



République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

Université Abou-Bekr Belkaid–Tlemcen
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Et Sciences De La Terre Et De L'univers
Département De Biologie

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en sciences

Option : Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments

Présentée par

Mme. MAKHLOUFI Souad

Thème :

**Valorisation des résidus du palmier dattier
(*Phoenix dactylifera* L.), essai de production de
bioéthanol**

Soutenue le : 11/05/2024

Devant le jury composé de :

Azzi Rachid	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Makhloufi Ahmed	Professeur	Université de Béchar	Directeur de thèse
Chebloune Yahia	Professeur	Université de Grenoble	Co-directeur de thèse
Belyagoubi Larbi	M.C.A	Université de Tlemcen	Examineur
Benlarbi Larbi	M.C.A	Université de Béchar	Examineur
Ziane Mohamed	Professeur	Universsité de Ain- Témouchent	Examineur

Année Universitaire : 2023-2024

Remerciements

C'est pour moi un grand honneur et plaisir d'exprimer aujourd'hui mes plus vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à M. le Professeur MAKHLOUFI AHMED de l'université Tahri Mohamed, Bechar et M. le Professeur CHEBLOUNE YAHIA de l'Université Grenoble Alpes France, mes deux promoteurs, pour leurs aides, leurs patiences, leurs soutiens et leurs précieux conseils qui ont permis la réalisation et l'aboutissement de ce travail.

A nouveau je remercie M. le Professeur CHEBLOUNE YAHIA directeur PAVAL Lab, Université de Grenoble Alpes pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et réaliser une partie de ce travail.

Mes vifs remerciements vont à Monsieur AZZI RACHID, Professeur à l'Université de Tlemcen, d'avoir bien voulu présider le jury de soutenance de cette thèse.

Je remercie très sincèrement Monsieur BELYAGOUBI LARBI, Maître de conférences « A » à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir fait le grand honneur de juger ce travail.

Je suis honorée également par la présence de Monsieur BENLARBI LARBI, Maître de conférences « A » à l'Université de Béchar, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer ma grande considération et mes vifs remerciements à Monsieur ZIANE MOHAMED, Professeur à l'Université d'Ain Temouchent, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

J'adresse un grand merci à M. Harizia Abdelkader, Professeur à l'université de Mascara et Directeur du laboratoire Géo-Environnement et Développement des Espaces, pour ses encouragements, ses conseils et sa contribution dans la correction de l'article.

Ma reconnaissance va aussi à M. AMAR YAZID PhD au laboratoire de Béchar et à M. DRAOUI MORAD Docteur et ingénieur au laboratoire de biologie de l'université de Béchar.

J'attache une importance particulière à remercier les personnes responsables des laboratoires de Biologie, de chimie et de médecine, Université de Béchar et du laboratoire PAVAL, Université de Grenoble (France).

Au terme de ces remerciements je tiens à citer mes collègues de travail du centre de recherche CRSTRA, M. BENOUIS SLIMANE Chercheur, M. BOUARFA SAID maître de recherche et M. BENZOHERA IBRAHIM Chef de Station de Naâma (CRSTRA).

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère qui m'a toujours encouragée et soutenue
A la mémoire de mon cher père et de mon frère Amine, qu'Allah leur
fasse miséricorde

A mon cher grand frère Zakaria

A mon petit trésor Mohamed Adnane

المخلص

بدأت تجارب إنتاج الإيثانول من الكتلة الحيوية اللجنوسيليلوزيكية لنخيل التمر من خلال عزل 42 عزلة فطرية من ورق النخيل الجاف (الجريد) و14 عزلة من تربة تحت الماء من سد جرفة التربة (بشار). وأعقب عزل الفطريات الفحص في الوسط الصلب لإنزيم الجلوكاناز الداخلي و الخارجي. تم اختيار السلالتين $Sb_{3/4}$ و $Sb_{4/3}$ ، باعتبار أنهما عاليتا الأداء حيث المؤشر الإنزيمي يعد ما بين 1.07 و 1.16. كما تم تحديد السلالتين $Sb_{3/4}$ و $Sb_{4/3}$ جزئياً على أنهما *Aspergillus* MS-34 *iranicus* isolat و *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43. أظهر توصيف الكتلة الحيوية أن نسبة مادة الأزوت تعد منخفضة في ورق النخيل الجاف (الجريد) بـ 0.028% أما المعالجة المسبقة بواسطة KOH بدا فعالاً مع تحرير السيليلوز إلى حد 1276.11 مغ/ل. وبينما وصل إنتاج السكر في وسط التحلل المائي إلى 197.84 مغ/ل عند مستوى 50% P-KOH، نلاحظ أن CMCCase و FPase وتركيز البروتين كانوا عند الحد الأقصى في 20% P-KOH بنسبة 11.29 وحدة دولية/مل، 4.76 وحدة دولية/مل و 6.18 مل على التوالي. أظهر النشاط الإنزيمي فعالية أعلى للأندوجلوكاناز وإكزوجلوكاناز عند *A. iranicus* MS-34 isolat وعلى العكس من ذلك، نشاط البيطاغلوكوزيداز وتركيز البروتين كانتا بكمية أكبر مع السلالة *T. verrucosum* MS-43 isolat. CMCCase و FPase ناشطتان على النحو الأمثل عند 60°C. في حين كانت الأفضلية لـ FPase لـ *A. iranicus* MS-34 isolat عند 50°C. PH الأمثل هو 4.0 لأنشطة *A. iranicus* و 6.0 و 8.0 لـ FPase و CMCCase لـ *T. verrucosum* على التوالي. أظهر الخليط الإنزيمي للسلالتين المستخدم في التحلل المائي لورقة النخيل أنشطة أنزيمية أعلى من الزراعة الأحادية مع عائد تسكر قدره 64.90%. سجل تخمير ناتج التحلل أقصى عائد للإيثانول قدره 2.04 غ/ل. والذي تم تقديره على أنه عائد قدره 15.33% مقارنة بالكتلة الحيوية الأولية.

الكلمات المفتاحية: التخمير، مخلفات نخيل التمر، السيلولاز، المعالجة المسبقة، التحلل المائي، فطريات تحلل السيليلوز، الإيثانول الحيوي

Résumé

Les essais de la production d'éthanol à partir de la biomasse lignocellulosique du palmier dattier ont été initiés par un isolement fongique. Un total de 42 isolats fongiques issus de la palme sèche et de 14 isolats d'origines sol subaquatique du Barrage de Djorf Torba (Béchar). L'isolement fongique a été suivi par un criblage sur milieux solides de l'exo- et endo-glucanase. Deux souches (Sb_{3/4} et Sb_{4/3}) ont été sélectionnées comme étant les plus performantes avec un EI entre 1,07 et 1,16. Les analyses moléculaires des souches Sb_{3/4} et Sb_{4/3} ont permis de les identifier comme étant *Aspergillus iranicus* isolat MS-34 et *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43 respectivement. La caractérisation de la biomasse a montré que la palme est composée d'une faible proportion en matière azotée (0,028 %). Le prétraitement par KOH s'est révélé efficace avec une libération de cellulose jusqu'à 1276,11 mg/l. Tandis que le rendement en sucres dans les milieux d'hydrolyse a atteint 197,84 mg/l à P-KOH_{50%}, mais la CMC_{ase}, la FPase et la concentration en protéines étaient à leurs maximums dans le P-KOH_{20%} à raison de 11,29 UI/ml, 4,76 UI/ml et 6,18 mg/ml respectivement. La cinétique enzymatique a montré une forte activité endoglucanase et exoglucanase chez *A. iranicus* isolat MS-34. A l'inverse, l'activité β -glucosidase et la teneur en protéine se sont montrées plus importantes avec la souche *T. verruculosus* isolat MS-43. Les activités les plus optimales de la CMC_{ase} et FPase ont été trouvées à 60°C, alors que l'activité optimale de la FPase de *A. iranicus* isolat MS-34 a été trouvée à 50°C. Ces activités sont optimales à un pH 4.0 pour les activités d'*A.iranicus*, 6.0 pour l'FPase et 8.0 pour la CMC_{ase} de *T. verruculosus*. La mixture enzymatique des deux souches qui a été utilisée pour l'hydrolyse de la palme a montré des activités enzymatiques plus importantes que celle de monoculture avec un rendement en saccharification de 64,9 %. La fermentation des hydrolysats a permis d'obtenir un rendement maximal en éthanol de 2,04 g/l et qui a été estimé comme un rendement de 15,33 % par rapport à la biomasse initiale.

Mots clés : Valorisation, Résidus du palmier dattier, cellulases, prétraitement, hydrolyse, moisissure cellulolytique, bioéthanol.

Abstract

Attempts of ethanol production from date palm lignocellulosic biomass was initiated by the isolation of 42 fungal isolates from dry palm and 14 others isolated from Djorf Torba dam underwater soil (Béchar). Isolation of these strains was followed by exo- and endoglucanase screening on solid medium. Two strains (Sb_{3/4} and Sb_{4/3}) were selected as efficient with an EI between 1.07 and 1.16. Using the molecular tools, the strains Sb_{3/4} and Sb_{4/3} were identified as *Aspergillus iranicus* isolate MS-34 and *Talaromyces verruculosus* isolate MS-43, respectively. The biomass characterization has shown that the palm contained a low nitrogenous material (0.028 %). The pretreatment with KOH turned out to be effective with cellulose release up to 1276.11 mg/l. While the yield of sugars in P-KOH_{50%} hydrolysis medium reached 197.84 mg/l, but CMCase, FPase and protein concentration were at their maximum in the P-KOH_{20%} at the rate of 11,29 UI/ml, 4.76 UI/ml and 6.18 mg/ml respectively. Enzymatic kinetics showed a higher exo- and endoglucanase activity in *A. iranicus* isolate MS-34. Conversely, the β -glucosidase activity and the protein content were higher with products from *T. verruculosus* isolate MS-43 strain. Optimal activities of CMCase and FPase were found to be at 60 °C, while that of the FPase of *A. iranicus* isolate MS-34 was at 50 °C. In addition, the optimal activity with *A. iranicus* was at pH 4.0 while for FPase and CMCase of *T. verruculosus* the optimal activities were at pH 6.0 and 8.0, respectively. The enzymatic mix of the two strains used for the hydrolysis of the palm, showed a better enzymatic activity compared to monoculture with 64.9 % of saccharification yield. Hydrolysate fermentation has recorded a maximum ethanol yield of 2.04 g/l, which was estimated to 15.33 % of initial biomass yield.

Key words: Valorization, Date palm residues, cellulases, pretreatment, hydrolysis, Cellulolytic fungal, bioethanol.

Liste des abréviations

- ° GL : Degré Gay-Lussac
- Ace3 : Facteur de transcription contrôle les activités de la cellulase et le métabolisme du lactose chez *Trichoderma reesei*
- ADN : Acide 3,5 dinitrosalicylique
- ANOVA : Analyse de la variance
- ARN : Acide ribonucléotidique
- A_w : Activité de l'eau
- AZF1 : Activateur des cellulases et xylanases
- BglR : Facteur de transcription bêta-glucosidaseregulator
- BLC : Biomasse lignocellulosique
- C/N : Rapport carbone azote
- CA : Cellulose Avicel
- CB : Cellulose brute
- CBH : Exoglucanase
- Ccarbohy : Concentration en carbohydate
- ClbR : Régulateur transcriptionnel sensible aux cellobioses et à la cellulose
- Clr-1/ Clr-2/ Clr-3 : Activateur de la production de cellulases et hémicellulases
- CMCase : Activité endoglucanase
- CreA/Cre1 : Facteur de transcription
- CYA : Czapec extrait de levure agar
- DCPA : Dichloran Chloramphénicol Peptone Agar
- EG : Endoglucanase
- EI : Indice enzymatique
- FAO : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture
- FPase : Activité papier filtre
- G : intensité de la pesanteur artificielle
- G25N : Gélose à base de nitrate de glycérol
- Hap2/3/5, HapB/C/E: Facteurs de transcription activateurs
- HCl : Acide chloryhdrique
- H : Humidité
- ITS : Internal transcribed spacer
- LiP : Peroxydases de lignine
- LPMO : Polysaccharides mono-oxygénases lytiques
- MAT : Matière azotée totale
- MCMC : Milieux d'hydrolyse carboxymethylcellulose
- MEA : Gélose à l'Extrait de Malt
- MM : Matière minérale
- MnP : Les peroxydases de manganèse

- MO : Matière organique
- Pa.s⁻¹ /mPa.s⁻¹ : Pascal par seconde/ milli pascal par minute
- MS : Matière sèche
- N : Nombre de répétition
- NCBI : National Center for Biotechnology Information
- NO_x : Oxyde d'azote
- nm : Nanomètre
- *P* : Probabilité
- P.O.U : Protéines d'organisme unicellulaires
- P/P : Poids par poids
- PacC/Pac : facteur de transcription et répresseur de la production de cellulases
- PCR : Polymérase Chain Reaction
- PDA : Potato Dextrose Agar
- P-KOH_{0%} : Palme sèche non traitée (Témoin)
- P-KOH_{10%} : Palme sèche traitée avec 10 % de charge KOH
- P-KOH_{20%} : Palme sèche traitée avec 20 % de charge KOH
- P-KOH_{50%} : Palme sèche traitée avec 50 % de charge KOH
- RNase : Ribonucléase
- rpm: Rotation per minute
- SAA : Spectrophotomètre d'absorption atomique
- Sb : Souches de barrage
- SHF : Hydrolyse et fermentation séparées
- SSCF : Saccharification avec co-fermentation simultanées
- SSF : Saccharification et fermentation simultanées
- TDS : Taux de sel
- p/v : Poids par volume
- XlnR/ Xyr1 : Régulateur de la dégradation fongique du xylane et de la cellulose
- xyn1 et xyn2 : Gènes xylanolytiques
- βG ou BGL : β-glucosidases

Liste des figures

Figure I.1.	Présentation schématique du palmier dattier.....	5
Figure I.2.	Organisation des polysaccharides structuraux et de la lignine dans les parois cellulaires des biomasses lignocellulosiques.....	8
Figure I.3	Composition typique de la biomasse lignocellulosique.....	8
Figure I.4	Structure β -cellubiose.....	9
Figure I.5	Portion d'une chaîne de cellulose. Les liaisons glucosidique sont de type β (1 \rightarrow 4).....	9
Figure I.6	Voies de conversion de la BLC.....	11
Figure I.7	Synthèse des différents procédés de production d'éthanol.....	15
Figure I.8	Description synthétique de la voie de production de bioéthanol de première génération.....	16
Figure I.9	Classification des différentes voies d'obtention du bioéthanol de 2 ^{ème} génération.....	16
Figure I.10	Description synthétique de la voie de production de bioéthanol de troisième génération.....	17
Figure I.11	Principales étapes du processus bioconversion de la BLC en éthanol.....	18
Figure I.12	Origines des inhibiteurs de la fermentation éthanolique.....	24
Figure I.13	Groupes des champignons de pourriture dotés d'une activité cellulolytique.....	26
Figure I.14	Mécanisme de biodégradation de la cellulose.....	27
Figure I.15	Action de l'endoglucanase (EG) sur le brin de cellulose.....	28
Figure I.16	Action de l'cellobiohydrolase (CBH) sur le brin de cellulose libérant de cellobiose.....	28
Figure I.17	Action de β -glucosidases (BGL) sur le cellobiose.....	28
Figure I.18	Schéma de la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes cellulolytiques chez les champignons.....	32
Figure II.1	Site de prélèvement des échantillons de la palme sèche du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.), variété Fegousse de la palmeraie de Jedida, wilaya de Béchar.....	38

Figure II.2	Localisation des sites de prélèvement des échantillons de la palme sèche du palmier dattier et du sol subaquatique du barrage de Djorf Torba de la wilaya de Béchar, Algérie.....	38
Figure II.3	Echantillon de la palme sèche du palmier dattier (<i>Phenix dactyliferae</i> L.) de la région de Béchar.....	42
Figure II.4	Echantillons du sol subaquatique du barrage de Djorf Torba de la wilaya de Béchar.....	42
Figure II.5	Identification microscopique des moisissures par la technique de microculture d'Haris (1989).....	44
Figure II.6	Mode d'ensemencement des différents isolats du genre <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> d'après Pitt et Hoking (2009).....	45
Figure II.7	Mode d'ensemencement des différents isolats du genre <i>Alternaria</i> d'après Pitt et Hoking (2009).....	45
Figure II.8	Diagramme schématique de l'ARNr avec localisation des amorces de la région ITS des champignons composés des régions ITS1 et ITS2 séparées par le segment 5.8S. ITS1 et ITS4 sont des amorces sens et anti-sens largement utilisées pour amplifier l'ensemble de la région ITS.....	48
Figure II.9	Schéma représentant les étapes de prétraitement de la palme sèche.	50
Figure II.10	Mesure de la viscosité des cultures à base du CMC avant et après hydrolyse enzymatique avec le viscosimètre automatique (FUNGILAB).....	56
Figure II.11	Mesure du taux d'éthanol après fermentation.....	59
Figure III.1	Concentration en cations de l'eau brute du barrage durant la période Mars – Août (2021).....	62
Figure III.2	Concentration en anions de l'eau brute du barrage durant la période Mars – Août (2021).....	63
Figure III.3	Evolution du pH de l'eau brute du barrage durant la période Mars – Août (2021).....	63

Figure III.4	Taux des sels de l'eau brute du barrage durant la période Mars – Août (2021).....	64
Figure III.5	Evaluation de l'activité enzymatique des isolats cellulolytiques sur milieux CMC (carboxymethyl-cellulose) et milieu CA (cellulose Avicel) à 25°C après 5 jours d'incubation.....	72
Figure III.6	<i>Aspergillus spp.</i> (Isolat Sb _{3/4}).....	74
Figure III.7	<i>Penicillium verrucosum</i> (Isolat Sb _{4/3}).....	75
Figure III.8	Position de la souche <i>Aspergillus iranicus</i> isolat MS-34 dans l'arbre phylogénétique. Réalisé dans MEGAX11 (2021).....	77
Figure III.9	Position de la souche <i>Talaromyces verruculosus</i> isolat MS-43 dans l'arbre phylogénétique. Réalisé dans MEGAX11 (2021).....	78
Figure III.10	Résultats de prétraitement alcalin de la palme sèche.....	80
Figure III.11	Concentration de cellulose avant et après prétraitement alcalin.....	80
Figure III.12	Mesure de la viscosité des milieux hydrolysés par la souche <i>A.iranicus</i> isolat MS-34 et <i>T.verruculosus</i> isolat MS-43 avant et après dix jours d'incubation.....	91
Figure III.13	Teneur en protéine dans l'extrait enzymatique des milieux d'hydrolyse CMC avec les souches <i>A.iranicus</i> isolat MS-34 et <i>T.verruculosus</i> isolat MS-43.....	91
Figure III.14	Teneur en sucres réducteurs après hydrolyse avec le mixte enzymatique.....	98

Liste des planches

Planche III.1	Evolution du pH et de la concentration en carbohydrates dans les différents milieux d'hydrolyse avec la souche <i>A.iranicus</i> isolat MS-34.....	82
Planche III.2	Evolution du pH et de la concentration en carbohydrates dans les différents milieux d'hydrolyse avec la souche <i>T. verruculosus</i> isolat MS-43.....	83
Planche III.3	Activité enzymatique de la souche <i>A.iranicus</i> isolat MS-34 et <i>T. verruculosus</i> isolat MS-43 après 10 jours d'incubation à 28°C dans les milieux d'hydrolyse.....	86
Planche III.4	Teneur en protéine dans l'extrait enzymatique des milieux d'hydrolyse P-KOH _{0%} , P-KOH _{10%} , P-KOH _{20%} et P-KOH _{50%} avec les souches <i>A.iranicus</i> isolat MS-34 et <i>T. verruculosus</i> isolat MS-43.....	86
Planche III.5	Effet de la variation de la température sur les activités enzymatique Endoglucanase (A) et Papier filtre (B), d' <i>A.iranicus</i> isolat MS-34 et <i>T.verruculosus</i> isolat MS-43.....	93
Planche III.6	Effet de la variation du pH sur les activités enzymatiques Endoglucanase (C) et Papier filtre (D), d' <i>A.iranicus</i> isolat MS-34 et <i>T.verruculosus</i> isolat MS-43.....	93
Planche III.7	Comparaison entre le rendement théorique et le rendement expérimental en éthanol après 72 h de fermentation. (A) : rendement en éthanol avec la palme non traité ; (B) : rendement en éthanol avec la palme traité à 20 % KOH.....	98

Liste des tableaux

Tableau I.1	Classification botanique des palmiers.....	4
Tableau I.2	Composition de biomasse lignocellulosique.....	8
Tableau I.3	Propriétés physiques et chimiques de la cellulose.....	10
Tableau I.4	Propriétés physico-chimiques de l'éthanol.....	12
Tableau I.5	Classement des producteurs de biocarburants et principales matières premières.....	14
Tableau I.6	Principaux méthodes du prétraitement chimique et physicochimique de la BLC.....	20
Tableau I.7	Principales fonctions des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de la cellulase chez les champignons.....	29
Tableau I.8	Filière d'application de l'enzyme cellulase.....	33
Tableau II.1	Préparation des dilutions de cellulose pour la réalisation de la courbe d'étalonnage.....	51
Tableau II.2	Préparation des dilutions de glucose pour la réalisation de la courbe d'étalonnage des sucres réducteurs par Anthrone.....	52
Tableau II.3	Préparation des solutions étalons pour le dosage des protéines.....	53
Tableau II.4	Préparation des dilutions de glucose pour la réalisation de la courbe d'étalonnage par DNS.....	54
Tableau III.1	Composition chimique de la palme sèche du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) variété Fegousse.	60
Tableau III.2	Composition minérale de la palme sèche du palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L., variété Fegousse).....	61
Tableau III.3	Isolement des souches fongiques à partir des différents échantillons....	65
Tableau III.4	Caractères macroscopiques des souches fongiques isolées.....	67
Tableau III.5	Caractères microscopiques des souches fongiques isolées.....	68
Tableau III.6	Diamètres des colonies et des halos d'hydrolyse obtenus sur milieu CMC et CA avec indice enzymatique des isolats cellulolytiques.....	71

Tableau III.7	Comparaison de la production de cellulases par <i>Aspergillus iranicus</i> isolat MS-34 et <i>Talaromyces verruculosus</i> isolat MS-43.....	88
Tableau III.8	Activité cellulasique du mixte enzymatique d' <i>A. iranicus</i> isolat MS-34 et <i>T. verruculosus</i> isolat MS-43.....	96

TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Dédicace	
المخلص	I
Résumé	II
Abstract	III
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des Planches	VI
Liste des tableaux	VII
Introduction générale	1

Chapitre I : Recherche bibliographique

I.1	Palmier dattier et ses sous-produits	4
I. 1.1	Généralités sur le palmier dattier	4
I.1.2	Palmeraie de la Saoura	5
I.1.3	Domaines d'exploitation des résidus du palmier dattier	6
I.2	Composition de la lignocellulose et structure de cellulose	7
I.2.1	Lignocellulose	7
I.2.2	Structure de polysaccharide « cellulose »	9
I.3	Concept de la dégradation de la biomasse lignocellulosique (BLC)	10
I.3.1	Voies de conversion de la BLC	10
I.4	Bioéthanol de deuxième génération	12
I.4.1	Ethanol et ses utilisations	12
I.4.2	Classification de l'éthanol	15
I.4.2.1	Bioéthanol de 1ère génération	15
I.4.2.2	Bioéthanol de 2ème génération	16
I.4.2.3	Bioéthanol de 3ème génération	17
I.5	Procédés de production de l'éthanol de 2ème génération	18
I.5.1	Prétraitement de la BLC	19
I.5.1.1	Prétraitement physique	19
I.5.1.2	Prétraitement chimique	19
I.5.1.3	Prétraitement physicochimique	21
I.5.1.4	Prétraitement biologique	21

I.5.1.5	Facteurs influençant l'efficacité de prétraitement.....	21
I.5.2	Hydrolyse enzymatique.....	22
I.5.3	Fermentation.....	22
I.5.3.1	Facteurs influençant la production de bioéthanol.....	23
I.5.3.1.1	Température.....	23
I.5.3.1.2	Inoculum.....	23
I.5.3.1.3	Durée de fermentation.....	23
I.5.3.1.4	Agitation.....	23
I.5.3.2	Inhibiteurs de la fermentation.....	23
I.5.4	Récupération de bioéthanol.....	24
I.6	Enzymes cellulolytiques fongiques.....	25
I.6.1	Champignons cellulolytiques.....	25
I.6.2	Classification des cellulases et mode d'action.....	27
I.6.2.1	Endoglucanase (EG).....	28
I.6.2.2	Exoglucanase (CBH).....	28
I.6.2.3	β -glucosidases (β G).....	28
I.6.3	Mécanisme d'induction de cellulase.....	28
I.6.4	Mécanismes de régulation moléculaire de l'expression des gènes de la cellulase.....	29
I.6.3	Applications biotechnologiques des cellulases.....	32
I.7	Avantages et inconvénients du bioéthanol de 2 ^{ème} génération	34
I.7.1	Avantages	34
I.7.2	Inconvénions	35

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1	Echantillonnage	37
II.1.1	Biomasse lignocellulosique.....	37
II.1.2	Zone d'étude.....	37
II.2	Caractérisation de la biomasse à hydrolyser.....	37
II.2.1	Matière sèche (MS)	37
II.2.2	Matière organique et Minérale (MO et MM).....	39

II.2.3	Cellulose Brute (CB).....	39
II.2.4	Dosage d'azote.....	40
II.2.5	Dosage des éléments minéraux.....	40
II.3.1	Analyse chimique de la zone d'échantillonnage.....	41
II.3.2	Isolement des souches fongiques.....	41
II.3.2.1	Echantillons des palmes sèches.....	43
II.3.2.2	Echantillons du sol subaquatique du barrage de Djorf Torba.....	43
II.3.3	Purification et description des moisissures isolées.....	43
II.3.4	Conservation des souches fongiques isolées.....	43
II.3.5	Sporulation des moisissures.....	44
II.3.6	Identification morphologique des différents isolats	44
II.4	Criblage et sélection des souches fongiques productrices de cellulase.....	46
II.4.1	Condition culturelle	46
II.4.2	Coloration au chromogènes.....	46
II.4.3	Calcul de l'indice enzymatique	46
II.5	Identification moléculaire des souches cellulolytiques performantes.....	47
II.5.1	Préparation des échantillons pour l'étude moléculaire.....	47
II.5.2	Extraction d'ADN.....	47
II.5.3	Amplification de l'ITS de l'ADNr nucléaire par la Polymérase Chain Reaction (PCR).....	48
II.5.4	Séquençage, alignement et arbre phylogénétique	49
II.6	Etude de l'hydrolyse de cellulose contenue dans la palme du palmier dattier.....	49
II.6.1	Prétraitement de la palme	49
II.6.2	Dosage de cellulose libéré dans le prétraitement.....	49
II.7	Hydrolyse de la cellulose contenue dans la palme traitée par <i>Aspergillus</i> <i>iranicus</i> isolat MS-34 et <i>Talaromyces verruculosus</i> isolat MS-43.....	51
II.7.1	Mesure du pH	52
II.7.2	Dosage des sucres réducteurs.....	52
II.7.3	Dosage des protéines.....	52
II.7.4	Dosage de l'activité enzymatique.....	53
II.8	Etude de la cinétique de la cellulase produite par <i>Aspergillus iranicus</i> isolat MS-34 et <i>Talaromyces verruculosus</i> isolat MS-43 en batch- fermentation	55

II.8.1	Dosage des activités enzymatiques.....	55
II.8.2	Caractérisation des activités enzymatiques.....	57
II.8.2.1	Effet du pH.....	57
II.8.2.2	Effet de température.....	57
II.9	Production de Bioéthanol	57
II.9.1	Production de l'enzyme brute.....	57
II.9.2	Dosage des activités cellulolytiques dans le mixte enzymatique.....	58
II.9.3	Hydrolyse enzymatique de la palme.....	58
II.9.4	Fermentation de glucose.....	58
II.89.5	Estimation du taux d'éthanol produit.....	58
II.10	Analyse statistique.....	59

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1	Caractérisation de la palme sèche du palmier dattier	60
III.2	Analyse chimique de l'eau brute du barrage.....	62
III.2.2	Isolement et purification des isolats fongiques.....	64
III.2.3	Identification des souches isolées.....	66
III.2.3.1	Identification du genre	66
III.2.3.2	Identification des espèces.....	66
III.3	Criblages et sélection des souches fongiques productrices des cellulases...	71
III.4	Caractérisation des deux souches cellulolytiques sélectionnées	74
III.4.1	Caractérisation phénotypique.....	74
III.4.2	Caractérisation moléculaire.....	75
III.4.3	Arbres phylogénétiques.....	76
III.5	Etude de l'hydrolyse de celluloses contenues dans la palme du palmier dattier	79
III.5.1	Estimation de cellulose libérée dans chaque prétraitement.....	79
III.5.2	Hydrolyse de la palme sèche par les souches <i>A. iranicus</i> isolat MS-34 et <i>T. verruculosus</i> isolat MS-43.....	81
III.6	Etude de la cinétique de la cellulase produite par <i>A. iranicus</i> souche MS-34 et <i>T. verruculosus</i> isolat MS-43 en batch-fermentation.....	87
III.6.1	Dosage des activités enzymatiques	87
III.7.2	Mesure de la viscosité du CMC.....	90

III.6.3	Estimation de la teneur en protéines.....	90
III.7	Caractérisation des activités enzymatiques.....	92
III.7.1	Activité enzymatique en fonction de la température.....	92
III.7.2	Activité enzymatique en fonction du pH.....	94
III.8	Production de bioéthanol.....	96
III.8.1	Dosage des activités cellulolytiques dans le mixte enzymatique.....	96
III.8.2	Hydrolyse enzymatique et saccharification de la cellulose contenue dans la palme.....	97
III.8.3	Fermentation alcoolique.....	99
Conclusion générale et perspectives.....		101
Références bibliographiques.....		104
Annexes.		

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au cours de ces dernières décennies, l'augmentation de la demande énergétique a connu un rebond extraordinaire partout dans le monde. Les conséquences de la surconsommation des carburants fossiles entraînent leur raréfaction progressive à la fois en production et en découvertes de nouveaux gisements importants. Par ailleurs, à cause de l'importante implication de leur utilisation dans la dégradation environnementale, des appels à des réductions d'utilisation et de remplacement de ce type d'énergie sont de plus en plus réclamés par la communauté internationale. Face à l'épuisement des réserves qui ne sont pas pérennes, les prix ont excessivement augmenté pour devenir inaccessibles à une fraction de la population dans de nombreux pays. Devant ces sérieux problèmes la recherche de sources alternatives d'énergies durables s'impose et fait l'objet de nombreuses recherches et innovations.

Dans ce contexte, les voies alternatives au pétrole sont diversifiées : les énergies solaires, éolienne, marine ou l'hydrogène constituent des exemples d'énergies renouvelables de plus en plus développées. Cependant, dans la nature, il existe un moyen de capter et de stocker l'énergie par photosynthèse sous forme d'une biomasse. L'avantage de cette dernière est sa capacité à générer des carburants aux propriétés analogues à celles du pétrole, c'est-à-dire que le carburant est concentré dans un état liquide léger. Ils sont désignés par agro-carburants ou biocarburants.

La production du bioéthanol comme biocarburant par procédé de fermentation présente des avantages significatifs. Selon un rapport de l'administration américaine, le taux de production de bioéthanol en 2050 sera 50 fois supérieur à celui de 2004 (**Ganguly et al., 2021**). Sur le plan économique, l'éthanol de deuxième génération issu de source lignocellulosique s'avère plus prometteur (**Grippi et al., 2020**).

A l'échelle mondiale, l'Algérie est l'un des grands pays qui cultive le palmier dattier et le premier pays en Afrique du Nord (**Rahman et al., 2022**), avec plus de 19 millions de palmiers en 2023 (**APS, 2023**). On estime que chaque palmier produit un total de 10,8 à 13,5 kg de palmes par an (**Chehema et Longo, 2001**), ce qui équivaut à 0,172 et 0,216 million de tonnes de poids brut de palmes sèches par an. Ce majeur résidu agricole algérien pourrait potentiellement être une matière première intéressante à faible coût pour la transformation en biocarburant. Cependant, la valorisation de toute matière lignocellulosique nécessite une étape de prétraitement pour dégrader le complexe récalcitrant constitué de la lignine et l'hémicellulose (**Bendaoud et al., 2023**). L'élimination de ces barrières rend la cellulose

accessible pour son hydrolyse qui génère des sucres simples fermentescibles pour la production de bioéthanol.

Le prétraitement alcalin a été largement étudié et il s'est avéré efficace pour différents types de biomasse. L'utilisation de l'hydroxyde de potassium (KOH) comme prétraitement chimique alcalin a fait l'objet de récentes études en raison de sa forte activité en délignification (**Jaffar et al., 2016 ; Zahoor et al., 2021**).

Dès lors que la cellulose devient accessible, des enzymes d'origines microbiennes peuvent agir pour l'hydrolyser en glucose. Sous sa forme de complexe enzymatique, la cellulase est l'enzyme responsable de la dégradation de cellulose. Plusieurs sous-types de cellulase se distinguent selon son mode d'action vis-à-vis du substrat en endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.74 et EC 3.2.1.91) et β -glucosidases (EC 3.2.1.21) (**Shah et al., 2019 ; Hebal et al., 2021**).

Il est clairement établi que les champignons filamenteux microscopiques jouent un rôle essentiel dans le recyclage des matières organiques à travers la diversité d'enzymes qu'ils produisent naturellement. *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigates*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.*...etc sont les champignons cellulolytiques les plus étudiés et les plus employés en industrie. (**Roussos et Raimbault, 1982 ; Dashtban et al., 2011 ; Meena et al., 2018**). Les cellulases fongiques sont bien plus simples que celles produites par les bactéries, et ceci est dû à la présence de deux domaines qui sont le domaine catalytique et le domaine de liaison à la cellulose, ce qui facilite leur utilisation (**Srivastava et al., 2019**). Il existe diverses applications de cellulases fongiques, telles que l'industrie alimentaire (clarification des jus, améliorateur de texture et de la qualité du produit, production des boissons alcooliques) et l'industrie du textile et du papier ; elles sont également utilisées dans la fabrication des détergents et dans l'agriculture.

En biotechnologie, la recherche vise à développer la biomasse fongique lignocellulolytique par l'intégration de nouvelles souches fongiques extrêmement actives. De ce fait, la sélection et l'identification de nouvelles espèces performantes sont l'un des moyens les plus efficaces (**Leng, 1996**).

L'hypothèse générale de recherche porte sur le fait que la palme sèche du palmier dattier constitue une bonne matière organique hydrolysable en sucres fermentescibles. Les champignons cellulolytiques se trouvent souvent sur des végétaux et aussi dans des endroits

humides. C'est la raison pour laquelle nous les avons recherché et tenté de les isoler à partir des échantillons de la palme et dans le sol subaquatique du barrage de Djorf Torba. Par la suite, ces souches fongiques sélectionnées, ont été exploitées pour hydrolyser la poudre de la palme sèche traitée et non traitée pour produire du glucose. Le sucre obtenu est par la suite fermenté par la levure industrielle *Saccharomyces cerevisiae*. Enfin à l'issue de cette fermentation le rendement en bioéthanol est évalué.

Dans cette étude qui vise l'utilisation des résidus du palmier dattier comme matière première disponible pour la production du bioéthanol, les objectifs spécifiques sont déclinés comme suit :

- Etude de la composition chimique de la biomasse (la palme sèche) à hydrolyser ;
- Isolement des souches fongiques possédant des activités cellulases ;
- Identification des isolats et sélection des souches cellulolytiques les plus performantes dans l'ensemble des moisissures ;
- Identification moléculaire des souches cellulolytiques performantes ;
- Prétraitement de la biomasse du palmier dattier à hydrolyser ;
- Tests d'hydrolyse de cellulose contenue dans la palme du palmier dattier par les souches fongiques sélectionnées ;
- Evaluation des activités enzymatiques des deux souches fongiques dans les milieux d'hydrolyse ;
- Etude de la cinétique des enzymes cellulolytiques et caractérisation de leurs activités enzymatiques ;
- Transformation de cellulose de la palme sèche en sucre fermentescible à l'aide des extraits enzymatiques des deux souches fongiques ;
- Essais de la fermentation et la production du bioéthanol et évaluation du rendement en bioéthanol.

Le manuscrit de cette présente thèse est structuré en trois chapitres. Le premier chapitre est dédié à une synthèse bibliographique. Cette dernière englobe des généralités sur le palmier dattier et l'exploitation de ses sous-produits ; structure, composition et dégradation de la lignocellulose ; le bioéthanol de deuxième génération et le processus de fermentation ; l'enzyme cellulase d'origine fongique, sa classification et son mode d'action et en dernier lieu, les avantages et les inconvénients du bioéthanol de 2^{ème} génération. Le second chapitre détaille l'étude expérimentale et les différentes méthodes utilisées durant la réalisation de cette étude.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus et la discussion. Nous terminons ce manuscrit par une conclusion et des perspectives de recherche.

CHAPITRE I:
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Palmier dattier et ses co-produits

I. 1.1 Généralités sur le palmier dattier

Le palmier est un élément d'une vaste famille végétale de presque 3000 espèces. Il appartient à une des plus importantes familles parmi la classe des Monocotylédones C'est la famille des PALMAES (Albano, 2006) (Tableau I.1). L'aspect botanique du palmier dattier (*Phoenix dactyliferae* L.) a été décrit dans plusieurs ouvrages (More et White, 2005 ; Albano, 2006).

Tableau I.1 : Classification botanique du palmier dattier (Albano, 2006 ; Krueger, 2021).

<u>Embranchement :</u>	SERMAPHYTES (plante à graines)
<u>Sous-embranchement :</u>	ANGIOSPERMES (plante à fleurs)
<u>Classe :</u>	MONOCOTYLEDONES
<u>Ordre :</u>	ARECALES
<u>Famille :</u>	ARECACEAE (PALMAE)
<u>Sous-famille :</u>	Coryphoidées
<u>Genre :</u>	<i>Phoenix</i>
<u>Espèce :</u>	<i>Phoenix dactylifera</i> L.

C'est un arbre arborescent à tronc monopodique (Figure I.1), d'une hauteur qui peut dépasser les 20 mètres (Albano, 2006). Son stipe marqué de cicatrices foliaires comprend des faisceaux libéroligneux qui relient chaque racine à une palme donnée. Il est doté d'un simple bourgeon terminal ou zone de croissance en longueur. Le stipe est marqué de cicatrices foliaires.

Le système racinaire qui se présente en quatre zones (I, II, III, IV) d'enracinement est très développé. Il comprend une racine primaire unique et temporaire et des racines secondaires grêles, longues, obliques ou horizontales, parfois aériennes. Le bulbe, ou plateau racinal, est volumineux et émerge en partie au-dessus du niveau du sol (Toutain, 1967 ; Boulanouar, 2015).

Les palmes (djerid) sont insérées, en hélices très rapprochées, sur le stipe par une gaine pétiolaire bien développée (cornaf) enfouie dans un fibrillum, feutrage appelé lif ; leur pétiole (rachis) est semi-cylindrique, épineux vers la base (chouque) et constamment dure ; le limbe, entier et fripé au début de la croissance, se développe ensuite, découpé en folioles ; sa nervation est pennée. Le limbe des folioles à cuticule épaisse est toujours coriace et recouvert d'une mince

couche de cire. La nervure de chaque foliole fait saillie à la face inférieure, les folioles sont redoublées (Toutain, 1967).

Inflorescence dioïque, les fleurs mâles sont courtes en grappes dressées, les fleurs femelles sont tombantes et à pétales brunes. Le fruit consiste en une graine de 3-7 cm comestible et sucrée (More et White, 2005).

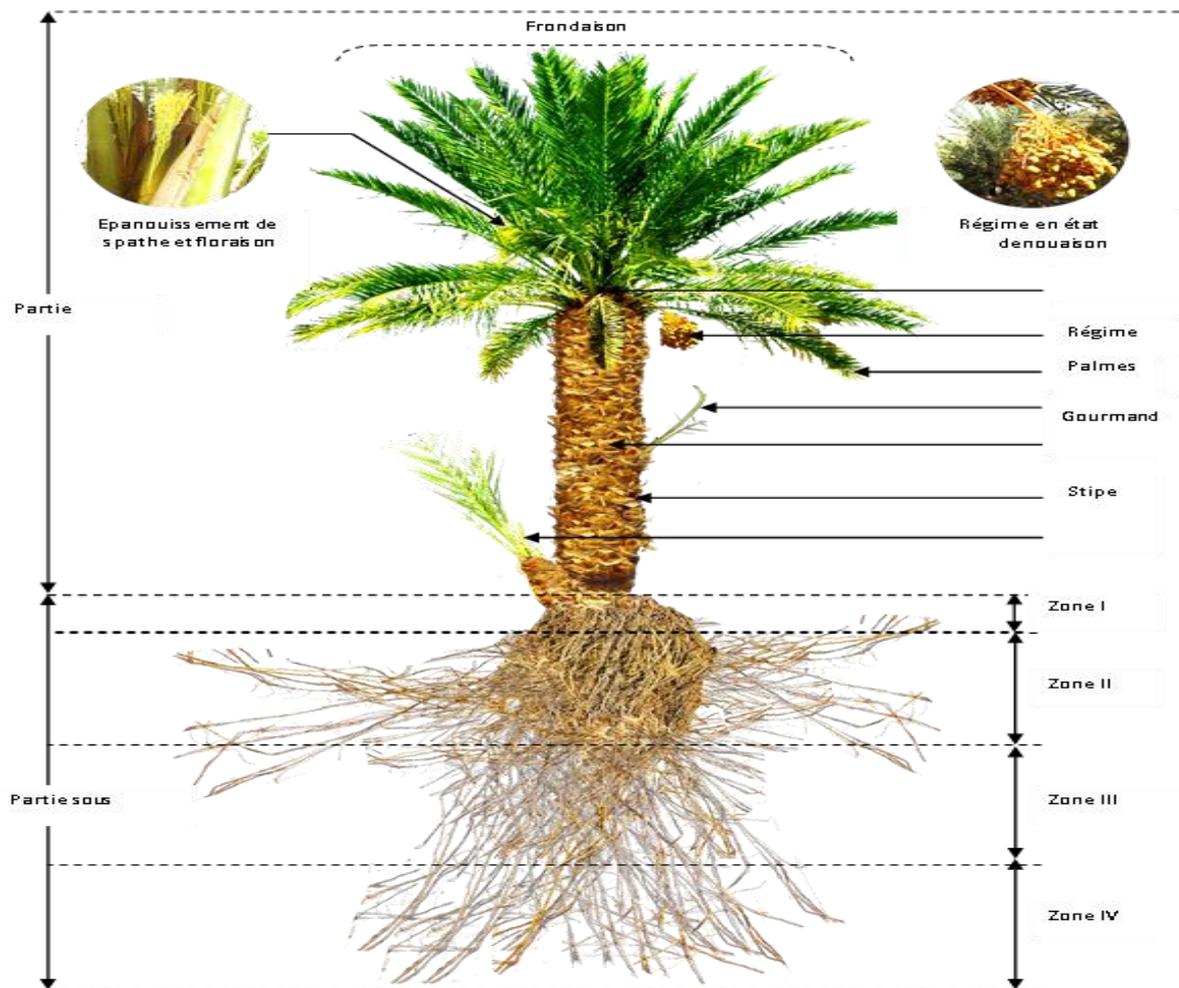


Figure I.1 : Présentation schématique du palmier dattier (Boulanouar, 2015).

I.1.2 Palmeraie de la Saoura

La vallée de la Saoura jalonnée de luxuriantes oasis (Igli, Béni Abbès, Louata...etc.), dispose d'une certaine abondance d'eau. Elle résulte de la jonction des oueds Guir et la Zouzfana qui représente un principal cours d'eau du Sahara Nord Occidental de l'Algérie. Elle

est bordée à l'Est par le Grand Erg occidental, à l'ouest par la Hamada du Guir (Mio-Pliocène) et la Petite Hamada (**Merzougui et al., 2007**). Sa capitale Béchar occupe une position avantageée surtout par sa position géographique qui la situe en plein cœur des différentes liaisons qui traversent le désert du Sahara et surnommée "la porte du désert". Ainsi, il est connu que la palmeraie de Béchar est l'une des plus importantes de la Saoura (**Benyoucef, 2012**). Selon Algérie Presse service (**2017**), les communes de la wilaya de Béchar et Béni Abbès s'étendent sur 4.509 hectares et hébergent 657.850 palmiers.

I.1.3 Domaines d'exploitation des résidus du palmier dattier

Outre sa production de dattes pour l'alimentation humaine, le palmier dattier offre une large gamme de sous-produits exploités par la population saharienne (**Chehma et Longo, 2001**), à savoir :

- ✓ Les dattes non consommables se transforment en vinaigre, levures, et sirop par fermentation microbiologiques ;
- ✓ La farine de dattes peut être utilisée dans la panification ;
- ✓ Production des bio-alcools à partir des déchets de dattes riches en sucres fermentescibles (**Kaidi et Touzi, 2001**) ;
- ✓ Production de biomasse et protéines d'organisme unicellulaires (P.O.U) qui constituent une voie potentiellement importante pour résoudre les problèmes cruciaux posés par le déficit en protéines alimentaires (**Bessah et Touzi, 2001**), l'exemple de la culture *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu à base de dattes (**Espiard, 2002**) ;
- ✓ Jus de dattes, par extraction, utilisé comme sucrerie ;
- ✓ Tronc d'arbre, utilisé dans l'ébénisterie traditionnelle, bois de chauffage et charpentes de bâtiments ;
- ✓ Palmes sèches, utilisées comme clôtures, brises vent, dans la confection de couffins, de chapeaux, etc., ils peuvent même servir en industrie de papier ;
- ✓ Les régimes de dattes, comme balais traditionnels, et comme combustibles ;
- ✓ Le lif pour la confection des semelles de sandales ;
- ✓ Le laghmi, boisson très recherchée par la population locale, représentant la sève qui s'écoule du stipe ;
- ✓ Les noyaux de dattes, outre leur utilisation pour les nouvelles plantations, constituent une biomasse locale, disponible et bon marché. Ses potentialités d'utilisation sont immenses et peuvent intéresser les différents secteurs de l'activité humaine telle les industries agro-alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (**Lecheb, 2010**) ;

- ✓ Les sous-produits les plus utilisés dans l'alimentation de bétail sont principalement, les déchets de dattes, puis viennent les pédicelles de dattes et les palmes sèches.

I.2 Composition de la lignocellulose et structure de cellulose

I.2.1 Lignocellulose

Les hydrates de carbone des biomasses lignocellulosiques sont séparés en deux catégories : les hydrates de carbone non structuraux comme les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides de réserves et les hydrates de carbone structuraux (dont la dénomination plus commune de « polysaccharides structuraux » (**Godin et al., 2011**))

La paroi cellulaire des biomasses lignocellulosiques est constituée d'une grande diversité de ces polysaccharides structuraux qui sont divisés en différentes catégories : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (**Figure I.2**). Ces composés sont liés à des protéines pariétales (riches en acides aminés, soit de type hydroxyproline, soit de type thréonine-hydroxyproline, ou de type glycine) et à des polyphénols, plus particulièrement la lignine (**Poirier, 2004**).

Les polysaccharides structuraux et la lignine sont les constituants les plus abondants dans la paroi cellulaire (**Figure I.3**). Ces macromolécules s'entremêlent et forment une structure tridimensionnelle complexe et très résistante, maintenue par des liaisons hydrogène et des liaisons covalentes qui résistent aux attaques de phyto-pathogènes et qui confèrent de la rigidité aux plantes (**Wertz, 2010**). La proportion et la nature de chacune des macromolécules sont en fonction de l'origine botanique de la matière (**Saidi, 2011**) (**Tableau I.2**).

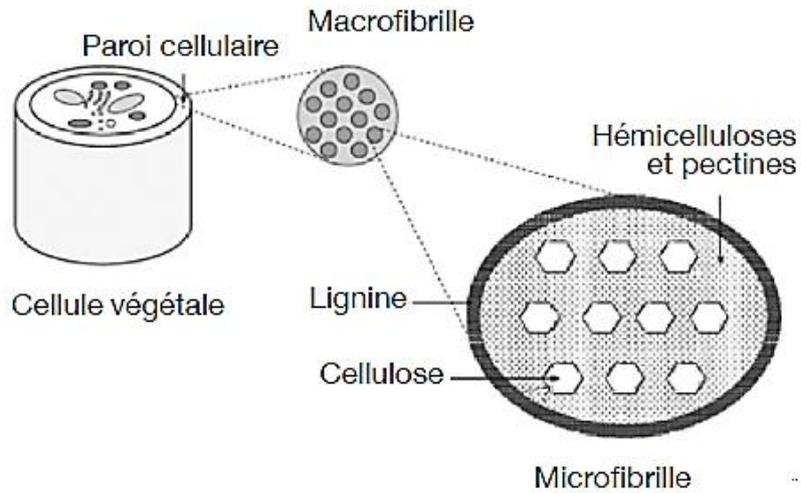


Figure I.2 : Organisation des polysaccharides structuraux et de la lignine dans les parois cellulaires des biomasses lignocellulosiques (adapté de Zhang, 2008 in Godin *et al.*, 2011)

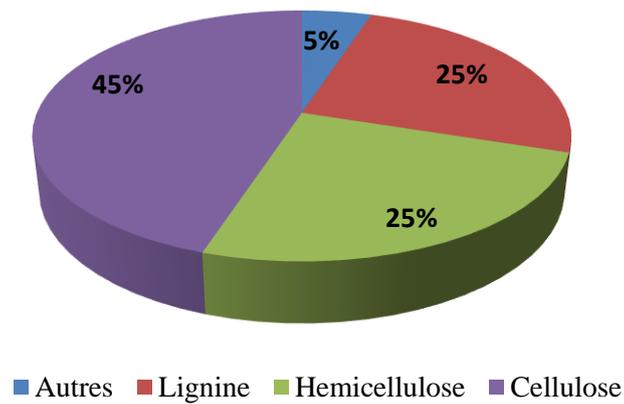


Figure I.3 : Composition typique de la biomasse lignocellulosique (Wertz, 2010).

Tableau I.2 : Composition de biomasse lignocellulosique (Sun et Cheng, 2002)

	Cellulose (%)	Hémi-Cellulose (%)	Lignine (%)
Bois dur	40-55	24-40	18-25
Bois tendre	45-50	25-35	25-35
Pailles	30-43	22-35	15-23
Herbes	25-40	35-50	10-30

I.2.2 Structure de polysaccharide « cellulose »

La cellulose est constituée par un enchainement de cycle glucopyranose. Ce sont des unités de D-glucopyranoside réunies par des liaisons (1→4) dans de longues chaînes non ramifiées (Solomons et Fryhle, 2000). Les liaisons sont de type β-glucosidiques (C1(β)-C4), de sorte que le motif principal répété « n » fois, correspond à la structure du β-cellobiose (Jamart *et al.*, 2006) (Figure I.4)

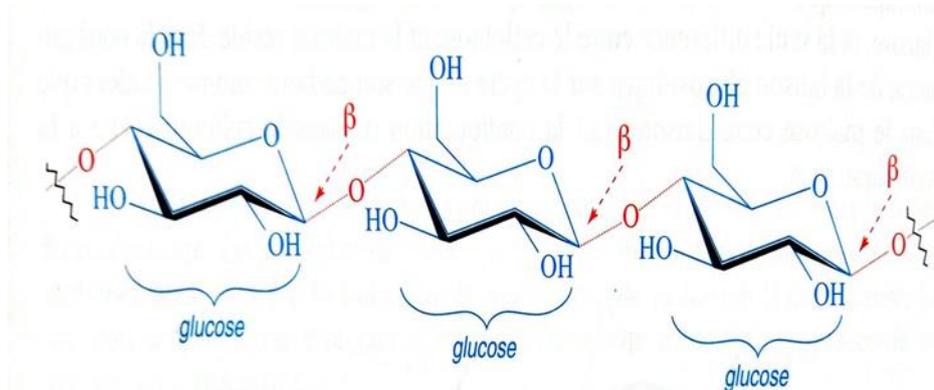


Figure I.4 : Structure β-cellobiose (Jamart *et al.*, 2006)

La valeur de n n'est pas connue avec précision (les méthodes de détection de la masse moléculaire utilisables sont imprécises et risquent de provoquer une dégradation partielle des chaînes) (Figure I.5), mais on considère 1500 comme une valeur vraisemblable, ce qui correspond à une masse moléculaire de l'ordre de 500 000.

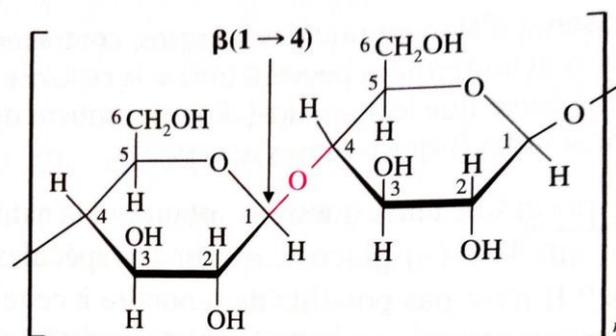


Figure I.5 : Portion d'une chaîne de cellulose. Les liaisons glucosidiques sont de type β (1→4) (Solomons et Fryhle, 2000).

La cellulose est insoluble dans l'eau, mais son hydrolyse complète, (par ébullition avec un acide dilué ou par voie enzymatique) donne du cellobiose puis du glucose (**Jamart et al., 2006**). En effet, les propriétés de la cellulose dépendent de la taille du polymère, qui dépend de l'âge de la cellule (**Tableau I.3**). Plus la cellule vieillit plus le polymère sera important.

Tableau I.3 : Propriétés physiques et chimiques de la cellulose (**Jamart et al., 2006**)

Propriétés de la cellulose	
Propriétés physiques	Propriétés chimiques
<ul style="list-style-type: none">• Résistance mécanique (la résistance d'un fil de cellulose est identique à celle d'un fil de cuivre de même diamètre) ;• Déformable ce qui confère une certaine souplesse et élasticité à la membrane ;• Perméabilité au gaz et à l'eau, grâce à une structure capillaire des microfibrilles.	<ul style="list-style-type: none">• Totalement insoluble dans la plupart des solvants ;• Molécule hygrophile qui absorbe de l'eau sans être soluble ;• Résistance aux attaques chimiques et enzymatiques ;• Biodégradation liée à la cellulase.

I.3 Concept de la dégradation de la biomasse lignocellulosique (BLC)

La lignocellulosique est considérée comme une source d'énergie renouvelable (**Typesetting et al., 2007**). Les ressources de biomasse lignocellulosique proviennent des résidus agricoles et forestiers et des sous-produits de transformation du bois, qu'il s'agisse de plantes ligneuses ou de plantes herbacées. Comme nous avons cité auparavant, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont les composantes principales de la lignocellulosique. La cellulose et l'hémicellulose peuvent être hydrolysées par des enzymes ou par des produits chimiques en sucre simple, ensuite, ce dernier converti par processus biologique en bio-alcool. En effet, ces trois composantes peuvent aussi être converties en gaz ou syngas (gaz de synthèse) par le processus de gazéification. Ainsi, La conversion des syngas donne de l'éthanol et de l'éther (**Drapcho et al., 2008**).

I.3.1 Voies de conversion de la BLC

La conversion comprend deux procédures : l'hydrolyse de la cellulose dans la matière lignocellulosiques en sucres réducteurs fermentescibles et la fermentation des sucres en éthanol (Sun et Cheng, 2002). Deux voies se dessinent pour transformer la biomasse lignocellulosique en biocarburant : la voie thermochimique et la voie biochimique. La conversion thermochimique implique essentiellement la gazéification, ou autres procédés thermiques de la biomasse, suivie de la synthèse catalytique ou de la formation du gaz ou du liquide qui en résulte en biocarburants. Tandis que, la conversion biochimique implique essentiellement l'hydrolyse des polysaccharides de la biomasse, et la fermentation des sucres qui en résultent en éthanol (Wertz, 2010). Toutefois, avec le développement des procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique en éthanol, les voies de conversion sont regroupées en : voie physique, chimique, biologique et multiple (hybride), la Figure I.6 présente une synthèse sur les différents prétraitements. Les stratégies de prétraitements hybrides sont généralement plus efficaces dans l'amélioration de la digestibilité de la BLC, ils sont souvent utilisés pour concevoir des technologies avancées de prétraitement. (Abdou Alio, 2020).

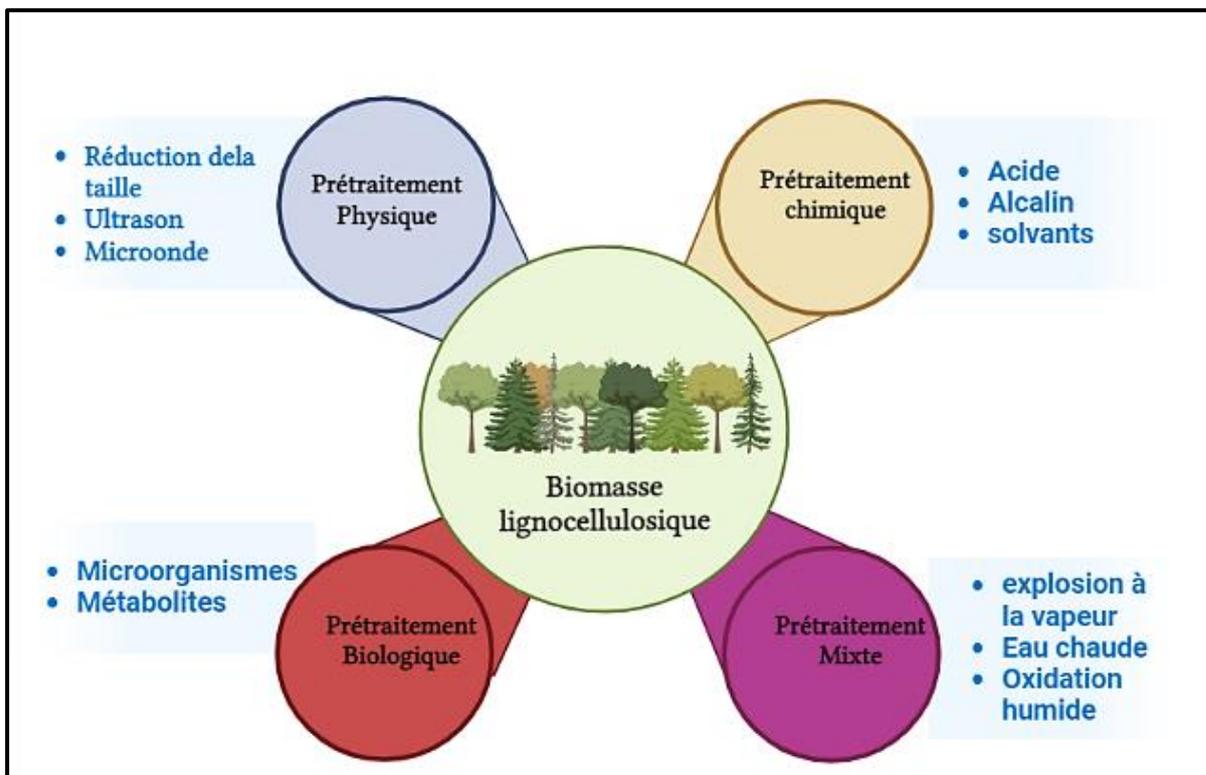


Figure I.6 : Voies de conversion de la BLC

I.4 Bioéthanol de deuxième génération

I.4.1 Ethanol et ses utilisations

L'éthanol ou l'alcool éthylique, est un composé chimique dont la formule moléculaire $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$. Il n'est rien de plus que l'alcool contenu dans les boissons alcoolisées qui sont fabriquées depuis la nuit des temps. L'éthanol est le biocarburant liquide le plus utilisé (Typesetting *et al.*, 2007 ; Demirbas, 2008), il est le produit de la fermentation des sucres. Cependant, Le bioéthanol est de l'éthanol élaboré à partir de biomasse, autrement appelé éthanol cellulosique (Van Heiningen, 2006 ; Srivastava *et al.*, 2017). Le tableau I.4 illustre les propriétés physico-chimiques de l'éthanol.

Tableau I.4 : Propriétés physico-chimiques de l'éthanol (Ruan *et al.*, 2019)

Propriétés	Éthanol
Formule	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
Poids moléculaire	46,07 g.mol ⁻¹
Densité (densité relative) à 15 °C	106–110
Point de congélation	- 114 °C
Point d'ébullition	78 °C
Pression de vapeur à 38 °C	15,9 kPa
Chaleur spécifique	2,4 kJ/kg/K
Viscosité à 20 °C	1,19 mPa.s
Pouvoir calorifique inférieur	21,1 kJ/L
Point d'éclair	13 °C
Température d'auto-inflammation	423 °C
Limite inférieure d'inflammabilité	4,3 % vol
Limite supérieure d'inflammabilité	19,0 % vol

L'éthanol est utilisé dans divers domaines et rentre dans la composition d'un grand nombre de produits. Il est exploité comme solvant dans l'industrie des peintures et vernis, dans la production de l'encre, les matières plastiques, les adhésifs, les explosifs, les parfums, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et des produits alimentaires. En chimie, il est utilisé comme précurseur pour la production de nombreux composés (acide acétique, acrylate d'éthyle, acétate d'éthyle, éthers de glycol, éthylamine, éthylène, éthersoxydes notamment l'ETBE (éthyl- tert-butyl-éther)) (INRS, 2019).

Ainsi, le bioéthanol (éthanol obtenu produit à partir de matières premières végétales), peut être utilisé seul ou avec de l'essence comme biocarburant (Demirbas, 2008 ; Srivastava *et al.*, 2017 ; INRS, 2019) ; L'éthanol est actuellement proposé aux automobilistes, les mélanges essence-éthanol renferment 5 à 85 % de bioéthanol selon le type du carburant et les pays. Par exemple, les Etats-Unis, le Brésil et la Chine sont les pays fortement engagés dans la production des biocarburants (Tableau I.5).

D'après les projections, la production mondiale d'éthanol et de biodiesel augmentera pour atteindre respectivement 140 milliards de litres et 55 milliards de litres en 2031, poussée par l'expansion du marché dans les pays asiatiques qui encouragent la production intérieure à l'aide de subventions, de crédits d'impôts et de prêts d'investissement assortis de faibles taux d'intérêt (OCDE/FAO, 2022). Les matières premières utilisées pour la fabrication des biocarburants varient selon les pays. Les matières premières traditionnelles demeureront prédominantes, même si de nombreux pays sont de plus en plus sensibles à la durabilité du secteur.

Tableau I.5 : Classement des pays producteurs de biocarburants et principales matières premières (OCDE/FAO, 2022).

Pays	Rang (période de référence)		Principales matières premières	
	Éthanol	Biodiesels	Éthanol	Biodiesels
États-Unis	1 (46.7 %)	2 (18.4 %)	Maïs	Huile de soja, huiles de cuisson usagées
Union européenne	4 (4.9 %)	1 (30.7 %)	Betterave sucrière, blé, maïs	Huile de colza, huile de palme, huiles de cuisson usagées
Brésil	2 (26.3 %)	4 (13.1 %)	Canne à sucre, maïs	Huile de soja
Chine	3 (8.4 %)	8 (2.8 %)	Maïs, manioc	Huiles de cuisson usagées
Inde	5 (2.9 %)	14 (0.4 %)	Mélasse, canne à sucre, maïs, blé, riz	Huiles de cuisson usagées
Canada	6 (1.6 %)	13 (0.8 %)	Maïs, blé	Huile de colza, huiles de cuisson usagées, huile de soja
Indonésie	20 (0.1 %)	3 (17.5 %)	Mélasse	Huile de palme
Argentine	8 (0.9 %)	5 (3.6 %)	Mélasse, canne à sucre, maïs	Huile de soja
Thaïlande	7 (1.4 %)	7 (3.0 %)	Mélasse, manioc, canne à sucre	Huile de palme
Colombie	14 (0.4 %)	11 (1.3 %)	Canne à sucre	Huile de palme
Paraguay	11 (0.5 %)	18 (0.02 %)	Maïs, canne à sucre	Huile de soja

I.4.2 Classification de l'éthanol

Selon le procédé de production utilisé, on peut classer l'éthanol selon son origine en deux catégories : éthanol non renouvelable et éthanol renouvelable bio source de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération (**Figure I.7**).

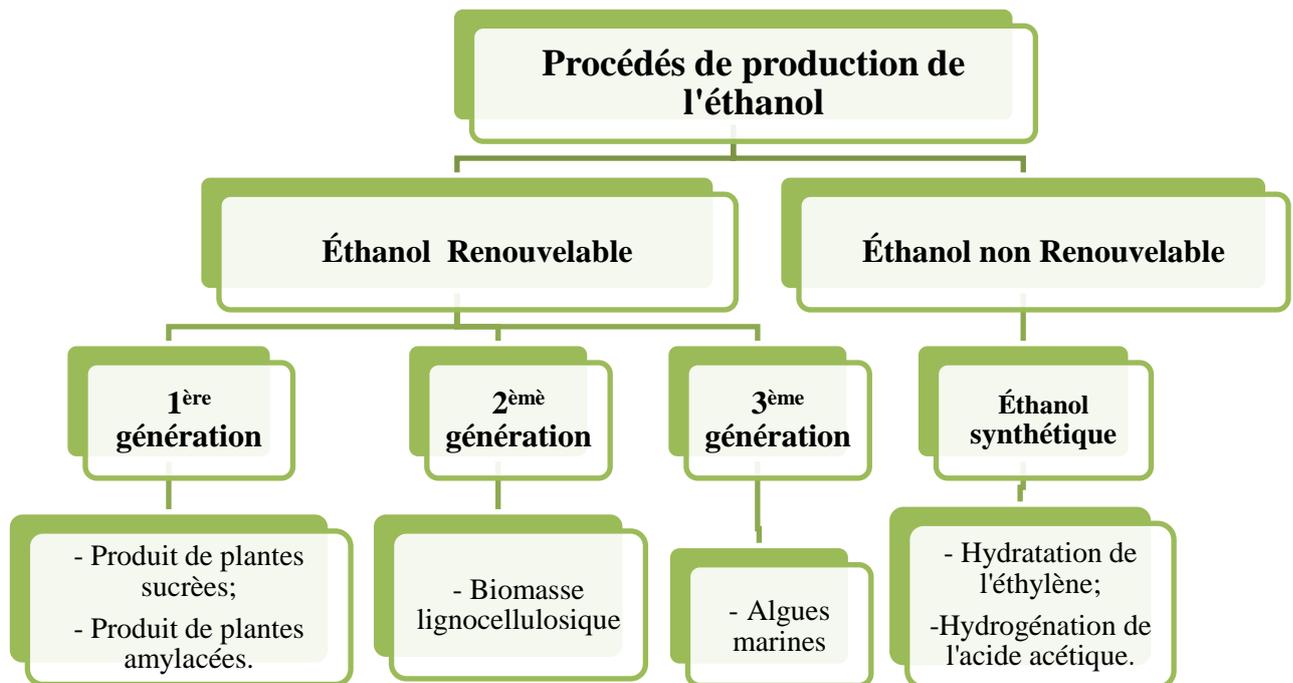


Figure I.7 : Synthèse des différents procédés de production d'éthanol (**Abdou Alio, 2020**).

I.4.2.1 Bioéthanol de 1^{ère} génération

L'éthanol de première génération est produit directement à partir des substrats riches en sucre de certaines cultures (canne à sucre, betterave sucrière, etc) et en amidon (maïs, orge, blé, pomme de terre, etc.). La production est réalisée en convertissant le saccharose ou les monosaccharides, en particulier le glucose en éthanol par fermentation grâce à la métabolisation par des micro-organismes (**Lennartsson *et al.*, 2014 ; De Almeida et Colombo, 2021**) (**Figure I.8**). Dans ce type de procédé, le prétraitement consiste principalement en une élimination des impuretés et une désinfection des matières contenant du saccharose (**Abdou Alio, 2020**). Cependant, cette base de matières premières ne sera pas totalement durable, car de vastes plantations de plantes destinées à la production d'éthanol entreront en concurrence avec la

plantation de plantes alimentaires sur des terres cultivables limitées, ce qui pourrait entraîner une crise alimentaire (Binod *et al.*, 2010).

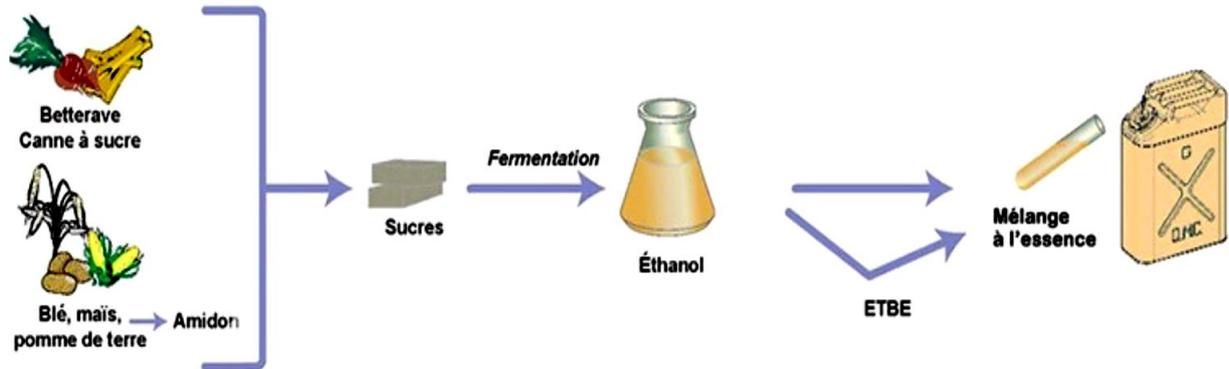


Figure I.8 : Description synthétique de la voie de production de bioéthanol de première génération (IFPEN, 2017).

I.4.2.2 Bioéthanol de 2^{ème} génération

Le bioéthanol de deuxième génération est produit à partir de ressources renouvelables non alimentaires (Abdou Alio, 2020). Ce sont les matières premières lignocellulosiques, y compris les plantes qui ne proviennent pas de cultures destinées à l'alimentation, comme le panic raide et les arbres, et les matières résiduelles (comme les déchets solides, les déchets municipaux, les résidus de transformation du bois et les déchets agricoles) (Demirbas, 2008 ; Lennartsson *et al.*, 2014 ; De Almeida et Colombo, 2021) (Figure I.9).

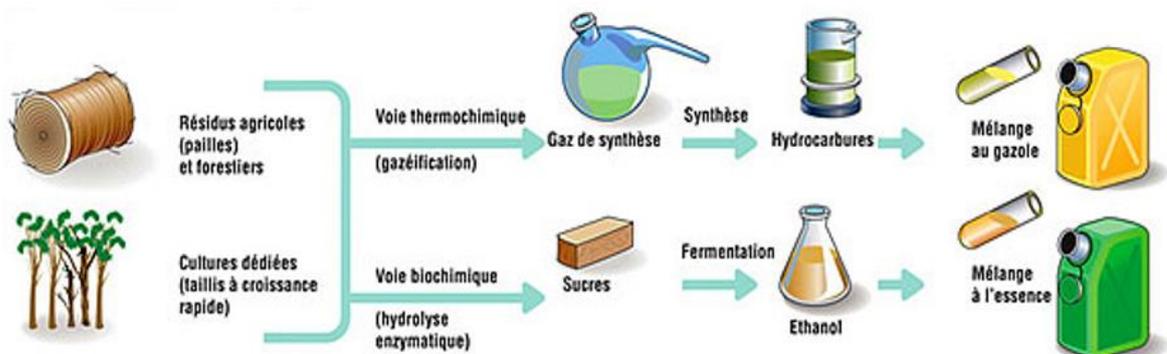


Figure I.9 : Classification des différentes voies d'obtention du bioéthanol de 2^{ème} génération (IFPEN, 2017).

La biomasse lignocellulosique est une matière première intéressante ; étant donné qu'elle constitue une ressource renouvelable de manière durable. De plus, elle dispose d'excellentes propriétés environnementales puisque sa transformation ne génère pas de rejet important de dioxyde de carbone ou de soufre. Sur le plan économique, elle pourrait avoir un potentiel important à cause de l'augmentation constante des prix des combustibles fossiles (Abdou Alio, 2020).

I.4.2.3 Bioéthanol de 3^{ème} génération

Les algues marines sont la nouvelle alternative prometteuse pour la production de bioéthanol, en fonction de leurs structures et de leur composition. L'avantage principal de cette biomasse renouvelable c'est sa croissance rapide et durable (Razif *et al.*, 2014 ; Kamyab *et al.*, 2016). Etant donné que les algues marines ont une teneur élevée en glucides dans leur composition, elles sont capables de produire près de 60 fois plus d'alcool que les autres matières premières agricoles ou forestières (Phwan *et al.*, 2018). Toutefois, cet avantage majeur s'oppose à un défi qui limite son utilisation, car la présence du polymère hydrocolloïde dans la paroi cellulaire des algues, la rend plus solide et donc la nécessité d'un prétraitement coûteux (représente environ 20 % du coût de production) pour dégrader ces structures complexes (Guedes *et al.*, 2019) (Figure I.10).

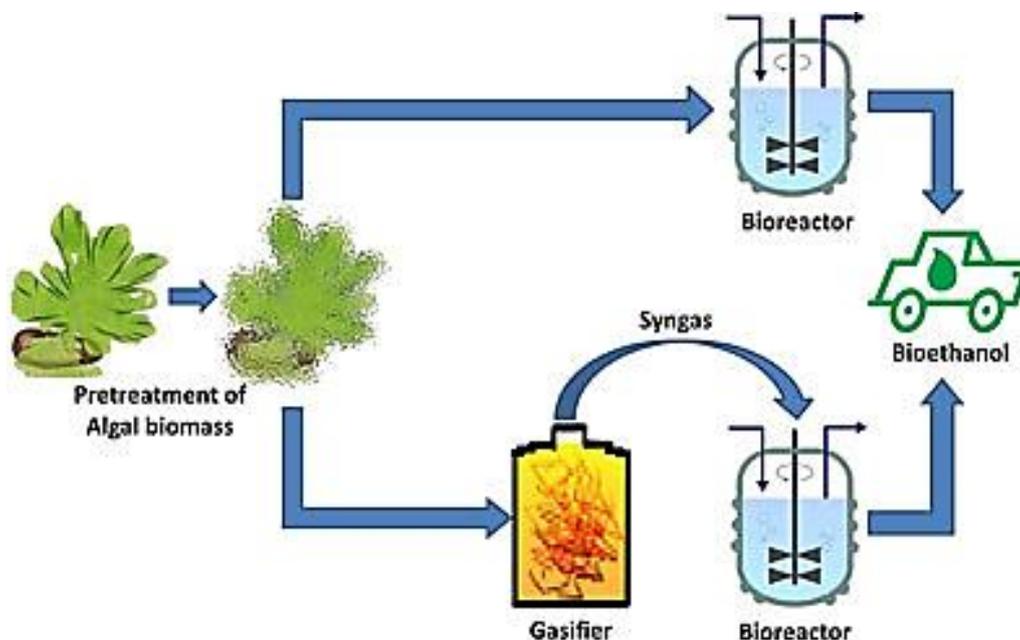


Figure I.10 : Description synthétique de la voie de production de bioéthanol de troisième génération (Razif *et al.*, 2014)

✚ Les biocarburants de deuxième et troisième génération comme le bioéthanol sont également appelés biocarburants avancés, parce que les techniques ou mécanismes utilisés dans leur production sont encore en phase de recherche et de développement, ou en phase pilote ou d'adaptation pour la production à grande échelle (**Drapcho et al., 2008 ; De Almeida et Colombo, 2021**).

✚ Vu que notre recherche dans cette étude est liée à la production du bioéthanol de deuxième génération, la synthèse bibliographique qui suit va se focaliser sur les procédés de production de Bioéthanol de deuxième génération et sur l'hydrolyse biologique de la biomasse.

I.5 Procédés de production de l'éthanol de 2^{ème} génération

Le processus de bioconversion de la biomasse lignocellulosique (BLC) en éthanol comprend plusieurs étapes. La première étape est le prétraitement de la biomasse, suivie par l'hydrolyse enzymatique biologique et en fin la fermentation et la récupération de l'éthanol (**Figure I.11**). Une bonne combinaison de chaque étape est importante pour obtenir un rendement plus élevé en bioéthanol d'une manière rentable et durable (**Saini et al., 2015**).

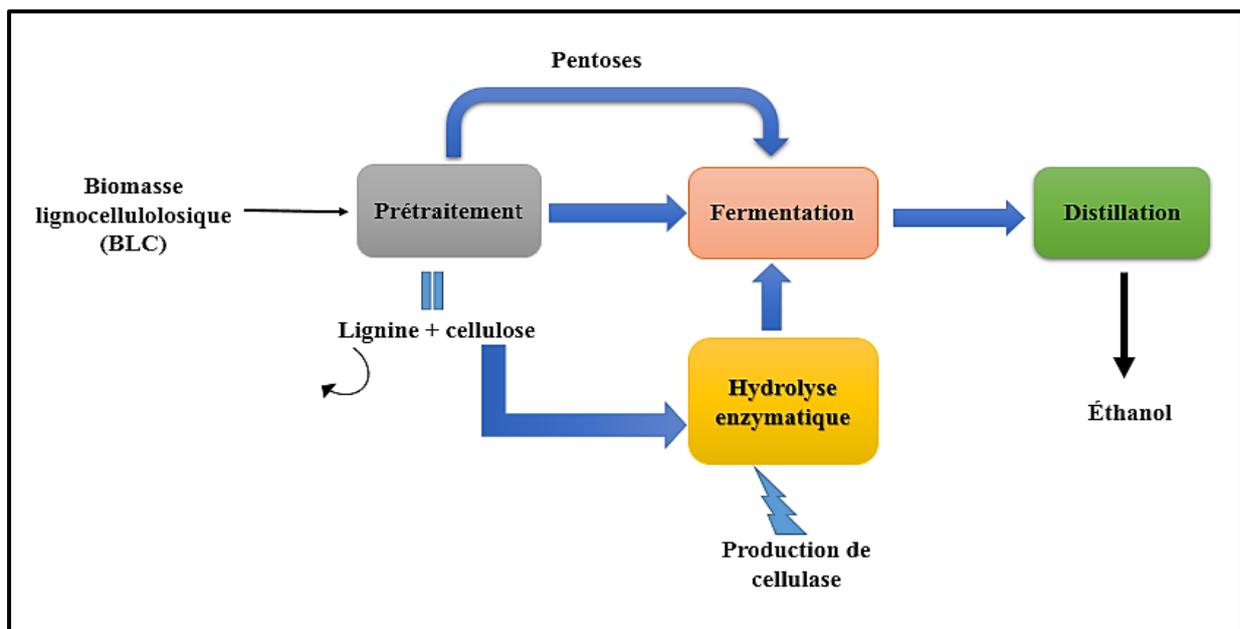


Figure I.11 : Principales étapes du processus de bioconversion de la BLC en éthanol (Originale, 2023).

I.5.1 Prétraitement de la BLC

Le prétraitement est une étape clef dans le processus de bioconversion car il est nécessaire pour décomposer la structure de la lignine et des hémicelluloses, réduire la cristallinité et augmenter la porosité de la cellulose afin de la rendre accessible aux enzymes et permettre ainsi son hydrolyse. Comme nous avons vu dans la section **III.1**, il existe plusieurs méthodes de prétraitement. Chaque prétraitement a ses caractéristiques, ses avantages et ses inconvénients.

I.5.1.1 Prétraitement physique

Il existe différentes méthodes mécaniques pour la réduction de la taille de la BLC comme la fragmentation, le déchiquetage et le broyage. Ces méthodes visent à améliorer la digestibilité, à augmenter la surface spécifique et à réduire le degré de polymérisation et la cristallinité de la cellulose (**Sun et Cheng, 2002 ; Saini et al., 2014**). L'objectif du broyage est de réduire les limitations de transfert de chaleur et de masse. Il est plus efficace pour réduire la taille des particules et la cristallinité de la cellulose. Par ailleurs, une autre forme de prétraitement physique est suggérée, c'est la technique d'irradiation. Elle consiste à utiliser le rayonnement gamma qui clive les liaisons β -1,4 glycosidiques, permettant d'obtenir une surface plus grande et une cristallinité inférieure. Néanmoins, les techniques d'irradiation ont été décrites comme inefficaces, lentes, coûteuses en énergie et économiquement non viables (**Ogier et al., 1999 ; Abdou Alio, 2020**)

I.5.1.2 Prétraitement chimique

Les méthodes de prétraitement chimiques impliquent généralement des techniques hydrolytiques utilisant des acides et des alcalis, bien que des agents oxydants aient également été envisagés (**Tableau I.6**). L'utilisation de tels réactifs chimiques cause une dégradation élevée des polysaccharides. Ainsi, les hémicelluloses de structure hétérogène et de faible degré de polymérisation sont hydrolysées en premier. Quant à l'hydrolyse de la cellulose, elle est plus difficile à cause de sa structure cristalline et son étroite association avec la lignine. Cependant, une hydrolyse totale de la cellulose représente l'objectif principale de ces procédés, tout en évitant la dégradation des sucres (**Ogier et al., 1999 ; Mousdale, 2008**).

Il a été rapporté que le prétraitement alcalin améliore efficacement le rendement d'hydrolyse (**Liu et al., 2015**). La première action du prétraitement alcalin est la solvatisation et la saponification des liaisons esters intermoléculaires entre la lignine et l'hémicellulose et entre

la lignine et la cellulose. De plus, le prétraitement alcalin peut provoquer un gonflement de la cellulose, augmenter la surface spécifique, diminuer la polymérisation et déstabiliser la structure de la lignine, comme il améliore l'exposition de la cellulose aux attaques enzymatiques et à la dégradation des autres glucides (Chandra *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2015).

Tableau I.6 : Principaux méthodes du prétraitement chimique et physicochimique de la BLC (Mousdale, 2008).

Principes	Solubilisation de l'hémicellulose	Délignification et élimination de l'hémicellulose	Délignification
Méthodes chimiques	Acide	Alcalis	Solvants
	Sulfurique dilué	Hydroxyde de sodium	Méthanol
	Chlorhydrique dilué	Hydroxyde de sodium+ peroxyde	Ethanol
	Nitrique dilué	L'exposition à l'hydroxyde de sodium	Acétone
	Phosphorique dilué	Ammoniac aqueux	
	Vapeur d'acide sulfurique	Hydroxyde du calcium	
	Imprégnation		
	L'explosion à l'acide sulfurique		
	L'explosion au dioxyde de carbone		
	L'explosion au dioxyde de soufre		

I.5.1.3 Prétraitement physicochimique

Ce prétraitement est un exemple des prétraitements hybrides. Dans cette catégorie de prétraitement, des paramètres physiques comme la température ou la pression sont combinés à des traitements chimiques. Il est majoritaire dans les technologies de prétraitement, tel que le prétraitement à la vapeur (ou explosion à la vapeur), le prétraitement à l'eau chaude, le prétraitement par oxydation humide, le recyclage par percolation de l'ammoniac, l'explosion à l'ammoniac ou le prétraitement à l'ammoniac aqueux (**Abdou Alio, 2020**).

I.5.1.4 Prétraitement biologique

Contrairement aux autres types physiques et chimiques, le prétraitement biologique est considéré comme un processus qui présente plusieurs avantages : faible consommation énergétique, aucune exigence en matériels et inoffensivité pour l'environnement (**Mousdale, 2008 ; Abdou Alio, 2020**). Par contre, la nécessité d'une période de temps élevée pour la dégradation des polysaccharides réduit l'intérêt pour ce type de prétraitement. Les prétraitements biologiques sont principalement associés à l'action de champignons producteurs d'enzymes capables de dégrader la lignine, l'hémicellulose et les polyphénols (**Ogier et al., 1999**). C'est pourquoi, le choix de ou des microorganismes est d'une importance judicieuse dans ce prétraitement. La BLC est soumise à l'action de champignons de la pourriture blanche (*Basidiomycètes*), de la pourriture molle et de la pourriture brune. Cette dernière attaque principalement la cellulose, tandis que la pourriture blanche et la pourriture molle attaquent à la fois la lignine et la cellulose via la production des enzymes peroxydases de lignine, les polyphénol oxydases, les peroxydases dépendantes du manganèse et les laccases (**Fan et al., 1987 ; Mousdale, 2008 ; Abdou Alio, 2020**).

I.5.1.5 Facteurs influençant l'efficacité du prétraitement

Les prétraitements sont absolument indispensables pour l'obtention de bioéthanol car ils augmentent de manière considérable les rendements de l'hydrolyse de la cellulose. Selon **Sun et Cheng (2002)**, le rendement de l'hydrolyse peut augmenter de 20 %, jusqu'à 90 % après le prétraitement. Cependant, un prétraitement efficace devrait améliorer la conversion des sucres, éviter la dégradation ou la perte de glucides, ainsi que la formation de sous-produits inhibiteurs de l'hydrolyse et la fermentation. Il devrait de plus être rentable et réduit la demande en énergie (**Ogier et al., 1999 ; Sun et Cheng, 2002 ; Hu et al., 2008**).

I.5.2 Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est une réaction catalysée par un ensemble d'enzymes spécifiques appelées cellulases, produites par des bactéries ou des champignons. Les produits de l'hydrolyse sont généralement des sucres réducteurs, notamment du glucose. Les cellulases de type fongique sont les plus étudiées en raison de la capacité de ces microorganismes à générer des grandes quantités d'enzymes (**Blackwell, 2011 ; Lübeck et Lübeck, 2018**). À l'inverse de l'hydrolyse chimique, l'hydrolyse enzymatique est réalisée dans des conditions relativement douces (pH 4,8 ; température 50 °C) (**Ogier *et al.*, 1999 ; Azhar *et al.*, 2017 ; Abdou Alio, 2020**). Cependant, l'hydrolyse enzymatique a une cinétique beaucoup plus lente alors qu'il ne faut que quelques minutes dans le cas de l'hydrolyse chimique. De plus, le produit final de l'hydrolyse enzymatique (le glucose dans la majorité du temps) inhibe l'enzyme et finit par affecter le processus.

I.5.3 Fermentation

La fermentation est un processus anaérobie biologique dans lequel le sucre est converti en alcool par l'action des microorganismes. Il existe plusieurs microorganismes capables de fermenter les glucides en bioéthanol (**Demirbas, 2008**). La levure *Saccharomyces cerevisiae* est le microorganisme le plus utilisé dans la fermentation des carbohydrates issus de la BLC en raison de sa grande tolérance aux composés inhibiteurs et la variation dans le pH (**Azhar *et al.*, 2017 ; Kovalski *et al.*, 2020**). Cependant, cette levure ne peut pas convertir les pentoses et les sucres provenant de l'hémicellulose en éthanol (**Ogier *et al.*, 1999**). Trois types de fermentation sont fréquemment utilisés dans le processus de la production de bioéthanol. L'hydrolyse et la fermentation séparées (SHF), la saccharification et la fermentation simultanées (SSF) et la saccharification avec co-fermentation simultanées (SSCF). Dans la SHF, l'hydrolyse de la BLC est séparée de la fermentation éthanolique, ce qui permet de réagir l'enzyme à des températures élevées pour une meilleure performance. Tandis que, les microorganismes de fermentation peuvent fonctionner à température modérée pour une optimisation de la consommation des sucres (**Azhar *et al.*, 2017 ; Srivastava *et al.*, 2019**). En revanche, plusieurs facteurs influencent la fermentation alcoolique, qu'ils soient physiques (température, durée, pression), chimiques (inhibiteurs, pH, concentration initiale de nutriments), qui peuvent nuire au rendement et à l'efficacité de la fermentation (**Kovalski *et al.*, 2020**).

I.5.3.1 Facteurs influençant la production de bioéthanol

I.5.3.1.1 Température

La température affecte le taux de croissance de microorganisme. La température optimale dans le processus de fermentation est de 20 °C à 35 °C. Pour *S. cerevisiae*, la température optimale est de 30°C. Certaines enzymes impliquées dans la fermentation sont sensibles à l'élévation de la température, conduisant ainsi à la dénaturation de leurs structures tertiaires et par conséquent à un blocage de l'activité enzymatique (**Srivastava et al., 2019**).

I.5.3.1.2 Inoculum

La charge microbienne initiale affecte le taux de consommation du sucre. En effet, plus la charge de l'inoculum est faible, plus le taux de productivité de l'éthanol dans la fermentation sera faible (**Azhar et al., 2017**).

I.5.3.1.3 Durée de fermentation

La durée de la fermentation a un effet sur la croissance microbienne. Ainsi, un temps de fermentation court entraîne une fermentation inefficace en raison d'une croissance insuffisante de MO. D'un autre côté, une durée trop prolongée de la fermentation est nocive sur la croissance microbienne en raison de la forte concentration de l'éthanol (**Azhar et al., 2017**).

I.5.3.1.4 Agitation

Le taux d'agitation contrôle la perméabilité des nutriments dans le bouillant de fermentation et réduit l'inhibition de l'éthanol sur les cellules. Plus la vitesse de l'agitation est élevée, plus la qualité d'éthanol produite est élevée. Le taux d'agitation courant est de 150 à 200 tr/min. Néanmoins, une vitesse d'agitation excessive n'est pas corrélée à une production régulière d'éthanol car elle limite les activités métaboliques des cellules (**Zabed et al., 2014**).

I.5.3.2 Inhibiteurs de la fermentation

Lors du prétraitement de la BLC et l'hydrolyse enzymatique, des composés inhibiteurs peuvent être formés. En effet, le xylose et le glucose peuvent être dégradés respectivement en furfural et en 5-hydroxyméthyl furfural (HMF) (**Figure I.12**). Les prétraitements génèrent également des acides aliphatiques comme l'acide acétique, acide formique et acide lévulinique. Ces altérations varient selon le prétraitement mais également selon sa durée et son intensité (**Ballerini, 2006 ; Didden et al., 2008**).

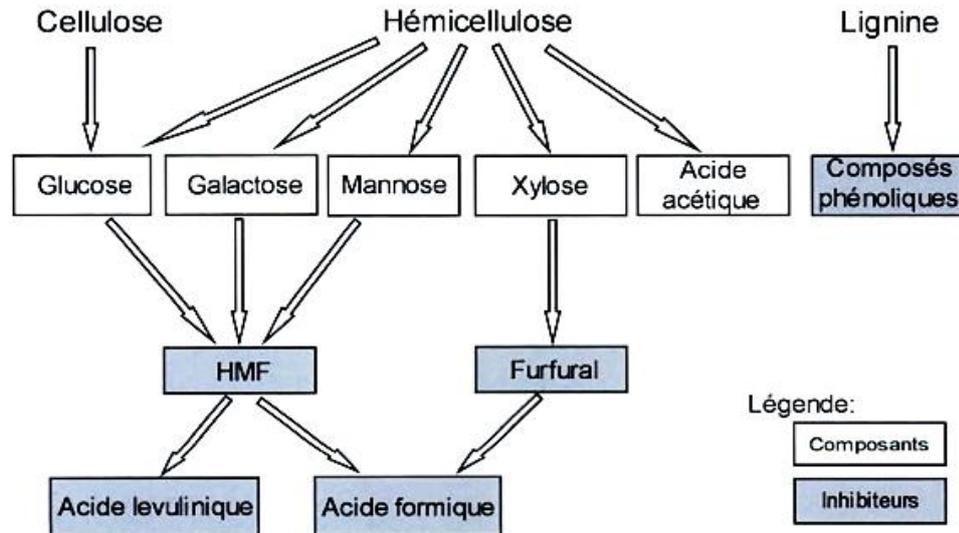


Figure I.12 : Origine des inhibiteurs de la fermentation éthanolique (Didderen *et al.*, 2008)

I.5.4 Récupération de bioéthanol

Après fermentation, l'éthanol se trouve dans un mélange contenant principalement de l'eau, des composés provenant de la dégradation de la BLC, des substances ajoutées au cours du procédé et des métabolites produits par les microorganismes. La concentration en éthanol dans la solution est de l'ordre de 10 % (10 °GL¹). Pour obtenir un alcool biocarburant, il faut d'abord augmenter la concentration ethilique par distillation et rectification, avant de le déshydrater pour éliminer toute trace d'eau (Didderen *et al.*, 2008).

La distillation est le processus qui permet la séparation de l'éthanol des autres éléments qui se trouvent dans le mélange de fermentation dite le moût. Cette opération de séparation qui est basée sur la volatilité de l'alcool, permet de passer d'une solution de 10°GL à 94°GL en éthanol. Cependant, l'éthanol n'est pas le seul élément volatil présent dans le mout fermenté, d'autres composés sont volatilisés lors de la distillation à savoir : des alcools, des acides gras, des éthers, de l'eau et du CO₂. L'ensemble de ces composés va donc se retrouver dans la phase gazeuse avec l'éthanol. Ce dernier subit alors des opérations complémentaires selon le marché visé. Une déshydratation pour l'usage carburant, rectification pour l'industrie, rectification et surfinage pour l'industrie alimentaire (Ballerini, 2006).

¹ ° GL : degré Gay-Lussac. Le degré alcoolique ou degré Gay-Lussac correspond au nombre de cm³ éthanol pur contenu dans 100 cm³ d'un mélange eau et éthanol.

La rectification est une opération au cours de laquelle l'alcool est purifié à travers des phases successives d'évaporation et de condensation. Tandis que, la déshydratation est le passage de l'éthanol par un tamis moléculaire, l'éthanol est dit (anhydre). Un dénaturant y est ajouté en petite quantité afin d'éviter qu'il ne soit commercialisé sur le marché de l'alimentation humaine (Guzmán-Martínez, 2019).

I.6 Enzymes cellulolytiques fongiques

I.6.1 Champignons cellulolytiques

Les champignons filamenteux (moisissures) ont une grande importance dans l'écosystème par leur intervention dans les recyclages écologiques (Buee *et al.*, 2009). Parmi toutes les microorganismes cellulolytiques, les champignons sont responsables de 80 % de la dégradation de la cellulose (Srivastava *et al.*, 2019). De nombreux champignons sont capables de pousser sur divers types de substrats et aident dans la décomposition de la matière organique complexe en matière inorganique (minérale) utilisable par les végétaux (Nhan *et al.*, 2021). Les champignons cellulolytiques sont considérés comme facteur clé dans la création du compost de bonne qualité. D'ailleurs, plusieurs travaux de recherches ont indiqué que l'application de ce genre de champignon comme inoculum, augmente la capacité de la rétention d'eau et crée un équilibre de rapport C/N dans les déchets cellulosiques (Sivaramanan, 2014 ; Nhan *et al.*, 2021).

Généralement dans les forêts, les champignons dans les phylums *Ascomycota*, *Basidiomycota* et *Deuteromycota* sont important dans la dégradation de cellulose (Srivastava *et al.*, 2019). Cependant, dans l'industrie les espèces des genres les plus préférées sont les cellulases fongiques aérobies, telle que : *Apergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Trichoderma* (Gil *et al.*, 2009 ; Srivastava *et al.*, 2019) (Figure I.13).



Figure I.13 : Groupes des champignons de pourriture dotés d’une activité cellulolytique (Photos réalisées par Thomas Reich²) (Bajpai, 2022).

² <https://totholz.wsl.ch/fr/galerie-photo.html>

I.6.2 Classification des cellulases et mode d'action

Etant donné que la cellulose est un polymère cristallin non ramifié, plusieurs cellulases sont nécessaires pour sa dégradation. Les cellulases hydrolysent les liaisons β -1,4-D-glucane, libérant des cello-oligosaccharides, du cellobiose ou du glucose. Ainsi, la dégradation complète de cellulose est réalisée par un complexe enzymatique qui comprend des End- β -1,4-glucanases (EG EC 3.2.1.4), des Cellobiohydrolases (CBH EC 3.2.1.91 et EC 3.2.1.176) et des β -glucosidases (BGL EC 3.2.1.21) (Ghose, 1987 ; Colonia et Chagas, 2014 ; Bajpai, 2022) (Figure I.14). Ainsi, ces trois classes d'enzymes ne sont pas les seules enzymes impliquées dans l'hydrolyse. Certains champignons produisent également d'autres enzymes pour favoriser la décomposition de la cellulose, comme la cellodextrinase (EC3.2.1.74) qui peut éliminer le disaccharide (cellobiose) du cello-oligosaccharide. En outre, cellodextrine phosphorylase (EC 2.4.1.49), cellobiose phosphorylase (EC 2.4.1.20) et cellobiose épimérase (EC 5.1.3.11) se sont également avérées liés à la dégradation de la cellulose (Sharma *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2020). En plus de celles-ci, les polysaccharides mono-oxygénases lytiques (LPMO) sont également considérés comme des auxiliaires enzymes efficaces pour la dégradation de la cellulose. Ces enzymes pourraient former un système de cellulase qui hydrolyse la cellulose par action synergique (Harris *et al.*, 2010 ; Morgenstern *et al.*, 2014)

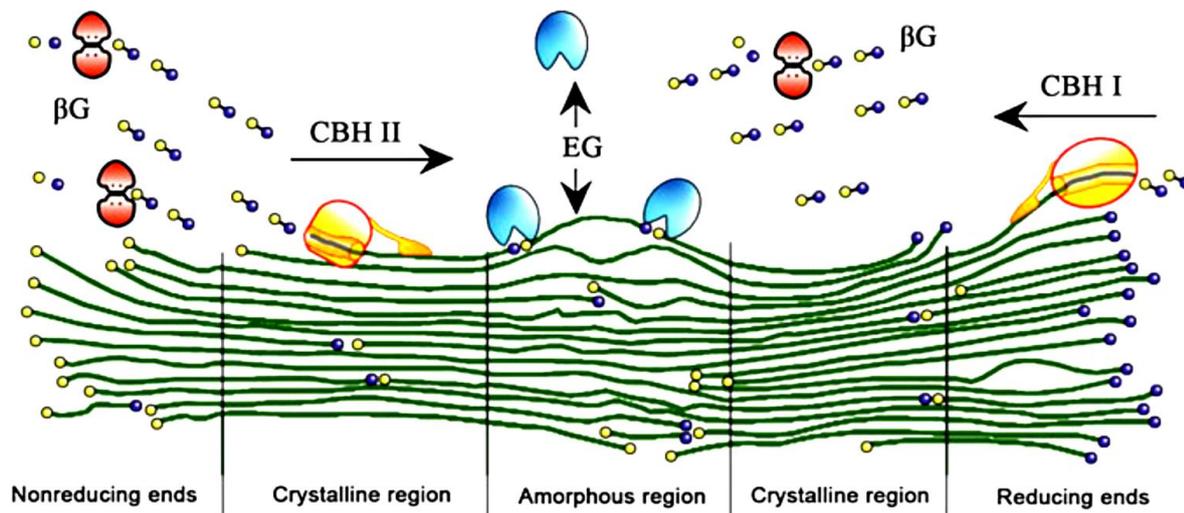


Figure I.14 : Mécanisme de biodégradation de la cellulose. EG : Endoglucanase, CBH : Cellobiohydrolase, BGL où β G : β -glucosidase (Wang *et al.*, 2012).

I.6.2.1 Endoglucanases (EG)

Les EG rompent les liaisons internes de la chaîne polysaccharide (les liaisons glucosidiques β -1,4), d'une façon aléatoire, réduisent ainsi le degré de la polymérisation du substrat avec libération de cellodextrines, de la cellobiose et du glucose (Wang *et al.*, 2012) (Figure I.15). L'endoglucanase est active sur les celluloses solubles. L'action des EG a pour effet de créer de nouvelles extrémités non réductrices qui sont des sites réactifs pour la CBH (Hasper *et al.*, 2002).

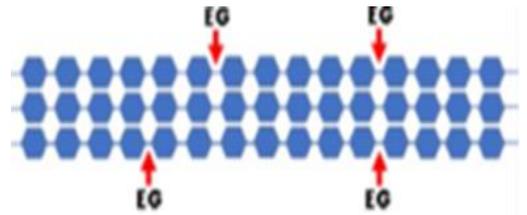


Figure I.15 : Action de l'endoglucanase (EG) sur le brin de cellulose (Mondal *et al.*, 2022)

I.6.2.2 Exoglucanases (CBH)

Ces enzymes attaquent les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libèrent des résidus cellobioses (Didderen *et al.*, 2008) (Figure I.16). La CBH seule n'est pas active sur la cellulose cristalline et les celluloses solubles (carboxyméthylcellulose) (Sun *et al.*, 2002).

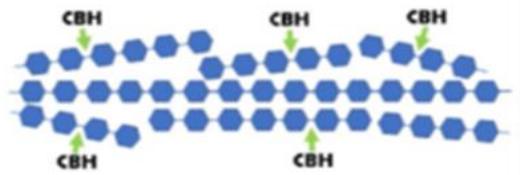


Figure I.16 : Action de l'cellobiohydrolase (CBH) sur le brin de cellulose libérant de cellobiose. (Mondal *et al.*, 2022)

I.6.2.3 β -glucosidases (β G)

Les β -glucosidases hydrolysent les cellobioses pour libérer le glucose. Selon Saradouni *et al* (2004) (Figure I.17), La β G est l'enzyme clé dans l'efficacité de la biodégradation de la cellulose.

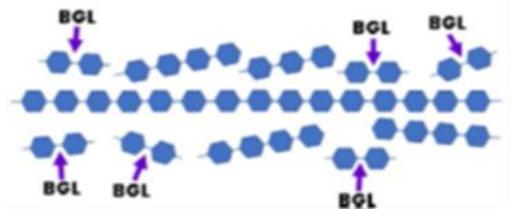


Figure I.17 : Action de β -glucosidases (BGL) sur la cellobiose. (Mondal *et al.*, 2022)

I.6.3 Mécanisme d'induction de cellulase

La première étape dans le mécanisme de l'induction enzymatique chez les champignons, est de détecter une source de carbone externe. Selon les sources de carbone disponibles, la production de cellulase est régulée au niveau de la transcription chez les champignons, et ce n'est que lorsque des polysaccharides végétaux tels que la cellulose sont fournis comme sources de carbone que le champignon commence à produire ces enzymes en grande quantité (Vazquez-Montoya *et al.*, 2019).

Par contre, lors de l'utilisation des sources de carbone facilement métabolisées comme le glucose, la production de ces enzymes est inhibée (Wang *et al.*, 2020). C'est pourquoi, il est suggéré que plusieurs voies de transduction du signal responsables de chacun de ces inducteurs pourraient contrôler l'expression de la cellulase (Kubicek *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 2020). Par exemple, la protéine G hétérotrimérique GanB (alpha)-SfaD (beta)-GpgA (gamma) est un capteur de source de carbone qui contrôle la signalisation cAMP/PKA en réponse au glucose (Lafon *et al.*, 2005). Le GanB peut être impliqué dans la détection de diverses sources de carbone et l'activation ultérieure de la transduction du signal en aval. De plus, il a été confirmé que HxtB, un transporteur de glucose et de xylose, se localise dans la membrane plasmique et peut jouer un rôle dans la signalisation et le métabolisme du glucose dans son propre flux (Dos Reis *et al.*, 2017).

Aussi, la protéine kinase PskA a une fonction importante dans le contrôle du flux de sucre et du métabolisme (Rutter *et al.*, 2002). Cependant, les capteurs de source de carbone, le transport ultérieur et les voies de signalisation cellulaire restent encore largement obscurs (Wang *et al.*, 2020).

I.6.4 Mécanismes de régulation moléculaire de l'expression des gènes de la cellulase

La dégradation efficace des polysaccharides de la paroi cellulaire des plantes nécessite la sécrétion massive de diverses cellulases et un système de régulation complexe pour contrôler les gènes liés à la cellulase. Ces gènes sont régulés par plusieurs facteurs de transcription (Tableau I.7) qui sont les cibles potentielles de la manipulation génétique de la production de cellulase (Sukumaran *et al.*, 2021 ; Mondal *et al.*, 2022).

Tableau I.7 : Principales fonctions des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de la cellulase chez les champignons.

Facteur de transcription	Fonctions	Souches fongiques	Références
XlnR/ Xyr1	Les principaux activateurs transcriptionnels des gènes codant pour les enzymes cellulases (cbh1, cbh2, egl1 et bgl1).	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>T. reesei</i>	Van Peij <i>et al.</i> , 1998 Stricker <i>et al.</i> , 2006

Chapitre I : Recherche bibliographique

BglR	Régulateur positif de l'expression des gènes codant pour la BGL ; Répresseur des gènes CBH et EG.	<i>T. reesei</i>	Liu et al., 2019
ClbR	Régule les gènes codant pour la cellulase induite par la cellulose et la cellobiose.	<i>A. aculeatus</i>	Kunitake et al., 2013
Ace3 Clr-3	L'augmentation de l'expression du gène de la cellulase.	<i>T. reesei</i>	Mondal et al., 2022
PacC/Pac	Stimuler ou empêcher la production de cellulase selon la variation du pH Impliqué dans des fonctions cellulaires	<i>A. nidulans</i> <i>T. reesei</i> <i>N. crassa</i>	Wang et al., 2020 Martins et al., 2020
Clr-1/ Clr-2	L'activation du Clr-1 nécessite la présence d'un inducteur cellobiose, stimule l'expression de bgl ; Clr-2 ne nécessite aucun inducteur pour son activation mais sa suppression pourrait empêcher l'utilisation de la cellulose comme source de carbone.	<i>N. crassa</i>	Mondal et al., 2022
HapB/C/E Hap2/3/5 Hap2/3/5	Permettent une expression modérée des gènes cellulases et xylanases (cbh2 et xyn2)	<i>Aspergillus spp</i> <i>T. reesei</i> <i>N. crassa</i>	Kim et al., 2020
CreA/Cre1	Régulation de la répression des catabolites de carbone (CCR) ; Supprime la transcription des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des polysaccharides plus complexes.	<i>T. reesei</i> <i>A. nidulans</i> <i>P. oxalicum</i>	Hu et al., 2021
AZF1	Régulateur positive de l'activité de BGL et CBH	<i>T. reesei</i> <i>A. nidulans</i>	Antonieto et al., 2019

La plupart des facteurs de transcription impliqués dans ces mécanismes de régulation appartiennent à la famille des clusters binucléaires zinc Zn₂Cys₆- qui à ce jour, ne s'est avérée spécifique qu'aux champignons (**Wang et al., 2020**) (**Figure I.18**). Le régulateur de xylanase XlnR, est un régulateur positif de type Zn₂Cys₆- spécifique aux champignons, a été d'abord identifié chez *A. niger* puis son gène orthologue a été isolé et désigné Xyr1 chez *T. reesei* (**Van Peij et al., 1998 ; Stricker et al., 2006**). Certaines études ont démontré qu'il régule l'expression non seulement des gènes cellulolytiques mais aussi des gènes xylanolytiques (**Mondal et al., 2022**). Il a été rapporté que la suppression du gène Xyr1 entraînait une diminution importante des niveaux d'expression des principaux gènes xylanolytiques (xyn1 et xyn2) et des gènes cellulolytiques (cbh1, cbh2, egl1 et bg11), même dans des conditions de culture d'induction (**Stricker et al., 2006**).

La cellulose et le xylane sont les polysaccharides les plus abondants dans la nature ; par conséquent, XlnR/Xyr1 est un régulateur essentiel dans le processus d'utilisation de la biomasse. En plus de la dégradation des polysaccharides, XlnR/Xyr1 régule également l'expression d'enzymes (D-xylose réductase, XyrA) impliquées dans la première étape de la voie catabolique des pentoses, qui est la principale voie de conversion du L-arabinose et du D-xylose (**Wang et al., 2020**).

Ainsi, il existe un autre facteur de transcription capable de détecter la source de carbone externe, c'est le régulateur de la β -glucosidase BglR (**Liu et al., 2019**). Ce régulateur est également impliqué dans la détection de la cellobiose, mais le mécanisme spécifique de son action n'a pas été étudié en profondeur et nécessite une exploration plus approfondie (**Nitta et al., 2012**).

De même pour le facteur ClbR de type Zn₂Cys₆-, qui est impliqué dans la dégradation de la cellulose et de la cellobiose chez *A. aculeatus*. De plus, il s'est avéré qu'il induit l'expression de plusieurs gènes cellulolytiques, tels que la FII-carboxyméthyl cellulase (cmc2) et la FIII-avicelase (cbhI) (**Kunitake et al., 2013**).

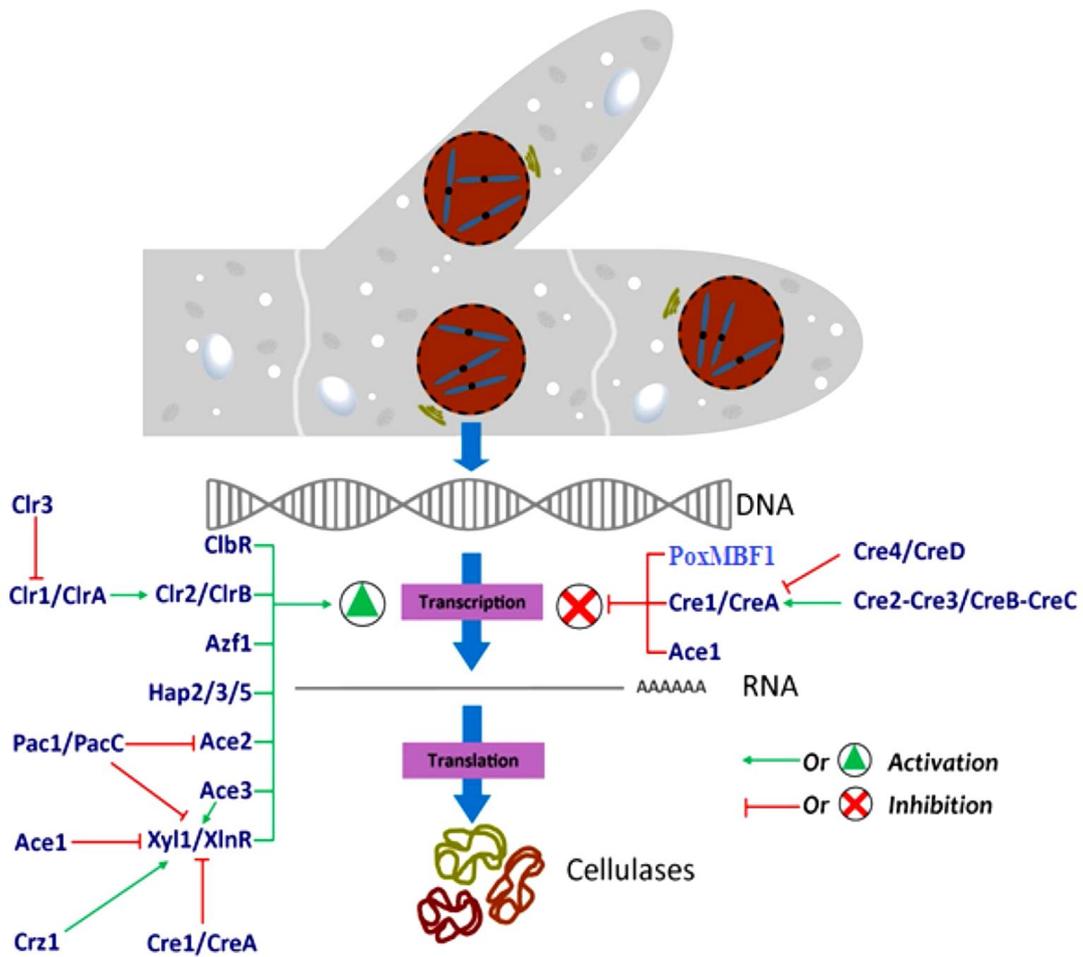


Figure I.18 : Schéma de la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes cellulolytiques chez les champignons (Mondal *et al.*, 2022).

I.6.3 Applications biotechnologiques des cellulases

Les enzymes cellulases ont une application diversifiée dans différentes filières, comme l'agriculture, l'alimentation, la fermentation et l'industrie. (**Tableau I.8**)

Tableau I.8 : Filière d'application de l'enzyme cellulase. (Bhat, 2000 ; Singh *et al.*, 2007 ; Naraian, 2019)

Filière	Applications
Agriculture	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration des cultures en croissance par la combinaison enzymatique de la cellulase, pectinase et l'hémicellulase ; - Résistance aux maladies végétales par dégradation de la paroi cellulaire du pathogène.
Bioconversion	<ul style="list-style-type: none"> - Transformation de la BLC en produits utiles tel que les biocarburants (éthanol et méthanol) ; - Transformation aussi en acides organiques, lipides et protéines ; - Amélioration de la performance des ruminants et préservation d'un fourrage de haute qualité.
Fermentation	<ul style="list-style-type: none"> - Amélioration de maltage, brassage, pressage et la fermentation primaire grâce à l'activité cellulosique ; - Réduction de la viscosité du moût, ce qui rend la filtrabilité plus faisable.
Alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> - Clarification, stabilisation et augmentation du rendement des jus des fruits et légumes ; - Les enzymes telles que la cellulase et l'hémicellulase trouvent également une application dans l'extraction de l'huile d'olive.
Pâte et papier	<ul style="list-style-type: none"> - La cellulase agit comme co-additif dans des procédés tels que le blanchiment de la pâte et dépulpage biomécanique ; - Amélioration des propriétés de la fibre ainsi que sa brillance ; - Amélioration du drainage dans la pâte à papier ; - Réduction dans l'énergie et dans le chlore ; - Aide dans la production des produits biodégradables comme le carton et les serviettes hygiéniques.
Textile	<ul style="list-style-type: none"> - La cellulase est connue pour améliorer la qualité et la stabilité des tissus par bio-stanisation des jeans et biopolissage ; - Amélioration de l'absorption de l'adoucissement par les fibres des vêtements ;

	<ul style="list-style-type: none">- Embellissement de la brillance des couleurs avec élimination de l'excès de colorant présent dans les tissus ;- Utilisation dans le polissage du coton et d'autres tissus.
Savants et détergents	<ul style="list-style-type: none">- La cellulase est utilisée avec les lipases et les protéases dans plusieurs détergents ;- Augmente l'efficacité du détergent à éliminer les saletés dans les vêtements ;- Donne une brillance et ressortie les couleurs des vêtements.

I.7 Avantages et inconvénients du bioéthanol de 2^{ème} génération

Comme toute énergie renouvelable, le bioéthanol de deuxième génération présente des avantages et des inconvénients tant sur le plan environnemental que sur le plan économique et technologique.

I.7.1 Avantages

- ***Une ressource abondante et renouvelable***

Le bioéthanol de 2^{ème} génération est produit à partir de la biomasse lignocellulosique qui est une source disponible et abondante provenant des déchets agricoles, des résidus forestiers et d'autres sources de biomasse.

- ***Réduction des déchets agricoles***

L'agriculture est l'un des plus grands secteurs biologiques qui produit la plus grande biomasse (FAO, 2022). En conséquence, les statistiques de production agricole ont enregistré une augmentation de 50 à 60 % dans la production mondiale de culture primaire entre l'année 2000 et 2020. (FAO, 2022 ; USDA, 2023). Malheureusement, cette croissance de la production a créé la génération d'énorme quantité de déchets. Étant donné que l'on estime que les déchets agricoles doubleront d'ici 2050 pour atteindre 4 milliards de tonnes dans les pays développés et en voie de développement (Yevich et Logan, 2003 ; Duque-Acevedo *et al.*, 2020), le bioéthanol de 2^{ème} génération est une technologie innovante de transformation et de réduction des déchets agricoles.

▪ ***Réduction des émissions de gaz à effet de serre***

L'utilisation du bioéthanol permet de réduire la dépendance aux combustibles fossiles et de contribuer à la transition énergétique. Ainsi, Le bioéthanol produit à partir de la biomasse lignocellulosique peut réduire les émissions de gaz à effet de serre par rapport aux carburants fossiles, et cela est dû à deux raisons : la première est la photosynthèse qui absorbe le CO₂ pendant la croissance de la biomasse quant à la deuxième, c'est du fait que la combustion de l'éthanol est beaucoup plus propre que celle de l'essence. En termes de rejets, il est aux environs de 50 % de moins pour le CO₂, 30 % de moins pour NO_x (Oxyde d'azote) et plus de 90 % de réduction pour les particules fines qui sont nocives pour la santé (Eplaque, 2023).

▪ ***Un prix moins cher à la pompe***

En Europe, l'éthanol est généralement moins cher que l'essence à la pompe, ce qui peut constituer un avantage économique pour les consommateurs. En France, l'E85 (carburant contient 85 % d'éthanol pour 15 % d'essence) est d'environ 2 fois moins cher que l'essence (Eplaque, 2023).

▪ ***Absence de compétition entre l'usage alimentaire et énergétique***

Contrairement aux biocarburants de 1^{ère} génération produits à partir des cultures alimentaires, la production de bioéthanol de 2^{ème} génération ne crée pas de concurrence directe avec ces cultures.

I.7.2 Inconvénients

▪ ***Une Technologie bien coûteuse***

La production de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique nécessite des technologies et des machines avancées pour réaliser le prétraitement de la biomasse, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation alcoolique (Didden *et al.*, 2010). Par exemple : les bioréacteurs à grande échelle. Les températures et le pH optimaux pour l'hydrolyse enzymatique et la fermentation peuvent être différents, ce qui peut entraîner des inefficacités dans le processus de production.

▪ ***Besoin de l'utilisation des micro-organismes génétiquement modifiés (MGM)***

Les processus de l'hydrolyse et de la fermentation peuvent faire appel à des micro-organismes génétiquement modifiés (MGM), capables de supporter la variation de la température, du pH, des différents composants du milieu ou des MGM capables de donner un meilleur rendement ou de fermenter des sucres simples non fermentescibles comme la

xylose (**Limayem et Ricke, 2012**). Ce qui peut susciter des préoccupations en matière de sécurité et d'acceptation sociale.

▪ *Besoin de prétraitement*

Etant donné que la lignocellulosique est une biomasse très complexe, son prétraitement est primordial avant son utilisation dans la production du bioéthanol, ce qui peut augmenter les coûts et la difficulté du processus.

CHAPITRE II :
MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 Échantillonnage

II.1.1 Biomasse lignocellulosique

La biomasse utilisée dans cette étude est une masse des palmes sèches issues d'un palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) de la variété Fegousse (**Figure II.1**). Cette variété de palmier est la plus abondante dans les oasis sahariennes de la wilaya de Béchar.

II.1.2 Zone d'étude

Les échantillons utilisés pour isoler les souches fongiques sont prélevés de deux biotopes différents. Le premier biotope est une palme sèche de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) issu d'une palmeraie de la région Jedida, située à 70 km de la wilaya de Béchar (31°46'28"N, 1°45'10"E) (**Figure II.2**). Le deuxième biotope est le sol subaquatique du barrage de Djorf Torba situé à 50 km à l'ouest de la ville de Béchar (31°30'21"N, 2°46'24"E) (**kabour, 2016**) (**Figure II.2**).

II.2 Caractérisation de la biomasse à hydrolyser

II.2.1 Matière sèche (MS)

La matière sèche est habituellement obtenue par dessiccation de l'échantillon dans une étuve préalablement réglée à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant (**Laouar et al., 2021**). La teneur en MS est exprimée en pourcentage (%) en fonction du poids de l'échantillon brut selon la formule suivante :

- **MS % = 100 – H%**
 - **MS** : Taux de matière sèche du substrat en % ;
 - **H** : Taux de l'humidité en %.

D'où l'Humidité est calculée selon l'équation suivante :

$$\mathbf{H\% = \frac{E - M}{E} \times 100}$$

- **E** : Poids initial de la prise d'essai en g ;
- **M** : Poids de la prise d'essai après étuve en g.



Figure II.1. Site de prélèvement des échantillons de la palme sèche du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), variété Fegousse de la palmeraie de Jedida, wilaya de Béchar, Algérie (Originale, 2022)

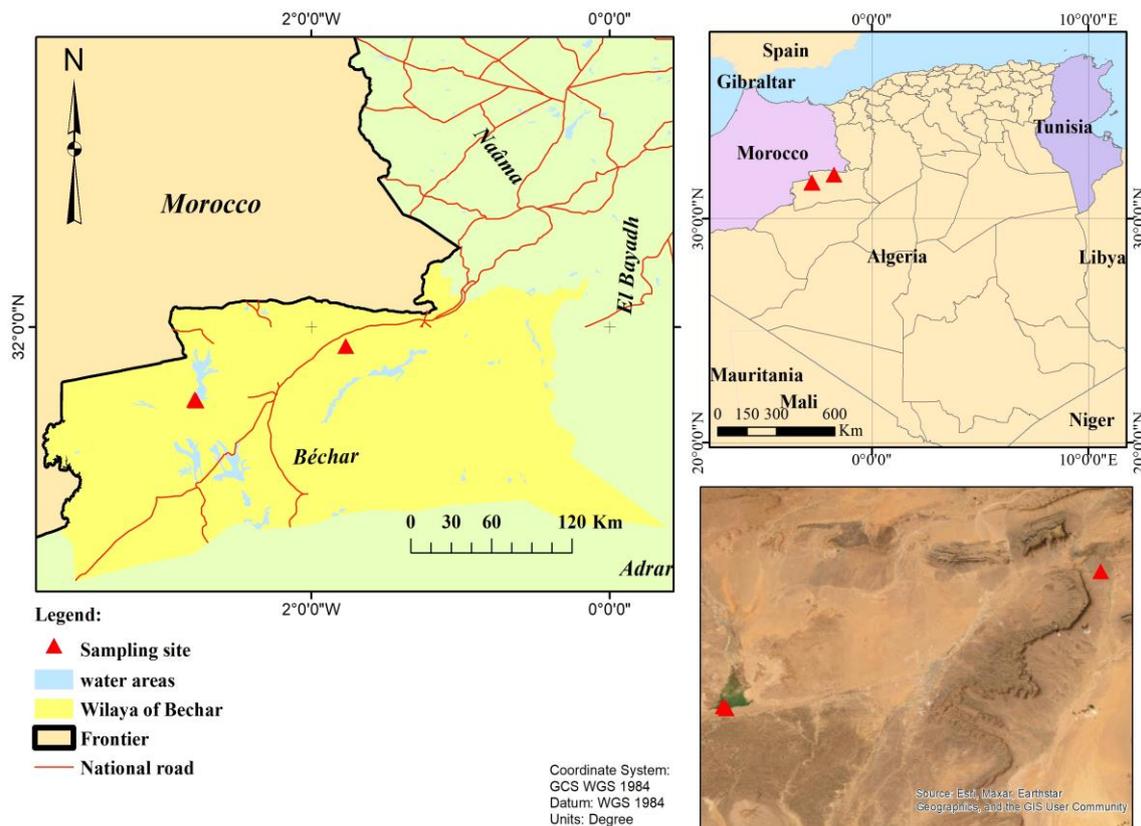


Figure II.2 : Localisation des sites de prélèvement des échantillons de la palme sèche du palmier dattier et du sol subaquatique du barrage de Djorf Torba de la wilaya de Béchar, Algérie (Originale, 2022)

II.2.2 Matière organique et Minérale (MO et MM)

La teneur en cendre brute est obtenue après incinération de 5 g de matière sèche de l'échantillon dans un four à moufle à une température de 550 °C (Halidou *et al.*, 2022). Ainsi La perte du poids après la calcination des échantillons permet de déterminer les proportions pondérales de la matière organique et de la matière minérale qui sont exprimées en % selon les équations suivantes :

- **Matière organique (MO)**

$$\text{MO}\% = \frac{\mathbf{E - M}}{\mathbf{E}} \times \mathbf{100}$$

- **E** : Poids initial de l'échantillon en g ;
- **M** : Poids de l'échantillon après incinération en g.

- **Matière minérale (MM)**

La teneur en matière minérale est représentée par la formule suivante :

- **MM% = 100 – MO%**

II.2.3 Cellulose Brute (CB)

La teneur en cellulose brute est quantifiée selon la méthode de Weende (AFNOR., 1993). Elle consiste à effectuer deux hydrolyses successives. 1,5 g de matière sèche a été soumis à une hydrolyse acide (H₂SO₄, 0,26N) et une autre basique (KOH, 0,23N) pendant 30 minutes à chaqu'une d'elles. Après hydrolyse, les échantillons ont été étuvés à 105 °C, puis calcinés à 550 °C dans un four à moufle. Ainsi, La cellulose brute est déterminée par gravimétrie selon la formule suivante :

$$\text{CB}\% = \frac{\mathbf{P_{se} - P_{sf}}}{\mathbf{P_e \times MS}} \times \mathbf{100}$$

- **CB** : Cellulose brute exprimée en % par rapport à la matière sèche ;
- **MS** : Matière sèche exprimée en % ;
- **P_{se}** : Poids de l'échantillon à la sortie de l'étuve en g ;
- **P_{sf}** : Poids de l'échantillon à la sortie du four à moufle en g ;
- **P_e** : Poids de la prise d'essais en g.

II.2.4 Dosage d'azote

La méthode utilisée pour le dosage d'azote dans la palme est celle de Kjeldhal (ISO 1817, 2009). Dans un tube de minéralisation, 5 g de de la palme sèche en poudre ont été incorporées avec une pincée de catalyseur (sulfate de cuivre et de potassium) et 15 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré. Ensuite, la digestion a été effectuée par chauffage progressif pendant 5 h. D'abord, la température a été ajustée à 150 °C pendant 10 min, puis elle a été augmentée jusqu'à 250 °C et 10 minutes plus tard à 350 °C. Une fois la minéralisation terminée, la solution limpide obtenue a été diluée a été diluée dans un volume final de 100 ml avec de l'eau distillée pour éviter une forte réaction lors de l'ajout de la soude.

La distillation a été réalisée dans un distillateur semi-automatique, dont l'ajout de la lessive de soude à 35 % s'est fait automatiquement pour libérer l'ammoniac (NH₃). Ce dernier a été entraîné par la vapeur d'eau dans un erlenmeyer contenant une solution d'acide borique à 25 % et du rouge de méthyle comme indicateur du pH. L'ammoniac à été alors titré par acide sulfurique 0,02 N et la teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N (\%) = \frac{V / V' \times (N - N') \times 0,05 \times 1,4}{P}$$

- **V** : Volume de la solution minéralisée (ml) ;
- **V'** : Volume de la solution de soude ajoutée (ml) ;
- **N** : Quantité d'acide sulfurique lue après titrage (ml) ;
- **N'** : Volume de l'acide sulfurique dépensé dans le titrage du témoin (ml) ;
- **P** : Poids de la prise d'essai (g).

La teneur en protéines est calculée en multipliant le taux d'azote total N (%) par le coefficient 6,25.

$$\text{Teneur en protéine} = N (\%) \times 6,25$$

II.2.5 Dosage des éléments minéraux

Le dosage des éléments minéraux de la palme a été précédé par le broyage à sec de l'échantillon (la palme sèche) jusqu'à obtention d'une poudre. Les prises d'essai ont été pesées dans des creusets en porcelaine et incinérées dans le four à moufle à 550°C. Les cendres obtenues ont été ensuite traitées à l'acide chloryhdrique HCl (2N), puis après digestion en bain

marie pendant une demi-heure, la solution a été récupérée avec une quantité d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume final de 50 ml.

Le dosage du calcium (Ca) et du magnésium (Mg) a été effectué au spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) (**Diagayété et Schenkel, 1986 ; Pauwels et al., 1992**). Le sodium (Na) et le potassium (K) ont été dosés au photomètre de flamme (**Annexe 2**).

II.3.1 Analyse chimique de la zone d'échantillonnage

En considérant que la palme sèche représente le premier biotope dont on a isolé les souches fongiques, sa composition chimique est représentée dans la section **II.1** (Etude de la composition chimique de la biomasse à hydrolyser). Pour le deuxième biotope qui est le sol subaquatique du barrage Djorf Torba de la wilaya de Béchar, l'analyse a été portée sur les échantillons de l'eau brute de ce barrage, qui ont été prélevés durant les mois de Mars, Avril, Mai, Juin, Juillet et Août de l'année 2021. Toutes les analyses ont été effectuées au niveau du laboratoire de la direction des eaux avec l'assistance de l'ingénieur de laboratoire. Les techniques utilisées sont décrites dans le Journal Officiel De La République Algérienne (**JORADP., 2011**) Les échantillons ont subi différentes analyses physicochimiques à savoir pH, taux de sel (TDS), taux de calcium, taux de magnésium dissous, chlorure, sulfate, sodium, bicarbonate, les protocoles détaillés sont présentés dans l'**Annexe 3**.

II.3.2 Isolement des souches fongiques

Les trois échantillons de la palme sèche sont divisés en trois parties : pétiole, rachis et folioles. Chaque partie est répartie en trois lots (**Figure II.3**). Les neuf lots ont subi un broyage à l'aide d'un broyeur électrique. Quant aux échantillons du sol subaquatique du barrage de Djorf Torba, quatre échantillons ont été prélevés et mis dans des pots de polypropylène stériles de volume 50 ml (**Figure II.4**).



Figure II.3 : Echantillon de la palme sèche du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) de la région de Béchar (Original, 2019)



Figure II.4 : Echantillons du sol subaquatique du barrage de Djorf Torba de la wilaya de Béchar (Original, 2019)

II.3.2.1 Échantillons des palmes sèches

5 g de chaque échantillon de la poudre de la palme ont été mis dans des flacons contenant 45 ml d'eau physiologique stérile. Les mélanges ont subi un malaxage à l'aide d'un stomacher. Les solutions obtenues ont été considérées comme des dilutions mères à 10^{-1} . A partir de chaque solution mère des dilutions décimales (10^{-2} jusqu'à 10^{-3}) ont été effectuées dans 9 ml d'eau physiologique stérile. Chaque dilution correspond à un échantillon qui sera par la suite étalé à la surface d'un milieu de culture à base de la gélose Potato Dextrose Agar (PDA) (**Annexe 1**). Toutes les boites ont été Incubées à 25°C pendant 7 jours.

II.3.2.2 Echantillons du sol subaquatique du barrage de Djorf Torba

Une suspension de l'échantillon est constituée par 1 g de sol subaquatique et 9 ml d'eau physiologique stérile (dilution mère). La suspension a été agitée pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur Vortex. Une série de dilution décimale (10^{-2} jusqu'à 10^{-4}) a été ensuite préparée à partir de la solution mère. 1 ml des dilutions de chaque échantillon a été étalé à la surface de la gélose « PDA, MEA et CDA » puis incubée à 25°C durant 7 jours.

II.3.3 Purification et description des moisissures isolées

Dès leur apparition sur les milieux de culture, les colonies de moisissures ont été repiquées sur géloses PDA supplémentées par 1 ml d'acide lactique à 25 %. Incubées à 25°C pendant 7 jours. Les souches pures ont été regroupées en fonction des caractéristiques la couleur du mycélium aérien, de la couleur du revers de la boîte et de la production des pigments diffusibles.

II.3.4 Conservation des souches fongiques isolées

Les souches fongiques pures isolées ont été maintenues avec deux types de conservation (**Botton et al.1990**) :

- ❖ Conservation courte durée : toutes les souches ont été maintenues dans des tubes de gélose PDA inclinés et stockés à 4°C jusqu'à leurs utilisations. La durée de cette conservation ne devrait pas dépasser les trois mois.
- ❖ Conservation longue durée : Pour une conservation à -20°C, les spores ont été récupérées par addition de 10 ml d'H₂O stérile supplémenté de tween (0.1%) et additionné de glycérol à 20 % comme agent cryo-protecteur.

II.3.5 Sporulation des moisissures

Le milieu gélosé PDA a été utilisé pour la sporulation de toutes les souches fongiques isolées. Les spores ont été récupérées à partir de vieilles cultures incubées préalablement à 25°C jusqu'à sporulation complète des cultures fongiques.

II.3.6 Identification morphologique des différents isolats

L'identification des moisissures fait appel aux caractéristiques de la culture et de la morphologie des colonies fongiques (Botton *et al.*, 1990 ; Pitt et Hocking, 2009) :

- **Caractéristiques de la culture :** Ce sont les critères macroscopiques tels que, la vitesse de croissance, la texture, la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture, l'odeur, l'exsudat et la présence d'un pigment diffusible (Chabasse *et al.*, 2002).
- **Caractéristiques morphologiques :** C'est l'étude microscopique du mycélium, c'est-à-dire la nature des organes différenciés (aspect des spores /conidies), les têtes du mycélium et son cloisonnement.

L'identification morphologique réalisée par une étude microscopique a été effectuée par la technique de « *microculture* » décrite par Haris en 1989. Cette technique consiste à inoculer les spores des moisissures sur des lames munies de petits carrés de PDA solidifiés et les recouvrir par des lamelles. Les spores ont étéensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble a été conditionné dans une chambre stérile et humide (Figure II.5) puis, incubé à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours. Après incubation, les lamelles à la surface desquelles s'adhèrent le mycélium ont été transférées sur d'autres lames stériles contenant une goutte de lactophénol pour être observées au microscope.

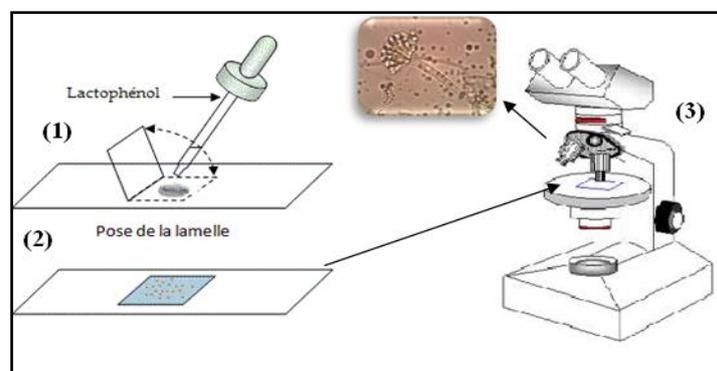


Figure II.5 : Identification microscopique des moisissures par la technique de microculture d'Haris (1989).

L'identification macroscopique a été réalisée en adoptant la technique de « *single sporing* » décrite par **Pitt et Hocking** en 2009. Elle est basée sur la relation entre l'activité de l'eau du milieu de culture et la température d'incubation. Elle consiste à inoculer des spores d'une culture jeune dans des tubes contenant une suspension semi solide à base de 0,2 % d'Agar et quelques gouttes de Tween 80. Ensuite cinq milieux cultureux ont été ensemencés à partir de cette suspension. La gélose PDA, la Gélose à l'Extrait de Malt (MEA), et une gélose à base de nitrate de glycérol (G25N). Les quatre milieux ont été incubés à 25°C tandis que le milieu Czapec extrait de levure agar (CYA) a été incubé à différentes températures : 5°C, 25°C et 37°C (**Annexe 1**) (**Figure II.6**).



Figure II.6 : Mode d'ensemencement des différents isolats du genre *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* d'après **Pitt et Hoking** (2009).

La technique décrite ci-dessus concerne les espèces du genre *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*. De même les espèces du genre *Alternaria* ont été identifiées par la technique « *Single spore* » mais avec les milieux suivants (**Pitt et Hocking, 2009**) : PDA, MEA, G25N, et le milieu Dichloran Chloramphénicol Peptone Agar (**DCPA**) ont été incubés à 25 °C tandis que le milieu **CYA** a été incubé à différentes températures : 5°C, 25°C et 37°C (**Figure II.7**).

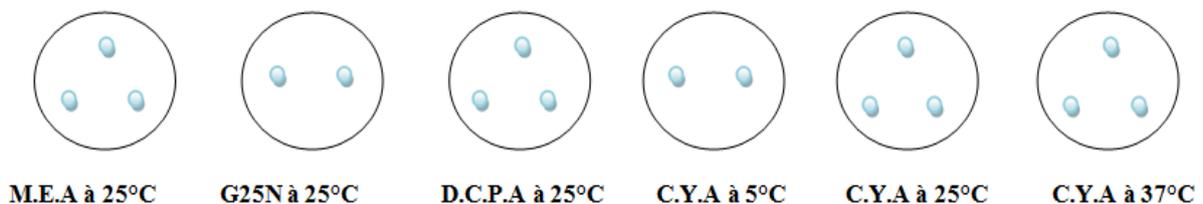


Figure II.7 : Mode d'ensemencement des différents isolats du genre *Alternaria* d'après **Pitt et Hoking** (2009).

II.4 Criblage et sélection des souches fongiques productrices de cellulase

II.4.1 Condition de culture

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des moisissures isolées a été réalisée sur deux types de milieux solides. La composition des deux milieux est similaire (0,3% NaNO₃, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄, 0,05% KCl, 0,05% peptone and 2% agar) sauf pour la source de carbone qui diffère. Le premier milieu gélosé est à base de 1% (p/v) de Cellulose brute, le deuxième est à base de 1% (p/v) de Carboxyméthyl Cellulose (CMC) (**Kasana et al., 2008 ; Jo et al., 2011 ; Colonia et Chagas Júnior, 2014**).

Les boîtes ont été inoculées avec un disque de mycélium (6 mm de diamètre) à partir d'une culture mûre de chaque isolat puis Incubée à 28°C pendant 5 jours.

II.4.2 Coloration au chromogènes

Le colorant indicateur de l'activité enzymatique est le Rouge de Congo à 0,1% (**Colonia et Chagas Júnior, 2014 ; Hanne et al., 2014**). Après la période d'incubation, les cultures ont été couvertes par la solution colorante pendant 30 min. Ensuite, la solution a été renversée et les cultures ont été lavées au chlorure de potassium à 0,5 M pendant 10 min.

II.4.3 Calcul de l'indice enzymatique

L'apparition d'une zone claire autour des colonies fongiques indique la présence de l'activité cellulolytique des isolats dans le milieu de culture. L'indice enzymatique est le rapport entre le diamètre de la colonie fongique et le diamètre du halo enzymatique (**Herculano, 2011**) :

$$EI = \frac{\varnothing h}{\varnothing c}$$

EI : Indice enzymatique ;

$\varnothing h$: Diamètre de la zone claire (halo enzymatique) en « mm » ;

$\varnothing c$: Diamètre de la colonie fongique en « mm ».

II.5 Identification moléculaire des souches cellulolytiques performantes

Les souches qui ont été sélectionnées dans le groupe des isolats cellulolytiques « SB_{3/4} et SB_{4/3} » ont subi une identification moléculaire qui a été réalisée par l'analyse comparative des séquences ITS (amplification de fragments par l'utilisation des amorces ITS1 et ITS4) au Laboratoire Paval, université de Grenoble Alpes, France.

II.5.1 Préparation des échantillons pour l'étude moléculaire

Les deux souches fongiques ont étéensemencées à raison de 10⁶ spores/ml dans des Erlenmeyers de 250 ml avec 100 ml de bouillon dextrose à la pomme de terre (PDB) puis incubées pendant 72h à 25°C sous agitation et à l'obscurité. Les cultures liquides ont par la suite été filtrées à travers une membrane en nitrocellulose de 0,45µm. Après la filtration le matériel fongique a été récupéré et congelé dans l'azote liquide puis broyé et conservé à -80°C pour extraction d'ADN ultérieur.

II.5.2 Extraction d'ADN

La méthode d'extraction de l'ADN par le protocole **de Lee *et al* (2006)** a été choisie. 0,2 g de mycélium a été ajouté à 800 µl de la solution lyse CTAB (**Annexe 1**). Ensuite 5 µl RNase (10 mg/ml) ont été ajoutés et la suspension a été incubée pendant une heure à 37°C. Les protéines dans la suspension ont été soumises à l'action de la Proteinase K avec un volume de 10 µl (20 mg/ml) et incubées pendant 30 min à 65°C. Ainsi, le lysat a été supplémenté par 800 µl de solution phenol-chloroform-isoamyl alcohol à raison de 25/24/1(v/v/v). Le mélange a été inversé plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une émulsion, puis suivi par une centrifugation (13,000 rpm/ 5min à 20°C) dont lequel la phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube Eppendorf. 0,7 ml d'une solution froide de 2-propanol a été ensuite ajoutée pour précipiter l'ADN fongique. Le précipité a subi une centrifugation (13,000 rpm/ 10 min à 4°C) avec récupération du culot. Ce dernier a été rincé plusieurs fois avec l'éthanol 70 % puis séché à l'aire libre. Par la suite l'ADN a été remis en suspension d'eau ultra-pure.

La vérification de la qualité de l'ADN a été faite par migration en gel d'agarose à 1 % dilué dans tampon TAE (**Annexe 1**) et la concentration a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre avec une absorbance de 260 nm.

II.5.3 Amplification de l'ITS de l'ADNr nucléaire par la Polymérase Chain Reaction (PCR)

La PCR est une réaction enzymatique qui permet l'amplification en chaîne d'une région spécifique de l'ADN pour l'obtention d'une grande quantité de ce fragment spécifique d'ADN à partir d'une faible quantité initiale d'ADN (Mullis et Faloona, 1987).

Pour amplifier la région ITS1-5.8S-ITS2 (Figure II.8) les amorces ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3') et ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ont été utilisées pour amplifier la région des gènes codant pour l'ARNr. Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume final de 50 µL contenant 5 µL de matrice ADN, 1 µL de solution de chaque amorce, 25 µL EconoTaq PLUS GREEN 2X Master Mix et 18 µL eau distillée stérile. L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur Eppendorf (Eppendorf Mastercycler) et les paramètres du cycle de la PCR comptent 30 cycles, dont les étapes sont la dénaturation thermique de l'ADN à 95 °C suivies par une hybridation des amorces à 50 °C – 65 °C et une élongation à 72 °C.

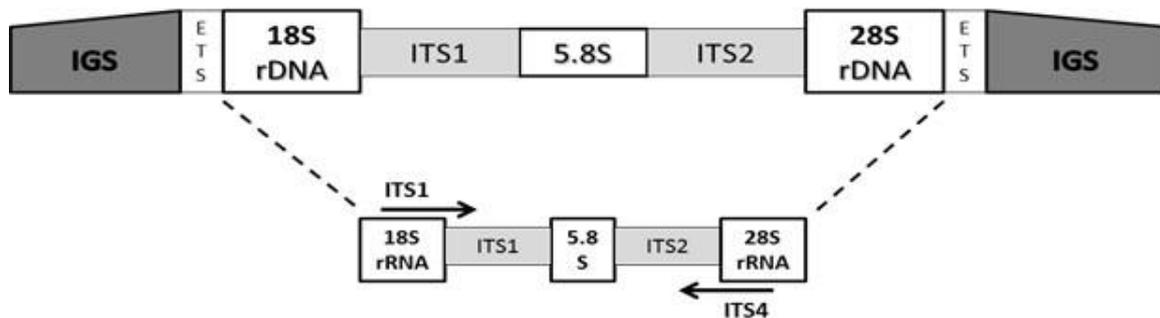


Figure II.8 : Diagramme schématisé de l'ARNr avec localisation des amorces de la région ITS des champignons composés des régions ITS1 et ITS2 séparées par le segment 5.8S. ITS1 et ITS4 sont des amorces sens et anti-sens largement utilisées pour amplifier l'ensemble de la région ITS (Mazari *et al.*, 2017).

À la fin de l'amplification, des fractions des produits PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %). D'où l'ADN est révélé par une coloration au Bromure d'éthidium visible sous une lampe UV. Les produits PCR ont été conservés à 4°C jusqu'à leurs utilisations, ensuite purifiés à l'aide d'un kit de nettoyage Nucleospin (Machery Nagel, France), selon les instructions du fabricant.

II.5.4 Séquençage, alignement et arbre phylogénétique

Les échantillons d'ADN ont été envoyés par le Laboratoire Pavat (université Grenoble Alpes, France) au laboratoire EUROFINs en Allemagne spécialisé pour le séquençage en. Les séquences obtenues ont été utilisées pour la recherche de similarité en utilisant le logiciel BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dans la banque de gènes NCBI. En revanche, les logiciels MAFFT v.7.221 (2019) et BioEdit v.7.2.5 (2013) ont été utilisés successivement dans l'alignement et le nettoyage des séquences. Le logiciel Mega1 software (version 11.0.10) a été utilisé pour créer l'arbre phylogénétique des deux souches « SB_{3/4} et SB_{4/3} ».

II.6. Etude de l'hydrolyse de cellulose contenue dans la palme du palmier dattier

II.6.1 Prétraitement de la palme

La palme sèche a subi un broyage en poudre à l'aide d'un moulin électrique. Ensuite 25 g de cette poudre a été mis dans des erlenmeyers contenant 250 ml d'eau distillée stérile. Des concentrations en KOH ont été ajoutées avec précaution à raison de 0 % (témoin), 10 %, 20 % et 50 % (g KOH/g palme sèche) dans chaque erlenmeyer. Le tout a été mélangé jusqu'à homogénéisation puis incubé à 20°C. Après 24h d'incubation, le mélange a été filtré à l'aide d'un tissu stérile. Ainsi, La matière solide obtenue a été lavée trois fois avec 100 ml d'eau distillée stérile (Liu *et al.*, 2015) (Figure II.9). Il faut noter que la conservation de la palme traitée s'est faite à 4°C pour une durée de 48h.

II.6.2 Dosage de cellulose libérée dans le prétraitement

Afin d'estimer la concentration de cellulose libérée dans le milieu, la méthode colorimétrique de dosage des glucides par la méthode Anthrone (Leng *et al.*, 2016) a été utilisée. Cette méthode est applicable aux sucres réducteurs (Whistler et Wolfrou., 1962) et non réducteurs (Scott et Melvin., 1957). Elle utilise un réactif composé de 0,5 g d'Anthrone dissout dans 145 ml d'eau distillée, puis complété à 500 ml avec de l'acide sulfurique concentrée.

Dans une série de tubes à essais, 1 g de chaque palme traitée au KOH (10 %, 20 % et 50%) plus le témoin (0%) ont été mis dans 9 ml d'eau distillée. 1 ml de chaque solution à analyser a été ajouté à 5 ml du réactif Anthrone. Comme témoin, l'eau distillée a été traitée de la même façon que la solution analysée. Les tubes ont été soigneusement agités puis incubés dans un bain-marie à 80°C pendant 20 minutes. Une couleur verte a été formée dûe à la présence

des sucres. Après refroidissement, la densité optique a été notée pour chacune des solutions à 620 nm. La liqueur contenant de l'eau distillée a été utilisée pour établir le zéro optique du spectrophotomètre.

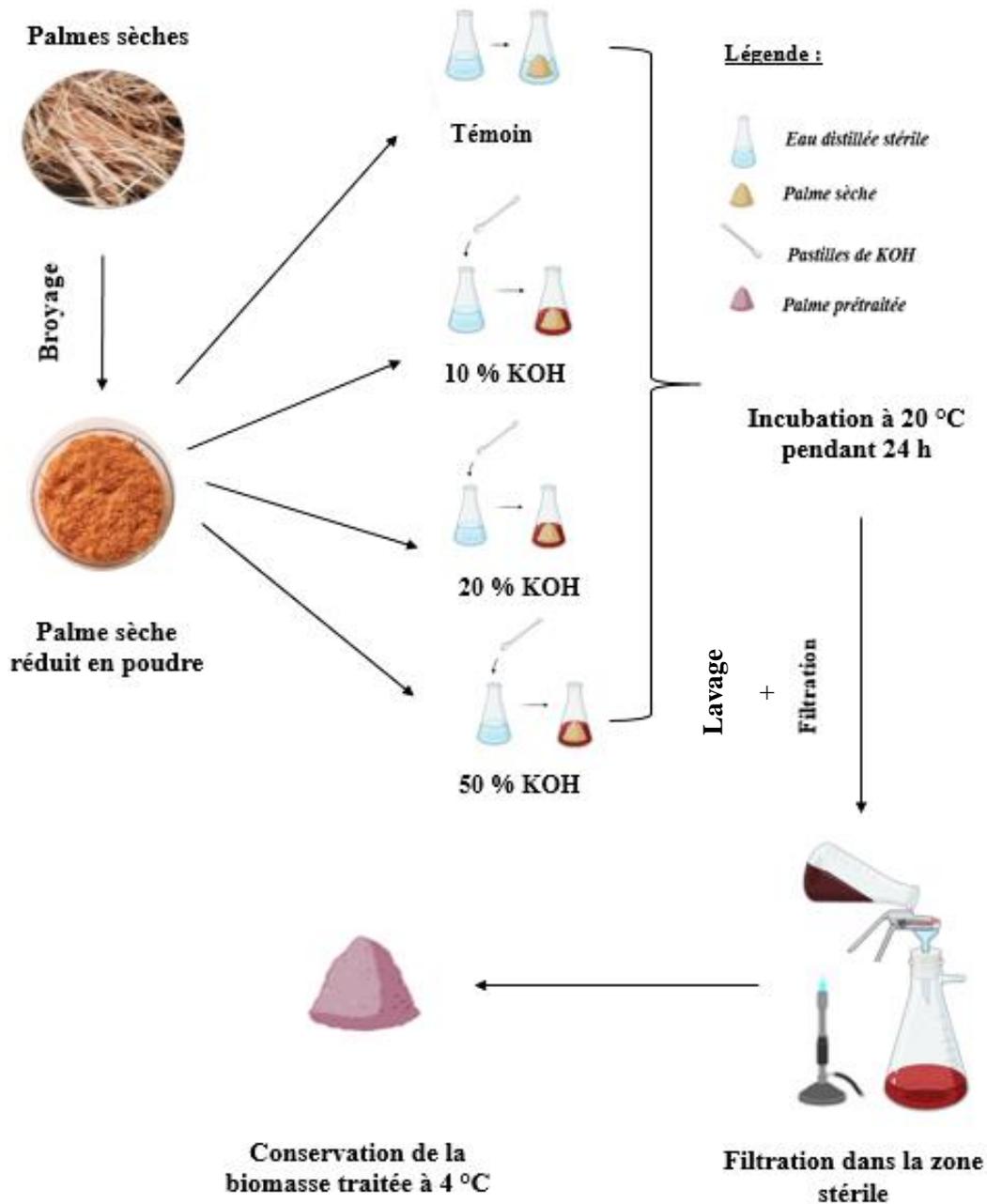


Figure II.9 : Schéma représentant les étapes de prétraitement de la palme sèche (Original, 2023). **Témoin** : palme sèche sans traitement, **10 % KOH** : palme sèche traitée avec une charge de 10 % de KOH, **20 % KOH** palme sèche traitée avec une charge de 20 % de KOH, **50 % KOH** palme sèche traitée avec une charge de 50 % de KOH.

Pour évaluer la teneur en un sucre donné, une courbe d'étalonnage a été établie pour ce sucre. La gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une solution mère de cellulose (1g/l) et des dilutions entre 0 à 800 mg/l de concentration (**Tableau II.1**). La courbe d'étalonnage en cellulose est présentée dans **l'annexe 5**.

Tableau II.1 : Préparation des dilutions de cellulose pour la réalisation de la courbe d'étalonnage.

Tube	Témoin	1	2	3	4	5
Volume (ml) pris de la solution mère (1 g/l)	0	1	2	3	4	8
Eau distillée (ml)	10	9	8	7	6	2
Volume de solution à analyser (ml)	1	1	1	1	1	1
Réactif Anthrone (ml)	5	5	5	5	5	5
Concentration finale en mg/l	0	100	200	300	400	800

II.7 Hydrolyse de la cellulose contenue dans la palme traitée par *Aspergillus iranicus* isolat MS-34 et *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43

Le milieu de production utilisé est le milieu **Mandels et Weber, (1969)**. La poudre de palme sèche a été utilisée comme source unique de carbone dans les quatre expériences à raison de 1%. La fermentation immergée a été réalisée dans des fioles jaugées stériles de 500 ml à raison de 250 ml de milieu stérile. Ensuite, le milieu de production a été inoculé avec 10^6 spores/ml à l'aide d'une cellule de Malassez. La température a été maintenue à 25°C, pH 5,5 et l'agitation était de 150 tours/min. Les échanges d'air étaient assurés par des pipettes Pasteur stériles qui étaient insérées dans le bouchon des fioles, les prélèvements étaient effectués par une tubulure stérile attachée à une seringue. Des prélèvements quotidiens ont été effectués pendant 10 jours.

Les échantillons utilisés pour le dosage des protéines et le dosage des activités enzymatiques ont été centrifugés à 4000 G pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu représente l'extrait enzymatique. Toutes les expérimentations ont été réalisées en triplicata.

II.7.1 Mesure du pH

Le pH des échantillons du milieu d'hydrolyse a été mesuré à trois reprises à l'aide d'un pH mètre de type ADWA (AD1030) préalablement étalonné.

II.7.2 Dosage des sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs a été effectué selon la méthode Anthrone (**Leng et al., 2016**) (voir section **II.5.2**). Ce test a été précédé par une précipitation des échantillons à l'acétate de plomb (10 %) et au bicarbonate (0,1 mg/l). La courbe d'étalonnage en glucose figure dans l'**Annexe II.4**. Elle a été tracée selon la gamme d'étalonnage qui est présentée dans le tableau en dessous (**Tableau II.2**).

Tableau II.2 : Préparation des dilutions de glucose pour la réalisation de la courbe d'étalonnage des sucres réducteurs par Anthrone.

Tube	Témoin	1	2	3	4	5
Volume (ml) pris de la solution mère (1 g/l)	0	0,5	1	1,5	2	2,5
Eau distillée (ml)	10	9,5	9	8,5	8	7,5
Volume de solution à analyser (ml)	1	1	1	1	1	1
Réactif Anthrone (ml)	5	5	5	5	5	5
Concentration finale en mg/l	0	50	100	150	200	250

II.7.3 Dosage des protéines

La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de **Bradford (1976)**. Cette méthode est l'une des méthodes les plus courantes pour mesurer la concentration des protéines

en solution avec l'albumine du sérum bovin (BSA) cristalline comme standard (**Annexe 4**). Elle repose sur la liaison du colorant bleu de Coomassie (G250) aux protéines (acides aminés basiques et aromatiques). La forme anionique (liée) du colorant est bleue et possède un spectre d'absorption maximale estimée à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité du colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

L'estimation de taux des protéines a été effectuée au premier, cinquième et dixième jour. Le dosage a été réalisé en ajoutant à 1 ml de chaque échantillon (surnageant) 2 ml de colorant Bradford. Le mélange a été incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 15min afin que l'équilibre de fixation protéines-colorants s'établisse. La teneur en protéines a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage (**Annexe 5**) tracée selon le tableau d'étalonnage suivant : (**Tableau II.3**).

Tableau II.3 : Préparation des solutions étalons pour le dosage des protéines.

Tube	Témoin	1	2	3	4	5
Volume (µl) pris de la solution mère (1 mg/ml)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	1000	980	960	940	920	900
Volume de solution à analyser (ml)	1	1	1	1	1	1
Réactif Bradford (ml)	2	2	2	2	2	2
Concentration finale en µg/ml	0	20	40	60	80	100
Concentration en mg/ml	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1

II.7.4 Dosage de l'activité enzymatique

Le dosage des activités enzymatiques a été effectué à la fin de l'hydrolyse.

- **Activité papier filtre (FPase)** : Elle détermine l'activité totale dans un complexe cellulasique selon la méthode de **Ghose (1987)**. Son principe est basé sur la mesure du pouvoir réducteur des sucres libérés lors de l'hydrolyse d'un substrat cellulosique.

Le mélange réactionnel a été constitué de la solution enzymatique (0.5 ml), de tampon citrate 0.1 M, pH 4.8 (1 ml) et 50 mg de papier filtre (Whatman N° 1) de 1x6 cm, incubé à 50°C, pendant 60 minutes.

- **Activité Endoglucanase (CMCase) :** c'est pour la détermination de l'endo 1,4-β-D-glucanase (EC 3. 2. 1. 4.) Elle a été mesurée dans un volume total de 1,5 ml d'un mélange réactionnel contenant 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué dans un tampon citrate 0.1 M, pH 4.8 et 0.5 ml d'une solution de CMC à 1% (p/v) préparée dans le même tampon que l'extrait enzymatique. Le mélange est incubé à 50°C pendant 30 minutes.

Le glucose libéré de l'hydrolyse du papier filtre et du CMC a été mesuré selon la méthode de Miller (**Miller, 1959**) par une réaction colorimétrique due à la présence du DNS (acide dinitrosalicylique) qui joue le rôle d'oxydant et le glucose étant le réducteur (**Annexe 4**). L'absorbance est déterminée à 540 nm. Ainsi, La concentration en glucose a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage de glucose (**Annexe 5**). Tandis que, la préparation de la gamme d'étalonnage est présentée dans le tableau **II.4**.

Tableau II.4 : Préparation des dilutions de glucose pour la réalisation de la courbe d'étalonnage par méthode DNS.

Tube	Témoin	1	2	3	4	5	6
Volume (ml) pris de la solution mère (1 g/l)	0	0,5	1	2	3	4	5
Eau distillée (ml)	10	9,5	9	8	7	6	5
Volume de solution à analyser (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Réactif DNS (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Procédure dans la préparation	Chauffage au bain Marie à 100°C pendant 5 min						
Eau distillée (ml) ajoutée après refroidissement	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Concentration finale en mg/l	0	50	100	200	300	400	500

L'activité enzymatique a été calculée en unité internationale par ml (UI/ml). Une unité enzymatique (UI/ml) est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1 μmol de glucose /min :

- FPase : $(\text{mg de glucose libéré} / 0,18016 \text{ mg}/\mu\text{mol}) / (0,5 \text{ ml} \times 60 \text{ min})$
 $= \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1} = \text{UI/ml}$.
- CMCCase : $(\text{mg de glucose libéré} / 0,18016 \text{ mg}/\mu\text{mol}) / (0,5 \text{ ml} \times 30 \text{ min})$
- $= \mu\text{mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1} = \text{UI/ml}$.

II.8 Etude de la cinétique de la cellulase produite par *Aspergillus iranicus* isolat MS-34 et *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43 en batch-fermentation

Le milieu utilisé est le même que le milieu de d'hydrolyse de la palme sèche, à l'exception de la source de carbone qui est remplacée par 1% de CMC. Les paramètres de culture (pH, température, concentration d'inoculum et durée de fermentation) sont les mêmes que pour la fermentation précédente.

Les paramètres étudiés durant toute la période de fermentation dans cette cinétique sont : le pH, le dosage de glucose par méthode DNS, le dosage des protéines et le dosage des activités enzymatiques (**Annexe 4 et 5**).

II.8.1 Dosage des activités enzymatiques

- ❖ **Le dosage des activités FPase et CMCCase** est décrit dans la section **II.6.4**.
- ❖ **Activité β -glucosidase** : la méthode utilisée pour déterminer cette activité est celle proposée par **Klyosov et Rabinowitch (1980)**, modifiée par **Oliveros et al. (2014)**. Pour chaque échantillon trois tubes à essai ont été utilisés. Le premier tube contenait une solution cellobiose 15 mM, un tampon citrate pH 4,8 et de l'eau distillée, le deuxième tube contenait un volume de l'extrait enzymatique et deux volumes d'eau et le troisième tube contenait une solution cellobiose, le tampon citrate et l'extrait enzymatique. Tous les tests ont été effectués à trois répétition. Les solutions ont été homogénéisées à l'aide d'un vortex puis incubées à 50°C pendant 30 min. La quantité de glucose libérée a été mesurée selon la méthode de DNS par soustraction des absorbances des blancs de celle de l'échantillon. Cependant, l'activité β -glucosidase a été déterminée selon l'équation d'**Afolabi (1997)** :

- β -glucosidase (UI/ml) = Glucose (mg) \times 0,0926.
Ici : 1.0 mg glucose = 0.5 / (0.18016 mg/ μ mol \times 1.0 ml \times 30 min)
= μ mol min⁻¹ ml⁻¹ = 0.0926 UI/ml

❖ **Mesure de la viscosité du CMC** : Parmi les méthodes utilisées pour déterminer l'activité cellulasique, c'est la technique de viscosimètre (**Klyosov et Rabinowitch, 1980 ; Ghose, 1987 ; Shuangqi et al., 2011**). C'est une détermination de la réduction du milieu CMC par le viscosimètre rotatif. Elle est basée sur la fonction des enzymes qui raccourcissent la longueur des chaînes polysaccharidiques de cellulose dans une solution visqueuse en la rendant moins visqueuse. La viscosité des solutions a été mesurée à température de 30°C et à une vitesse de rotation de 30 rpm en utilisant le rotor N° :1 (≤ 100 mPa.s⁻¹) (**Annexe 6**). Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un viscosimètre automatique FUNGILAB type V-PAD/142002 (**Figure II.10**).



Figure II.10 : Mesure de la viscosité des cultures à base du CMC avant et après hydrolyse enzymatique avec le viscosimètre automatique (FUNGILAB) (**Original, 2023**)

II.8.2 Caractérisation des activités enzymatiques

II.8.2.1 Effet du pH

L'étude de la variation des activités enzymatiques en fonction du pH a été mesurée à 50°C de chaque enzyme (CMCase et FPase) pour une gamme de pH de 3.0 à 8.0. Trois types de solutions tampon ont été utilisés pour suivre les effets du pH sur les activités enzymatiques : tampon citrate 0.1 M pour les pH 3.0 et 4.0, le tampon citrate-phosphate 0.1 M pour les pH de 5.0, 6.0 et 7.0, le tampon phosphate 0.2 M pour le pH 8.0 (**Annexe 1**).

II.8.2.2 Effet de température

L'enzyme brute dans le surnageant de culture a été utilisée pour la caractérisation des activités spécifiques de la CMCase et de la FPAase. Les échantillons ont été incubés à différentes températures, soit 40, 50, 60, 70 et 80 °C pour examiner la température optimale de l'activité enzymatique dans un tampon citrate (0,1 M, pH 4,8).

II.9. Production de Bioéthanol

II.9.1 Production de l'enzyme brute

La production d'enzyme a été effectuée selon la méthode de fermentation submergée. Le milieu de fermentation a été constitué par 2 L de milieux Mandel avec CMC à raison de 1% comme source unique de carbone. Le pH a été ajusté à 5,5 et la température a été maintenue à 30°C avec une agitation de 150 tours/minute. Les échanges d'air ont été assurés par la présence d'une pipete pasteur en verre fixé dans le bouchon des fioles. Dans ces conditions, l'oxygène dissous dans le milieu de culture ne va pas être inférieur à 20 % de la saturation en air. Les deux souches sélectionnées ont été inoculées séparément à raison de 10⁷ spores par ml de milieu. La production de l'enzyme s'est poursuivie pendant 10 jours. A la fin de la fermentation, une centrifugation à 4000 G pendant 10 minutes a été réalisée. Le surnageant constitue l'extrait enzymatique brut, il sert pour l'hydrolyse de poudre de la palme traitée et non traitée.

II.9.2 Dosage des activités cellulolytiques dans le mixte enzymatique

Pour obtenir une hydrolyse optimale de notre substrat végétale, nous avons mixé les extraits enzymatiques des deux souches fongiques sélectionnées. Aussi, l'activité exo-glucanase, endo-glucanase, et β -Glucosidase a été déterminée dans le mixte enzymatique selon les méthodes citées précédemment dans la section **II.6.4** et **II.7.1**

II.9.3 Hydrolyse enzymatique de la palme

La méthode utilisée dans cette expérience est celle de **Winarsih et Siskawardani (2020)** avec modification. Les échantillons utilisés dans l'hydrolyse enzymatique sont palme non traitée et palme traitée avec 20 % de KOH. 20 g de chaque échantillon a été mélangé avec 400 ml de mixte enzymatique et 400 ml du tampon citrate (0.1 M, pH 4.8). Ensuite, incubation du mélange à 60 °C pendant 4 jours avec une faible agitation. Le surnageant de l'hydrolysate a été recueilli par centrifugation à 3 420 G pendant 10 minutes (**Sriariyanun et al., 2019**). Un dosage des sucres réducteurs a été effectué selon la méthode de DNS (**Miller, 1959**). Le rendement en saccharification représenté par la conversion de la cellulose en glucose après processus d'hydrolyse enzymatique a été calculé selon la formule suivante de **Nurul Adela et al. (2015)** :

- ❖ **Rendement en saccharification (%)** : $[\text{Glucose}] / [\text{Cellulose initiale}] \times 100$
- ❖ **[Glucose]** : Concentration de glucose à la fin de l'hydrolyse enzymatique.
- ❖ **[Cellulose initiale]** : Concentration en cellulose initiale.

II.9.4 Fermentation du surnageant de l'hydrolysate

La levure *Saccharomyces cerevisiae* industrielle de la marque Eagle (pays de production : Egypte, date de fabrication : 19/04/2022, date de péremption : 18/04/2024) a été ajoutée à raison de 0,5 % (p/v) (**Winarsih et Siskawardani, 2020**) dans le milieu de fermentation qui était composé par un volume d'hydrolysate et un volume de milieu d'enrichissement (composé de 6 g extrait de levure, 0,5 g MgSO₄, 7H₂O, 1 g de KH₂PO₄, 1 g glucose et le pH était ajusté à 5,5) (**Sriariyanun et al., 2019**). Les cultures de levure ont été placées dans un agitateur-incubateur à 150 tours/min à température 30°C, pendant 72 heures.

II.9.5 Estimation du taux d'éthanol produit

A la fin de la fermentation, l'éthanol a été mesuré avec l'appareil EXAO-JEULIN (**Figure II.11**). Le capteur éthanol de cet appareil est associé à une sonde qui permet de mesurer une concentration d'éthanol dans l'eau en mg/L. Il est particulièrement adapté aux manipulations du métabolisme cellulaire tel que la fermentation alcoolique des levures.

La sonde éthanol a été préalablement étalonnée selon la procédure d'étalonnage indiquée dans le guide de l'appareil. La lecture des résultats a été faite à l'aide d'un système d'acquisition sur ordinateur. Ainsi, le pourcentage du rendement en bioéthanol est le rapport

entre la concentration de l'éthanol (g/l) obtenu et le rendement théorique en éthanol (g/l) multiplié par cent.

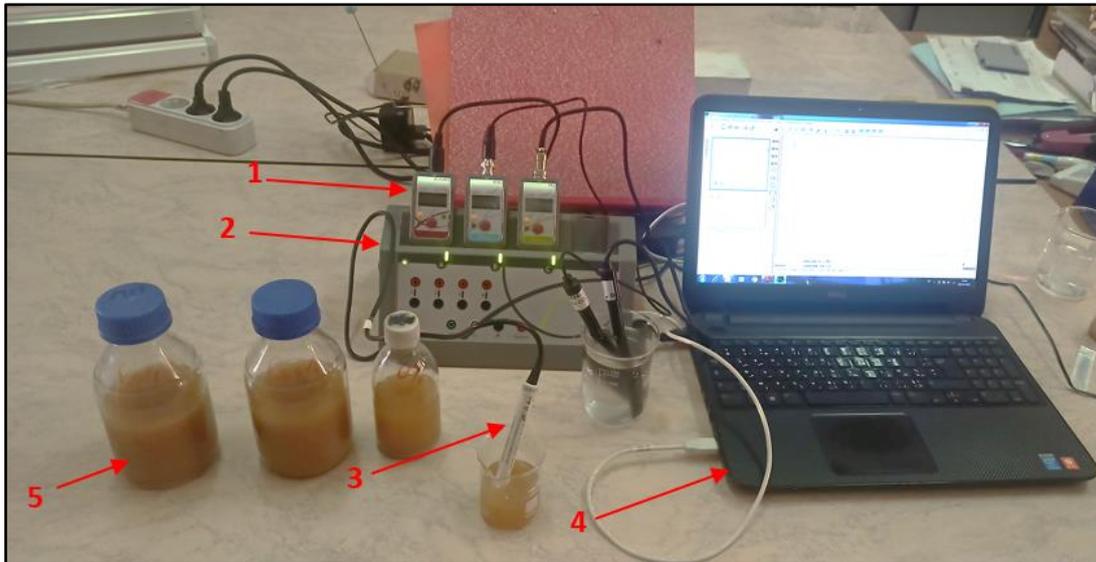


Figure II.11 : Mesure du taux d'éthanol après fermentation (1) : capteurs éthanol, O₂ et CO₂ ; (2) : Interface Foxy ; (3) : sonde éthanol ; (4) : ordinateur connecté à l'interface Foxy ; (5) : les solutions à analyser (Originale, 2022)

II.10 Analyse statistique

L'analyse de la variance « ANOVA » a été utilisée pour les tests suivants :

- Comparaison de la quantité de cellulose libérée dans chaque prétraitement ;
- Comparaison du taux des sucres libérés dans les cultures submergées des deux souches avec les différents prétraitements ;
- Effet de la température sur les activités cellulolytiques d'*Aspergillus iranicus* isolat MS-34 et *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43 ;
- Effet du pH sur les activités cellulolytiques d'*Aspergillus iranicus* isolat MS-34 et *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43.

CHAPITRE III :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1 Caractérisation de la palme sèche du palmier dattier

Les résultats de l'étude chimique sur la poudre sèche de la palme du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L., variété Fegousse) sont rapportés dans les tableaux **III.1** et **III.2**.

Tableau III.1 : Composition chimique de la palme sèche du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) variété Fegousse. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

Unité	Pourcentage massique (%)					
Paramètres analysés	H	MS	MO	MM	CB	MAT
Palme sèche	1,0733	98,92	92,12	07,87	37,2	0,0284
	$\pm 0,055$	$\pm 0,055$	$\pm 0,40$	$\pm 0,40$	$\pm 1,249$	$\pm 0,0149$

- **H** : humidité ; **MS** : matière sèche ; **MO** : matière organique ; **MM** : matière minérale ; **CB** : cellulose brute ; **MAT** : matière azotée totale.

Il a été constaté que le taux de la matière organique « MO » (92,12 % $\pm 0,40$) est bien supérieur à celui de la matière minérale « MM » (7,87 % $\pm 0,40$) (**Tableau III.1**). De plus le taux en matière azotée « MAT » s'est avéré très faible (0,0284 % $\pm 0,0149$). En conséquence, la teneur en protéine était de 0,177 %. En comparant ce résultat au fourrage destiné à l'alimentation animale dont la teneur en protéines contient au moins 16 % (**FAO, 2019**), la teneur protéique de la palme du palmier dattier est exessivement faible. Ce faible taux en MAT n'est pas spécifique à la variété Fegousse puisqu'il a également été observé dans l'étude de **Chehma et al. (2000)** lors de l'analyse des palmes sèches issues de deux variétés de dattes qui sont *Deglet Nour* et *Ghars*.

Concernant la composition minérale de la palme étudiée, quatre éléments minéraux ont été analysés (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ and K^+) (**Tableau III.2**). La concentration du calcium (Ca^{2+}) s'est avérée la plus élevée (14,40 $\pm 0,45$ mg/g), suivie par la concentration du magnésium (Mg^{2+}) (5,26 $\pm 0,36$ mg/g).

Tableau III.2 : Composition minérale de la palme sèche du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), variété Fegousse. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

Unité	Elément minérale			
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺
mg/g	14,40 $\pm 0,45$	5,26 $\pm 0,36$	1,60 $\pm 0,12$	2,09 $\pm 0,04$
%	1,44	0,52	0,16	0,20

L'examen des données bibliographiques concernant la teneur en minéraux montre que les intervalles sont de 0,12 à 0,53 % pour le calcium, de 0,005 à 0,39 % pour le sodium et de 0,07 à 1,10 % pour le potassium (**El-Shurafa, 1984**). D'une manière générale, les taux des minéraux mesurés pour la variété Fegousse sont conformes avec les résultats bibliographiques sauf pour le Calcium qui a enregistré une teneur plus élevée. L'étude de **Kolsi-Benzina (2008)** a montré que cette variation peut être due à plusieurs facteurs, tels que l'effet de la région et la position du palmier. De plus, la teneur en minéraux varie selon le stade de maturation, le cultivar, les conditions environnementales et les pratiques agronomiques (**Al-Farsi et Lee, 2008 ; Tripler et al., 2011 ; Dghaim et coll, 2021**)

La teneur en cellulose brute représentée par la matière organique restant insoluble après traitement acide et alcalin était de 37,2 %. Alors que, dans les résultats d'**Almi et al (2015)**, le pourcentage de la teneur brute en cellulose dans le pétiole, le rachis et les folioles est de 23,97 %, 54,02 % et 49,00 % respectivement. Cela pourrait correspondre à une teneur en cellulose brute dans leurs échantillons de la palme (42,33 %), qui est légèrement supérieure à notre résultat. De même pour l'analyse de **Nasser et al (2016)**, les valeurs de la teneur en cellulose brute est de 32,8% à 47,5%. Toutefois, il a été signalé que la composition des résidus du palmiers dattiers contient moins de cellulose que d'autres résidus lignocellulosiques (**Bledzki et al., 1996**).

III.2 Analyse chimique de l'eau brute du barrage

Etant donné que les souches fongiques étudiées dans ce travail proviennent d'un sol subaquatique de la région de Kenadsa (Barrage de Djorf Torba), des analyses chimiques ont été effectuées chaque mois durant 6 mois sur l'eau brute pour faire un état de lieu de notre zone d'échantillonnage. Pour cela, cinq critères ont été étudiés : Salinité, sodium, alcalinité, dureté, et pH. Les principaux sels responsables de la salinité de l'eau sont les sels du calcium (Ca^{2+}), du magnésium (Mg^{2+}), du sodium (Na^+), les chlorures (Cl^-), les sulfates (SO_4^{2-}) et les bicarbonates (HCO_3^-) (**Figure III.1 et III.2**). De ce fait, une valeur élevée de la salinité signifie une grande quantité d'ions en solution.

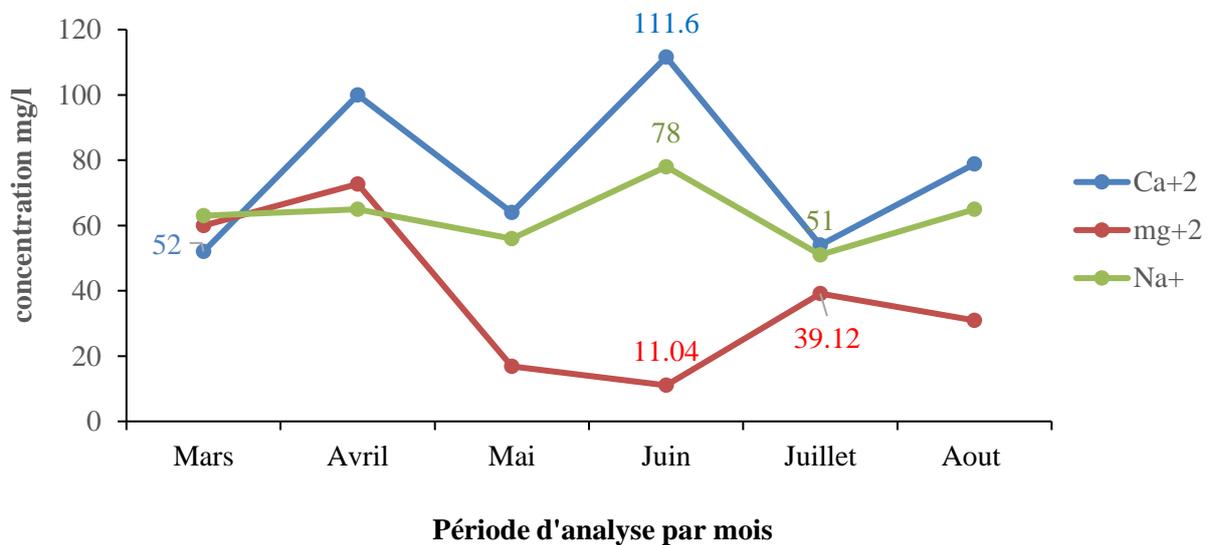


Figure III.1 : Concentration en cations de l'eau brute du barrage durant la période Mars – Août (2021)

Les échantillons de l'eau brute du barrage ont enregistré un taux de chlorure qui dépasse les normes Algériennes recommandées par le **JORA (2011)** (>200 mg/l). La valeur maximum enregistrée en mois d'Août est de 638,1 mg/l. Selon la grille de qualité des eaux de surface (**Annexe 7**), le magnésium, le calcium, le sulfate et les bicarbonates semblent être dans les normes. En ce qui concerne le pH, on peut dire que l'eau brute du barrage est une eau alcaline puisqu'elle est supérieure à pH 7 pendant toute la période d'analyse (**Figure III.3**).

Cette alcalinité d'eau peut favoriser le développement des populations bactériennes plus que celui des populations fongiques, qui sont plutôt acidophiles (pH optimum entre 4 et 6) (Nicklin *et al.*, 2000). Cependant, Botton *et al.* (1990) ont mis en évidence une croissance dans une large gamme de pH de 4.5-8.0 pour les moisissures.

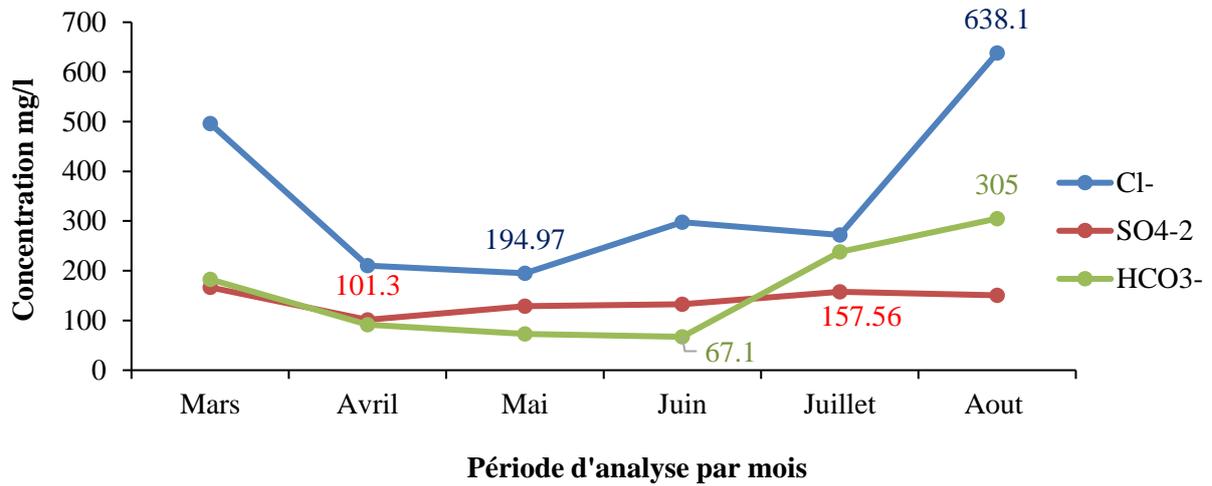


Figure III.2 : Concentration en anions de l'eau brute du barrage durant la période Mars – Août (2021)

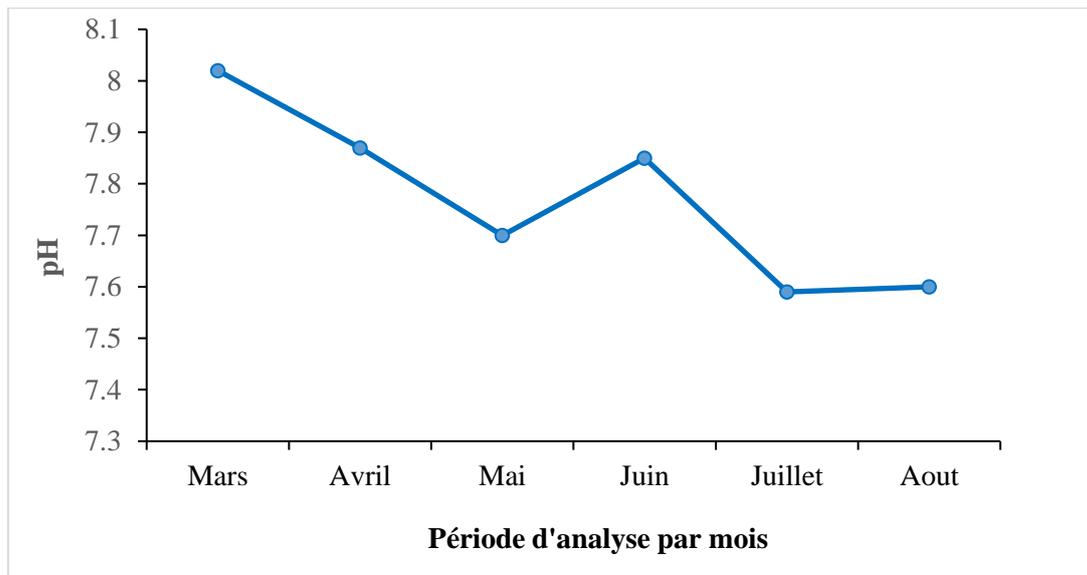


Figure III.3 : Évolution du pH de l'eau brute du barrage durant la période Mars – Août (2021)

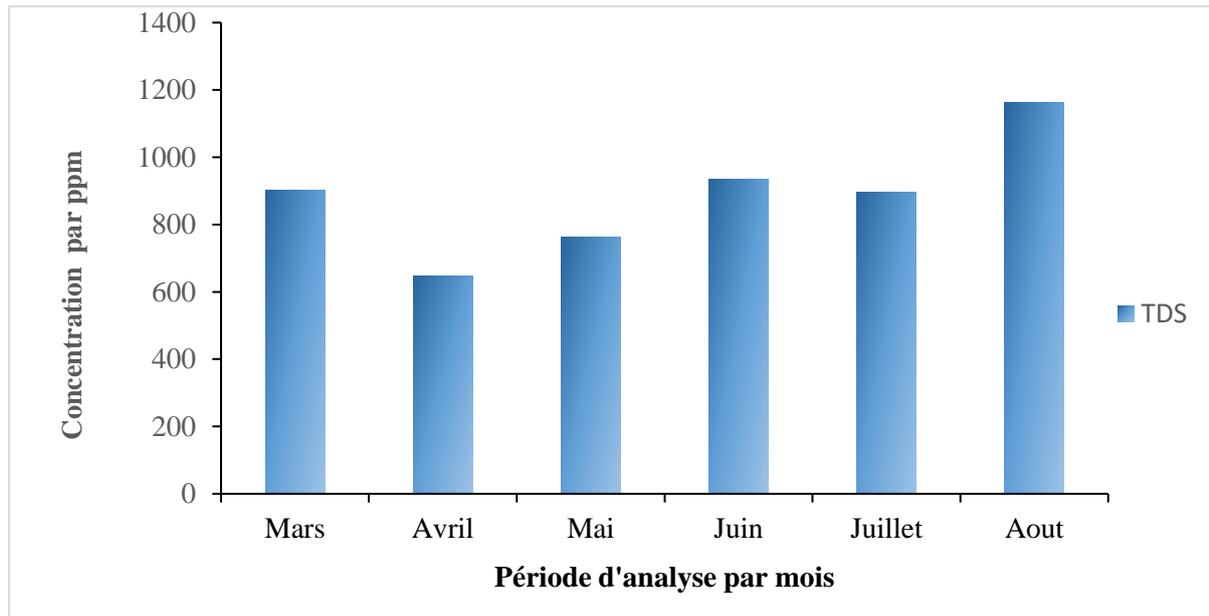


Figure III.4 : Taux des sels de l'eau brute du barrage durant la période Mars – Août (2021)

Les résultats montrent une élévation légère dans le taux des sels (TDS) des échantillons d'eau (**Figure III. 4**). Cette légère salinité peut être expliquée par l'effet de la sécheresse due à la diminution de la précipitation, par le réchauffement climatique entraînant une évaporation augmentée, la désertification et la dégradation des sols. D'autant plus, les dépôts continuels de sédiments entraînent un élargissement de la surface du barrage Djorf-Torba qui accentue l'évaporation de l'eau (**Kabour et al., 2015**).

D'après **Gunde-Cimerman et Zalar (2014)**, depuis plusieurs décennies les champignons ont été reconnus comme xérophiles ou xérotolérants, cela veut dire qu'ils sont capables de croître dans un environnement à faible activité d'eau (A_w).

III.2.2 Isolement et purification des isolats fongiques

On rappelle que les échantillons sont de deux biotopes totalement différents. Le premier biotope est de nature sèche, le deuxième biotope est humide (sol subaquatique).

L'isolement des souches fongiques à partir des échantillons des palmes sèches a permis d'obtenir 42 isolats, dont la majorité des isolats se localise dans la partie pétiole. Il est à noter que plus on s'éloigne du tronc la densité fongique diminue (**Tableau III.3**)

Tableau III.3 : Isolement des souches fongiques à partir des différents échantillons.

Origine	Milieu	Dilution	Nb de colonies
Palme sèche, partie Pétiole	PDA	10 ⁻²	15 (S ₁ , S ₂ , S ₃ , S ₄ , S ₆ , S ₂₁ , S ₂₃ , S ₂₄ , S ₂₅ , S ₂₆ , S ₂₇ , S ₂₉ , S ₃₀ , S ₃₁ , S ₃₂)
		10 ⁻³	4 (S ₅ , S ₇ , S ₁₉ , S ₂₀)
	CDA	10 ⁻²	3 (S ₂₂ , S ₂₈ , S ₃₃)
	Agar blanc	10 ⁻²	Abs
Palme sèche, partie Rachis	PDA	10 ⁻²	9 (S ₉ , S ₁₁ , S ₁₂ , S ₃₅ , S ₃₆ , S ₃₇ , S ₃₈ , S ₃₉ , S ₄₀)
		10 ⁻³	3 (S ₁₀ , S ₁₃ , S ₁₄)
	CDA	10 ⁻²	1(S ₃₄)
	Agar blanc	10 ⁻³	1(S ₈)
Palme sèche, partie Foliole	PDA	10 ⁻²	3 (S ₁₇ , S ₁₈ , S ₄₂)
		10 ⁻³	1 (S ₄₁)
	CDA	10 ⁻²	Abs
	Agar blanc	10 ⁻²	2 (S ₁₅ , S ₁₆)
Sol du barrage 1 (profondeur d'eau 5 cm)	PDA	10 ⁻¹	2 (Sb _{1/1} , Sb _{1/2})
		10 ⁻²	1 (Sb _{1/3})
		10 ⁻³	Abs
Sol du barrage 2 (profondeur d'eau 10 cm)	PDA	10 ⁻¹	1 (Sb ₂)
		10 ⁻²	Abs
		10 ⁻³	Abs
Sol du barrage 3 (profondeur d'eau 15 cm)	PDA	10 ⁻¹	2 (Sb _{3/1} , Sb _{3/2})
		10 ⁻²	1 (Sb _{3/4})
		10 ⁻³	1 (Sb _{3/3})
Sol du barrage 4 (profondeur d'eau 20 cm)	PDA	10 ⁻¹	4 (Sb _{4/2} , Sb _{4/3} , Sb _{4/4} , Sb _{4/5})
		10 ⁻²	1 (Sb _{4/6})
		10 ⁻³	1 (Sb _{4/1})

- Abs : absence de colonies

Alors que l'isolement à partir des échantillons du sol du barrage de Djorf Torba a permis d'isoler 14 isolats fongiques de couleurs et de structures différentes (**Tableau III.4 ; III.5**).

La répartition disproportionnée des souches fongiques dans les échantillons des palmes sèches démontre que les parties pétioles hébergent plus de souches fongiques que les parties Rachis et folioles. Cela peut être lié à la composition et la position des différentes parties dans la palme.

III.2.3 Identification des souches isolées

L'utilisation des caractéristiques de détermination décrites par **Ramirez (1982)**, de **Botton et al. (1990)** et de **Pitt et Hocking (2009)** a permis d'identifier les souches isolées.

III.2.3.1 Identification du genre

Les observations des structures microscopiques caractéristiques des souches fongiques isolées telles que le mycélium, les conidiophores et les conidies ont permis d'identifier les genres auxquels appartenaient les isolats. Ainsi, 4 genres de moisissures ont été mis en évidence (**Tableau III. 5**). Le genre *Alternaria*, le genre *Aspergillus*, le genre *Cladosporium* et le genre *Penicillium*.

III.2.3.2 Identification des espèces

Les observations des caractéristiques structurales des colonies fongiques telles que l'aspect du mycélium, la surface des colonies, la couleur du mycélium et du revers de la boîte ainsi que la présence ou l'absence des pigments ont permis d'identifier les espèces des souches isolées.

Parmi les espèces fongiques identifiées selon les clefs d'identification :

- ***A. flavus***

Les colonies d'*A. flavus* cultivées sur le milieu CYA à 25°C et 37°C sont supérieures ou égales à 35 mm de diamètre. Elles sont planes, denses, poudreuses, envahissantes, veloutées sur les zones marginales et floconneuses au centre avec une couleur jaune. Il n'y a pas de croissance à 5°C. Sur le milieu G25N, les colonies sont floconneuses avec une couleur blanche, leur diamètre moyen varie entre 25 mm à 40 mm. Sur le milieu MEA, les colonies présentent une couleur jaune verdâtre qui vire au vert olive après 14 jours d'incubation. Le diamètre moyen en fin de période d'incubation est de 50 à 70 mm.

Tableau III.4 : Caractères macroscopiques des souches fongiques isolées.

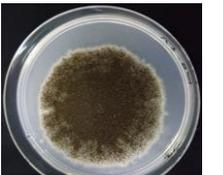
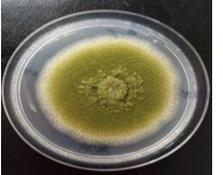
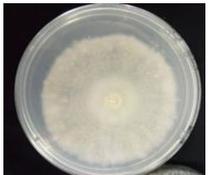
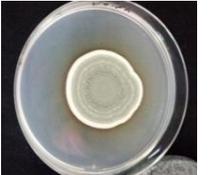
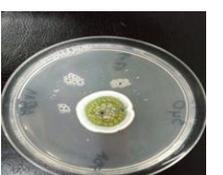
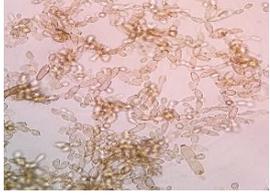
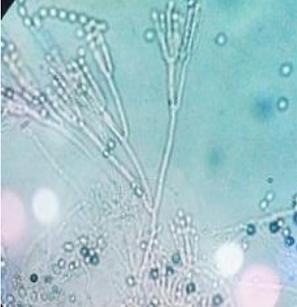
Genre avec Code des souches Correspondants	Fructification	Caractérisation de la colonie	Surface	Pigment de revers de la boîte	Vue d'ensemble	Revers de la boîte
<i>Alternaria</i> S ₂₄ , S ₂₇	Vert olive centre gris	Veloutée et floconneuse	Plane à flexueuse	Centre marron et contour brun		
<i>Aspergillus</i> S ₃ , S ₄ , S ₆ S ₂₀ , S ₂₂ , S ₂₃ , S ₃₄ , S ₃₅ , S ₃₇ , S ₄₁ , S ₄₂	Vert foncé Vert	Poudreuse Poudreuse,	Plane Plane	Pale Incolore (absence de pigments)	 	 
<i>Cladosporium</i> S ₈ , S ₉ , S ₃₀ , S ₃₃	Petite colonie brune olivâtre	Floconneuse à poudreuse	Plane	Pigment marron olivâtre		
<i>Penicillium</i> S ₁ , S ₂ , S ₅ , S ₇ , S ₁₀ S ₃₈ , S ₄₀	Vert pale Vert pale entouré par un cercle blanc Vert entouré par un cercle blanc	Floconneuse Floconneuse au centre avec une zone granuleuse Granuleuse	Plane Plane Plane	Incolore (absence de pigments) Pigment jaune orangé Pigment jaune	  	  

Tableau III. 5 : Caractères microscopiques des souches fongiques isolées.

Code de la souche	Genre	Aspect microscopique du genre	Photos de l'aspect microscopique du genre
S ₂₄ , S ₂₇	<i>Alternaria</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiophores à croissance sympodiale - Conidies marron en chaînes courtes irrégulièrement ramifiées - Acropétales s'allongeant au sommet, cloisonné longitudinalement et transversalement 	
S ₃ , S ₄ , S ₆ S ₂₀ , S ₂₂ , S ₂₃ , S ₃₄ , S ₃₅ , S ₃₇ , S ₄₁ , S ₄₂	<i>Aspergillus</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Mycélium cloisonné - Plusieurs Conidiophores, dressés non ramifiés, terminés en vésicules - Conidies de couleurs variées en chaîne divergente - Phialides formés directement sur les vésicules -Paroi des cellules épaisses 	
S ₈ , S ₉ , S ₃₀ , S ₃₃	<i>Cladosporium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Hyphes cloisonnés bruns -Conidies unicellulaires ellipsoïdales de couleur brun pâle à brun foncé et ont un hile foncé - Conidophore porte des renflements terminaux et intercalaires 	 
S ₁ , S ₂ , S ₅ , S ₇ , S ₁₀ S ₃₈ , S ₄₀	<i>Penicillium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Conidiospores isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille - Phialide branché directement à l'extrémité du conidiospore - Conidies en chaine de forme globuleuse ou cylindrique 	

- ***A. parasiticus***

Les colonies d'*A. parasiticus* sont caractérisées par une croissance à 25 et 37°C. Sur milieu CYA les colonies sont planes, denses et veloutées, de couleur blanche virant au jaune verdâtre aux extrémités, elles ont un diamètre qui varie entre 41 et 50 mm avec absence de croissance à température basse (5°C). Sur le milieu Glycérol Nitrate Agar à 25°C, le diamètre est presque le même avec une couleur blanche et jaune au centre. Sur le milieu MEA à 25°C les colonies ont un diamètre de 43 à 50 mm de couleur vert foncé et très dense.

- ***A. niger***

Les diamètres des colonies sur les milieux CYA et MEA varient entre 45 mm à 55 mm et parfois couvrant toute la boîte de Pétri. La structure est plane, veloutée avec un mycélium blanc surmontée par une couche brune foncée à noire. Les colonies sont généralement plus petites que celles sur milieu CYA variant de 30 à 35 mm de diamètre et sur G25N de 35 à 37 mm de diamètre, planes, veloutées, avec un mycélium blanc ou jaune pâle. Une absence de croissance à 5°C.

- ***A. terreus***

Les diamètres des colonies cultivées sur le milieu CYA de 33 à 40 mm de diamètre, elles sont planes, basses, veloutées et denses. Le mycélium est blanc et sur CYA à 37°C brun entouré par une couleur grisâtre. Colonies sur MEA de 35 mm à 40 mm de diamètre sont similaires à celles sur CYA. Colonies sur G25N de 22 à 30 mm de diamètre sont planes, revers marron et pas de croissance à 5°C.

- ***P. frequentans***

Les diamètres des colonies cultivées sur le milieu CYA à 25°C est de 34 à 40 mm de diamètre, elles sont planes avec une texture de surface veloutée, mycélium blanc entouré par une couleur verte avec un pigment soluble jaune vif et un revers jaune pâle. Le diamètre des colonies cultivées sur le milieu MEA est de 25 à 35 mm, elles sont veloutées, planes mycélium blanc visible aux centres seulement. Le diamètre des colonies cultivées sur le milieu G25N est de 24-25 mm. Il n'y a pas de croissance à 37°C ni à 5°C.

- ***C. cladosporoides***

Les diamètres des colonies cultivées sur le milieu CYA à 25°C est de 37 mm, et de 25 mm et 34 mm à 73°C cultivées sur le milieu CYA et MEA, respectivement. La couleur des

colonies est noire mouchetée avec un revers vert pale à grisâtre et une croissance lente. La structure de la colonie est dense veloutées et il n'y a pas de croissance sur 5°C.

- *A. alternata*

Les diamètres des colonies cultivées sur le milieu CYA et MEA est de 50 mm à 62 mm respectivement. Elles sont planes avec une floculation profonde, le mycélium blanc au début puis il devient gris au centre entouré par une couleur verte grise. Un revers brun aux alentours de la colonie et marron foncé. Le diamètre des colonies cultivées sur G25N est de 15-22 mm, elles sont de couleur vert olive. Il y a absence de croissance 37°C et à 5°C.

Les résultats de l'identification des isolats fongiques ont montré une diversité du genre et d'espèces. Les espèces appartenant au genre *Aspergillus* étaient les plus dominantes. D'après **Pitt et Hocking (2009)**, les espèces de ce genre sont les plus abondantes dans le monde, suivies par les espèces du genre *Penicillium* et *Fusarium*. Selon le même auteur, cette dominance est due à sa capacité de se développer à des températures élevées et une faible activité d'eau A_w . *A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, sont des espèces reconnues par leurs productions des mycotoxines et comme agents d'altération des céréales, des noix, des graines, des fruits et légumes.

Bien que les deux genres *Aspergillus* et *Penicillium* causent d'énormes pertes économiques en tant qu'agents de détérioration alimentaire, la présence des espèces de genre *Penicillium* dans les aliments est plus ou moins accidentelle. *P. frequentans*, connu au paravent sous le nom *P. glabrum* est une espèce non mycotoxinogène rencontrée fréquemment dans le blé, la farine, le soja, les arachides et aussi dans les produits à base de viande (**Domsch et al., 1980 ; Pitt et Hocking, 2000**).

Cladisporium est un genre couramment isolé et souvent dominant dans la microflore aéroportée. Les espèces de ce genre se présentent à la fois comme saprophytes et comme agents pathogènes des plantes (**Crouse et al., 2007**). *C.cladosporoides* a été isolé dans une grande gamme d'aliments y compris les légumes et fruits frais, le blé, la farine, le riz, la viande fraîche et congelée, les noix et même le poisson (**Pitt et Hocking, 2019**).

A l'inverse, les espèces appartenant au genre *Ulocladium*, connu sous le nom *Alternaria*, sont rarement trouvées dans les aliments. Elles ont été isolées à partir des noisettes, des noix, du pistache, d'orge et d'arachides (**Pitt et Hocking, 2000**).

III.3 Criblages et sélection des souches fongiques productrices des cellulases

La quantification et l'obtention des cellulases fongiques sont des objectifs difficiles à atteindre (Stephen *et al.*, 2003). De ce fait, deux milieux solides ont été mis utilisés pour permettre le criblage de 56 isolats fongiques. Un milieu solide contenant du carboxymethylcellulose (CMC) pour une sélection primaire et un deuxième milieu solide contenant de la cellulose Avicel (cristallin) (CA) pour une sélection secondaire des souches cellulolytiques performantes. Seules les souches ayant répondu positivement aux deux tests ont été sélectionnées. Elles sont présentées dans le **Tableau III. 6** et la **Figure III. 5**.

Tableau III.6 : Diamètres des colonies et des halos d'hydrolyse obtenus sur milieu CMC et CA avec indice enzymatique des isolats cellulolytiques. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types avec N=4.

Code isolat fongique	Diamètre colonie en CMC	Diamètre halo en CMC	Indice enzymatique CMC	Diamètre colonie en CA	Diamètre halo en CA	Indice enzymatique CA
Sb_{3/4}	54,5 mm $\pm 0,5$	4 mm $\pm 0,1$	1,073	52 mm $\pm 0,1$	1 mm $\pm 0,1$	1,019
Sb_{4/3}	45,25 mm $\pm 0,7$	3,5 mm $\pm 0,5$	1,077	40,3 mm $\pm 0,57$	6,5 mm $\pm 0,5$	1,16
S_{9/18}	77 mm $\pm 0,1$	1,5 mm $\pm 0,5$	1,019	Abs	Abs	/
S_{11/18}	25,5 mm $\pm 0,5$	8,5 mm $\pm 0,5$	1.33	Abs	Abs	/
S_{12/18}	20 mm $\pm 0,1$	11.5 $\pm 0,5$	1.57	Abs	Abs	/

▪ Abs : absence

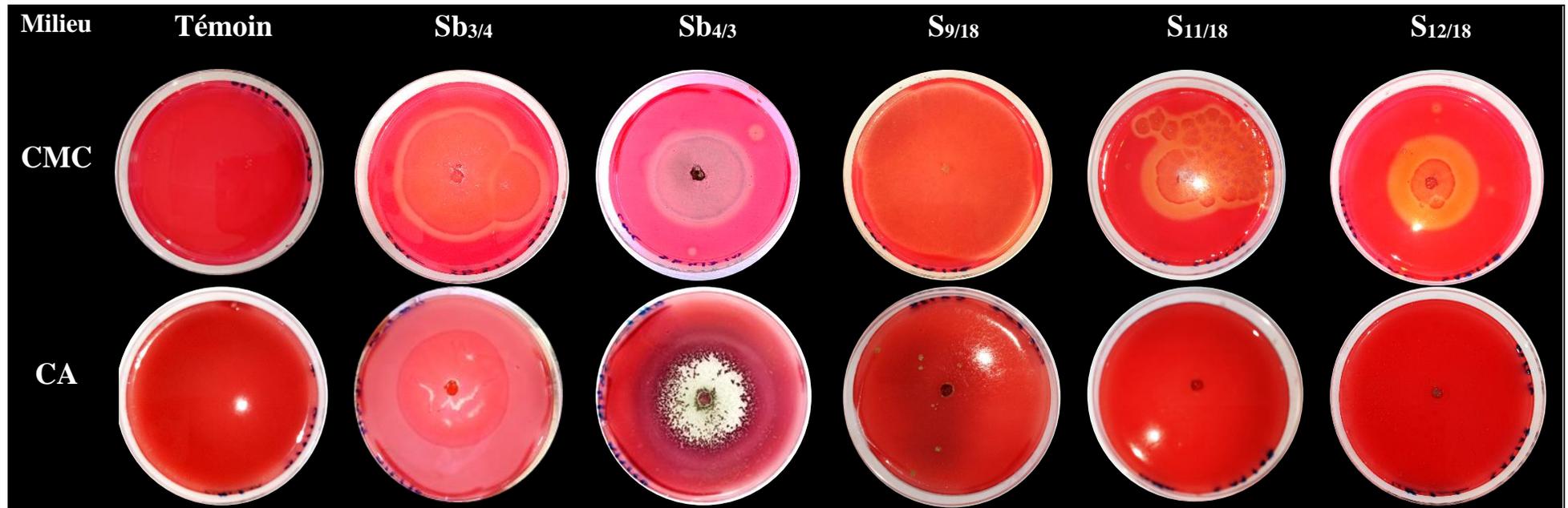


Figure III.5 : Évaluation de l'activité enzymatique des isolats cellulolytiques sur milieux CMC (carboxymethyl-cellulose) et milieu CA (cellulose Avicel) à 25°C après 5 jours d'incubation.

La méthode de screening en milieux solide avec des chromogènes indicatifs a été souvent utilisée pour la détection des cellulases produites par des microorganismes à potentiel biotechnologique (**Kasana et al., 2008 ; Jo et al., 2011 ; Colonia et Chagas Júnior, 2014**). Utilisant cette méthode nos résultats ont montré que 9 % des isolats fongiques testés ont répondu positivement au screening. Deux entre eux ($Sb_{3/4}$ et $Sb_{4/3}$) ont été isolés des échantillons du sol subaquatique du barrage Djorf El Torba et les quatre restantes sont issus de la palme du palmier dattier. Le criblage réalisé en milieu CMC a présenté une dégradation du colorant rouge Congo, le halo enzymatique passe du rouge à l'orange (**Figure III. 5**), Tandis que pour le milieu CA la dégradation de la couleur est jaune. A savoir, Les indices enzymatiques supérieurs à 1,0 représentent clairement la sécrétion enzymatique à l'extérieur de la colonie et quant à ceux avec des valeurs inférieures à 1,0 ils définissent la croissance de la colonie supérieure au halo enzymatique.

Les résultats obtenus ont aussi permis de révéler une variabilité significative au sein de ces champignons cellulolytiques. Il apparaît clair que les souches isolées à partir de la palme n'ont pas pu se développer sur le milieu minéral à base de cellulose Avicel car elles ne possèdent pas une activité Exoglucanase (CBH), contrairement aux deux souches issues du barrage qui exhibent une bonne activité CBH ($EI_{Sb_{3/4}}$: 1,019 ; $EI_{Sb_{4/3}}$; 1,16). Cependant, l'activité Endoglucanase (EG) la plus élevée était observée chez l'isolat de la palme $S_{12/18}$ avec un indice enzymatique EI : 1,5. Selon des études antérieures, une hydrolyse efficace de la cellulose est déterminée par la coopération des trois types d'enzymes (**Shuangqi et al. 2011**). Cependant, selon **Zhang et al. (2006)** et **Miklaszewska et al. (2016)**, le rôle le plus important dans le processus est dû aux endoglucanases (EG) et exoglucanases (CBH). De ce fait les deux isolats fongiques des sols subaquatiques ont été sélectionnés pour les expériences qui suivent.

Comparé à d'autres résultats, les plus grands halos de criblage obtenus sur milieu CMC avec le chromogène Rouge de Congo étaient de 40 mm et dans le milieu Avicel de 51 mm en utilisant des champignons filamenteux isolés des sols (**Colonia et Chagas Júnior, 2014**). Dans l'étude de **Kwon et al., 2007** le plus grand diamètre de la zone claire avec des *Fusarium spp* était de 25 à 40 mm seulement.

Également, l'étude de **Miklaszewska et al. (2016)** présente l'indice enzymatique (EI) de plusieurs genres et espèces fongiques à activité cellulolytique dont le groupe des *Penicillium sp.* (26 isolats) avait une moyenne d'EI égale à 1,12. Pour le groupe

d'*Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *Aspergillus spp.*) l'EI variait entre 0,95 et 1,94 et pour les *Trichoderma spp.* (16 isolats) la moyenne de EI était de 0,67.

III.4 Caractérisation des deux souches cellulolytiques sélectionnées

III.4.1 Caractérisation phénotypique

Comme il a été cité auparavant, le screening en milieu solide a permis de choisir deux isolats à activité cellulolytique supérieure. Le profil phénotypique de chaque isolat est comme suit :

1. Isolât Sb_{3/4}

Cette souche a été isolée du sol subaquatique du barrage Djorf-Torba. Le mycélium obtenu après croissance sur milieu gélosé PDA, MEA, CYA et G25N est de couleur blanche à blanc cassé (**Figure III.6**), une texture de surface veloutée floconneuse au centre, le revers beige au miel. Néanmoins, dans les cultures matures la couleur de mycélium devient jaune. Une faible sporulation, absence de sclérose et de pigment soluble. Ainsi, le diamètre des colonies diffère d'une gélose à une autre : il est de 28-31 mm dans le PDA ; 18-23 en MEA ; 18-22 dans CYA à 25°C ; 21-25 dans CYA à 37°C et aucune croissance fongique à 5 °C. Sous microscope photonique, l'isolât Sb_{3/4} présente les caractéristiques du genre *Aspergillus*.

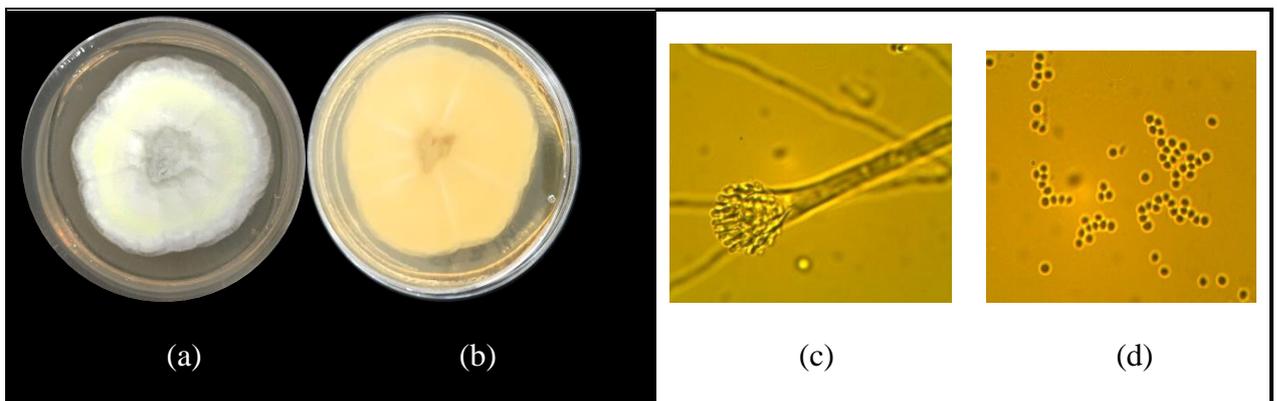


Figure III.6 : *Aspergillus sp.* (Isolat Sb_{3/4}). (a) colonie sur gélose PDA après 7 jours d'incubation à 25°C. (b) revers de la colonie. (c) conidiophore. (d) conidies.

2. Isolat Sb_{4/3}

Cette souche a été aussi isolée du sol subaquatique du barrage Djorf-Torba. Les colonies obtenues après culture sur les milieux gélosés PDA, MEA, CYA et G25N sont denses avec une structure granuleuse. Sur le milieu PDA la colonie est de couleur verte et un contour blanc, revers jaune brun à brun foncé. Sur les milieux CYA et MEA le centre de la colonie est un vert olive entouré par un vert clair. Sur G25N les colonies sont blanches. Parfois les colonies produisent une pigmentation rouge brique avec un revers de couleur rouge vif (**Figure III.7**). Le diamètre sur les différents milieux gélosés est comme suit : MEA : 30-35 mm G25N 25°C : 23 mm ; CYA à 25°C diamètre des colonies : 18-22 mm ; CYA à 37°C : 24-25°C, absence de croissance sur 5°C.

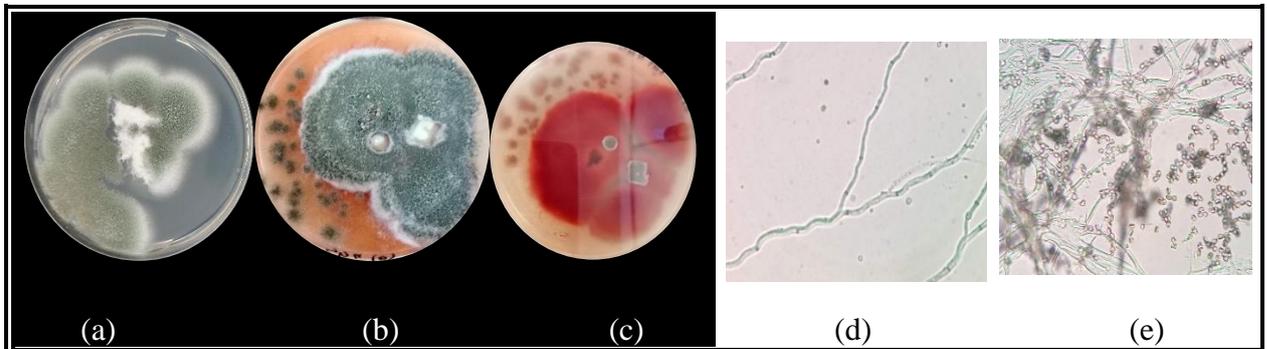


Figure III.7 : *Penicillium verrucosum* (Isolat Sb_{4/3}). (a) colonie sur gélose PDA après 7 jours d'incubation à 25°C. (b) pigmentation produite sur PDA (c) revers de la colonie. (d) structure de fructification. (e) conidies.

Les résultats obtenus par les tests d'identification classique ne permettent pas de faire une caractérisation précise de l'espèce. Selon les clés d'identification citées auparavant, la souche Sb_{3/4} présente les caractéristiques les plus proches à *A. candidus* et *A. niveus*. A l'opposé de Sb_{3/4}, la présence de pigmentation rouge dans les cultures de la souche Sb_{4/3} a permis de l'identifier comme une *P. verrucosum*.

III.4.2 Caractérisation moléculaire

Afin de confirmer l'identification des souches cellulolytiques, *Aspergillus spp.* isolat Sb_{3/4} et *Penicillium verrucosum* isolat Sb_{4/3} une identification moléculaire a été effectuée. Pour cela, les amorces ITS 1 et ITS 4 ont été utilisées dans l'amplification par PCR et les produits obtenus ont été séquencés. Ces séquences ont été utilisées pour réaliser un Après

BLAST sur la banque génique Genbank, suivi par alignement et nettoyage des séquences. Les données obtenues ont révélé que parmi toutes les séquences détectées, la plus grande similarité (99,82 %) de la souche *Aspergillus spp.* isolat Sb3/4 était avec la souche *Aspergillus iranicus* DTO 203-D7 (Genbank KP987077.1).

Tandis que, la souche *Penicillium verrucosum* isolat Sb_{4/3} était similaire à l'espèce *Talaromyces verruculosus* strain CPO MARH6 (Genbank MN944729.1) avec un pourcentage d'identité nucléotidique de 99,62 %.

Les séquences issues des nouvelles souches de l'espèce *Aspergillus iranicus* et l'espèce *Talaromyces verruculosus* sont déposées dans la base de données NCBI GenBank, sous le numéro d'accession suivant :

- ✓ *Aspergillus iranicus* isolat MS-34 : OL823064.1
- ✓ *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43 : OQ789265.1

III.4.3 Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques ont été produites à partir des données du BLAST et l'alignement des séquences à l'aide du MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021) avec la méthode de Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987). Le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les taxons associés se sont regroupés dans le test bootstrap (1000 répliqués) est indiqué sous les branches (Figure III.7 ; III.8). Les deux arbres sont dessinés à l'échelle, avec des longueurs de branches dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. En ce qui concerne les distances évolutives, elles ont été calculées à l'aide de la méthode à 3 paramètres de Tamura (Tamura, 1992). Ces analyses ont été réalisées sur 41 séquences nucléotidiques pour *A. iranicus* isolat MS-34 et 45 séquences nucléotidiques pour *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43.

Selon l'analyse phylogénétique, *A. iranicus* isolat MS-34 est phylogénétiquement proche de l'espèce *A. niveus*, *A. neoindicus*, *A. allahabadii* et *A. candidus* (Figure III.8). Tandis que, *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43 est étroitement lié à *T. pinophilus*, *T. oumae-annae*, *T. adpressus* et quelques souches de *Penicillium sp.* (Figure III.9). Cependant, les caractéristiques culturelles et micro-morphologiques peuvent être différentes d'une espèce à une autre. Les résultats taxonomiques dans l'étude d'Arzanlou *et al.* (2016) sont conformes à nos résultats d'analyse phylogénétique pour la souche *A. iranicus* isolat MS-34. En revanche, l'étude de Yilmaz *et al.* (2014) illustre que l'espèce *Talaromyces*

verruculosus est bien liée à l'espèce *T. oumae-annae* dans la classification de *Talaromyces* section *Islandici*.

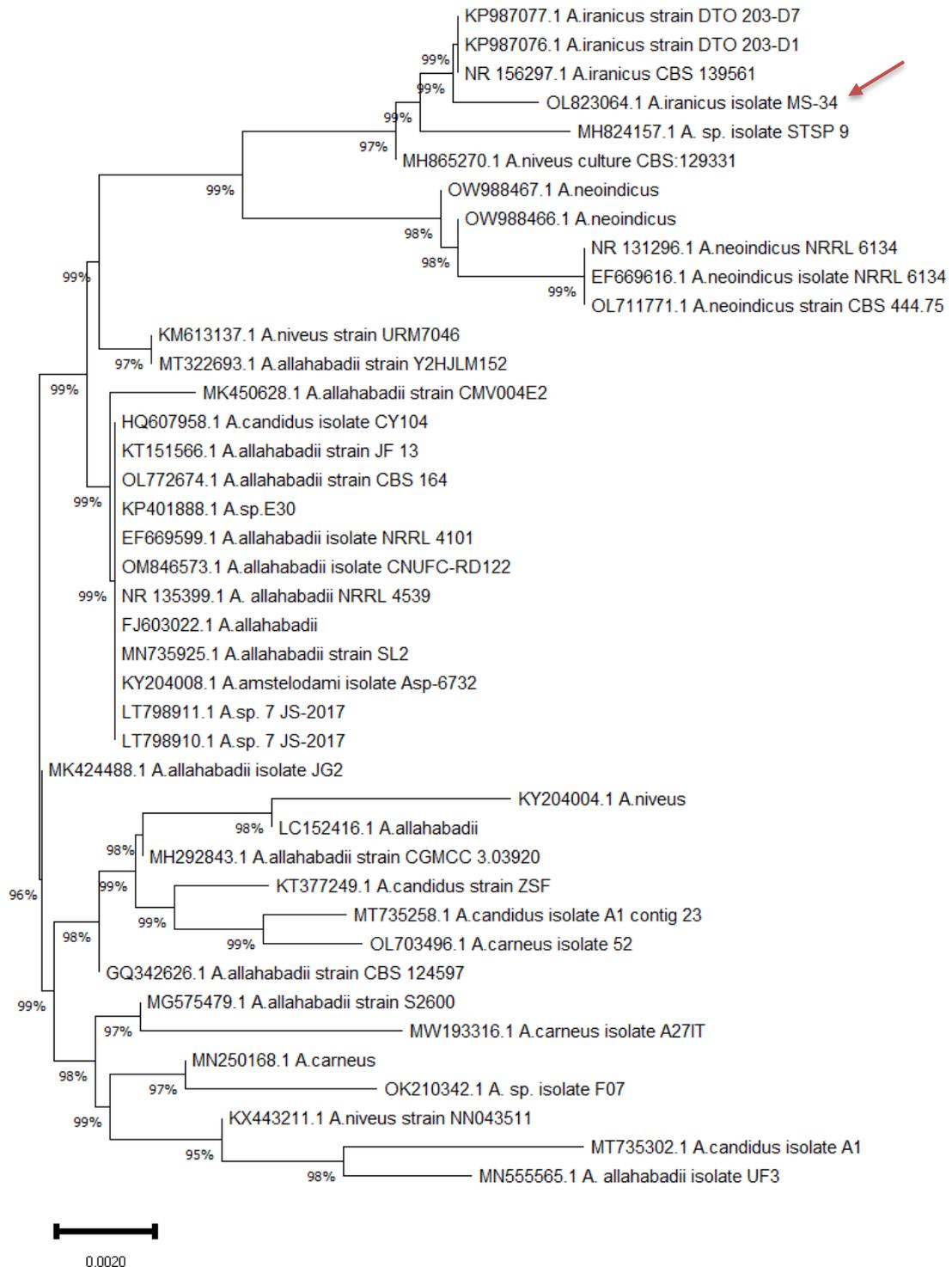


Figure III.8 : Position de la souche *Aspergillus iranicus* isolat MS-34 dans l'arbre phylogénétique. Réalisé dans MEGAX11 (2021)

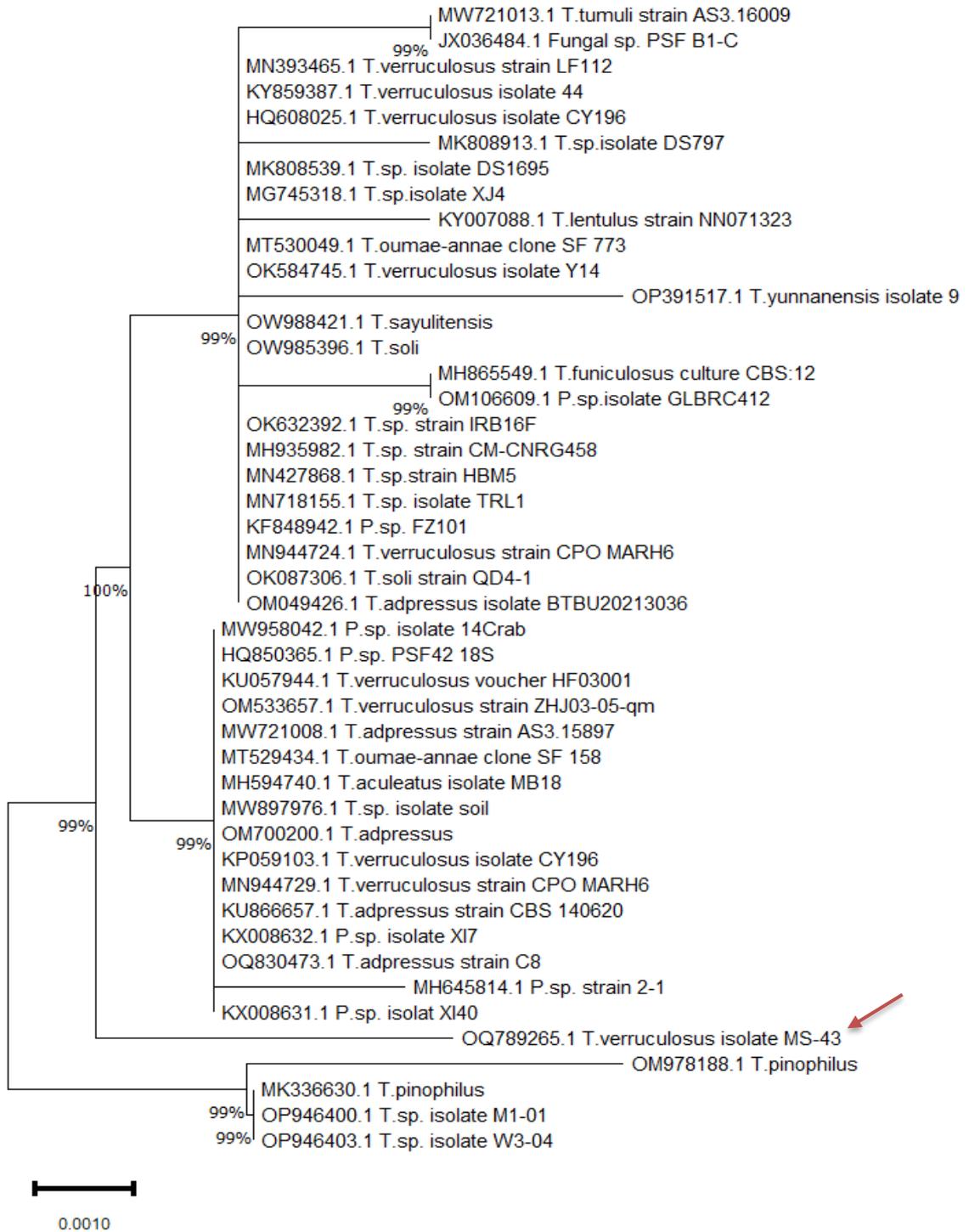


Figure III.9 : Position de la souche *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43 dans l'arbre phylogénétique. Réalisé dans MEGAX11 (2021)

III.5 Etude de l'hydrolyse de celluloses contenues dans la palme du palmier dattier

III.5.1 Estimation de cellulose libérée dans chaque prétraitement

L'objectif d'un prétraitement est de rendre accessible les différents composants de la biomasse lignocellulosique. Dans notre cas, c'est pour augmenter l'exposition de la cellulose de la palme sèche aux attaques enzymatiques dans les milieux d'hydrolyses. Pour cela, trois solutions alcalines de KOH (10 %, 20 % et 50 %) ont été utilisées en parallèle avec le témoin (palme non traitée) pour vérifier, optimiser et évaluer l'efficacité du prétraitement sur l'hydrolyse fongique de nos échantillons (**Figure III.10 et III.11**).

Les résultats dans la figure III.11 montrent une corrélation entre l'augmentation progressive des concentrations en KOH (0, 10, 20 et 50 %) et l'augmentation progressive de la teneur en cellulose dans les milieux (539,44 mg/l, 897,22 mg/l, 1171,11 mg/l et 1276,11 mg/l). Il paraît clair que la quantité de cellulose libérée dans le milieu d'hydrolyse est nettement influencée par le degré du prétraitement employé auparavant. Cette augmentation est statistiquement significative selon l'analyse effectuée par le test statistique ANOVA avec une valeur de $p = 0,009$ ($P \leq 0,05$) (**Annexe 8**).

Il a été rapporté dans plusieurs études que le prétraitement alcalin améliore efficacement le rendement d'hydrolyse de nombreuses biomasses (**Sun et al., 1995 ; Kim et Holtzapfle, 2005 ; Liu et al., 2015 ; Memon et Memon, 2020**). Le prétraitement utilisé dans cette étude a été choisi pour des échantillons ayant une teneur en cellulose comprise entre 33 et 40 % (p/p) (**Talebnia et al., 2010 ; Liu et al., 2015**). En conséquence, le prétraitement de nos échantillons de la palme sèche qui contiennent 37,2 % de cellulose, s'est avéré efficace. Il a été observé que l'intensité de la couleur du liquide séparé dérivé du traitement au KOH devenait plus sombre avec la sévérité du prétraitement (**Figure III.10**).

Selon **Liu et al. (2015)**, il existe une corrélation positive entre la teneur en lignine et l'hémicellulose dans le filtrat noir et la charge initiale en KOH. Ce qui est expliqué par le fait que le prétraitement a éliminé les composants amorphes comme la lignine et l'hémicellulose (**He et al., 2008**).

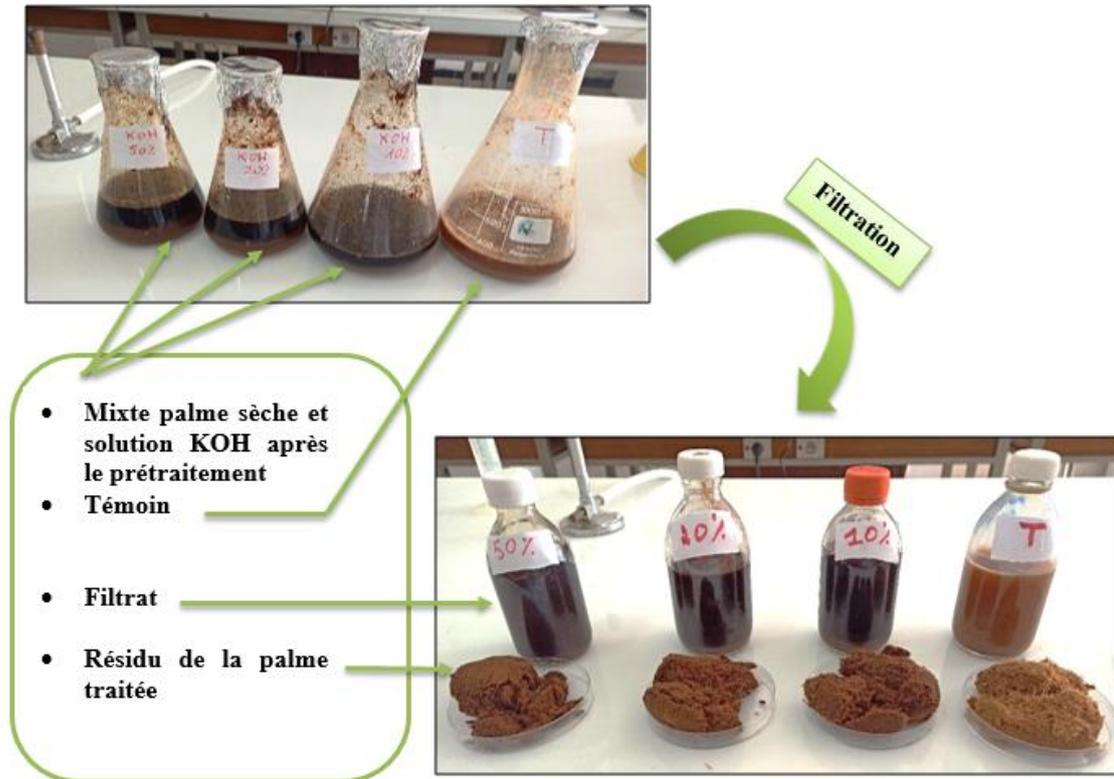


Figure III.10 : Résultats de prétraitement alcalin de la palme sèche.

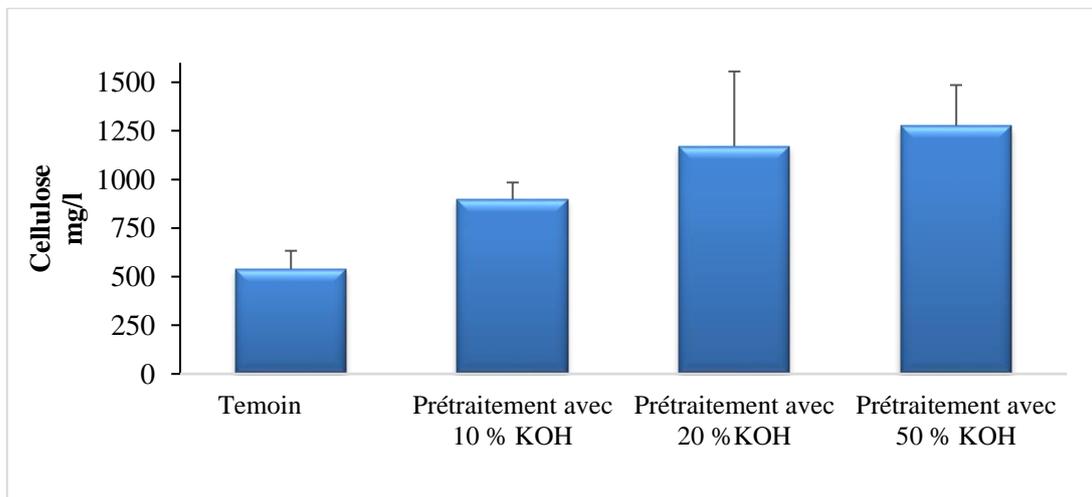


Figure III.11 : Concentration de cellulose avant et après prétraitement alcalin. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écartst-ypes. N=3.

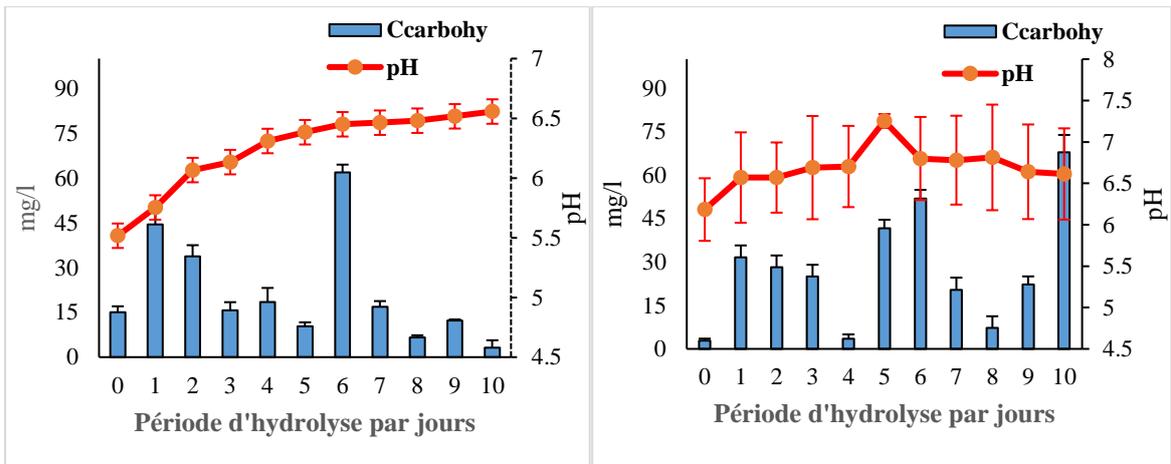
III.5.2 Hydrolyse de la palme sèche par les souches *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43

Dans le milieu minérale « Mandel » la poudre de la palme sèche traitée et non traitée a été utilisée comme substrat cellulosique hydrolysable par les souches *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43. Quatre paramètres ont été mesurés dans cette expérimentation : le pH, la concentration des protéines et sucres réducteurs et l'activité enzymatique. Les résultats sont présentés dans les planches **III.1, III.2 et III.3 (Annexe. 9)**.

Il a été observé que les quantités des carbohydrates ont atteint des valeurs maximales à différentes périodes de fermentation dans les cultures submergées. Les valeurs maximales dans l'hydrolyse avec la souche *A. iranicus* isolat MS-34 sont entre 51,90 et 61,90 mg/l dans le témoin et dans le P-KOH_{10%} (palme sèche traitée avec 10 % de charge KOH) enregistrée après 6 jours d'incubation. Contrairement à ces résultats, les deux prétraitements (P-KOH_{20%} et P-KOH_{50%}) ont montré des valeurs maximales à partir du deuxième et quatrième jour d'incubation (**Planche III.1**). En outre, la valeur maximale dans les cultures avec la souche *A. iranicus* isolat MS-34 a atteint 197,84 mg/l.

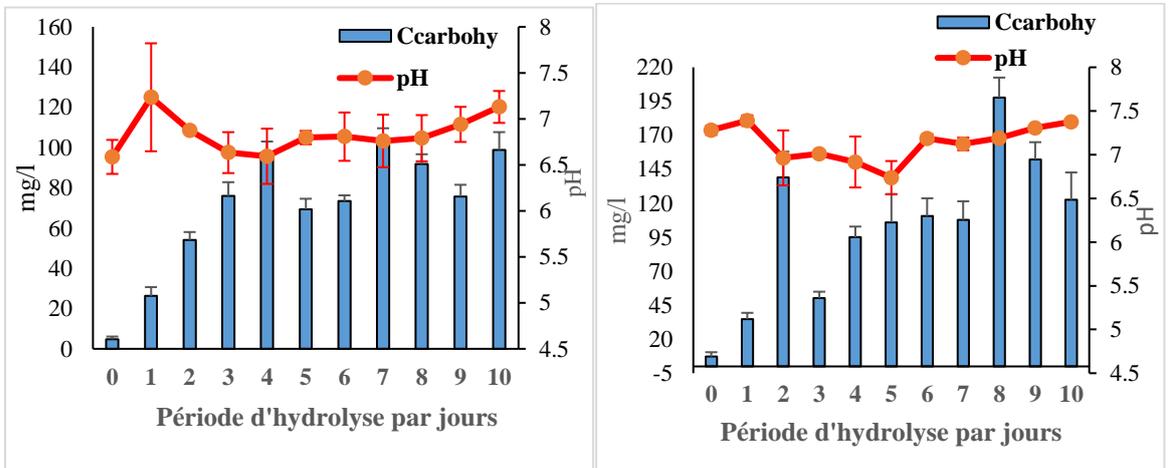
En ce qui concerne les cultures avec la souche *T. verruculosus* isolat MS-43, les valeurs maximales en sucres réducteurs sont enregistrées à partir du 4^{ème} et 6^{ème} jour, avec des quantités légèrement inférieures à celles obtenues avec des cultures de la souche *A. iranicus* isolat MS-34 : 126,59 mg/l pour le témoin, 92,21mg/l pour P-KOH_{10%}, 83,78 mg/l pour P-KOH_{20%} et 133,46 mg/l P-KOH_{50%}. (**Planche III.2**)

D'après l'évaluation statistique utilisant le test ANOVA à deux facteurs pour comparer les taux les plus élevés des sucres libérés dans les cultures submergées des deux souches avec les différents prétraitements (**Annexe 8**), a permis de révéler une différence significative en fonction du type de l'espèce fongique et du prétraitement employé. On dit alors qu'il y a une interaction entre les 2 facteurs (F est très supérieur à la valeur critique (> 0,05) et donc l'interaction est hautement significative. La probabilité (p-value) dans les variations est inférieure à α (< 0,001) ce qui veut dire que l'effet est hautement significatif.



(A)

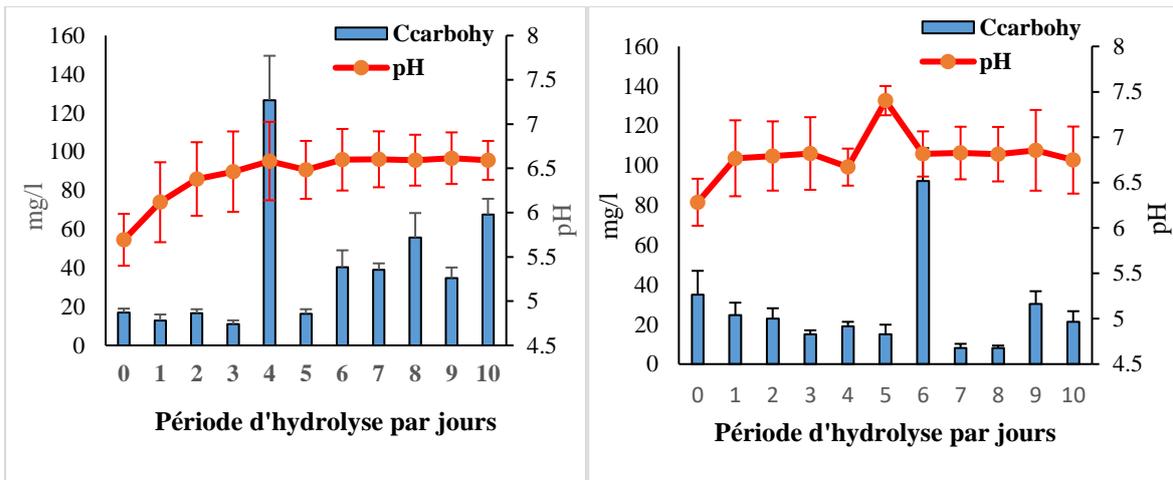
(B)



(C)

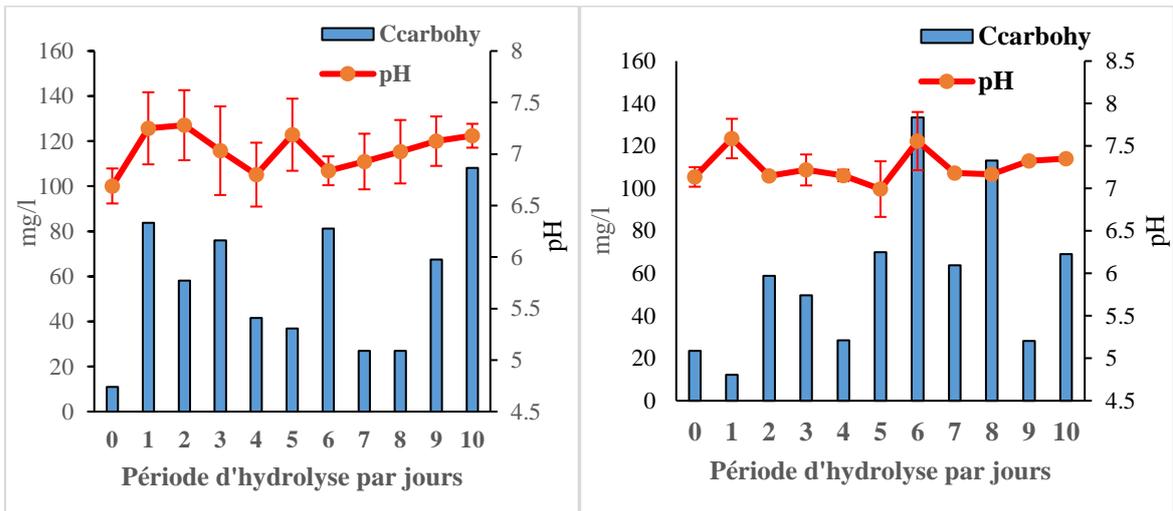
(D)

Planche III.1 : Evolution du pH et de la concentration en carbohydrates (Ccarbohy) dans les différents milieux d'hydrolyse avec la souche *A. iranicus* isolat MS-34. (A) : palme sèche sans traitement (témoin), (B) : palme sèche traitée avec 10 % de charge KOH, (C) palme sèche avec 20 % de charge KOH, (D) palme sèche traitée avec 50 % de charge KOH. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.



(A)

(B)



(C)

(D)

Planche III.2 : Evolution du pH et de la concentration en carbohydrates (Ccarbohy) dans les différents milieux d'hydrolyse avec la souche *T. verruculosus* isolat MS-43. (A) : palme sèche sans traitement (témoin), (B) : palme sèche traitée avec 10 % de charge KOH, (C) palme sèche avec 20 % de charge KOH, (D) palme sèche traitée avec 50 % de charge KOH. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écartstypes. N=3.

Par rapport aux rendements en sucres réducteurs de la palme sèche non traitée les rendements en sucres réducteurs de la palme sèche prétraitée au KOH ont été trouvés bien plus supérieurs après hydrolyse enzymatique. De même, les rendements en sucres ont été significativement améliorés avec l'augmentation de la proportion de KOH. Ce qui est conforme aux résultats de **Liu et al. (2015)**. De même, **Gong et al. (2020)** affirme que la charge en solide (sel de prétraitement) exerce des effets significatifs sur l'efficacité et le rendement de la saccharification. Le rendement en sucre le plus élevé était de 197,84 mg/l à 50 % de charge de KOH. Cependant, la moyenne totale des quantités de sucre dans les milieux P-KOH_{20%} et P-KOH_{50%} était bien proche.

Quant au pH, une augmentation des valeurs dans les cultures submergées avec les deux espèces a été observée. En effet le pH dans les cultures sans traitement varie dans un intervalle de [5,5 à 6,6] ; Dans le milieu P-KOH_{10%} il était entre [6,1 à 7,2] ; Pour le milieu P-KOH_{20%} le pH était compris entre [6,5 à 7,2] et dans les cultures avec P-KOH_{50%} il était entre [6,9 à 7,5]. Il est évident que les moisissures peuvent se développer dans une large plage de pH allant de pH 2 à pH 11. Comme il a été rapporté, la majorité des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH optimum variant de 3 à 7 (**Lynd et al., 2002**) et que celles d'origines fongiques ont une gamme plus limitée (pH de 4 à 5), contrairement aux cellulases bactériennes dont le pH optimum est proche de la neutralité (**Buchholz et al., 1983 ; Ben Hmad et Gargouri., 2017**).

Toutefois, des cellulases neutres et alcalines ont été isolées des bactéries alcalophiles comme *Streptomyces* (**Nakai et al., 1987**), *Bacillus* (**Horikoshi, 1991**) et des mycéliums comme les espèces *Humicola* et *Aspergillus jinlinensis* poussant à pH neutre (**Schulein, 1997 ; Panpan et al., 2020**). Selon, **Ben Hmad et Gargouri, 2017**, les micro-organismes capables de croître et de produire des enzymes dans des conditions d'environnement difficile, ont plus d'avantages pour la survie. De plus, dans de telles conditions, la compétition avec les autres espèces est restreinte.

Les activités enzymatiques dans les milieux d'hydrolyse avec la palme traitée sont illustrées dans la planche **III.3**. Les deux souches fongiques ont exhibé des activités enzymatiques importantes mesurées après 10 jours d'incubation. L'activité endoglucanase (CMCase) allait de $31,57 \cdot 10^{-1}$ UI/ml jusqu'à $112,97 \cdot 10^{-1}$ UI/ml et l'activité cellulolytique totale (FPase) allait de $19,50 \cdot 10^{-1}$ UI/ml jusqu'à $47,62 \cdot 10^{-1}$ UI/ml.

Néanmoins, l'activité enzymatique avec la souche *A. iranicus* isolat MS-34 était supérieure à l'activité enzymatique avec la souche et *T. verruculosus* isolat MS-43 dans les différentes expériences de fermentation. Aussi, l'activité enzymatique dans le milieu avec le P-KOH_{20%} a été la plus importante. Ces résultats indiquent que les enzymes cellulases peuvent être produites en bonne quantité par ces souches fongiques (*A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43) sans apport de nutriments dans les conditions de la fermentation submergée de la palme sèche traitée au KOH. Cependant, la souche *A. iranicus* s'est montrée meilleure pour la production de l'enzyme cellulase. Il est connu que les espèces d'*Aspergillus* sont de bonnes productrices des enzymes cellulases. Des études antérieures ont rapporté une activité cellulase élevée chez *A. niger* (Mrudula et Murugammal, 2011) ; *A. aculeatus* (Mhuantong et al., 2021) et *A. fumigatus* (Sarkar et Aikat, 2014).

De même, l'espèce *Talaromyces verruculosus* a été étudiée pour son activité cellulolytique dans plusieurs recherches scientifiques (Goyari et al., 2015 ; Jain et al., 2018 ; 2020).

Pour la teneur en protéine dans l'extrait enzymatique, les résultats sont rapportés dans la planche III.4. Le taux de protéines le plus élevé de 6,18 mg/ml a été obtenu dans les milieux d'hydrolyse avec le P-KOH_{20%}, après 5 jours d'incubation avec la souche *A. iranicus* isolat MS-34 (Planche III.4. A). De même pour la souche *T. verruculosus* isolat MS-43, le taux de protéine le plus élevé (9 mg/ml) a été obtenu après 5 jours d'incubation mais dans les milieux d'hydrolyse avec le P-KOH_{50%} (Planche III.4. B). Selon une étude bien antérieure de Roussos et Raimbault (1982), la biosynthèse des protéines est parallèle aux étapes de la cinétique de production des activités cellulases présentent dans le surnageant. Ces protéines sont synthétisées essentiellement pendant la phase de multiplication active du mycélium.

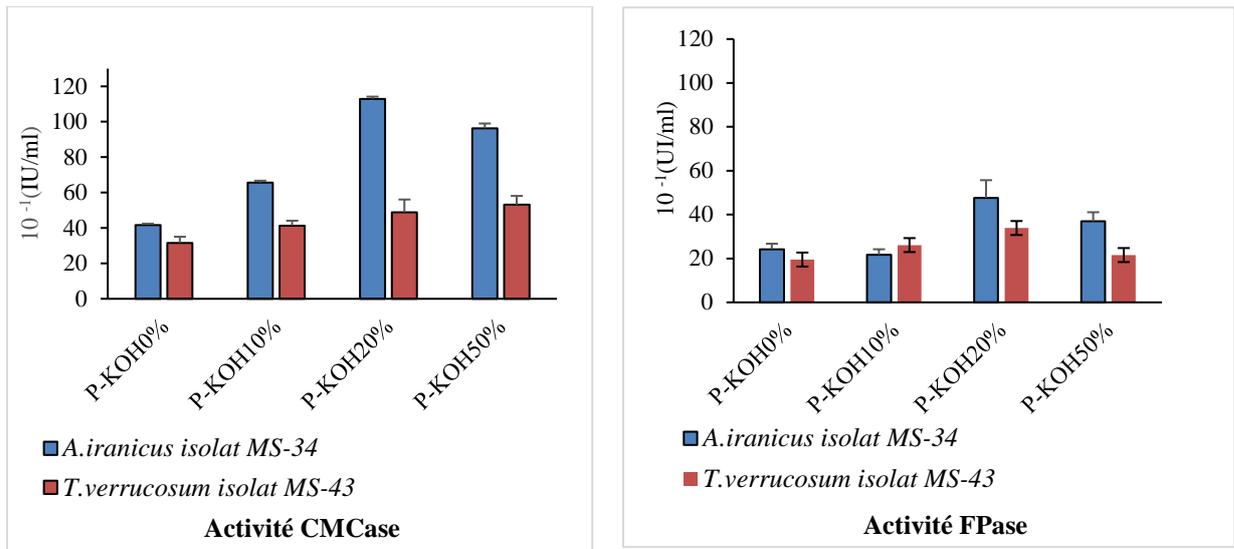


Planche III.3 : Activité enzymatique de la souche *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43 après 10 jours d'incubation à 28°C dans les milieux d'hydrolyse : P-KOH_{0%} (témoin), P-KOH_{10%} (Palme sèche traitée avec 10 % de KOH), P-KOH_{20%} (Palme sèche traitée avec 20 % de KOH) et P-KOH_{50%} (Palme sèche traitée avec 50 % de KOH). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

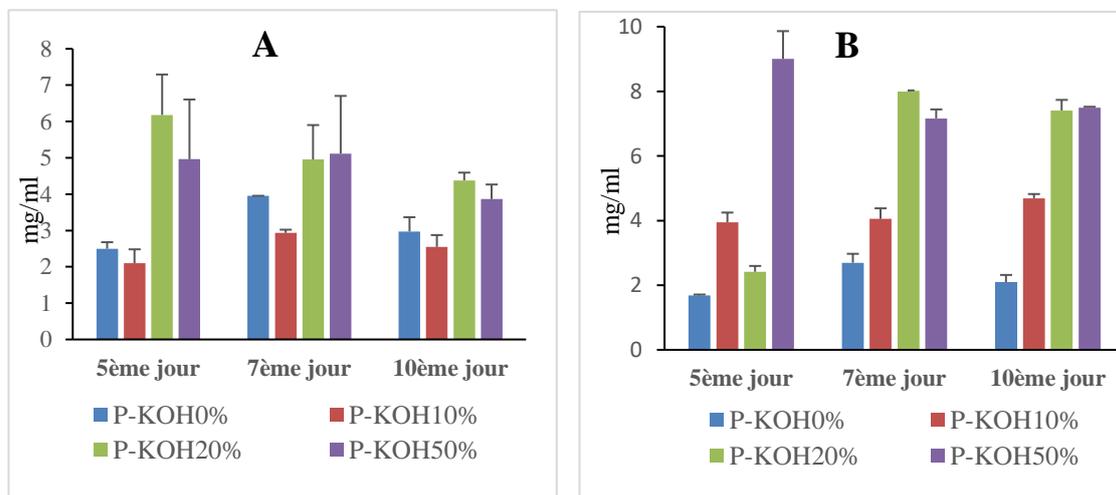


Planche III.4 : Teneur en protéine dans l'extrait enzymatique des milieux d'hydrolyse P-KOH_{0%} (témoin), P-KOH_{10%} (Palme sèche traitée avec 10 % de KOH), P-KOH_{20%} (Palme sèche traitée avec 20 % de KOH) et P-KOH_{50%} (Palme sèche traitée avec 50 % de KOH) inoculés avec les souches *A. iranicus* isolat MS-34 (A) et *T. verruculosus* isolat MS-43 (B). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

III.6 Étude de la cinétique de la cellulase produite par *A. iranicus* souche MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43 en batch-fermentation

III.6.1 Dosage des activités enzymatiques

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose par les moisissures est un processus complexe qui exige la participation de plusieurs enzymes : l'Endoglucanase, la Cellobiohydrolase, et la β -glucosidase. L'étude des cinétiques des productions enzymatiques par la souche *A. iranicus* isolat MS-34 et la souche *T. verruculosus* isolat MS-43 a été effectuée par fermentation sur milieu Mandel supplémenté de 1% CMC et avec un taux d'inoculum de 10^6 spores/ml, incubé à 30°C sous agitation à 150 tours/min.

Les résultats rapportés dans le tableau **III.7**, montrent une production enzymatique progressive par les souches isolées avec un maximum obtenu après 24 heures, 120 heures et 144 heures pour l'activité endoglucanase ($22,18 \cdot 10^{-1}$ UI/ml), l'activité β -glucosidase ($3,34 \cdot 10^{-1}$ UI/ml) et l'activité papier filtre ($8,76 \cdot 10^{-1}$ UI/ml) respectivement. La souche *A. iranicus* isolat MS-34 a enregistré le taux d'activité maximal pour l'endoglucanase et FPase. Cependant, la souche *T. verruculosus* isolat MS-43 avait une activité β -Glucosidase plus importante.

L'activité enzymatique endoglucanase (CMCase) a atteint son maximum après 24 h d'incubation pour les deux souches fongiques ($22,18 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *A. iranicus* isolat MS-34 et $6,24 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *T. verruculosus* isolat MS-43), suivie par l'activité totale (FPase) entre 72 h et 144 h ($8,76 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *A. iranicus* isolat MS-34 et $6,55 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *T. verruculosus* isolat MS-43) et l'activité β -glucosidase entre 96 h et 192 h d'incubation ($1,92 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *A. iranicus* isolat MS-34 et $3,34 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *T. verruculosus* isolat MS-43). Il est connu que la durée d'incubation allant de 20 h à 40 h représente la phase de la croissance active du mycélium. L'obtention d'une activité endoglucanase maximale après seulement 24 h d'incubation peut être due à la grande affinité des enzymes de nos souches au substrat CMC. Ainsi, les endoglucanases représentent la première enzyme qui agit sur la molécule cellulose selon sa fonction catalytique (**Shah et al., 2019**). Néanmoins, les endoglucanases et les exoglucanases agissent d'une manière synergique libérant du cellobiose. Ce dernier est catalysé par la β -glucosidase (**Saradouni et al., 2004 ; Silveira et al., 2012 ; Mondal et al., 2022**).

Tableau III.7 : Comparaison de la production de cellulases par *Aspergillus iranicus* isolat MS-34 et *Talaromyces verruculosus* isolat MS-43.

Souches	<i>Aspergillus iranicus</i> isolat MS-34				<i>Talaromyces verruculosus</i> isolat MS-43			
	Activités enzymatiques (10 ⁻¹ UI ml ⁻¹)				Activités enzymatiques (10 ⁻¹ UI ml ⁻¹)			
Temps (heur)	FPase	Endoglucanase (CMCase)	β-Glucosidase	pH	FPase	Endoglucanase (CMCase)	β-Glucosidase	pH
12 h	0,81±0,25	1,67±0,17	1,23±0,07	6,09±0,31	3,74±0,24	2,94±0,10	2,92±0,01	6,35±0,03
24 h	7,54±0,96	22,18±0,18	1,57±0,08	5,85±0,12	3,94±0,29	6,24±0,40	3,12±0,06	6,09±0,01
48 h	5,74±0,7	15,14±0,16	1,61±0,07	6,195±0,21	3,06±0,16	5,78±0,16	3,12±0,02	6,19±0,01
72 h	6,79±0,68	9,70±0,23	1,80±0,07	6,365±0,24	6,55±0,25	4,20±0,03	3,22±0,01	6,34±0,01
96 h	8,27±0,40	18,54±0,04	1,92±0,21	6,6±0,25	2,83±0,16	4,64±0,17	3,24±0,01	6,40±0,04
120h	6,36±0,15	11,07±0,28	1,86±0,12	6,64±0,13	2,71±0,88	5,24±0,08	3,34±0,07	6,36±0,01
144h	8,76±0,98	8,32±0,32	1,60±0,10	6,73±0,18	3,80±0,05	5,5±0,16	3,08±0,02	6,35±0,02
168 h	6,24±0,17	7,48±0,09	1,11±0,05	6,83±0,21	3,85±0,02	5,51±0,04	1,43±0,05	6,35±0,14
192 h	7,69±0,19	4,59±0,11	1,00±0,04	6,82±0,3	3,01±0,30	5,04±0,04	1,48±0,01	6,69±0,02
216 h	7,87±0,56	7,08±0,23	1,30±0,10	6,79±0,13	2,92±0,08	4,59±0,08	1,66±0,04	6,49±0,01
240 h	6,37±0,12	4,07±0,40	1,10±0,05	6,740±0,28	2,79±0,91	3,73±0,07	1,59±0,05	6,43±0,04

Nb : Les résultats du tableau III.7 sont exprimés en valeurs moyennes ±écarts-types.

Les résultats obtenus avec les souches que nous avons isolées montrent une supériorité comparée aux résultats des travaux de **Hidayat et al. (2021)**. Dans leurs conditions l'activité endoglucanase maximale était de $2,4 \cdot 10^{-1}$ U/ml chez *Trichoderma sp.* PK1J2. Sp. G2J2. Comme ils ont aussi enregistré une activité FPase maximale de $1,01 \cdot 10^{-1}$ U/ml, $0,83 \cdot 10^{-1}$ U/ml, $0,48 \cdot 10^{-1}$ U/ml et $0,45 \cdot 10^{-1}$ U/ml avec la souche *Trichoderma sp.* PK1J2, *Aspergillus sp.* FIG1, *Aspergillus sp.* FNCC 6012 et *Penicillium* respectivement.

De même, l'étude de **Mohapatra et al. (2018)** a rapporté une activité endoglucanase de $2,87 \cdot 10^{-1}$ UI/ml à 30°C avec une souche d'*Aspergillus fumigatus* autochtone isolée à partir des déchets lignocellulosiques décomposés dans le sol. Cependant, auparavant **Facchini et al. (2011)** ont signalé une activité endoglucanase de $5,5 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec la souche *Aspergillus japonicus*, ce qui était supérieure à l'activité endoglucanase des deux souches présentées dans cette étude.

D'autres travaux ont rapporté une activité papier filtre (FPase) voisine de l'activité trouvée dans notre étude : $2,76 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *A. fumigates* (**Sarkar et Aikat, 2014**), $3,8 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec la souche *T. reesei* (**Nathan et al., 2014**) et $12 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec une *Penicillium sp.* CPF2 (**Syed et al., 2013**). D'un autre côté, **Devi et al. (2022)**, a signalé une activité FPase ($10,1 \cdot 10^{-1}$ U/ml) proche de l'activité FPase maximale obtenue dans nos résultats ($8,76 \cdot 10^{-1}$ UI/ml) avec la souche *Trichoderma atroviride* AD-130 et dans une fermentation submergée.

Pour l'activité β -glucosidase, différentes études ont rapporté des valeurs similaires à nos résultats. **Yu et al. (1998)** ont obtenu une activité de $3,4 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *T. reesei* après une précipitation de la cellulase. **Cabezas et al. (2012)** ont obtenu une activité β -glucosidase maximale de $4,5 \cdot 10^{-1}$ UI/ml avec *P. glabrum*. De plus, dans l'étude de **Saha et al. (1994)**, une souche *A. pullulans* cultivée en fermentation submergée a donné une activité β -glucosidase maximale de $2,7 \cdot 10^{-1}$ UI/ml.

Penicillium verruculosum, renommé en 2011 comme *Talaromyces verruculosus* (**Samson et al., 2011**), est connu depuis longtemps comme une espèce productrice suprême de cellulase et d'extrolite antimicrobien (**Szakács et al., 1981** ; **Solov'eva et al., 2005** ; **Hu et al., 2016**). Cependant, Peu d'espèces de *Talaromyces* ont été étudiées, à l'exception du système cellulolytique de *Talaromyces emersoni* (**Goyari et al., 2015**).

III.7.2 Mesure de la viscosité du CMC

Afin de confirmer la présence de l'activité cellulolytique de nos deux souches fongiques, nous avons mesuré la viscosité du milieu de fermentation Mandel supplémenté de 1% CMC avant et après hydrolyse fongique (**Figure III.12**). Les résultats ont montré une diminution dans la viscosité des milieux d'hydrolyse (MCMC) avec les deux souches fongiques. La viscosité de MCMC inoculé avec *T. verruculosus* isolat MS-43 a diminué de 7,04 mpa/s par rapport au milieu d'initial (MCMC). En revanche, la diminution de la viscosité dans le MCMC inoculé avec *A. iranicus* isolat MS-34 était de 12,86 mpa/s. Ces résultats sont conformes à ceux de **Thayer et al. (1984)** et **Lee et al. (2007)**. Les deux études ont démontré une diminution de la viscosité avec augmentation des sucres réducteurs et cela en fonction du temps.

Selon **Sharma et al. (2016)**, le changement dans la viscosité est lié à l'activité endoglucanase du complexe enzymatique qui agit sur le degré de polymérisation du substrat cellulosique. Ceci veut dire que nos résultats sont en corrélation avec les résultats précédemment discutés dans la section (**III.6**). L'activité endoglucanase de la souche *A. iranicus* isolat MS-34 était la plus élevée, en conséquence la diminution de la viscosité dans le MCMC inoculé avec cette souche est la plus importante.

III.6.3 Estimation de la teneur en protéines

Les valeurs maximales de la concentration en protéines a enregistré son maximum chez la souche *T. verruculosus* isolat MS-43 dès les 12 premières heures de fermentation avec une teneur de 1,96 mg/ml et chez *A. iranicus* isolat MS-34 avec une teneur de 0,99 mg/ml à 24h d'incubation (**Figure III.13**). Cette augmentation est due à la synthèse accrue des protéines, entre autres les enzymes (**Leghlimi et al., 2013**). Ensuite, une légère fluctuation de la quantité totale de protéine a été enregistrée à partir de 72 h jusqu'à 216 h. Cela est associé à la croissance du mycélium dans le milieu de fermentation (**Roméro et al., 1999**). A 240 h, la concentration de protéines a diminué jusqu'à atteindre 0,75 mg/ml avec la souche *A. iranicus* isolat MS-34 et 0,63 mg/ml avec la souche *T. verruculosus* isolat MS-43, suite à l'hydrolyse des protéines par les protéases produites par le champignon en l'absence de nutriment essentiel dans le milieu (**Roméro et al., 1999 ; Leghlimi et al., 2013**).

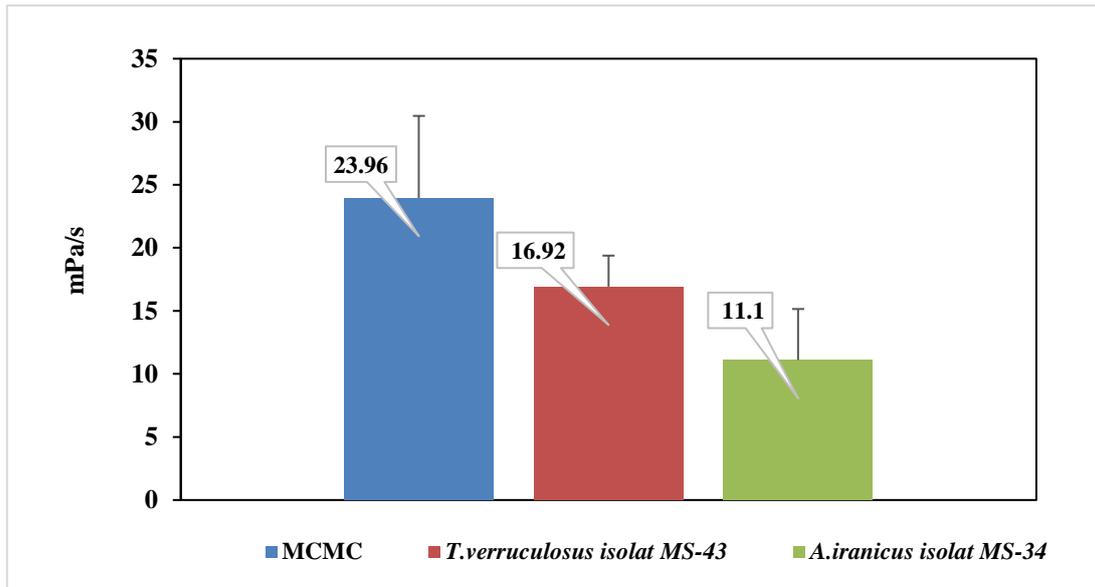


Figure III.12 : Mesure de la viscosité des milieux hydrolysés par la souche *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43 avant et après dix jours d’incubation. MCM : témoin (milieu stérile). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3

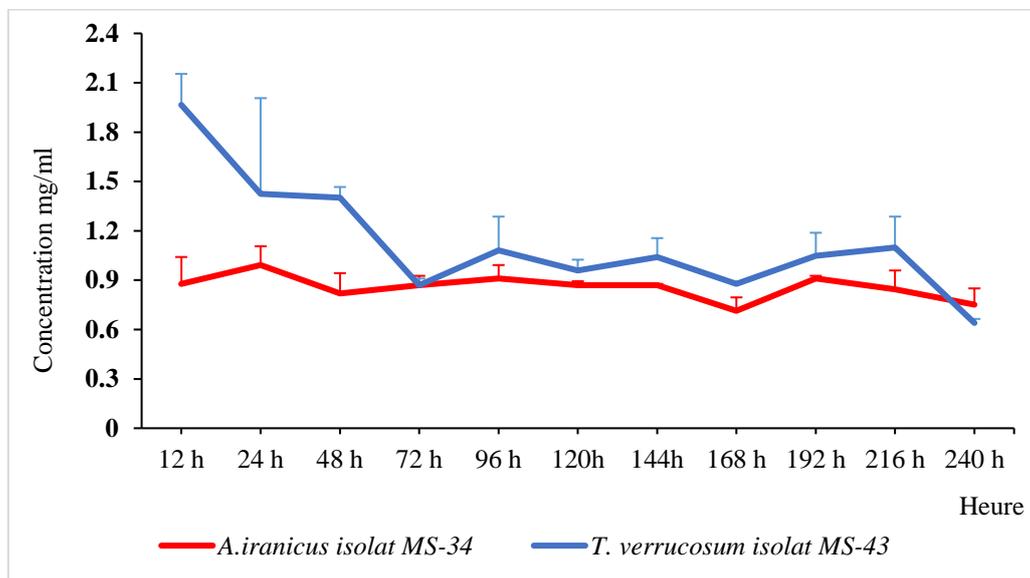


Figure III.13 : Teneur en protéine dans l’extrait enzymatique des milieux d’hydrolyse CMC avec les souches *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3

III.7 Caractérisation des activités enzymatiques

Deux propriétés physico-chimiques de l'extrait enzymatique brut de nos souches fongiques ont été déterminées.

III.7.1 Activité enzymatique en fonction de la température

L'influence de la température sur les activités enzymatiques a été étudiée à différentes températures (40, 50, 60, 70, et 80°C) (**Planche III.5**). Les activités enzymatiques endoglucanases ont atteint leurs valeurs maximales à 60°C pour les deux souches *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43. Cependant, la valeur maximale dans l'activité papier filtre a été enregistrée à 50°C pour *A. iranicus* isolat MS-34 et 60°C pour *T. verruculosus* isolat MS-43.

80 à 100 % de l'activité endoglucanase chez *A. iranicus* isolat MS-34 a été préservée aux températures situées entre 40 à 60 °C et chez *T. verruculosus* isolat MS-43, elle a été située entre 60 à 70°C. Toutefois, l'endoglucanase est restée supérieure à 50 % dans les différentes températures (**Planche III.5.A**). Cela peut indiquer une qualité de l'activité endoglucanase produite par nos souches fongiques, qui est le maintien d'une bonne activité sur une large gamme de température.

En revanche, plus de 50 % de l'activité papier filtre chez *A. iranicus* isolat MS-34 était perdue avec l'augmentation de la température (> 50°C). Néanmoins, l'activité papier filtre chez *T. verruculosus* isolat MS-43 était bien réservée dans les différentes températures étudiées à raison de 80 à 100 % d'activité enzymatique (**Planche III.5.B**).

L'analyse statistique de la variance (ANOVA) des résultats, a démontré que la température exerce un effet significatif sur les activités endoglucanase de *A. iranicus* isolat MS-34 ($F = 8,39$ $p < 0.001$) et sur les activités endoglucanase de *T. verruculosus* isolat MS-43 ($F = 20,88$ $p < 0.001$) (**Annexe 8**).

Pour l'activité papier filtre l'analyse statistique de la variance (ANOVA), indique que la température exerce un effet significatif sur l'activité de *A. iranicus* isolat MS-34 ($F = 14,27$ $p < 0.001$). Par contre, l'effet de la température sur l'activité papier filtre chez *T. verruculosus* isolat MS-43 est faible ($F = 5,6$ $p > 0.001$) (**Annexe 8**).

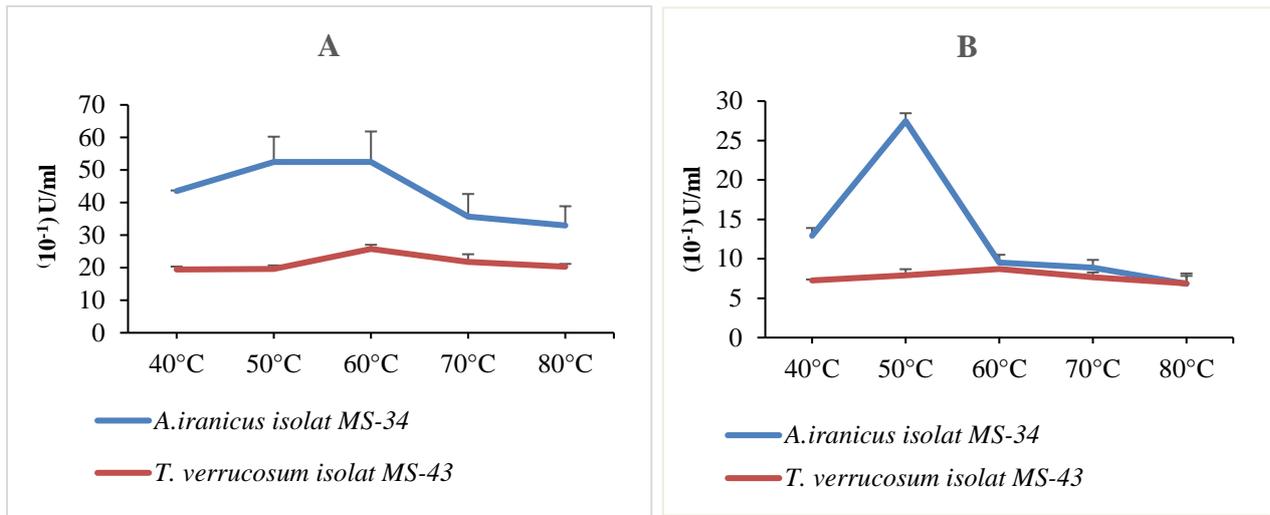


Planche III.5 : Effet de la variation de la température sur les activités enzymatiques Endoglucanases (A) et Papier filtre (B), d'*A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ± écarts-types. N=3.

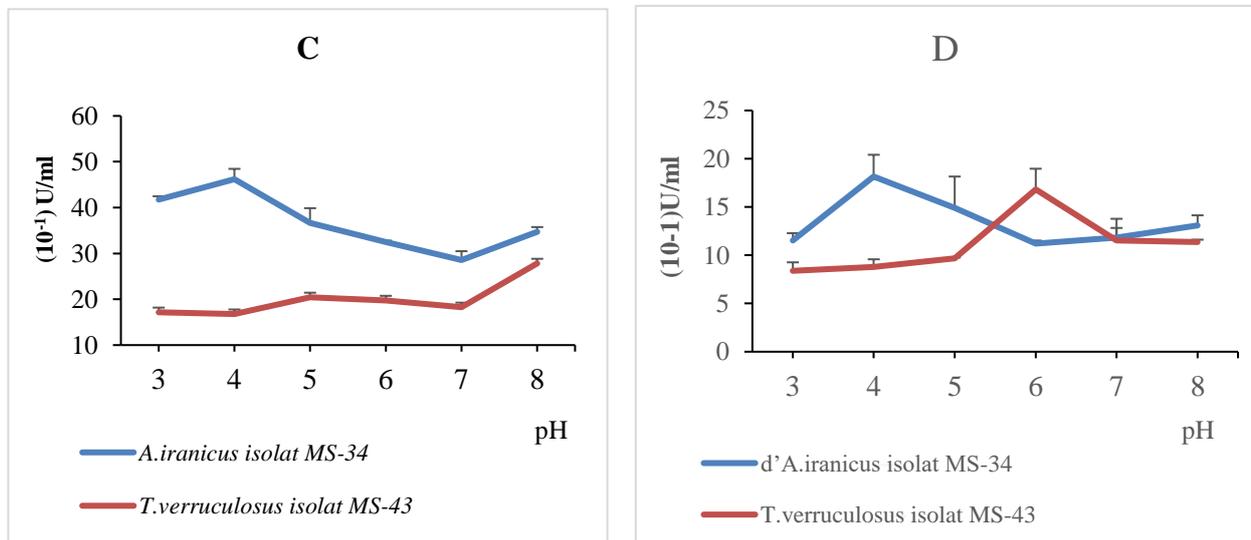


Planche III.6 : Effet de la variation du pH sur les activités enzymatiques Endoglucanase (C) et Papier filtre (D), d'*A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ± écarts-types. N=3.

Chez les champignons, la température optimale pour l'activité cellulolytique varie selon l'espèce et le type de cellulase. Dans l'ensemble, elle s'est située entre 40 et 60 °C avec quelques variations en fonction de l'espèce et du système de cellulase spécifique étudié (**Krzysztof, 2019**). La température optimale pour l'activité de la cellulase d'*Aspergillus niger* cultivée sur des coquilles d'Arachides (*Arachis hypogaea*) s'est avérée être à 40°C dans les travaux de **Sulyman et al. (2020)**, il en est de même dans les travaux d'**Ali et al. (1991)** qui ont rapporté une activité cellulase optimale par *A. terreus* et *A. niger* Z10 à la même température. Cependant, des titres élevés d'activité CMCase ont été observés à 30°C pour *T. reesei* (NCIM 1186) et *Penicillium sp.* (**Prasanna et al., 2016 ; Jampala et al., 2017**). D'une manière similaire pour *Aspergillus niger* NCIM 1207 et *Aspergillus flavus*, la température optimale a été trouvée à 28°C (**Gokhale et al., 1991 ; Sutaoney et al., 2020**).

Comme pour les bactéries, il existe une minorité de souches fongiques dite thermophiles connue par leur production d'enzymes stables et actives à des températures élevées (**Krzysztof, 2019**). Ainsi, les souches de l'espèce *Talaromyces emersonii* sont décrites comme des souches fongiques à activité cellulolytique thermostable, avec une température optimale entre 60 et 70°C (**Li et Papageorgiou, 2019**). Nos résultats sont donc en parfait accord avec ceux indiqués par **Goyari et al (2015)** pour la température optimale de l'activité enzymatique chez *T. verruculosus* (60°C). En effet, les champignons producteurs de ce type d'enzyme sont des candidats prometteurs dans l'industrie qui utilise la cellulase à haute température dans la conversion de la biomasse lignocellulosique et pour la production de biocarburants (**Goyari et al., 2015 ; Krzysztof, 2019 ; Li et Papageorgiou, 2019**).

III.7.2 Activité enzymatique en fonction du pH

L'étude de la variation de l'activité endoglucanase et papier filtre en fonction du pH est menée à 50°C. Le pH optimum des enzymes des deux souches a été déterminé (**Planche III.6**). Chez *A. iranicus* isolat MS-34 les activités enzymatiques étaient à leurs maximales à pH 4.0 (tampon citrate). Tandis que l'activité endoglucanase de la souche *T. verruculosus* isolat MS-43 était à son maximale à un pH alcalin 8.0 (tampon phosphate) et l'activité papier filtre à un pH 6.0 (tampon citrate-phosphate).

L'étude statistique de la variance (ANOVA) des résultats (**Annexe 8**) révèle que le pH exerce un effet significatif sur les activités endoglucanase ($F = 21,92$ $p < 0.001$ pour *A. iranicus* isolat MS-34 ; $F = 197,56$ $p < 0.001$ pour *T. verruculosus* isolat MS-43) mais son effet était faible

avec l'activité papier filtre ($F = 6,05$ $p > 0.001$ pour *A. iranicus* isolat MS-34, $F = 4,16$ $p > 0.001$ pour *T. verruculosus* isolat MS-43).

Les enzymes sont des protéines qui peuvent être largement influencées par le pH, chaque enzyme a une gamme de pH optimal pour son fonctionnement, et le pH optimal est celui pour lequel l'activité enzymatique est maximale. Les enzymes cellulolytiques produites par les champignons ont un pH optimal qui varie selon les études. Selon **Lynd et al. (2002)** la plupart des préparations cellulolytiques étudiées sont fonctionnelles dans un pH optimal qui varie de 3 à 7. D'autres études ont montré que le pH optimum des enzymes cellulolytiques est souvent situé entre pH 4.0 et pH 6.0 (**Leghlimi et al., 2013**). *A. flavipes* a montré des activités CMCase et FPase maximales à pH 4,5 (**Dina et Thankamani, 2023**), de même pour la souche *Aspergillus niger* F8 isolée à partir d'un composte (**Buragohain et al., 2016**). Ainsi, les activités les plus élevées ont été atteintes à pH 4 avec une souche d'*A. oryzae* dans l'étude de **Malvessi et Silveira. (2004)**.

La souche *T. verruculosus* isolat MS-43 avait une activité cellulasique plus importante à des pH neutres et alcalins. Les cellulases neutres et alcalines des micro-organismes ont un intérêt majeur comme enzymes industrielles (**Ben Hmadet Gargouri, 2017**). Bien que la plupart des cellulases fongiques ont des optimales de pH acide, il existe des exceptions, par exemple les enzymes cellulases produites par *Chaetomium* sp. (Une souche d'origine marine) dans des conditions alcalines à 50 °C avaient une stabilité et des activités plus élevées que dans des conditions non alcalines (plage de pH testé entre 5 à 12). (**Ravindran et al, 2010**). De même, les endoglucanases de l'espèce *Humicola insolens* ont montré une activité optimale entre pH 7 et 8,5 (**Schulein, 1997**).

Contrairement à nos résultats, l'étude de **Fontes et al. (2023)** a déterminé des conditions optimales acides (pH : 2,8) lors de l'hydrolyse de la cellulose du papier filtre par une souche de *T. verruculosus*. La majorité des recherches sur les cellulases de cette espèce utilise un pH réactionnel entre 3.0 et 5.0 (**Inoue et al., 2014 ; Talukdar, 2015 ; Jain et al., 2018**). Cependant, l'étude de **Bharti et al. (2018)** rapporte une activité maximale d'endoglucanase, de FPase et de β -glucosidase à température 30 °C et à pH 6,0.

III.8 Production de bioéthanol

Les extraits enzymatiques des deux souches fongiques ont été récupérés par centrifugation à partir d'une fermentation submergée contenant de la cellulose sous forme CMC à raison de 1% et avec un pH initial 5,5 et une température d'incubation de 30°C. Le mélange des extraits enzymatiques bruts des deux souches a été utilisé pour l'hydrolyse de la palme sèche traitée et non traitée.

III.8.1 Dosage des activités cellulolytiques dans le mixte enzymatique

Les valeurs des activités exoglucanase (activité papier filtre), endoglucanase et β -glucosidase du mixte enzymatique sont présentées dans le tableau **III.8**.

En comparaison avec les résultats des activités cellulolytiques dans l'étude de la cinétique de la cellulase produite par *A. iranicus* souche MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43 en batch-fermentation (**section III.7**), le mixte enzymatique présente une activité endoglucanase et β -glucosidase plus élevée par rapport aux valeurs maximales présentées dans le tableau III.7. Cependant, l'activité endoglucanase (FPase) était presque identique à la valeur maximale présentée dans le même tableau.

Tableau III.8 : Activité cellulolytique du mixte enzymatique d'*A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43

Activité cellulolytique du mixte enzymatique	UI ml ⁻¹
Exoglucanase	0,89 ± 0,31
Endoglucanase	6,18 ± 1,89
β -glucosidase	1,37 ± 0,014

Nb : Les résultats du tableau III.8 sont exprimés en valeurs moyennes \pm écarts-types. N=3.

Pour améliorer le processus de l'hydrolyse de la cellulose, il existe plusieurs approches ; parmi celles-ci, l'utilisation d'un mélange de cellulase de deux ou plusieurs espèces. Selon l'étude d'**Imai et al. (2004)**, un système enzymatique mixte de cellulase de *T. viride* et *A. niger* a montré une activité hydrolytique améliorée par rapport aux systèmes à enzyme unique. De même, **Winarsih et Siskawardani (2020)** ont rapporté une activité endoglucanase (1,99 UI/ml)

et β -glucosidase de (0,14 UI/ml) inférieur à nos résultats et une activité exoglucanase (0, 96 UI/ml) proche de nos résultats (Tableau III.8) et cela dans un mixte d'enzymes brute de deux espèces cellulolytiques (*T. reesei* et *A. niger*) pour l'hydrolyse des épis de maïs. Ainsi, le mélange de cellulase provenant de plusieurs espèces et/ou organismes peut former des systèmes enzymatiques plus efficaces et une saccharification du substrat éventuellement améliorée (**Baker et al., 1998 ; Wang et Sun, 2010**).

III.8.2 Hydrolyse enzymatique et saccharification de la cellulose contenue dans la palme

Plusieurs études ont utilisé des processus d'hydrolyse et de fermentation séparés dans leurs analyses (**Abdou Alio et al., 2020**), similaires à ce qui a été réalisé dans cette étude. L'hydrolyse enzymatique a été réalisée avec de la palme non traitée et la palme traitée puis un dosage des sucres réducteurs a été effectué à la fin de chaque hydrolyse (**Figure III.14**). La teneur en sucre a atteint son maximale dans le milieu d'hydrolyse avec la palme traitée à 20 % KOH (4830 mg/l). Tandis que, la teneur en sucre réducteur en milieu d'hydrolyse avec la palme non traitée a atteint 2020,24 mg/l.

Les résultats obtenus montrent que le mélange enzymatique des deux souches fongiques a été capable de convertir la cellulose de la palme en sucre réducteur dans les milieux d'hydrolyses. Les meilleurs pourcentages de conversion de cellulose ont été obtenus avec les essais contenant la palme traitée (52,7 %, 57,9 % et 64,9 %). Ces résultats appoentent la démonstration que l'hydrolyse enzymatique de la cellulose a été améliorée grâce au prétraitement alcalin.

Néanmoins, ce qui a attiré notre attention est le fait que, les milieux d'hydrolyses avec la palme non traitée ont présenté des saccharifications significatives de la masse lignocellulosique avec un pourcentage de conversion de 25,5, 27,15 et 31,9 %. Cette saccharification peut être due à différents facteurs, le broyage de la palme sèche constitue en lui-même un traitement physique capable de libérer une quantité de cellulose. Selon plusieurs études, le broyage post-traitement permet encore d'augmenter la digestibilité de la biomasse lignocellulosique (**Jin et al., 2006 ; Yeh et al., 2010 ; Passicousset, 2019**). De plus, La présence de d'autres types d'enzymes capables de dégrader la biomasse lignocellulosique dans le surnageant enzymatique (l'enzyme brute) peut être un de ces causes. Selon **Mardetko et al. (2021)**, diverses espèces fongiques sont capables de dégrader la biomasse lignocellulosique grâce à leur cocktail enzymatique composé d'enzymes cellulolytiques et lignolytiques.

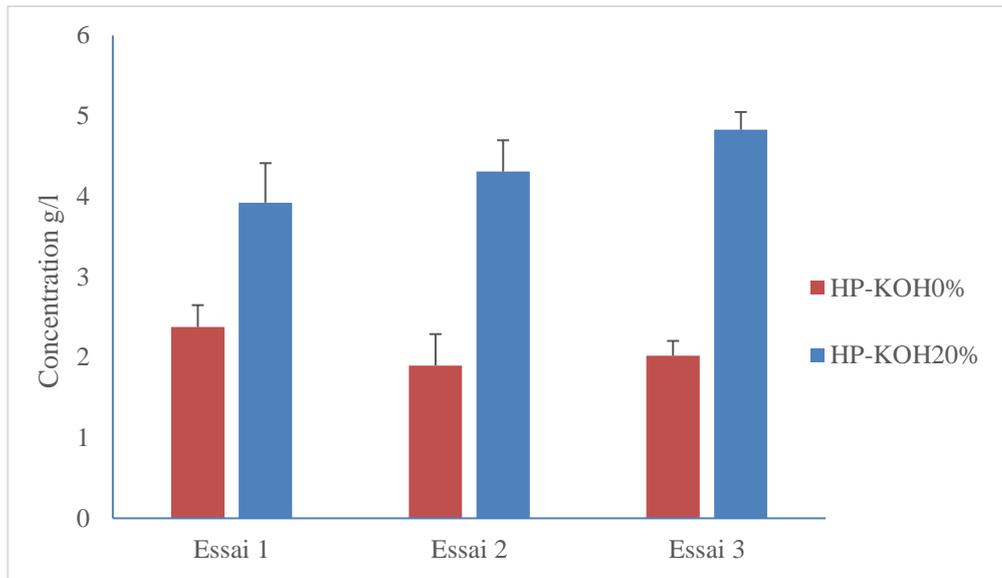


Figure III.14 : Teneur en sucres réducteurs après hydrolyse avec le mixte enzymatique. HP-KOH_{0%} : milieux d'hydrolyse avec de la palme non traitée ; HP-KOH_{20%} : milieux d'hydrolyse avec de la palme traitée à 20 % KOH. Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes ± écarts-types. N=3.

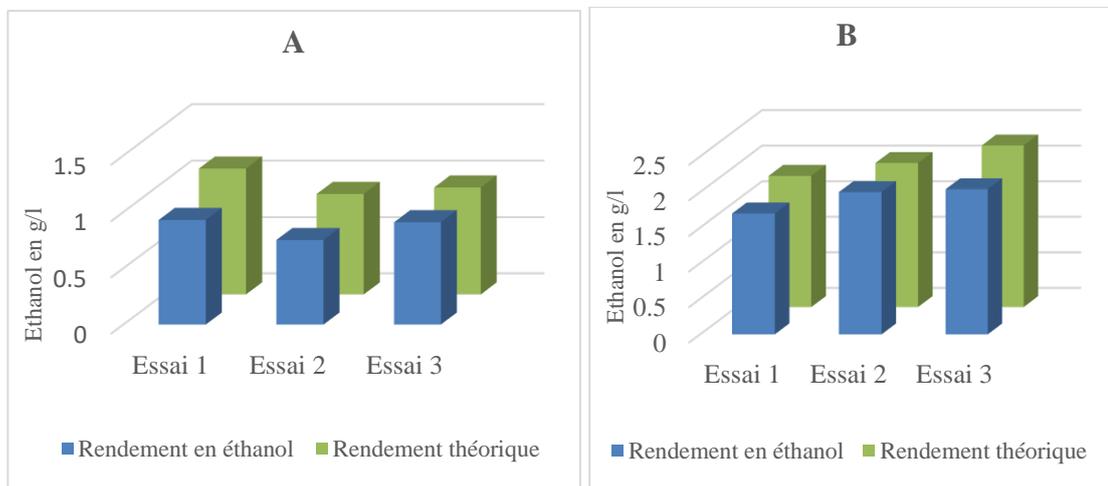


Planche III.7 : Comparaison entre le rendement théorique et le rendement expérimental en éthanol après 72 h de fermentation. (A) : rendement en éthanol avec la palme non traité ; (B) : rendement en éthanol avec la palme traité à 20 % KOH

Parmi les champignons qui sont connus pour leur sécrétion de ces enzymes : *Trichoderma reesei*, *Tremetes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*, etc. (Acharya *et al.*, 2010 ; Irbe *et al.*, 2014 ; Sajith *et al.*, 2016). A savoir, un cocktail enzymatique d'un ou plusieurs souches fongiques peut être composé de la cellulase, de la xylanase responsable de l'hydrolyse de l'hémicellulose, des phénols oxydases dont parmi celles-ci, les peroxydases de lignine (LiP), les peroxydases de manganèse (MnP) et les laccases pour la dégradation de la lignine (Dashtban *et al.*, 2010 ; Mardetko *et al.*, 2021).

III.8.3 Fermentation alcoolique

La levure de boulanger a été utilisée pour la production de bioéthanol à partir de l'hydrolysate de la palme traitée et non traitée. Après 72h d'incubation, la teneur en éthanol a été mesurée par une sonde d'éthanol de l'appareil Exao-Jeulin. Les résultats sont présentés dans la **Planche III.7**.

A partir d'un taux de sucre réducteur entre 1898,29 mg/l à 4830 mg/l, un rendement en éthanol de 0,752 g/l à 2,04 g/l a été enregistré. A savoir, les sucres réducteurs obtenus par hydrolyse de la lignocellulosique sont des pentoses (principalement xylose et arabinose), des disaccharides (cellobiose) et du glucose. Ce dernier est facilement transformé en éthanol par la levure *S. cerevisiae* qui est traditionnellement utilisée comme culture starter dans la production d'éthanol en raison de son faible coût et sa disponibilité (Azhar *et al.*, 2017). Selon Ogier *et al.* (1999), ainsi 1 g de glucose a un rendement de l'ordre de 0,47 g d'éthanol avec la levure *S. cerevisiae*. Ainsi, le rendement théorique a été calculé à partir des taux en sucres réducteurs obtenus après l'hydrolyse enzymatique.

Le rendement maximal en bioéthanol a été obtenu à partir de l'hydrolysate de la palme traitée de l'essai 3 avec une concentration 2,04 g/l (**Planche III.7 (B)**) et un pourcentage de rendement égale à 89,86 %. Pour les milieux de fermentation avec l'hydrolysate de la palme non traitée, le meilleur rendement a été obtenu dans l'essai 1 avec une concentration 0,93 g/l (**Planche III.7 (A)**) et un pourcentage de rendement égale à 83,26 %. Cependant, le rendement en éthanol par rapport à la biomasse lignocellulosique représentée par la poudre de palme a été estimé à des valeurs allant de 5,65 à 6,99 % pour la palme non traitée et de 12,78 à 15,33 % pour la palme traitée.

Le pourcentage de rendement en éthanol par rapport à la saccharification et qui varie de 83,26% à 92,2% montre que la majorité des sucres réducteurs a été assimilée par la levure durant la fermentation et que les conditions opératoires et les étapes de chaque procédé ont permis à la levure d'avoir des sucres simples fermentescibles comme une source de carbone afin de produire le bioéthanol.

Dans une étude similaire de **Winarsih et Siskawardani (2020)**, l'hydrolyse d'épis de maïs à l'aide d'un mélange d'enzymes brutes issues de *T. reesei* et *A. niger* a généré 6.4 g/l d'éthanol qui est bien supérieur à nos résultats. Nos résultats sont aussi inférieurs à celui obtenu avec la paille de blé (24,4 g/l) (**Govumoni et al., 2013**). Par ailleurs, l'étude de **Boulal et al., (2018)** sur la production de bioéthanol de deuxième génération à partir des sous-produits des palmiers dattiers avec des procédures physico-chimiques a permis d'obtenir un rendement en alcool de 20 %. Ce qui est moyennement supérieur à notre rendement (15,33 %).

Il est important de noter que le rendement en bioéthanol de 2^{ème} génération dépend de plusieurs facteurs, tels que le prétraitement employé, la procédure de transformation des sucres complexes en sucres simples et la fermentation alcoolique (**Ogier et al., 1999 ; Wang et Sun, 2010 ; Tse et al., 2021**). La composition chimique et la qualité de la biomasse lignocellulosique peuvent aussi influencer le rendement et l'efficacité du processus de production de bioéthanol (**Abdou Alio et al., 2020**). Toutefois, il est important de prendre en considération le coût et l'impact environnemental lors du choix d'un procédé de production de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique.

CONCLUSION GÉNÉRALE

ET

PERSPECTIVES

Ce travail a pour ambition, la valorisation des résidus du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) pour la production du bioéthanol, en s'interrogeant si la palme sèche du palmier dattier constitue une bonne matière hydrolysable en sucre fermentescible par des cellulases d'origine fongiques, qui par la suite servira de substrats pour la production du bioéthanol.

La stratégie employée pour cette étude a été dans un premier temps d'isoler des moisissures productrices d'endo- et d'exo-cellulases ; dans un second temps de sélectionner les souches fongiques les plus performantes pour les utiliser dans la dégradation de la cellulose contenue dans la palme du palmier dattier. Afin, d'optimiser les conditions d'hydrolyse, un prétraitement alcalin de la matière première a été employé. Enfin, l'étude de la cinétique enzymatique des souches sélectionnées, l'optimisation des activités enzymatiques et l'évaluation du rendement en bioéthanol ont constitué la phase de valorisation de notre stratégie.

L'étape initiale a été consacrée à l'étude de la composition chimique de la biomasse de la palme sèche. Cette dernière s'est révélée riche en matière organique (92,12 %), équilibrée en concentration minérale (7,87 %) et cellulosique (37,2 %) mais très pauvre en matière azotée (0,0284 %). La seconde étape qui consistait à obtenir et caractériser des isolats fongiques provenant de deux différents biotopes (la palme sèche et le sol subaquatique du barrage Djorf Torba) a permis l'étude de 42 isolats issus de la palme sèche et de 14 isolats d'origine du sol subaquatique. Bien évidemment, l'isolement a été précédé par une analyse de la zone d'échantillonnage. Les examens d'identification macroscopique et microscopique classiques des moisissures isolées ont mis en évidence 4 genres fongiques : le genre *Alternaria*, le Genre *Aspergillus*, le genre *Cladosporium* et le genre *Penicillium*.

L'isolement fongique a été suivi par un criblage de l'activité cellulolytique sur deux milieux solides. Le premier à base de CMC pour démontrer l'activité Endoglucanase et le second à base de CA pour démontrer l'activité Exoglucanase. Seuls deux isolats (Sb_{3/4} et Sb_{4/3}) d'origines de sol subaquatique ont répondu positivement aux deux tests. Quant à l'identification moléculaire des deux souches fongiques sélectionnées Sb_{3/4} et Sb_{4/3}, elle a révélé une similarité des séquences d'ADN de 99,82 % avec l'espèce *Aspergillus iranicus* DTO 203-D7 et de 99,62 % avec l'espèce *Talaromyces verruculosus* strain CPO MARH6 respectivement.

L'influence du prétraitement alcalin au KOH sur la libération de la cellulose contenue dans la palme sèche ainsi que son influence sur le rendement en carbohydrates après hydrolyse par les souches fongiques a été bien démontrée. Les rendements en sucres dans les milieux d'hydrolyse ont été significativement améliorés avec l'augmentation de la proportion de KOH

atteignant une valeur maximale égale à 197,84 mg/l avec P-KOH_{50%} 50 %. Cependant, l'activité enzymatique dans le milieu avec P-KOH_{20%} était la plus élevée (112,97.10⁻¹ UI/ml avec la CMC_{Case} et 47,62.10⁻¹ UI/ml avec la FPase). De même, le taux de protéines le plus élevé de 6,18 mg/ml a été mesuré dans les milieux d'hydrolyse avec le P-KOH_{20%}.

Après une étude comparative des cinétiques des cellulases produite par *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43 en batch-fermentation, il a été constaté que les taux maximaux de l'activité endoglucanase et exoglucanase ont été enregistrés dans les cultures avec la souche *A. iranicus* isolat MS-34, cependant, l'activité β -glucosidase la plus importante a été enregistrée dans les cultures avec la souche *T. verrucosum* isolat MS-43. Il en est de même pour les résultats de la viscosité des milieux de fermentation supplémentée avec 1% CMC, la plus faible viscosité a été observée dans la culture avec la souche *A. iranicus* souche MS-34 à raison de 11,1 mpa/s. En revanche, La concentration maximale en protéines a été enregistrée chez la souche *T. verruculosus* isolat MS-43 avec une teneur de 1,96 mg/ml.

La production des enzymes par nos deux souches fongiques a été nettement influencée par la variation de la température et du pH. La production de l'enzyme endoglucanase était favorisée à 60°C pour les deux souches, tandis que la FPase était favorisée à 50°C pour la souche *A. iranicus* isolat MS-34 et 60°C pour la souche *T. verruculosus* isolat MS-43. Le pH optimal des activités relatives pour *A. iranicus* isolat MS-34 était 4.0 avec un tampon citrate, alors que le pH optimal pour la souche *T. verruculosus* isolat MS-43 était alcalin avec l'activité endoglucanase (pH 8.0 dans le tampon phosphate) et l'activité FPase (pH 6.0 dans le tampon citrate-phosphate).

Le mixte enzymatique des deux souches qui a été utilisé pour l'hydrolyse de la palme traitée à 20 % KOH et non traitée a présenté une activité endoglucanase (19,9 10⁻¹ UI/ml) et β -glucosidase de (1,4 10⁻¹ UI/ml) plus élevée par rapport à celle dans le surnageant des monocultures. De plus, le meilleur rendement en saccharification a été obtenu avec l'essai contenant de la palme traitée à raison de 64,9 %. Cependant, l'hydrolyse avec la palme non traitée a présenté des saccharifications allant jusqu'à 31,9 %.

La fermentation submergée des différents hydrolysats avec la levure *S. cerevisiae* a enregistré un rendement en éthanol allant de 0,752 g/l à 2,04 g/l et un pourcentage de rendement en éthanol allant de 83,26 % à 92, 2 % par rapport à la saccharification et de 5,65 % à 15,33 % par rapport à la biomasse initiale.

Les résultats rapportés dans ce manuscrit apportent clairement la preuve du concept de la possibilité de produire du bioéthanol à partir d'un résidu du palmier dattier par des procédures biologiques. De plus les souches sélectionnées et utilisées dans cette étude s'avèrent être de bons agents de conversion de la cellulose en sucres fermentescibles.

Il serait intéressant de poursuivre cette étude par des recherches plus approfondies pour l'optimisation et la mise en œuvre d'un procédé de valorisation de cette biomasse à grande échelle. De ce fait, de nombreuses perspectives découlent de ce travail, citons par exemple :

- Optimisation du milieu de production enzymatique par l'utilisation d'un autre résidu agricole riche en matière azotée ;
- La recherche d'autres activités enzymatiques produites par les souches fongiques *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43 capables de dégrader le complexe lignocellulosique comme les lignases, les laccases, les xylanases et les amylases ;
- La purification du surnageant enzymatique par chromatographie afin d'améliorer l'activité cellulosique spécifique ;
- La récupération du bioéthanol par des techniques beaucoup plus sophistiquées (colonnes de distillation, tamis moléculaire) que celle de la distillation classique.

**LISTE DES
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

Références bibliographiques

Abdou Alio, M. (2020). Production de bioéthanol à partir d'une biomasse lignocellulosique multi-ressources locale par prétraitement Organosolv et hydrolyse enzymatique. Thèse de Doctorat, Université Clermont Auvergne. France. 170 p.

Abdou Alio, M., Tugui O. C., Rusu L., Pons A., Vial, C. (2020). Hydrolysis and fermentation steps of a pretreated sawmill mixed feedstock for bioethanol production in a wood biorefinery. *Bioresour. Technol*, 310, 123412.

Acharya, D. K., Chabhadiya S. B., Shah A. J., Shilpkar P., Acharya P. B., Modi H. A. (2010). Profilage enzymatique des champignons lignocellulolytiques. *Int. J. Biol. Chim. Sci*, 4, 443-449.

AFNOR, V03-040. (1993). Méthodes générales d'analyse et d'essai des produits alimentaires. Normes nationales et documents normatifs nationaux. 12 p.

Agence nationale des barrages et transferts (ANBT). (2017). Evolution de la qualité physico-chimique des eaux du Barrage Hammam Debagh. 10 p.

Algérie Presse Service (APS). (2023). Agriculture : un programme pour la plantation d'un million de palmiers à partir de la saison 2023-2024. <https://www.aps.dz/economie/162725-agriculture-un-programme-pour-la-plantation-d-un-million-de-palmiers-a-partir-de-la-saison-2023-2024>

Albano, P. O. (2006). La Connaissance des Palmiers, culture et utilisation. Ed, Edisud. France. 356 p.

Ali, S., Sayed A., Sarker R. I., Alam, R. (1991). *World J. Microbiol. Biotechnol*, 7, 62.

Almi, K., Benchabane A., Lakel S., Kriker, A. (2015). Potential utilization of date palm wood as composite reinforcement. *J. Reinf. Plast. Compos*, 34, 1231-1240.

Andlar, M., Rezić T., Mardetko N., Kracher D., Ludwig R., Šantek, B. (2018). Dégradation de la lignocellulose : Un aperçu des champignons et des enzymes fongiques impliqués dans la dégradation de la lignocellulose. *Ing. Vie Sci*, 18, 768-778.

Antonieto, A. C. C., Nogueira K. M. V., de Paula R.G., Nora L. C., Cassiano M. H. A., Guazzaroni M. E., Almeida F., da Silva T. A., Ries L. N. A., de Assis L. J., Goldman G.

H., Silva R. N., Silva-Rocha, R. (2019). A Novel Cys2His2 Zinc Finger Homolog of AZF1 Modulates Holocellulase Expression in *Trichoderma reesei*. *mSystems*, 4 (4), e00161-19.

Audigie, C. L., Fagerella J., Zonszain, F. (1984). Manipulation d'analyse biochimique. Ed : Tec et Doc, Lavoisier. Paris. 270 p.

Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem. Biophys*, 10, 52-61.

Bachelier, G., Gavinelli, R. (1966). Dosage globale des glucides du sol par la methods colorimétriques à l'Anthrone et à l'Orcinol. *Cahier Orstom Série Pédologique*, 4, 97-103.

Bajpai, P. (2022). Cellulases in the Biofuel Industry. Ed: Elsevier. 268 pp.

Baker, J. O., Ehrman C. I., Adney W. S., Thomas S. R., Himmel, M. E. (1998). Hydrolysis of cellulose using ternary mixtures of purified cellulases. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Nineteenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4-8. 1997, at Colorado Springs, Colorado*. Humana Press, 395-403.

Ballerini, D. (2006). Les biocarburants : état des lieux perspectives et enjeux du développement. Ed: *TECHNIP*, 263-270.

Ben Hmad, I., Gargouri, A. (2017). Neutral and alkaline cellulases: Production, engineering, and applications. *Journal of basic microbiology*, 57(8), 653-658.

Bendaoud, A., Abdelkhalek Belkhiri M. M., Moubchir T., Hmamou A., Tlemcani S., Eloutassi N., Lahkimi, A. (2023). Simple and Combined Pretreatment of a Mixture of Forestry and Aromatic-Medicinal Plant Waste by Chemical, Physical and Enzymatic Methods. *Ecol. Eng.*, 24 (4), 376-383.

Benyoucef, Y. (2012). La Saour : le vieux Ksar de Taghit, Témoin d'une histoire millénaire. Ed : Algerie, Terre d'afrique. <http://algerieterredafrique.blogspot.com>.

Bessah, R., Touzi, A. (2001). Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires (P. O. U) à partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse*, 37-40.

- Bharti, A. K., Kumar A., Kumar A., Dutt, D. (2018).** Exploitation de la biomasse hystérophore de *Parthenium* comme substrat à faible coût pour la production de cellulase et de xylanase sous fermentation à l'état solide à l'aide de *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687. *JRRAS*, 11 (4), 271-280.
- Bhat, M. K. (2000).** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv*, 18 (5), 355-383.
- Binod, P., Sindhu R., Singhanian R. R., Vikram S., Devi L., Nagalakshmi S., Kurien N., Sukumaran R. K., Pandey, A. (2010).** Bioethanol production from rice straw: An overview, *Bioresour. Technol*, 101 (13), 4767-4774.
- Blackwell, M. (2011).** The fungi: 1, 2, 3. . . 5.1 million Species? *Am J Bot*, 98 (3), 426-438.
- Krueger, R. R (2021).** Biologie et utilisation du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Dans Le génome du palmier dattier, Vol. 1 : *Phylogénie, biodiversité et cartographie Cham*. Ed : Springer International, 3-28.
- Botton, B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P. H., Larpent J. P., Reymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau, P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2^{ème} Ed. Masson. Collection Biotechnologies. 34-428.
- Boulanouar, A. (2015).** Bio écologie de l'entomofaune des différentes palmeraies de la région de la Saoura (Béchar) : Application a quelques espèces fréquentant la plante hôte *Phoenix dactylifera* L. Thèse de Doctorat. Université A. B. B. Tlemcen. Algérie.
- Buchholz, K., Rapp P., Zadrazil, F. (1983).** Methods of enzymatic analysis. Ed: Bergmaeyer, HU. Verlag Chemie, Weinheim, 2, 178-180.
- Buee, M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R. H., Uroz S., Martin, F. (2009).** 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist*, 184 (2), 449-456.
- Buragohain, P., Sharma N., Pathania, S. (2016).** Use of Wheat Straw for Extracellular Cellulase Production from *Aspergillus niger* F8 Isolated from Compost. *Indian journals*, 7, 37-41.

- Cabezas, L., Calderon C., Medina L. M., Bahamon I., Cardenas M., Bernal A. J., Restrepo, S. (2012).** Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia spp.* *J. Microbiol*, 50 (6), 1009.
- Chandra, R., Takeuchi H., Hasegawa T., Kunmar, R. (2012).** Improve in biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. *Energy*, 43, 273-282.
- Chehma, A., Longo, H. (2001).** Valorisation des sous-produits du palmier dattier en vue de leur utilisation en alimentation du bétail. *Revue des Energies Renouvelables : Production et Valorisation Biomasse* : 59-64.
- Colonia, B. S. O., Chagas Júnior, A. F. (2014).** Screening and detection of extracellular cellulases (endo- and exo-glucanases) secreted by filamentous fungi isolated from soils using rapid tests with chromogenic dyes. *AJB*, 13 (52), 4694-4701.
- Crous, P. W., Braun U., Schubert K., Groenewald, J. Z. (2007).** The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. *Stud. Mycol*, 58, 1-253.
- Dashtban, M., Schraft H., Syed T. A., Qin, W. (2010).** Biodégradation fongique et modification enzymatique de la lignine. *Int. J. Biochem. Mol. Biol*, 1, 36-50.
- De Almeida, M. A., Colombo, R. (2021).** Production Chain of First-Generation Sugarcane Bioethanol: Characterization and Value-Added Application of Wastes. *Bioenerg. Res*, 16.
- de Castro, A. M., Ferreira M. C., da Cruz J. C., Pedro K. C., Carvalho D. F., Leite S. G., Pereira, N. (2010).** High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. *Enzyme Res*, 854526.
- Demirbas, A. (2008).** Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines. Ed: Springer. Spain, 39-45.
- Devi, S., Suhag M., Singh J., Dhaka, A. (2022).** Highly Efficient Conversion Biomass of *Saccharum munja* for Cellulases and Xylanase Production to Ethanol Repression by Newly Isolated *Trichoderma atroviride* AD-130. *J. Agric. Sci*, 94.
- Diagayété, M., Schenkel, H. (1986).** Composition minérale des ligneux consommés par les ruminants de la zone sahélienne. *Elev.Méd. vét*, 39, 421-424.

Didderen, I., Destain J., Thonart, P. (2008). Le bioéthanol de seconde génération : la production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Ed : Presses Agronomiques de Gembloux. Belgique. 128 p.

Didderen, I., Destain, J., Thonart, P. (2010). La production de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Fôret Wallonne*, 104, 39-45.

Dina, S., Thankamani, V. T. (2023). Optimization of cellulase production from *Aspergillus flavipes* by submerged and solid state fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci*, 12 (5), e4754-e4754.

Domsch, K. H., Gams W., Anderson, T. H. (1980). Compendium of Soil Fungi, 2 Vol. London: Academic Press.

Dos Reis, T. F., Nitsche B. M., de Lima P. B., de Assis L. J., Mellado L., Harris, S. D., Meyer V., Dos Santos R. A., Riano-Pachon D. M., Ries, L. N. (2017). The low affinity glucose transporter HxtB is also involved in glucose signalling and metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Sci. Rep*, 7, 45073.

Drapcho, C. M., Nhuan N. P., Walker, T. H. (2008). Biofuels Engineering Process Technology. Ed: The McGraw-Hill companies. USA, 371 p.

Duque-Acevedo, M., Belmonte-Urena, L. J., Cortés-García, F. J., Camacho-Ferre, F. (2020). Agricultural waste: Review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Glob. Ecol. Conserv*, 22, e00902.

El-Shurafa, M. Y. (1984). Studies on the amount of minerals annually lost by way of fruit harvest and leaf prunings of date palm tree. *Date Palm J*, 3(1), 277-286.

Eplaque. (2023). Les avantages et inconvénients de l'éthanol. Consulté le 22/7/2023. <https://www.eplaque.fr/achat-voiture/avantage-inconvenient-ethanol>

Espiard, E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, 360 p.

Facchini, F. D. A., Vici A. C., Jorge J. O. A., Terenzi H. C. F., Polizeli, M. D. L.T. D. M., Reis, V. R. A., Reis, R. A. (2011). Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. *Bioprocess Biosyst. Eng*, 34, 347-355.

Fan, L., Gharpuray M., Lee, Y. (1987). Cellulose hydrolysis biotechnology monographs 57. vol 3. Springer, Berlin, Heidelberg, 121–148.

FAO. (2019). Nitrogen and Protein Content Measurement and Nitrogen to Protein Conversion Factors for Dairy and Soy Protein-Based Foods: A Systematic Review and Modelling Analysis. World Health Organization: Rome, Italy.

FAO. (2022). World Food and Agriculture-Statistical. Yearboo. Rome.

Fengel D., Wegener, G. (1984). WOOD. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter Berlin- New York. University of Munich, Germany. 613, 1960-1982.

Fontes, D. I., Bezerra T. S., de Freitas E. P. B., de Oliveira M. N., da Cruz Silva S., Silva S. Y. S., de Alexandria Santos, D. (2023). Production of cellulases from Amazonian fungi and their application in babassu cellulose hydrolysis. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 182, 105631.

Ganguly, P., Khan, A., Das, P., Bhowal, A. (2021). Cellulose from lignocellulose kitchen waste and its application for energy and environment: bioethanol production and dye removal. *Indian Chem. Eng*, 63(2), 161-171.

Gil, N., Gil C., Amaral M. E., Costa A. P., Duarte, A. P. (2009). Utilisation d'enzymes pour améliorer le raffinage de la pâte kraft blanchie d'Eucalyptus globulus. *Biochimie. Ing. J*, 46, 89-95.

Godin, B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Patrick A., Gerin., Delcarte, J. (2011). Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses Lignocellulosiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 15(1), 165-182

Gokhale, D. V., Patil S. G., Bastawde, K. B. (1991). Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Appl Biochem Biotechnol*, 30 (1), 99-109.

Gong, Z., Wang X., Yuan W., Wang Y., Zhou W., Wang G., Liu, Y. (2020). Fed-batch enzymatic hydrolysis of alkaline organosolv-pretreated corn stover facilitating high concentrations and yields of fermentable sugars for microbial lipid production. *Biotechnol. Biofuels*, 13, 1-15.

Govumoni, S. P., Koti S., Kothagouni S. Y., Venkateshwar S., Linga, V. R. (2013). Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. *Carbohydr. Polym*, 91(2), 646-650.

Goyari, S., Devi S. H., Bengyella L., Khan M., Sharma C. K., Kalita M. C., Talukdar, N. C. (2015). Unveiling the optimal parameters for cellulolytic characteristics of *Talaromyces verruculosus* SGMNPF3 and its secretory enzymes. *J. Appl. Microbiol*, 119 (1), 88-98.

Grippi, D., Clemente R., Bernal, M. P. (2020). Chemical and Bioenergetic Characterization of Biofuels from Plant Biomass: Perspectives for Southern Europe. *Appl. Sci*, 10 (10), 3571.

Guedes, A. C., Amaro H. M., Sousa-Pinto I., Malcata, F. X. (2019). Algal spent biomass-A pool of applications. In *Biofuels from Algae*, 2nd Ed.; Pandey, A., Chang, J.-S., Soccol, C.R., Lee, D.-J., Chisti, Y., Eds.; Elsevier: Amsterdam, the Netherlands. Chapter 16, 397-433.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P. (2014). Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. *Food Technol. Biotechnol*, 52(2), 170-179.

Guzmán-Martínez, C. E., Castro-Montoya A. J., Nápoles-Rivera, F. (2019). Economic and environmental comparison of bioethanol dehydration processes via simulation: reactive distillation, reactor–separator process and azeotropic distillation. *Clean Techn Environ Policy*, 21, 2061-2071.

Halidou, M. A., Gounga, M. E., Ado, R. I. (2022). Caractérisation biochimique de la pulpe et de l'amande des fruits murs de *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. consommées au Niger. *Int.J. Biol. and Chim Sci*, 16 (6), 2560-2572.

Haris, C. (1989). Introduction to modern microbiology. Black wall scientific publication.179p.

Harris, P.V., Welner D., McFarland K. C., Re E., Navarro Poulsen, J. C., Brown, K., Salbo R., Ding H., Vlasenko E., Merino S., et al. (2010) Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry*, 49, 3305-3316.

Hasper, A. A., Dekkers E., Mil M. V., Van de Vondervoort P. J. I., De Graaff, L. H. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ.Microbiol*, 68 (4), 1556-1560.

Hebal, H., Boucherba, N., Binay, B., Turunen, O. (2021). Activity and stability of hyperthermostable cellulases and xylanases in ionic liquids, *Biocatal*, 39 (4), 242-259.

Henneberg, W., Stohmann, F. (1860). Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer. Vol. I. Schwetschke u. Sohn, Braunschweig, 4 p.

Herculano, P. N., Lima, D. M. M., Fernandes, M. J. S., Neves, R. P., Souza-Motta, C. M., Porto, A. L. F. (2011). Isolation of cellulolytic fungi from waste of castor (*Ricinus communis* L.). *Curr. Microbiol*, 62, 1416-1422.

Hidayat, M. R. (2021). Isolation and Identification of Cellulolytic Bacteria Symbiont from Various Termites on Different Nest Type in Bukit Baka Bukit Raya National Park, West Kalimantan, Indonesia. *Walailak. J. Sci. Technol*, 18 (14), 12708-12.

Hocini, C., Ben Abdallah, S. (2009). Mise en valeur de la plaine d'Abadla, irrigation et drainage, Mem. Ingénieur, Université de Béchar.

Horikoshi, K. (1991). Microorganisms in alkaline environments, Chapter 3. Tokyo: Kodansha, 25-32.

Hu, G., Heitmann J. A., Rojas, O. J. (2008). Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark and forest residues. *BioResources*, 3, 270-294.

Hu, L., Taujale R., Liu F., Song J., Yin Q., Zhang Y., Yin, Y. (2016). Draft genome sequence of *Talaromyces verruculosus* ("Penicillium verruculosum") strain TS63-9, a fungus with great potential for industrial production of polysaccharide-degrading enzymes. *J. Biotechnol*, 219, 5-6.

Hu, Y., Li, M., Liu, Z., Song, X., Qu, Y., Qin, Y. (2021). Carbon catabolite repression involves physical interaction of the transcription factor CRE1/CreA and the Tup1-Cyc8 complex in *Penicillium oxalicum* and *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels*, 14, 244.

IFPEN. (2017). Quel avenir pour les biocarburants consulté le 15/10/2022. <https://www.ifpenergiesnouvelles.fr/enjeux-et-prospective/decryptages/energiesrenouvelables/quel-avenir-les-biocarburants>.

Imai, M., Ikari, K., Suzuki, I. (2004). Hydrolyse haute performance de la cellulose à l'aide d'espèces mixtes de cellulase et d'un prétraitement par ultrasons. *J. Génie. Biochimie*, 17 (2), 79-83.

Inoue, H., Decker, S. R., Taylor, L.E., Yano, S., Sawayama, S. (2014). Identification et caractérisation des enzymes cellulolytiques centrales de *Talaromyces cellulolyticus* (anciennement *Acremonium cellulolyticus*) critiques pour l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique. *Biofuels. Biotechnology*, 7, 1-13.

INRS. (2019). Éthanol : Base de données, Fiche toxicologique n° : 48, 1-11. www.inrs.fr/fichetox.

Irbe, I., Elisashvili, V., Asatiani, M., Janberga, A., Andersone, I., Andersons, B., Biziks V., Grinins, J. (2014). Activité lignocellulolytique de *Coniophora puteana* et *Trametes versicolor* dans la fermentation du son de blé et la décomposition hydrothermale feuillus modifiés. *Int. Biodéter. Biodégr*, 86, 71-78.

Jaffar, M., Pang, Y., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., Korai, R. M., Li, X. (2016). Wheat straw pretreatment with KOH for enhancing biomethane production and fertilizer value in anaerobic digestion. *Chin. J. Chem. Eng*, 24, 404-409.

Jain, L., Kurmi, A. K., Agrawal, D. (2018). Conclusive selection of optimal parameters for cellulase production by *Talaromyces verruculosus* IPC 324 under SSF via saccharification of acid-pretreated sugarcane bagasse. *Biofuels*, 12, 61-69.

Jain, L., Kurmi, A. K., Kumar, A., Narani, A., Bhaskar, T., Agrawal, D. (2020). Exploring the flexibility of cellulase cocktail obtained from mutant UV-8 of *Talaromyces verruculosus* IPC 324 in depolymerising multiple agro-industrial lignocellulosic feedstocks. *Int. J. Biol. Macromol*, 154, 538-544.

Jamart, B., Bodiguel, J., Brosse, N. (2006). Chimie organique : Cours QM et applications. 17^e Ed : Dnoud. Paris. 560 p.

Jampala, P., Tadikamalla, S., Preethi, M., Ramanujam, S., Uppuluri, K. B. (2017). Concurrent production of cellulase and xylanase from *Trichoderma reesei* NCIM 1186: enhancement of production by desirability-based multi-objective method, *3 Biotech*, 7, 14.

Jin, Z., Katsumata, K. S., Lam, T. B., Iiyama, K. (2006). Covalent linkages between cellulose and lignin in cell walls of coniferous and nonconiferous woods. *Biopolymers*, 83 (2), 103-110.

Jo, W.S., Park, H. N., Cho, D. H., Yoo, Y. B., Park, S. C. (2011). Optimal media conditions

for the detection of extracellular cellulase activity in *Ganoderma neo-japonicum*. *Mycobiology*, 39 (2), 129-132.

Kabour, A. (2016). Le barrage de Djorf Torba (Béchar, Sud-Ouest Algérien), sous contraintes du climat, de l'environnement. ANBT. Document de barrage Djorf-Torba, Biskra, Algérie : direction de barrage Djorf-Torba.

Kabour, A., Mekkaoui, A., Chebbah, L. (2015). Le barrage de Djorf Torba (Béchar, Sud-Ouest Algérien), sous contraintes du climat, de l'environnement et de gestion. *Int. J. Environ. Clim*, 3 (5), 23-32.

Kaidi, F., Touzi, A. (2001). Production de Bioalcool à Partir des Déchets de Dattes. *Rev. Energ. Ren.* : Production et Valorisation-Biomasse, 75-78.

Kamyab, H., Din, M. F. M., Ponraj, M., Keyvanfar, A., Rezanian, S., Taib, S. M., Majid, M. Z. A. (2016). Isolation and Screening of Microalgae from Agro-Industrial Wastewater (POME) for Biomass and Biodiesel Sources. *Desalin. Water Treat*, 57, 29118-29125.

Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Curr. Microbiol*, 57, 503-507.

Kim, J. E., Nam, H., Park, J., Choi, G. J., Lee, Y. W., Son, H. (2020). Characterization of the CCAAT-binding transcription factor comple in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Sci Rep*, 10 (1), 1-11.

Kim, S., Holtzapple, M. T. (2006). Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresour. Technol*, 97, 583-591

Kovaleski, G., Bittencour, J. V. M., Rodrigues, S. A. (2020). Estudo da Imobilização Celular de *Saccharomyces Cerevisiae* em Alginato de Cálcio. Ed : AYA Editora. 71 p.

Krzysztof, B. (2019). Elements of Bioeconomy. Ed. *IntechOpen*. Royaume-Uni. 186 p.

Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mandels, M., Kubicek-Pranz, E. M. (1993). Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited beta-diglycoside permease. *J. Biol. Chem*, 268, 19364-19368.

Kumar, N., Sudan S. K., Garg, R., Sahni, G. (2019). Enhanced production of novel halostable recombinant endoglucanase derived from the metagenomic library using fed-batch fermentation. *Process Biochem*, 78, 1-7.

Kunitake, E., Tani, S., Sumitani, J., Kawaguchi, T. (2013). A novel transcriptional regulator, ClbR, controls the cellobiose- and cellulose-responsive induction of cellulase and xylanase genes regulated by two distinct signaling pathways in *Aspergillus aculeatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 97, 2017-2028.

Kwon, H. W., Yoon, J. H., Kim, S. H., Hong, S. B., Cheon, Y., Ko, S. J. (2007). Detection of Extracellular Enzyme Activities in Various *Fusarium* spp. *Mycobiology*, 35(3), 162-165.

Lafon, A., Seo JA., Han KH., Yu JH., d'Enfert, C. (2005). The heterotrimeric G-protein GanB (alpha)-SfaD(beta)-GpgA(gamma) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 171 (1), 71-80.

Laouar, A., Rouissat, L. D., Makhloufi, A., Ali, A., Chibani, M., Boulal, A. (2021). Caractérisation physico-chimiques et microbiologiques de vinaigre produit à partir des dattes. *IJNRE*, 3 (2), 22-28.

Lecheb, F. (2010). Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique de la matière grasse du noyau des dattes : essai d'incorporation dans une crème cosmétique de soin. Mémoire de Magister. Université M'hamed Bougara, Boumerdès. 112 p

Lee, J. M., Heitmann, J. A., Pawlak, J. J. (2007). Rheology of carboxymethyl cellulose solutions treated with cellulases. *BioResources*, 2 (1), 20-33.

Leghlimi, H., Meraihi, Z., Boukhalfa-Lezzar, H., Copinet, E., Duchiron, F. (2013). Production and characterization of cellulolytic activities produced by *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). *AJB*, 12, 465-475.

Leng, F., Sun, S., Jing, Y., Wang, F., Wei, Q., Wang, X., Zhu, X. (2016). A rapid and sensitive method for determination of trace amounts of glucose by anthrone-sulfuric acid method. *Bulg Chem Commun*, 48 (1), 109- 113.

Leng, R. A. (1996). L'application de la biotechnologie a l'alimentation animale dans les pays en développement. FAO, 90 p.

- Lennartsson, PR., Erlandsson P., Taherzadeh, MJ. (2014).** Integration of the first- and second-generation bioethanol processes and the importance of by-products, *Bioresource Technology*, 165, 3-8.
- Li, D. C., Papageorgiou, A. C. (2019).** Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. *Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance*. Cham, Switzerland; Berlin/Heidelberg, Germany. Ed: Springer. 395-417.
- Limayem, A., Ricke, S. C. (2012).** Biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol: perspectives actuelles, enjeux potentiels et perspectives d'avenir. *PECS*, 38 (4), 449-467.
- Liu, P., Lin, A., Zhang, G., Zhang, J., Chen, Y., Shen, T., Zhao, J., Wei, D., Wang, W. (2019).** Enhancement of cellulase production in *Trichoderma reesei* RUT-C30 by comparative genomic screening. *Microb Cell Fact*, 18, 81.
- Lübeck, M., Lübeck, P. S. (2018).** Isolation and Screening of Cellulolytic Filamentous Fungi. *Cellulases: Methods mol. Boil*, 1796, 37-45.
- Lynd, L. R., Weimer P. J., Van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002).** Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol*, 66 (3), 506-577.
- Malvessi, E., Silveira, M. M. D. (2004).** Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 47, 693-702.
- Mardetko, N., Trontel, A., Novak, M., Pavlečić, M., Ljubas, B. D., Grubišić, M., Šantek, B. (2021).** Screening of lignocellulolytic enzyme activities in fungal species and sequential solid-state and submerged cultivation for the production of enzyme cocktails. *Polymers*, 13 (21), 3736.
- Martins, MP., Martinez-Rossi NM., Sanches PR., Rossi, A. (2020).** The PAC-3 transcription factor critically regulates phenotype-associated genes in *Neurospora crassa*. *Genet. Mol. Biol*, 43 (3), e20190374.

- Mazari, W., El Haci, I. A., Boucherit Otmani, Z. (2017).** Contrôle de la formation de biofilm fongique en milieu dentaire. Recherche antimicrobienne : nouvelles connaissances biologiques et programmes éducatifs, 315-323.
- Meena, R. S, Vijayakumar, V., Yadav, G. S., Mitran, T. (2018).** Response and interaction of Bradyrhizobium japonicum and arbuscular mycorrhizal fungi in the soybean rhizosphere. *J. Plant Growth Regul*, 84, 207-223.
- Memon, M. J., Memon, A. R. (2020).** Wheat straw optimization via its efficient pretreatment for improved biogas production. *Civ. Eng. J*, 6 (6), 1056-1063.
- Merzougui, T., Mekkaoui, A., Kabour, A. (2007).** L'eau dans l'oasis de Béni Abbés : un patrimoine essentiel (vallée de la Saouara, Sud Ouest algérien). <http://www.naturevivante.org>
- Mhuantong, W., Charoensri, S., Poonsrisawat, A., Pootakham, W., Tangphatsornruang, S., Siamphan, C., Chantasingh, D. (2021).** High quality *Aspergillus aculeatus* genomes and transcriptomes: a platform for cellulase activity optimization toward industrial applications. *Front. bioeng. biotechnol*, 8, 607176.
- Miklaszewska, B., Macko, D., Kłosowski, G., Mikulski, D. (2016).** Application of semi-quantitative and quantitative methods for the selection of cellulolytic filamentous fungi isolated from pulp mill materials. *BioTechnologia*, 97 (3), 169-178.
- Miller, G. L. (1959).** Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, 31(3), 426-428.
- Mohapatra, S., Padhy, S., Mohapatra, P. K. D., Thatoi, H. N. (2018).** Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, Pennisetum species through cellulase from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*. *Bioresour. Technol*, 253, 262-272.
- Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., Chisti, Y. (2001).** Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J. Biotechnol*, 92, 113-131.
- Mondal, S., Halder, S. K., Mondal, K. C. (2022).** Tailoring in fungi for next generation cellulase production with special reference to CRISPR/CAS. *SMAB*, 2, 113-129
- More, D., White, J. (2005).** Encyclopédie des Arbres. Ed: Flammarion.Grande-Bretagne. Pp: 775-777.

- Morgenstern, I., Powlowski, J., Tsang, A. (2014).** Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: From dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. *Brief. Funct. Genom*, 13, 471-481.
- Morris, D. L. (1948).** Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's Anthrone reagent. *Science*, 107, 254-255.
- Mousdale, D. M. (2008).** Biofuels: biotechnology, chemistry, and sustainable development. Ed: CRC Press, Taylor & Francis Group. London. 404 p.
- Mrudula, S., Murugammal, R. (2011).** Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Braz J Microbiol*, 42(3):1119-27. doi: 10.1590/S1517-838220110003000033.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-350.
- Nakai, R., Horikoshi, S., Uozumi, T., Beppu, T. (1987).** Purification and properties of cellulases from an alkalophilic *Streptomyces* strain. *Agric Biol Chem*, 51, 3061-5.
- Naraian, R. (2019).** Mycodegradation of Lignocelluloses. Springer Nature. 252 p.
- Nathan, V. K., Esther Rani, M., Rathinasamy, G., Dhiraviam, K. N., Jayavel, S. (2014).** Process optimization and production kinetics for cellulase production by *Trichoderma viride* VKF3. *SpringerPlus*, 3, 1-12.
- Nhan, N. T., Anh D. L. H., Tri, N. M. (2021).** Isolation of Cellulolytic Fungi and Their Application for Production of Organic Fertilizer from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Biotech Studies*, 30 (1), 16-21.
- Nicklin, J., Graeme-Cook, K., Killington, R. (2000).** L'essentiel en microbiologie. Berti Editions. Paris. 362p
- Nitta, M., Furukawa, T., Shida, Y., Mori, K., Kuhara, S., Morikawa, Y., Ogasawara, W. (2012).** A new Zn (II)(2)Cys(6)-type transcription factor BglR regulates beta-glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 388-397.

Nurul Adela, B., Loh S. K., Nasrin, A. B. (2015). The improvement on enzymatic hydrolysis of oil palm (*Elaeis guineensis*) empty fruit bunch lignocellulose. *Malays Appl Biol*, 44 (1), 95-100.

Nurul Adela, B., Loh, S. K., Nasrin, A. B. (2015). The improvement on enzymatic hydrolysis of oil palm (*Elaeis guineensis*) empty fruit bunch lignocellulose. *Malays Appl Biol*, 44 (1), 95-100.

OCDE/FAO. (2022). Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO, statistiques agricoles de l'OCDE (base de données), <http://dx.doi.org/10.1787/agr-outl-data-fr>.

Ogier, J. C., Leygue, J. P., Ballerini, D., Pourquoi, J., Rigal, L. (1999). Production d'ethanol a partir de biomasse lignocellulosique. *Oil Gas Sci. Technol*, 54 (1), 67-94.

Passicousset, J. (2019). Descripteurs physicochimiques de la biomasse lignocellulosique en hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation in situ. Chimie-Physique. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France.

Pauwels, J., Van Ranst, E., Verloo, M., Mvondo, A. (1992). Manuel d'Analyses de sols et de plantes. Equipements, Gestion de stocks, de verrerie et produits chimiques. Publications agricoles 28, AGCD, Bruxelles, Belgique. 265 p

Phwan, C. K., Ong, H. C., Chen, W. H., Ling, T. C., Ng E. P., Show, P. L. (2018). Overview: Comparison of Pretreatment Technologies and Fermentation Processes of Bioethanol from Microalgae. *Energy Convers. Manag*, 173, 81-94.

Pitt, J. I. (2000). A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species, 3rd edn. Sydney, NSW: Food Science Australia, CSIRO.

Poirier, V. (2004). La dégradation biochimique de la lignine. Agri-Food Research and Developmen Uni. Univ. Québec.

Prasanna, H. N., Ramanjaneyulu, G., Reddy, B. R. (2016). Optimization of cellulase production by *Penicillium sp.* *3 Biotech*, 6, 162.

Rahman, H., Vikram, P., Hammami, Z., Singh, R. K. (2022). Recent advances in date palm genomics: A comprehensive review. *Front. Genet*, 13.

Ramirez, C. (1982). Manual and atlas of the Penicillia. Elsevier Biomedical Press.

- Ravindran, C., Naveenan, T., Varatharajan, G. R. (2010).** Optimization of alkaline cellulase production by the marine-derived fungus *Chaetomium sp.* using agricultural and industrial wastes as substrates. *Botanica Marina*, 275-282.
- Razif, H., Jason, Y., Thiruvenkadam W. S., Selvakumar., Ghani Wan A. W., Cherrington, T., Danquah, M. K. (2014).** Algal biomass conversion to bioethanol a-step-by-step assessment. *Biotechnol. J*, 9 (1), 73–86.
- Romero, M. D., Aguado J., Gonzalez, L., Ladero, M. (1999).** Cellulase production by neurospora crash on wheat straw. *Enzyme Microb. Technol*, 25, 244-250.
- Roussos, S., Raimbault, M. (1982).** Hydrolysis of cellulose by fungi. 1. Screening of cellulolytic strains. *Annales de Microbiologie*. Vol. 133, n° 3. Pp. 455-464.
- Ruan, R., Zhang, Y., Chen, P., Liu, S., Fan, L., Zhou, N., Ding, K., Peng, P., Addy, M., Cheng, Y., Anderson, E., Wang, Y., Liu, Y., Lei, H., Li, B. (2019).** Biofuels: Introduction, Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels, Elsevier. Pp: 3-43.
- Rutter, J., Probst, B. L., McKnight, S. L. (2002).** Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell*, 111 (1), 17–28.
- Saha, B C., Freer, S. N., Bothast, R. J. (1994).** Production, purification et propriétés d'une β -glucosidase thermostable à partir d'une souche à variante de couleur d'*Aureobasidium pullulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3774-3780.
- Saidi, A. (2011).** La biomasse lignocellulosique et la bioénergie. Division Bio-énergie & Environnement : recherche et développement, *CDER*, 21.
- Saini, J. K., Saini, R., Tewari, L. (2015).** Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5, 337–353.
- Saitou, N., Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*, 4, 406-425.
- Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., Benjamin, S. (2016).** Un aperçu sur les cellulases fongiques avec une perspective industrielle. *J. Nutr. Nourriture. Sci*, 6, 461.

Samson, R. A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K. A., Peterson, S. W., Varga, J., Frisvad, J. C. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud. Mycol.* 70,159-183.

Saradouni, N., Penninckx, M., MOHAND-OUSSAID, O., BENALLAOUA, S. (2004). Recherche D'un Milieu Optimal Pour La Production De La β -Glucosidase chez *Aspergillus fumigatus* (Fresenius) MUTANT albino. Sciences & Technologie. C, Biotechnologies. *ASJP*, 11-17.

Sarkar, N., Aikat, K. (2014). *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3 provides for increased cellulase production. *Int J Chem Eng*, 1–9.

Schulein, M. (1997). Propriétés enzymatiques des cellulases d'*Humicola insolens*. *Biotechnol. J*, 57 (1-3), 71-81.

Scott, T. A., Melvin, E. H. (1957). Methods in enzymology. Colowick S. and Kaplan N.D. Ed: Academic Press – New York. 3, 84 p.

Shah, F., Ranawat, B., Mishra, S. (2019). An approach toward cellulase production, bioconversion, and utilization. In *Advanced bioprocessing for alternative fuels, biobased chemicals, and bioproducts*. Woodhead Publishing. Pp : 207-223.

Shah, F., Ranawat, B., Mishra, S. (2019). Une approche vers la production, la bioconversion et l'utilisation de cellulase. Dans *Biotraitement avancé pour les carburants alternatifs, les produits chimiques biosourcés et les bioproducts*. Éditions Woodhead, 207-223.

Sharma, A., Tewari, R., Rana, S. S., Soni, R., Soni, S. K. (2016). Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 179,1346-1380.

Silveira, M. H. L., Rau, M., da Silva Bon, E. P., Andreus, J. (2012) A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulase preparations using filter paper. *Enzyme Microb Technol.* 51 (5), 280-5.

Singh, A., Kuhad, R. C., Ward, O. P. (2007). Industrial application of microbial cellulose. In: Kuhad RC, Singh A(eds) *Lignocellulose biotechnology*. Int Pub Hous, New Delhi, India. Pp: 345-358.

Sivaramanan, S. (2014). Isolation of cellulolytic fungi and their degradation on cellulosic agricultural wastes. *JAIR*, 2 (8), 458-463.

Solov'eva, I. V., Okunev, O. N., Vel'kov, V. V., Koshelev, A. V., Bubnova, T. V., Kondrat'eva, E. G., Skomarovskii, A. A., Sinitsyn, A. P. (2005). The selection and properties of *Penicillium verruculosum* mutants with enhanced production of cellulases and xylanases. *Microbiology*, 74, 172-178.

Sriariyanun, M., Mutrakulcharoen, P., Tapaamorndech, S., Cheenkachorn, K., Rattanaporn, K. (2019). A Rapid Spectrophotometric Method for Quantitative Determination of Ethanol in Fermentation Products. *Orient. J. Chem*, 35 (2), 744–750.

Srivastava, M., Sengupta, S., Das, P., Datta, S. (2017). Novel Pre Treatment Techniques for Extraction of Fermentable Sugars from Natural Waste Materials for Bio Ethanol Production”, *Int. J. Environ. Sci. Nat. Resour*, 7, 2572–1119.

Srivastava, M., Srivastava, N., Ramteke, P. W., Mishra, P. K. (2019). Approaches to enhance industrial production of fungal cellulases. Ed: Springer. 209 p.

Stricker, A. R., Grosstessner-Hain, K., Wurleitner, E., Mach, R. L. (2006). Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot. Cell*, 5, 2128-2137.

Sukumaran, R. K., Christopher, M., Kooloth-Valappil, P., Sreeja-Raju, A., Mathew, R. M., Sankar, M., Puthiyamadam A., Adarsh, V. P. (2021). Aswathi A, Rebinro V, Abraham A. Addressing challenges in production of cellulases for biomass hydrolysis: targeted interventions into the genetics of cellulase producing fungi. *Bioresour Technol*, 329, 124746.

Sulyman, A. O., Igunnu A., Malomo, S. O. (2022). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. *Heliyon*, 6 (12), e05668.

Sun, R., Lawther, M., Banks, W. B. (1995). Influence of alkali pre-treatment on wheat straw cell wall components. *Ind. Crop. Prod.* 4, 127-145.

Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol*, 83(1), 1-11.

Sutaoney, P., Choudhary, R., Gupta, A. (2020). Bioprospecting cellulolytic fungi associated with textile waste and invitro optimization of cellulase production by *Aspergillus flavus* NFCCI-4154. *J. Dev*, 13 (1), 64-84.

Syed, M B., Seraman, S., Rajendran, A., Thangavelu, V. (2013). Optimization of compactin production by 122lacket-burman method using *Penicillium citrinum*. *Int. J. Chemtech Res*, 5 (3), 1393-1400.

Szakács, G., Réczey, K., Hernádi, P., Dobozi, M. (1981). *Penicillium verruculosum* WA30 a new source of cellulase. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 11, 120-124.

Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol*, 101(13), 4744-4753.

Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol. Biol. Evol*, 9, 678-687.

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol*, 38, 3022-3027.

Thayer, D. W., Lowther, S. V., Phillips, J. G. (1984). Cellulolytic activities of strains of the genus *Cellulomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 34 (4), 432-438.

Toutain, G. (1967). Le palmier dattier culture et production. *Al Awamia*, (25), 84-150.

Tse, T. J., Wiens, D. J., Reaney, M. J. (2021). Production of bioethanol, a review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*, 7(4), 268.

Typesetting, J. S., Porthcawl, L. T. D., Glamorgan, M. (2007). Biofuels for transport: global potential and implications for sustainable energy and agriculture. Ed: Earthscan. UK et USA. 452 p.

USDA (United States Department of Agriculture). (2023). World Agricultural Production, Foreign Agricultural Service Global Market Analysis.

Van Heiningen, A. (2006). Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. *Pulp Pap. Can*, 107 (6), 141-146.

Van Peij, N. N., Visser, J., de Graa, L. H. (1998). Isolation and analysis of xlnR, encoding a transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Mol. Microbio*, 27, 131-142.

Vazquez-Montoya, E. L., Castro Ochoa, L. D., Maldonado Mendoza, I. E., Luna Suarez, S., Castro Martinez, C. (2019). Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Rev Argent Microbiol*. 52 (1), 4-12.

Wang, B. T., Hu, S., Yu, X. Y., Jin, L., Zhu, Y. J., Jin, F. J. (2020). Studies of Cellulose and Starch Utilization and the Regulatory Mechanisms of Related Enzymes in Fungi. *Polymers*, 12 (3), 530.

Wang, K., Sun, R. C. (2010). Biorefinery straw for bioethanol. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels. Chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose. Elsevier. Pp : 267-287.

Wertz, J. L. (2010). « La lignine », Rapport de synthèse, *ValBiom* – Gembloux AgroBio Tech.

Whistler, R. L., Wolfrom, M. L. (1962). Methods in carbohydrate chemistry. Vol. 1. Analysis and preparation of sugars. Academic Press New York. 589 p.

Winarsih, S., Siskawardani, D. D. (2020). Hydrolysis of corncobs using a mixture of crude enzymes from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for bioethanol production. *Energy Reports*, 6, 256-262.

Xiaying, L., Steven, M., Zicari, B., Guangqing Liu, A., Yeqing Li, C., Ruihong, Z. (2015). Pretreatment of wheat straw with potassium hydroxide for increasing enzymatic and microbial degradability. *Bioresour. Technol*, 185, 150-157.

Yeh, A I., Huang, Y. C., Chen, S. H. (2010). Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose, *Carbohydr. Polym*, 79 (1), 192-199.

Yevich, R., Logan, J. A. (2003). An assessment of biofuel use and burning of agricultural waste in the developing world. *Glob. Biogeochem. Cycles*, 17 (4), 1095.

Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad J. C., Samson, R. A. (2014). Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Stud. Mycol*, 78, 175-341.

Yu, X. B., Yun, H. S., Koo, Y. M. (1998). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C30 in a batch fermenter. *J. Microbiol. Biotechnol*, 8 (6), 575-580.

Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., Boyce, A. N. (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *Sci. World J*, 2014, 957102.

Zahoor, W., Tan, X., Imtiaz, M., Wang, Q., Miao, C., Yuan, Z., Zhuang, X. (2021). Rice straw pretreatment with KOH/urea for enhancing sugar yield and ethanol production at low temperature. *Ind Crops Prod*, 170, 113776.

Zhang, Y. H. P., Himmel, M. E., Mielenz, J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv*, 24, 452-481.

ANNEXES

Annexe 1

Les milieux de cultures

1. Milieu PDA (Potatoes Dextrose agar)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200 g
Dextrose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

2. Milieu PDB (Potatoes Dextros bouillon)

Ces les mêmes composantes du milieu PDA à l'exception de l'agar-agar.

3. Milieu MEA (Malt Extract Agar)

Matière Sèche	50 g
Agar	5 g
Eau distillée	1000 ml

4. Milieu G25N (25 % Glycérol Nitrate Agar)

KH ₂ PO ₄	0.75 g
Czapek Concentre	7.5 ml
Extrait de levure	3.7 g
Glycerol.....	250 g
Agar	12 g
Eau distillée	750 ml

5. Milieu CYA (Czapek Yeast Agar)

Czapek Concentre.....	10 ml
KH ₂ PO ₄	1 g
Extrait de levure	5 g
Sucrose	30 g
Agar	15 g

Eau distillée1000 ml

6. Czapek Concentre

NaNO₃30 g

KCL5 g

MgSO₄5 g

FeSO₄..... 0.1 g

Eau distillée100 ml

7. Milieu Mandel

(NH₄)₂SO₄1.4 g

KH₂PO₄2 g

Urée0.3 g

Peptone1 g

CaCl₂0.3 g

MgSO₄ 7H₂O0.3 g

Solution d'oligo-éléments1 ml

Tween 802 ml

Extrait de levure0.25 g

Eau distillée1000 ml

Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

- Solution d'oligo-éléments :

HCl0.96 ml

FeSO₄ 7H₂O0.88 g

MnCl₂ 4H₂O0.17 g

ZnSO₄ 7H₂O0.54 g

CoCl₂ 6H₂O0.34 g

Eau distillée100 ml

8. Solution lyse CTAB

TRIS-HCl pH 7,4.....100 mM

EDTA pH 8.020 mM

NaCl.....250 mM

SDS (sodium dodecyl sulfate).....2%

9. TAE (Tris, Acétate, EDTA)

Pour la préparation d'une solution stock concentrée cinquante fois (50x) de tampon TAE pH 8,0 peser à :

- TrisBase.....242 g
 - acide acétique glacial 100 %57,1 mL
 - EDTA 0,5M.....100 mL
 - Eau distillée(~800mL) pour 1L
- Ajuster le pH à 8.0.

Annexe 2

Dosage des sels minéraux

I.1 Dosage du calcium

Le dosage du calcium (Ca) a été effectué à l'aide d'une spectrométrie d'absorption atomique (SAA) à la longueur d'onde de 422 nm. Le principe est basé sur le fait que les atomes libres peuvent absorber la lumière d'une certaine longueur d'onde et l'absorption de chaque élément est spécifique. L'analyse par absorption atomique utilise la loi de Beer- Lambert.

Minéralisation

Comme il a été cité dans la partie matériel et méthode, Les cendres des échantillons obtenues sont traitées à l'acide chlorhydrique HCl (2N), puis après digestion en bain marie pendant une demi-heure, la solution est récupérée avec une quantité d'eau distillée jusqu'à l'obtention d'un volume final de 50 ml.

Méthode de dosage

Réactifs :

- Acide chlorhydrique concentré (HCL)
- **solution mère de calcium** 1g/l : elle est préparée à partir de CaCO₃ (dissoudre 2,497 g CaCO₃ avec 50 ml H₂O et 25 ml HCl (concentré), ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à 1000 ml)
- **solution fille de calcium à 100 mg/l**

-**solution mère de Chlorure de lanthane** : dissoudre 175,5 g de La_2O_3 dans 185 ml HCl (concentré) et de l'eau déminéralisée, jauger à 1000 ml =15%)

- **solution fille de lanthane à 3 %** (diluer 200 ml de solution La 15 % à 1000 ml à l'eau déminéralisée)

Étalonnage :

A partir des solutions précédentes, préparer la gamme selon les indications du tableau ci-dessous :

Tableau I.1 : Gamme d'étalonnage pour dosage du calcium.

Numéro de fiole	Témoin	1	2	3	4
Ca 100 mg/l	0	2,5	5	7,5	10
HCL pure	2	2	2	2	2
La 3%	10	10	10	10	10
Eau diméniralisée pour avoir 100 ml					
Ca mg/l	0	2,5	5	7,5	10

Préparation des solutions d'analyse

Les échantillons d'analyse sont dilués pour avoir Ca entre 2 et 10 mg/l, HCl 2 % et La 0,3 %.

Conditions spectrales

- Lampe à cathode creuse de calcium,
- longueur d'onde : 422 nm,
- flamme air-acétylène oxydante.

I.4 Dosage de magnésium

Le dosage du magnésium (Mg) a été effectué par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) à la longueur d'onde de 285 nm.

Réactifs :

- Acide chlorhydrique concentré
- solution de magnésium 100 mg/l (Cette solution peut être préparée en dissolvant 0,495 g (MgSO_4) dans de l'eau distillée et en ajustant le volume à 1 litre).

Étalonnage : Préparer une gamme de solutions selon les indications du tableau ci-dessous :

Tableau I.2 : Gamme d'étalonnage pour dosage de magnisium.

Numéro de fiole	Témoin	1	2	3	4	5	6
Mg (100 mg/l) ml	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3
HCL ml	2	2	2	2	2	2	2
Eau diméniralisée pour avoir 100 ml							
Mg mg/l	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3

I.3 Dosage de sodium et du potassium

Le dosage de sodium et du potassium est réalisé à l'aide d'un photomètre à flamme. Lorsque les atomes d'un élément sont excités, leurs retours à l'état fondamental s'accompagnent de photons, de fréquence « F » spécifique à cet élément, l'utilisation de ce phénomène constitue la base de la spectroscopie d'émission.

-Réactifs :

-Acide nitrique

-Solution étalon de NaCl 100 mg/l

- solution étalon de KCl à 100 mg/l

Réalisation de la courbe d'étalonnage à partir d'une solution fille (1 mg/l) de sodium et potassium, les lectures sont effectuées à une longueur d'onde de 589 nm pour le sodium et 766,5 nm pour le potassium (Tableau I.3)

Tableau I.3 : Série de dilutions pour réalisation de la courbe d'étalonnage du sodium et du potassium

Numéro de fiole	Témoin	1	2	3	4
Solution étalon de sodium ou de magnisium (1 mg/l)	0	10	20	30	40
Eau permutée (ml)	100	100	100	100	100
Acide nitrique (ml)	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Coconcentration finale en mg/l	0	0,1	0,2	0,3	0,4

Annexe 3

Analyses physico chimiques de l'eau du barrage

1. **Mesure du pH** : la mesure du pH est effectuée à l'aide d'un pH mètre
2. **Mesure de TDS** : Le taux de sel est mesuré à l'aide d'un appareil multi-paramétrique. L'électrode préalablement rincé à l'eau distillée est plongé dans chaque échantillon d'eau à examiner.

chlorure, sulfate, bicarbonate**3. Dosage des ions calcium Ca^{+2} et magnésium Mg^{+2} (ISO N° 6058)**

Le titrage molaire des ions calcium et magnésium est effectuée avec une solution de sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) à pH10. Le noir érichrome T, qui donne une couleur rouge foncé ou violette en présence des ions calcium et magnésium, est utilisé comme indicateur.

- Réactifs1) **Solution d'E.D.T.A N/50 ($\text{C}_{10} \text{H}_{14} \text{N}_2 \text{Na}_2 \text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : (0,02N ou 0,01M)**

- EDTA 3,725 g. après déshydratation à 80°C pendant 2 h.

- H₂O distillée q.s.p 1000 ml.

2) **Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 2 N :**

- NaOH (pastilles) 80 g.

H₂O distillée q.s.p 1000 ml.

3) **Solution d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) pH = 10,1:**

- Chlorure d'ammonium 67,5 g.

- NH₄OH (25%)..... 570 ml

- HCl concentré PH = 10,1

- H₂O distillée q.s.p 1000 ml.

: Noir eriochrome T.

- **Solution étalon de référence (CaCO₃)= 0.01mol/l**

Sécher un échantillon de carbonate de calcium pur pendant 2 h à 150°C.

En introduire 1 g dans une fiole conique de 500 ml et humidifier avec de l'eau. Ajouter goutte à goutte de l'acide chlorhydrique à 4 mol/l jusqu'à ce que tout le carbonate soit dissous. Eviter un excès d'acide.

Ajouter 200 ml d'eau et porter à ébullition quelques minutes afin d'éliminer le dioxyde de carbone. Refroidir et ajouter quelques gouttes de l'indicateur au rouge de méthyle. Ajouter une solution ammoniacale à 3 mol/l jusqu'à ce que la solution devienne orange. Transvaser la solution dans une fiole jaugée de 1000ml et compléter au volume avec de l'eau distillée. 1 ml de la solution contient 0.4008 mg(0.01 mmol/l) de calcium.

• **Mode opératoire :**

- (V₁) Ca²⁺ :
 - Prendre 50 ml d'eau à analyser.
 - Ajouter 2 ml de NaOH à 2 N.
 - Ajouter du Murexide.
 - Et titrer avec l'E.D.T.A jusqu'au virage (violet).
- (V₂) Ca²⁺Mg²⁺ :
 - Prendre 50 ml d'eau à analyser.
 - Ajouter 2 ml de NH₄OH (10,1).
 - Ajouter noir eriochrome.
 - Et titrer avec l'E.D.T.A jusqu'au virage (bleu).

Expression des résultats : La détermination du mg/l de Calcium est donnée par la formule suivante :
 d'où :

$$\text{mg/lCa}^{2+} = \frac{V_1 * C_{\text{EDTA}} * F * M_{\text{Ca}^{2+}}}{P.E} * 1000$$

V₁ : Volume d'EDTA nécessaire pour une concentration donnée.

C : Concentration molaire d'EDTA (0,01 M/l).

M_{Ca²⁺} : Masse molaire du calcium en g.

P.E : Prise d'essai (volume de l'échantillon nécessaire pour ce dosage).

F : Facteur

Donc

$$\text{mg/lCa}^{2+} = \frac{V_1 * 0.01 * F * 40.08}{50} * 1000$$

$$\text{mg/l Ca}^{2+} = V_1 \times F \times 8.016$$

La détermination du mg/l de Magnésium est donnée par la formule suivante :

$$\text{mg/lMg}^{2+} = \frac{(V_2 - V_1) * C_{\text{EDTA}} * F * M_{\text{Mg}^{2+}}}{P.E} * 1000$$

d'où :

V₂: Volume total d'E.D.T.A

V₁ : Volume d'EDTA nécessaire pour une concentration donnée.

C : Concentration molaire d'EDTA (0,01 M/l).

M_{Mg²⁺} : Masse molaire du Magnésium en g.

P.E : Prise d'essai (volume de l'échantillon nécessaire pour ce dosage).

F : Facteur

Donc

$$\text{mg/l Mg}^{2+} = \frac{(V_2 - V_1) * 0.01 * F * 24.3}{50} * 1000$$

$$\text{mg/l Mg}^{2+} = (V_2 - V_1) \times F \times 4.86$$

4. Dosage de sodium Na⁺ par photomètre de flamme (ISO 9964/3)

Préparation des étalons :

Solution fille de sodium (Na⁺) à 10 mg/l de la solution mère de Na Cl à 1000 mg/l dans 100 ml d'eau distillée.

2)- Partie pratique :

Mode opératoire :

Appareil Dr LANGE (JENWAY)

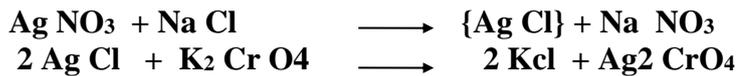
Il faut le suivre étape par étape :

- Allumer l'appareil à l'aide du bouton vert (Power).
- Ouvrir le robinet de la bouteille du gaz.
- Allumer la flamme à l'aide du bouton noir "IGNITION" sans lâcher le doigt jusqu'à l'affichage "FLM" en rouge sur l'écran.
- Pipeter de l'eau distillée remplie dans une cuvette.
- Optimiser la flamme si elle est jaune à l'aide du bouton " fuel " jusqu'à ce que la couleur devienne bleu violacée.
- Optimiser à zéro à l'aide du bouton "Blank".
- Laisser se stabiliser 5 à 10 minutes.
- Une fois qu'elle se stabilise à zéro, activer la cuvette d'eau distillée et la remplacer par une autre cuvette remplie par une solution étalon de Na⁺ ou du K⁺ à 10 mg/l.
- Optimiser à 10 mg/l à l'aide du bouton "FINE"
- Retirer la cuvette remplie par une solution étalon de "Na⁺" ou de "K⁺" à 10 mg/l et la remplacer par une cuvette remplie d'eau distillée et vérifier si l'écran affiche zéro (0.000).
- Retirer la cuvette remplie par l'eau distillée et la remplacer par une cuvette remplie par une solution étalon de Na⁺ à 10 mg/l et vérifier si l'écran affiche (10).
- Retirer la cuvette et la remplacer par une autre cuvette remplie d'eau distillée.
- A la fin, passer aux échantillons inconnus jusqu'à ce que la valeur affichée sur l'écran est stable (3 essais pour chaque échantillon).
 - Le résultat est donné directement en mg/l.

5. Détermination des chlorures Cl⁻ (NF T 90 -014)

Principe :

Réaction des ions chlorure avec des ions argent pour former du chlorure d'argent insoluble qui est précipité quantitativement. Addition d'un petit excès d'ions argent et formation du chromate d'argent brun-rouge avec des ions chromates qui ont été ajoutés comme indicateur. Cette réaction est utilisée pour l'indication du virage. Durant le titrage, le pH est maintenu entre 5 et 9.5 afin de permettre la précipitation.



Réactifs :

Solution de nitrate d'argent à 0,01 N:

1,6987 d' AgNO₃ → 1000 ml d'eau distillée

Indicateur coloré K₂CrO₄ à 10 %:

10 g de K₂CrO₄ → Q.S.P 100 ml d'H₂O dist.

Solution de chlorures à 71 mg/l:

0.107g de NH₄Cl.....1000ml d'eau distillée.

Mode opératoire :

Prendre 5 ml d'eau à analyser,

Ajouter 2 gouttes de K₂CrO₄ (coloration jaunâtre).

Titre avec Ag NO₃ à 0,01 N jusqu'à coloration brun rougeâtre.

Expression des résultats :

$$F.G: \frac{V_{\text{AgNO}_3} \times N_{\text{AgNO}_3} \times M_{\text{Cl}}}{PE} = \frac{V_{\text{AgNO}_3} \times 0,01 \times 35,5 \times F \times 1000}{5}$$

$$F.S : \text{mg/l Cl}^- = V_{\text{AgNO}_3} \times 71 \times F.$$

V_{AgNO₃} : Volume d'AgNO₃ nécessaire pour le dosage de l'échantillon.

N_{AgNO₃} : Normalité d'AgNO₃

M_{Cl⁻} : masse des chlorures.

F : facteur de correction du titre d'Ag NO₃.

PE : prise d'essai.

Pour le F : - Prendre 5 ml de la solution mère à 71 mg/l.

- Ajouter 2 gouttes de l'indicateur coloré.

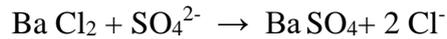
- Doser par AgNO₃ à 0,01 N jusqu'au virage.(couleur brun rougeâtre).

$$F = \frac{1}{V_{\text{AgNO}_3}}$$

6. Détermination des Sulfates (SO₄²⁻) (NF T 90 -014)

Principe :

Les ions sulfates sont précipités et passés à l'état de sulfate de baryum
En présence de Ba Cl₂.

**Appareil :**

Spectrophotomètre UV Visible

Réactifs :

Solution mère de sulfates à 1 g/l à partir de Na_2SO_4
 Peser 1,479 g de Na_2SO_4 1000 ml d'eau distillée.

Solution stabilisante :

Acide chlorhydrique (c) 60 ml.
 Ethanol 200 ml.
 Chlorure de sodium 150 g.
 Glycérol 100 ml.
 Eau distillée Q.S.P. 1000 ml.

Solution de chlorure de baryum :

Chlorure de baryum 150 g.
 Acide chlorhydrique 5 ml.
 Eau distillée Q.S.P. 1000 ml.

Gamme d'étalonnage :

Prendre 8 béchers de 250 ml.
 Laver très bien avec du savon et une lavette.
 Rincer abondamment avec l'eau du robinet.
 Rincer avec une solution acide chlorhydrique
 Rincer avec l'eau du robinet puis avec de l'eau distillée.

Remarque :

- Les échantillons troubles ou colorés doivent être filtrés sur filtre de 0,45 μm .
 - Les échantillons qui contiennent plus de 70 mg/l SO_4^{2-} doivent être dilués avant détermination.

Gamme d'étalonnage :

Tableau :

N° Bécher	0	1	2	3	4	5	6	7
\$ mère à 1g/l	0	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	7 ml
qsp	100 ml							
\$ stabilisante	5 ml							
\$ chlorure de baryum	2 ml							
Agitation 1 mn.								

concentration finale mg/l SO ₄ ²⁻	0	10	20	30	40	50	60	70
--	---	----	----	----	----	----	----	----

Enregistrer la gamme dans le spectrophotomètre à la longueur d'onde λ 420.

* **Mode opératoire :**

- * Prendre 20 ml d'eau à analyser puis compléter à 100 ml d'eau distillée.
- * Ajouter 5 ml de la solution stabilisante.
- * Ajouter 2 ml de chlorure de baryum.
- * Agiter énergiquement pendant 1 mn.
- * Passer au spectrophotomètre $\lambda = 420$ nm.

* **Expression des résultats :**

mg/l SO₄²⁻ = la valeur lue sur le spectrophotomètre x facteur de la dilution.

7. Détermination de l'alcalinité (HCO₃⁻) (NF T0-036)

L'alcalinité d'une eau correspond à la présence bicarbonates, carbonates et hydroxydes.

Principe :

Détermination des volumes successifs d'acide fort en solution diluée nécessaire pour neutraliser, aux niveaux de pH = 8,3 et 4,3, le volume d'eau à analyser. La première détermination sert à calculer le titre alcalimétrique (TA), la seconde à calculer le titre alcalimétrique complet (TAC).

Réactifs :

- * Solution d'acide Chlorhydrique à 1 N :
- * Solution d'HCl à 0,1 N :
 - d'HCl à 1 N 100 ml.
 - H₂O distillée q.s.p 1000ml.

Électrode : Électrode de pH

Mode opératoire :

- Prendre 100 ml d'eau à analyser,
- Noter son pH puis titrer avec HCl à 0,1 N jusqu'à obtention d'un pH de 4,3.

* **Expression des résultats :**

$$F.G = \frac{V_A \times N_A \times M_{HCO_3^-} \times 1000}{PE} = \frac{V_A \times 0,1 \times 61 \times 1000}{100}$$

$$F.S : V_{A1} \times 61 = \text{mg/l } HCO_3^-$$

V_A : Volume d'acide versé.

N_A : normalité d'acide versé.

$M_{HCO_3^-}$: masse des bicarbonates (HCO_3^-).

P.E : prise d'essai.

* **Remarque** :

Si le pH de l'échantillon est supérieur à 8,3 ; titrer jusqu'à cette valeur (volume d'HCl obtenu correspond au CO_3^{2-}) puis continuer le dosage jusqu'à pH de 4,3 noter le volume V_{A2} .

$$\text{mg/l } CO_3^{2-} = V_{A2} \times 60$$

Annexe : 4

Méthode de dosage

1. Dosage de glucose par DNS (Miller, 1959)

Dissoudre 1g de DNS dans 50 ml de NaOH (2N). Ajouter 30g tartrate de sodium potassium tétrahydraté double, compléter à 100 ml avec l'eau distillée puis agité. Le réactif doit être conservé à l'abri de la lumière. Il se conserve environ un mois 2. 2.

2. Dosage des protéines (Bradford, 1976)

Nous avons besoin de deux solutions pour le dosage des protéines par cette méthode

A. Préparation de la solution de Bradford

- Bleu de coomassi G2500,01g
- Acide orthophosphorique10ml
- Ethanol 95%5ml
- Eau distillée100ml

B. Solution sérum bovine albumine (SBA)

- SBA.....1g

- Eau distillée100ml

Annexe : 5

Courbes d'étalonnages

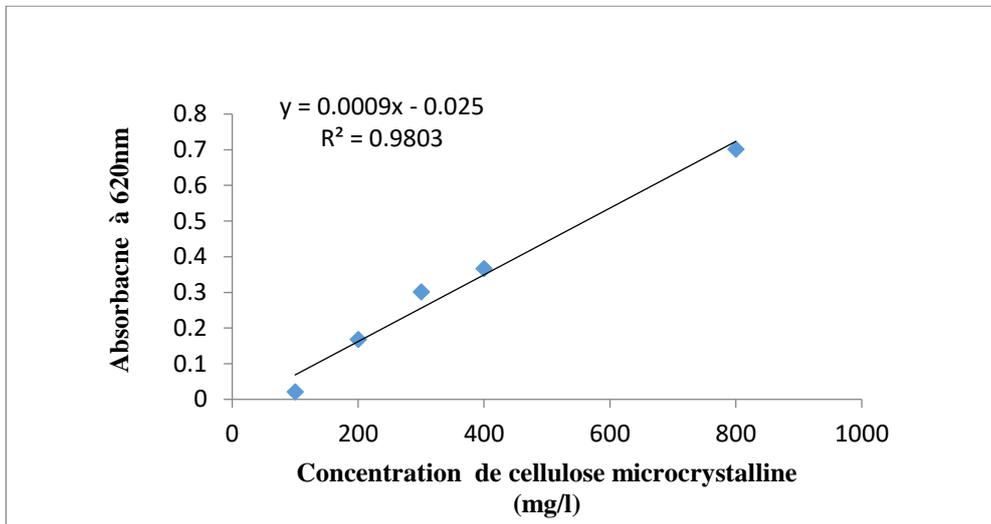


Figure 1 : Courbe étalon pour dosage de cellulose

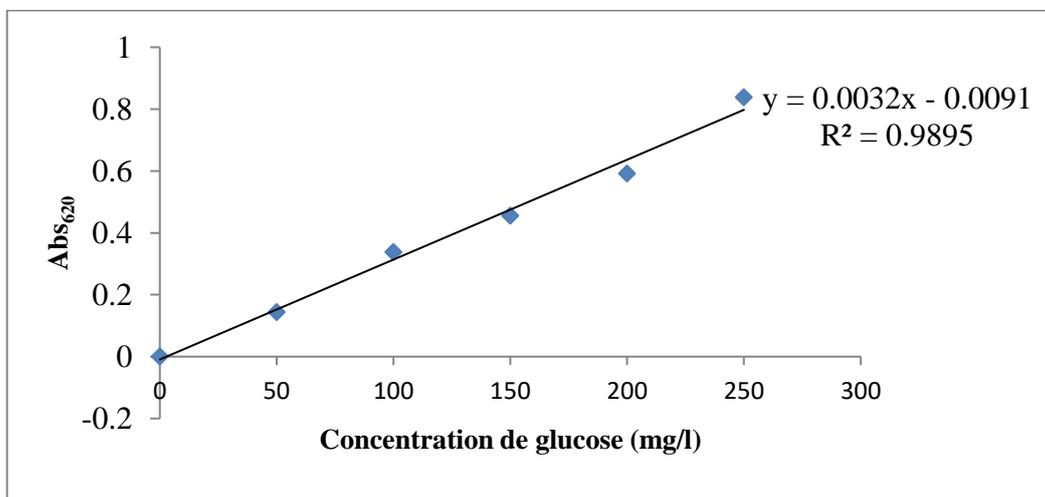


Figure 2 : Courbe étalon pour dosage de Glucose par Anthrone

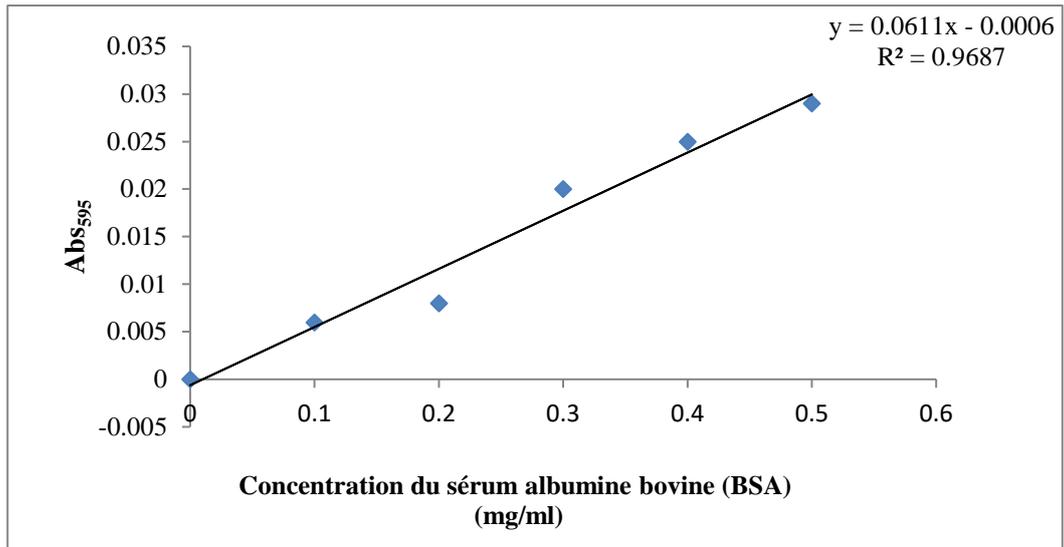


Figure 3 : Courbe étalon pour le dosage des protéines

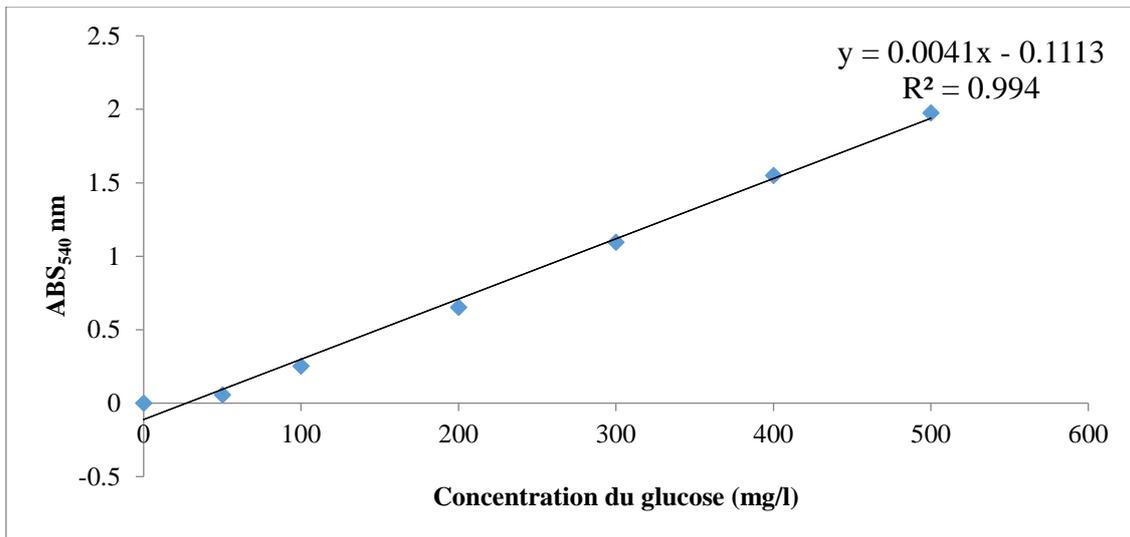


Figure 4 : Courbe étalon glucose par DNS pour le dosage des activités cellulosiques

Annexe : 6

Retard de Viscosimètre



Annexe : 7

Tableau 1 : Grille de qualité des eaux de surface de l'ABHCSM de Constantine et l'ANBT d'Algérie

Altération Minéralisation					
Paramètre	Unité	Excellente	Bonne	Passable	Mauvaise
Conductivité électrique	µS/cm	≥180 et ≤400	>400 et ≤2500	<180 ou >2500 et ≤4000	>4000
Chlorures	mg/l	25	200		>200
Sulfates	mg/l	25	250		>250
Altération Matières azotées hors nitrates					
Paramètre	Unité	Excellente	Bonne	Passable	Mauvaise
Ammonium	mg/l	0,05	0,5	4	>4
Nitrites	mg/l	0,05	0,1	0,7	>0,7
Altération Nitrates					
Paramètre	Unité	Excellente	Bonne	Passable	Mauvaise
Nitrates	mg/l	25	50	100	>100
Altération Matières organiques et oxydables					
Paramètre	Unité	Excellente	Bonne	Passable	Mauvaise
Oxygène dissous	%	100	90	50	30
DBO5	mg/l	0	5	10	15
DCO	mg/l	0	20	40	50
Altération Phosphates					
Paramètre	Unité	Excellente	Bonne	Passable	Mauvaise
Phosphates	mg/l	0-0,01	0,01-0,1	0,1-<3	>3
Altération Turbidité					
Paramètre	Unité	Excellente	Bonne	Passable	Mauvaise
Turbidité	NTU	<2	35	70	>105

Annexe : 8

Analyses statistiques

1. Concentration de cellulose avant et après prétraitement alcalin.

Analyse de variance: un facteur

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
0	3	1618,33333	539,444444	4370,67901
0,1	3	2691,66667	897,222222	3533,64198
0,2	3	3513,33333	1171,11111	127211,111
0,5	3	3828,33333	1276,11111	33002,7778

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>
Entre Groupes	974461,806	3	324820,602	7,72838593	0,00949825
A l'intérieur des groupes	336236,42	8	42029,5525		
Total	1310698,23	11			

2. Comparaison des taux de carbohydrates libérés dans les cultures submergées des deux souches avec les différents prétraitements

Tests ANOVA à deux facteurs

Analyse de variance: deux facteurs avec répétition d'expérience						
RAPPORT DÉTAILLÉ	0,1	0,2	0,5	Total		
61,90625						
Nombre d'échantillons	3	3	3	9		

Somme	155,71875	312,28125	593,53125	1061,53125		
Moyenne	51,90625	104,09375	197,84375	117,947917		
Variance	23,29268906	16,59543906	66,97376406	4128,00942		
<i>126,59375</i>						
Nombre d'échantillons	3	3	3	9		
Somme	276,65625	251,34375	400,40625	928,40625		
Moyenne	92,21875	83,78125	133,46875	103,15625		
Variance	274,8549516	80,12487656	96,80100156	643,145403		
<i>Total</i>						
Nombre d'échantillons	6	6	6			
Somme	432,375	563,625	993,9375			
Moyenne	72,0625	93,9375	165,65625			
Variance	606,7883531	162,4674231	1308,752094			
ANALYSE DE VARIANCE						
<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Échantillon	984,5703125	1	984,5703125	10,5745974	0,00693247	4,75 ***
Colonnes	28763,76953	2	14381,88477	154,466003	2,7328E-09	3,89 ***
Interaction	8288,183594	2	4144,091797	44,5088601	2,81E-06	3,89 ***
A l'intérieur du groupe	1117,285444	12	93,10712031			Degré de signification
Total	39153,80888	17				

3. Effet de la température sur l'activité endoglucanase d'*A.iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43

Analyse de la variance (ANOVA) un facteur d'*A.iranicus* isolat MS-34

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance			
40°C	4	173,94	43,48	0,034			
50°C	4	209,68	52,42	40,633			
60°C	4	209,86	52,46	101,92			
70°C	4	142,89	35,72	31,78			
80°C	4	131,82	32,95	23,31			
ANALYSE DE VARIANCE							
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F	Degré de Signification
Entre Groupes	1326,29	4	331,573	8,39	0,0009	3,06	***
A l'intérieur des groupes	593,07	15	39,538				
Total	1919,36	19					

Analyse de la variance (ANOVA) un facteur *T. verruculosus* isolat MS-43

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance			
40°C	4	77,73	19,43	0,54			
50°C	4	78,27	19,57	0,85			
60°C	4	103,00	25,75	1,06			
70°C	4	87,11	21,78	3,67			
80°C	4	81,34	20,33	0,44			
ANALYSE DE VARIANCE							
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F	Degré de signification
Entre Groupes	109,71	4	27,43	20,88	5,44E-06	3,06	***
A l'intérieur des groupes	19,70	15	1,31				
Total	129,41	19					

4. Effet de la température sur l'activité papier filtre d' *A. iranicus* isolat MS-34 et *T. verruculosus* isolat MS-43

Analyse de la variance (ANOVA) un facteur d'*A.iranicus* isolat MS-34

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Varianc e			
40°C	4	51,935	12,98	0,069			
50°C	4	100,27	25,06	63,85			
60°C	4	39,66	9,91	1,88			
70°C	4	36,85	9,21	1,40			
80°C	4	29,47	7,36	3,25			
ANALYSE DE VARIANCE							
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilit é	Valeur critique pour F	Degrée de signification
Entre Groupes	804,610	4	201,15	14,27	5,34E-05	3,055	***
A l'intérieur des groupes	211,424	15	14,09				
Total	1016,03	19					

Analyse de la variance (ANOVA) un facteur *T. verrucosus* isolat MS-43

Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance			
40°C	4	28,94	7,23	0,01			
50°C	4	31,64	7,91	0,39			
60°C	4	34,80	8,70	0,00			
70°C	4	30,56	7,64	0,27			
80°C	4	27,49	6,87	1,06			
ANALYSE DE VARIANCE							
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilit é	Valeur critique pour F	Degrée de signification
Entre Groupes	7,786	4,000	1,946	5,608	0,006	3,056	ns
A l'intérieur des groupes	5,206	15,000	0,347				
Total	12,992	19,000					

Annexe 9

1. Résultats de l'Hydrolyse de la palme sèche par les souches *A. iranicus* isolat MS-34 et *T.verruculosus* isolat MS-43

1. A Hydrolyse de la palme (temoin) par les souches *A. iranicus* isolat MS-34 avec le

Jours	Moyenne d'absorbance	Moyenne des concentrations (mg/l)	Ecarte-type	Moyène pH	Ecarte-type
0	0,039	15,03	3,03	5,51	0,57
1	0,133	44,40	8,35	5,75	0,72
2	0,099	33,78	4,74	6,06	0,70
3	0,041	15,65	2,32	6,13	0,79
4	0,05	18,46	3,76	6,31	0,85
5	0,024	10,34	1,45	6,38	0,81
6	0,189	61,90	6,69	6,45	0,78
7	0,045	16,90	1,8	6,46	0,70
8	0,012	6,59	0,82	6,48	0,66
9	0,03	12,21	1,188	6,51	0,70
10	0,0012	3,21	0,13	6,55	0,60

1. C Hydrolyse de la palme traitée avec 10% KOH par les souches *A. iranicus* isolat MS-34

Jours	Moyenne d'absorbance	Moyenne des concentrations (mg/l)	Ecarte-type	Moyenne pH	Ecarte-type
0	0,001	2,84	0,85	6,18	0,37
1	0,092	31,59	6,48	6,57	0,54
2	0,081	28,15	4,49	6,57	0,42
3	0,071	25,03	4,26	6,69	0,62
4	0,002	3,46	0,66	6,70	0,49
5	0,124	41,59	2,71	7,25	0,08
6	0,157	51,90	4,82	6,8	0,50
7	0,056	20,34	1,30	6,78	0,53
8	0,014	7,21	2,23	6,81	0,63
9	0,062	22,21	2,45	6,64	0,57
10	0,208	67,84	2,59	6,61	0,55

1. E Hydrolyse de la palme traitée avec 20% KOH par les souches *A. iranicus* isolat MS-34

Jours	Moyenne d'absorbance	Moyenne des concentrations (mg/l)	Ecarte-type	Moyenne pH	Ecarte-type
0	0,006	4,71875	1,87	6,58	0,18
1	0,075	26,28125	1,98	7,23	0,58

2	0,164	54,09375	5,54	6,87	0,02
3	0,234	75,96875	12,74	6,63	0,22
4	0,303	97,53125	9,40	6,59	0,30
5	0,213	69,40625	11,74	6,79	0,07
6	0,226	73,46875	3,26	6,80	0,26
7	0,324	104,09375	4,07	6,76	0,28
8	0,285	91,90625	8,12	6,79	0,25
9	0,233	75,65625	13,3	6,94	0,19
10	0,307	98,78125	9,001	7,13	0,17

1. G Hydrolyse de la palme traitée avec 50% KOH par les souches *A. iranicus* isolat MS-34

Jours	Moyenne d'absorbance	Moyenne des concentrations (mg/l)	Ecarte-type	Moyenne pH	Ecarte-type
0	0,014	7,21	2,49	7,28	0,05
1	0,102	34,71	5,62	7,39	0,06
2	0,436	139,09	27,44	6,96	0,31
3	0,152	50,34	5,67	7,01	0,04
4	0,295	95,031	7,48	6,91	0,29
5	0,33	105,96	13,18	6,73	0,19
6	0,345	110,65	12,06	7,18	0,04
7	0,336	107,84	12,78	7,12	0,07
8	0,624	197,84	8,18	7,19	0,01
9	0,478	152,21	9,87	7,30	0,01
10	0,383	122,53	9,74	7,37	0,03

2. Dosage des protéines dans les milieux d'hydrolyse avec la palme sèche

2. A avec la souche *A. iranicus* isolat MS-34 :

Lecture	L1	L2	L3	P-KOH _{0%}	P-KOH _{0%}	P-KOH _{0%}	
Jours	temoin	temoin	temoin	L1 mg/ml	L2 mg/ml	L3 mg/ml	Ecarte type
5eme jour	0,163	0,141	0,152	2,67	2,31	2,49	0,18
7eme jour	0,241	0,241	0,241	3,95	3,95	3,95	0
10eme jour	0,205	0,157	0,181	3,36	2,57	2,97	0,39
	L1	L2	L3	P-KOH _{10%}	P-KOH _{10%}	P-KOH _{10%}	
	10%	10%	10%	L1 mg/ml	L2 mg/ml	L3 mg/ml	Ecarte-type
5ème jour	0,151	0,104	0,1275	2,48	1,71	2,09	0,38

Annexes

7ème jour	0,184	0,173	0,1785	3,02	2,84	2,9	0,09
10ème jour	0,175	0,135	0,155	2,87	2,21	2,54	0,32
	L1	L2	L3	P-KOH _{20%}	P-KOH _{20%}	P-KOH _{20%}	
	20%	20%	20%	L1 mg/ml	L2 mg/ml	L3 mg/ml	Ecarte-Type
5eme jour	0,445	0,309	0,377	7,29	5,06	6,18	1,11
7eme jour	0,36	0,244	0,302	5,90	4,003	4,95	0,94
10eme jour	0,28	0,254	0,267	4,59	4,166	4,37	0,21
	L1	L2	L3	P-KOH _{50%}	P-KOH _{50%}	P-KOH _{50%}	
	50%	50%	50%	L1 mg/ml	L2 mg/ml	L3 mg/ml	Ecarte-Type
5eme jour	0,202	0,403	0,3025	3,31	6,60	4,96	1,64
7eme jour	0,409	0,215	0,312	6,70	3,52	5,11	1,58
10eme jour	0,26	0,211	0,2355	4,26	3,46	3,86	0,40

Annexe :10

Production scientifique

Lien de l'article : https://www.researchgate.net/profile/Souad-Makhloufi/publication/370562051_Isolation_of_a_new_Aspergillus_iranicus_strain_from_the_soil_of_southwestern_Algeria_exhibiting_potential_palm_date-cellulose_degrading_activity/links/64668b5766b4cb4f73bcb11a/Isolation-of-a-new-Aspergillus-iranicus-strain-from-the-soil-of-southwestern-Algeria-exhibiting-potential-palm-date-cellulose-degrading-activity.pdf

South Asian J Exp Biol; 13 (2): 80-91; 2023 [DOI: 10.38150/sajeb.13(2).p80-91]




**South Asian Journal
of Experimental Biology**

ISSN: 2280-9799 Vol. 13, Issue 2 Page 80-91 http://www.sajeb.org

REGULAR ARTICLE

Isolation of a new *Aspergillus iranicus* strain from the soil of southwestern Algeria exhibiting potential palm date-cellulose degrading activity

Souad Makhloufi^{1,2,3}, Ahmed Makhloufi¹, Yahia Chebloune⁴

¹Laboratory of valorization of vegetal Resource and Food Security in Semi-Arid Areas, South West of Algeria, BP 417, Tahri Mohamed University, Bechar, Algeria
²Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Earth and Universe Science, University of Tlemcen B.P 119, 13000, Tlemcen, Algérie
³Centre for Scientific and Technical Research on Arid Regions (CRSTRA), University campus Mohamed Kheider, BP 1582R.P Biskra 07000 Algeria
⁴INRAE/UGA USC 1450, Pathogenesis and Lentivirus Vaccination Laboratory, PAVAL Lab., Grenoble Alpes University, 38041, Grenoble Cedex 9, France

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article History: Received: 5 Dec 2022 Revised: 15 Feb 2023 Accepted: 19 Feb 2023</p> <p>*Corresponding Author: Email: makhloufi.souad1012@gmail.com Telephone: +213 7 73 32 59 65</p> <p>Keywords: biotechnology, Date palm, palms, <i>Aspergillus iranicus</i>, fermentation, cellulase</p>	<p>Microorganisms with biotechnological properties are needed for transformation or degradation of biological products. Here we isolated a new <i>Aspergillus</i> strain (MS-34) from the soil of southwestern Algeria and found that it is related to <i>Aspergillus iranicus</i>. The MS-34 was examined for possible biotechnological properties and we found it to be highly efficacious at degrading palm date cellulose following fermentation. Pretreatment fermentation of palm in 50 % generated the highest (197.84 mg/l) carbohydrate concentration. Pretreatment with 20% KOH produced a maximum 112.97 IU/ml and 47.62 IU/ml for endoglucanase and exoglucanase activities respectively. Besides, glucose and proteins concentration in batch fermentations with 1% CMC medium fluctuated between 86.41 mg/l to 108.85 mg/l and the protein level was 0.713- 0.991 mg/ml. There were significant temperature and pH effects on the enzymatic activity and the optimal temperature conditions were found to be 50-60°C and pH 4.0. Since palm dates are one of the massive agricultural products of the Southeastern and Southwestern Algeria, use of this strain for transformation of palm tree waste will be an advanced biotechnology tool that will contribute to significantly reduce pollution linked to waste incineration. In addition, resulting fermentation products may be used as sources of energy.</p>

1. Introduction

Agriculture is one of the largest organic sectors with the highest biomass production, it has become a major resource to reduce poverty and

contribute to improving the standard of living and agro-industry value chain of world's population and countries (FAO, 2022). In consequence, the agricultural production statistics recorded a global primary crops production of 9.3 billion tonnes in

Les attestations de participations aux conférences



Le biocontrôle de quelques espèces de genre *aspergillus* de la flore d'altération du blé tendre par l'utilisation des bactéries lactiques

Makhloufi S., Moussaoui A., Djaboub S.

makhloufi.souad1012@gmail.com

Department of Biology, Faculty of Science and Technologie, Tahri Mohamed University, Bechar, 08000 Algérie.

Le blé tendre est une céréale de grande importance dans notre aliment, toutefois cette céréale est souvent exposée aux contaminations fongiques et leurs toxines. La présence des espèces d'*aspergillus* productrices de mycotoxine dans le blé, comme *A. flavus* et *A. parasiticus*, influence non seulement la qualité de blé, mais engendrer des conséquences non négligeables sur la santé de consommateur. Le biocontrôle de ces germes par l'utilisation des bactéries lactiques isolées à partir de cinq échantillons de blé tendre, constitue l'objectif de notre recherche.

Une analyse physico-chimique des échantillons du blé a été effectuée. Ensuite un isolement des souches fongiques par méthode de dilution, suivi par une identification du genre et de l'espèce a été réalisé. Dans l'isolement des souches lactiques, nous avons utilisé la technique d'enrichissement. L'activité antifongique des souches lactiques a été étudiée en deux étapes avec deux tests, un qualitatif et l'autre quantitatif. Les résultats d'antagonismes montrent que 25% des souches lactiques isolées ont une activité antifongique, avec des pourcentages maximaux de 46,66% en présence d'une souche d'*A. flavus* et 62,83 % enregistré avec une souche d'*A. parasiticus*. L'identification de la souche la plus performante montre que c'est une souche lactique d'*Enterococcus faecium*.

Mots clés : Biocontrôle, *Aspergillus*, bactéries lactique, blé tendre, activité antifongique.



Tahri Mohamed University of Bechar - Algeria
Faculty of Naturel and Life Sciences



3rd International
Seminar on Biology
Bioressources & Food Safety

CERTIFICATE

OF ATTENDANCE

THIS CERTIFICATE IS PRESENTED TO

Makhloufi Souad



This certificate is awarded for participation at
The Third International Seminar on Biology (3rd.SIB)
- Bioressources & Food Safety -
16 - 19 Nov 2019 - Grouz Hotel - Bechar. ALGERIA.



Dr. BENLARBI Larbi
President of SIB3





3rd International Seminar on Biology
Bioresources & food safety 3SIB
Béchar - Algeria, November 16-19, 2019

ISOLEMENT ET MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DE QUELQUES SOUCHES FONGIQUES ISSUES DE PALMIER DATTIER

Makhloufi Souad¹, Makhloufi Ahmed²,

1,2 Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université Mohamed Tahnouk BP 17 08000
Bechar Algerie.

makhloufi.souad1012@gmail.com



Résumé : Ce travail consiste à isoler des souches fongiques à partir des palmiers dattiers, qui sont capable de produire l'enzyme cellulase. Cette dernière a une importance majeure dans la bioconversion des déchets agricoles en une biomasse conséquente. Les 41 souches fongiques isolées à partir des rachis et folioles ont répondu positivement au test de papier filtre sauf la souche *Alternaria alternata*. Ainsi la culture en milieu solide à base de cellulose montre que les souches *A. niger*, *A. terreus* et *Aspergillus.sp* ont une croissance très significative de 27% à 33,3% comparativement au reste des souches isolées. Avec une biomasse qui varie entre 402 mg et 664 mg. La production maximale est obtenue par *A. niger* isolée du pétiole. Ces isolats fongiques ont une grande importance dans la production des fioles et dans la transformation des déchets organique.

Mots clés : Isolement, fongique, activité cellulolytique, palmier dattier



Réserves de
BIOSPHERE



Parc National de Tlemcen



Laboratoire de Biodiversité Végétale
Conservation & Valorisation



Association la terre verte



Association Nationale Algérienne
d'Ornithologie



Laboratoire Ecologie et Gestion des
Ecosystèmes Naturels



Centre de Recherche Scientifique
et Technique sur les Régions
Arides (CRSTRA)

شهادة مشاركة

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Attribuée à : Makhloufi Souad,

Co-auteurs : Makhloufi Ahmed

Centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides- station Naama

Pour leur participation au 1er Séminaire National en ligne (Webinaire) sur les Zones Humides en Algérie organisé à Tlemcen, le 02 Février 2021, avec une communication orale intitulée :

Recherche de nouvelles souches fongiques à activité cellulolytique issu

d'un milieu aquatique de la wilaya de Bechar.

رئيس الملتقى

Président du Colloque

TIEMCEN Le 02 Février 2021

Dr. BENARADJ Abdskrim

رئيس اللجنة العلمية

Président du comité
scientifique

Pr. CHERIFI K.

UDL - Sidi Bel Abbas

ممثل مراكز البحث

Représentant du CRSTRA

Directeur de la Station

Expérimentale Du Milieu Biophysique

CRSTRA - NAAMA

