2.1.4)

Qui hydrolysent de manière aléatoire les parties amorphes de la cellulose, principalement les chaînes de surface des microfibrilles, générant des oligosaccharides de différentes tailles, ainsi que de nouvelles extrémités de chaînes. Ces enzymes n'agissent pas sur la cellulose cristalline et sont mises en évidence sur la carboxyméthylcellulose (CMC : forme soluble de la cellulose), on les appelle également CMCases (Bayer *et al.*, 1998).

2.3.2. Les exoglucanases ou 1,4- β -D-glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBHs)

Qui agissent de manière processive et s'adsorbent sur la cellulose en hydrolysant à partir des extrémités réductrices (type I ou CBHI) ou à partir des extrémités non réductrices (type II ou CBHII) pour libérer du cellobiose. Ce sont les seules enzymes agissant sur la cellulose cristalline.

2.3.3. Les β -glucosidases (BGs) ou cellobiases ou β -D-glucoside glucohydrolases (EC3.2.1.21)

Qui hydrolysent le cellobiose ou les cello-oligosaccharides (DP inférieur à 6) en glucose. Elles n'ont pas d'action sur la cellulose insoluble (Saddler *et al.*, 2010 ; Ballerini, 2011).

Le complexe cellulolytique de *Trichoderma reesei* se compose de 80% de CBH (50- 60% de CBHI et 12-20% de CBHII par rapport aux cellulases totales), de 20% d'EG (5-10% de EGI et 1-10% de EGII) et de moins de 1% de β -glucosidase (puisque la plupart de ces enzymes sont intracellulaires) (Lopes, 2008).

2.4. Mécanisme de dégradation de la cellulose

La cellulolyse est l'étape fondamentale de la transformation de la cellulose en sucres fermentescibles et en produits économiquement rentables, Elle correspond à l'hydrolyse biologique de la cellulose en molécules de plus petite taille comme les cellodextrines) le cellobiose et le glucose. Le mécanisme de dégradation de la cellulose ou cellulolyse (Figure 2), tout comme celui d'un polysaccharide pariétal, est un phénomène de catalyse enzymatique hétérogène et suit les étapes suivantes :

- Etape 1 : Transfert de l'enzyme du milieu aqueux vers le polysaccharide insoluble et adsorption des enzymes (cellulases) sur le substrat à l'interface liquide-solide via le module de liaison grâce à des interactions non covalentes (hydrogène, électrostatique ou hydrophobe);
- Etape 2 : Localisation d'une liaison susceptible d'être hydrolysée à la surface du substrat ;

- Etape 3 : Formation du complexe enzyme-substrat (par insertion de l'extrémité de chaîne dans le tunnel catalytique pour initier l'hydrolyse) ;
- Etape 4 : Hydrolyse de la liaison β -glycosidique et glissement simultanée vers l'avant de l'enzyme le long de la chaîne de cellulose ;
- Etape 5 : Désorption des cellulases du substrat ou répétition de l'étape 4 ou des étapes 2/3 si ce n'est que le domaine catalytique se détache de la chaîne ;
- Etape 6 : Transfert des produits de dégradation du polysaccharide vers le milieu aqueux et hydrolyse du cellobiose en glucose par la β -glucosidase (si cette enzyme est présente dans le cocktail enzymatique) (Beaugrand, 2004 ; Bansal *et al.*, 2009).

L'attaque initiale de la cellulose est la plus lente et la réaction d'hydrolyse des différents produits s'accélère. Au cours de cette hydrolyse, les produits d'inhibition (cellobiose, glucose) et les changements de propriété du substrat affectent les différentes étapes.

Lors de la cellulolyse, un certain nombre de synergies vont se produire entre :

*Les exoglucanases et les endoglucanases ;

*Les exoglucanases processives par l'extrémité réductrice et celles processives par l'extrémité non réductrice ,

*Les exoglucanases et les β -glucosidases qui hydrolysent le cellobiose, produit final inhibiteur des cellobiohydrolases,

*Le module catalytique et le module de liaison composant les cellulases (endoglucanases et exoglucanases) pour produire des oligosaccharides et/ou du Cellobiose (Schulein, 1985 ; Ballerini, 2011).

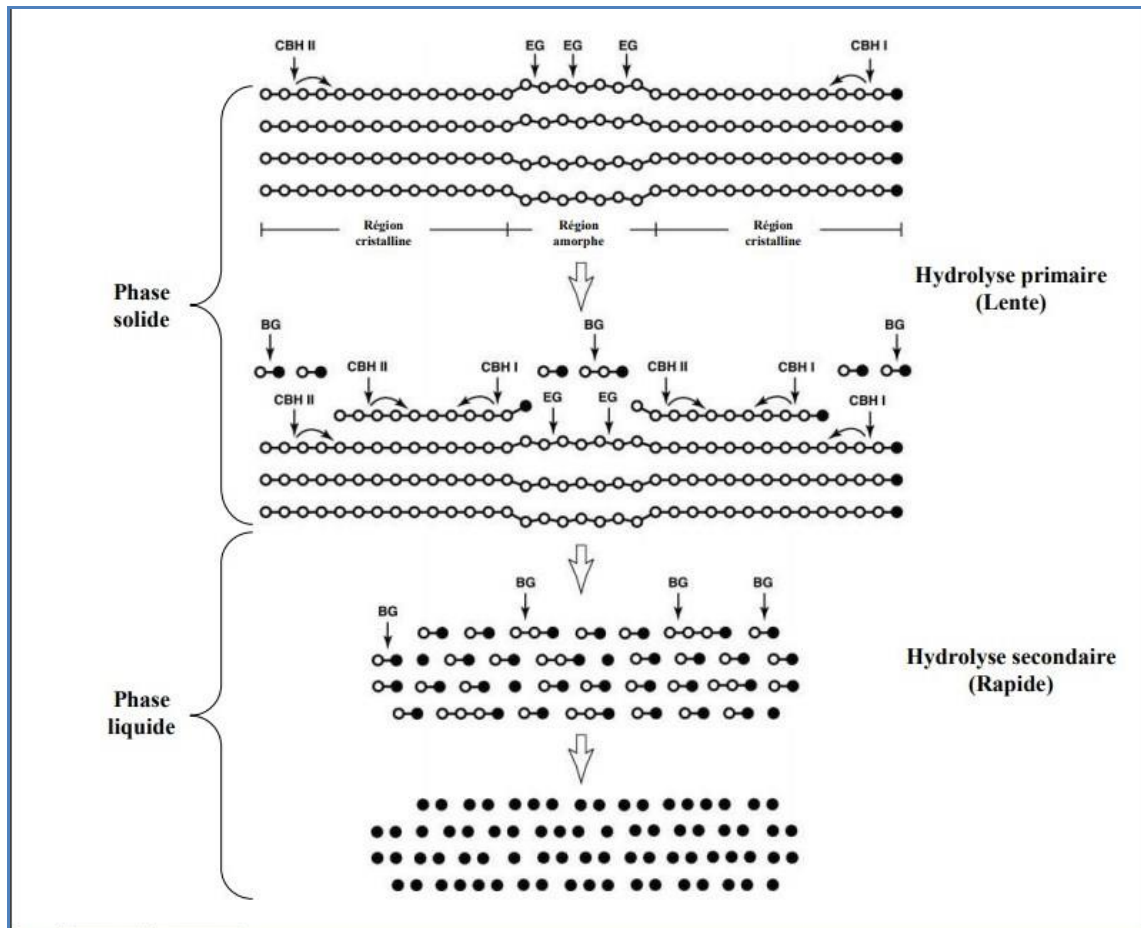


Figure 2 : La cellulolyse (Gusakov, 2011). (EG : endoglucanase, CBHI : cellobiohydrolase de type I, CBHII : cellobiohydrolase de type II, BG : β -glucosidase).

2.5. Origines de la cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature (Xu *et al.*, 2000). Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes, protozoaires, vers, mollusques, insectes etc...(Odier et Rouau, 1985). De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale ou microbienne.

2.5.1. Origine animale

Plusieurs espèces animales (omnivores et herbivores) utilisent la cellulose comme source d'énergie, malgré leur incapacité à produire des cellulases endogènes, mais ceci est dû à une vie symbiotique des microorganismes dans leur système digestif (Smant *et al.*, 1998). Ainsi, peu de cellulases endogènes ont été décrites chez des organismes supérieurs (Xu *et al.*, 2000). Des cellulases ont été isolées à partir du suc digestif d'escargot comestible *Helix pomatia* (Rebeyrotte *et al.*, 1976 ; Kubicek., 1981), de la glande digestive d'une moule verte *Perna viridis* (Marchall.,1973), de la moule bleue

Mytilus edulis (Xu *et al.*, 2000) et du mollusque marin *Littorina brevicula* (Purchon, 1977 ; Kiesov, 1982). De plus, l'amibe *Dictyostelium discoideum* produit une cellulase extracellulaire pendant la germination de ses spores (Blume et Ennis., 1991). Des cellulases ont également été identifiées dans les glandes de l'oesophage de kyste des nématodes *Globodera restochiensis* et *Heterdora glycines*, parasites obligatoires des plantes (Smant *et al.*, 1998).

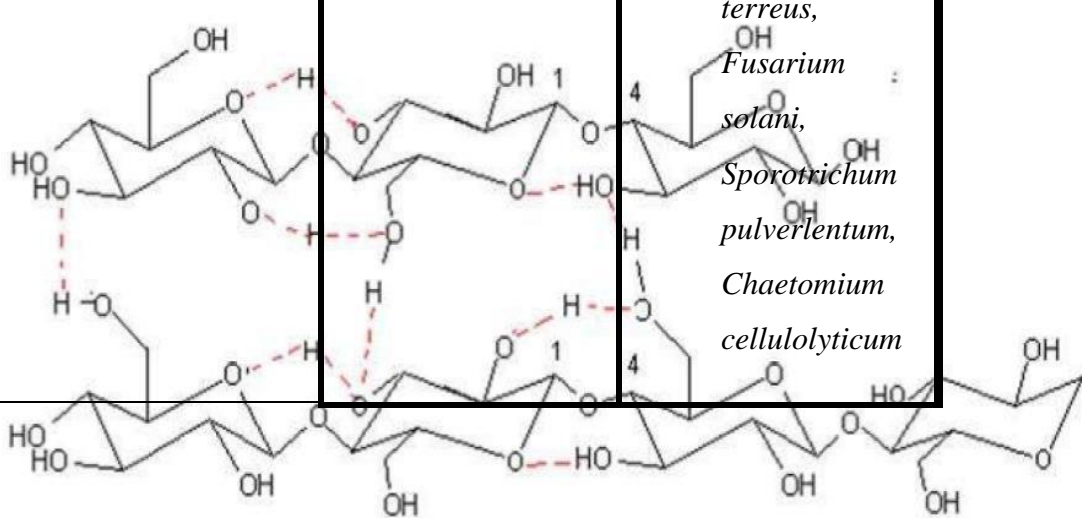
2.5.2. Origine végétale

Les cellulases jouent un rôle important dans la maturation des fruits où elles participent à la libération des arômes (Cordonnier *et al.*, 1986). Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des fruits tels que les grains de raisin, les amandes douces (Riccio *et al.*, 1999), de l'avocat *Persea americana* (Blume et Ennis, 1991), des céréales tels que l'orge (Dan *et al.*, 2000) et le riz de la variété *Oryza sativa* (Xu *et al.*, 2000). Les préparations cellulasiques d'origine végétale sont dépourvues d'exo- β -glucanases (Mandels *et al.*, 1976). Néanmoins, la fabrication d'enzyme végétale est soumise aux contraintes d'approvisionnement de la matière première (caractère saisonnier des récoltes, spéculations dues aux incertitudes économiques et politiques des pays producteurs) (Joyeau, 1982).

2.5.3. Origine microbienne

La flore cellulolytique est très variée; elle se retrouve dans des écosystèmes divers constitués par les composts, les fumiers, les litières, les boues d'estuaires, le fond des lacs et le tractus digestif des animaux. Ces microorganismes appartiennent à des groupes taxonomiques très variés pouvant être groupés suivant leur appartenance au groupe Eucaryotes ou Procaryotes, leur température de croissance qui permet de distinguer les microorganismes mésophiles et les microorganismes thermophiles, et enfin suivant leur comportement vis à vis de l'oxygène (Tableau 1) (Béguin *et al.*, 1992).

Tableau 1: Exemples de microorganismes producteur de la cellulase (Bagnara, 1986 ; modifié par Cailliez, 1991) et (Béguin et Aubert, 1992).

Eucaryotes	Protozoaires	<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	
	Champignons	Moisissures	<i>Neocallimastix frontalis,</i> <i>Sphaeromonas communis,</i> <i>Piromonas commmunis,</i> <i>Trichoderma viridae, T. reesei, T. koningii,</i> <i>Trichoderma longibrachiatum,</i> <i>Aspergillus aculeatus,</i> <i>A.nidulans, A. oryzae, A. niger, A. terreus,</i> <i>Fusarium solani,</i> <i>Sporotrichum pulverlentum,</i> <i>Chaetomium cellulolyticum</i>
			

		Levures	<i>Candida molischiana</i> , <i>C. pulcherrima</i> , <i>C. stellata</i> , <i>C. wickerhamii</i> , <i>Cryptococcus flavus</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces fibuligeratinis</i> , <i>Trichosporon cutanum</i>
Procaryotes	Bactéries	Aérobies	<i>Sporocytophaga</i> , <i>Myxococcoides</i> , <i>Baccillus subtilis</i> , <i>Cellulomonas et Pseudomonas</i>
		Anaérobies strictes	<i>Clostridium thermocellum</i> , <i>C. stercorarium</i> ,

			<i>Ruminococcus albus, R. flavefasciens, Bactéroï des succinogenes</i>
		Anaérobies facultatifs	<i>Erwinia chrysantharum</i>
		Actinomycètes	<i>Micromonospora propionici Streptomyces flavogriseus Streptomyces lividans Thermonospora curvata</i>

2.6. Applications industrielles de la cellulase

Les cellulases occupent une place de choix dans le marché des enzymes, en raison de leurs applications industrielles multiples, entre autres : les industries de transformation de l'amidon, la brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes, l'industrie des pâtes et papier, et textiles (Gao *et al.*, 2008). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique (Duff et Murray, 1996).

En outre, les cellulases étaient commercialement valables pour plus de 30ans, et présentent une cible pour les recherches aussi bien académiques ou industrielles (Singh.,

1999). Son utilisation permet potentiellement la production de glucose, élément de base, qui une fois fermenté permet d'accéder à d'autres substances clés à savoir alcools, acétones et acides organiques notamment des acides gras volatiles d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (Receveur *et al.*, 2002) ce qui renvoie à différentes applications industrielles (Tableau 2).

Tableau 2 : Applications industrielles de la cellulase.

Industries alimentaires	Faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993). Traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes.
Industries des textiles et des détergents	Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov <i>et al.</i> , 2000). Aussi dans les lessives afin d'améliorer l'apparence et la brillance des couleurs (Maurer, 1997 ; Cavako-Paulo, 1998).
Industrie de papeterie	Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993).
Nutrition animale	Utilisées comme additifs dans l'alimentation animale car l'addition des cellulases, aux aliments pour porcins, améliore leur digestibilité, ce qui réduit l'excrétion de cellulose non digérée (et donc diminue la charge polluante des excréments) (Scriban, 1993 ; Gusakov <i>et al.</i> , 2000).
Industrie Thérapeutique	L'utilisation quasi confidentielle de certaines cellulases dans des formules médicamenteuses à vocation d'aide digestive (Odier et Rouau, 1985 ; Scriban, 1993).
Production de biocarburants	Aujourd'hui il existe deux grandes filières de production de biocarburants : 1. La filière éthanol qui comprend l'éthanol et l'ETBE pour les

	véhicules essence. 2. La filière des huiles végétales avec l'EMHV pour les véhicules diesel.
--	---

3. Champignons du genre *Trichoderma*

3.1. Introduction

Le genre *Trichoderma* regroupe un ensemble de champignons imparfaits saprophytes qui se retrouvent couramment dans le sol, sur le bois mort, les débris végétaux et les organes aériens des plantes. On le reconnaît facilement en culture grâce à la couleur généralement verdâtre de ses spores et le port typique de ses phialides (en forme de quilles) (Johanne, 2002). Selon la structure des conidiophores et selon la morphologie des conidies ; la taxonomie du genre *Trichoderma* comporte neuf espèces: *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* et *T. viride* (Rifai, 1969).

3.2. Morphologie

La majorité des espèces de *Trichoderma* sont morphologiquement très semblables et difficiles à distinguer. L'aspect macroscopique des *Trichoderma* sp est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées, réparties en boîtes de Pétri. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires. Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides. Cinq 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 conidiogenèse. D'autres cercles concentriques réguliers se forment par la suite, et entre le 16^{ème} et le 20^{ème} jour un feutrage épais se superpose à la culture. Au microscope optique (Figure 3) on peut observer un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Kubicek *et al.*, 2003).

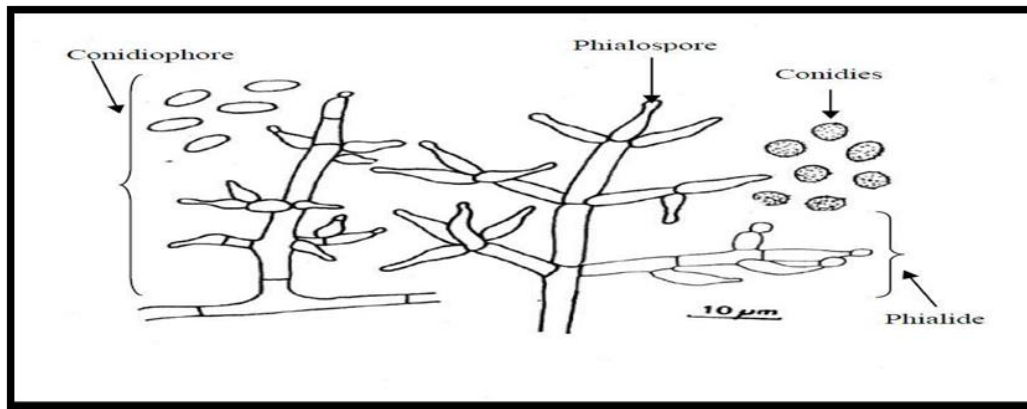


Figure 3 : Aspect microscopique de *Trichoderma* (Botton *et al.*, 1990).

3.3. Taxonomie

La position taxonomique actuelle des *Trichoderma sp* se présente comme suit (Bissett, 2004) (Tableau 3) :

Tableau 3 : Position taxonomique des *Trichoderma* (Bissett, 2004).

Sous embranchement	<i>Ascomycotina</i>
Classe	<i>Sordariomycètes</i>
Ordre	<i>Hypocréales</i>
Famille	<i>Hypocraceae</i>
Genre	<i>Trichoderma</i>

Vue le nombre croissant d'espèces nouvelles de *Trichoderma sp*, Bisset en 1991, propose la notion de « section » se basant sur la morphologie des conidiophores et des phialides, il regroupe les espèces dans 5 sections (Figure 4) (*Trichoderma*, *Pachybasium*, *Hypocreanum*, *Longibrachiatum* et *Saturnisporum*) (Leuchtmann, 1996).

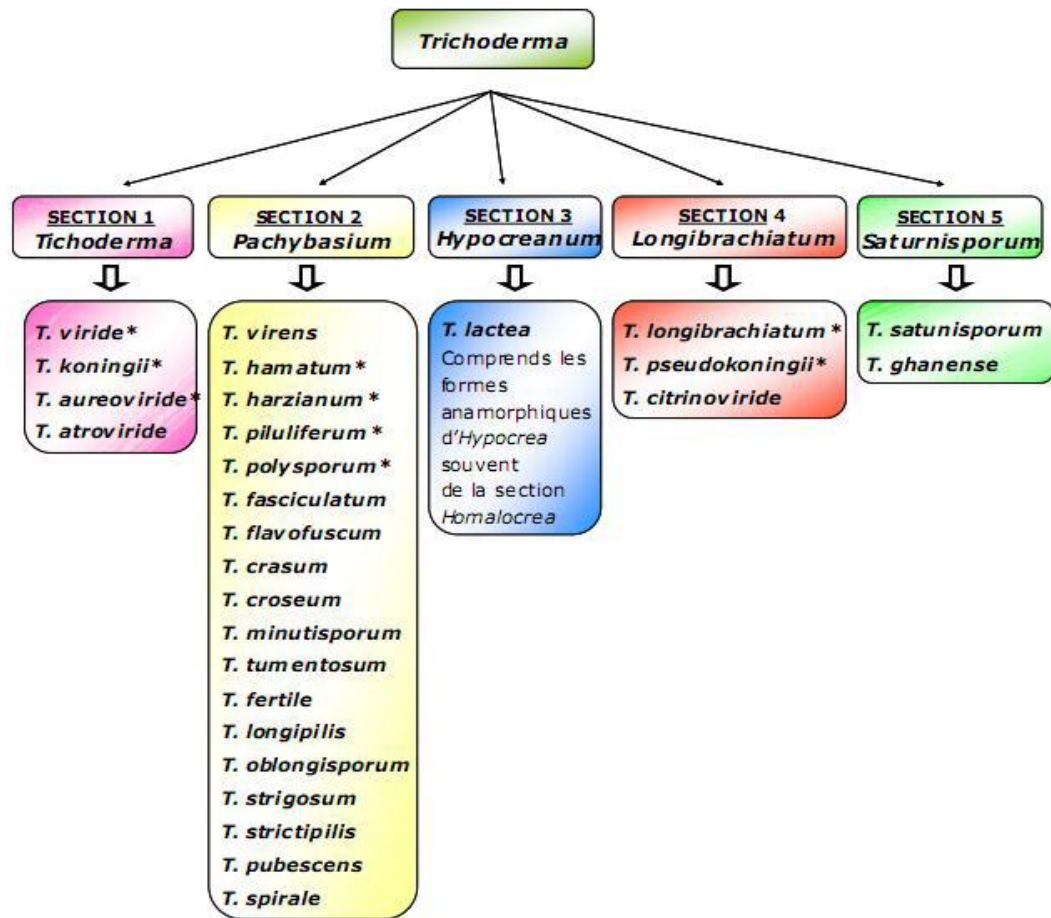


Figure 4: Les 5 sections systématiques de *Trichoderma sp*, selon (Bissett, 1991 a et b).
* les espèces agrégées de Rifai, (1969).

Chapitre 02 : La fermentation solide et la matière première

1- La fermentation solide

1-1- Définition

La fermentation en milieu solide est généralement définie comme étant la croissance de micro-organismes sur des substrats solides en absence totale ou presque d'eau libre (Raimbault, 1980, Pandey *et al.*, 2000). La fermentation en milieu ou en phase solide (FMS) est un procédé technologique qui reproduit les conditions de vie naturelle des microorganismes, en particulier celles des champignons, en permettant leur développement (adhésion) à la surface d'un support organique (Holker et Lenz, 2005). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide absorbée ou complexée dans la matrice solide et une phase gazeuse prise au piège dans les particules ou entre celles-ci.

Rahardjo *et al.*, (2006) expliquent la diffusion des moisissures filamenteuses dans le substrat solide humide (Figure 5).

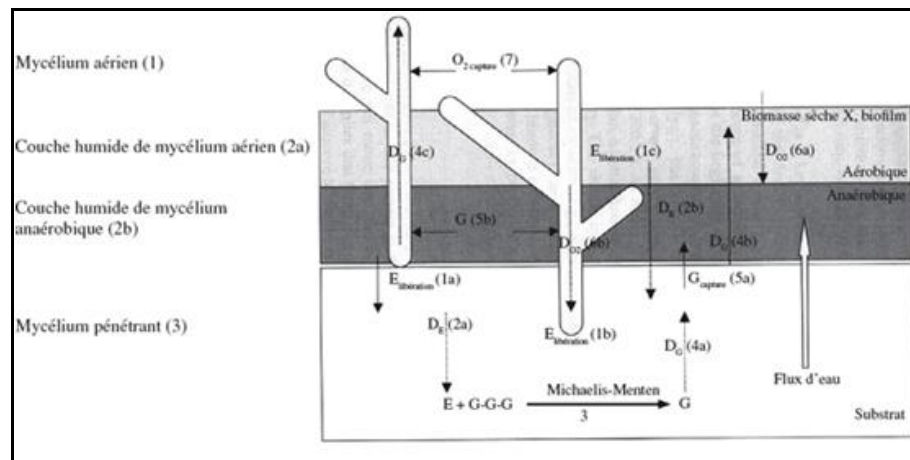


Figure 5 : Modèle proposé pour la diffusion des microorganismes filamenteux dans le substrat solide (Rahardjo *et al.*, 2006).

1-2-Domains d'applications de la fermentation solide

De manière générale, les applications de la fermentation solide concernent l'alimentation humaine (fromages, production de champignons comestibles, Koji, choucroute et saucissons secs), le compostage et l'ensilage, la bio-filtration de gaz malodorants, la production d'aliments riches en protéines pour l'alimentation animale, la production d'enzymes (amylases, cellulases, xylanases, etc.) et de métabolites spécifiques (éthanol, acides organiques tels que acide citrique, etc.). Cependant, la fermentation en milieu solide s'est également développée progressivement à d'autres domaines d'applications quel'alimentaire (Tableau 4).

Tableau 4 : Principaux domaines d'applications de la fermentation en milieu solide. (Manpreet et al., 2005. Raimbault, 1998. DURAND, 1998)

Domaine d'application	Produits	Microorganismes
Alimentaire	Champignons supérieurs	<i>Agaricus bisporus</i> (Champignon de Paris) <i>Lentinus edodes</i> (Shiitaké) <i>Pleurotus ostreatus</i> (Pleurotes)
	Fromages à pâte persillée, fromages à croûte fleurie (camembert, brie,...)	<i>Penicillium roquefortii</i> <i>Penicillium camembertii</i> <i>Penicillium caseicola</i>
	Pain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Acides organiques	Acide citrique Acide lactique	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i>
Divers	Bioconversion de substrats agricoles (compostage, ensilage)	
	Biostimulation des plantes (ectomycorhizes)	
	Bioremédiation des polluants organiques dans le sol	
	Délignification de la biomasse	
	Détoxification biologique de composés toxiques et dangereux	
	Production d'inoculum fromager (conidies de <i>Penicillium</i>)	
Enzymes	Amylases, glucoamylases Cellulases, xylanases Pectinases Protéases	<i>Aspergillus spp.</i> <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Rhizopus oligosporus</i>
Enrichissement nutritif (protéines) des aliments pour animaux	Canne à sucre, manioc, pulpe de betterave,...	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
Métabolites secondaires	Arômes	<i>Penicillium spp.</i> , <i>Trichoderma spp.</i>
	Antibiotiques (pénicilline)	<i>Penicillium notatum</i>
	Hormones végétales (acide gibbérélique)	<i>Gibberella fujikuroi</i>
	Alcaloïdes (ergot)	<i>Claviceps purpurea</i>
Lutte biologique (biocontrôle/biopesticide)	Biofongicides, bioinsecticides,...	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Coniothyrium minitans</i>

1-3- Avantages et inconvénients des fermentations solides

1-3-1-Avantages

L'utilisation des procédés de fermentation à l'état solide possède plusieurs avantages. En effet, ces derniers sont des procédés simples qui ont recours à des technologies simples. Ils ne demandent pas des équipements sophistiqués et chers pour contrôler les paramètres environnementaux. De plus, les produits de la fermentation en culture solide sont la plupart du temps concentrés, ce qui facilite leur purification. En outre, la faible humidité du milieu et le grand volume utilisés en FMS réduisent la possibilité de contamination par d'autres microorganismes. Cependant, la majorité des bactéries demandent des taux d'humidité élevés pour survivre. De plus, lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides, il n'y a pas de production de mousses en plus que les volumes des déchets générés sont faibles. Les enzymes produites

lors d'une fermentation solide sont moins sensibles aux répressions cataboliques et aux inductions (Singhania *et al.*, 2009). Les avantages de la fermentation en culture solide encouragent le recours à ce procédé pour produire des métabolites à haute valeur ajoutée.

1-3-2- Inconvénients

Bien que la fermentation solide possède plusieurs avantages, ce procédé souffre de quelques limitations. En effet, la fermentation en milieu solide ne peut être effectuée que par un nombre limité de microorganismes, lesquels peuvent se développer facilement à de faibles activités d'eau et d'humidité. De plus, dans un milieu solide, le transfert d'oxygène et de chaleur sont limités, ce qui rend difficile les procédés de cette fermentation à grande échelle. Le transfert de chaleur est ralenti par la faible quantité d'eau disponible dans le milieu, ce qui provoque des problèmes de surchauffe lorsque la fermentation est réalisée à grande échelle. Ce surchauffe provoque l'évaporation de l'eau disponible dans le milieu, limitant ainsi l'utilisation de la fermentation en culture solide à grande échelle. Entre autres, la production de forte concentration de produits par la fermentation en culture solide peut être accompagnée par la production de substances inhibitrices aux microorganismes. Parmi les inconvénients de la FMS, on peut aussi soulever la difficulté de l'estimation de la biomasse et de la croissance des microorganismes, qui sont fortement fixés aux substrats. En outre, contrairement à la fermentation liquide, les paramètres de la fermentation solide ne sont pas suivis directement. Ceci est dû à l'absence de sondes adaptées au suivi direct des paramètres de fermentation solide (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Il est pratiquement difficile d'assurer une distribution parfaitement homogène de substances ajoutées au milieu de culture. Ceci rend plus difficile le contrôle en ligne des paramètres de culture tels que le pH, l'humidité et les concentrations des nutriments.

2- Matière première

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale (Slama *et al.*, 2005). La céréale la plus populaire

dans les pays orientaux, c'est le blé qui prédomine en Europe, en Amérique du Nord, en Afrique du Nord et dans une partie de l'Asie.

2-1- Description générale du blé

Le « blé » est un terme générique qui désigne plusieurs céréales appartenant au genre *Triticum*. Ce sont des plantes annuelles, monocotylédones, cultivées dans de très nombreux pays. Le blé appartient, avec l'orge, l'avoine, le seigle et le riz à la catégorie des céréales à pailles. Elles sont caractérisées par la présence d'une tige surmontée par des grains riches en hydrates de carbone (Figure 6) (Raynal-Ioualalen,1996).



Figure 6 : Croquis d'une plante de blé (Masclef, 1987).

2-2-production de blé

D'un point de vue production, le blé est estimé à 660 millions de tonnes, l'équivalent de 100 Kg par habitant on considérant la population mondiale. D'après *Mahfoud et Lasbahani* (2015), les deux espèces de blé les plus cultivées sont : Le blé dur (*Triticum durum*) et le blé tendre (*Triticum aestivum*).

2-2-1- Production du blé dans le monde

Le blé est la céréale la plus cultivée dans le monde en termes de superficie. principalement en Asie, en Europe et en Amérique du Nord (Tableau 5) Mais, à la différence du riz et du maïs, dont l'essentiel de la production est assurée par une seule région du monde (Chine pour le riz et USA pour le maïs), la culture de blé est présente sur tous les continents de la planète (Maréchal, 2001).

Tableau 5 : Production mondiale du blé (AGPB, 2011).

	2009		2010		2011	
	Tonnage (millions de tonnes)	% de la production mondiale	Tonnage (millions de tonnes)	% de la production mondiale	Tonnage (millions de tonnes)	% de la production mondiale
Europe	143	21.1	140.7	21.6	142.9	20.9
dont Union-Européenne	138.3	20.4	136.8	21.0	138.4	20.3
Ex-URSS	113.6	16.7	82.3	12.6	112.3	16.4
Nord et centre Amérique	91.5	13.5	87	13.3	82.3	12.0
Amérique du sud	17.9	2.6	24.6	3.8	21.9	3.2
Asie	264.6	39.0	267.8	41.0	263	38.5
Afrique	25.7	3.8	22.1	3.4	24.3	3.6
Océanie	22.2	3.3	28.2	4.3	26.5	3.9
Production mondiale	678.5		652.6		683.2	

2-2-2-Production de blé en Algérie

Les produits céréaliers en Algérie occupent plus de 50% des surfaces agricoles utiles, soit plus de 3 millions d'hectares. Les chaumes de céréales sont utilisés par les ovins durant la saison sèche (Juillet à Septembre). Ces chaumes fournissent près de 997 millions d'Unités Fourragères Lait par an (Houmani, 1998).

*Lors de la récolte de la plante, celle-ci subit un fractionnement mécanique primaire qui conduit à la séparation des grains d'une part et des pailles d'autre part. Un fractionnement mécanique secondaire est réalisé sur le grain lors des activités de meunerie qui engendre deux fractions : la farine et les issues (sons, remoulages, etc.) (Figure 7).

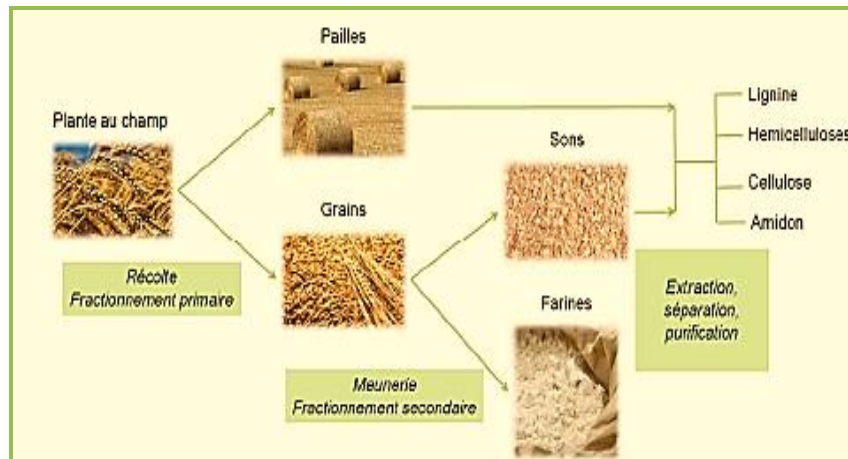


Figure 7: Illustration générale du fractionnement du blé (Du *et al.*, 2009).

2-3- Description d'un des constituants de la plante (son de blé)

2-3-1- Structure macroscopique et microscopique du son de blé

Pour comprendre la structure du son, il faut tout d'abord aborder plus en détail la structure des tissus maternels qui constituent le tégument, enveloppe du grain de blé. Ces tissus maternels sont constitués, de l'intérieur vers l'extérieur d'une assise aleurone, du tégument séminal, du péricarpe et d'une coque externe (cuticule) (Figure 8). Le péricarpe est riche en fibres insolubles comme la cellulose, en lignine et acide férulique. Le tégument contient principalement des alkylrésorcinols (lipide phénolique). La couche d'aleurone est riche en minéraux et en vitamine B (Antoine *et al.*, 2002).

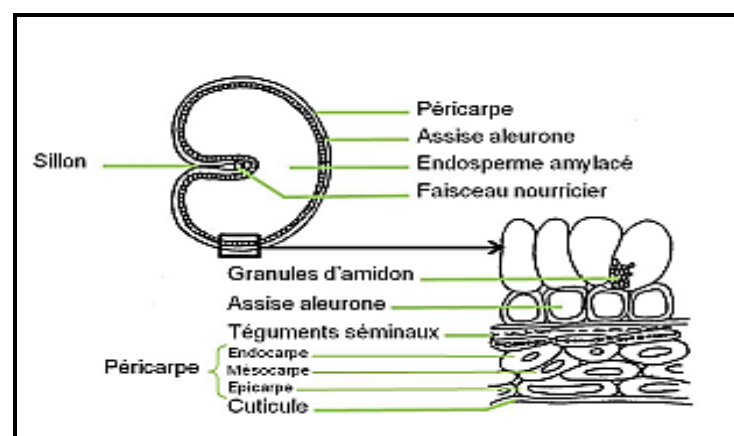


Figure 8 : Structure anatomique du son de blé (Bourdeau *et al.*, 1992).

Le son de blé est une enveloppe externe multi-lamellaire composée des tissus maternels (bande hyaline, testa, péricarpe et cuticule), au sens anatomique du terme, additionné de la couche aleurone et de restes de l'endosperme, au sens industriel du terme (Figure 9). Il représente entre 11 et 15% de la masse totale du grain de blé et son rôle est de protéger la graine (Hemery *et al.*, 2007).

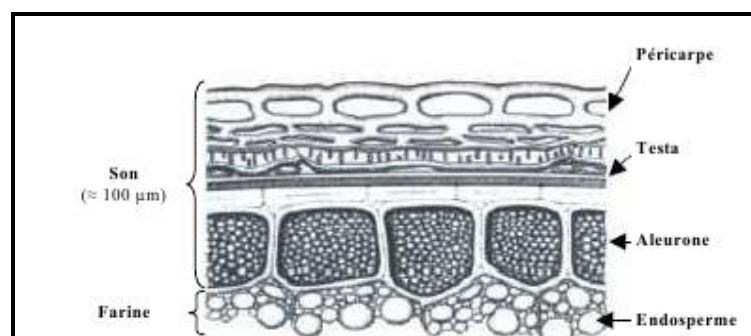


Figure 9 : Les différentes couches cellulaires constitutives du son de blé industriel (Surget, 2005 ; Hemery *et al.*, 2009).

2-3-2- Composition chimique du son de blé

La composition biochimique du son de blé industriel comprend de 22 à 25% de (glucurono) arabinoxylyanes, de 14 à 17% de protéines, de 7 à 11% de cellulose, de 3 à 10% de lignine, des β -glucanes à liaisons mixtes et de 11 à 30% d'amidon résiduel selon le mode de fractionnement (Kabel *et al.*, 2006). Au total, les polysaccharides hors amidon représentent environ 46% du son de blé industriel, dont près de 70% sont des (glucurono) arabinoxylyanes. Les travaux recensant la composition chimique des sons de blé présentent une hétérogénéité forte. (Tableau 6)

Tableau 6: Compositions chimiques des sons de blé de différentes origines.

% de la matière sèche	(Raynal-Ioualalen, 1996)		(Bataillon <i>et al.</i> , 1998)		(Maréchal, 2001)
	Son brut	Son désamidonné	Son brut	Son désamidonné	Son désamidonné
Cellulose	9,2	15,5	11,0	25,0	18,7
Hémicelluloses	37,0	60,0	19,0	45,0	62,3
Lignine	6,7	8,0	6,0	3,0	3,8
Amidon	20,0	n.d	29,0	1,0	n.d.

Protéines	14,8	15,2	14,0	9,0	15,6
Lipides	n.d	n.d	6,0	6,0	n.d
Matières minérales	5,3	1,0	4,0	1,0	1,5

Les hémicelluloses sont, après l'amidon, les constituants majoritaires des sons de blé. Elles sont principalement constituées d'arabinoxylanes, comme en témoigne la composition en sucres simples présentée au tableau 7. Par ailleurs, il peut être observé qu'une part non négligeable de protéines est présente, provenant de la couche aleurone.

Tableau 7 : Composition en sucre du son désamidonné. (*Hromadkova et al., 2008*).

Sucre simple	%
Xylose	39,2
Arabinose	25,2
Mannose	0,9
Galactose	2,1
Glucose	32,6

2-3-3- Utilisations principales du son de blé

Les qualités nutritionnelles du son lui permettent d'être utilisé dans l'alimentation humaine en tant que « fibre alimentaire » notamment dans le domaine de la boulangerie sous la forme de pains et de biscuits. Ceci signifie qu'il fait alors partie des aliments, mais qu'il n'est pas dégradé par des enzymes propres à l'homme (Selvendran *et al.*, 1980 ; Ralet *et al.*, 1990). Il aurait aussi un rôle dans la prévention d'un certain nombre de maladies et de cancers en agissant comme un inhibiteur d'agents mutagènes. Il est aussi le plus souvent employé pour l'alimentation animale, particulièrement celle des ruminants, en tant que source de protéines et qu'agent de charge.

Dans le domaine industriel, le son de blé, plus ou moins traité pour éliminer l'amidon, trouve aussi des débouchés dans les domaines de l'industrie papetière où sa faible teneur en lignine peut représenter un avantage.

2-3-4- Rôle du son de blé

Beaucoup de co-produits issus de l'agriculture remplacent les substrats synthétiques généralement plus onéreux. Parmi ces résidus, le son de blé est un des substrats le plus attractif. Il a pour avantage de permettre une bonne circulation de l'air, de ne pas présenter d'agglomération des particules entre elles, de faciliter la pénétration du mycélium dans le substrat et d'être bon marché. Aujourd'hui, le son de blé est utilisé en fermentation en milieu solide pour la production d'enzymes, de métabolites secondaires et autres produits d'intérêt biotechnologiques. Le son de blé a une bonne capacité de rétention de l'eau pouvant aller jusqu'à 80% (Abdullah *et al.* 1985). Ainsi, il est possible de travailler avec une humidité importante permettant une bonne croissance des champignons.

Le son de blé contient de la cellulose (13%), l'amidon (15-25%) et du xylène (12,65%) qui induisent une bonne production de cellulases, d'amylases et de xylanases, respectivement. Le son de blé est un substrat potentiellement intéressant pour la production de biocarburant. Des études actuelles portent sur la saccharification et la fermentation simultanée de son de blé qui permet de convertir les complexes polysaccharidiques en réserve de sucre facilement transformable en éthanol (Javed *et al.*, 2012).

Le son de blé a également un rôle dans le domaine médical. Les antioxydants contenus dans ce coproduit peuvent réduire les risques de maladies telles que : le cancer du colon, la maladie de Parkinson, les maladies cardio-vasculaires. Les fibres du son de blé sont connues pour diminuer le taux de cholestérol (Javed *et al.*, 2012).

Il est aussi utilisé comme additif dans l'alimentation humaine pour l'apport de vitamine B. Le son de blé peut aussi être utilisé dans l'alimentation animale. Il a été montré que l'ajout quotidien de son de blé dans l'alimentation des vaches permet d'augmenter la production de lait de 14,65 litres par jour.

De part l'abondance mondiale de ce co-produit, ses propriétés et ses nombreuses applications en fermentation mais aussi en médecine, le son de blé est considéré comme « l'or marron » du XXI^{ème} siècle (Javed *et al.*, 2012).

An orange scroll-style banner with a gradient from light to dark orange, featuring a shadow and a 3D effect. The banner is centered horizontally and contains the text "Matériels et méthodes" in a bold, black, serif font.

Matériels et méthodes

1-Microorganisme

La moisissure utilisée dans cette étude est *Trichoderma longibrachiatum* isolée au laboratoire de Génie Enzymatique (Université Constantine 1), à partir d'échantillons de sol collectés proche de la source thermique (Hammam Debbagh, Guelma), localisée dans le nord est de l'Algérie. Cette souche est identifiée au niveau du laboratoire DSMZ en Allemagne (Ieghlimi, 2013).

1-1 Préparation de l'inoculum

La souche est maintenue sur milieu PDA (Annexe 1), incubées à 30°C jusqu'à ce que la surface de la boîte soit recouverte de spores (Figure 10). Après sporulation de la moisissure, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension de spores va servir à l'inoculation des milieux de cultures et de production des enzymes cellulolytiques. La concentration en spores est déterminée par le dénombrement de la dilution appropriée à l'aide d'une cellule de Thoma (Guiraud, 1998).

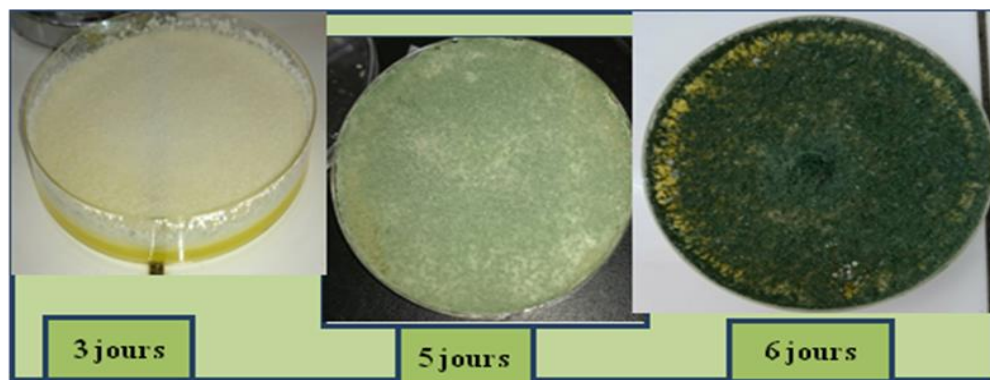


Figure 10 : *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur milieu PDA, après 3, 5 et 6 jours d'incubation à 30°C.

1-2- Conservation de la souche

Les suspensions de spores sont ensuite stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990). Pour une conservation à -20°C, les spores sont récupérées par addition de 10 ml d'eau distillée avec le glycérol à 20% (agent cryoprotecteur). Ces suspensions de spores sont ensuite stockées au congélateur, afin de garder leur viabilité et de limiter les possibilités de variation, jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990).

2-Etude de la production des enzymes cellulolytiques par fermentation sur milieu solide

2-1- Matière première

Le son de blé est la matière première principalement utilisée, comme substrat de fermentation, dans cette étude. Il nous a été gracieusement fourni par le groupe de Hamma Bouziane, unité 314 Constantine. Son humidité initiale est de 13.7%. Sa composition est présentée dans l'annexe 2.

2-2- Conduite de la fermentation solide

La production des enzymes recherchées est réalisée dans des erlens-meyers de 250 ml à raison de 5 grammes de substrats par erlens, imbibés par une solution *starter* (Annexe 3) (agent humidifiant à 70%), Les milieux sont homogénéisés à l'aide d'une tige en verre puis les erlens-meyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, les erlens vont servir pour l'étude de : effet de la température d'incubation et du taux d'inoculum sur la production des enzymes, optimisation de la production des enzymes par l'emploi des plans statistiques de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946).

2-2-1-Effet de la température d'incubation et du taux d'inoculum sur la production des enzymes

L'étude de l'effet de la température sur la production des enzymes, dont le but est de comparer les activités enzymatiques produites par la souche à différentes températures, ainsi de déterminer la température optimale de production, est effectuée par inoculation des erlens meyers préparés précédemment avec une suspension de spores à raison de 2×10^7 spores par gramme de substrat. Le contenu de chaque erlen meyer doit être bien mélangé à l'aide d'une tige stérile. Les erlens meyers ensemencés sont ensuite incubés à différentes températures (28°C, 30°C, 37°C et 45°C) pendant 3 jours. L'étude de l'influence du taux d'inoculum sur la production des enzymes par la souche est réalisée par incubation des erlens contenant le milieu de production à 30°C (température optimale de production des enzymes), pendant 3 jours. Les taux d'inoculum étudié sont $1,5 \times 10^7$ et $2,5 \times 10^7$ spores par gramme de substrat. Toutes les expériences sont réalisées en duplicate.

2-2-2- Plan d'expériences pour l'optimisation de la production des enzymes

Le plan d'expériences utilisé est établi selon les matrices de Plackett-Burman (Plackett et Burman, 1946), ce plan permet la sélection des facteurs ayant un effet

significatif sur la production des enzymes cellulolytiques (papier filtre et endoglucanase) par la souche *Trichoderma longibrachiatum*. Ces matrices d'expériences permettent d'évaluer l'influence de k facteurs à deux niveaux sur la réponse étudiée avec un nombre d'expériences N tel que : $N = 2^k$ (N est un multiple de 4 et peut être compris entre 4 et 100). Ce sont des matrices carrées (dites matrices d'Adarnard) ne contenant que des éléments égaux à +1 ou -1, établies par permutation circulaire à partir d'un générateur de base.

Dans cette étude, la matrice employée est représentée dans le tableau 7. 8 expériences et 7 facteurs (5 réels et 2 erreurs) : chaque ligne représente les différentes expériences et chaque colonne les facteurs testés. (X3) et (X5) représentent les facteurs erreurs qui permettent l'estimation de l'erreur expérimentale. Les facteurs de la dernière expérience étant toujours pris au niveau -1. Les niveaux supérieurs (+) et les niveaux inférieurs (-) de l'ensemble des facteurs testés sont rapportées dans le tableau 8 et les essais sont reportés dans la matrice des essais en tableau 7. Les erlens sont ensemencés avec une suspension de spores à un taux de 2×10^7 spores par gramme de substrat, et incubés à 30 °C pendant 3 jours. Les expériences sont préparées en double (chaque résultat est la moyenne de 2 essais).

Tableau 8 : Matrice d'expériences de Plackett et Burman pour l'étude de 7 facteurs avec 8 expériences.

N° d'essais	<u>Facteurs</u>						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
1	1	1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	1
4	-1	1	-1	-1	1	1	1
5	1	-1	-1	1	1	1	-1
6	-1	-1	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1	1	-1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

X_3 et X_5 : sont les facteurs erreurs.

(+) : niveau supérieur du facteur.

(-) : niveau inférieur du facteur.

Tableau 9 : Les facteurs testés et leurs concentrations correspondantes.

Facteurs	Niveau (-)	Niveau (+)
X_1 : CMC	0%	1%
X_2 : $(NH_4) SO_4$	0%	0.5%
X_3 : Erreur	-	-
X_4 : $MgSO_4 7H_2O$	0%	0.05%
X_5 : Erreur	-	-
X_6 : $FeSO_4 7H_2O$	0%	0.02%
X_7 : $ZnSO_4 7H_2O$	0%	0.02%

2-2-3- Analyse statistique des matrices du plan de plackett-Burman

A la fin de chaque expérience, les coefficients de chaque facteur explicatif sur la production des enzymes en question de *Trichoderma longibrachiatum* sont estimés par la méthode des moindres carrés et assortis de test t de Student à un seuil critique α . Des sous modèles sont alors sélectionnés pour chacun des facteurs à expliquer. Le degré de signification accepté (niveau de confiance) est de $(1-\alpha) \geq 70\%$. La signification de chaque variable sur la production des enzymes est déterminée via le test- t de Student, si le test t est significatif, l'effet est donc dû au changement du niveau du facteur et non pas au hasard ni à l'erreur expérimentale. C'est-à-dire le changement du facteur du niveau inférieur au niveau supérieur entraîne un effet positif ou négatif sur la réponse. Les calculs des coefficients de régression ainsi que le test de Student pour la régression linéaire multiple sont évalués par le logiciel « Minitab 15 » (Minitab Inc, PA, USA).

La réponse théorique Y , pour chaque facteur analysé, est de la forme :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \varepsilon$$

Où β_0 : constante
 $\beta_1 \dots \beta_7$: coefficients de régression
 $X_1 \dots X_7$: facteurs explicatifs.

L'effet de chaque facteur et de l'erreur sont calculés comme la différence entre la moyenne des valeurs de réponses observées au niveau supérieur (+) et la moyenne des valeurs de réponses observées au niveau inférieur (-).

$$E = \frac{\sum \text{réponses au niveau (+)}}{r} - \frac{\sum \text{réponses au niveau (-)}}{r}$$

E : effet de chaque facteur ;

r : le nombre d'apparition du facteur au niveau supérieur ou inférieur, r = 4

* La variance est définie comme la moyenne des carrés des erreurs, qui est exprimée par :

$$V_E = \frac{\sum (\text{erreurs})^2}{n}$$

V_E : Variance des effets ;

n : nombre des erreurs.

* L'erreur standard E. S est définie comme la racine carrée de la variance, exprimé par :

$$E.S = \sqrt{V_E}$$

* La signification de chaque facteur est déterminée par le test-t de Student :

$$t = E / E.S$$

3- Mesures et dosages effectués après fermentation

A la fin de la fermentation, une quantité connue (2.5g) de substrat fermenté est mélangée avec 50 ml de solution tampon citrate 0.1M, pH 4.8 (Annexe 4). Après broyage à l'aide d'un blinder ménager pendant 1 à 2 minutes, le mélange est centrifugé à 12000 rpm pendant 5 minutes, à 4°C. Le surnageant obtenue (représente l'extrait enzymatique) est utilisée pour le dosage des activités enzymatiques (papier filtre et endoglucanase). Les expérimentations sont réalisées en triplicate. Le surnageant est conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

3-1- Dosage des activités cellulolytiques

➤ **Activité papier filtre (APF)** : est utilisée pour déterminer l'activité totale dans un complexe cellulosique selon la méthode de Ghose (Ghose, 1987) dont le

principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés (lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique). Le mélange réactionnel est constitué d'une solution d'enzyme (0.5 ml), d'1 ml de tampon citrate (0.1M, pH 4.8) et de 50 mg de papier filtre Wattman N° 1 (des morceaux de 1 x 6 cm), incubés à 50°C pendant 60 minutes.

➤ **Activité endoglucanase:** (CMCase, endo 1.4-β-D-glucanase ; EC 3. 2. 1. 4) est mesurée dans un volume totale de 1 ml d'un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans du tampon citrate 0.1 M, pH 4.8 et 0.5 ml d'une solution de CMC (carboxymethylcellulose) à 1 % (W/V) préparé dans le tampon citrate 0.1M, pH 4.8. Ce mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 30 minutes.

La quantité des sucres réducteurs libérés de l'hydrolyse du papier filtre et du carboxymethylcellulose est mesurés selon la méthode de Miller (Miller, 1959) par une réaction colorimétrique due à la présence du réactif : acide dinitrosalicylique (DNS) (Annexe 5).

* L'absorbance de la coloration développée est lue à 540 nm, l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant le glucose comme standard avec une concentration de la solution mère de *0.0167Moles/litre* (figure11). L'activité enzymatique est calculée en **Unité par gramme de matière sèche (U/gds)**.

Une unité de l'activité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui libère une micromole d'équivalent glucose (lorsque le glucose est utilisé comme étalon sucre réducteur) par minute et par millilitre, à 50°C, pH 4,8. Si il y a une forte couleur rouge brique donc il y a une grande production des sucres libérés (glucose). Le blanc est préparé de la même façon, sans l'addition de substrat. Chaque dosage est effectué en triplicate.

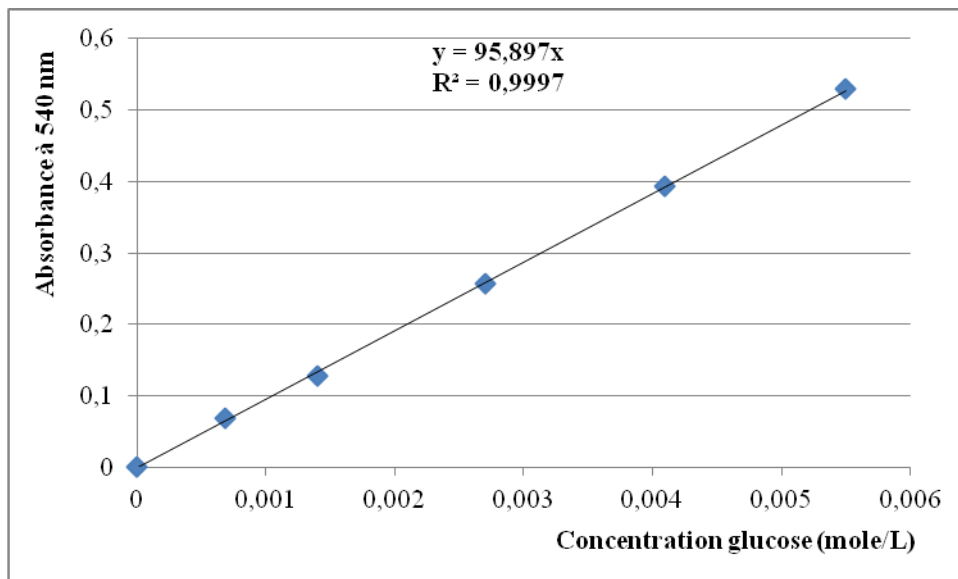


Figure 11 : Courbe étalon de glucose pour le dosage des activités papier filtre et endoglucanase.

3-2- Mesure de l'humidité

L'humidité est un paramètre qui renseigne sur le développement du champignon au cours de la culture. En effet, au cours de sa croissance, le champignon produit six molécules d'eau pour une molécule de glucose consommée (Clémence ,2012). De plus, la mesure du taux d'humidité permet de déterminer la matière sèche, nécessaire pour le calcul de la production de l'enzyme.

L'humidité est déterminée par la méthode de la mesure du poids sec. 2,5g de substrat fermenté de chaque prélèvement est séché par incubation dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant (Audigie *et al.*, 1984). L'humidité correspond au pourcentage que représente la masse d'eau obtenue par calcul après dessiccation par rapport à la masse initiale.

D'une part, la matière totale et la matière sèche sont déterminées afin de calculer la production des enzymes. La matière sèche permet également d'avoir des indications concernant la consommation du substrat. D'autre part, l'humidité est un paramètre permettant l'amélioration de la croissance du champignon et/ou de la production de la molécule recherchée.



Résultats

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus portant sur l'étude de la production des enzymes cellulolytiques de *Trichoderma longibrachiatum* par fermentation sur milieu solide. Dans cette étude, l'influence de la température d'incubation et du taux d'inoculum sur la production des enzymes est testée, ainsi que, l'optimisation du milieu de production des enzymes recherchées par l'emploi du plan d'expériences de Plackett-Burman, (1946), du fait que la grande majorité des micro-organismes industriels sont chimio-hétérotrophes, ce qui rend nécessaire d'apporter au milieu de production, une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux.

1-Effet de la température d'incubation

Différentes températures (28°C, 30°C, 37°C et 44°C) sont testées pour comparer les activités enzymatiques mesurées : papier filtre et endoglucanase, ainsi de déterminer la température optimale pour la production des enzymes. Les résultats sont présentés dans les figures 12 et 13.

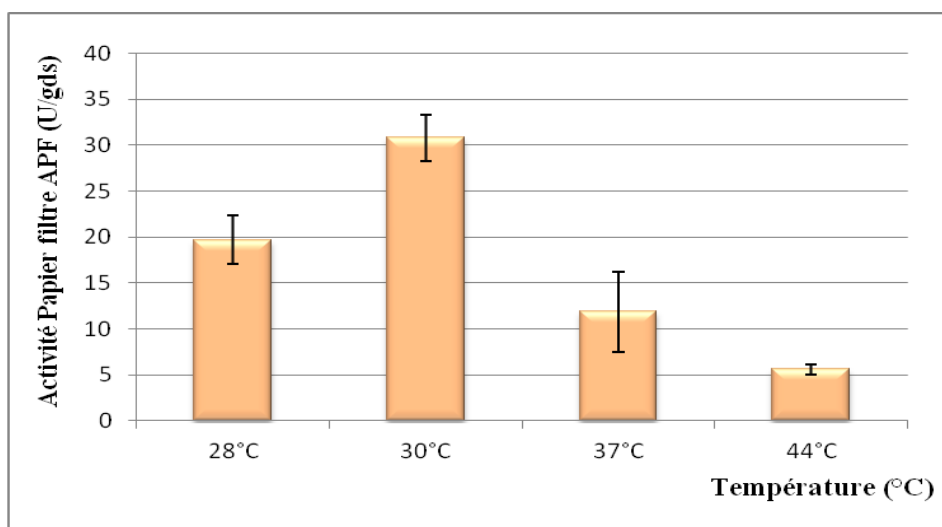


Figure 12 : Effet de la température d'incubation sur la production de l'activité Papier filtre (APF) après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types. N=3.

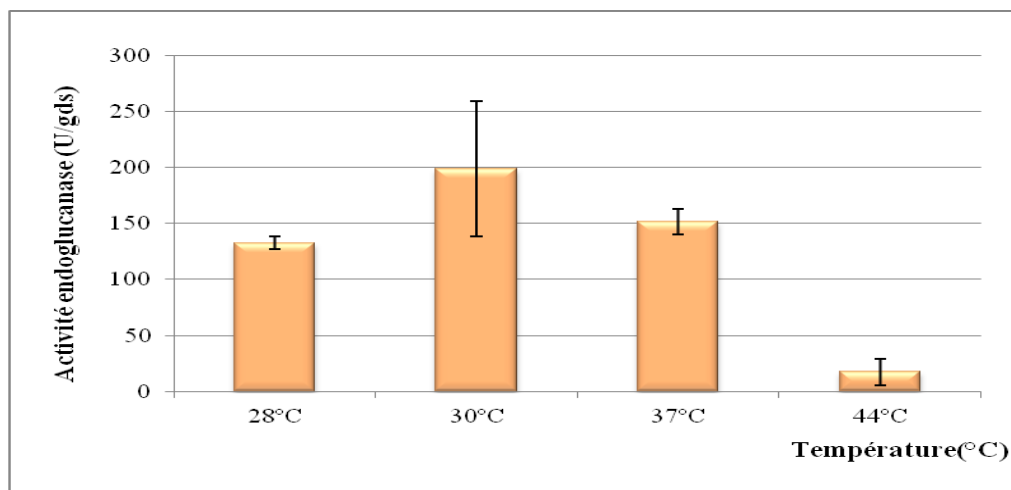


Figure 13 : Effet de la température d'incubation sur la production de l'activité endoglucanase après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types. N=3.

Les résultats présentés dans les figures 12 et 13 montrent que la production de la cellulase est nettement influencée par la température d'incubation. La température optimale de production des deux activités APF et endoglucanase est de 30°C, où les activités sont mesurées à **30.83 U/gds pour l'APF et 225,8 U/gds pour l'endoglucanase**. Cette température va donc être adoptée pour la suite de notre étude. La production des enzymes est aussi appréciable à 28°C et à 37°C. Pour l'activité globale papier filtre, les valeurs de 19.7 U/gds, 11.87 U/gds sont mesurées respectivement à 28°C et à 37°C. De même, l'activité endoglucanase est évaluée à 28°C et à 37°C dont les valeurs respectives sont : 132.4 U/gds, 151.5 U/gds. Quant à 44°C, la production des enzymes s'avère très faible, les valeurs respectives de 5.6 U/gds et 17.4 U/gds sont mesurées pour les activités papier filtre et endoglucanase.

2- Effet de la Densité de l'inoculum

Une gamme des taux d'inoculum (spores/gramme de substrat) : 1.5×10^7 , 2×10^7 et 2.5×10^7 , est testé à 30°C pour comparer la production des enzymes à différentes concentrations en inoculum, aussi pour déterminer le taux d'ensemencement optimal adéquat pour la production maximale des enzymes. Les résultats sont présentés dans les figures 14 et 15.

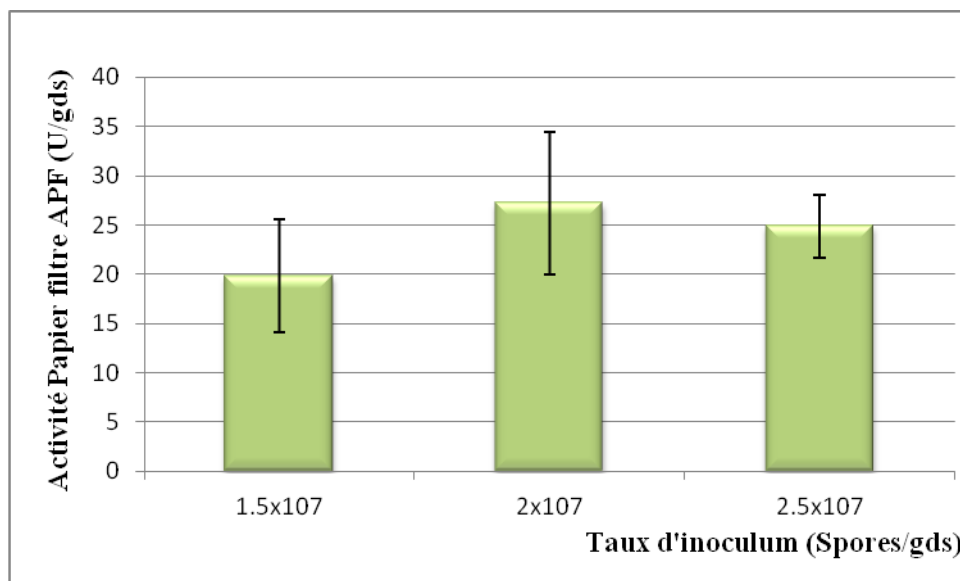


Figure 14 : Effet du taux d'inoculum sur la production de l'activité Papier filtre (APF) après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types. N=3.

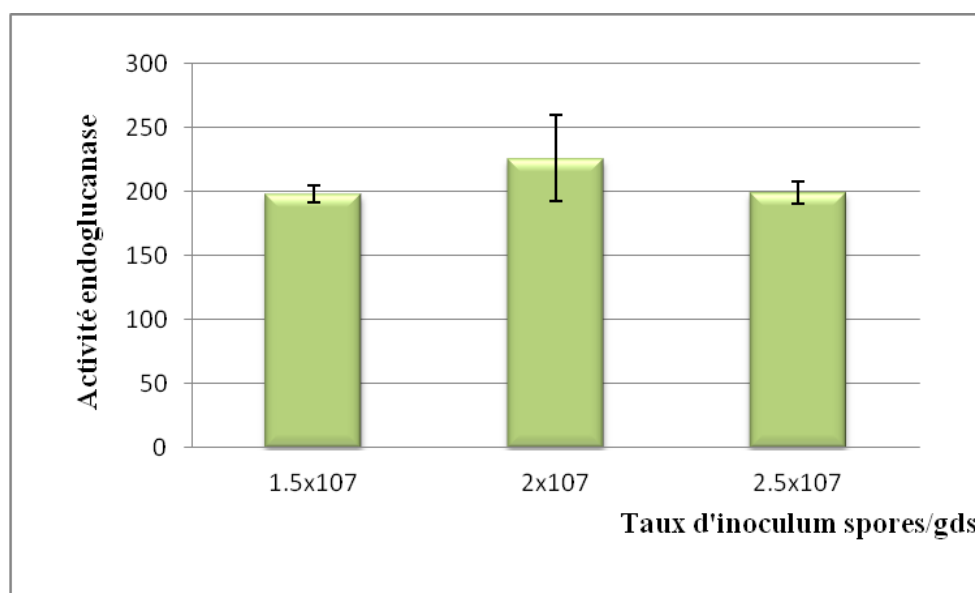


Figure 15 : Effet du taux d'inoculum sur la production de l'activité endoglucanase après 3 jours de fermentation. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts- types. N=3.

L'examen des figures 14 et 15, montre que le taux d'ensemencement influe différemment l'expression des enzymes secrétées par cette souche. Il ressort que la concentration d'inoculum de 2×10^7 spores par gramme de substrat, semble être suffisante pour obtenir une bonne activité cellulolytique mesuré à **30.83 U/gds pour l'activité APF** et à **225,8 U/gds pour l'activité endoglucanase**. Cette concentration d'inoculum est choisie pour la suite du travail. Par ailleurs, on note une légère diminution des activités évaluées avec les autres concentrations en spores. A savoir, le

taux 1.5×10^7 spores/gds donne 19.8 U/gds d'APF et 198.12 U/gds d'endoglucanase, presque de même, on obtient avec le taux 2.5×10^7 spores/gds 24.87 U/gds d'APF et 199.42 U/gds d'endoglucanase.

3- Optimisation de la production des enzymes selon le plan statistique de Plackett et Burman

L'effet des facteurs étudiés selon le plan de Plackett et Burman (Carboxyméthyl cellulose, sulfate d'ammonium, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) a permis d'évaluer 2 réponses : l'activité globale papier filtre et l'activité endoglucanase. L'ensemble des résultats est récapitulé dans le tableau (10).

Tableau 10 : Activités enzymatiques produites selon le plan de Plackett et Burman.

N° d'essais	Facteurs							Activité APF (U/gds)	Activité endoglucanase (U/gds)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7		
1	1	1	1	-1	1	-1	-1	16.93	285.70
2	1	1	-1	1	-1	-1	1	4.96	212.72
3	1	-1	1	-1	-1	1	1	28.34	217.55
4	-1	1	-1	-1	1	1	1	22,96	266.51
5	1	-1	-1	1	1	1	-1	19.71	222.79
6	-1	-1	1	1	1	-1	1	17.43	163.93
7	-1	1	1	1	-1	1	-1	13.42	273.83
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	19.68	148.13

3-1- Effets des facteurs testés sur la production de l'activité papier filtre

L'activité papier filtre (APF) varie de 4.96 U/gds à 28.34 U/gds avec une moyenne de 17.92 U/gds (Tableau10). La plus faible activité correspond à l'essai n° 2 où le milieu de base est enrichi en CMC, en sulfate d'ammonium, en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ et en $ZnSO_4$

7H₂O. Par contre, l'activité la plus importante est enregistrée dans le 3^{ème} essai où le milieu de production est supplémenté en CMC, en FeSO₄ 7H₂O et en ZnSO₄ 7H₂O.

3-2- Effet des facteurs testés sur la production de l'activité endoglucanase

L'endoglucanase de *Trichoderma longibrachiatum* varie de 148.13 U/gds à 285.7 U/gds avec une moyenne de 223.89 U/gds. Le plus faible rendement est obtenu dans l'essai 8 qui comporte le milieu de base sans aucune supplémentation et le plus élevé dans l'essai 1 où le milieu de culture est enrichi en CMC et en sulfate d'ammonium.

3-3- Traitement statistique des résultats

L'analyse statistique des résultats nous a permis de mesurer l'effet de chaque facteur par le calcul du coefficient de corrélation et son niveau de signification sur chaque réponse par la mesure de la probabilité (P): Le principe d'exploitation consiste à calculer les coefficients du modèle polynomial, plus sa valeur absolue est élevée, plus le terme correspondant (facteur simple ou interaction) a une influence importante sur la réponse étudiée. S'il est faible, il a peu ou pas d'effet. S'il est négatif, dans ce cas l'augmentation de la valeur du facteur exerce une diminution de la réponse. La signification statistique est déterminée grâce au test de la probabilité (P):

* $P < 0,3$: le résultat est significatif, donc le facteur est retenu.

* $P > 0,3$: le résultat est non significatif, donc le facteur ne présente pas un effet important sur la réponse ce qui l'exclue de l'étude.

D'après le tableau(10), les données, ajustées sur un modèle de régression montrent que les facteurs les plus influents sur l'activité papier filtre sont : le sulfate d'ammonium et les sels (FeSO₄ 7H₂O, MgSO₄7H₂O). L'analyse statistique (Tableau 11) montre que la production de l'activité papier filtre est expliquée de façon positive significative par FeSO₄ 7H₂O ($p=0,215$) et de façon négative significative par le sulfate d'ammonium (NH₄) SO₄ ($p=0,128$) et le MgSO₄7H₂O ($p=0,165$).

Tableau 11: Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production l'activité papier filtre (APF).

Facteur	Effet	Coeff	Coef ErT	t	p
Constante		17.92	2,976	11,22	0,008
CMC	-0.885	- 0,315	2,976	-0,11	0,925
(NH ₄) SO ₄	-6.723	-7,506	2,976	-2,52	0,128**
MgSO ₄ 7H ₂ O	-8.097	- 6,398	2,976	-2,15	0,165**
FeSO ₄ 7H ₂ O	6.35	5,332	2,976	1,79	0,215**
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.99	1,159	2,976	0,39	0,734

* : Signification

Par contre les facteurs CMC et sulfate d'ammonium influencent positivement la production de l'endoglucanase (Tableau12): d'une façon significative pour le CMC ($p=0,288$), très significative pour la source d'azote représentée par le sulfate d'ammonium, avec une probabilité ($p=0,153$).

Tableau 12 : Etude statistique de l'effet des facteurs testés sur la production de l'endoglucanase.

Facteur	Effet	Coeff	Coef ErT	t	p
Constante		223.89	24,01	17,19	0,003
CMC	21.59	34,42	24,01	1,43	0,288**
(NH ₄) SO ₄	71.59	54,08	24,01	2,25	0,153**
MgSO ₄ 7H ₂ O	-11.16	-2,37	24,01	-0,10	0,930
FeSO ₄ 7H ₂ O	42.55	21,29	24,01	0,89	0,469
ZnSO ₄ 7H ₂ O	-17.44	3,72	24,01	0,15	0,891

* : Signification

Les facteurs CMC et $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ n'ont aucun effet significatif sur l'activité papier filtre. Par contre, les sels n'ont aucun effet significatif sur l'endoglucanase.

3-4- Expression des résultats sous forme d'équation

Les résultats des activités cellulolytiques peuvent être présentés par une équation polynomiale du premier degré ayant la forme suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7$$

De tous ces résultats, les meilleurs sous modèle retenu (après régression progressive) permettant d'exprimer les activités cellulolytiques de *Trichoderma longibrachiatum* qui sont récapitulés dans le tableau (13).

Tableau 13 : Sous modèles de régressions retenus pour le rendement en activité cellulolytique.

Réponses mesuré	Equation	R2	Facteurs sélectionnés
Activité papier filtre(APF)	$Y_{APF} = 17.92 - 7,51 X_2 - 6,40 X_4 + 5,33 X_6$	87,8%	X2:(NH ₄) SO ₄ X4 :MgSO ₄ 7H ₂ O X6:FeSO ₄ 7H ₂ O
Activité endoglucanase	$Y_{Endoglucanase} = 223.89 + 34,42 X_1 + 54,1 X_2$	79,9%	X1:CMC X2:(NH ₄) SO ₄



Discussion

La température est un facteur critique, joue un rôle prépondérant sur la croissance, la germination, la sporulation et le métabolisme des moisissures affectant ainsi la biosynthèse des enzymes (Raimbault, 1983). D'après les résultats obtenus, la production maximale des enzymes cellulolytiques (**30,83 U/gds pour l'APF et 225,8 U/gds pour l'endoglucanase**) par la souche *T.longibrachiatum* est enregistrée à la température de 30°C. Ceci corrobore les résultats de Taskin et Erdal (2010), qui montrent que la température optimale pour la production maximale de la cellulase par *Penicillium expansum* ne dépasse pas 30°C. Aussi, Piotrajanas *et al.*, (1995) affirment que la température optimale de production de l'activité APF par *T. reesei* se situe entre 28°C et 30°C. Moeses *et al.*, (2012) annoncent une température optimale de 28°C pour la production d'activité papier filtre par *Trichoderma reesei* cultivé par FMS sur milieu à base de son de riz. Van Zyl, 1985 a montré que le maximum de l'activité endoglucanase se situe entre 26 et 30°C. De même, Ndiogou Gueye *et al.*, (2016) montrent que la température optimale de production de la cellulase par *Trichoderma* est de 29°C. Par contre le maximum d'endoglucanase produite par *T.viride* est à 55°C (Van Zyl, 1985).

Nos résultats montrent qu'un taux d'inoculum de 2×10^7 spores/gds donne le maximum des activités enzymatiques. Cependant, une concentration de 3×10^7 spores/gds correspond à une dose optimale pour initier une bonne croissance (Roussos et Raimbault, 1982). Aussi, un taux de 2×10^8 spores/gds est préconisé pour la production de cellulase de *Trichoderma. Sp* cultivé sur grignons de pomme (Haiyan *et al.*, 2010). En effet, les taux d'inoculum faibles exigent plus de temps pour la multiplication des cellules à un nombre suffisant pour utiliser le substrat et produire les enzymes. Tandis que, un inoculum de concentration moyenne en spores assure une prolifération rapide de la biomasse, ainsi que, la synthèse de métabolites. Au-delà d'une certaine limite, la production d'enzymes pourrait diminuer en raison de l'épuisement des nutriments due à une biomasse accrue, ce qui entrainerait une diminution de l'activité métabolique (Haiyan *et al.*, 2010).

Bien que, le milieu son de blé soit largement utilisé pour la production de la cellulase par FMS, ce dernier puisse soutenir la croissance de champignons filamenteux et la production de cellulase. Cependant, il ne peut pas fournir assez de nutriments nécessaires aux organismes pour la production maximale d'enzymes, d'où l'ajout exogène de certains nutriments au milieu pour améliorer la croissance cellulaire et la production d'enzymes (Sternberg et Dorval, 1979 ; Tangu et Blanch, 1981).

La production de l'activité papier filtre est expliquée de façon positive significative par le $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($p=0,125$), avec une augmentation de la production par 32,26%, et de façon négative significative par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ($p=0,128$) et le $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($p=0,165$), avec une diminution de la production par -34,16% et -41,14%, respectivement. L'effet négatif significatif du sulfate d'ammonium s'explique probablement par la présence de quantités suffisantes en azote dans le blé qui est un élément majeur indispensable à la croissance microbienne, donc son addition à la concentration de 0.5% a diminué la production. Selon Amirul *et al.*, (1996), l'azote peut être un facteur limitant. Il doit être fourni à des doses adéquates, sous forme inorganique et complexe pour avoir un effet stimulateur.

Les ions métalliques sont connus pour stabiliser et activer les enzymes (Swamy, 1994; Leveque *et al.*, 2000 et Vieille et Zeikus, 2011). Le MgSO_4 joue un rôle dans le métabolisme des champignons est principalement lié à l'activation de plusieurs variétés de systèmes enzymatiques. Par ailleurs, il contribue à la formation et au fonctionnement de la membrane des moisissures. Il se lie à l'ATP et à l'ADP et joue un rôle dans le transport du phosphore (Francis et Khasraji, 1991) . L'absence d'effet pourrait s'expliquer par leur présence en quantité suffisante dans le milieu de base.

Les facteurs CMC et sulfate d'ammonium influencent positivement la production de l'endoglucanase. Effet significatif pour le CMC ($p=0,288$) avec une augmentation de la production par 14,57%, très significatif pour la source d'azote représentée par le sulfate d'ammonium ($p=0,153$) avec une augmentation de la production par 48,33%. Ce

résultat est attendu: le CMC est le substrat inducteur de l'endoglucanase. D'après Niranjane *et al.*, (2007), le CMC s'est révélé être un puissant inducteur des enzymes cellulases. D'où l'obtention des plus hauts rendements de cellulases sur CMC. Il a également été constaté que le CMC était le substrat préféré pour la production d'endoglucanase (Lucas *et al.*, 2001).

Le sulfate d'ammonium influence positivement la production de l'endoglucanase d'une façon très significative. Pederson et Nielsen (2000), rapportent dans leurs études que l'utilisation des sources azotées, comme l'extrait de levure et le sulfate d'ammonium favorise la production de taux élevés d'enzymes par la moisissure *Aspergillus oryzae*, ceci peut être expliquée par le fait que les micro-organismes nécessitent des taux faible en azote sous formes simple et complexe.

L'apport en sels minéraux n'a aucun effet significatif sur l'activité endoglucanase, car la teneur en sels minéraux contenu dans le milieu de base (son de blé) semble suffisante couvrir les besoins de la moisissure. Bien que leur rôle soit capital : le calcium, nécessaire au maintien de la conformation de l'enzyme et à son activité, le chlore et le zinc jouent le rôle de cofacteurs (Comi *et al.*, 2000 ; Bennamoun *et al.*, 2004 ; Djekrif-Dakhmouche 2006 et Gangadharan *et al.*, 2008).

L'effet des facteurs erreurs doit être nul, néanmoins lorsqu'il est différent de zéro comme dans notre cas nous suggérons qu'il est du à des erreurs effectués lors des mesures ou des dosages différents ou bien il peut s'expliquer également par une interaction entre les facteurs vue l'ordre élevé du fractionnement dans les matrices de Plackett et Burman, ce qui veut dire que l'erreur peut être confondue à une interaction. L'erreur moyenne, vaut pour la production de la cellulase ; valeurs de t respectivement non significatif. Cela nous permet de dire que les résultats obtenus dans notre étude sont acceptable et ce plan statistique est idéal pour ce type d'optimisation.



Conclusion générale

Le but de cette étude est la production de la cellulase par la moisissure, *T.longibrachiatum* par fermentation sur milieu solide (FMS). Les résultats obtenus montrent que le son de blé utilisé comme milieu de base constitue un substrat convenable pour la croissance de la moisissure à cause de sa richesse en matières azotées et en cellulose. Ces sources carbonées et azotées conviennent donc aussi bien à la croissance microbienne qu'à la production de métabolites.

La production des enzymes par *T. longibrachiatum* est effectuée sur son de blé à 70% d'humidité. Elle est influencée par la température d'incubation et du taux d'inoculum. La température optimale de production des deux activités APF et endoglucanase est de 30°C, où les activités sont mesurées à 30.83 U/gds pour l'APF et 225,8 U/gds pour l'endoglucanase. La concentration d'inoculum de 2×10^7 spores par gramme de substrat est suffisante pour obtenir une bonne activité cellulolytique mesuré à 30.83 U/gds pour l'activité APF et à 225,8 U/gds pour l'activité endoglucanase.

La production s'est poursuivie par l'optimisation de la composition du milieu de culture en réalisant les expériences dans le cadre d'un plan statistique de Plackett et Burman (1946) pour la sélection des facteurs d'enrichissement ayant un effet significatif sur la production des enzymes. Pour cela, cinq facteurs de supplémentation du milieu de base sont utilisés: carboxyméthyl cellulose, sulfate d'ammonium, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

L'analyse statistique des résultats de ce plan et la modélisation selon une régression linéaire multiple ont permis de sélectionner le CMC et le sulfate d'ammonium comme facteurs avec ayant un effet significatif sur l'activité endoglucanase et les facteurs sulfate d'ammonium, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ avec un effet significatif sur l'activité papier filtre.

Ces résultats exigent d'autres études et ouvrent de nouvelles perspectives :

*Tester autres déchets agroalimentaires pour la production de différentes substances par des souches fongiques.

*La détermination des valeurs optimales des facteurs sélectionnés par l'emploi d'un autre modèle statistique, basé sur les plans composites centrés de Box et Wilson (1951).



Références

bibliographiques

1. **Abdullah A. (1985).** "Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw." *biotechnology and bioengineering* 27(1), P: 20-27.
2. **Acourè S., Tama M. (2001).** Utilisation des Dattes de Faible Valeur Marchande (Rebuts de Deglet-Nour, Tunisie et Tantboucht) Comme Substrat pour la Fabrication de la Levure Boulangère. Station I.N.R.A.A, Touggourt. Rev. p :1-10.. *Energ. Ren.: Production et valorisation Biomasse.*
3. **Amirul A-A., Khood S-L., Nazalan M-N., Razip M-N., et Azizan M-N., (1996).** Purification AND proprieties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Folia microbial (praha)*, 41(2) : 165-174.
4. **Antoine C., Lullien Pellerin V., Abecassis J. & Rouau X. (2002).** Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer. *Sciences des Aliments.* 22. pp. 10.
5. **Arantes., Valdeir., Saddler., Jack N. (2010).** Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* [en ligne], vol. 3, n°4.
6. **Audigie C.L., Fagerella J., Zonszain F. (1984).** Manipulation d'analyse biochimique. P:270. Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris.
7. **Bagnara C. (1986).** Identification et caractérisation d'une nouvelle bactérie cellulolytique mésophile : *Cellulomonas fermentans*. Etudes physiologiques et biochimiques. Thèse de Doctorat ès Sciences. Université d'Aix-Marseille. France.
8. **Ballerini Daniel. (2011).** Les biocarburants. Répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports. Paris (France) : Technip, 381 p. ISBN : 978-2710809692.
9. **Bansal., Prabuddha., Hall., Mélanie., Realff., Matthew J., Lee., Jay H., Bommarius., Andreas S.. Modeling. (2009).** Cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances* [en ligne], vol. 27, n°6, p. 833-848.
10. **Bataillon, M., P. Mathaly., A. P. Nunes Cardinali and F. Duchiron. (1998).** "Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale." *Industrial Crops and Products*, 8(1):37-43.
11. **Bayer E A., Kenig R., Lamed R. (1998).** Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J Bacteriol.* 156: 81.

12. **BEAUGRAND., Johnny. (2004).** Bases cytologiques et moléculaires de la dégradation enzymatique du son de blé tendre [en ligne]. Thèse de doctorat : biochimie. Reims : Université de Reims Champagne-Ardenne.
13. **Bèguin P., Aubert J P. (1994).** The biological degradation of cellulose, fems, *microbiol. Rev.* 13, P: 25-58.
14. **Bellon-Maurel V., Orliac O. & Christen P. (2003).** Sensors and measurements in solid-state fermentation: a review. *Process Biochem.*, 38, 881-896.
15. **Bennamoun L., Meraihi Z., et Dakhmouche S. (2004) :** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivée sur milieu à base de déchets d'oranges. *J. Food Eng.*, 64 : 257-264.
16. **Bissett J. (1991).** A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. (a) *Can. J. Bot.* 69: 2373-2417.
17. **Blume J.E., Ennis H.L. (1991).** A dictyostelium dicoideum cellulose is a member of a spore germination-specific gene family. *J. Biol. Chem.* 266 (23). p:15432-15437.
18. **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P H., Larpent J P., Reymond P., Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P: 34-428.
19. **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.
20. **Bourdeau.A. and G. Ménard. (1992).** Le blé, éléments fondamentaux et transformation. Laval, Les Presses de l'Université de Laval.
21. **Box G.E.P., Wilson K.B. (1951).** On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Stat. Soc. B.*, 13; 1-45.
22. **BROWN. R., Malcolm Jr. (1999).** Cellulose structure and biosynthesis. *Pure and Applied Chemistry* [en ligne], vol. 71, n°5, p. 767-775.
23. **Cavako-Paulo. (1998).** Mechanism of cellulase action in textile processes .
24. **Chundawat., Shishir P.S., Beckham., Gregg T., Himmel., Michael E., Dale., Bruce E. (2011).** Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* [en ligne], vol. 2, p. 121-145.

25. **Clémence- RESTINO. (2012).** Production d'acide itaconique par des souches d'*Aspergilli* par fermentation en milieu solide.p :64.
26. **Comi K., Akeno T., Minetoki T., Ozeki K., Kumagai C., Okazaki N., et Linura Y. (2000).** Molecular cloning and characterization of a transcriptional activator gene amy r involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*. Basic Biotechnol. Biochem. 64(4): 816-827.
27. **Cordonnier R.E., Bayonone C.L., Baumes R.L. (1986).** Données récentes sur les précurseurs d'arômes du raisin, perspectives de leurs exploitations en vinification. Rev. Fr. Oenol. 102.p :29-41.
28. **COSGROVE ., Daniel J. (2005).** Growth of the plant cell wall. Nature Reviews Molecular Cell Biology [en ligne], vol. 6, n°11, p. 850-861.
29. **Dan S., Marton. I., Dekel M., Bravdo B.A., He S., Withers S.G., Shoseyov O. (2000).** Cloning, expression, characterisation and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase.J.Biol.Chem.275 (7).p: 4973-4980.
30. **Djekrif-Dakhmouche S., Gheribi-Aoulmi Z., Meraihi, Z., et Bennamoun, L. (2006).** Application of a statistical design to the optimization of culture medium for -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. J. Food Eng., 73: 190-197.
31. **Du, C., G. M. Campbell., N. Misailidis., F. Mateos-Salvador., J. Sadhukhan., M. Mustafa and R. M. Weightman. (2009).** "Evaluating the feasibility of commercial arabinoxylan production in the context of a wheat biorefinery principally producing ethanol. Part 1. Experimental studies of arabinoxylan extraction from wheat bran." Chemical Engineering Research and Design, 87(9):1232-1238.
32. **Duff, S.J.B. and Murray, W.D (1996).** Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol - a review. Bioresource. Technol., 55: 1-33.
33. **DURAND, Alain. (1998).** La fermentation en milieu solide. Biofutur [en ligne] n°181, p. 41-43. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S0294-3506\(98\)80171-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0294-3506(98)80171-3).
34. **Eriksson, T., Borjesson, 1., Tjemeld, F. (2002)** "Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose", Enzyme Microbial Technology 31(3): 353-364.
35. **Francis R. et. Khasraji T.O. (1991).** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires Cultivés sur Corn Steep Liquor et Evaluation Nutritionnelle de la Biomasse Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse, 11-28.

36. **Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Madhavan Nampoothiri K., Sukumaran R-K., et Pandey A., (2008)** : Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*, 99 : 4597-4602.
37. **Gao, J., H. Weng, D. Zhou., M. Yuan., F. Guan and Yu Xi.(2008)**. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solidstate cultivation of corn stover. *Bioresour. Technol.*, 99 :7623-7629.
38. **Geng, x., Kaichang Li., Irina A. Kataeva., Xin-Liang L., Lars G.L (2003)** "Effetes of twoCellobiohydrolases, CbhA and CeIK, from *Clostridium thermocellum* on Deinking of Recycled Mixed Office Paper", *Progress in Paper Recycling* 12(3): 6-1 0.
39. **Ghose. TK . (1987)**. Mesure des activités de la cellulase.*Pure Appl Chem*,59 , 257-268
40. **GIDENNE.T. (2003)**. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* [en ligne], vol. 81, n°2-3, p. 105-117. Disponible à l'adresse : [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00301-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00301-9).
41. **Greenshields. (1993)**. "Evaluating the feasibility of commercial arabinoxylan production in the context of a wheat biorefinery principally producing ethanol. Part 1. Experimental studies of arabinoxylan extraction from wheat bran." *Chemical Engineering Research and Design*, 87(9):1232-1238.
42. **Guiraud J. P., (1998)**. Microbiologie alimentaire. Donod. Paris. P: 7-330.
43. **Gusakov, A. ;Sinitsyn, A .; Berlin, A .; Markov, A. et Ankudimova, N. (2007)**. Desing of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose *Biotechnol. Bioeng* 97, P: 1028–1038.
44. **GUSAKOV, Alexander V.** Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology* [en ligne], septembre 2011, vol. 29, n°9, p. 419-425.
45. **Haiyan Sun., Xiangyang Ge., Zhikui Hao., Ming Peng. (2010)**. Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (2), pp. 163-166.
46. **HENRISSAT, B., DRIGUEZ, H., VIET, C., SCHULEIN, M.** Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nature Biotechnology*.
47. **Holker., Udo., Lenz and Jürgen. (2005)**. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages. *Current Opinion in Microbiology*. Vol. 8, N°3.p: 301-306.

48. **HOUMANI M., (1998).** Valorisation des pailles algériennes par traitement technologique dans l'alimentation du cheptel. Thèse de Doctorat d'Etat en sciences agronomiques. INA d'Alger (Algérie) 154p.
49. **Hromádková, Z., Z. Kováčiková and A. Ebringerová (2008).** "Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran." *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6):1062-1068.
50. **Iwashita, K. (2002).** Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J. Biosci. Bioeng.*, 94: 530-535.
51. **Javed M. (2012).** "wheat bran as a brown gold: nutritious value and its biotechnological applications." *african journal of microbiology research* 6(4), P: 724-733.
52. **Johanne,C (2002).** Le pouvoir antagoniste de *Trichoderma* Johanne Caron, phytopathologiste Horti-Protection inc. Conférence présentée lors des journées horticoles régionales à St-Rémi.
53. **Joyeaux A. (1982).** Les préparations industrielles d'enzymes. p :22-46. In : Durant G., Monsan. (ed.), Les enzymes production et utilisations industrielles. Edition GautierVillars.Paris.
54. **Kiesov A.A.(1982).** Enzymatic hydrolysis of cellulose,5. Cellulase complexes in marine organisms from the sea of Japan.*Bioorgan. Khim.* 8. p: 1490-1496.
55. **Kubicek C P., Bissett J., Druzhinina I., Kullnig-Gradinger C., Szakacs G. (2003).** Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma sp.*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genet Biology.* 38 (3): 310-319.
56. **Kubicek C.P. (1981).** Release of carboxymethyl-cellulase and β -glucanases from cell walls of *Trichoderma reesei*.*European.J.Appl .Microbiol.Biotrechnol .*13.p: 226-291.
57. **Leghlimi H. (2013).** Cellulases de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques desenzymes. Thèse de Doctorat en Sciences.
58. **Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. (2006).** Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.
59. **Leuchtmann A., Petrini O., Samuels G. (1996).** Isozyme subgroups in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Mycologia.* 88 (3): 384-394.

60. **Leveque E., Janeček Š., Haye B. and Belarbi A.(2000).** Thermophilic archaeal amyolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, , 26 (1): 3-14.
61. **Lopes ferreira, Nicolas.** Valorisation des ressources renouvelables : de la production d'éthanol au développement de nouveaux bioproduits. *Journal de la Société de Biologie [en ligne]*, novembre 2008, vol. 202, n°3, p. 191-199. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1051/jbio:2008021>.
62. **Lucas, R., Robles, A., Garcia, M. T., Cienfuegos de G. A., and Galves. A. (2001).** Production, purification and properties of an endoglucanase produced by the Hyphomycete *chalara (syn. Thielaviopsis) paradoxa* CH 32. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 79-85.
63. **Mahfoud, A. and Lasbuhani, A. (2015).** Approche de la lutte contre les maladies fongiques du blé : étude de l'efficacité de trois molécules antifongiques (in vitro et in situ) et l'effet antagoniste de certains microorganismes fongiques (in vitro).Mémoire de master, Université des frères Mentouri,14p.
64. **Mandels M., Andreotti R., Roche C. (1976).** Measurement of saccharifying cellulose. *Biotrechnol.Bioeng.Sump.6*. p: 21-33.
65. **Marchall J.J. (1973).** Preliminary report on the digestive enzymes present in the digestive gland of *Perna viridis*. *Comp.Biochem.Physiol.B.44*. p :981-988.
66. **-Maréchal, P. (2001).** Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bivis: obtention d'agromatériaux. PhD thesis, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse. Pp. 350.
67. **-Masclaf, A. (1987).** Atlas des plantes de France: Planches, Belin.
68. **Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., Banerjee, U.C. (2005).** Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology [en ligne]*, vol. 1, n°2, p. 1-9. Disponible à l'adresse : <http://web.usm.my/mjm/issues/vol1no2/review1.pdf>.
69. **Mathot P. (1996).** Modélisation d'un réacteur simplifié pour la fermentation solide de produits et sous-produits agricoles. Valorisation de l'aliment fermenté par le porc. Thèse de doctorat : Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique).
70. **Maurer. (1997).** Cellulases in the Textile Industry.

71. **Miller, GL. (1959).** Utilisation du réactif acide dinitrosalicylique pour la détermination du sucre réducteur. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428. doi: 10.1021 / ac60147a030.
72. **Minitab Inc, PA, USA: STATE COLLEGE, Pa.2007** — Minitab Inc. today released Minitab® 15 Statistical Software, the latest version of the leading package used in quality improvement and statistics education.
73. **Moses Jeyakumar Rajesha., Leelavathy Rajesha., Lakew Wondimu Abachire. (2012).** Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Cellulase by Using *Trichoderma Reesei*. *European Journal of Applied Engineering and Scientific Research*, 2012, 1 (4):196-200.
74. **Nevalainen k M H., Palva E J. (1990).** Production of extracellular enzymes in mutant Isolated from *Trichoderma viridea* unable to hydrolyse cellulose. *Appl envirmicrobiol*, 33, P: 11-16.
75. **Niranjane, A.P., P. Madhou and T.W. Stevenson. (2007).** The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantean*. *Enzyme Microbial Technol.*, 40: 1464- 1468.
76. **Odier E., Rouau X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. *In: Mouranche A., Costes C. (ed.), Hydrolases et dépolymérasés. Enzymes d'intérêt industriel. Edition Gauthier-Villard, Paris, p: 199-214.*
77. **Odier F., Rouau X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine p.199-214.in: Mouranche A., C. (ed), Hydrolases et dépolymérase. Enzyme d'intérêt industriel. Edition Gauthier-Villard, Paris.
78. **-Pandey A., Soccol C.R. et Mitchell D. (2000).** New developments in solid state fermentation: I. Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 35: 1153-1169.
79. **Pederson H., Nielsen J. (2000).**The influence of nitrogen sources on the alpha-amylase productivity of *A.oryzae* in continuous cultures. *Appl. Microbial. Biota.* (53), pp.278-281.
80. **Percival zhang, Y.-H., Himmel, Michael E., Mielenz, Jonathan R. (2006).** Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* [en ligne], vol. 24, n°5, p. 452-481. Disponible à l'adresse : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.003>.
81. **Piotr janas.,Zdzislaw.,Tafgonski . (1995)** effect of temperature on the production of cellulases, xylanases and lytic enzymes by selected *Trichoderma reesei* .departement of food technology and storage agricultural academy Akademia 13,20-934lubin.

82. **Plackett K-L., et Burman J-P. (1946).**: The design of optimum multifactoriel experminets. *Biometrika*, 33: 305-325.
83. **Prevot Vincent. (2013).** Comparaison de la production de complexes enzymatiques par fermentation en milieu solide et par fermentation en milieu liquide. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne.
84. **Purchon R.D.(1977).**The biology of the mollusca, 2 nd ed. Pergamon Press, Oxford.
85. **-Rahardjo Y.S.P., Tramper J. & Rinzema A.(2006).** Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.*, **24**(2), 161-179.
86. **Raimbault M. (1983).** Fermentation en milieu solide, croissance de champignonsfilamenteux sur substrat amylicé. p:1-42. O.R.S.T.O.M.-Paris.
87. **Raimbault, 1980., Pandey. (2000).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron. J. Biotechnol.*, 1(3), <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/9/>, (03.02.08).
88. **Raimbault, Maurice. (1998).** General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* [en ligne], vol. 1, n°3, p. 174-188. Disponible à l'adresse : <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/9/9.PDF>
89. **-Ralet M. C., Thibault J. F., Della Valle G. (1990).** Influence of extrusion-cooking on the physic-chemical properties of wheat bran. *Journal of Cereal Science*. 11. 249-259.
90. **Raynal-Ioualalen, R. (1996).** Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxylanes. PhD thesis, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle - UMR 1010 INRA / INP ENSIACET, Université de Toulouse. Pp. 324.
91. **Rebeyrotte P., Dupin F., Jayle M.F. (1976).** Contribution à l'étude d'une cellulose extraite du suc digestif d'Helix pomatia. *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris*. 49. p : 1247-1256.
92. **Receveur V., Czjzek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape, and conformation al flexibility of a two-domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry*. 277(43), P: 40887-40892.
93. **Riccio P., Rossano R., Vinella M., Domizio P., Zito F., Sansevrino F., D'elis A., Rosi I. (1999).** Extraction and immobilisation in one step of two β -glucosidases released

- from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. Enzyme and Microbiol Technology.24. p:123-129.
94. **Rifai, M A. (1969)**. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycologia.Papers. 116: 1-56.
95. **Romero M D., Aguado J., Gonzalez L., Ladero M. (1999)**. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. Enzyme and Microbial Technology.25: 244-250.
96. **Rousselle, A. M., Bertoniere, N. R., Howley, P. S., Goynes, W. R., Jr. (2002)** "Effect of whole cellulase on the supramolecular structure of cotton cellulose", Textile Ressearch Journal 72(11): 963 -972.
97. **Roussos S., Hannibal L. (1984)**. Valorisation biotechnologique de la bagasse par laproduction au niveau pilote d'enzymes de champignons filamenteux cellulolytiques. Compte Rendu Final d'une Recherche financée par le CORDET 83. Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Appliquée. Edition de l'ORSTOM. Institut Français de Recherche Scientifique pour le développement en coopération. France.
98. **Roussos., Raimbault. (1982)**. M.Hydrolyse de la cellulose par les moisissures. - I. ((Screening 1) des souches cellulolytiques. Ann. MicrobioZ. (Insf. Pas-teur), 133 B, 455-464.
99. **Schamburg D., Salzman M G B F. (1991)**. Cellulase. *In*: Enzyme Handbook, Vol IV.Springer-Verlag Berlin, p: 1-11.
- 100.**Scriban R. (1993)**. *Trichoderma reesei* exhibitis true revercibility and a high exchange rate on cristalline cellulose. Biotechnologie. P : 32-690,4ème édition.
- 101.**Scriban R. (1999)**. Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.).P : 401-409.
- 102.-**Selvendran R. R., Ring S. G., O'Neill M. A., Dupont M .S. (1980)**. Composition of cell wall material from wheat bran used in clinical feeding material. Chemistry and Industry. 22. 885-888.
- 103.**Semedo, L., Gomes, R. c., Bon, E. P. S., Soares, R. M. A., Linhares, L. F., Coelho, R. R.R. (2000)** "Endocellulase and exocellulase activities of two *streptomyces strains* isolated from a forest soil", Applied biochemistry and biotechnology 84-86: 267-276.
- 104.**Singh.A. (1999)**. Engineering enzyme properties, Indian Journal of Microbiology, vol. 39, no.2, P: 65–77.
- 105.-**Singhania, R.R., Patel, K., Soccol, C.L., Pandey, A (2009)**. Recent advances in solid-state fermentation. Biochem Eng J. 44:13-18

- 106.-**Slama A , Ben Salem M ,Zid E, 2005** . Les céréales en Tunisie: production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Science et changements planétaires/Sécheresse, 16(3) :225- 229.
- 107.**Smant G., Stokkermans JP.W.G., Yan Y., De Boer J.M., Baum T.J., Wang X., Hussey R.S., Gommers F.J., Henrissat B., Davis E.L., Helder J., Schots A., Bakker J .(1998)**. Endogenous cellulases in animals: Isolation of β -1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. Biochemestery. 95(9). p: 4906-4911.
- 108.**Sternberg D., Dorval S.** (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. Biotechnol Bioeng. 21: 181-191.
- 109.**Stryer L., Berg J M., Tymoczko J L.** (2003). Biochimie. 5^{ème} édition. Médecine-Sciences.Flammarion. Paris. P: 303.
- 110.**Swamy M. V., Sai Ram M. and Seenayya G. (1994)** β -Amylase from Clostridium thermocellum SS8-A thermophilic, anaerobic, cellulolytic bacterium. Letters in Applied Microbiology, 18, 301-304.
- 111.**Tangu S K., Blanch H W.** (1981). Enhanced production of cellulase, hemicellulases and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Biotechnol Bioeng. 23: 1837-1849.
- 112.**Taskin M. et Erdal S., 2010.** Production of α -amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. Romanian Biotechnological Letters Vol. 15 (3), pp.5342-5350.
- 113.**Van Zyl WH (1985)**. Une étude des cellulases produites par trois actinomycètes mésophiles cultivées sur bagasse comme substrat. Biotechnol. Bioengi. 27 (9): 1367-1373.
- 114.**Vielle C. and Zeikus J. G.** Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and Molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, 65:1- 43.
- 115.**Vyas Santosh, A. L. (2003)** "Biodeinking of mixed office waste paper by alkaline active cellulases from alkalotolerant *Fusarium* sp." , Enzyme and Microbial Technology 32:236-245.
- 116.**Xu B. (2002)**. Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*: Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thèse de doctorat. Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Sweden.
- 117.**Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J C.** (2000). Purification, characterization and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*. Euro J Biochem. 267: 4970-4977.



Annexes

Annexe 1 : Milieu PDA

- Extrait de pomme de terre
- Glucose.....20g
- Agar.....20g
- Eau distillé stérile.....1000ml
- pH= 5

***Préparation de l'extrait pomme de terre**

200g de pomme de terre non pelées vieilles sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 20 min, ils sont enfin écrasés puis filtrés. Le filtrat obtenu représente l'extrait de pomme de terre.

***Préparation de milieu de culture**

L'agar et le glucose dissous à chaud dans l'extrait, compléter à 1Ld'eau distillée.

Annexe 2 : Composition chimique du son de blé (Bataillon *et al.*, 1998)

Paramètre	Pourcentage %
Cellulose	11
Amidon	29
Protéine	14
Matière grasse	7.7
Matière minérale	4

Annexe 3: Agent humidifiant

- Glucose.....1g
- Sulfate d'ammonium.....0.046g
- Tartrate double Na, K.....0.046g
- Eau distillé.....100ml

-Dissoudre 1 g de glucose, 0.046g de sulfate d'ammonium et 0.046 g de tartrate double Na, K dans un petit volume d'eau distillée et bien mélanger, puis compléter à 100 ml avec l'eau distillée et agiter jusqu'à l'homogénéisation complète.

Annexe 4 : solution tampon citrate 0.1M, pH =4.8

- Acide citrique (0.1M).....23g
- Citrate de sodium (0.1 M).....58g
- Eau distillé

Protocole :

- 1000 ml acide citrique (0.1M) : 23g acide citrique dans 1000 ml d'eau distillée.
- 2000 ml citrate de sodium (0.1M) : 58g citrate de sodium dans 2000ml d'eau distillée.
- Titration à l'aide d'un pH mètre (préalablement étalonné) jusqu'à pH 4.8. La solution tampon est conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

Annexe 5 : acide dinitrosalicylique (DNS) (Miller, 1959)

- Dissoudre 1g de DNS dans 20 ml de NaOH (2N) et 50 ml d'eau distillée (NaOH (2N) : 8g NaOH dans 100 ml eau distillé).
- Ajouter 30 g tartrate double Na, K. Compléter à 100ml avec l'eau distillée, agité.
- Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois.

Annexe 6 : Analyse de variance**Activité endoglucanase :**

Prédicteur	Coeff	Coef ErT	T	P
Constante	412,75	24,01	17,19	0,003
X1	34,42	24,01	1,43	0,288
X2	54,08	24,01	2,25	0,153
X4	-2,37	24,01	-0,10	0,930
X6	21,29	24,01	0,89	0,469
X7	3,72	24,01	0,15	0,891

Activité papier filtre :

Prédicteur	Coeff	Coef ErT	T	P
Constante	33,394	2,976	11,22	0,008
X1	-0,315	2,976	-0,11	0,925
X2	-7,506	2,976	-2,52	0,128
X4	-6,398	2,976	-2,15	0,165
X6	5,332	2,976	1,79	0,215
X7	1,159	2,976	0,39	0,734

Thème : Optimisation de la production de cellulase par *Trichoderma longibrachiatum* cultivée sur son de blé.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie fongique des Mycètes.

Résumé

La production des enzymes cellulolytiques par *Trichoderma longibrachiatum* est effectuée sur milieu à base de son de blé à 70% d'humidité par fermentation solide. L'influence de la température (28°C, 30°C, 37°C et 44°C) et du taux d'inoculum (1.5×10^7 , 2×10^7 et 2.5×10^7 spores par grammes de substrat) sur la production des enzymes APF et endoglucanase est testée. Les milieux de production sont préparés par l'emploi d'un plan factoriel de Plackett-Burman à N=8 essais, et N-1 facteurs : cinq réels de production (carboxyméthyl cellulose, sulfate d'ammonium, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ et $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) et deux erreurs. Ce plan est choisi afin de sélectionner les facteurs favorisant la production des enzymes. Les activités APF et endoglucanase sont mesurées à leurs valeurs maximales à la température de 30°C, et avec un taux d'inoculum de 2×10^7 spores par gramme de substrat (30.83 U/gds et 225,8 U/gds, respectivement). L'analyse statistique du plan Plackett-Burman, a permis la sélection de trois facteurs ayant un effet significatif sur la production de l'activité papier filtre, de façon positive significative par le $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ($p=0,125$), de façon négative significative par le sulfate d'ammonium ($(NH_4) SO_4$ ($p=0,128$) et le $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($p=0,165$). Pour ce qui est de la production de l'endoglucanase, elle est corrélée positivement d'une façon significative avec le CMC ($p=0,288$), très significative pour le sulfate d'ammonium ($p=0,153$).

Mots clés : Cellulase, *Trichoderma longibrachiatum*, fermentation en milieu solide, son de blé, optimisation, plan Plackett-Burman.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Zoologie.UFM Constantine.

Jury d'évaluation :

Présidente : Melle. H. ALMI. Maitre de conférences B. UFM Constantine,

Rapporteur : Mme. H. LEGHLIMI. Maitre de conférences B. UFM Constantine,

Examinatrice : Melle. A. BELMESSIKH Maître Assistante A- UFM Constantine.

Date de soutenance : 26/06/2018