



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant
Filière : Sciences biologiques, Spécialité : Bioindustrie, Analyse et Contrôle

Sous le thème

**Sélection de microorganismes producteurs de Laccases en
vue de la valorisation de la biomasse
lignocellulosique**

Par : CHIBI Amina

ZERKINE Ouiem Rania

Jury d'évaluation :

Président de jury : Mr BOULAHROUF A.

Rapporteur : Mr KACEM CHAOUACHE N.

Examinatrice : BATAICHE I.

Tutrice : Melle CHAOUA. S

Prof. Univ. Constantine1.

Prof. Univ. Constantine 1.

MCB. Univ. Constantine 1.

Doctorante - UFM Constantine.

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018-2019



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant
Filière : Sciences biologiques, Spécialité : Bioindustrie, Analyse et Contrôle

Sous le thème

**Sélection de microorganismes producteurs de Laccases en
vue de la valorisation de la biomasse
lignocellulosique**

Par : CHIBI Amina

ZERKINE Ouiem Rania

Jury d'évaluation :

Président de jury : Mr BOULAHROUF A.

Rapporteur : Mr KACEM CHAOUACHE N.

Examinatrice : BATAICHE I.

Tutrice : Melle CHAOUA. S

Prof. Univ. Constantine1.

Prof. Univ. Constantine 1.

MCB. Univ. Constantine 1.

Doctorante - UFM Constantine.

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2018-2019

Remerciement

En préambule à ce mémoire nous remercions "ALLAH " qui nous a réconcilié à accomplir ce travail.

Tout d'abord nous remercions Mr Boulahrouf A, qui nous a fait l'honneur de présider le jury et Mme. Bataiche I, pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail en acceptant de l'examiner.

Nous remercions chaleureusement notre encadreur Mr.Kacem chaouche N , pour l'aide ,les conseils et les connaissances qu'il nous a transmis.

Nous n'oublions pas Mme. KARA ALI que nous lui devons de grands remerciements pour sa gentillesse et ses directives précieuses.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à notre tutrice Mme. Chaoua S, qui a eu l'amabilité de répondre à tous nos questions, fournir les explications nécessaires, nous orienter, nous aider, nous conseiller et surtout d'être patiente avec nous.

Nos remerciements plus sincères à l'équipe du laboratoire LaMyBAM et à toutes les personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Merci à tous.

Dédicaces

*Je remercie tout d'abord mon Dieu
de m'avoir donné courage ; patience et conscience afin de bien rédiger
ce modeste travail que je le dédie*

*À mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu
avec leurs encouragements et qui m'ont donné un magnifique modèle
de labeur et de persévérance*

*A mon chère cousin préféré N qui ne cesse de me soutenir et de
m'encourager sans limites ...*

À toute ma famille

Mes frères et mes sœurs

A mes amis et surtout F4

Merci pour vos conseils et soutien de tous les jours

Amina

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que Je dédie ce travail

A Ma tendre Mère, Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager.

A mon papa qui m'a appris que la vie était remplie de petites batailles, vainqueurs, vaincus, la guerre continue jusqu'à ce qu'on devienne vieux,

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mon frère et mes sœurs, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A ma chère amie Iméne, en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

A mes adorables amies Khaoula, Amina, kenza... pour avoir rendu mon quotidien récréatif et passionnant... mes meilleurs vœux de bonheur, de santé et de réussite pour vous.

A toute la promotion « BAC 2019 ».

A samah, que dieu illumine ta vie et réalise tes rêves.

A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.

Ouiem...



Tables des Matières

Remerciement et dédicaces

Table des matières

Listes des figures

Listes des tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
1- Revue bibliographique	3
1.1- Sources de la biomasse lignocellulosique.....	3
1.2- Le palmier dattier en Algérie.....	3
1.2.1- Classification botanique du palmier dattier.....	4
1.2.2- Palmes.....	4
1.2.2.1-Composition chimique des palmes sèches.....	5
1.3- La lignocellulose.....	5
1.3.1- Structure de la lignocellulose.....	6
1.3.2- Dégradation de la matière lignocellulosique.....	9
1.3.2.1 - Organismes dégradeurs de la lignocellulose.....	10
1.4- Les termites.....	11
1.4.1- Régimes alimentaires des termites.....	12
1.4.2- Système symbiotique des termites.....	12
1.4.3- La microflore du tube digestif des termites.....	13
1.5- Action des enzymes sur la matière lignocellulosique.....	14
1.5.1- Généralités sur les enzymes.....	14
1.5.2- Origine des enzymes industrielles.....	15
1.5.3- Production industrielle des enzymes microbiens.....	15
1.5.4- Les enzymes ligninolytiques.....	16
1.5.5- Utilisation des déchets agro-industriels dans la production des enzymes ligninolytique.....	16
1.6- La laccase.....	18

1.6.1- Sources de la laccase.....	18
1.6.2- Propriétés de la laccase.....	19
1.6.3- Structure de la laccase.....	20
1.6.4- Mécanisme d'action de la laccase.....	21
1.6.5- Applications biotechnologiques de la laccase.....	22
2- Matériel et méthodes.....	25
2.1-Echantillonnage.....	25
2.1.1-Le substrat.....	25
2.1.2-Les insectes	26
2.2- Séparation et sélection des insectes.....	29
2.2.1-Préparation des solutions microbiennes.....	28
2.2.2-Isolement des microorganismes.....	28
2.2.3- Purification des souches microbiennes.....	29
2.2.4- Conservation des isolats.....	29
2.3- Etude de l'activité enzymatique des souches microbienne.....	29
2.3.1-Mise en évidence de l'activité laccasique.....	29
2.3.2-Mise en évidence de l'activité cellulósique.....	30
2.3.3-Mise en évidence de l'activité xylanatique.....	30
2.4- Identification préliminaire de l'isolat microbien sélectionné.....	30
2.4.1-Caractérisation morphologique.....	30
2.4.1.1-Aspect macroscopique des colonies.....	30
2.4.1.2-Aspect microscopique des colonies.....	30
2.4.2-Caractérisation biochimique.....	32
2.4.2.1-Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	32
2.4.2.2- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires.....	33
2.4.2.2.1-Détermination de l'activité amylolytique.....	33
2.4.2.2.2-Détermination de l'activité protéolytique.....	33
2.4.2.3-Fermentation des sucres.....	34
2.4.3-Caractérisation de la souche par les galeries d'identification biochimique.....	34
2.4.3.1- Préparation des galeries.....	34
2.4.4- Caractérisation physiologique de la souche T5.....	36
2.4.4.1-Test de croissance à différentes températures.....	36

2.4.4.2-Test de thermo-résistance.....	36
2.5-Mise en fermentation.....	36
2.5.1- Fermentation en milieu synthétique.....	36
2.5.1.1-Préparation de l'inoculum.....	36
2.5.1.2-Inoculation.....	36
2.5.2-Fermentation en milieu nature.....	37
2.6. Suivi de la fermentation.....	37
2.6.1-Prélèvements.....	37
2.6.1.1-Milieu synthétique.....	37
2.6.1.2-Milieu naturel.....	38
2.6.2-Suivi du pH.....	38
2.6.3-Suivi de la biomasse.....	39
2.6.4-Suivi de l'activité laccasiqu.....	39
2.6.5-Dosage des polyphénols totaux.....	39
2.7-Application sur la laccase.....	40
2.7.1-Prétraitement de la biomasse.....	40
2.7.2-Dégradation des colorants synthétiques.....	40
3- Résultats et discussion.....	42
3.1- Echantillonnage.....	42
3.1.1-Les insectes.....	42
3.2- Séparation et sélection d'insectes.....	42
3.2.1- Isolement et purification des microorganismes.....	44
3.3-Etude de l'activité enzymatique de la souche sélectionnée.....	45
3.3.1-Mise en évidence de l'activité laccasique.....	45
3.3.2-Mise en évidence de l'activité cellulósique.....	46
3.3.3- Mise en évidence de l'activité xylanatique.....	47
3.4- Identification préliminaire de l'isolat microbien sélectionné.....	48
3.4.1- Caractérisation morphologique.....	48
3.4.1.1- Aspect macroscopique des colonies.....	48
3.4.1.2- Aspect microscopique des colonies.....	48
3.4.2-Caractérisation biochimique.....	50
3.4.2.1- Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	50

3.4.2.2- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires.....	52
3.4.2.2.1- Détermination de l'activité amylolytique.....	52
3.4.2.2.2- Détermination de l'activité protéolytique.....	52
3.4.2.3- Fermentation des sucres.....	54
3.4.3- Caractérisation de la souche par les galeries d'identification biochimique.....	55
3.4.4- Caractérisation physiologique de l'isolat T5.....	58
3.4.4.1- Test de croissance à différentes températures.....	58
3.4.4.2- Test de thermo-résistance.....	59
3.5- Suivi de la fermentation.....	59
3.5.1-Milieu synthétique.....	59
3.5.1.1- Suivi du pH.....	59
3.5.1.2- Biomasse.....	60
3.5.1.3- Suivi de l'activité laccasique.....	61
3.5.2-Milieu naturel.....	62
3.5.2.1- Suivi de l'activité laccasique.....	62
3.5.2.2- Dosage des polyphénols totaux.....	63
3.6- Application sur la laccase.....	65
3.6.1-Prétraitement de la biomasse.....	65
3.6.2-Dégradation des colorants synthétiques.....	65

4- Conclusion et perspectives.....69

Résumés

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

BB : Bleu de Bromothymol

BM : Bleu de Méthylène

CMC : Carboxyméthylcellulose

ISP₂: *International Streptomyces Project*

LMBG: Lignin Medium Basal Guaiacol

RC: Rouge Congo

rpm: rotation par minute

SSF : Solide-State Fermentation

UI : Unité enzymatique Internationale ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

VM : Vert de Malachite

ϵ : coefficient d'extinction molaire ($\text{M}^{-1}.\text{Cm}^{-1}$)

Liste des tableaux

Tableau 1	Composition chimique des palmes sèches	5
Tableau 2	Substrats utilisés pour la production des enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide.....	17
Tableau 3	Les propriétés générales de la laccase.....	19
Tableau 4	Classification de <i>Coptotermes formosanus</i>	44
Tableau 5	Isolement et purification des isolats microbiens issus des termites et des larves de capricornes.....	45
Tableau 6	Résultats de la mise en évidence des enzymes respiratoires de l'isolat T5....	52
Tableau 7	Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires de l'isolat T5...	54
Tableau 8	Résultats des tests d'identification biochimique de l'isolat T5 par les galeries API 20E et CH 50.....	57
Tableau 9	Test de la croissance de l'isolat T5 à différentes températures.....	58
Tableau 10	Test de dégradation des colorants synthétiques par la laccase de l'isolat T5.....	68

Liste des Figures

Figure 1	Figuration schématique du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i>)	4
Figure 2	Structure des palmes du palmier dattier.....	5
Figure 3	Structure de la matière lignocellulosique.....	7
Figure 4	Structure de la cellobiose.....	7
Figure 5	Monomères de la lignine.....	8
Figure 6	Schéma récapitulant la digestion chez les termites inférieurs.....	14
Figure 7	Représentation de la structure 3D de la laccase de <i>Trametes versicolor</i> ...	20
Figure 8	Représentation de la structure 3D de la laccase de <i>Bacillus subtilis</i> obtenue par cristallographie aux rayons X.....	21
Figure 9	Différentes réactions catalysées par la laccase.....	22
Figure 10	Feuille du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera L</i>)	25
Figure 11	Site d'échantillonnage au niveau de la forêt de "DJEBEL OUEHCHE" à CONSTANTINE.....	26
Figure 12	Arbre de pin (<i>Pinus halepensis</i>) hébergeant des xylophages.....	26
Figure 13	La collecte des insectes xylophages.....	27
Figure 14	Séparation des insectes « appareil de Berlèse »	27
Figure 15	Réalisation d'une série de dilutions à partir de la solution mère.....	28
Figure 16	Ensemencement des isolats sur milieu LMBG.....	29
Figure 17	Test catalase sur lame.....	32
Figure 18	Test oxydase sur disque.....	32
Figure 19	Galleries API 20 E et API 50 CH respectivement avant inoculation.....	35
Figure 20	Inoculation et mise en culture en milieu synthétique.....	37
Figure 21	La fermentation en milieu naturel.....	37
Figure 22	Filtration sous vide du milieu naturel.....	36
Figure 23	Échantillons issus de la fermentation en milieu naturel.....	36
Figure 24	Dosage des polyphénols présents dans le milieu naturel.....	38

Figure 25	Le termite <i>Coptotermes formosanus</i> observé sous la loupe binoculaire..	43
Figure 26	Mise en évidence de la laccase sur milieu LMBG	46
Figure 27	Mise en évidence de la cellulase sur milieu CMC.....	47
Figure 28	Mise en évidence de l'activité xylanatique sur milieu XBM	47
Figure 29	Aspect macroscopique de l'isolat T5.....	48
Figure 30	Coloration de l'isolat T5 au bleu de méthylène.....	49
Figure 31	Aspect microscopique de l'isolat T5 après coloration de Gram (Gx100)	50
Figure 32	Résultats du test mannitol-mobilité	55
Figure 33	Galleries API 20 E et API 50 CH après inoculation par l'isolat T5.....	56
Figure 34	Résultat d'identification de l'isolat T5 par le logiciel (Lab UPMB).....	56
Figure 35	Suivi de la variation du pH de la fermentation en milieu synthétique en fonction du temps.....	60
Figure 36	Suivi de la concentration cellulaire de la fermentation en milieu synthétique.....	61
Figure 37	Suivi de production de la laccase par l'isolat T5 en milieu synthétique (863).....	62
Figure 38	Evolution de l'activité laccasique en milieu à base de palmes sèches au fil du temps.....	63
Figure 39	Dosage des polyphénols du milieu à base de palmes sèches.....	64
Figure 40	Résultats de la mise en culture de la levure <i>saccharomyces cerevisiae</i> sur des milieux à base de déchets de palmes sèches traité par la souche T5.....	66

Introduction

Introduction

Les réserves en combustibles fossiles ne dureront pas éternellement (quelques 40 à 50 années au plus tard), la recherche de sources d'énergie alternatives renouvelables (de substitution) s'impose par conséquent, à travers la diversification des sources d'énergie et le remplacement progressif des sources conventionnelles, là où cela est nécessaire et possible (Bensmail et Touzi, 2012). L'Algérie est l'un des rares pays riches en potentiel énergétique renouvelable au monde. Elle s'engage avec détermination sur la voie des énergies renouvelables afin d'apporter des solutions globales et durables aux défis environnementaux et aux problématiques de préservation des ressources énergétiques d'origine fossile (Smai et Lamine, 2016). Les énergies renouvelables sont liées « en principe » à des sources inépuisables dont leur exploitation est accompagnée d'une émission minimale de déchets et de polluants contrairement au cas des énergies fossiles. Parmi les énergies renouvelables, c'est l'énergie issue de la biomasse qui est de loin la plus importante puisque c'est la plus prometteuse (Deglise et Donnot, 2010).

La lignocellulose est le composant prédominant des plantes et du matériel végétal mort, c'est la biomasse la plus abondante sur la terre, en particulier dans les écosystèmes terrestres. Depuis l'utilisation de la lignocellulose en tant que ressource de biomasse, il est toujours difficile de comprendre les systèmes naturels dans lesquels la lignocellulose est décomposée, en raison de l'inefficacité de sa dégradation. On pense que les microorganismes, principalement les champignons et les bactéries, procèdent à la décomposition de la lignocellulose, tandis que les invertébrés du sol renforcent considérablement l'activité des microorganismes par la simple dispersion et l'effritement des matières végétales, ainsi que par leur dissimilation réelle (Abe *et al.*, 2000). Les termites sont les uns des insectes les plus importants du sol qui décomposent efficacement la lignocellulose à l'aide des symbiotes microbiens associés. Les termites dissimuleraient une proportion non négligeable des composants de la lignocellulose liés à la cellulose (74 à 99%) et à l'hémicellulose (65 à 87%). En raison de leur capacité digestive et de leur grande abondance, les termites ont un impact écologique considérable sur le bio-recyclage de la lignocellulose.

L'utilisation d'enzymes provenant de sources végétales et microbiennes diverses a été activement étudiée ces dernières années (Aitken 1993 ; Karam and Nicell 1997). La laccase est l'une d'entre elles qui est le système enzymatique le plus ancien et le plus étudié. La laccase fait,

actuellement, l'objet de beaucoup d'attention en raison de ses diverses applications telles que la décoloration des colorants, la détoxification des déchets et la bioremédiation. Les laccases catalysent l'oxydation d'un large éventail de substrats tels que les ortho et para-diphénols, les phénols méthoxyles-substitués, les amines aromatiques, les acides phénoliques et plusieurs autres composés couplés à la réduction de l'oxygène moléculaire en eau avec un mécanisme d'oxydation électronique (Atallah *et al.*, 2013).

De ce fait, l'objectif de ce travail s'articule sur la recherche et l'isolement de microorganismes sécrétant de la laccase, en vue de la bio-valorisation de la biomasse lignocellulosique.

**Revue
bibliographique**

1- Revue bibliographique

1.1- Sources de la biomasse lignocellulosique

Les déchets issus de l'agriculture et des industries agroalimentaires attirent l'attention en raison de leur abondance, de leur biodégradabilité, de leur richesse en carbone et de leur contenu nutritif, et aussi pour gérer les problèmes de déchets de l'industrie sur le plan économique et environnemental (Gassara *et al.*, 2010). En Algérie, différentes bioressources lignocellulosiques ont été étudiées par rapport à leur teneur en principaux composés constitutifs (cellulose, hémicellulose, lignine, Azote et cendres) (Hamma, 2012).

A titre d'exemple, le palmier dattier est la composante principale de l'agrosystème oasien. Environ 18 millions de palmiers dattiers sont cultivés en Algérie sur une superficie totale estimée à 169.380 hectares (Babahammi, 2014). Cette grande quantité de palmiers dattiers produit énormément de déchets qui peuvent être responsable des problèmes phytosanitaires des oasis et elle doit être éliminée pour réduire son impact sur l'environnement (Babahammi, 2014). Ces déchets sont des produits de taille et les sous-produits ligneux en l'occurrence, palmes sèches, régimes, kornaf, racines et lifes (Dihazi, 2012).

1.2- Le palmier dattier en Algérie

Le palmier dattier *Phoenix dactylifera L.* (Figure 1), est un arbre d'une importance capitale dans la vie économique et sociale des populations sahariennes (Dihazi, 2012). Sa culture est essentiellement localisée dans les wilayas sahariennes (Chehema et Longo 2001), la wilaya de Biskra est la première région phoenicicole avec 27,4 % de la superficie totale, 23,1 % du nombre total de palmiers dattiers et 41,2 % de la production nationale de dattes, suivie par la wilaya d'El Oued avec respectivement 22 %, 22,4 % et 25%.

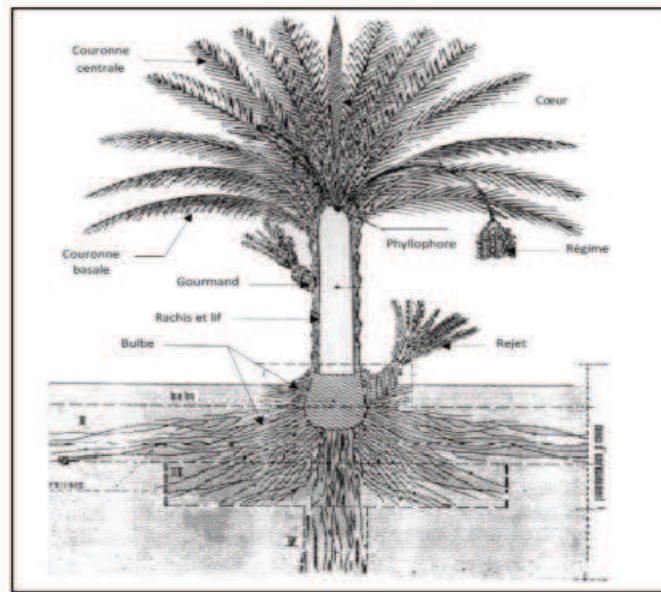


Figure 1 Figuration schématique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) d'après (PEYRON, 2000)

1.2.1 - Classification botanique du palmier dattier

D'après (Djafour *et al*, 2005), la classification botanique du palmier dattier est comme suit :

- ❖ Groupe : *Spadiciflores* ;
- ❖ Embranchement : *Angiospermes* ;
- ❖ Classe : *Monocotylédones* ;
- ❖ Ordre : *Palmale* ;
- ❖ Famille : *Palmacées* ;
- ❖ Sous famille : *Coryphoidées* ;
- ❖ Tribu : *Phoenixées* ;
- ❖ Genre : *Phoenix* ;
- ❖ Espèce : *Phoenix dactylifera* L.

1.2.2- Palmes

La palme ou « Djérid » est une feuille pennée dont les folioles sont régulièrement disposées en position oblique le long du rachis qui s'étend au pétiole (Figure 2). Les segments inférieurs sont transformés en épines, plus ou moins nombreuses, et plus ou moins longues. Le pétiole

(Kornaf) est dur et relativement rigide. Chaque année, le palmier dattier produit un certain nombre de palmes à partir de bourgeon et perd d'autres (Gagui , 2009).

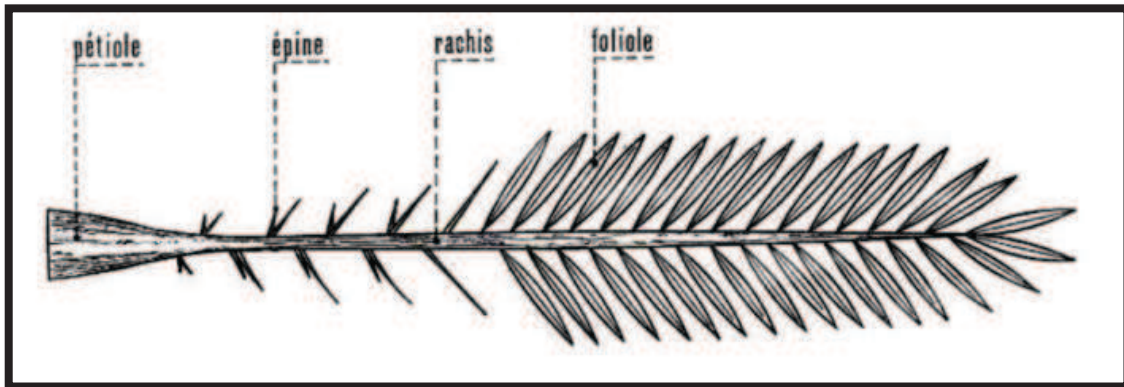


Figure 2 structure des palmes du palmier dattier

1.2.2.1 - Composition chimique des palmes sèches

Les analyses de feuilles de palmier dattier faites par les spécialistes américains ont montré qu'elles avaient des teneurs élevées en matières sèches de l'ordre de 40 %, en chlorures (1,5 %) et en soufre (4%). Par contre, les quantités de matière azotées et phosphorées sont faibles (Toutain, 1967). Le tableau 1 représente sa composition en polymères lignocellulosiques.

Tableau 1 Composition chimique des palmes sèches (Babahammi,2014)

	MO (%)	CB (%)	CV (%)	HCOS (%)	LIGN (%)
Palme sèches	84.74-0.13	30.70-0.30	32.83-2.31	23.98-2.81	20.45-2.36

MO : matière organique ; CB : cellulose brute ; CV : cellulose vraie ; HCOSE : hémicellulose ; LIGN : lignine ;

1.3- La lignocellulose

La lignocellulose est un macro polymère produit par les végétaux ; il est, en effet, le composant principal de la paroi cellulaire et peut représenter jusqu'à 90% du poids sec (Faraco, 2013). Sa principale fonction est d'assurer la résistance mécanique et physique permettant la turgescence

des cellules végétales. Cette résistance est rendue possible par la composition et la structure de la lignocellulose, même si celles-ci varient en fonction des espèces végétales (Vassiliev *et al.*, 2012), des conditions locales, climatiques et écologiques. La résistance et la complexité de la lignocellulose la rendent également difficile à dégrader, ce qui présente des intérêts écologiques pour les plantes en termes de défenses et de maintien de leur intégrité, mais ça présente un obstacle pour son utilisation comme source de carbone renouvelable (Chen *et al.*, 2008). Pourtant, l'agriculture et les industries forestières produisent de larges quantités de déchets lignocellulosiques riches en carbone, principalement polysaccharides et composés aromatiques, qui peuvent être valorisés sous forme de biocarburants, bioplastiques et autres dérivés chimiques d'intérêt industriel. La conversion de la lignocellulose en produits chimiques à haute valeur ajoutée est donc l'un des enjeux majeurs de notre siècle pour remplacer le flux des matières d'origine pétrolière par des ressources renouvelables et durables.

1.3.1- Structure de la lignocellulose

La lignocellulose est principalement composée de trois polymères : cellulose, hémicellulose et lignine (Figure 3). Ceux-ci sont associés en une matrice hétérogène dont la cohésion est assurée à la fois par la résistance des différents composants et par des liaisons covalentes et non covalentes entre eux (Auer, 2018).

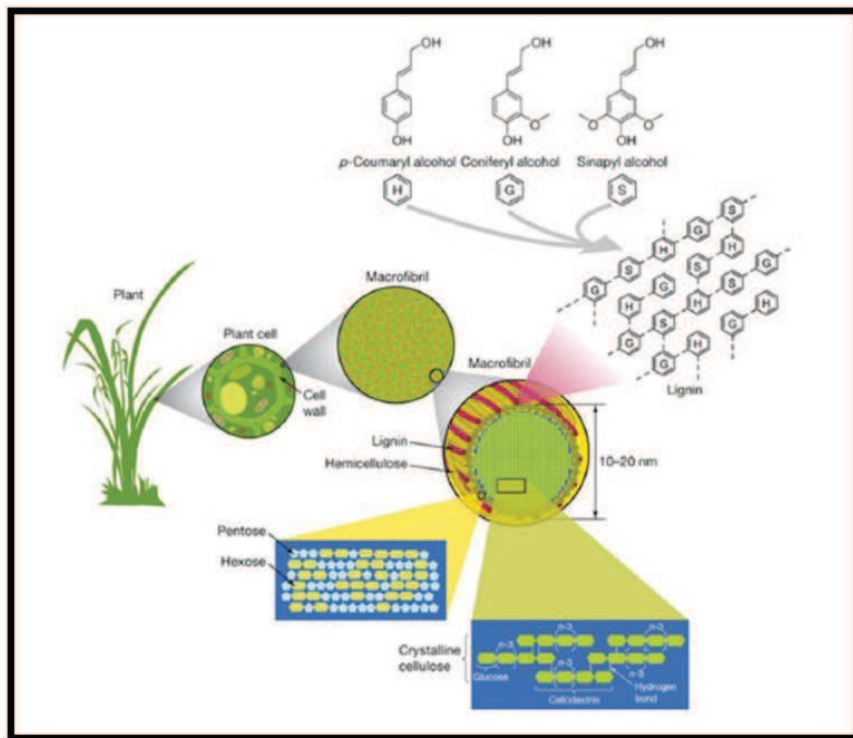


Figure 3 Structure de la matière lignocellulosique (Rubin et Edward, 2008)

- **La cellulose** : Constituant majoritaire de la matière ligneuse, elle représente environ 40% du matériau. Cette macromolécule est en fait une chaîne de cellobioses, eux-mêmes composés de deux unités anhydroglucoses aboutées (Figure 4). La matière première étant donc un sucre, il s'agit d'un polysaccharide. Il existe une distinction entre la cellulose amorphe et la cellulose cristalline, qui, elle, est organisée spatialement. La longueur de sa chaîne, appelée degré de polymérisation (DP), varie d'une essence à l'autre, mais sa composition reste la même. Cette molécule très hydrophile, linéaire et non ramifiée assure principalement le rôle de soutien mécanique ;

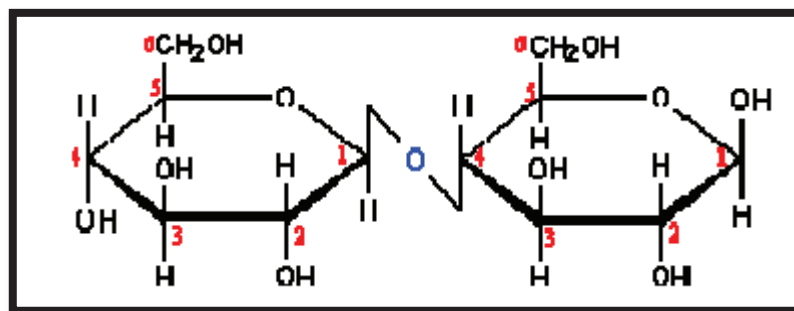


Figure 4 Structure de la cellobiose

- **Les hémicelluloses** : Polysaccharides plus courts que la cellulose, ramifiés, amorphes, et présentant également un caractère hydrophile. Ces molécules représentent environ 30% du bois, et sont constituées de différents sucres (xylose, galactose, mannose.). Leur composition, donnant différentes familles de molécules (xylanes, galactanes ou encore mannanes, selon la nature des sucres qui les constituent majoritairement), varie entre les essences : les feuillus sont majoritairement composés de xylose alors que chez les résineux, les hémicelluloses ont une proportion de galactoglucomannanes plus importante (Lapointe, 2000).
- **La lignine** : Molécule représentant 20 à 40% de la matière ligneuse, elle assure le rôle de liant entre la cellulose et les hémicelluloses. En effet, la lignine est le deuxième polymère naturel après la cellulose de par son abondance et elle est toujours associée à cette dernière dans les parois cellulaires. Sa biosynthèse à partir de trois motifs de base, l'alcool coumarylique (ou parahydroxyphényle), l'alcool coniférylique (ou guaïacyle) et l'alcool sinapylique (ou syringyle) (Figure 5), conduit à de nombreuses structures moléculaires dont les proportions vont dépendre de la plante et de son écosystème. Les lignines varient donc selon les essences : les résineux ont des monomères de type guaïacyle uniquement, alors que les feuillus ont en plus des monomères de type syringyle (Del Rio *et al.*, 2001). La lignine a des propriétés hydrophobes et antioxydantes et est principalement responsable de la photocoloration (Pandey, 2005).

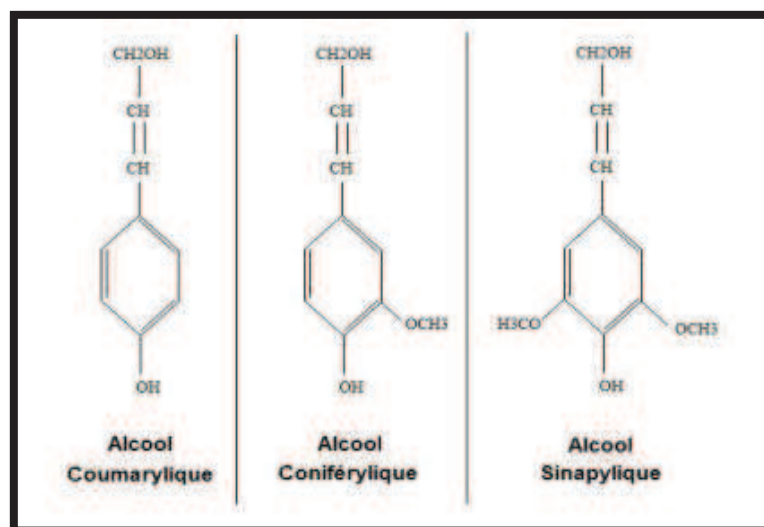


Figure 5 monomères de la lignine

- **Les extractibles** : Molécules de faible poids moléculaire, elles sont de diverses natures : les terpènes, les tanins (hydrolysables ou condensés). Il est possible de déterminer leur présence, par des techniques comme la chromatographie en phase gazeuse (Eikenes *et al* ; 2006) ou bien par relaxométrie (Daudé *et al* ; 2002).

1.3.2- Dégradation de la matière lignocellulosique

La lignocellulose est présente dans de nombreux écosystèmes où elle est dégradée et sert de source de carbone : sédiments marins, sols, compost ou encore systèmes digestifs animaux.

La dégradation des fibres lignocellulosiques implique principalement deux types d'enzymes. Le premier groupe est composé d'enzymes oxydantes capables d'attaquer la lignine. Le deuxième groupe comprend des enzymes capables de dégrader les hémicelluloses et la cellulose, qui conduisent finalement à des monosaccharides (Dworkin *et al.*, 2006).

Les végétaux étant quasiment les seuls autotrophes au carbone dans les écosystèmes terrestres, tous les organismes hétérotrophes dépendent, à un moment ou un autre de leur chaîne alimentaire, de la digestion de lignocellulose. Dégradation, méthanisation, humification ou minéralisation de la biomasse lignocellulosique sont des processus naturels réalisés par des micro-organismes qui font partie du cycle du carbone ; ils ont lieu notamment dans les sols.

Les communautés microbiennes impliquées ne sont pas uniquement bactériennes, les champignons y jouent parfois un rôle majeur, notamment dans les écosystèmes forestiers (Dashtban *et al.*, 2009).

Les animaux herbivores, se nourrissant majoritairement de plantes. Si certains d'entre eux ont une production d'un nombre restreint d'enzymes lignocellulolytiques, la digestion complète de la lignocellulose repose principalement sur l'intervention de flores digestives microbiennes. Ainsi, la transformation de la biomasse lignocellulosique a lieu principalement grâce au métabolisme des microorganismes présents dans les sols ou les systèmes digestifs. L'étude du fonctionnement de ces écosystèmes, permet une meilleure compréhension des mécanismes de transformation de la lignocellulose, mais également de s'en inspirer ou d'utiliser leur potentiel en biotechnologie (Auer, 2018).

Il existe des méthodes de prétraitements biologiques qui font appel aux capacités de certains champignons à dépolymériser la lignocellulose. Ces organismes appartenant au règne des *Fungi* ou *Mycota* produisent des enzymes (lignine peroxydases, laccases, polyphénols oxydases)

capables de dégrader la lignine, l'hémicellulose et la cellulose (Canam *et al.*, 2013). La délignification de la biomasse est efficace et sélective permettant d'augmenter l'accessibilité du substrat et les vitesses de production de bio hydrogène en fermentation (Magnusson *et al.*, 2008). L'inconvénient majeur des prétraitements biologiques est la lenteur du procédé (10 jours à plusieurs semaines) avec des conditions contrôlées et une perte du carbone consommé par les champignons (Agbor *et al.*, 2011), car, dans un contexte de valorisation de biomasse lignocellulosique, les communautés aérobies ne sont pas un bon modèle puisqu'en présence d'oxygène la dégradation est principalement orientée vers la production de biomasse microbienne et de CO₂, alors que les produits intéressants en industrie sont les produits de fermentation (acides gras volatils notamment). Seuls quelques champignons sont connus pour croître en conditions anaérobies et produire des enzymes lignocellulolytiques (cellulases, xylanases et phénol-hydrolases), mais ils n'ont été détectés que dans un nombre limité d'écosystèmes (intestins de ruminants principalement (Gordon et Phillips, 1998 ; Cheng *et al.*, 2009). Dans la majeure partie des autres cas, la dégradation de la lignocellulose sous conditions anaérobies est assurée en grande partie par la composante bactérienne des communautés microbiennes.

1.3.2.1 - Organismes dégradeurs de la lignocellulose

La lignine, est extrêmement résistante à la dégradation. En formant des liaisons à la fois avec la cellulose et les hémicelluloses, elle crée une barrière à toutes les solutions ou enzymes, et empêche la pénétration des enzymes lignocellulosiques au sein de la structure lignocellulosique.

Bien que la lignine résiste à l'attaque de la plupart des microorganismes, certains champignons basidiomycètes de la pourriture blanche sont capables de dégrader la lignine efficacement (Dashtaban *et al.*, 2010), parmi ceux-ci, *Trametes sp.*, *Phanerochaete sp* et *Pleurotus sp*, qui produisent des enzymes oxydatives extracellulaires. Pour cette raison, ils sont utilisés dans les prétraitements biologiques de la biomasse lignocellulosique (Gourdon, 2001).

Dans la nature, la décomposition de la biomasse lignocellulosique est réalisée par des communautés mixtes de champignons et de bactéries (Hervé *et al.*, 2014). La fonction de ces dernières est encore très peu connue mais des études ont montré que les bactéries participent à la dégradation de la biomasse lignocellulosique (Gelhaye *et al.*, 1993 ; Zainudin *et al.*, 2013).

De plus, des systèmes enzymatiques semblables à ceux décrits chez les champignons ont été mis en évidence chez des bactéries (Ausec *et al.*, 2011 ; Taylor *et al.*, 2012). Ainsi, des espèces appartenant aux genres *Xanthobacter*, *Burkholderia* ou *Rhodococcus* peuvent synthétiser des enzymes ligninolytiques.

Les insectes xylophages aussi jouent un rôle important dans la dégradation de la lignocellulose et en particulier les termites qui la digèrent avec une grande efficacité et représentent un modèle d'insecte pertinent (Nakashima *et al.*, 2002).

1.4- Les termites

Les spécialistes dénombrent 2858 espèces de termites décrites, dont 537 sont situées dans la zone Néotropicale (Constantino, 2007). Les termites sont des insectes sociaux très développés qui constituent l'ordre des isoptères. Dans cet ordre, il y a six familles, dont cinq sont classées comme les termites inférieurs (*Mastotermitidae*, *Kalotermitidae*, *Hodotermitidae*, *Rhinotermitidae* et *Serritermitidae*). Les termites inférieurs ont des genres et des espèces uniques d'*oxymonad*, de *trichomonad* et de flagellés *hypermastigotes*, capables d'ingérer du bois et de vivre en symbiose dans l'empreinte de l'intestin postérieur. L'autre famille de termites (*Termitidae*), qui représente environ 75% de toutes les espèces, est constituée par les termites supérieurs.

Les populations de protozoaires dans ces termites (le cas échéant) sont faibles et n'incluent pas les espèces xylophages (Honigberg, 1970). Ces insectes possèdent un appareil buccal de type broyeur (Grassé, 1949). Certaines espèces qui dégradent le bois et les matériaux cellulosiques ont un impact économique important qui leur confère un statut de nuisible pour les activités humaines. On ne parle ici que de 10% des espèces qui sont xylophages (mangeur de bois) (Lima et Costa-Leonardo, 2007). Cette minorité suffit à leur donner une mauvaise réputation. Pourtant les termites sont en grande majorité des humivores. Par exemple, ils consomment 24 à 32% de la production annuelle des feuilles tombées dans une forêt tropicale en Malaisie (Matsumoto et Abe, 1979) ou encore 63% de litière d'herbacées d'une savane nigériane (Wood, 1978).

Les termites rentrent dans les processus de recyclage des nutriments par trituration, décomposition, humification, minéralisation de produits cellulosiques puis la formation du sol (Tayasu *et al.*, 1997 ; Holt et Lepage, 2000 ; Costa-Leonardo, 2002).

Ces insectes ont un développement similaire aux blattes, de type hémimétabole (Lo *et al.*, 2000 ; Lo *et al.*, 2003 ; Inward *et al.*, 2007 ; Legendre *et al.*, 2008). Il s'agit d'un type de développement progressif, sans stade immobile entre la larve et l'adulte, leurs larves ressemblent à des imagos (adultes) sans ailes. Il y a trois stades : œuf, larve (comporte plusieurs stades) et imago. Lors de chaque mue, les individus se débarrassent intégralement de leur cuticule et par ce biais, ils perdent leurs symbiotes situés dans la partie distale du tube digestif qui elle aussi est tapissée de cuticule. Le mésentéron (partie moyenne du tube digestif), qui est d'origine endodermique et donc dépourvu de cuticule, fait exception (Grassé, 1982).

1.4.1- Régimes alimentaires des termites

Les termites sont tous potentiellement des consommateurs du bois (xylophages), mais seulement 10% d'entre eux sont des xylophages stricts, les autres ont un régime plus diversifié en matériaux organiques se trouvant dans des niveaux de décompositions différents (Lima et Costa-Leonardo, 2007). Leur préférence alimentaire est donc très diversifiée, certains mangent du bois « vivant » (l'arbre est sur pied et vivant), mais ils se trouvent aussi dans la partie morte du bois (duramen), des herbacées, de la litière, des champignons, des nids d'autres espèces de termites, des excréments et carcasses d'animaux, des lichens et matériaux organiques présent dans le sol (Lee et Wood, 1971; La Fage et Nutting, 1978; Wood, 1978; Noirot, 1992; Sleaford *et al.*, 1996; Miura et Matsumoto, 1998; Donovan *et al.*, 2001).

1.4.2- Système symbiotique des termites

Les termites sont symbiotiquement associés à divers microorganismes, notamment des bactéries, protistes et mycètes. Les bactéries se trouvent dans les termites supérieurs et inférieurs, alors que les protistes vivent dans l'intestin des termites inférieurs seulement. Les mycètes, également présents chez certains termites, sont supposés de jouer des rôles dans l'intestin des termites : ils sont une source de protéines, sont capables de dégrader la lignine, diminuer le rapport carbone / azote et enfin sécréter des cellulases et des xylanases (Didden *et al.*, 2008). Les mycètes peuvent dégrader la lignine en dioxyde de carbone, qui n'est pas attaqué par les bactéries et les protistes (Dürre ; 2004). La digestion de la lignocellulose par les termites inférieurs et supérieurs dépend de diverses souches, produisant des enzymes capables d'hydrolyser les composants lignocellulosiques.

La biodiversité du tube digestif des termites a été étudiée précédemment et différentes activités enzymatiques provenant des symbiotes et du termite lui-même ont été identifiées. Il a été démontré que les intestins des termites contiennent des amylases, des cellulases et des xylanases (Tartar *et al.*, 2006).

1.4.3- La microflore du tube digestif des termites

Le système digestif des termites a été décrit en détail par Noirot et Noirot-Timothee (1969). En résumé, il comprend l'intestin antérieur (comprenant la récolte et le gésier), l'intestin moyen et l'intestin postérieur.

Les bactéries se trouvent dans l'intestin postérieur et le segment mixte. Bien que des bactéries aient été observées dans le segment mélangé d'espèces de cinq genres de termites, aucune tentative n'a été faite pour identifier ces espèces bactériennes, même si le segment mélangé contient un grand nombre de bactéries qui ont l'apparence d'une culture pure et ne se mélangent pas avec le bol alimentaire (Noirot et Noirot-Timothee 1969). La complexité de l'association de la flore et de la faune dans l'intestin, avec des bactéries adhérant à l'épithélium de la panse ou à d'autres bactéries ou protozoaires (Breznak et Pankratz 1977 ; To *et al.* 1980 ; Bignell *et al.* 1980) rendrait difficile la récupération de toutes les bactéries présentes dans l'intestin.

Le poids de la microflore des termites peut atteindre 40% du poids total des termites (Bignell ,2010). La digestion du bois s'effectue principalement dans l'intestin postérieur des termites, qui abrite (10^{11}) cellules microbiennes/mL (Alvira *et al.*, 2010). Le termite ingère de petites particules de bois par l'action de ses mandibules (20–100 μm). Les protistes flagellés peuvent phagocyter ces fragments et les fermenter (Alvira *et al.*, 2010).

Les termites sont capables de métaboliser 85% du glucose contenu dans la cellulose et 83% du xylose contenu dans les hémicelluloses (Dworkin, *et al.* ; 2006). Cette efficacité surpasse celle des consortia qui se développent au sein du rumen. Par conséquent, le tube digestif du termite peut être considéré comme source potentielle de cellulases et d'hémicellulases. Les termites inférieurs (Figure 6) contiennent, en plus des bactéries, archéobactéries et mycètes communs aux termites supérieurs, des protistes supposés de jouer un rôle clé dans la digestion de la cellulose au sein du tube digestif (Brüne et Ohkuma, 2010). Ils sont capables de phagocyter les particules de bois pour les hydrolyser et les fermenter (Bignell, 2010). Par conséquent, ils possèdent un potentiel hydrolytique plus élevé que les termites supérieurs.

L'essentiel de la microflore est contenu dans une zone élargie du tube digestif nommée « hindgut », en fin de tube digestif, après le « foregut » et le « midgut » (Bignell, 2010).

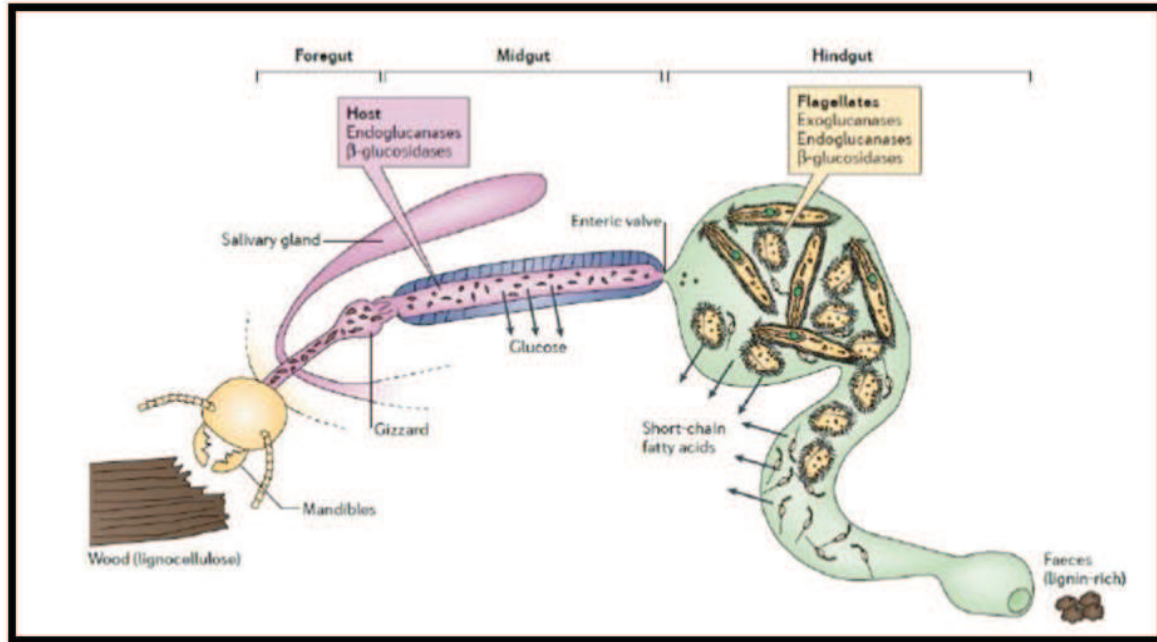


Figure 6 Schéma récapitulatif de la digestion chez les termites inférieures (d'après (Brune, 2014))

1.5- Action des enzymes sur la matière lignocellulosique

1.5.1- Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des protéines qui agissent en tant que catalyseurs pour accélérer des réactions chimiques dans la matière organique, cette propriété est liée à la présence, dans leurs structures, d'un site actif qui est en forme de cavité au sein de laquelle se déroule la réaction enzymatique (Netto *et al.*, 2013).

Les fonctions des enzymes sont fortement spécifiques en ce qui concerne le substrat et les cofacteurs, parce que l'accepteur actif exige habituellement un ligand ou un connecteur approprié montrant la bonne taille, la forme, la charge et le caractère hydrophobe ou hydrophile (Netto *et al.*, 2013).

1.5.2- Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les plantes, les animaux et les microorganismes (Aviron-Violet *et al.*, 1982 ; Arnaud *et al.*, 1993).

La synthèse d'enzymes à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Dès lors, la production d'enzymes à partir de la flore microbienne est l'avenue privilégiée. En fait, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont : une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (Arnaud *et al.*, 1993).

Cependant, parmi les milliers d'espèces de microorganismes connus dans ce domaine, environ 20 seulement sont actuellement commercialisés sur une base d'avoir un impact significatif sur l'industrie des enzymes. Ainsi, *Bacillus arnyloliEtefaciens* et *Bacillus lichenifurmis* produisent environ 50% de l'ensemble des enzymes de fermentation, alors que les moisissures du genre *Aspergillus*, *A. niger* et *A. oryzae*, en génèrent 30 % (Aviron -Violet *et al.*, 1982).

1.5.3- Production industrielle des enzymes microbiens

Traditionnellement, les enzymes microbiennes étaient produites par culture en surface, soit en couche mince de milieu liquide ou de milieu semi-solide. Les cultures séchées donnaient des préparations suffisamment stables. Cette technique est encore utilisée pour quelques productions, en particulier les enzymes d'origine fongique telles que les amylases d'*Aspergillus*, les protéases d'*Aspergillus* et de *Mucor* ou les pectinases de *Penicillium*. Mais les contrôles de température d'aération et d'humidité présentent des difficultés. En fait, dès que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les microorganismes, la production industrielle d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires. Les cultures en milieu liquide profondes, agitées, sont mieux adaptées aux différents contrôles par des méthodes modernes et réduisent les risques de contamination.

De plus, elles se prêtent mieux aux opérations d'extrapolation et d'optimisation nécessaires pour le passage du fermenteur pilote de laboratoire au fermenteur industriel (Aviron-Volet *et al.*, 1982 ; Arnaud *et al.*, 1993).

1.5.4- Les enzymes ligninolytiques

Dans la nature, la biodégradation de la lignine au cours du processus de décomposition du bois serait principalement liée aux activités de nombreux micro-organismes. La dégradation de la biomasse lignocellulosique est réalisée par un pool enzymatique complexe constitué de cellulases, d'hémicellulases et de ligninases, associé à la complexité biochimique et structurale de la biomasse lignocellulosique. Au cours de la dégradation sélective de la lignine, des enzymes hydrolysent partiellement la lignine et les polysaccharides non cellulosiques sans dégradation significative de la cellulose. Parmi les enzymes dites « ligninolytiques », deux peroxydases, la lignine peroxydase (LiP) et la manganèse peroxydase (MnP) et une phénol oxydase couplée avec le cuivre, la laccase, sont considérées comme les principales enzymes responsables de la dépolymérisation de la lignine (Sanchez, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Wan et Li, 2010). Les chercheurs ont récemment accordé beaucoup d'attention aux laccases en raison de leur capacité à oxyder les composés phénoliques et non phénoliques liés à la lignine, ainsi que les polluants environnementaux très récalcitrants, ce qui les rend très utiles pour leur application à plusieurs processus biotechnologiques (Couto *et al.*, 2006).

1.5.5- Utilisation des déchets agro-industriels dans la production des enzymes ligninolytiques

Les résidus agro-industriels sont généralement considérés comme les meilleurs substrats pour les processus de fermentation en milieu solides, afin de produire des métabolites à haute valeur ajoutée notamment les enzymes. Un certain nombre de substrats ont été utilisés pour la culture de micro-organismes pour produire des enzymes ligninolytiques, parmi lesquels on cite la bagasse de canne à sucre, son de blé, son de riz, son de maïs, la paille de blé, paille de riz, la paille de l'orge, les déchets de la banane et les déchets d'orange (Tableau2). Le choix d'un substrat pour la production d'enzymes dans un processus de SSF dépend de plusieurs facteurs, qui sont principalement liés au coût et à la disponibilité du substrat. Dans un processus de SSF, le substrat solide fournit non seulement les éléments nutritifs à la culture microbienne, mais sert

aussi à la fixation des cellules. Le substrat qui fournit tous les nutriments nécessaires pour les micro-organismes est considéré comme le support idéal. Toutefois, certains éléments nutritifs peuvent être disponibles à des concentrations suboptimales, voire absents dans les substrats. Dans ces cas, il deviendra nécessaire de les compléter par une source extérieure. De plus, la complexité des déchets, notamment les déchets lignocellulosiques, nécessite parfois le recours au prétraitement (chimique, mécanique et ou thermique), rendant ainsi les nutriments plus facilement accessibles pour la croissance microbienne (Gassara, 2012).

Il est de notoriété publique que la majorité des déchets agroindustriels sont de nature lignocellulosique. La production de laccase à partir de ces déchets agroindustriels revêt une grande importance en raison de la réutilisation des déchets industriels qui réduit les problèmes posés lors de leur élimination et permet également d'utiliser les résidus pour diverses applications industrielles. (Poonam et Pandey, 2009). Le choix d'un substrat naturel approprié est fortement influencé par les teneurs élevées en lignine (Couto et Sanroman, 2005). De plus, ces substrats constituent un habitat naturel favorable pour la sécrétion d'enzymes lignocellulosiques en plus grande quantité (Chawachart *et al.*, 2004 ; Revankar et Lele, 2006).

Tableau 2 Substrats utilisés pour la production des enzymes ligninolytiques par fermentation à l'état solide

Support	Microorganisme	Type du réacteur	Enzyme	Production	Référence
Déchet de banane	<i>P. ostreatus</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i>	fioles	Laccase, LiP	1,7106 U/mg de laccase 0,1632 U/mg de LiP	Reddy <i>et al.</i> , 2003
Maïs	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	fioles	Laccase	180 U/ml de laccase	Tychanowicz <i>et al.</i> , 2006
Son de blé	<i>P. pulmonarius</i>	fioles	Laccase	8,600 U/g	D'SOUZA <i>et al.</i> , 2006
Son de blé	<i>Fomes sclerodermeus</i>		Laccase, MnP	6,3 U g ⁻¹ de MnP 270 U g ⁻¹ de laccase	Papinutti <i>et al.</i> , 2003
Paille de blé	<i>P. chrysosporium</i>	fioles	LiP, MnP		Castillo <i>et al.</i> , 1997
Paille de blé	<i>P. chrysosporium</i>	fioles	LiP, MnP	2600 U/L de LiP, 1375 U/L de MnP	Xu <i>et al.</i> , 2001
Paille de blé	<i>P. pulmonarius</i>	fioles	Laccase	8,600 U/g substrate	D'SOUZA <i>et al.</i> , 2006

1.6- La laccase

La laccase (benzène diol : oxygène oxydoréductases, EC 1.10.3.2) est une enzyme de type ligninases, c'est-à-dire qu'elle est capable de dégrader la lignine. La laccase est une enzyme oxydative à base de cuivre, elle est capable de réagir spécifiquement avec différents types de résidus phénoliques de la lignine en présence d'oxygène comme accepteurs d'électrons. La spécificité du substrat de la laccase et le fait qu'elle utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons au lieu du peroxyde d'hydrogène comme l'enzyme lignolitique peroxydase, ce qui la rend très intéressante pour des applications industrielles et environnementales (Camarero *et al.*, 2005).

1.6.1- Sources de la laccase

➤ *Chez les champignons*

En 1883, Yoshida a décrit pour la première fois la laccase en l'extrayant de la laque japonaise, *Rhus vernicifera*. En 1896, Bertrand et Laborde prouvèrent que la laccase était présente dans les champignons pour la première fois. La laccase est largement répandue dans les plantes supérieures, les bactéries, les champignons et les insectes (Kumar et Sonkar, 2013).

➤ *Chez les bactéries*

La laccase bactérienne a été signalée pour la première fois chez *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993) ; elle joue un rôle dans la pigmentation cellulaire, l'oxydation de composés phénoliques (Faure *et al.*, 1994) et / ou le transport d'électrons (Alexandre *et al.*, 1999). Elle a été trouvée également chez d'autres bactéries comme *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Aquifex aeolicus*, *Bacillus halodurans*, *Alpha protéobactérie*, *Pseudomonas maltophila*, *Streptomyces antibioticus*, *Thermus thermophilus* et *Xanthomonas*, etc. (Sharma et Kuhad, 2007).

➤ *Chez les insectes*

L'enzyme laccase a également été caractérisée chez différents insectes, par exemple, *Bombyx*, *Calliphora*, *Diploptères*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Orycètes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* et *Tenebrio* (Arora et Sharma, 2010). La laccase d'insecte est une longue séquence amino-terminale caractérisée par un domaine unique constitué de plusieurs résidus conservés de cystéine, aromatiques et chargés. Récemment, ils ont découvert que deux iso-formes du gène de la laccase 2 catalysaient le tannage des cuticules larvaire, nymphale et adulte chez *Tribolium castaneum* (Arakane *et al.*, 2005; Sharma et Kuhad, 2008).

1.6.2- Propriétés de la laccase

Les laccases sont monomériques, dimériques ou tétramériques. Ce sont des glycoprotéines dont le taux de glucides se situe entre 10 et 45 %, celui-ci contribuant à la stabilité de l'enzyme (Claus, 2004). En 1997 Call et Mücke ont étudiés les propriétés générales de la laccase (Tableau3).

Tableau 3 Les propriétés générales de la laccase

Propriétés	Intervalle
pH-Optimal	3.0–7.5
Température optimale (°C)	40–80
Masse moléculaire (kDa)	60–390
Teneur en cuivre (atomes par molécule)	2-16
Redox potentiel (mV)	180–800
Nombre des isoenzymes	Jusqu'à 5
Points isoélectriques	2.6–7.6
Inhibiteurs	Dithioethylcarbamic acid, thioglycolic acid, phenylthiourea EDTA, coniferyl alcohol.
Réactions catalysées	Demethylation, demethoxylation decarboxylation, formation of phenoxy radicals, C α -C β cleavage, alkylaryl cleavage, C α -oxidation.

1.6.3- Structure de la laccase

Les structures des laccases de *Bacillus subtilis* (Enguita *et al.*, 2004), de *Coprinus cinereus* (ducros *et al.*, 1998) et de *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002) ont été établies par différentes techniques telles que la cristallographie, les rayons X, la spectroscopie UV/visible ou la RPE (résonance paramagnétique électronique).

La séquence des acides aminés, la structure du site actif (Figure 7) (Berka *et al.*, 1997 ; Jang *et al.*, 2002) ainsi que la spécificité vis-à-vis des substrats phénoliques (D'Annibale, 1996 ; Johannes et Majacherczyk, 2000) ont été établies.

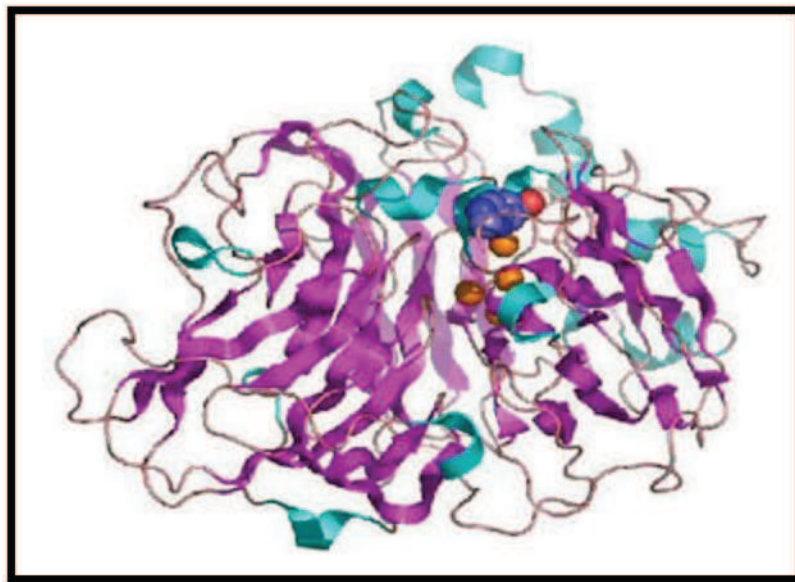


Figure 7 Représentation de la structure 3D de la laccase de *Trametes versicolor*

Sur la Figure (8) ci-dessous est représentée la structure tridimensionnelle de la laccase de *Bacillus subtilis*. Dont les détails de la disposition des atomes de cuivre du site actif de l'enzyme, la position du substrat, l'ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) lié aux protéines sont représentés.

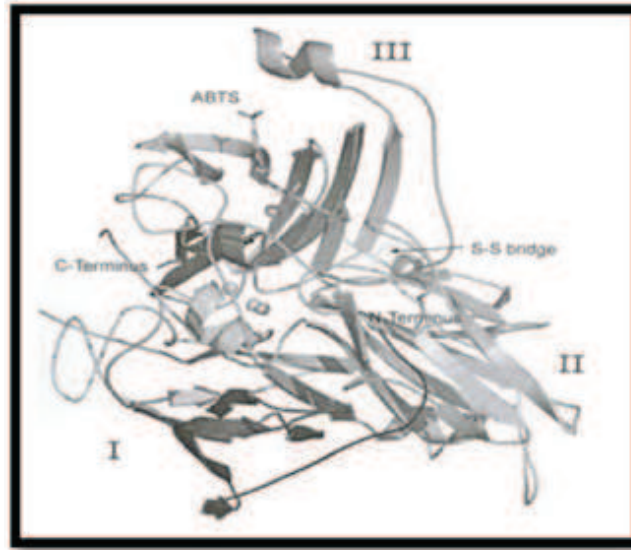


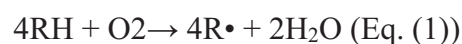
Figure 8 Représentation de la structure 3D de la laccase de *Bacillus subtilis* obtenue par cristallographie aux rayons X (d'après Enguita *et al.*, 2004)

1.6.4- Mécanisme d'action de la laccase

Les laccases consomment de l' O_2 au lieu de H_2O_2 pour oxyder les monolignols (Sterjiades *et al.*, 1992, Bao *et al.*, 1993). Pour exécuter la fonction catalytique, la laccase dépend d'atomes de Cu distribués aux trois centres de cuivre différents. L'enzyme laccase retire l'électron des substrats et les convertit en radicaux libres, qui peuvent être polymérisés. Après avoir reçu quatre électrons, l'enzyme les donne à l'oxygène moléculaire pour former une molécule d'eau (Eq. (1)) (Bourbonnais et Paice, 1990) Dans l'ensemble, la catalyse de laccase comporte trois étapes principales (Figure 9) :

1. Réduction du Cu de type 1 par réduction du substrat ;
2. Transfert interne d'électrons du type 1 Cu vers les types 2 et 3 Cluster tri nucléaire Cu ;
3. Réduction de l'oxygène (dans l'eau) au niveau des cuirs de types 2 et 3 (Thurstone, 1994 ; Solomon *et al.*, 1992 ; Messerschmidt, 1994 ; Yaropolov *et al.*, 1994).

La réaction globale est la suivante :



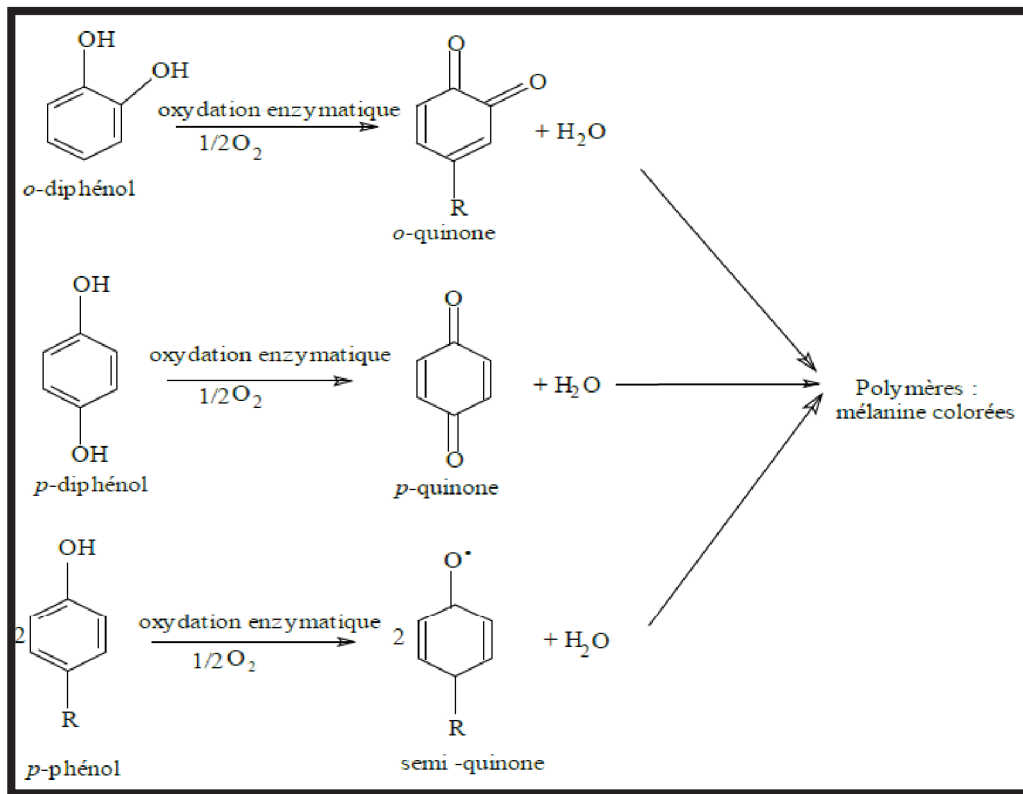


Figure 9 Différentes réactions catalysées par la laccase (Issa, 2009)

1.6.5- Applications biotechnologiques de la laccase

Quelques laccases se trouvent actuellement sur le marché des industries du textile, de l'alimentation et autres, et de plus en plus de candidats sont activement mis au point pour une commercialisation future. Un grand nombre d'applications industrielles pour les laccases ont été proposées. Elles comprennent les pâtes et papiers, le textile, la synthèse organique, l'environnement, l'alimentation, les produits pharmaceutiques et la nanobiotechnologie. Les biocatalyseurs à base de laccase spécifiques, économes en énergie et biodégradables s'inscrivent bien dans le développement d'industries hautement efficaces, durables et respectueuses de l'environnement (Kunamneni *et al.*, s.d.).

➤ **Industrie de cosmétique :** Plusieurs brevets relatent l'utilisation des laccases dans le monde cosmétique, surtout pour la synthèse de nouveaux pigments dits "naturels" pour colorer les cheveux (Lang et Cotteret, 1999) qui sont moins irritants et plus simples d'utilisation que les produits courants, car les laccases remplacent des produits chimiques tels que H_2O_2 en milieu alcalin (NH_3). Plus récemment, des préparations cosmétiques et dermatologiques

contenant des protéines laccasiques pour le blanchiment de la peau ont aussi été développées (Golz-Berner *et al.*, 2004).

➤ **La dégradation des HAP :** Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants environnementaux omniprésents. Celles-ci sont produites lors de la combustion incomplète de combustibles fossiles et de déchets organiques et également à la suite de divers processus industriels (Alcalde *et al.*, 2002 ; Alcalde *et al.*, 2003). De nombreuses études ont été menées sur la biodégradation de divers hydrocarbures aromatiques, mais leur faible hydrosolubilité et leurs faibles taux de dégradation interrompent la bioremédiation des HAP (Levin *et al.*, 2003). Par conséquent, il est essentiel de connaître les microorganismes ayant une grande capacité de dégradation des HAP afin de remédier efficacement à la contamination par les HAP. Les champignons responsables de la pourriture blanche produisent une enzyme extracellulaire, la laccase, qui oxyde les HAP en leurs quinones correspondantes, puis les dégrade en CO₂.

➤ **Industrie de textile et teinture azoïque :** L'industrie textile contenant des réactifs chimiques utilisés dans des compositions chimiques très diverse, allant du composé inorganique aux polymères et aux produits organiques (Juang *et al.*, 1996). Il a été rapporté que la laccase empêchait les taches de colorer les textiles imprimés. Dans le cadre de la solution de lavage, la laccase pourrait rapidement blanchir le colorant libéré, entraînant ainsi une réduction du temps de traitement, de l'énergie et de l'eau nécessaires pour obtenir une qualité satisfaisante du textile. Le blanchiment par colorant textile catalysé par la laccase peut également être utile pour le finissage de tissus de coton teints. Une autre application intéressante de la laccase dans ce domaine est la transformation par oxydation et le couplage consécutif du précurseur de colorant à la matrice de colle dans les peaux. Sous catalyse de la laccase, le précurseur de colorant soluble pourrait être absorbé, oxydé et polymérisé pour donner l'effet tannant souhaité. Le processus pourrait améliorer l'efficacité de la teinture, réduire les coûts ou améliorer les caractéristiques de la peau (Xu, 1999). Les laccases ont été largement étudiées pour la dégradation des colorants azoïques (Chivukula et Renganathan, 1995). La laccase, la peroxydase de manganèse, la lignine peroxydase et l'alcool aryle alcool oxydase ont été trouvés dans des extraits bruts à l'état solide. Cependant, seule l'activité de la laccase a été corrélée à

l'élimination de la couleur et les préparations purifiées par la suite ont pu effectuer cette réaction *in vitro*.

➤ **Détection du phénol, de l'aniline et de l'oxygène :** La laccase a été utilisée pour la détection de divers polluants en développant des biocapteurs et des kits de diagnostic. Pour détecter le phénol, les anilines ou d'autres substrats réducteurs, trois types de capteurs à base de laccase ont été rapportés. Le premier type détecte le changement photométrique résultant de l'oxydation d'un substrat chromogène, le second type surveille le changement de concentration en O₂ couplé au substrat, l'oxydation, et le troisième type utilise une électrode qui remplace O₂ en tant qu'accepteur des électrons transportés du substrat (à travers la laccase) (Xu, 1999).

➤ **Industrie pharmaceutique :** Les laccases ont été utilisées pour la synthèse de plusieurs produits de l'industrie pharmaceutique (Arora et Sharma, 2010). Le premier produit chimique d'importance pharmaceutique préparé à l'aide de l'enzyme laccase est l'actinocine préparée à partir d'acide 4-méthyl-3-hydroxyanthranilique. Ce composé a une capacité anticancéreuse et agit en bloquant la transcription de l'ADN de la cellule tumorale (Burton, 2003).

La vinblastine est un autre exemple de médicament anticancéreux utile dans le traitement de la leucémie. La plante *Catharanthus roseus* produit naturellement de la vinblastine. Cette plante produit une petite quantité de ce composé. La katarantine et la vindoline sont les précurseurs de ce composé important du point de vue pharmaceutique. Celles-ci les précurseurs sont produits en quantités plus importantes et sont faciles à purifier. La laccase est utilisée pour convertir ces précurseurs en vinblastine. Une conversion de 40% de ces précurseurs en produit final a été obtenue à l'aide de laccase (Yaropolov *et al.*, 1994). L'utilisation de la laccase dans de telles réactions de conversion a rendu possible la préparation de plusieurs composés importants aux propriétés utiles, telles que les antibiotiques (Pilz *et al.*, 2003).

Matériel et méthodes

2- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'isolement et la sélection des microorganismes producteurs de laccase, qui dépolymérise la lignine, en vue de la valorisation de la biomasse lignocellulosique répandue en grandes quantités et présentant un ennui pour l'environnement.

Le développement des travaux faits au cours de cette étude a eu lieu au niveau du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de L'activité Microbienne (**LaMyBAM**), Université Frères Mentouri Constantine 1.

2.1- Echantillonnage

2.1.1- Le substrat

Les feuilles du palmier dattier *Phoenix dactylifera L.* (Les palmes sèches) (Figure10), provenues de la wilaya de "Biskra" ; ont été séchées à l'air libre et à l'ombre, pendant un mois ; coupées en petits morceaux ; broyées puis tamisées. La poudre obtenue a été conservée dans des bocaux en verre pour une utilisation ultérieure, comme substrat, lignocellulosique, de fermentation (milieu naturel).



Figure 10 Feuille du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*)

2.1.2- Les insectes

La collecte des échantillons d'insectes a été effectuée en mois de mars, à une température moyenne d'environ 18°C, au niveau de la forêt de "DJEBEL EL OUEHCHE", majoritairement occupée par des arbres de pin, à Constantine (Figure11).

L'écorce des arbres de pin (*Pinus halepensis*) perforés (Figure12), a été retirée à l'aide d'un couteau stérile pour atteindre les insectes qui se trouvaient à l'intérieur des trous ; les morceaux d'écorce retirés ont été collectés à l'aide d'une pince stérile puis mis dans des pots stériles (Figure 13).



Figure 11 Site d'échantillonnage au niveau de la forêt de "DJEBEL EL OUEHCHE" à CONSTANTINE



Figure 12 Arbre de pin (*Pinus halepensis*) hébergeant des xylophages



Figure 13 La collecte des insectes xylophages

2.2- Séparation et sélection des insectes

Dans des conditions d'asepsie, sous hôte à flux laminaire, le dispositif appareil de "Berlèse" a été monté, pour récolter les insectes qui se trouvaient à l'intérieur des morceaux d'écorce collectés ; ces derniers ont été placés dans un entonnoir en-dessus d'une grille jouant le rôle de tamis, puis ils ont été déposés sous une lampe allumée, qui, en plus de la chaleur dégagée, sa lumière a permis de chasser les insectes des morceaux de bois et de les faire tomber dans un erlenmeyer contenant de l'éthanol dilué (LADELL, 1936). Les insectes récupérés et sélectionnés pour poursuivre cette étude, ont été prélevés de l'éthanol et rincés abondamment avec de l'eau distillée stérile (Figure 14) ; puis observés à la loupe binoculaire.

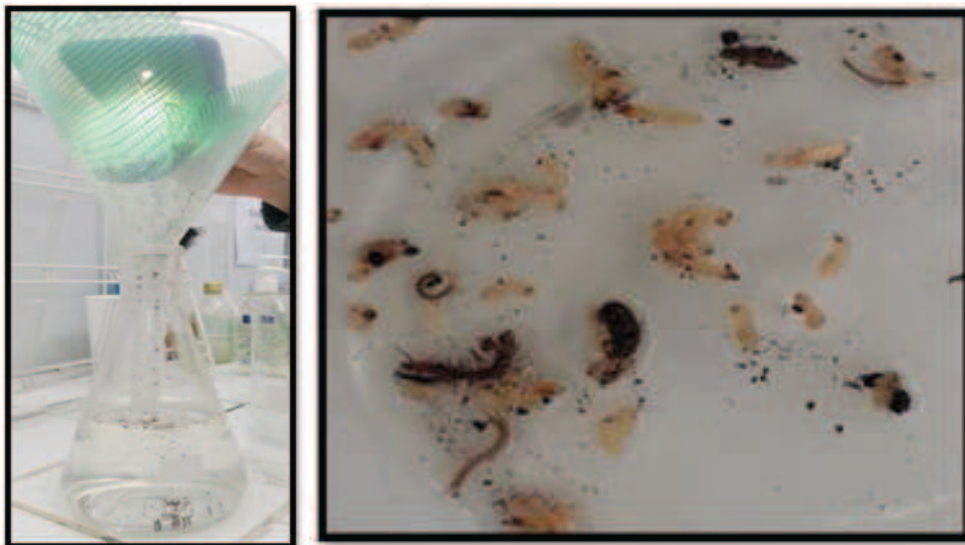


Figure 14 Séparation des insectes « appareil de Berlèse »

2.2.1- Préparation des solutions microbiennes

Dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile, les insectes sélectionnés ont été broyés, à l'aide d'un micro pilon stérile, puis le contenu du tube a été homogénéisé au vortex, ainsi la solution mère a été obtenue (Bahiru *et al.*, 2006).

Pour préparer une série de diluions ,1mL de cette solution a été prélevé, aseptiquement, à l'aide d'une micropipette, et transféré dans un tube contenant 9mL d'eau physiologique stérile pour obtenir une dilution de l'ordre (10^{-1}), de la même manière des dilutions décimales (jusqu'à 10^{-4}) ont été réalisées (Figure 15).

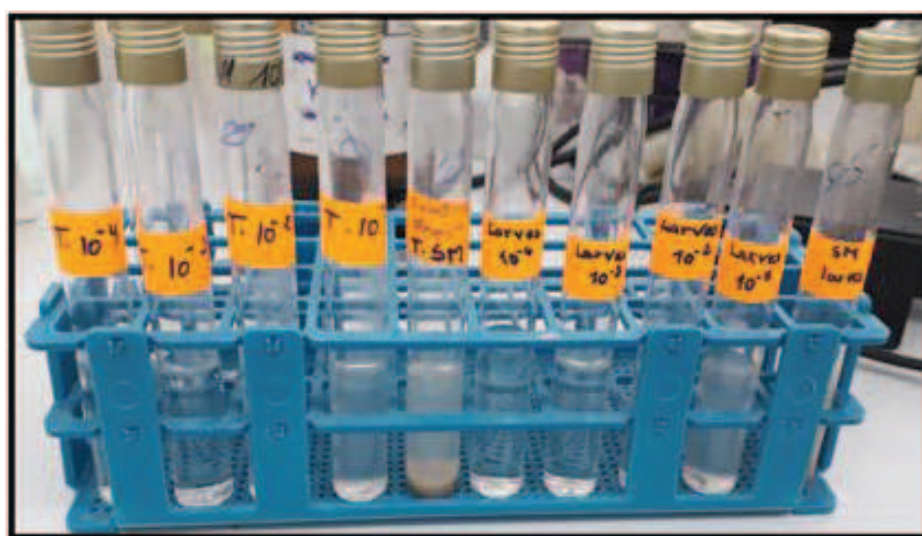


Figure 15 Réalisation d'une série de dilutions à partir de la solution mère

2.2.2- Isolement des microorganismes

Cette étape a été réalisée afin d'isoler les différentes souches microbiennes présentes dans le tube digestif des insectes sélectionnés. À partir de la solution mère et des dilutions préparées, des boîtes de pétri contenant les milieux : 863 et ISP2 (Annexe1) ont étéensemencées en déposant 0,1mL du bouillon microbien sur la gélose qui a été, par la suite, bien réparti sur toute la surface. L'incubation a été faite à 30°C et les boîtes ont été observées quotidiennement pendant 7 jours.

2.2.3- Purification des souches microbiennes

L'obtention d'isolats à l'état pur a été réalisée par repiquage successif des différentes colonies issues des boîtes d'isolement, sur les mêmes milieux et dans les mêmes conditions de culture précédentes ; des observations macroscopiques et microscopiques ont été réalisées pour s'assurer de la pureté des souches. Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un code.

2.2.4- Conservation des isolats

Pour ce faire, des colonies des cultures purifiées sont transférées dans des tubes à essais stériles contenant le bouillon nutritif (Annexe1) ; additionné de 20% de glycérol, incubés à 30 °C pendant 24h puis conservés à une température de +4°C.

2.3-Etude de l'activité enzymatique des souches microbienne

2.3.1- Mise en évidence de l'activité laccasique

Les isolats purifiés précédemment, ont été testés sur milieu LMBG (Annexe1), qui a étéensemencé par une touche d'ose, d'une culture jeune, au centre de la gélose (Figure16). Les boîtes de Petri ont été incubées à une température de 30°C pendant une période de 15 jours. L'apparition d'une zone brune rougeâtre, qui indique la présence d'une activité laccasique, a été suivie par des observations journalières (Coll *et al.*, 1993).



Figure 16 Ensemencement des isolats sur milieu LMBG

2.3.2- Mise en évidence de l'activité cellulosique

Afin de déterminer leur activité cellulosique ; les isolats qui ont montré un test laccase positif, ont été ensemencées, de la même façon que pour le test laccase, sur milieu CMC (Annexe1) ; incubées à 30°C jusqu'à apparition d'une colonie visible à l'œil nu, puis elles ont été inondées par le rouge Congo (2%) pendant 30 minutes, décolorées avec une solution de NaCl (1M) pendant la même durée puis observées. La dégradation de la cellulose du milieu autour des colonies est indiquée par l'apparition d'une zone claire contre une couleur rouge pour la cellulose non dégradée (Buswell *et al.*, 1994 ; Buswell *et al.*, 1996 ; Pointing *et al.*, 1999).

2.3.3- Mise en évidence de l'activité xylanatique

De la même manière expliquée précédemment pour l'activité cellulosique ; l'activité xylanatique a été testée sur milieu XBM (Annexe1) avec une coloration de 5 minutes avec de l'iode (0.25%) puis rinçage à l'eau distillée. L'apparition d'une zone jaune opaque pour le xylane dégradé contre une couleur bleu violet / rougeâtre pour le xylane non dégradé, a été ainsi observée (Egger, 1986 ; Pointing *et al.*, 1999).

2.4- Identification préliminaire de l'isolat microbien sélectionné

L'isolat T5 ayant montré une activité laccasique a été identifié partiellement par l'ensemble des tests préliminaires : observation macroscopique et microscopique, tests biochimiques, galerie API 20 E et 50 CH.

2.4.1- Caractérisation morphologique

2.4.1.1- Aspect macroscopique des colonies

Cette étape comprend l'étude de l'aspect macroscopique, qui consiste à observer à l'œil nu la croissance, la couleur, la taille et la forme des colonies (Camille, 2007) sur milieu 863.

2.4.1.2- Aspect microscopique des colonies

➤ Observation à l'état frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme. Une petite goutte d'eau stérile a été déposée sur une lame creuse ; puis quelques colonies, de la souche examinée, ont été dispersées dans cette goutte recouvert ensuite par une lamelle ; l'observation a été réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) puis à immersion (X100) (Singleton, 2005).

➤ **Coloration au bleu de méthylène**

La coloration au bleu de méthylène permet de renseigner sur la forme ; la taille et le mode de regroupement des bactéries en réalisant un frottis et le fixer, la lame a été recouverte de bleu de méthylène phéniqué, pendant 2 minutes, rincée à l'eau distillée, puis séchée entre 2 feuilles de papier Joseph et enfin Observée à l'objectif (X100) à immersion dans l'huile et à pleine lumière (Guiraud, 1998).

➤ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Pour ce faire un frottis a été fixé sur une lame qui a été inondée par le violet de Gentiane phéniqué pendant 1 minute, lavée à nouveau avec l'eau distillée, recouverte par une solution de Lugol pendant 1 minute, puis lavée à nouveau avec de l'eau distillée. Une décoloration a été effectuée en rinçant la lame avec l'alcool puis avec l'eau distillée. Enfin, la lame a été plongée dans la Fuchsine phéniquée pendant 1 minute, lavée à l'eau distillée, puis séchée en la tamponnant avec du papier Joseph. L'observation a été effectuée à l'objectif (X100) à immersion dans l'huile et à pleine lumière (Marchal *et al.*, 1988)

➤ **Coloration de spores**

Cette coloration permet la mise en évidence de la présence de spores au sein d'une cellule bactérienne. Après la réalisation d'un frottis, Ce dernier a été recouvert de vert de malachite ; chauffée pendant 10 minutes jusqu'à émission de vapeurs blanches sans faire. Après refroidissement et rinçage à l'eau distillée, une contre coloration a été effectuée en recouvrant la lame par la fuchsine pendant 2 minutes. Enfin, la lame a été lavée ; séchée et observée à l'objectif (X100).

2.4.2- Caractérisation biochimique

2.4.2.1- Mise en évidence des enzymes respiratoires

➤ Test catalase

Ce test facilite la détection de l'enzyme catalase bactérienne qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. Sur une lame, une goutte de peroxyde 3% a été placée, puis à l'aide d'une anse de platine stérile la bactérie T5 est déposée sur cette goutte (Reiner ,2016) (Figure 17).



Figure 17 Test catalase sur lame

➤ Test oxydase

Le test d'oxydase est basé sur la production de l'enzyme indophénol-oxydase par les organismes possédant le cytochrome C. À partir d'une culture jeuneensemencée sur milieu 863, une colonie est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur (Aslanzadeh, 2006) puis mise en contact avec un disque d'oxydase (Figure 18). Le virage, éventuel, de la couleur du disque a été observé au cours de la manipulation.

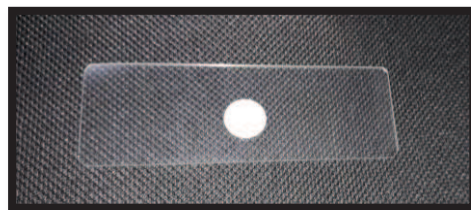


Figure 18 Test oxydase sur disque

➤ **Type respiratoire**

Ce test permet de déterminer le type respiratoire d'une bactérie, c'est-à-dire définir son comportement vis-à-vis du dioxygène. Certaines bactéries ne peuvent vivre qu'en son absence, d'autres qu'en sa présence, d'autres encore sont indifférentes. Pour ce faire, des tubes contenant la gélose viande foie ont été régénérés par un chauffage durant 30 minutes au bain-marie bouillon. L'ensemencement de la souche a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube, puis remontée de façon à ensemer uniformément le milieu sur toute la hauteur. Après refroidissement, le milieu est mis en incubation à 30 °C pendant 24 à 48 heures (Guiraud, 1998).

2.4.2.2- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires

2.4.2.2.1- Détermination de l'activité amylolytique

La mise en évidence de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase ou l'amyloglucosidase est réalisée par le dépôt de la colonie de l'isolat T5 sur gélose à amidon (Annexe1). Après incubation à 37°C, des observations régulières ont été effectuées chaque 24h pendant 72 heures en recouvrant la gélose par une solution de Lugol. L'absence de coloration autour de la culture indique la dégradation de l'amidon alors que les zones contenant l'amidon se colorent en brun (De vos *et al.*, 2009).

2.4.2.2.2- Détermination de l'activité protéolytique

➤ **Hydrolyse de la caséine**

Les protéases hydrolysent les protéines en petits fragments peptidique et acide aminés. L'hydrolyse de la caséine par les protéases, a été étudiée sur gélose au lait (Annexe1) à 37°C. Les résultats sont appréciés quotidiennement durant 72 heures. L'apparition d'une auréole claire autour de la culture indique la dégradation de la caséine (De vos *et al.*, 2009).

➤ **Lécithinases**

Pour réaliser ce test, le jaune d'œuf, composé de lécithine, de triglycérides et d'une lipoprotéine, a été utilisé comme substrat. La souche a été ensemencée sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (Annexe1). Après 24 à 72 heures d'incubation à 37°C,

l'apparition de zone claire autour de la culture indique que la souche possède la lécithinase (De Vos *et al.*, 2009).

2.4.2.3- Fermentation des sucres

➤ Test Mannitol mobilité

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Ce test permet de rechercher la fermentation du mannitol et la mobilité. Dans des tubes de mannitol-mobilité déjà préparés et à l'aide d'une pipette pasteur, une colonie de l'isolat a été ensemencée par piqure centrale, puis incubée à 37°C pendant 24h. La fermentation du mannitol se matérialise par un virage du milieu au jaune. Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement dans le long de la strie d'ensemencement (Gerhardt *et al.*, 1994).

2.4.3- Caractérisation de la souche par les galeries d'identification biochimique

La galerie API E 20 (Figure19), comportant 20 tests biochimiques, permet l'identification des bacilles Gram négatif de type entérobactéries (Holmes *et al.*, 1978). Les 12 premiers tests de la galerie API 20 E sont utilisés pour l'identification du genre *Bacillus* à Gram positif et autres genres proches (Logan et Berkeley, 2009). Par ailleurs, la galerie API 50 CH (Figure19) est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Les galeries sont inoculées par une suspension de l'isolat T5. Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans les capsules dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube, sans principe actif, sert de témoin négatif (Bio Mérieux, 2010).

L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant (Bio Mérieux, 2010).

2.4.3.1- Préparation des galeries

➤ Préparation de l'inoculum

Dans des ampoules d'API NaCl 0.85% medium (5mL), plusieurs colonies d'une culture de 18h ont été mises pour réaliser une suspension d'opacité égale à 2 de Mc Farland. De la même manière, l'inoculum de la galerie API 50 CH a été préparé dans une ampoule d'API 50 CHB/E medium.

➤ Inoculation et incubation des galeries

Les microtubes des plaques API 20 E et API 50 CH ont été inoculés avec l'API NaCl 0.85% medium et l'API 50 CHB/E medium respectivement, puis incubées à 30°C pendant 24-48h.

➤ Lecture des galeries

Pour la galerie API 20 E, l'addition des réactifs est effectuée au moment de la dernière lecture, la lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture (Annex 2) et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique et d'un logiciel d'identification, alors que pour la galerie API 50 CH l'identification a été faite à l'aide d'un logiciel d'identification sur web, par rapport aux résultats de l'acidification des milieux, repérés par un virage de couleur du rouge de phénol (indicateur de pH).

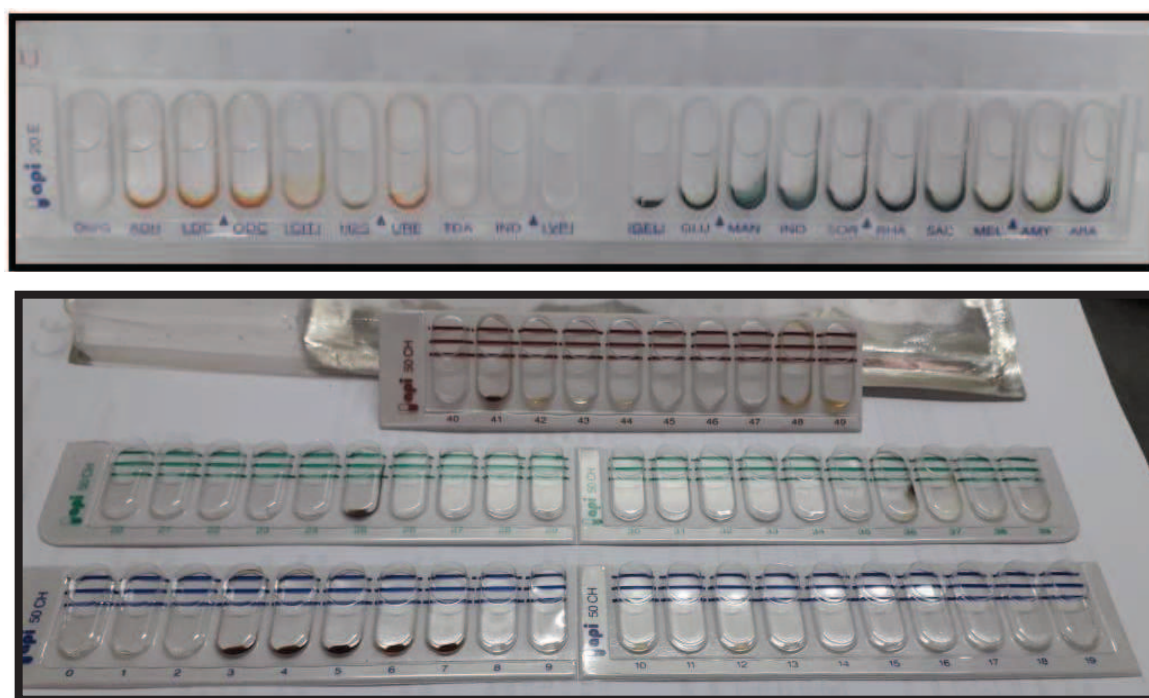


Figure 19 Galeries API 20 E et API 50 CH avant inoculation

2.4.4- Caractérisation physiologique de la souche T5

2.4.4.1- Test de croissance à différentes températures

La culture de la souche T5 a été incubée à différentes températures : 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C et 68°C sur milieu 863 pendant 24-48h. Des observations journalières ont été effectuées.

2.4.4.2- Test de thermo-résistance

D'après le protocole de (Guiraud, 2003) et avec légères modifications, la souche a été cultivée dans des tubes contenant du bouillon nutritif, incubés à 80°C pendant 10 minutes, refroidis puis réincubés à 37°C pendant 24h. La présence d'un trouble, indiquant une croissance bactérienne, a été suivi au fil du temps.

2.5-Mise en fermentation

Cette étape a été réalisée sur deux milieux ; l'un synthétique (863) et l'autre naturel (Annexe1) ; elle a pour but de suivre la production de la laccase microbienne, dans des conditions prédéfinies, en fonction du temps.

2.5.1- Fermentation en milieu synthétique

2.5.1.1- Préparation de l'inoculum

La souche sélectionnée T5 a été repiquée sur gélose 863, après incubation de 24h à 30°C, quelques colonies ont été prélevées et mises, aseptiquement, dans un erlenmeyer contenant 50 mL du milieu 863 liquide, puis il a été bien homogénéisé au vortex.

2.5.1.2- Inoculation

Des erlenmeyers de 100 mL contenant, chacun, 10 ml du milieu 863 liquide, ont été inoculés par 1 mL de l'inoculum préparé. Ils ont été placés dans un incubateur agité dont les conditions étaient : (150 rpm), 30°C, 6 jours (Figure 20).

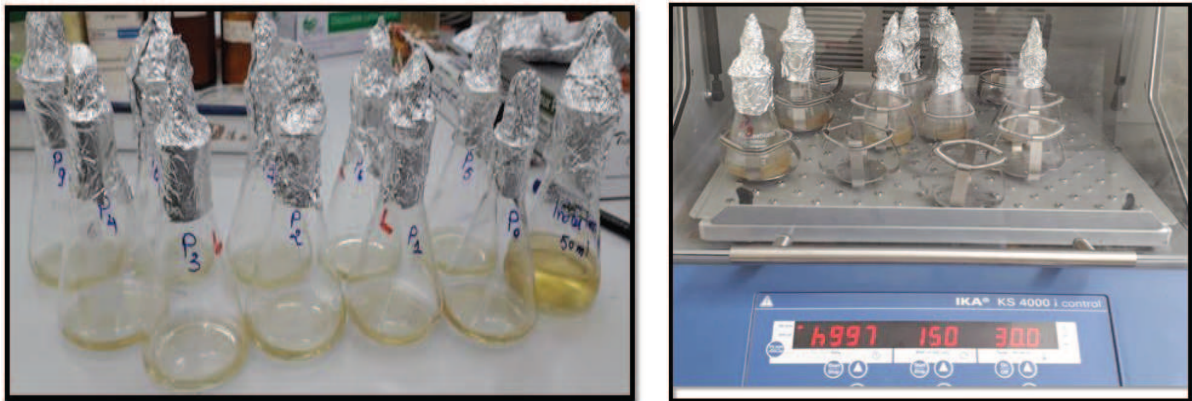


Figure 20 Inoculation et mise en culture en milieu synthétique

2.5.2- Fermentation en milieu naturel

12 flacons de 250 mL ont été préparés et autoclavés, chacun contenait le milieu naturel (Figure 21). De la même manière précédente, un inoculum a été préparé dans un tube contenant 20 mL d'eau distillée stérile, ensuite chaque flacon a été inoculé par 1.2 mL de cet inoculum et incubé à 30°C pendant 12 jours.

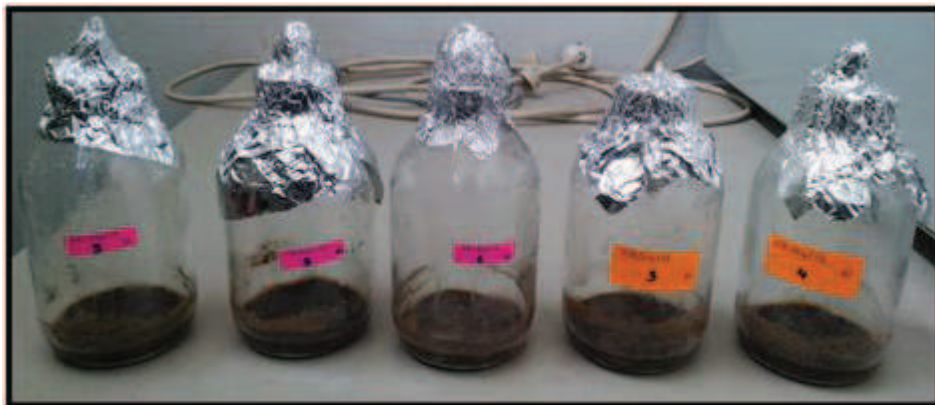


Figure 21 La fermentation en milieu naturel

2.6- Suivi de la fermentation

2.6.1- Prélèvements

2.6.1.1 Milieu synthétique

Le contenu d'un erlenmeyer a été prélevé, chaque heure, afin d'estimer et suivre la laccase produite, la biomasse et le pH du milieu. La pureté de la souche microbienne a été vérifiée sous microscope. Notant qu'on n'a pas pu compter le nombre de cellules sur une cellule de comptage Malassez, en raison de l'arrangement des cellules, qui étaient très attachées les unes aux autres, surtout en courtes et longues chainettes, avec des séparations, majoritairement, invisibles ; par conséquent, cela n'a pas permis un comptage exact.

2.6.1.2- Milieu naturel

Chaque 48h, deux flacons sont récupérés, dans lesquels 24mL d'eau distillée stérile a été ajouté, puis agités pendant 40 minutes. Une prise de la valeur du pH a été ainsi faite. Ensuite, le contenu de chaque flacon est filtré sous vide (Figure 22), puis centrifugé à une vitesse de 8000 rpm pendant 25 minutes à 4°C(Gomes *et al.*, 2009) ; les surnageants récupérés (Figure 23) ont été analysés par rapport à l'activité laccasique et leur contenu en polyphénols (Li *et al.*, 2007).



Figure 22 Filtration sous vide du milieu naturel

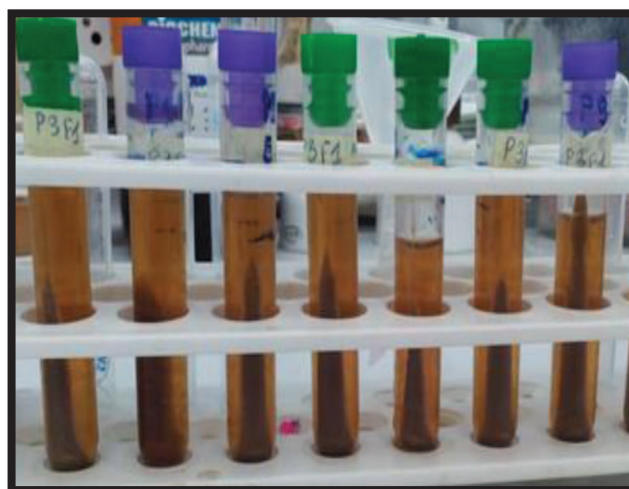


Figure 23 Échantillons issus de la fermentation en milieu naturel

2.6.2- Suivi du pH

La valeur du pH des d'inoculum ainsi celle des prélèvements du milieu synthétique ont été mesurées à l'aide d'un pH mètre ;

2.6.3- Suivi de la biomasse

Le suivi de la biomasse en milieu synthétique (863) a été réalisé en mesurant la concentration cellulaire de chaque prélèvement à 600nm au cours de la fermentation de 6 jours.

2.6.4- Suivi de l'activité laccasique

Le dosage de l'activité laccasique a été effectué par la détermination spectrophotométrique dans le visible des produits de l'oxydation d'un substrat phénolique. Pour ce faire, le gaïacol a été choisi comme substrat.

Le filtrat résultant de la filtration a servi d'extrait enzymatique dans cette étape.

L'activité enzymatique des laccases a été dosée en utilisant 0,1mL de l'extrait enzymatique additionné de 4,9mL du milieu réactionnel (Annexe1) et incubé à 37°C pendant 45minutes. Un blanc a été préparé en remplaçant l'échantillon par l'eau distillée. L'activité enzymatique est exprimée en unité internationale (UI), où 1(UI) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 microlitre du gaïacol par minute (Alberts *et al.*, 2009).

La variation de la densité optique à 450 nm a été suivie pendant 1minute, et l'activité enzymatique est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité enzymatique} = (\text{Abs en 1min}) * V / v. t. \epsilon \text{ (}\mu\text{mol. Min. L} - \mathbf{1}) \text{ Où :}$$

V : volume total ;

v : volume de l'échantillon ;

t : temps d'incubation ;

ϵ du gaïacol : 0.674 $\mu\text{mol/L}$.

2.6.5- Dosage des polyphénols totaux

La coloration produite par la réduction du réactif Follin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007), lors de l'oxydation des phénols (Ribéreau-Gayon, 1968) est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans la solution examinée. Un volume de 200 μL de l'échantillon (filtrat) a été pris, puis un volume de 1,5 mL du réactif Follin-Ciocalteu (dilué dix fois) a été ajouté. Après 4 mn, un volume de 1,5 mL de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 5% a été versé sur le mélange précédent (Figure 24). Les tubes ont été placés à l'obscurité pendant 2h.

Les résultats ont été lus sur spectrophotomètre à 750 nm, la concentration des polyphénols totaux est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-100µg/mL) (Annexe2).

La teneur en polyphénols totaux est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g extrait).

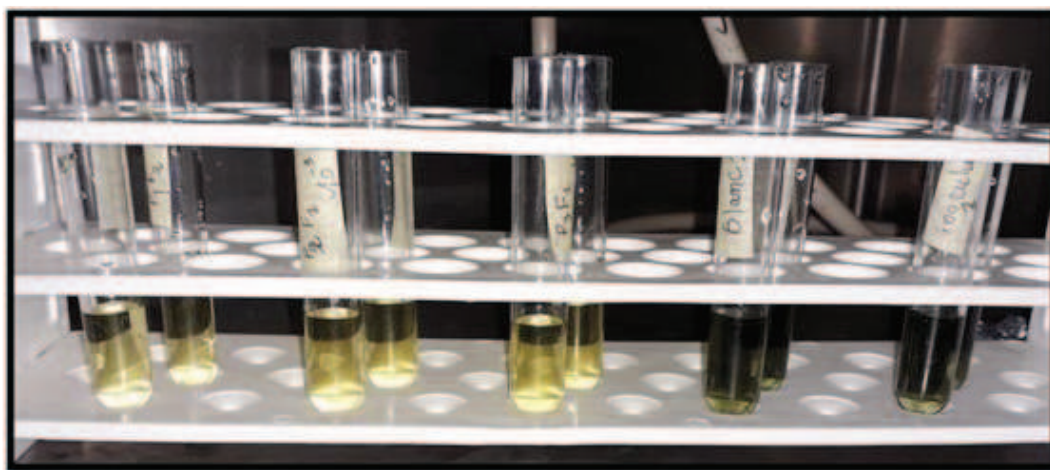


Figure 24 Dosage des polyphénols présents dans le milieu naturel

2.7-Application sur la laccase

2.7.1- Prétraitement de la biomasse

Pour tester l'effet de la laccase microbienne sur la lignine des palmes, les filtrats du milieu naturel qui ont montrés la présence d'une activité enzymatique maximale ont été utilisés comme milieu de culture gélosé pour tester la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, sur les éventuels sucres libérés, à 30°C pendant 72h. Un test de croissance, de la levure, sur un filtrat de palmes, non traité par la souche microbienne, a été réalisé pour servir de témoin.

2.7.2- Dégradation des colorants synthétiques

La dégradation des colorants par la laccase microbienne a été testée en utilisant quatre (4) colorants qui sont (RC), (VM), (BB) et (BM) sur des boîtes de Pétri, dont chacune contient 0.25g/l de chaque colorant (Annexe1), puis inoculées par la souche productrice de la laccase. Les

boites sont ensuite incubées à 30°C pendant 1-3 jours (Ahmed *et al.*, 2016). Le milieu LB (**Annexe1**) additionné de 0. 25g/L de chaque colorant et un autre milieu sans colorant (**Annexe1**) ont servis de témoins pour permettre la comparaison des résultats obtenus. Des observations quotidiennes ont été réalisées.

Résultats et discussion

3- Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'isolement et la sélection de souches microbiennes productrices de laccase à partir des insectes xylophages et la mise en application biotechnologique, de cette enzyme.

3.1- Echantillonnage

3.1.1- Les insectes

La collecte des insectes xylophages s'est déroulée à la région de "DJEBEL EL OUEHCHE" à Constantine, le choix de cet endroit est basé sur le fait d'être un lieu loin de la ville et donc moins exposé à la pollution ; ce qui permet, par conséquent, la collecte des insectes xylophages autochtones et d'éviter les insectes passagers. Les trous trouvés sur l'écorce des arbres du pin, indiquent effectivement la présence des insectes xylophages recherchés, car ces derniers possèdent un appareil buccal de type broyeur (Grassé, 1949). En effet, ce qui distingue ces insectes des autres est leur pouvoir de dégradation du bois et les matériaux lignocellulosiques. En outre, cette étape a permis la collecte d'autres insectes comme ; les larves de capricorne, des mille-pattes et des fourmis, etc.

3.2- Séparation et sélection d'insectes

Cette étape a permis la récupération du maximum des insectes collectés, surtout à partir des morceaux d'écorces et de la sciure de bois.

Parmi ces insectes, seulement deux types ont été choisis pour poursuivre notre étude en l'occurrence, les larves de capricorne et les termites ; ce choix est motivé, principalement, par leur présence massive sur le site en comparaison avec les autres insectes. Cette dominance peut être expliquée par le fait que les arbres du pin soit l'habitat principal de ses deux insectes. En effet, il est connu que les termites forment des tunnels dans le bois et qu'ils sont les principaux insectes décomposeurs de la matière organique (Bourguignon *et al.*, 2011). Ainsi, de nombreux arbres forestiers tropicaux, à un stade de développement avancés, subissent des attaques de termites dans le duramen le plus interne de leur tronc allant, parfois, jusqu'à créer une cheminée

sur toute la longueur de l'arbre. Il a été rapporté, que certaines espèces de termites peuvent même prendre pour habitat le centre du tronc (Hérault *et al.*, 2010). Le capricorne asiatique est un insecte xylophage originaire de Chine et de Corée (Lingafleter et Hoebeke, 2002). Cet insecte peut endommager un grand nombre d'espèces d'arbres à feuilles caduques (Sjöman *et al.*, 2014). En se développant, le capricorne passe par le stade larvaire qui creuse d'abord des galeries sous l'écorce avant de s'enfoncer plus profondément à l'intérieur du tronc (Keena et Moore, 2010).

Alors les termites, sont de très intéressants modèles d'insectes xylophages capables d'héberger des microorganismes producteurs d'enzymes ligninolytiques d'où l'intérêt de notre recherche. L'identification du termite sous microscope binoculaire (figure 25) et par des spécialistes en entomologie ont montrés qu'il s'agit, effectivement, du genre *Coptotermes formosanus* de la famille des *Rhinotermitidae* (tableau 4). En effet, les résultats de l'expérience de Itakura ont montré que la cellulose naturelle absorbée par ce termite est hydrolysée en oligosaccharides dans plusieurs régions du corps, ces molécules sont principalement hydrolysées en glucose dans l'intestin moyen. Le termite utilise, alors, le glucose formé comme source d'énergie et de carbone (Itakura, 1997). Dans le même concept, les travaux de Smith ont montré que cette espèce possède aussi une activité xylanatique (2009). Ces travaux ont bien mis en évidence la présence de ces deux enzymes pour autant les associer à des espèces microbiennes bien déterminées du symbiote du termite. En revanche, (Mathew *et al.*, 2011) ont montré que des isolats bactériens de ces termites présentent une activité laccasique.

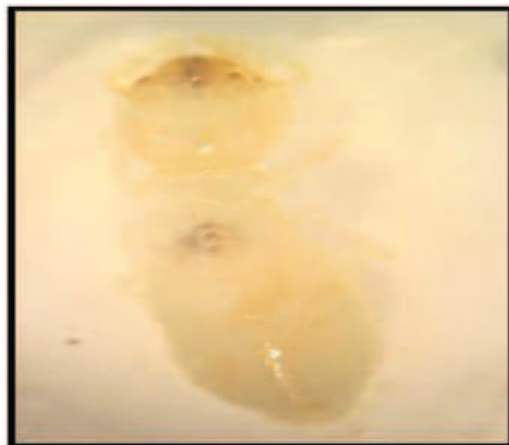


Figure 25 Le termite *Coptotermes formosanus* observé sous la loupe binoculaire

Tableau 4 Classification de *Coptotermes formosanus*

Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Classe	Insecta
Sous-classe	Pterygota
Infra-classe	Neoptera
Super-ordre	Polyneoptera
Ordre	Blattodea
Super-famille	Blattoidea
Famille	Rhinotermitidae
Sous-famille	Coptotermitinae
Genre	<i>Coptotermes</i>

3.2.1 - Isolement et purification des microorganismes

L'isolement de microorganismes a été réalisé sur deux milieux ; le milieu 863 qui est un milieu d'isolement non sélectif et le milieu ISP2. Le premier milieu a servi pour isoler le maximum de la flore microbienne des insectes, car, il permet le développement de la plupart des microorganismes non exigeants. Le deuxième milieu permet d'isoler les actinomycètes (Ara *et al*, 2012) car, d'après Watanabe (2003), certains actinomycètes isolés à partir de l'intestin des termites blanches ont pu se développer sur un milieu à base de lignine ce qui leur confère le pouvoir de dégradation de la matière lignocellulosique. De même, d'autres actinomycètes ont été isolés de l'intestin de fourmis blanches par Pasti et Belli (1985), possédaient l'activité cellulosique et ligninolytique (Pasti, 1990).

Sur milieu ISP₂, six (6) isolats fongiques ont été obtenus dont quatre (4) ont été obtenus à partir des termites et deux (2) à partir des larves de capricornes. Par ailleurs, aucune colonie d'actinomycètes n'a été obtenue. Cette absence peut être justifiée par le fait qu'ils soient inhibés par d'autres microorganismes. Selon les résultats de Watanabe (2003) la flore d'actinomycètes au sein des termites dépend de l'habitat de ce dernier, et même dans le même habitat la microflore se diffère d'un type taxonomique à un autre.

Sur le milieu 863, les bactéries avaient la dominance totale, vingt-cinq souches bactériennes ont été isolées, réparties comme suit ; treize (13) isolats obtenus à partir des termites et douze (12) à partir des larves de capricorne. Plusieurs travaux ont mis en évidence la présence des bactéries dans le tube digestif des termites, à titre d'exemple, 23 souches bactériennes ont été isolées à partir du termite *Z. angusticollis* (Wenzel, 2002). Il a été montré, aussi, que la diversité microbienne du système digestif des larves de capricorne, leur permet d'accroître leur pouvoir de dégradation de certains composants du bois (Scully *et al.*, 2014). Les résultats de cette étape sont récapitulés dans le tableau 5.

Tableau 5 Isolement et purification des isolats microbiens issus des termites et des larves de capricornes

	Termites	Larves capricornes	Total
Isolats fongiques	04	02	06
Isolats bactériens	13	12	25
Total d'isolats	17	14	31

3.3- Etude de l'activité enzymatique de la souche sélectionnée

3.3.1- Mise en évidence de l'activité laccasique

L'activité laccasique des isolats fongiques et bactériens a été mise en évidence sur milieu LMBG contenant 0.02% du gaïacol. Ce dernier, est un monométhoxybenzène constitué de phénol avec un substituant méthoxy en position ortho, utilisé comme substrat pour détecter l'activité laccasique (Sandhu et Arora, 1984). Après 9 jours d'incubation à 30°C, une couleur rouge brunâtre, à l'emplacement des colonies de l'isolat bactérien T5, isolé à partir des termites, a été observée (figure 26). Cette couleur indique l'oxydation du gaïacol par la laccase (Mabrouk *et al.*, 2010 ; Ang *et al.*, 2010). En effet, Noratiqah (2016), a isolé deux bactéries, *Bacillus sp.*, et *Brevibacillus sp.*, productrices de la laccase.

Le reste des microorganismes isolés, y compris les champignons, n'ont pas développé une activité laccasique positive, sachant que dans la nature, plutôt, les champignons qui sont, généralement, les producteurs potentiels de cette enzyme.

La bactérie T5, dotée de cette propriété est supposée capable de survivre sur des milieux complexes à base de biomasse lignocellulosique, elle a été, de ce fait, sélectionnée pour la suite de cette étude.

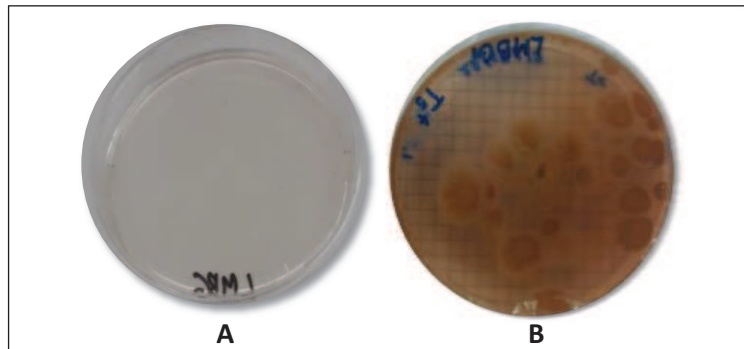


Figure 26 Mise en évidence de la laccase sur milieu LMBG

A : Témoin ; B : milieu inoculé par la souche T5

3.3.2- Mise en évidence de l'activité cellulosique

La coloration du milieu CMC,ensemencé par l'isolat T5, a laissé apparaitre, une zone claire modérée de 11mm autour de la colonie (figure 27). La carboxyméthylcellulose (CMC) est un substrat de l'endoglucanase et β -glucosidase. Cet essai est un bon indicateur de la capacité cellulosique des microorganismes. En effet, la présence de colorant rouge Congo permet de différencier entre la couleur rouge intact de la CMC signifiant l'absence de l'enzyme et la zone claire du substrat susceptible être dégradé par la cellulase de l'isolat testé (Buswell et Chang 1994 ; Buswell *et al.*, 1996 ; Pointing *et al.*, 1999). Plusieurs travaux ont montré la présence de cette enzyme chez les termites et certains ont précisé que cette enzyme est secrétée par la microflore du tube digestif de ceux-ci. Andri en 2015, a montré, par le même test, que 4 isolats bactériens du termites *Macrotermes gilvus* étaient dotés d'une activité cellulosique. Cette enzyme permet à la souche T5, de dégrader la cellulose en sucres simples (glucose) et s'en servir pour sa croissance.

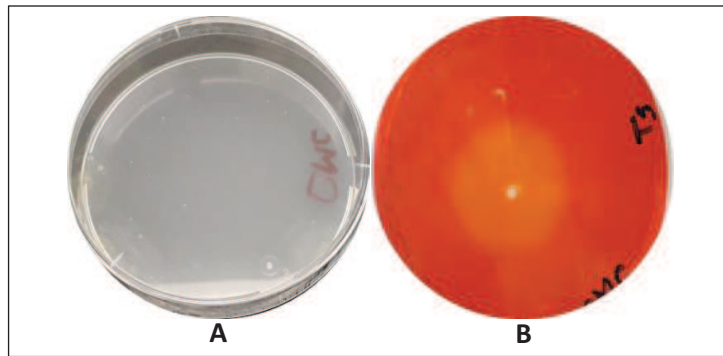


Figure 27 Mise en évidence de la cellulase sur milieu CMC
 A : Témoin ; B : milieu inoculé par la souche T5

3.3.3- Mise en évidence de l'activité xylanatique

La coloration avec le Lugol du milieu XBM ensemencé par l'isolat T5 a permis la distinction d'une zone jaune autour de la colonie contre une couleur bleue/violette pour le reste du milieu. Cette couleur jaunâtre représente une zone de dégradation de xylane, d'un diamètre de 1.7 cm (Figure28). Ce résultat est conforme avec ceux de (Prillinger *et al*, 1996 ; Schater *et al*, 1996 ; Wenzel *et al*, 2002) qui ont pu isoler quelques bactéries xylanase positif à partir des termites, parmi lesquelles *Bacillus thermoalkalophilus* qui a montré une bonne activité xylanatique sur milieu à base de déchets agricoles (Sridevi, 1990). Cette enzyme permet à la souche T5 de dégrader l'hémicellulose en sucres et de ce fait, elle aurait la capacité d'agir sur la totalité de la biomasse lignocellulosique, avec ces trois polymères principaux, qui sont la lignine, la cellulose et l'hémicellulose, dans des conditions optimisées.

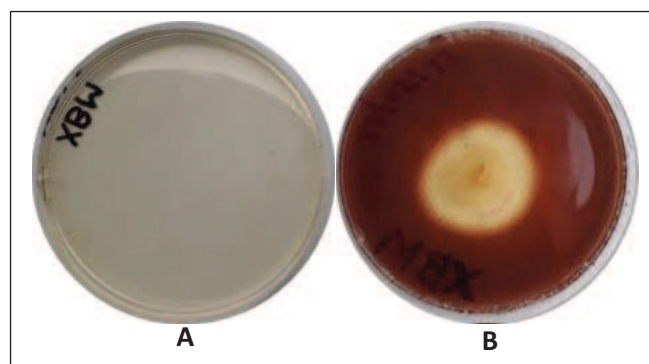


Figure 28 Mise en évidence de l'activité xylanatique sur milieu XBM
 A : Témoin ; B : milieu inoculé par la souche T5

3.4- Identification préliminaire de l'isolat microbien sélectionné

3.4-1. Caractérisation morphologique

3.4.1.1- Aspect macroscopique des colonies

Les colonies de l'isolat T5 développées sur milieu 863 (figure29), sont de petite taille, rondes, plates, opaques, non visqueuses, lisses, avec contour irrégulier, de couleur crème à beige avec présence d'odeur. Cette observation a permis, immédiatement, de prédire qu'il s'agit bien d'une souche bactérienne.

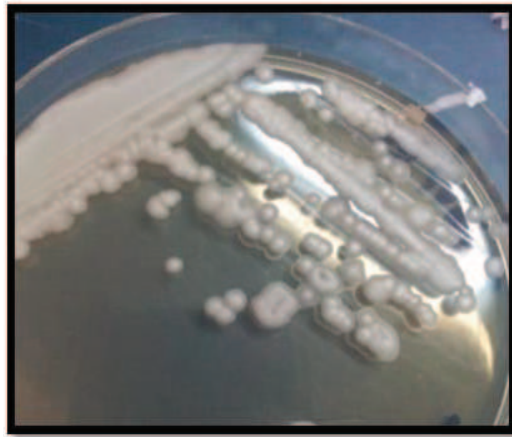


Figure 29 Aspect macroscopique de l'isolat T5

3.4.1.2- Aspect microscopique des colonies

➤ Observation à l'état frais

L'observation microscopique, de l'isolat T5, sur lame creuse à l'état frais a permis d'identifier un autre critère concernant l'isolat qui est la mobilité. L'isolat T5 apparaît sous forme de bacilles fins très mobiles. Généralement, les bacilles possédant cette caractéristique sont du genre *Bacillus*.

➤ **Coloration au bleu de méthylène**

Ce test a permis de renseigner sur la forme, la taille et le mode de regroupement de l'isolat T5. Le résultat obtenu après observation microscopique (Figure30) a révélé des bacilles droits à bouts arrondis, isolées ou regroupées en deux ou en chaînette.

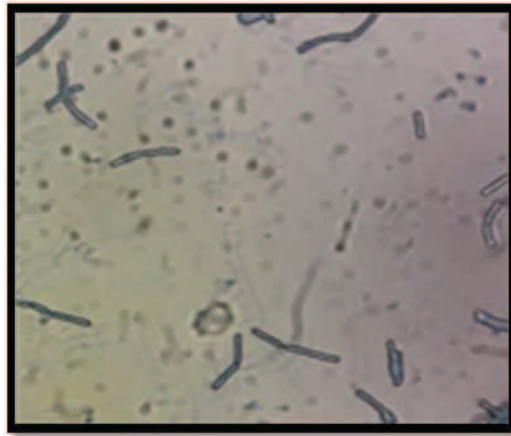


Figure 30 Coloration de l'isolat T5 au bleu de méthylène

➤ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram de l'isolat T5 a révélé que cette dernière est à Gram positif, elle a apparue, sous microscope, sous forme de bacilles droits bleu violacés (figure 31). Dans l'ensemble, les bactéries à Gram positif ont une paroi de peptidoglycane épaisse qui permet la rétention du colorant Violet de Gentiane qui apparaissent en violet sous le microscope.

Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont de grands bâtonnets avec une ciliature pérित्रiche, présentant un Gram positif (Pervot, 1977).

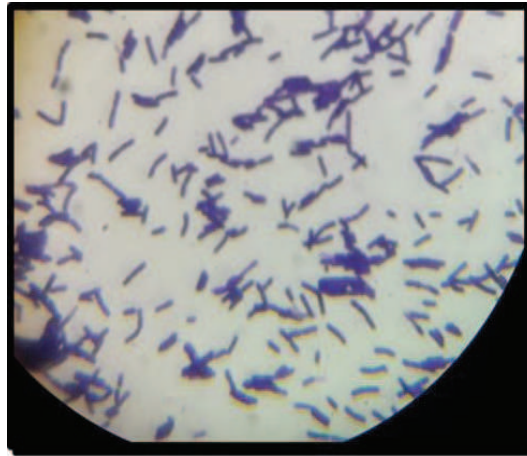


Figure 31 Aspect microscopique de l'isolat T5 après coloration de Gram (Gx100)

➤ Coloration de spores

Cette coloration permet de mettre en évidence la présence ou l'absence de spores au sein des cellules bactériennes. Les résultats obtenus révèlent la présence d'une coloration verte autour des cellules de la souche T5 ce qui explique qu'elle possède des endospores ovales centrale ou sub-terminale non déformante, elle est donc une souche sporulante. D'après (Ponce *et al.*, 2008) la sporulation est un processus naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries telles que les espèces de *Bacillus* ; c'est un mécanisme de survie, généralement, considéré comme un processus qui se produit lorsque l'organisme est en situation de stress. La plupart des travaux effectués sur les spores ont porté sur les spores des bacilles mésophiles, *B. cereus* et *B. subtilis* (Barill *et al.*, 2012). Cette caractéristique représente un avantage biotechnologique pour la souche T5 en termes de viabilité et de stockage. Les résultats de l'aspect microscopique des colonies sont conformes à ceux développés par le genre *Bacillus* et autres genres proches, notamment les bacilles décrits dans la littérature (De VOS *et al.*, 2009 ; Madigan *et al.*, 2006).

3.4.2- Caractérisation biochimique

3.4.2.1- Mise en évidence des enzymes respiratoires

➤ **Test catalase**

Les bactéries possédant la catalase sont capables de décomposer le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en eau (H₂O) et en oxygène (O₂). Une fois que le peroxyde d'hydrogène est mis en contact avec les colonies de la souche T5, l'apparition de bulles a été observée sur la lame (tableau 5). En effet, c'est l'oxygène libéré, par l'action de la catalase, qui a provoqué ce phénomène. Ce critère est lié entre autres aux *Bacillus*.

➤ **Test oxydase**


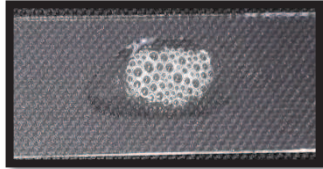

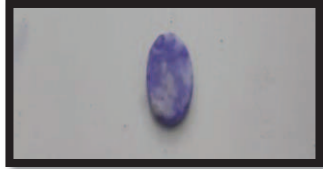

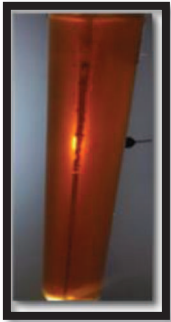
Ce test a été réalisé pour détecter l'éventuelle production de l'enzyme indophénol-oxydase par l'isolat T5. Le virage de la couleur du disque oxydase, mis en contact avec une colonie de T5, vers le bleu violet (tableau 6), indique l'oxydation du réactif phénylène diamine pour former un composé coloré en violet ce qui nous informe que l'isolat est oxydase positive. Ce résultat est conforme à celui de (Murugesan et Vembu, 2016) qui ont isolée des souche de *Bacillus* a oxydase positif.

➤ **Type respiratoire**

L'étude du type respiratoire de l'isolat T5 sur le milieu viande-foie a montré la présence d'une croissance tout au long du tube (tableau 6), ce qui annonce que la souche T5 est une bactérie aerobie-anaerobie facultative.

Les résultats obtenus lors de la mise en évidence des enzymes respiratoires sont conformes avec les caractéristiques du genre *Bacillus* comme : *Bacillus cereus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus coagulans* et *Bacillus subtilis* (Abe *et al.*, 2018).

Tableau 6 Résultats de la mise en évidence des enzymes respiratoires de l'isolat T5

Test	Témoin	Résultat
Test Catalase		
Test oxydase		
Type respiratoire		

3.4.2.2- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires

3.4.2.2.1- Détermination de l'activité amylolytique

L'hydrolyse de l'amidon est révélée lors de l'ajout du Lugol sur le milieu de culture solide à base d'amidon, l'apparition d'une zone claire autour des colonies de la souche T5 représente, en fait, une zone de dégradation du substrat (tableau 7).

3.4.2.2.2- Détermination de l'activité protéolytique

➤ Hydrolyse de la caséine

La dégradation de la caséine par l'isolat étudiée est révélée par l'apparition d'un halo clair autour des stries de la souche T5 (tableau 7) sur un milieu à base de lait, cela indique que la bactérie T5 possède la caseinase.

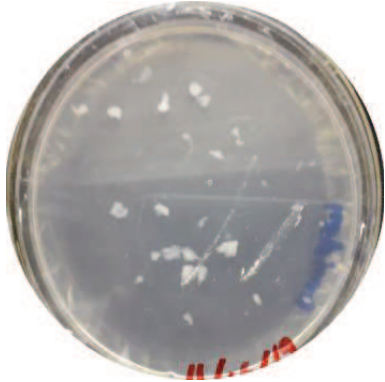





➤ **Lécithinases**

L'absence d'une zone claire visible autour de la colonie de la souche T5 (tableau 7) développée sur le milieu gélose à l'œuf ; indique qu'elle ne possède pas la lécithinase.

Le profil des activités amylolytiques et protéolytiques de l'isolat T5 a montré que cette dernière a la capacité d'hydrolyser l'amidon et la caséine par l'amylase et la protéase, par contre, elle ne possède pas la lécithinase.

Ces résultats corroborent ceux obtenus par Sarethy *et al.*, (2011), qui ont montré que de nombreuses espèces du genre *Bacillus* sont capables d'exprimer une large gamme d'enzymes extracellulaires telle que les protéases, les lipases et les amylases. Par ailleurs, Horikoshi, (1971) a aussi, rapporté que les bactéries du genre *Bacillus sp.* Sont dotées d'un système enzymatique, permettant la production des protéases. Ce qui nous laisse toujours orienter vers le genre *Bacillus*, en ce qui concerne la souche T5.

Tableau 7 Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires de l'isolat T5

Test	Témoin	Résultat
Hydrolyse de l'amidon		
Hydrolyse de la caséine		
Lécithinase		

3.4.2.3- Fermentation des sucres

➤ **Test Mannitol mobilité**

La mise en évidence de la mobilité de l'isolat T5 sur le milieu de culture mannitol-mobilité, a été prouvée par son diffusion sur toute la gélose (figure 32). Par contre la fermentation du mannitol n'a pas eu lieu, la couleur rouge du milieu n'a pas viré vers le jaune, ce qui signifie qu'il n'a subi aucune acidification due, essentiellement, à une éventuelle fermentation du mannitol.

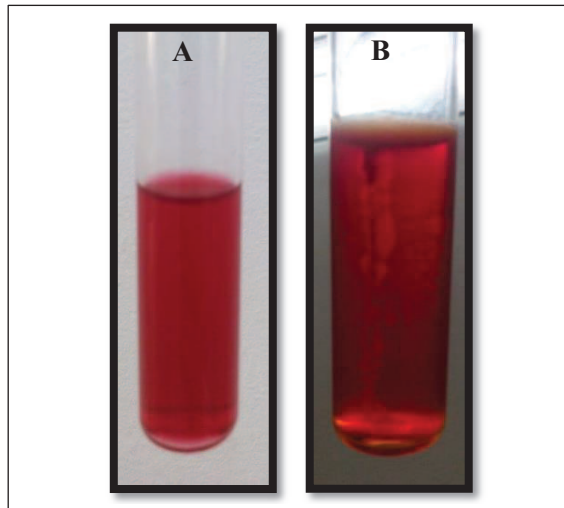


Figure 32 résultats du test mannitol-mobilité

A : Témoin ; B : milieu après développement de la souche T5

3.4.3- Caractérisation de la souche par les galeries d'identification biochimique

Les galerie 50 CH et API 20E sont des kit miniaturisés et standardisés contenant des tests biochimiques conventionnels qui permettent une rapide identification et différenciation entre plusieurs type d'espèces de *Bacillus* (Logan *et al.*, 1979).

Les résultats obtenus par la galerie API 20 E (figure33) à partir des 12 premiers tests, et la galerie 50 CH (figure 33) ont permis le rassemblement des résultats montrés dans le tableau (8), ces derniers et à l'aide du logiciel web (Lab UPMB) et le manuel de Bergey's (Brenner *et al.*, 2005) laissent supposer que l'isolat T5 s'agit de *Bacillus firmus*(figure34). Plusieurs études ont caractérisé cette espèce dans le traitement des effluents industriels de l'industrie du papier. (Min-Jen, 2001).



Figure 33 Galeries API 20 E et API 50 CH après inoculation par l'isolat T5

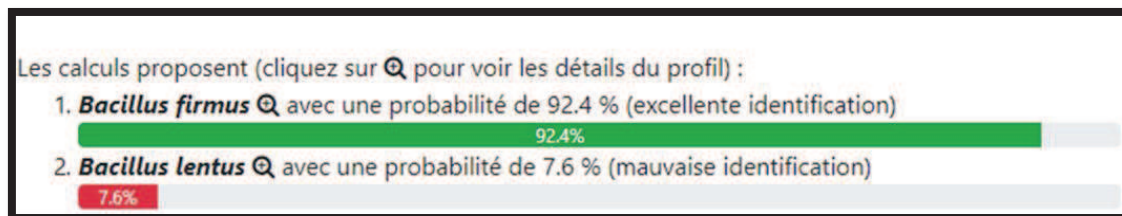


Figure 34 Résultat d'identification de l'isolat T5 par le logiciel (Lab UPMB)

Tableau 8 : Résultats des tests d'identification biochimique de l'isolat T5 par les galeries API 20E et CH 50

Test	Résultat	Test	Résultat	Test	Résultat
ONPG	-	D-Mannose	-	Glycogène	+
ADH	+	L-Sorbose	-	Xylitol	-
LDC	+	L-Rhamnose	+	Gentiobiose	-
ODC	+	Dulcitol	-	D-Turanose	-
CIT	-	Inositol	-	D-Lyxose	-
H2S	-	D-Mannitol	+	D-Tagatose	-
URE	-	D-Sorbitol	-	D-Fucose	-
TDA	-	MDM	-	D-Fucose	-
IND	-	MDG	-	D-Arabitol	-
VP	-	NAG	+	L-Arabitol	-
GEL	-	Amygdaline	-	GNT	-
Glucose	-	Arbutine	-	2KG	-
Glycerol	+	Esculine	+	5KG	-
Erythritol	-	Salicine	+		
D-Arabinose	-	D-Cellobiose	-		
L-Arabinose	+	D-Maltose	+		
D-Ribose	-	D-Lactose	-		
D-Xylose	-	D-Melibiose	-		
L-Xylose	-	D-Saccharose	-		
D-Adonitol	-	D-Trehalose	+		
MDX	-	Inuline	-		
D-Galactose	-	D-Mélézitose	-		
D-Glucose	-	D-Raffinose	+		
D-Fructose	-	Amidon	+		



Tests de la galerie API 20E



Tests de la galerie CH 50

3.4.4- Caractérisation physiologique de l'isolat T5

3.4.4.1- Test de croissance à différentes températures

Ce test a été réalisé sur milieu 863 à différentes températures 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C et 68°C afin de déterminer les préférences thermiques de l'isolat. Les résultats obtenus (tableau 8) montrent que cet isolat n'a pas pu se développer à des températures de 4°C et 10°C, par conséquent, il n'est pas psychrophile. Des espèces psychrophiles, comme *Bacillus psychrophilus*, poussent à des températures allant de 0°C jusqu'à 15°C. Le même comportement a été noté dans des conditions de 50 et 68°C, ce qui affirme que l'isolat n'est pas, non plus, thermophile. D'après la littérature consultée, les espèces de *Bacillus* thermophiles ne poussent qu'à des températures élevées (Environ 50°C à 68°C) (Flint *et al.*, 2001 ; Ronimus *et al.*, 2003) comme le *Geobacillus stearothermophilus*. Cependant, une légère croissance, avec quelques petites colonies, a été observée à 20 et à 45°C, cependant, une très bonne croissance a été remarquée à 30°C et à 37°C. En effet, les mésophiles comme *Bacillus cereus* se développent entre 20°C et 45°C avec un optimum de 37°C. Les résultats obtenus montrent que l'isolat T5 appartient au groupe des mésophiles.

Tableau 9 Test de croissance de l'isolat T5 à différentes températures

Température (°C)	Croissance
4	-
10	-
20	++
30	++++
37	++++
45	++
50	-
68	-

++ : Légère croissance bactérienne / ++++ : Bonne croissance bactérienne / - : Pas de croissance bactérienne.

3.4.4.2- Test de thermo-résistance

Ce test est composé de deux étapes, la première consiste à incuber des tubes inoculés par l'isolat à 80°C pendant 10 minutes, et la deuxième était de réincuber cette même culture, après refroidissement, à 37°C. Les résultats obtenus ont montré la présence d'un trouble qui s'explique par la capacité de la souche T5 à se développer après le passage à 80°C, ce qui nous a permis de conclure qu'elle est thermorésistante. D'après (Cortezzo et Setlow, 2005 ; Setlow, 2006) ce sont les spores du genre *Bacillus*, qui peuvent être extrêmement résistantes à la chaleur, aux radiations et aux agents chimiques.

3.5- Suivi de la fermentation

3.5.1- Milieu synthétique

Cette étape consiste à déterminer la cinétique de la croissance de l'isolat en milieu liquide (863) et la production de la laccase. Pour ce faire, trois (3) paramètres ont été suivis : la biomasse, le pH et l'activité laccasique pendant 6 jours de fermentation.

3.5.1.1- Suivi du pH

La variation du pH dû à la fermentation de l'isolat dans le milieu synthétique sont représentés dans la figure (35). En considérant le pH initial (6.2) une diminution a été d'abord, observée, durant les premières 7 heures de fermentation en enregistrant la valeur de 4.8, ensuite une augmentation remarquable (9) est notée après cette période et jusqu'à la fin de la fermentation. D'après Speck (1973) des métabolites sécrétés par *Bacillus* pendant sa croissance tels que : pyruvate, acétate provoquent l'acidification du milieu ; Par contre son augmentation est due aux produits de la lyse cellulaire qui commencent à se trouver dans le milieu dès le début de la phase stationnaire comme la laccase (Morozova *et al.*, 2007). Ce pH basique permet, en effet, d'avoir une activité laccasique chez le genre *Bacillus* (Ruijssenaars, 2004 ; Machczynski, 2004)

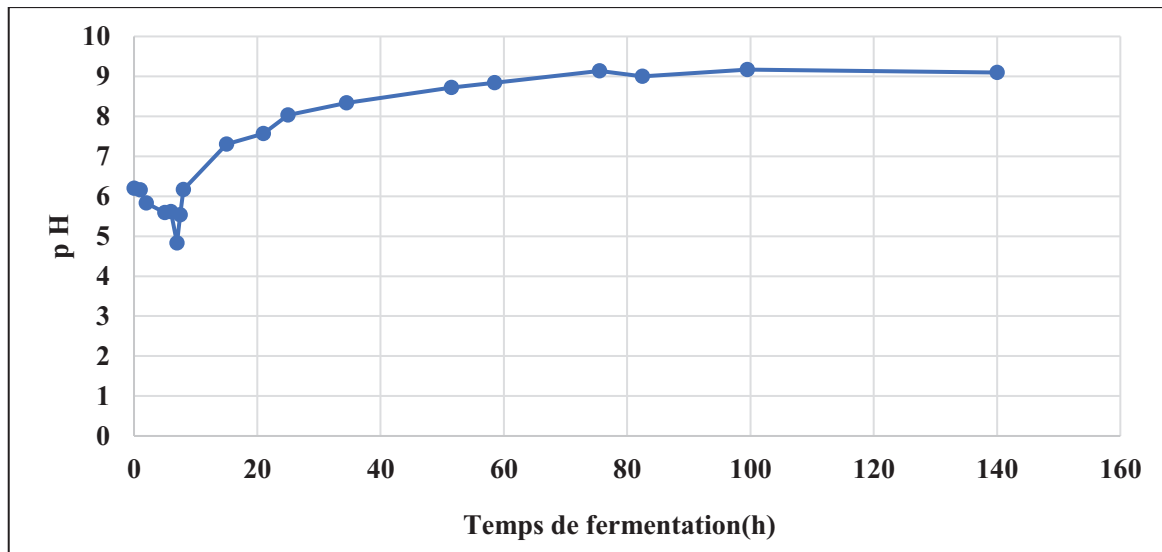


Figure 35 Suivi de la variation du pH de la fermentation en milieu synthétique en fonction du temps

3.5.1.2- Biomasse

Le suivi de la biomasse en milieu synthétique (863) est réalisé en mesurant la concentration cellulaire de chaque prélèvement au cours de la fermentation de 6 jours. La croissance de l'isolat T5 (figure 36), a été suivie tout au long de la fermentation en mesurant la densité optique à 600 nm sous forme : $\ln(\text{Concentration (cellule/ml)}) = f(t)$. D'une première vue, la phase de latence est absente à cause de l'utilisation d'une préculture. La phase exponentielle a duré environ 4h, suivie, d'une phase de ralentissement qui a duré 3h. La biomasse est représentée par des cellules majoritairement viables, un épuisement du milieu de culture, une accumulation des déchets et un début de lyse des bactérienne. La phase stationnaire a été maintenue pendant (138h) où les bactéries qui se multiplient compensent celles qui meurent.

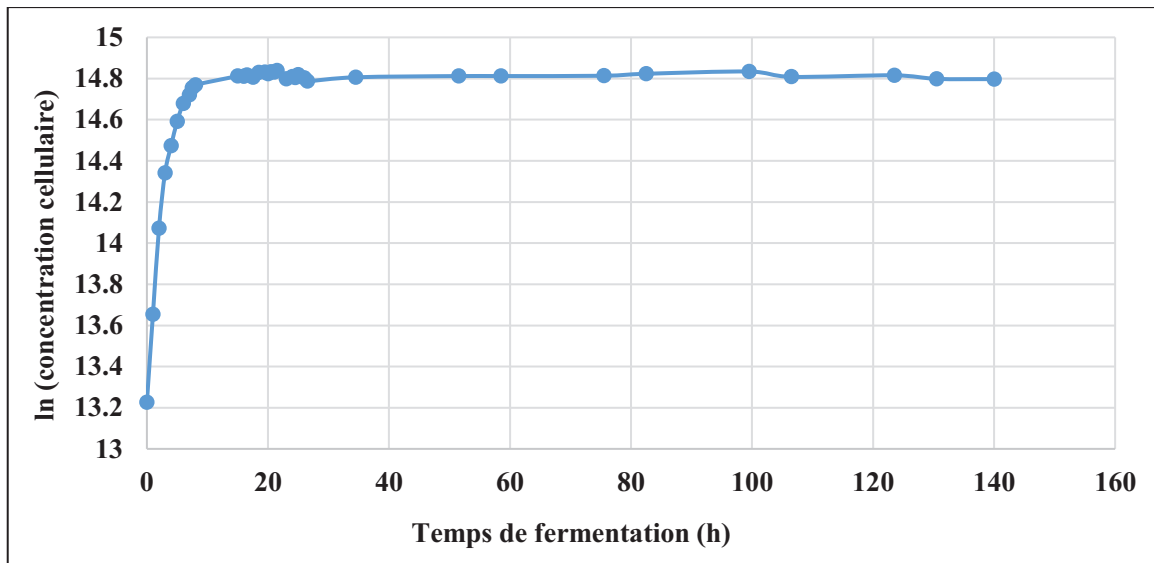


Figure 36 Suivi de la concentration cellulaire de la fermentation en milieu synthétique

3.5.1.3- Suivi de l'activité laccasique

Cette étape a pour but de tester la capacité de l'isolat à produire la laccase sur un milieu liquide ordinaire (863). Un prélèvement a été effectué chaque 24 h afin d'estimer l'activité enzymatique laccasique en utilisant le gaïacol comme substrat pour la révélation.

Les résultats du suivi obtenus (figure 37) montrent une augmentation progressive de l'activité dès les premières heures de fermentation jusqu'à atteindre une valeur maximale de 812 UI/L après 114h, dans un milieu caractérisé principalement par un pH alcalin (pH = 9). En effet, la laccase de *Streptomyces sviveus*, dans les mêmes conditions (pH=9) a montré une activité laccasique maximale (Matthias et Vlada, 2012). Les enzymes ligninolytiques ont principalement été décrites comme étant extracellulaires mais il y a des évidences dans la littérature sur l'existence des laccases intracellulaires chez les champignons de la pourriture blanche (Schlosser *et al.*, 1997). La production de la laccase par l'isolat T5 est jugé intéressante en comparaison avec les travaux de Murugesan et Vembu (2016) sur des genres de *Bacillus*, et qui ont obtenu une activité maximal de 490 UI/L dans un milieu optimisé. En outre, il a été constaté que l'activité laccasique est fortement liée à la biomasse cellulaire ce qui lui procure l'aspect d'un métabolite primaire. Ces constatations confèrent à cet isolat la caractéristique d'une souche d'intérêt.

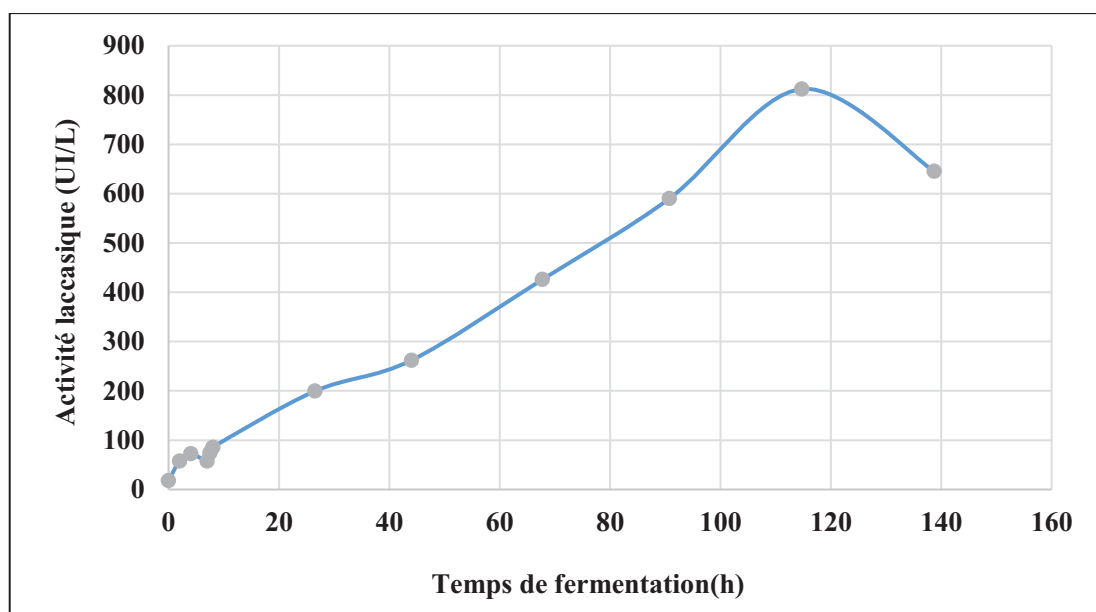


Figure 37 : Suivi de production de la laccase par l'isolat T5 en milieu synthétique (863)

3.5.2- Milieu naturel

3.5.2.1- Suivi de l'activité laccasique

La laccase est connue par sa capacité à oxyder des composés phénoliques et non-phénoliques de la lignine ce qui explique la persistance de cette substance dans la nature (Rodriguez *et al.*, 2006). Ce phénomène nous a incité à se focaliser dans ce travail à produire de la laccase microbienne sur milieu à base de palmes sèches. Pour ce faire, une fermentation de 12 jours a été lancée par l'isolat T5.

Les résultats de suivi de la laccase, au cours de la fermentation en milieu naturel, sont montrés par la figure (38). Il a été constaté que l'isolat développe une capacité à produire cette enzyme sur un milieu naturel complexe. L'activité laccasique augmente dès les premières heures de fermentation jusqu'à atteindre une activité spécifique maximale de 400UI/L après six jours de fermentation. Cette activité jugée intéressante mais demeure moindre en comparaison à l'activité de la même souche sur le milieu synthétique. En milieu naturel, les sucres sont piégés dans la matière lignocellulosique, ce qui nécessite un temps supplémentaire pour la dépolymérisation de la lignine et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (cellulase et xylanases). Selon Sandhi (1985) l'activité laccasique dans un milieu à base de malt était plus élevée par rapport à celle obtenue dans un milieu à base de la lignine. A la fin de la fermentation l'activité

laccasique a démunie régressivement pour atteindre 249UI/L. Les travaux de Benhassine en 2017 sur milieu à base de déchets de citrouille ont montré que le profil cinétique de l'activité laccasique chez *Trametes versicolor* a été détectée à partir du deuxième jour avec (154U/L) et a progressé jusqu'à atteindre son maximum après dix jours de fermentation (350U/L), après cette période l'activité enzymatique a diminuée ce qui a été constaté chez notre isolat T5. Cette régression peut être due au système de rétroinhibition par le phénomène d'isoenzymes, où l'enzyme se trouve sous plusieurs formes, dont chacune est sensible à un substrat donné (Scriban, 1998). De plus, il est connu, que la biomasse sécrétée, en fin de croissance, des métabolites, tels que les protéases, peuvent agir sur la laccase ou sur son isoenzyme (Gys, 2007).

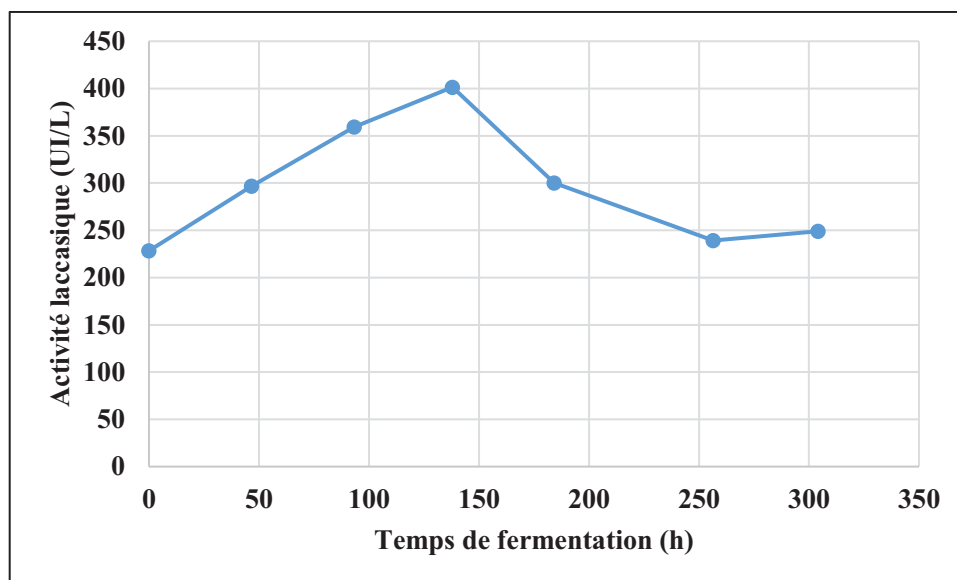


Figure 38 Evolution de l'activité laccasique en milieu à base de palmes sèches au fil du temps

3.5.2.2- Dosage des polyphénols totaux

Afin de suivre la dépolymérisation de la lignine qui est un polyphénol très complexe, un dosage des polyphénols totaux solubles dans le milieu à 760 nm a été fait selon la méthode de dosage Follin-Ciocalteu (Li et al., 2007), ce réactif est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes de bleu de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). Ces derniers

présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Une courbe d'étalonnage a été construite pour cet objectif (Annexe 2) en utilisant de l'acide gallique pour son pouvoir de déduire la concentration en polyphénols totaux dans un échantillon.

Les résultats montrés dans la figure (39) montrent l'évolution de la concentration des polyphénols dans le milieu au cours de la fermentation ; Les polyphénols détectés dans le milieu augmentent de 0.8 à presque 0.9 eq g d'AG/L pendant la période de fermentation. Cette augmentation peut être justifiée, par l'action de la laccase sur les chaînes des polyphénols constituant la lignine, car cette augmentation est corrélée avec l'activité laccasique. Il est à signaler que le test de dégradation des lignines par la laccase demeure un test qualitatif plutôt que quantitatif. Cette variation, des taux des polyphénols, au cours de la fermentation, nous indique une activité laccasique, ciblant les chaînes phénoliques de la lignine.

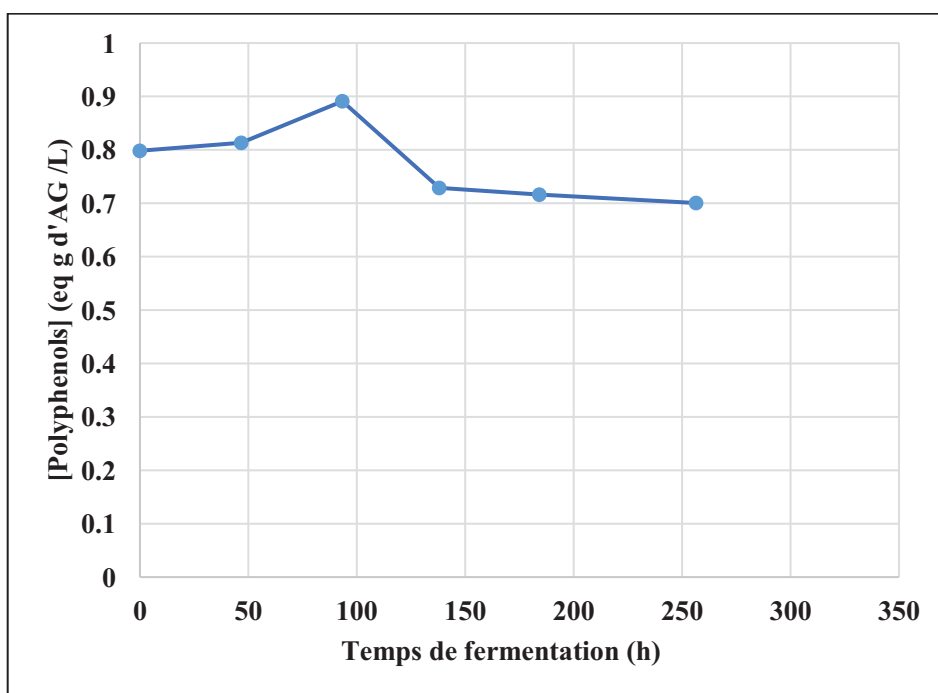


Figure 39 Dosage des polyphénols du milieu à base de palmes sèches

3.6- Application sur la laccase

3.6.1- Prétraitement de la biomasse

Cette expérience a été réalisée afin de confirmer la dépolymérisation de la matière lignocellulosique des palmes sèches par l'isolat T5 en faisant croître la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* sur différents filtrats du milieu de la fermentation. Pour ce faire, les filtrats (P2), (P3) et (P6) obtenus après une fermentation de 93h, 138h et 12 jours respectivement ont été choisis. Le P2 et le P3 ont montré une bonne activité laccasique de 359UI/L et 401UI/L, alors que le dernier prélèvement P6 a été choisi parce qu'il contenait, éventuellement, tous les produits de dégradation issus des réactions du pool enzymatique que possédait l'isolat T5, essentiellement, les sucres simples : des pentoses (xylose et arabinose), des disaccharides (cellobiose) et du glucose (Ogier *et al.*, 1999). Notant qu'un filtrat (P0) de palmes sèche, non traité par la souche T5, a été réalisé pour servir de témoin.

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* et d'après Kiiskinen et Saloheimo (2004) ne possède aucun des enzymes lignocellulolytiques, entre autres, la laccase, la cellulase et l'hémicellulase, ce qui justifie son choix.

Les résultats obtenus (figure 40) après 6 jours d'incubation à 30°C ont montrés que pour le filtrat (P0) il n'y a eu pas de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*; Ce résultat peut être expliqué par la présence de la matière lignocellulosique complexe dans le filtrat (P0) et qu'elle n'est pas assimilable par *Saccharomyces cerevisiae*, la lignine empêche la levure d'arriver jusqu'à la cellulose et l'hémicellulose, et même en y arrivant elle ne peut pas les utiliser sous la forme de polysaccharides non hydrolysés en sucres simples fermentescibles. Par ailleurs, pour les filtrats (P2) et (P3) une croissance, plus ou moins bonne, de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été remarquée, montrant par ce fait, que les sucres simples issus de la dégradation de la cellulose et l'hémicellulose sont devenus accessibles à la levure et qu'ils ont été libérés du complexe lignocellulosique par la dépolymérisation de la lignine sous l'effet de la laccase présente en quantités considérables dans ces deux filtrats.

Enfin, pour le filtrat (P6) une croissance, moins importante, de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a été observée, ce qui indique que ce filtrat n'était pas assez riche en sucres pour permettre une bonne croissance de la levure, ce qui peut être expliqué, du fait, qu'à la fin de la

fermentation, l'isolat T5 a déjà consommé le maximum des sucres libérés pour assurer sa croissance.

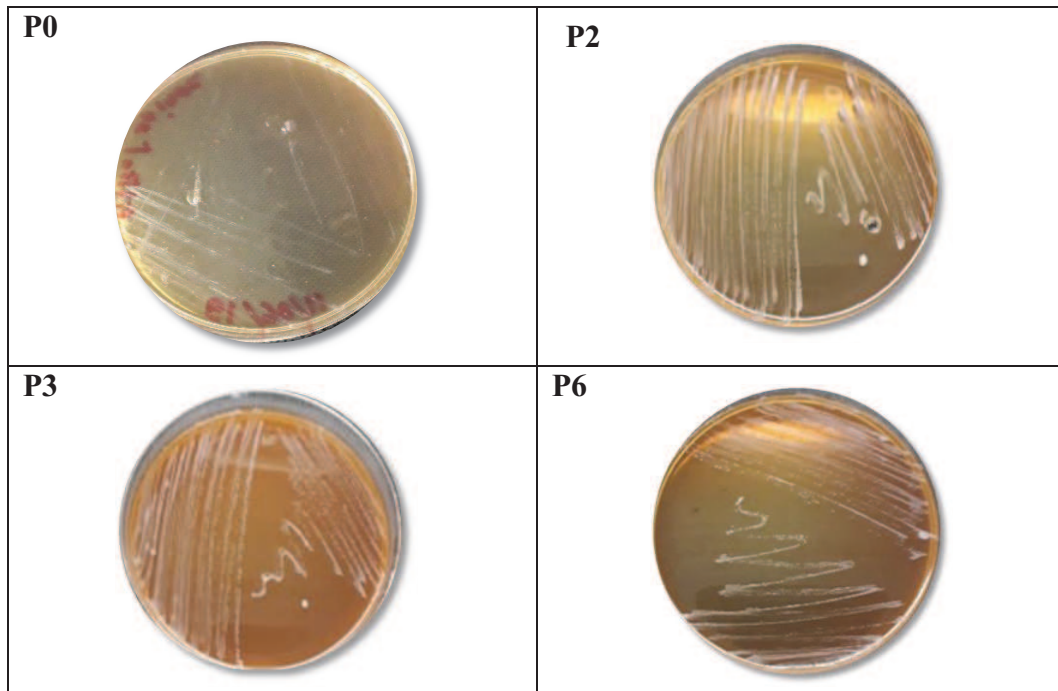


Figure 40 Résultats de la mise en culture de la levure *saccharomyces cerevisiae* sur des milieux à base de déchets de palmes sèches traité par l'isolat T5.

3.6.2- Dégradation des colorants synthétiques



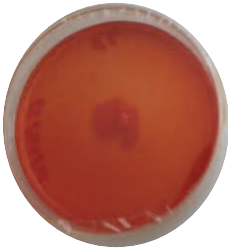
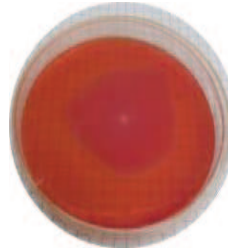



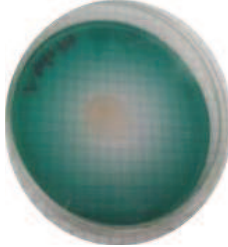
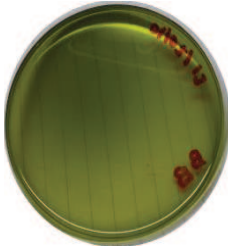


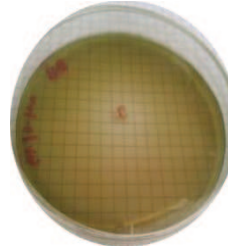



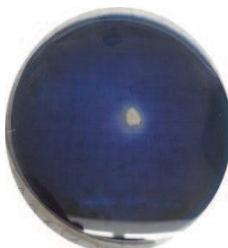
L'objectif de cette application, est de mettre en évidence la capacité de la laccase produite par l'isolat T5, à dégrader des colorants synthétiques dont (RC), (VM), (BB) et (BM), utilisés dans les industries du textile et qui représentent un danger pour l'environnement et la santé humaine. La toxicité des colorants azoïques n'est pas un fait nouveau, dès 1895, l'augmentation du nombre de cancers de la vessie observés chez des ouvriers de l'industrie du textile, est reliée à leur exposition prolongée aux colorants azoïques (Wu *et al.*, 2001). Pour ce faire, plusieurs colorants ont été testés.

Les résultats obtenus après incubation de 3 jours à 30°C (tableau 10) montrent l'apparition d'une zone claire autour de la zone de croissance de l'isolat T5 sur la boîte contenant le milieu LB ; additionné du colorant Bleu de Méthylène et Rouge Congo cela est justifié par la

dégradation partielle du colorant phénothiazine (BM) et azoïque (RC). Pour la boîte contenant le milieu LB additionné du Vert de Malachite, un changement de la couleur du milieu, du bleu vers le bleu clair, a été observée, ce qui indique une bonne dégradation de la molécule triphénylméthane diamine (VM). Ces résultats d'une part ; corroborent avec ceux de Ahmed et al., (2016) qui ont testés la dégradation des colorants (RC), (VM) et (BM) par *Bacillus sp.*, et d'autre part ; confirment l'efficacité de la laccase de l'isolat T5. Le milieu LB ; additionné du colorant sulfone phtaléines (BB), a connu, aussi, un changement de couleur, du vert vers le bleu, ce qui exprime une bonne dégradation de ce colorant. Ce résultat coïncide avec celui de Benhassine (2016) réalisé par deux souches productrices de la laccase *Trametes versicolor* et *Chaetomium globosum*).

Les résultats obtenus sur les milieux contenant des colorants sans milieu de culture (tableau 10), ont montré, aussi, la formation des zones claires autour de l'isolat T5 et des changements de couleurs indiquant, également, la dégradation des colorants dans ces conditions. Ces résultats sont moins importants que ceux observés en présence du milieu LB. Elles peuvent, probablement, être expliquées par le fait que la sécrétion de la laccase est, souvent, considérée comme réponse à une carence nutritive dans le milieu, de ce fait, le T5 a orienté son métabolisme, en recherchant une source d'énergie, vers la production de la laccase, en réponse de la présence du substrat phénolique dans le milieu. Ça nous renseigne de la capacité de l'enzyme produite par l'isolat à dégrader les colorants. Généralement, l'industrie du textile utilise un grand volume d'eau et de produits chimiques pour le traitement des colorants, la structure chimique de ces derniers, fournit une résistance à la décoloration lorsqu'ils sont exposés à la lumière, à l'eau ou aux produits chimiques (Shraddha, et al., 2011). En effet, la laccase est la solution idéale à cette préoccupation, car, elle peut oxyder, à la fois, des substrats phénoliques et non phénoliques, naturels ou synthétiques (Shraddha et al., 2011).

Tableau 10 Test de dégradation des colorants synthétiques par la laccase de l'isolat T5

Colorants	Témoin (colorant +Milieu de culture)	Témoin (Colorant)	Echantillon (colorant +milieu de culture)	Echantillon (colorant)
RC				
VM				
BB				
BM				

Conclusion

4- Conclusion et perspectives

Dans ce travail, l'isolement des microorganismes producteurs de laccases en vue de la valorisation de biomasse lignocellulosique s'est fait à partir des larves de capricorne et des termites xylophages habitant les arbres de pin de la région de Djebel El Ouahche, située à Constantine. La purification de ces microorganismes a permis d'isoler 6 isolats fongiques et 25 isolats bactériens. La sélection des souches productrices de la laccase, a été effectuée sur milieu contenant « le gaïacol », comme substrat de cette enzyme qui a permis de sélectionner un seul isolat bactérien (T5) à partir des termites, en tant que laccase positive. Des tests morphologiques et biochimiques, de cette bactérie, ont montré qu'il s'agit bien du genre *Bacillus*, fortement suspecté d'être un *Bacillus firmus*.

Les termites xylophages renferment une souche bactérienne à potentialité de production de laccase sur milieu à base de palmes sèches en vue de la valorisation de la biomasse lignocellulosique et sur milieu nutritif ordinaire.

Enfin pour intérêt d'application, la souche (T5) dégradait partiellement des colorants Rouge Congo et Bleu de méthylène par contre une bonne dégradation de Bleu de Bromothymol et de Vert de Malachite avec une croissance sur ces derniers sans et avec milieu LB a été constatée. Ces résultats confèrent à cet isolat un intérêt biotechnologique certain comme moyen de dépollution des effluents industriels, considérés comme sources de pollution d'environnement.

De nombreuses perspectives découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies sont nécessaires concernant plusieurs points, à savoir :

- Identification moléculaire de la souche T5 ;
- Etude de fermentation en scale-up de la souche ;
- Optimisation des conditions de fermentation à base de déchets agroalimentaires pour une production laccasique maximale ;
- Purification de la laccase sécrétée par cette souche.

Résumés

Résumé

Les réserves en combustibles fossiles ne dureront pas longtemps, la recherche de sources d'énergie alternatives renouvelables (de substitution) s'impose, *a priori*, par la valorisation de ressources énergétiques renouvelable tels que la biomasse lignocellulosique.

Les termites sont des insectes xylophages contenant dans leur tube digestif une diversité microbienne secrétant une large gamme d'enzymes d'intérêts tels que les enzymes lignocellulosiques.

L'objectif de ce travail est d'isoler des micro-organismes producteurs de la laccase à partir des termites xylophages. Cette enzyme dégrade la lignine, un constituant phénolique de la biomasse lignocellulosique, par conséquent, dégrade les colorants industriels.

L'isolement de ces microorganismes à partir d'un terme de l'espèce *Coptotermes formosanus*, habitant le pin de la région de Constantine, a permis de sélectionner un seul isolat bactérien doté d'une activité laccasique. L'identification préliminaire de l'isolat bactérien laisse supposer qu'il s'agit de *Bacillus firmus*. L'étude de la production de la laccase par l'isolat sélectionné sur milieu de fermentation à base de palmes sèches non optimisé a permis d'obtenir une activité laccasique considérable de 400UI/L ce qui laisse prédire que l'isolat peut être utilisé dans l'hydrolyse biologique de la biomasse lignocellulosique.

Par ailleurs, la culture de l'isolat sur différents milieux contenant de différents colorants synthétiques (RC), (VM), (BM) et (BB) utilisés en industrie a abouti à la dégradation de tous les colorants à différents degrés ce qui confère à cet isolat le pouvoir de bio-dépollution et de préservation de l'environnement.

Mots clés : Laccase, Termites, *Bacillus*, Biomasse lignocellulosique, Dégradation des colorants synthétiques.

Abstract

The reserves of fossil fuels will not last long, the search for alternative (renewable) alternative energy sources is essential, a priori, by the valorization of renewable energy resources such as lignocellulosic biomass.

Termites are xylophagous insects containing in their digestive tract a microbial diversity secreting a wide range of enzymes of interest such as lignocellulosic enzymes.

The goal of this work is to isolate laccase-producing microorganisms from xylophagous termites. This enzyme degrades lignin, a phenolic constituent of lignocellulosic biomass, therefore degrades industrial dyes.

The isolation of these microorganisms from a termite of the species *Coptotermes formosanus.*, inhabiting the pine of the Constantine region, allowed the selection of a single bacterial isolate with laccase activity. Preliminary identification of the bacterial isolate suggests that it is *Bacillus firmus*. The study of the production of laccase by the selected isolate on a non-optimized dry palm fermentation medium resulted in a considerable laccase activity of 400 IU / L, which suggests that the isolate can be used in biological hydrolysis of lignocellulosic biomass.

Furthermore, the culture of the isolate on different media containing different synthetic dyes (CR), (VM), (BM) and (BB) used in industry resulted in the degradation of all the dyes at different degrees which confers to this isolate the power of bio-depollution and preservation of the environment.

Keywords: Laccase, Termites, Bacillus, Lignocellulosic biomass, Degradation of synthetic dyes.

لن تدوم احتياطات الوقود الأحفوري طويلاً، فالبحث عن مصادر بديلة للطاقة (المتجددة) أمر ضروري، من خلال تجميع موارد الطاقة المتجددة مثل الكتلة الحيوية اللجينية.

النمل الأبيض عبارة عن حشرات xylophages تحتوي في الجهاز الهضمي على تنوع ميكروبي يفرز مجموعة واسعة من الإنزيمات المثيرة للاهتمام مثل أنزيمات lignocellulosic.

الهدف من هذا العمل هو عزل الكائنات الحية الدقيقة المنتجة للاكاز من النمل الأبيض إكسيلوفاج. هذا الإنزيم يحلل اللجنين وهو مكون الفينول من الكتلة الحيوية اللجينية، وبالتالي يحلل الأصباغ الصناعية.

عزل هذه الكائنات الحية الدقيقة من النمل الأبيض من النوع *Coptotermes formosanus*، الذي يعيش في الصنوبر في منطقة قسنطينة، سمحت باختبار عزلة بكتيرية واحدة تملك نشاط laccase. يشير التحديد الأولي للعزلة البكتيرية إلى أنها عصبية جرثومية. أسفرت دراسة إنتاج لاكاز بواسطة العزلة المختارة على وسط تخمير نخيل جاف غير محسن عن نشاط لاكاسي كبير قدره 400 وحدة دولية / لتر، مما يوحي بأنه يمكن استخدام العزلة في التحلل البيولوجي للكتلة الحيوية اللجينية.

علاوة على ذلك، فإن زرع العزلة على الوسائط المختلفة التي تحتوي على أصباغ اصطناعية مختلفة (CR) و (VM) و (BM) و (BB) المستخدمة في الصناعة قد أدت إلى تحلل جميع الأصباغ بدرجات مختلفة مما يمنح هذه العزلة خاصية إزالة التلوث والحفاظ على البيئة.

كلمات مفتاحية: لاكيز، النمل الأبيض، العصبوية، الكتلة الحيوية اللجينية، تحلل الأصباغ الاصطناعية.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

Abe T, Bignell DE, Higashi M. (2000). *Termites: evolution, sociality, symbiosis, ecology.* Kluwer, Dordrecht.

Abe, Anne Marie Koua, Justine Bomo Assanvo, Moussa Sanogo, and Kouamé Mathias Koffi. (2018). “Caractérisation Phénotypique de 52 Souches Des *Bacillus* Isolées à Partir de Racines Fraîches de Manioc Cultivées En Côte d’Ivoire.” *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 12 (5): 2284. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v12i5.28>.

Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., and Levin, D.B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 29, 675–685.

Ahmed, Abeer, Olubukola Babalola, and Tracey McKay. (2016). “Lignin Degradation by Two Isolated *Bacillus* Sp. Strains and Theirco-Culture Potential in the Production of Platform Chemicals.” *3rd INTERNATIONAL CONFERENCE ON SUSTAINABLE AGRICULTURE AND ENVIRONMENT*, no. November: 10–19.

Aitken, M.D. (1993). Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. *Chem. Eng. J.* 52: B49–B58.

Alberts JF, Gelderblom WCA, Botha A, Vanzyl WH. (2009). Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 135, 47–52.

Alcalde M., Bulter T., Arnold F. H. J. (2002). *Biomol Screen.*, 7, 547-553.

Alcalde M., Ferrer M., Plou F.J., Ballesteros A. (2006). *Trends Biotechnol.*, 24, 281-984- 287

Alexandre G., Bally R., Taylor BL and Zhulin IB. (1999). Loss of cytochrome oxidase activity and acquisition of resistance to quinine analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, 181: 6730-6738.

Alvira P., Tomas-Pejo E., Ballesteros M and Negro M. (2010): Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101:4851-4861.

Ara. I, Bukhari. N. A, Wijayanti. D. R. and Bakir. M. A. (2012). Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11(16). Pp: 3849-3857.

Arnaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisie Y., Cuvelier E.G.F., De Nettancourt D., Engasser J.M., GaW P, Goursaud J., Cnrenini M, Guiraud J.P, Iwen A C. Jupiq J.-M. Lebeault, J.-Y. Leveau, J. Martial, C. Mawas, F. Normand-Plessieq S. Pierrard, J. Pourquoiq P.-J. Raugel, H. Richard, H. Steenbrugge, E. Teoule, D. Thomas et J.-P. Vandecasteele.(1993). *Biotechnologies*. 4^{ième} ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation Lavoisier Paris, France, 904 pages.

Arakane Y., Muthukrishnan S., Beeman RW., Kanost MR., Kramer KJ. (2005). Laccase is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *PNAS*, 11337-11342.

Arora DS., Sharma RK. (2010). Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 160: 1760–1788.

Aslanzadeh, (2006). Biochemical profile-based microbial identification system. Assessment related to microbial food contamination. *Revue d'Epidemiologie*.

Atallah, M.M., Kheiralla, H.Z., Hamed, E.R., Youssry, A.A., Abd ElAty, A.A. (2013). Characterization and kinetic properties of the purified *Trematos phaerimangrovei* laccase enzyme. *Saudi J. Biol.Sci.* 20, 373–381.

Auer, L. (2018). Vers la maîtrise des communautés microbiennes lignocellulolytiques : impact de la source d'inoculum et du prétraitement du substrat sur le fonctionnement des communautés.

Ausec, L., Zakrzewski, M., Goesmann, A. (2011). Bioinformatic Analysis Reveals High Diversity of Bacterial Genes for Laccase-Like Enzymes. *PloS ONE*, 6, 1-9.

Aviron-Violet, P., J.L. Baret, C. Bertrand, B. Blazy, F. Bouvier, M. Comtat, P.R. Coulet P. Dupuy, J.F. Hervagault, A. Joyeau, J. Laurent, P. Monsan, D. Thomas, P. Sicard et G.M.A. Van Beynum. (1982). Les enzymes. Prùrction et utilistion inùstrielles. Durand G. et P. Monsan (eds), Bordas, Paris, France, 349 pages.

BABAHAMMI A. (2014). Caractérisation de la biomasse microbienne développée dans un compost issu des déchets du palmier dattier. Mémoire de master. Université Kasdi Merbah, Ouargla.

Bahiru B, Mehari T, Ashenafi M. (2006). Yeast and lactic acid flora of tej, an indigenous Ethiopians honey wine: Variation within and between production units. *Food Microbiology* 23, 277-282.

Bao W., O'Malley D.M., Whetten R and Sederoff R.R. (1993). *Science* 260 (1993) 672–674.

Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., ... & Mafart, P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and a w. *Food microbiology*, 32(1), 79-86.

Benhassine.s. (2017). “Thèse Thème Etude de La Laccase Produite Par Des Mycètes Isolés.” Université des frère mentouri constantine.

Bensmail, L., & Touzi, A. (2012). Valorisation de la biomasse à des fins énergétiques : Contribution de la production de biogaz au développement durable.

Berka R.M., Schneider P., Golightly E.J., Brown S.H., Madden M., Brown K.M., Halkier T., Mondorf K and Xu F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3151-3157.

Beynum G.M.A. (1982). Les enzymes. Production et utilisation industrielle. Durand G. et P. Monsan (eds), Bordas, Paris, France, 349 pages.

Bignell D. E., Oskarsson H and Anderson J. M. (1980). Specialization of the hindgut wall for the attachment of symbiotic micro-organisms in a termite *Procupitermes aburiensis* (Isoptera, Termitidae, Termitinae) *Zoomorphology* 96, 103-12.

Bignell D. (2010).: Morphology, Physiology, Biochemistry and Functional Design of the Termite Gut: An Evolutionary Wonderland. In: *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Edited by Bignell D, Roisin Y, Lo N. New York: Springer.

Biomérieux (2010).

Bourbonnais R and Paice M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS Lett.* 267, 99–102.

Bourguignon, T., Sobotnik, J., Lepoint, G., Martin, J. M., Hardy, O. J., Dejean, A., and Roisin, Y. (2011). Feeding ecology and phylogenetic structure of a complex neotropical termite assemblage, revealed by nitrogen stable isotope ratios. *Ecological Entomology* 36 (2):261-269.

Breznak J. A., and Pankratz, H. S. (1977). In situ morphology of the gut microbiota of wood eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Coptotermes formosanus* Shiraki]. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 33, 406-26.

Brune A. (2014). Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 168–180.

Brüne A and Ohkuma M: Diversity, structure and evolution of the termite gut microbial community. In: *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Edited by Bignell D, Roisin Y, LoN. Dordrecht: Springer; 2010: 413-438.

Burton S. (2003). Laccases and phenol oxidases in organic synthesis. *Curr Org Chem.* 7: 1317-1331.

Buswell, IA. Cai, YJ. and Chang, S.T. (1994). Cellulases and hemicellulases of *Volvariella volvacea* and the effect of tween 80 on enzyme production. *Mycological Research* 98: 1019-1024.

Buswell, IA., Cai, YJ., Chang, S.T., Peberdy, IF., Fu, S.Y. and Yu, H.S. (1996). Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 537-542.

Camarero S L D., Martinez M. J., Martinez A. T. (2005) "Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes», *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 1775-1784.

Camille, D. (2007). *Microbiology pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition Lavoisier. p 128-129.

Canam, T., Town, J., Iroba, K., Tabil, L., and Dumonceaux, T. (2013). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Microorganisms: Approaches, Advantages, and Limitations. In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, A. Chandel, ed. (InTech).

Chawachart N., Khanongnuch C., Watanabe T and Lumyong S. (2004). "Rice bran as an efficient substrate for laccase production from thermotolerant basidiomycete *Coriolus versicolor* strain RC3," *Fungal Diversity*, vol. 15, no. 2, pp. 23–32.

Chehma A, et Longo H. F. (2001). Valorisation des Sous-Produits du Palmier Dattier en Vue de leur Utilisation en Alimentation du Bétail. Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse ; p. 59-64.

Chen, X.L., Wang, J.K., Wu, Y.M., and Liu, J.X. (2008). Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid- and solid-associated ruminal microbes in vitro. Anim. Feed Sci. Technol. *141*, 1–14.

Cheng, Y.F., Edwards, J.E., Allison, G.G., Zhu, W.-Y., and Theodorou, M.K. (2009). Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch culture. Bioresour. Technol. *100*, 4821–4828.

Chivukula M et Renganathan V. (1995). Appl Environ Microbiol., *61*, 4374-4377.

CLAUS H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. Micron, *35* (1-2): 93-96.

Coll PM, Abalos JMF, Villanueva JR, Santamaria R, Perez P. (1993). Purification and characterization Phenoloxidase (Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971). Appl. Environ. Microbiol. *59*: 2607-2613.

Constantino R. (2007). On-Line Termites Database.

<http://www.unb.br/ib/zoo/docente/constant/catal/catnew.html>.

Cortezzo, D.E., Setlow, P. (2005). Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. Journal of Applied Microbiology *98*, 606-617.

Costa-Leonardo A. M. (2002). Cupins-praga: morfologia, biologia e controle. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista.

Couto S.R and M. A. (2005). Sanrom'an, "Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 22, no. 3, pp. 211–219.

Couto S. R., Luis J et Herrera T. (2006). *Industrial and biotechnological applications of laccases: A review*. 24, 500–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.04.003>

D’Annibale A., Celletti D., Felici M and Dimattia E. (1996). Substrat specificity of laccase from *Lentinus edodes*. *Acta Biotechnologica.*, 16, 257-270.

Dashtban, M., Schraft, H., and Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 578–595.

DASHTBAN M., SCHRAFT H., SYED T.A and QIN W. (2010). *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 1, 36, in <http://www.ijbmb.org/files/IJBMB1004005.pdf>.

Daudé G., Labbé N., De Jéso B., Lartigue J. C., Pétraud M. et Ratier M., (2002), « Moisture content and Extractive materials in Maritime pine wood by Low Field 1H NMR », *Holzforschung*, 56(1): pp. 25-31.

Deglixse X, et Donnot A. (2010). Bois Energie, Techniques de l’Ingénieur, Réf. BE8535.

Del Rio J. C., Gutierrez A., Martinez M. J. et Martinez A. T. (2001). « PyGC/MS study of *Eucalyptus globulus* wood treated with different fungi », *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58-59: pp. 441-452.

De Vos P., Garrity G-M., Jones D., Krieg N-R., Ludwig W., Rainey F-A., Schleifer K-H. And Whitman W-B. (2009). *Bergey’S Manual Of Systematic Bacteriology*, 7nd edition. Volume three, the firmicutes. springer, New York, USA.

Didderen I, Destain J, Thonart P. (2008). *Le bioéthanol de seconde génération : la production d’éthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. Belgium : Presses Agronomiques de Gembloux.

Dihazi.A. (2012). Interaction Palmier dattier-Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis : Induction des réactions de défense par l'acide salicylique et rôle de quelques microorganismes antagonistes de l'agent pathogène dans le contrôle de la maladie du Bayoud. Thèse de Doctorat : Biotechnologies et physiologies végétales, Université Ibn Zohr : Faculté des sciences, 204p.

DJAFOUR S., KHABBAZE A., KHOULDI Z. (2005) - Contribution à l'étude de la composition biochimique des dattes Dégelet- Nour dans le pédopaysage de la cuvette de Ourgela. Etude supérieur en biologie. Université Kasdi Merbah – Ouargla.

Donovan S. E., Eggleton P and Bignell D. E. (2001). Gut content analysis and a new feeding group classification of termites. *Ecological Entomology* 26 (4):356-366.

Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Ostergaard P., Schneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H and Davies G.J. (1998). Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat Struct Biol* 5, 310-316.

Dürre P. (2004). *Handbook of Clostridia*. United States of America: CRC Press.

Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H. (2006). *The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry*. Singapore: Springer.

Egger, K.N. (1986). Substrate hydrolysis patterns of post-fire ascomycetes (Pezizales). *Mycologia* 78: 771-780.

Eikenes M., Ekeberg D., Flaete P. O., Fongen M and Naess-Andresen C. F., (2006), « Qualitative and quantitative determination of extractives in heartwood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by gas chromatography », *Journal of Chromatography A*, 1109(2): pp. 267-272.

Enguita F.J., Marcal D., Martin L.O., Grenha R., Henriques A.O., Lindley P.F and Carrondo M.A. (2004). Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol Chem*, 279, 23472–23476.

Faraco, V. (2013). *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production* (Springer Science & Business Media).

Faure D., Bouillant ML., Bally R. (1994). Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. *Appl Environ Microbiol.*, 60, 3413–3415.

Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 90(2), 151-157.

Gassara F., Brar S.K., Tyagi R.D., Verma M., Surampalli R.Y. (2010). Screening of agroindustrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Eng. J.*, 49, 388–394.

Gassara F. (2012). PRODUCTION ECONOMIQUE D'ENZYMES LIGNINOLYTIQUES PAR FERMENTATION À L'ÉTAT SOLIDE DES DÉCHETS. Université du Québec Institut national de la recherche scientifique Centre Eau Terre Environnement.

Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W.A. and Krieg N.R., (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC, ASM, USA.

Gagui. W. (2015). L'effet d'ajout des fibres palmiers dattiers (Saaf et Lif) sur les propriétés physico-mécaniques des bétons de sable. Mémoire de Master Académique, Conception et calcul de structure. Biskra : Université Mohamed Kheider Biskra, 79p.

Gelhaye, E., Petitdemange, H., Gay, R. (1993). Adhesion and growth rate of *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 on crystalline cellulose. *Journal of bacteriology*, 175(11), 3452-3458.

Golz-Berner K., Walze B., Zastrow L and Doucet O. (2004). Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening. *Int Pat Appl WO2004017931*. Gomes SASS, Rebelo MJF. A new laccase biosensor for polyphenols determination. *Sensors* 3, 1-25.

Gomes E., Aguiar A. P., Carvalho C. C., Bonfá M. R. B., Da Silva R and Boscolo, M. (2009). Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 31–39. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100005>.

Gordon, G.L., and Phillips, M.W. (1998). The role of anaerobic gut fungi in ruminants. *Nutr. Res.Rev.* 11, 133–168.

Gourdon, R. (2001). Traitement biologique des déchets. Techniques de l'ingénieur. Environnement, 2(G2060), G2060-1.

Grassé P. P. (1949). Ordre des Isoptères ou termites. Edited by P. P. Grassé. Vol. 9, Traité de zoologie Paris : Masson.

Grassé P. P. (1982). Termitologia Tome I Anatomie, Physiologie, Reproduction des termites. Paris : Masson.

Guiraud, J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. p : 310-321.

Guiraud, J.P. (2003). Microbiologie des principaux produits alimentaires ; « Microbiologie Alimentaire, Techniques de Laboratoire » Dunod, Paris. ISBN 978-2- 10-0570089. pp: 91-136-179-219-224-228-247-259-291-294.

Gys M. (2007). Characteristics and dyes biodegradation potential of rude lignolytic enzymes from white-rot fungus *crepidotus variabilis* isolated in coastal tanzaniatanz. *J. Sci.* Vol 33.

HAMMA Faiza. (2012).la question des énergies renouvelables dans la perspective de l'après pétrole : cas de l'Algérie et pays du sud et Est Méditerranéens, Mémoire de Master professionnel, Université de Bejaia, 196p).

Hérault, B., Beauchaine, J., Muller, F., Wagner, F., Baraloto, C., Blanc, L., and Martin, J. M. (2010). Modeling decay rates of dead wood in a neotropical forest. *Oecologia* 164 (1):243-251.

Hervé, V., Le Roux, X., Uroz, S., Gelhaye, E., Frey-Klett, P. (2014). Diversity and structure of bacterial communities associated with *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2238-2252.

Holt J. A and Lepage M. (2000). *Termites and soil properties*. Edited by T. Abe, D. E. Bignell and M. Higashi. Vol. 2, *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Honigberg, B. M. (1970). Protozoa associated with termites and their role in digestion. In 'Biology of Termites'. Vol. 2. (Eds K. Krishna and F. M. Weesner.) pp. 1-36. (Academic Press: New York).

Horikoshi K. (1971). Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. *Agric. Biol. Chem.* 35:1407-1414.

Inward D. J. G., Vogler A. P and Eggleton P. (2007). A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (3) :953-967.

Itakura, S.Tanaka, H.Enoki, A.(1997). Distribution de cellulases, de glucose et de substances apparentées dans le corps de *Coptotermes formosanus*).

Issa N. (2009). Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophila* : application à la fonctionnalisation du chitosane. Thèse en procédés Biotechnologiques et Alimentaires ; Institut National Polytechnique de Lorraine ; Nancy, France.

Jang M.Y., Ruy W.R. and Cho M.H. (2002). Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 741-746.

Johannes C and Majcherczyk A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 524-528.

Juang R.S., Tseng,R.L ., Wu F.C and Lin S.J.(1996). *Environ Sci. Eng.*, 31: 325–38.

Karam, J., and Nicell, J.A. (1997). Potential application of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69: 141–153.

Keena, MA & Moore, PM. (2010). Effects of Temperature on *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) Larvae and Pupae. *Physiol. Ecol.* 39 :1323-1335.

Kumar V and Sonkar P. (2013). Laccases: Sources and Their Environmental Application. *International Journal of Bioassays*, 2(6), 909–911.

Kunamneni A., Plou F. J and Ballesteros A. (n.d.). *Postprint_Laccase_Patent_Review*.

LADELL, W. R. S. (1936). New Apparatus for Separating Insects and Other Arthropods from the Soil. *Annals of Applied Biology*, 23(4), 862–879. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1936.tb06132.x>.

La Fage J. P and Nutting W. L. (1978). Nutrient dynamics of termites. Edited by M. V. Brian, *Production ecology of ants and termites*. Cambridge: Cambridge University Press.

Lang G and Cotteret J. (1999). Hair dye composition containing laccase. (L'Oreal, Fr.). Int Pat Appl WO9936036.

Lapointe R. E., (2000), *Précis de Chimie de la Cellulose : Cégèp de TroisRivières* : 179 p.

Lee K. E. and Wood T. G. (1971). *Termites and soils*. London: Academic Press.

Legendre F., Whiting M. F., Bordereau C., Canello E. M., Evans T. A and Grandcolas P. (2008). The phylogeny of termites (Dictyoptera: Isoptera) based on mitochondrial and nuclear markers: Implications for the evolution of the worker and pseudergate castes, and foraging behaviors. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48 (2):615- 627.

Levin L., Viale A and Forchiassin A. (2003)., *Int. Biodet. Biodeg.*, 52, 1-5.

Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., chen F., Tian Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chimestry*. Pp771-776.

Lima J. T. and Costa-Leonardo A. M. (2007). Recursos alimentares explorados pelos cupins (Insecta : Isoptera). *Biota Neotropica* 7 (2) :243-250.

Lingafelter SW et Hoebeke ER. (2002) Revision of Anoplophora (Coleoptera: Cerambycidae). Entomological Society of Washington, Washington, D.C.

Lo N., Tokuda G., Watanabe H., Rose H., Slaytor M., Maekawa K., Bandi C and Noda H. (2000). Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Current Biology* 10 (13):801-804.

Lo N., Bandi C., Watanabe H., Nalepa C and Beninati T. (2003). Evidence for cocladogenesis between diverse dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts: *Society for Molecular Biology and Evolution*.

LOGAN, N. A., and R. C. W. BERKELEY. (1979). "Identification of Bacillus Strains Using the API System." *Microbiology* 130 (7): 1871–82. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-7-1871>.

Magnusson, L., Islam, R., Sparling, R., Levin, D., and Cicek, N. (2008). Direct hydrogen production from cellulosic waste materials with a single-step dark fermentation process. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 5398–5403.

Mabrouk, A.M.; Kheiralla, Z.H.; Hamed, E.R. and Youssry, A.A., Screening of some marinerived fungal isolates for lignin degrading enzymes (LDEs) production. *Agric. Biol. J. N. Am.*, 2010; 1(4): 591-599.

Marchal N., Bourdon J.L. and F Bimet. (1988). *Le laboratoire de bactériologie médicale. Equipement techniques de base sécurité.* Eds.Doin. p. 255-289-296-312.

Matthias Gunne, Vlada B. Urlacher, Characterization of the Alkaline Laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with Unusual Properties Discovered by Genome Mining,2012.

Matsumoto T and Abe T. (1979). The role of termites in an equatorial rain forest ecosystem of west Malaysia. *Oecologia* 38 (3):261-274.

Machczynski MC, Vijgenboom E, Samyn B, Canters GW. (2004). Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.* 13 (9): 2388–2397.

Messerschmidt A. (1994). Blue copper oxidases, *Adv. Inorg. Chem.* 40 -121–185.

Miura T. and Matsumoto T. (1998). Foraging organization of the open-air processional lichenfeeding termite *Hospitalitermes* (Isoptera, Termitidae) in Borneo. *Insectes Sociaux* 45 (1) :17-32.

Morozova O, Shumakovich G, Gorbacheva M, Shleev S, Yaropolov A. (2007). Laccases "bleu". *J Biochem.* 72 (10): 1136-1150.

Murugesan, Rajeswari, and Bhuvanewari Vembu. “Production of Extracellular Laccase from the Newly Isolated *Bacillus* Sp. PK4.” *African Journal of Biotechnology* 15, no. 34 (2016): 1813–26. <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15509>.

Nakashima K, Watanabe H, Saitoh H, Tokuda G, Azuma J. (2002): Dual cellulose-digesting system of the wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:777-784.

Netto C. G., Toma H. E and Andrade L. H. (2013). Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85, 71-92.

Noirot C et Nolrot- Timothee C. (1969). The digestive system, chapter 3, pp. 49-88, in Krishna, K. & Weesner, F. M. (eds.), *Biology of termites*, vol. 1, Academic Press, N. York & London, 598 pp.

Noirot C. (1992). From wood-to humus-feeding: an important trend in termite evolution. Edited by J. Billen, *Biology and Evolution of Social Insects* Leuven: University of Leuven Press.

Noratiqah KamsaniMadihah Md. SallehAdibah YahyaChun Shiong Chong. (2016). Production d'enzymes lignocellulolytiques par des microorganismes isolés de *Bulbitermes* sp. *Termite Gut dans la fermentation à l'état solide*, 2016, 7, pp 357–371.

Pandey K. K., (2005), « Study of the effect of photo-irradiation on the surface chemistry of wood », *Polymer Degradation and Stability*, 90(1): pp. 9-20.

Pasti M.B. (1990). Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (*Termitidae*) gut, 1990.

Pasti.B, L. Belli. (1985). Cellulolytic activity of actinomycetes isolated from termites (*Termitidae*) gut.

PEYRON G. (2000). *Cultiver le palmier- dattier, guide illustré de formation.*

Pilz R., Hammer E., Schauer F., Krag U. (2003). Laccasecatalyzed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60: 708-712.

Piontek K., Antorini M and Choinowski T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90.Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem*, 277,37663-37669.

Pointing, Stephen B. (1999). "Qualitative Methods for the Determination of Lignocellulolytic Enzyme Production by Tropical Fungi" 2 (March): 17–33.

Ponce, Adrian, Stephanie A. Cannon, and Pun To Yung. (2008). "Detection and viability assessment of endospore-forming pathogens." *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*. Springer New York, 481- 523.

Poonam S. N and A. Pandey. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*, Springer Science and Business Media.

Prevot,A.P.,(1977).*Bactériologies,notions elementaire*.Ed.Presses universitaires de France.P 218 *Pseudomonas aureofaciens* strain.*Applied and Environmental Microbiology* 57:2928-2934.

Revankar M.S and Lele S.S. (2006). "Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1," *Process Biochemistry*, vol. 41, no. 3, pp. 581–588, 2006.

Reiner Karen. (2016). "Catalase Test Protocol," no. November 2010: 1–9.

Ribéreau-Gayon P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Editions Dunod, Paris 254 pp.

Rodriguez C S, Sanroman M A. (2006). Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourization ability. *Journal of Food Engineering*.73: 388- 393.

Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International journal of food microbiology*, 85(1), 45-61.

Rubin et Edward M. (2008). "Genomics of Cellulosic Biofuels." *Nature* 454, no. 7206: 841–45. doi:10.1038/nature07190Sirim.

Ruijsenaars HJ, Hartmans S. (2004) A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65 (2): 177–182. 14.

Sanchez C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* (27):185I194.

Sarethy I. P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S. K., Gupta V. and Gupta S. (2011). Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38:769 -790.

Schlosser D., Grey R. and Fritsche W. (1997). Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbial Biotechnology*; 47: 412-418.

Scriban R. (1998). *Biotechnologie*. Lavoisier 5 ed. Paris.

Sharma KK and Kuhad RC. (2007). Laccase: enzyme revisited and function redefined. *Ind J. Microbiol.*, 2008, 48: 309–316. 21. Sharma P, Goel R, Caplash N. Bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 823-832.

Scully, ED, Geib, SM, Carlson, JE, Tien, M, McKenna, D, Hoover, K. (2014). Functional genomics and microbiome profiling of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*) reveal insights into the digestive physiology and nutritional ecology of wood feeding beetles. *BMC Genomics* 15 :1096.

Singleton, P. (2005). *Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies*, cours, (6e éd), Dunod.

Sjöman, H, Östberg, J, Nilsson, J.(2014) Review of host trees for the wood-boring pests *Anoplophora glabripennis* and *Anoplophora chinensis*: An urban forest perspective. *Arboric. Urban For.* 40:143-164.

Sleaford F., Bignell D. E and Eggleton, P. (1996). A pilot analysis of gut contents in termites from the Mbalmayo Forest Reserve, Cameroon. *Ecological Entomology* 21 (3) :279- 288.

Smai Ali et Zahi Lamine. (2016). “Les Potentialites De L’Algerie En Energies Renouvelables”.

Smith Joseph A., Michael E. Scharf, Roberto M. Pereira, and Philip G. Koehler. (2009). Comparisons of Gut Carbohydrolase Activity Patterns in *Reticulitermes flavipes* and *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) Workers and Soldiers, 2009, 59.

Solomon E.I., Baldwin M.J., Lowery M.D. (1992). *Chem. Rev.* 92 (1992) 521–542.

SPECK E. L AND E. FREESE. (1973). Control of Metabolite Secretion in *Bacillus subtilis*, *Journal of General Microbiolog*, 78,261-275.

Sridevi Rajaram, Ajit Varma. (1990). Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes, *Volume 34, Issue 1*, pp 141–144.

Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.

Sterjiades R., Dean J.F.D., Eriksson KE.L. (1992). *Plant Physiol.* 99 (1992) 1162–1168.

Tanaka T., Kohno H., Suzuki R., Yamada Y., Sugie Sand MoriH. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 94, 965–973.

Tartar A, Wheeler M, Zhou X, Coy M, Boucias D et Scharf M. (2009). Parallel metatranscriptome analyses of host and symbiont gene expression in the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Biotechnology for Biofuels*, 15:2-25.

Tayasu T., Abe T., Eggleton P and Bignell D. E. (1997). Nitrogen and carbon isotope ratios in termites: An indicator of trophic habit along the gradient from wood-feeding to soil-feeding. *Ecological Entomology* 22 (3):343-351.

Taylor C.R., Hardiman E.M., Ahmad M., Sainsbury P.D., Norris P.R., Bugg T.D.H. (2012). Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 521-530.

Thurston C. (1994). *Microbiology* 140 - 19–26.

To L. P., Margulis L., Chase D and Nutting W. L. (1980). The symbiotic microbial community of the Sonoran Desert termite *Pterotermes occidentis*. *BioSystems* 13, 109-37.

TOUTAIN G. (1967). Le palmier dattier culture et production. Page 87-91.

Vassilev, S.V., Baxter, D., Andersen, L.K., Vassileva, C.G., and Morgan, T.J. (2012). An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel* 94, 1–33.

Wan C and Li Y. (2010). Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme Microbial Technology* 47: 31–36.

Watanabe. Y,Naoya .S ,Takema. F. (2003). Isolation of actinomycetes from Termites' guts.

Wenzel.M ,I. Schönig ,M. Berchtold ,P. Kämpfer ,H. König.(2002).Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*.

Wood T.G. (1978). Food and feeding habits of termites. Edited by M. V. Brian, Production ecology of ants and termites. Cambridge: Cambridge University Press.

Xu F. (1999). "Laccase," In Flickinger, M.C. and Drews, S.W. (eds.), Encyclopedia of 975 Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, Bioseparation, JohnWiley & Sons Inc., New York, pp. 1545-1554.

Yaropolov A.I., Skorobogat'ko O.V., Vartanov S.S and Varfolomeyev S.V. (1994). Appl. Biochem. Biotechnol. 49 - 257–280.

Zainudin, M., M.H., Hassan, A., Mitsunori T et Yoshihito S. (2013). Indigenous cellulolytic and hemicellulolytic bacteria enhanced rapid co-composting of lignocellulose oil palm empty fruit bunch with palm oil mill effluent anaerobic sludge. Bioresource Technology, 147, 632-635.

Annexes

Annexes

1- Milieux de culture

1.1- Milieu 863

Peptone.....	10 g
Extrait de levure	10g
Glucose.....	10 g
Agar.....	17 g
Eau distillée.....	1000 mL

pH= $6 \pm 0,2$ à 25° C

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

1.2- Milieu ISP₂

Extrait de levure	4 g
Extrait de Malt.....	10g
Glucose.....	4 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 mL

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

1.3- Milieu LMBG

Peptone	3 g
Glucose	10 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
ZnSO ₄	0.001 g
K ₂ HPO ₄	0.4 g
FeSO ₄	0.0005 g
MgSO ₄	0.5 g
MnSO ₄	0.05 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 mL

pH= 6 ± 0,2 à 25°C additionné de 0.02% du Gaïacol

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

1.4- Milieu CMC

Extrait de levure	0.1 g
CMC	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.001 g
C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 mL

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

Complément 2% w/v rouge Congo ; NaCl (1M)

1.5- Milieu XBM

Extrait de levure	0.1 g
Xylane	40 g
KH ₂ PO ₄	1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0.001 g
C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 mL

Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

Complément 0.25% w/v Lugol

1.6- Gélose à l'Amidon

Peptone	5 g
Amidon.....	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL

1.7- Gélose au Lait

Extrait de levure	3 g
Peptone	10 g
NaCl	5 g
Poudre de lait	100 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 mL

pH= 6.5-7.2

1.8- Gélose au jaune d'œuf

Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
NaCl	10 g
Jaune d'œuf	100 mL
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 mL

pH =7

1.9- Milieu naturel

Palmes séches.....	3 g
Eau distillée.....	12 mL

Autoclavage durant 15 min à 121°C.

1.10- Milieu réactionnel (l'activité laccasique)

Sodium acetate 0.1 M/pH=6.....	4.8mL
Guaiacol (0.01M)	0.1 mL

1.11- Bouillon nutritif

Peptone	5 g
Extrait de viande.....	3 g
Eau distillée	1000 mL

1.12- Milieu avec colorants

Colorant.....	0.01 g
Eau distillée	40 mL

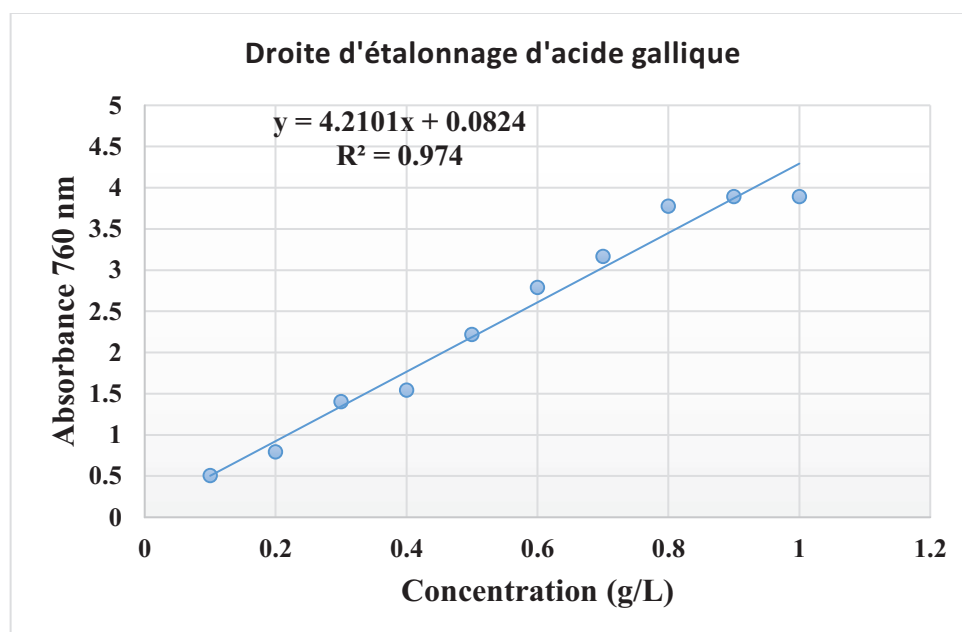
1.13- Milieu sans colorants

Agar	0.8 g
Eau distillée	40 mL

1.14- Milieu LB (Luria -Bertani)

Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
NaCl	10 g
Agar.....	20 g
Eau distillée	1000 mL

2- Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



3- Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'o-naphtol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		

Noms et Prénoms Chibi Amina Zerkine Ouiem Rania	Date de soutenance: 21/07/2019
Thème : Sélection de microorganisme producteurs de laccases en vue de la valorisation de la biomasse lignocellulosique	
<p>Résumé : Les réserves en combustibles fossiles ne dureront pas longtemps, la recherche de sources d'énergie alternatives renouvelables (de substitution) s'impose, <i>a priori</i>, par la valorisation de ressources énergétiques renouvelable tels que la biomasse lignocellulosique.</p> <p>Les termites sont des insectes xylophages contenant dans leur tube digestif une diversité microbienne secrétant une large gamme d'enzymes d'intérêts tels que les enzymes lignocellulosiques.</p> <p>L'objectif de ce travail est d'isoler des micro-organismes producteurs de laccase à partir des termites xylophages. Cette enzyme dégrade la lignine, un constituant phénolique de la biomasse lignocellulosique, par conséquent, dégrade les colorants industriels.</p> <p>L'isolement de ces microorganismes à partir d'un termite de l'espèce <i>Coptotermes formosanus</i>, habitant le pin de la région de Constantine, a permis de sélectionner un seul isolat bactérien doté d'une activité laccasique. L'identification préliminaire de l'isolat bactérien laisse supposer qu'il s'agit de <i>Bacillus firmus</i>. L'étude de la production de la laccase par l'isolat sélectionné sur milieu de fermentation à base de palmes sèches non optimisé a permis d'obtenir une activité laccasique considérable de 400UI/L ce qui laisse prédire que l'isolat peut être utilisé dans l'hydrolyse biologique de la biomasse lignocellulosique.</p> <p>Par ailleurs, la culture de l'isolat sur différents milieux contenant de différents colorants utilisés en industrie a abouti à la dégradation des tous les colorants à différents degrés ce qui confère à cet isolat le pouvoir de bio-dépollution et de préservation de l'environnement</p>	
Mot clés : : Laccase, Termites, <i>Bacillus</i> , Biomasse lignocellulosique, Dégradation des colorants synthétiques ;	
Laboratoires : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).	
Président de jury : Mr BOULAHROUF.A. Rapporteur : Mr KACEM CHAUCHE. N Examinatrice : Dr.Bataiche Insaf Maître de stage : Melle CHAOUA. S	Prof. Univ. Constantine 1. Prof. Univ. Constantine 1. MCB. Univ. Constantine 1. Doctorante.