

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Ahmed Draïa Adrar**



**Faculté des Sciences et de la Technologie**  
**Département Science de la Nature et de la Vie**

**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en :**  
**Filière : Sciences Agronomique**  
**Spécialité : Systèmes de Production Agro-écologique**

**Thème :**

---

**Etude de l'activité enzymatique des souches de levures et leur pouvoir de dégradation  
des poudres de palm de dates**

---

**Préparé par :**

**Mr. Doublal Hichem**

**Mr. Kouki abdelmadjid**

**Membres de jury d'évaluation :**

<b>Mr. Nani abdelhafid</b>	<b>Président</b>	<b>MAA</b>	<b>Univ. Adrar</b>
<b>Mr. ABEKHTI Abdelkader</b>	<b>Encadreur</b>	<b>MCA</b>	<b>Univ. Adrar</b>
<b>Mr. Bouslah yahia</b>	<b>Examineur</b>	<b>MCA</b>	<b>Univ. Adrar</b>

**Année Universitaire : 2020/2021**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République algérienne populaire et démocratique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE AHMED DRAYA - ADRAR

BIBLIOTHÈQUE CENTRALE

Service de recherche bibliographique

N°.....B.C/S.R.B//U.A/2021



جامعة احمد دراية - ادرار

المكتبة المركزية

مصلحة البحث البيولوجي

الرقم.....م.م/م.ب.ب.ب/اج.أ/2021

## شهادة الترخيص بالإيداع

أبحاث عبد القادر

انا الأستاذ(ة):

المشرف على مذكرة الماستر.

الموسومة ب: Etude de l'activité enzymatique des souches de levure et leur pouvoir de dégradation des poudres de palm de dattes

من إنجاز الطالب(ة): د. ويلال هشار

و الطالب(ة): كوكي عبد المجيد

كلية: العلوم والتكنولوجيا

القسم: علوم الطبيعة والحياة

التخصص: أنظمة الإنتاج النباتي البيئي

تاريخ تقييم / مناقشة:

أشهد ان الطلبة قد قاموا بالتعديلات والتصحيحات المطلوبة من طرف لجنة التقييم، وان المطابقة بين النسخة الورقية الإلكترونية استوفت جميع شروطها. بإمكانهم إيداع النسخ الورقية (02) والالكترونية (PDF).

- امضاء المشرف



زفني كبر القادر

## Remerciements

Avant tout, on remercie notre créateur *AllAH* le tout puissant qui nous a donné la sagesse et la santé et la volonté pour réaliser ce travail et arriver à ce stade scientifique.

On adresse nos sincères remerciements et notre profonde reconnaissance à

**Mr : ABKHTI Abdelkader** qui nous fait l'honneur d'assurer la direction de ce travail pour sa patience et sa gentillesse, qui nous a fait profiter de ses connaissances, On le remercie de nous avoir guidés pendant tout le long de la réalisation de notre mémoire.

Nos remerciements s'adressent à tous les enseignants de notre département de science et vie et plus particulièrement les enseignants de notre spécialité :System de production agro-écologique.

Nos remerciements vont également à tous les membres du jury Nani abdlhafide et Bouslah yahia , pour avoir accepté d'en faire partie et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce mémoire.

A nos collègues et tous les amis pour leurs soutiens moraux.

On remercie aussi tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

On dernier, nos vif remerciement à toute personne qui nous soutenue durant ce long parcours.

## **Dédicace**

Dédicaces Je dédie se modeste travail : À mes chères parents ahmed et saida .. mes chers frères qui ont toujours été derrière moi et mes besoins. À mes chères collègues surtout manel pour leur gentillesse et leur encouragement. À tous les membres de ma famille. A mon benome et frère madjid

Doublal Hichem

## Dédicace

À l'esprit de mon défunt père **AHMED**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

À ma très chère mère **WARDA**

La source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

À mon cher grand père maternel.

À ma chère grand-mère maternelle.

À ma chère grand-mère paternelle.

À la mémoire de mon grand père paternel.

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite.

Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour à mes chères sœurs : **Assia** et leur **enfant** et ma chère sœur **Zouleykha** et mon cher frère **Mohamed Amrane**.

À toute ma famille pour leur soutien tout le long de mon parcours.

À mon frère et ami et collègue **DOUBLAL Hichem** que je souhaite tous le bonheur a son chemin, sûrement à tout sa familles de plus grande aux plus petits.

À tous mes amis et collègues tout et tous en générale.

**Abdelmadjid**

## Liste des figures :

Numéro de figure	Titre de figure	Page de figure
Figure 1-1	montran la localisation des endophytes fongiques dans les racines des plantes ((a :Sporobolus pungens, b: Lygeum spartum,c :Sarcocornia fruticosa, d :L. spartum).Macia Vicente et al., 2008a).	3
Figure1-2	montre des Micrographes du microscope électronique à balayage des interactions entre trois endophytes fongiques et différent champignons pathogènes d'origine tellerique in vitro.	5
Figure1-3	Hydrolyse chimique	16
Figure 1-4	Hydrolyse enzymatique	17

### Liste des tableaux :

Numéro de tableau	Titre de tableau	Page de tableau
Tableau 1	Rôle d'inhibition de certains endopytes selon Cao et al (2009)	4
Tableau 2	La flore endogène des dattes (Al. Shaickly et al., 1986)	14
Tableau 3	Marielle et appareils utilisés dans station de production enzymatique à l'échelle semi-pilot	25

## Liste des abréviations

**AIA** : Acide Indole Acétique

**HCN**: Hydro cyanidric acid

**ISR** : Résistance systémique induite

**NaCl** : Chlorure de Sodium

**nm**: nanomètre

**PGPR**: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**PH** : Potentiel Hydrogène

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism

**P** : *phosphore*

**HCN** : Acide cyanhydrique

**Fig.** : Figure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : l'eau oxygénée



# Sommario

## Sommaire

<b>1. Introduction</b> .....	1
<b>Partie théorique</b> .....	1
<b>1-1 Valorisation microbienne de la biomasse agricole (palmier dattier) :</b> .....	3
<b>1-2 La microflore endophyte :</b> .....	3
<b>1-3 Role physiologique :</b> .....	5
<b>2 - Mode de pénétration de la flore endophyte :</b> .....	7
<b>2-1 Isolement des champignons endophytes</b> .....	7
<b>2-2 Évaluation de la capacité à promouvoir la croissance :</b> .....	7
<b>3- Diversité et activité enzymatique de la microflore endophyte fongique :</b> .....	8
<b>3-1 Microflore endophyte du palmier :</b> .....	8
<b>3-2 Microflore endophyte des autres plantes</b> .....	11
.....	11
<b>4-1 La microflore phylloplane :</b> .....	12
<b>4-2 L'importance d l'utilisation de phylloplane :</b> .....	12
<b>5 . Diversité de la flore microbienne des produits d'origine agricole</b> .....	13
<b>5-1 Fruits :</b> .....	13
<b>5-2 Identification des endophytes fongiques des racines :</b> .....	14
<b>6 - Dégradation hydrolytique :</b> .....	15
<b>6-1 HYDROLYSE CHIMIQUE :</b> .....	15
<b>6--2 Hydrolyse enzymatique :</b> .....	15
<b>7- L'activité protéolytique :</b> .....	16
<b>8- Technique d'étude l'activité enzymatique :</b> .....	16
<b>9 - Isolement des endophytes fongiques à partir des racines du palmier dattier</b> .....	17
<b>10- La biomasse du palmier dattier :</b> .....	18
<b>10-1 Complexifié du composé ligoncellulosique :</b> .....	18
<b>10-2 Lignine:</b> .....	18
<b>11- Enzymes hydrolytiques (cellulolytiques/xylanolytiques)</b> .....	19
<b>11-1 Le commerce des enzymse hydrolytique</b> .....	20
<b>Partie pratique</b> .....	1
<b>1 - Domaine d'application d'enzymes hydrolytiques</b> .....	22
<b>1-2 Dans les industries de l'alimentation de bétail</b> .....	22
<b>1-3 Acidophiles</b> .....	22

<b>1-4 Alkaliphiles</b> .....	23
<b>2- Champignons endophytes en agriculture</b> .....	23
<b>3- Mise en place d'une station de production enzymatique :</b> .....	23
<b>3-1 technique de production d'enzymes :</b> .....	23
<b>4- Matière et appareils utilisés dans station de production enzymatique à l'échelle semi-pilot</b> .....	24
<b>4-1 Exemple 1:</b> .....	24
<b>4-2 Les objectifs :</b> .....	24
<b>4-3 Exemple 2 : Estimation de l'activité de la cellulase par la méthode DNS</b> .....	25
<b>5 - Techniques d'isolement des champignons endophytes</b> .....	25
<b>6- Mode d'identification des endophytes fongiques des racines :</b> .....	25
<b>7- Détermination de l'activité enzymatique :</b> .....	26
<b>7-1 Protocol 01 :</b> .....	26
<b>7-2 Protocole 02</b> .....	26
<b>7-3 Protocole 03</b> .....	26
<b>Conclusion :</b> .....	29
<b>Les references</b> .....	31

## Résumé

La biomasse lignocellulosique représente l'une des ressources renouvelables les plus abondantes de la planète, et bien sûr la moins chère. Notre travail présente les connaissances sur les enzymes d'origines microbienne et naturelles utilisées dans la valorisation de la biomasse agricole par bioconversion et transformation.

Nous avons visé en premier ordre les cellulases et les pectinases et les domaines de leur application, leur importance économique ainsi que les recherches actuelles faites sur ces substances d'origines microbiennes. Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne, leurs méthodes d'obtention diffèrent selon leur source. Leur production nécessite la préparation de milieux à moindre coût, car le coût estimé des milieux de croissance connus représente entre 30 à 40% du coût de la production industrielle d'enzymes.

## **Abstract**

Lignocellulose biomass represents one of the most abundant renewable resources on the planet, and of course the cheapest. Our work presents knowledge on enzymes of microbial and natural origin used in the valorization of agricultural biomass by bioconversion and transformation.

We focused primarily on cellulose and hemicellulose and their areas of application, their economic importance as well as current research on these substances of microbial origin.

Industrial enzymes come from plant, animal or microbial sources, their methods of obtaining differ according to their source. Their production requires the preparation of media at lower cost, since the estimated cost of known growth media represents between 30 to 40% of the cost of industrial production of enzymes.

**Introduction**

**générale**

## 1- Introduction

la biomasse agricole est principalement d'origine lignocellulosique, elle est une des ressources inépuisables existantes dans la nature. Elle contient la lignine, le cellulose et l'hémicellulose. Actuellement cette biomasse est principalement valorisée sous forme de biocarburant comme : le biogaz et le bioéthanol. Ceci est devenu une nécessité dans un contexte actuel d'augmentation du prix de pétrole et les infractions industrielles des émissions massives de gaz à effet de serre. Ce constat justifie la nécessité de trouver des matières premières alternatives pour remplacer les carburants d'origine fossile pollués et dévastateurs d'énergie.

Dans les régions phonécicoles Les palmiers dattiers génèrent annuellement d'énorme quantité de biomasse sans une valorisation rentable. Dans le sud algérien Les palmes sèches

Presque 135 103 tonnes de palmes sèches sont produit annuellement, avec d'autres quantité appréciable de pédicelles de dattes (5 103 tonnes de pédicelles / an). Ces deux catégories de biomasse du palmier dattier représente la quasi-totalité de la biomasse d'origine phonécicole et constitue une voie de valorisation prometteuse. Malheureusement leur composition lignocellulosique hétérogène et complexe peut constituer un problème pour leur transformation en produits valorisables. Les difficultés liées à la valorisation de cette biomasse résident principalement dans sa nature récalcitrante et la complexité leur polysaccharide ce qui empêche leur hydrolyse complète. La partie polysaccharidique de la biomasse est constituée de la cellulose (polysaccharide linéaire de glucose), les hémicelluloses (polysaccharides branchés de sucres à 5 et 6 atomes de carbone) et la lignine (un polymère complexe aromatique). Chaque composé est plus au moins représenté dans la biomasse. Néanmoins, en moyenne, la biomasse lignocellulosique contient 40-60 % de cellulose, 20-40 % d'hémicelluloses et 10-25 % de lignine (...). Selon plusieurs auteurs, la biomasse du palmier-dattier est entièrement biodégradable. Par conséquent, il est possible de la valoriser par action microbienne. En outre, elle ne contiennent donc aucun élément toxique, ce qui les rend respectueux de l'environnement et relativement sûrs pour la santé humaine pendant leur traitement et leur cycle de vie. sur pour la santé humaine pendant la transformation et le cycle de vie. (Paul et al, 2015).

**Partie**

**théorique**



### **Partie théorique**

#### **1-1 Valorisation microbienne de la biomasse agricole (palmier dattier) :**

Dans cette partie nous allons aborder les différentes stratégies mettant en œuvre les microorganismes en tant qu'acteurs candidats et possibles transformateurs de la biomasse dattier.

Il est donc fondamental en premier abord de déterminer les microorganismes responsables de la production des enzymes lignocellulosiques qui ont le pouvoir de fractionner la biomasse lignocellulosique en des molécules moins complexes et jouissant d'une valeur commerciale.

Il y a deux types de microflore associées aux palmiers dattiers : l'endophyte et le phylloplane : Nous allons passer en revue les travaux réalisés dans ce sens et relever l'éventuelle activité lignocellulosique de la microflore concernée.

#### **1-2 La microflore endophyte :**

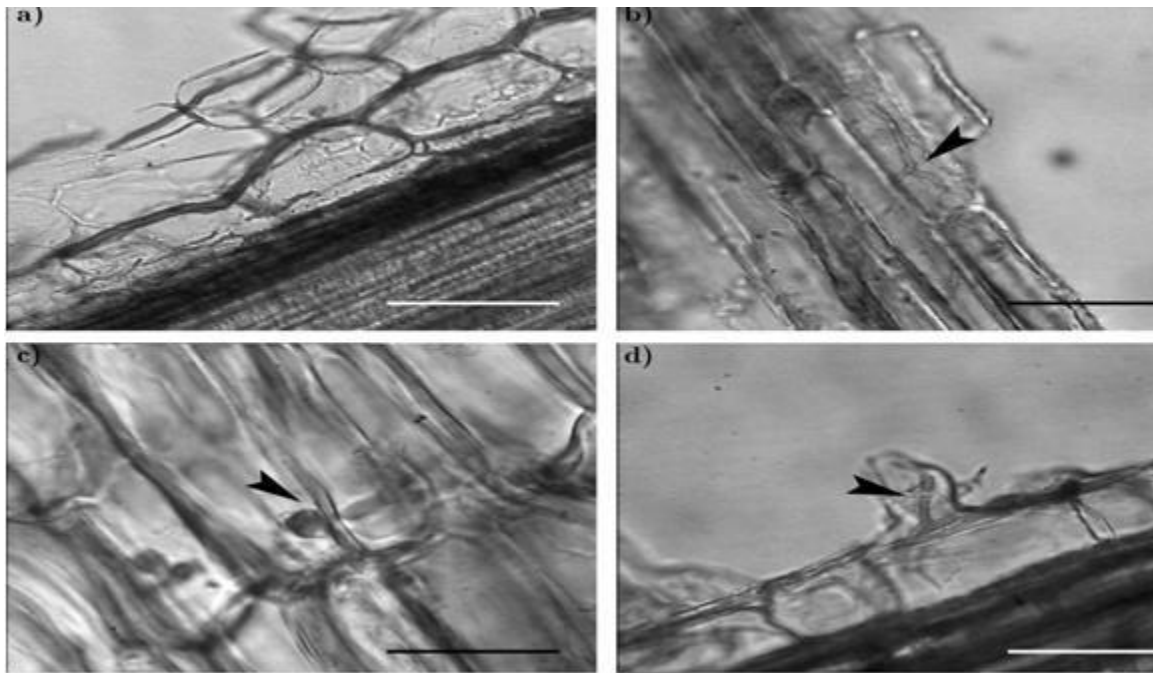
Les endophytes se sont le groupe des microorganismes qui colonisent communément les tissus des plantes (racinaires et aussi aériens). Le mode d'introduction des endophytes change selon les espèces, les tissus et les organes aussi. (Mohammed Mahmoud et al., 2017, Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006). Souvent cette colonisation ressemble à la formation des biofilms et des fois nombreux groupes microbiens divers (bactéries et champignons) occupent les interfaces intercellulaires des tissus vasculaires ou même l'intérieur des cellules (Kusari et Spiteller, 2012). Les conditions du milieu cellulaire interne équilibrées procurent aux endophytes un grand potentiel métabolique (He et al., 2009). Ce potentiel pourrait par la suite être exploité par la sélection des souches douées d'activités lytiques intéressantes pour convertir la biomasse lignocellulosique.

Les endophytes fongiques

Une partie de la microflore associée au palmier dattier assure une protection contre les facteurs de stress biotique et abiotique et peuvent promouvoir la croissance de la plante.

Dans ce sens, il y a un intérêt tout particulier pour les champignons endophytes associés aux racines et qui jouent un rôle d'agents protecteurs contre les ravageurs microbiens ([réf.](#)). Cette microflore pénètre les racines en produisant les enzymes nécessaires.

La figure suivante montre quelques colonies microbiennes (fongiques) infestant des tissus cellulaires racinaires.



**Figure 1: montrant la localisation des endophytes fongiques dans les racines des plantes ((a :*Sporobolus pungens*, b *Lygeum spartum*, c :*Sarcocornia fruticosa*, d :*L. spartum*). Macia Vicente et al., 2008a).**

A: Croissance intercellulaire du champignon endophyte dans les cellules épidermiques de *Sporobolus pungens*.

B: Colonisation intracellulaire d'une cellule épidermique de racines de *Lygeum spartum*.

C: Croissance intracellulaire du champignon endophyte avec gonflement de type appressorium (tête de flèche) pendant la pénétration de la paroi cellulaire dans le cortex de *Sarcocornia fruticosa*.

D: Colonisation hyphale d'une racine de *L. spartum*.

Les endophytes fongiques ont suscité un intérêt grandissant dernièrement vu leur activité métabolique d'importance sur le plan biotechnologique ainsi différentes applications ont été mis en place pour les exploiter convenablement. Les études ont montré l'aptitude de cette microflore à produire une grande variété des composés utiles en l'occurrence une large activité enzymatique impliquant un pouvoir de cellulase, chitinase et de la lipase. Les souches de *Trichoderma*, *Beauveria*, *Lecanicillium* et *Metarhizium* sont les plus étudiées de part leur contribution à la lutte contre les phytopathogènes. (Fang et al., 2005 ; 2012). La stratégie de sélection de ces souches performantes comprend la recherche des endophytes dans les plantes cultivées dans des conditions difficiles (déshydratés, salins, et contaminés, etc.)

Ces plantes connues par leur pouvoir adaptatif seraient appropriées pour les applications de très bonne rentabilité économique (Farrar et al., 2014).

### 1-3 Role physiologique :

En plus de leur pouvoir de pénétration invasif contrôlé par leur pouvoir enzymatique, les endophytes assurent une association bénéfique avec les plantes. Les endophytes sont aussi impliqués par des mécanismes directs et/ou indirects dans la stimulation de la physiologie et de la croissance végétale et aussi leur protection contre les ravageurs de plantes.

Un rôle physiologique capitale est représenté par la solubilisation des minéraux, la fixation de l'azote moléculaire, et la stimulation de la sécrétion des facteurs de croissance végétale à l'instar des auxines, les gibbérellines, les cytokinines et l'éthylène (Ahmad et al., 2008). D'autres mécanismes liés à la production de sidérophores et des enzymes de lyse cellulaire ont été aussi identifiés chez ces plantes (Farrar et al., 2014).

**Tableau : Role d'inhibition de certains endophytes selon Cao et al (2009)**

**Table 1** Inhibition of mycelial growth of phytopathogenic fungi by three endophytic fungi isolated from reed

Soilborne phytopathogenic fungi	Inhibition of mycelial growth <sup>a</sup> (%)		
	<i>Choiromyces aboriginum</i>	<i>Stachybotrys elegans</i>	<i>Cylindrocarpon</i> sp.
<i>Fusarium graminearum</i>	72.6 ± 1.3	83.7 ± 0.6	50.4 ± 1.3
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>perniciosum</i>	68.2 ± 1.3	72.6 ± 5.6	61.9 ± 0.6
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	68.9 ± 3.9	71.1 ± 1.9	72.6 ± 2.1
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	68.9 ± 2.9	77.0 ± 1.3	72.6 ± 2.6
<i>Pythium aphanidermatum</i>	40.7 ± 3.4	51.5 ± 0.6	78.5 ± 1.3
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	55.6 ± 3.9	81.1 ± 2.9	93.3 ± 2.2
<i>Rhizoctonia solani</i>	100.0 ± 0	71.5 ± 1.7	93.3 ± 2.2
<i>Sclerotium rolfsii</i>	58.5 ± 1.3	40.1 ± 2.5	30.2 ± 0.9

Note: <sup>a</sup> Mean of three replicates; Count inhibition when the time reaching the margin of the dish in Control II<sup>+</sup>. Inhibition (%) =  $(R_0' - R_0) / R_0' \times 100$

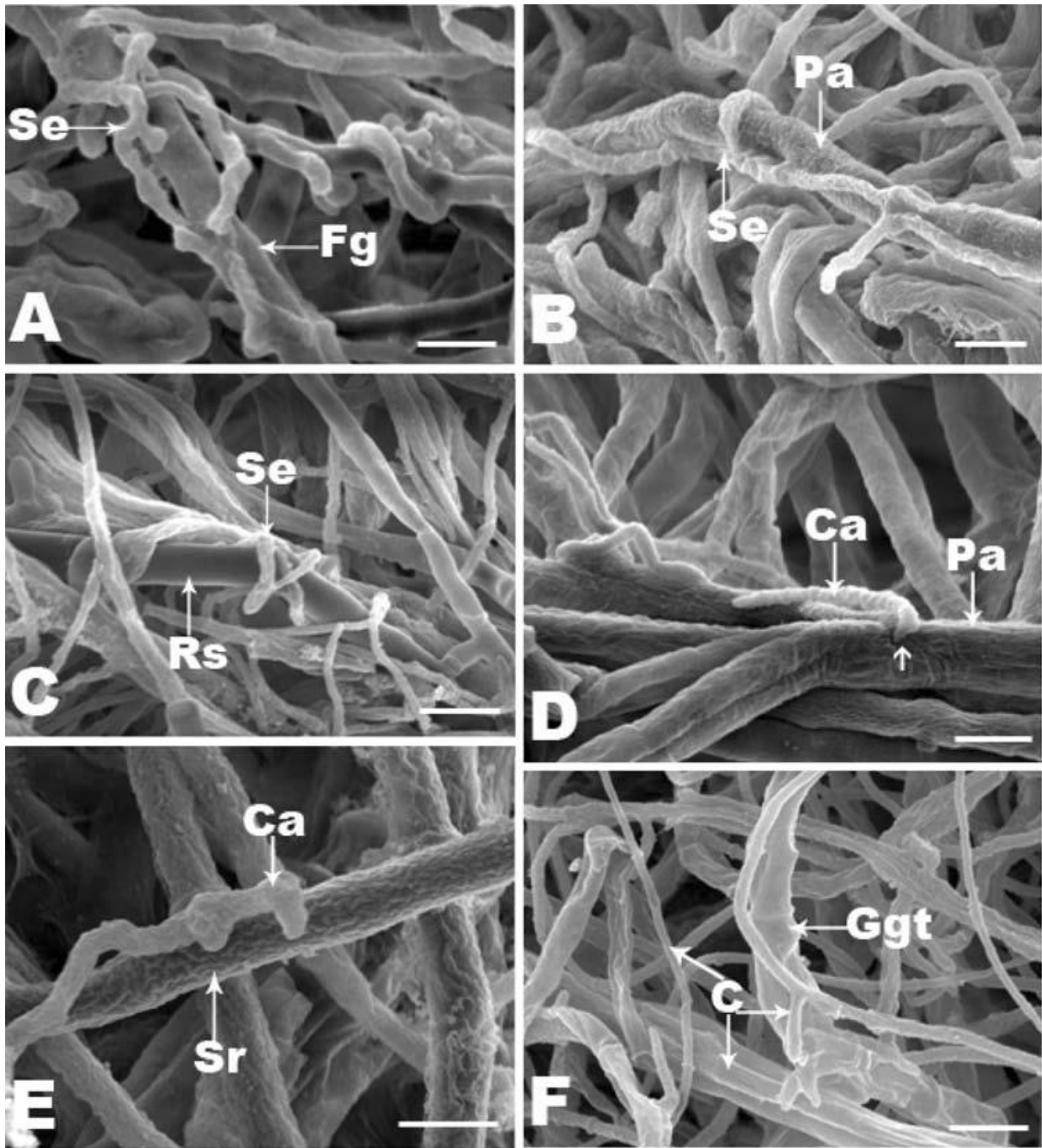


Figure ....montrant des Micrographes du microscope électronique

à balayage des interactions entre trois endophytes

fongiques et différents champignons pathogènes d'origine tellerique in vitro.

a Hyphes de *S. elegans* (Se) poussant le long des hyphes de *F. graminearum* (Fg), par des filaments et des bobines fréquentes.

b Hyphes de *S. elegans* (Se) poussant sur les hyphes de *P. aphanidermatum* (Pa). c Hyphes de *S. elegans* (Se) parasitant *R. solani* (Rs).

d Lieu de pénétration de *C. aboriginum* (Ca) dans l'hyphes de *P. aphanidermatum* (Pa).

e Stades parasitaires précoces de *C. aboriginum* (Ca) en contact étroit avec un hypha de *S. rolfii* (Sr). f Hyphae de *Cyllindrocarpon* sp. (C) poussant sur des hyphes de *G. graminis* var. *tritici* (Ggt).

Barres 5 lm en (e), 7,5 lm en (a) et (f)

### **2 - Mode de pénétration de la flore endophyte :**

La pénétration des endophytes dans les tissus végétale est possible via deux modes différents transmission ; soit par pénétration du réseau du mycélium et son développement végétatif qui se fait entièrement à l'intérieur des tissus. Les filaments intègrent la plante est sont par la suite disséminés aux générations suivantes par les graines infectées par les endophytes. Ce mode de transmission est le plus fréquemment observé chez les plantes et qui est d'ailleurs nommé la transmission verticale (Saikkonen *et al.*, 2010).

Le deuxième mode de transmission est assuré par les spores des champignons et d'autres plantes sont infectées horizontalement par ces endophytes (Saikkonen *et al.*, 1998).

#### **2-1 Isolement des champignons endophytes**

Les champignons endophytes ont été isolés de l'intérieur tissus de racines et de feuilles d'un palmier dattier en bonne santé. Les feuilles et les racines ont été lavées dans le robinet courant eau pendant 30 min. Seize à côté 1 mm 2 mm des segments ont été coupés de chaque racine et de chaque feuille lavées. Les échantillons ont été stérilisés en surface par lave dans l'éthanol à 90 % pendant 10 min, 2,5 % de sodium hypochlorite pendant 2 min et éthanol à 80 % pendant 3 min. Ils ont ensuite été rincés cinq fois à l'eau distillée stérile et laissés sécher à la surface dans des conditions stériles. En fait, la stérilisation de surface a déjà été présenté une méthode efficace pour le retrait des levures, des zygomycètes à croissance rapide, et autres organismes épiphylls de cultures endophytes (Schulz *et al.*, 1993; Arnold *et al.*, 2000).

#### **2-2 Évaluation de la capacité à promouvoir la croissance :**

Parmi les endophytes fongiques dominants isolés du palmier dattier identifiés dans la première partie, quatre isolats, qui étaient déjà décrits dans la littérature comme producteurs potentiels de nombreux métabolites secondaires, ont été évalués pour leur promotion de la croissance du blé. Parallèlement, la production de certains métabolites secondaires impliqués dans la promotion de la croissance tels que l'acide acétique indole (AIA), la production d'acide cyanhydrique (HCN) et la solubilisation du phosphore (P) ont également été étudiés.

##### **2-2- 1 Production d'acide acétique indole (AIA) :**

Le milieu Luria-Bertani enrichi en tryptophane (LBT) (Bric, J.M., R.M. Bostock and S.E. Siiverstone, 1991) a été utilisé pour l'évaluation de la production de l'IAA. Une membrane de nitrocellulose de 4 cm de diamètre a été déposée directement sur le milieu LBT et des disques mycéliens ont été placés sur cette membrane avec trois répétitions pour chaque isolat. Après 2 à 5 jours, la membrane de nitrocellulose a été placée sur du papier Whatman de 9 cm de diamètre imprégné de 2,5 ml de réactif de Salkowski (mélange de 2 % FeCl<sub>3</sub> 0,5 M avec 35 % de solution d'acide perchlorique) sur une boîte de Petri en verre. Après 10 à 30 minutes,

une réaction positive de la production d'AIA est indiquée par l'apparition d'un halo rouge à brun autour de la colonie fongique.

### **2-2-2 Production d'acide cyanhydrique (HCN) :**

La capacité de produire de l'acide cyanhydrique par isolats a été évaluée à l'aide de la méthode de (Bakker et Schippers). Chaque isolat a été cultivé dans un milieu PDA supplémenté de glycine. Un papier filtre du même diamètre de boîte de Petri imprégné d'une solution de couleur jaune (0,5% de picricacide et 20% de carbonate de calcium) a été déposé dans le couvercle de chaque boîte de Pétri scellé avec du parafilm et incubé dans la position opposée à 30 °C. Une vérification quotidienne de la réaction est effectuée pour déterminer la synthèse du HCN et le changement de couleur du papier filtre du jaune au brun. L'expérience a été menée en trois répétitions.

### **2-2-3 Solubilisation du phosphore (P) :**

La solubilisation du phosphore a été effectuée par des disques mycéliens de sous-culture dans des boîtes de Petri contenant du milieu solide dicalcique (PVK) de (Pikovskaya) additionné de bleu de bromophénol et incubé à 30 °C pendant 7 jours dans trois répétitions pour chaque isolat. La solubilisation du phosphore a été révélée par la présence d'un halo clair autour de la colonie ou par une décoloration complète du milieu de culture due à une diminution du pH du milieu qui est influencée par la sécrétion d'acides organiques et de phosphatases.

La littérature rapporte une diversité de la biomasse qui est constituée principalement des bactéries endophytes

## **3- Diversité et activité enzymatique de la microflore endophyte fongique :**

### **3-1 Microflore endophyte du palmier :**

La seule étude à notre portée sur la microflore du palmier dattier dans la région d'Adrar est celle réalisée par Mohammed Mahmoud et al, 2017 :

Cette équipe a mené une étude comparative de la microflore endophyte des palmeraies algériennes et celle d'Espagne (Alicante)

Les chercheurs ont choisi notre région vue qu'elle est caractérisée par des températures élevées et des conditions édaphiques particulière (salinité du sol). Des échantillons de champignons endophytes racinaires ont été prélevés à partir de trois sites à Adrar (2 à Bouda (Elmansour et Bendraou) et un à Tamentit). Le premier site est touché par une forte salinité 4,63 à 18,37 g/l selon (Daddi Bouhoun et al, 2013). Le deuxième site est saccagé par la maladie vasculaire Bayoud, dont l'agent responsable est *Fusarium oxysporum* fsp. *Albedinis*. Le dernier site concerne une palmérie d'apparence ordinaire prise comme témoin et contrôle.

Au total, 18 échantillons de racines ont été prélevés et cultivés sur milieu PDA. Un nombre de 460 champignons endophytes a été isolé. (235 : Tamentit, 155 de Bouda 1, (Bayoud) et 70 à partir des racines des palmiers en bon état). L'identification des souches isolées a permis de sélectionner 6 isolats dominants à savoir : *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium sp.*, *Cheatomium sp.*, et *Penicillium*. Les données de l'identification ainsi que la distribution des souches est montrée dans le tableau suivant selon Mohammed Mahmoud (2017).

Pour les palmiers d'Espagne, le champignon *Clonostachys rosea* était la plus fréquemment isolée dans les sites étudiés. Étonnamment cette moisissure est dotée d'un grand potentiel de bio-contrôle contre nombreuses maladies et compris le Bayoud. Des études ont montré leur pouvoir dans l'amélioration de la résistance de l'hôte contre le pathogène de avec *Botrytis cinerea*, la stimulation du système de défense enzymatiques (Mouekouba et al., 2013).

D'autre part, les endophytes d'origine algérien décrit par Mohammed Mahmoud (2017), et principalement *Aspergillus terreus* est un champignon fortement cellulolytique qui est capable à dégrader la biomasse composée de ce polymère. Cela a été révélé par Mirzaakhmedov et al, (2007) qui a comparé le rendement de la dégradation du cellulose de cette espèce avec d'autres espèces (*Panus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Fomes fomentarius*).

L'auteur a décelé l'efficacité de cette espèce à la dégradation du bois, et la forte activité de cellulase a été observée après 10 jours de croissance. Des analyses approfondies ont pu isoler deux types de cellulases (cellulase-I et cellulase-II) très actives à partir du hydrolysate du bouillon de culture avec une activité de 0.88 et 25.03 U/mg de protéine respectivement.

En fait, ce champignon a été détecté dans les trois palmeraies et surtout à Tamentit. Le même microorganisme a été précédemment isolé dans la région par (Abdullah et al. 2010) ce qui montre son adaptation aux qualités du sol de la région.

D'après Mohammed Mahmoud (2017), il y a aussi une autre espèce « *Beauveria bassiana* » qui est aussi prometteuse par son effet antibiose contre les larves des insectes ravageurs comme a été identifié chez *Aspergillus terreus*. (Sheng-li et Li 2010) avance que plusieurs types d'enzymes sont sécrétées par cette espèce pour fragmenter la cuticule des insectes. En plus de cellulase ces enzymes impliquent aussi de chitinase, lipase et plusieurs protéases.

Des analyses similaires sur les moisissures antagonistes contre le phytopathogène *Rhizoctonia solani* ont montré que *Choiromyces aboriginum* et *Stachybotrys elegans* sont de forts candidats mycoparasitisme qui peuvent être utilisés en lutte biologique par leur aptitude à la production des enzymes dégradant la chitine et le  $\beta$ -1,3 glucane, qui sont les principaux composants avec le cellulose de la paroi de plusieurs champignons phytopathogènes. En

## Partie théorique

---

présence de la chitine au niveau de la paroi cellulaire de l'espèce *Rhizoctonia solani*, les deux endophytes produisent des quantités significatives de chitinase et de  $\beta$ -1,3 glucanase qui sont des enzymes lytiques clés de la lyse des parois cellulaires des champignons (Ronghua et al., 2009)

Très récemment en Tunisie, Mefteh et al (2017) ont ciblé la microflore des palmes de dattiers. Parmi les 52 isolats, 34 avaient une activité cellulotique très remarquable.

La grande activité enzymatique a été enregistré chez les espèces de *Penicillium* puis *Aspergillus* et certains *Fusarium*. La levure *Geotrichum candidum* TDPEF 19 était la plus puissante dans l'activité cellulosique ayant montré une zone d'hydrolyse très importante : (15-25 mm). D'autres chercheurs ont montré la présence massive des membres de l'espèce *Alternaria* dans les palmes des palmier dattier (Ben Chobba et al., 2013).

Le groupe de recherche a effectué une comparaison des endophytes dans les tissus racinaire et foliaires. Il a été révélé que les Nectriaceae (38,5 %), sont observés exclusivement au niveau des tissus racinaires du palmier dattier.

Les données ont montré que ces champignons endophytes sp n'étaient pas répartis de façon uniforme entre les feuilles et les racines. *Pleosporaceae*, *Alternaria sp.* *Bipolaris sp* et *Curvularia* constituant le groupe dominant dans les feuilles et les racines du palmier dattier.

L'étude a révélé aussi que certains genres ont été enregistrés au niveau des tissus foliaires seulement mais pas dans les racines sur le même arbre. Par contre les espèces du *Fusarium* *mequeti* et *Cladosporium sp.* (1G10 et 1E1), ont été exclusivement enregistrées dans les racines mais jamais dans les tissus foliaires des palmiers dattiers selon certains auteurs. En revanche les membres du genre *Pythium sp.* (2A3), ont été enregistrées dans les racines uniquement.

En Egypte, El Deeb et Arabe (2013) ont mené une étude sur es endophytes associés au palmier dattier sains. Les données recueillis ont montré la présence de 30 champignons endophytes dont la plupart représentent les espèces des genres *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Chaetomium*.

Plus loin, plusieurs champignons endophytes ont été décrits dans d'autres types de palmier et cette comparaison nous a semblé intéressante vu la proximité taxonomique des espèces de palmacées (*Arecaceae* ). Par exemple, des espèces endophytes ont été détectées chez les



palmiers à huile (Rungjindamai et al., 2008), comme *Trametes elegans* et *Fomitopsis pinicola*. *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* f. sp. albedinisqui ont été ultérieurement détecté dans les palmiers dattiers (Lamberti, 1988; Hatimi, 1989; Fernandez et coll., 1995).

### 3-2 Microflore endophyte des autres plantes

Dans leur étude Cao et al., 2009 ont montré une activité de dégradation de cellulose chez le champignon endophyte *Phragmites australis* isolée des racines de la plante roseau. Cette activité a été soupçonné l'origine de la capacité de cet endophyte à pénétrer et de coloniser l'hyphe du moisissure pathogène *P. aphanidermatum*. Une autre hypothèse suggère une synergie entre les cellulases, des chitinases et des b-1,3 glucanases parce que les parois des cellules fongiques oomycètes contiennent principalement de la cellulose, des glucanes (principalement b-1,4-; b-1,3-; b-1,6-; et a-1,3-glucanes) et des traces de chitine.

D'autre part Marlida et al., 2000 ont détecté des quantité appréciables de l'enzyme Glycoamylase et une autre activité d'hydrolyse de l'amylopectine dans un filtrat de culture de l'endophyte *Acremonium*. La stabilité biologique de l'enzyme à une température de 60 °C et dans un pH compris entre 3 et 7 et lui offre des critères essentiels pour une utilisation intensive.

Certains autres genres comme *Trichoderma* sp., *Acremonium* sp., *Penicillium* sp et *Aspergillus* sp..sont aussi capables de produire des enzymes hydrolytiques (Potshangbam et al., 2017).

Dans une autre étude sur les champignons mycoparasites qui colonisent les racines du cucumber, les chercheurs (Chatterton and Punja, 2009) ont montré la dominance de deux champignons *Clonostachys rosea* et *Gliocladium roseum*. Ces mycètes ont aussi montré un grand pouvoir enzymatique de chitinase et de beta-1,3-glucanase. Il est persuadé que cette activité enzymatique remplisse deux objectifs ; le premier c'est l'attaque des champignons concurrents et le deuxième c'est pour pouvoir pénétrer les tissus de la plante.

### 4-1 La microflore phylloplane :

La phyllosphère des plantes peut être colonisée par une variété de microorganismes très complexes : moisissures, levures et bactéries. Cependant cette dernière est considérée comme la flore la plus dominante (Lindow et Brandl, 2003). D'un point de vue écologique, la phyllosphère est l'une des niches qui présentent une grande importance agricole et environnementale et l'une des plus importants réservoirs qui peuvent contenir une diversité bactérienne saprophytique et pathogénique (Whipps et al., 2008).

L'introduction de champignons de lutte biologique dans la palme le phylloplane pour lutter contre les ravageurs et les maladies semble donc, souhaitable. Une telle introduction devrait tenir compte interactions avec des microorganismes naturels sur feuilles de palmier. *Fusarium* spp. sont non pathogènes a trouvé des cochenilles colonisatrices saprotrophiquement (*Agriculture and Agri-Food Canada (2003)*). Les feuilles de palmier abritent également un large endophyte et saprotrophique mycobiota (Fröhlich J, Hyde KD 1999) (Pinnoi A, Pinruan U, Hyde KD, Jones EB2002).

La surface des feuilles ou mycoflora phylloplane dans les zones tempérées comprend plusieurs genres de levures collectivement catégo-rizedaseither rose (p. ex., *Sporobolomyces* spp ou *Rhodotorulas* spp.) ou blanc (p. ex., *Cryptococcus* spp.)

Des espèces de levures semblables ont été isolées à la surface des fruits (Chand-Goyal et Spotts, 1996) et dans l'écorce (Buck et al., 1998; Mc Bride and Hayes, 1977). Le rôle écologique des levures de phylloplane est peu connu, Les levures épiphytes constituent un tampon naturel important contre les agents pathogènes foliaires des plantes (Fokkema et al., 1975, 1979). et les isolats de levure individuels ont un potentiel de lutte biologique (Chand-Goyal et Spotts, 1996; Elad et al., 1994; Filonow et al., 1996; McLaughlin et al., 1992)

L'une des difficultés de l'utilisation des levures comme agents de lutte biologique sur le terrain est de maintenir des populations élevées d'antagonistes (Fokkema et al. 1975). Des fongicides ont été utilisés dans les tentations pour gérer les niveaux de population de levures sur les feuilles afin de mieux comprendre la capacité tampon de ces populations contre les maladies (Fokkema et al. 1975) et le rôle des levures en ce qui concerne l'accumulation de nutriments sur le phylloplane (Dik et al. 1991)

### 4-2 L'importance d l'utilisation de phylloplane :

Pour exploiter davantage l'utilisation des levures de phylloplane dans les organismes de lutte biologique, il est nécessaire de mieux comprendre les effets des pratiques de gestion des cultures sur les populations de levures, y compris l'application de différents fongicides chimiques. Les fongicides à large spectre du mancozèbe, du métirame ou du zinèbe ont réduit considérablement les populations de levures sur les blés (Dickinson and Wallace 1976; Dik et al. 1991; Southwell et al. 1999) and apple leaves (Andrews and Kennerley 1978; Hislop and Cox 1969)

### 5 . Diversité de la flore microbienne des produits d'origine agricole

La structure et la diversité des populations bactériennes à la surface des plantes ont été recherchées sur une variété de plantes et d'arbres. Néanmoins, et malgré que le palmier dattier est cultivé depuis plus de 4000 J.C. ans, et l'un des arbres d'importance socio-économique, un nombre limité de travaux voire nul n'a franchi l'étude de l'écologie bactérienne de cette plante à partir de ses différentes parties comme les feuilles, les fruits et le tronc du palmier dattier. La plus part des travaux ont été consacrés à l'étude des agents pathogènes qui infectent le palmier dattier et provoquent des maladies et des pertes économiques énormes pour les pays producteurs (Djerbi, 1990)

#### 5-1 Fruits :

En générale, les dattes sont très riches en nutriments tel que les sucres (80% du poids sec), les fibres (6.04 à 11.05%), les protéines (2.5%) et la acides aminées , les éléments minéraux( Elles sont de bonnes sources en potassium(552 mg dans 100g de dattes), fer (2,69%). Kimiri Khalal Rutab Tamar 11 Etude bibliographique calcium (65%), magnésium (20%) et phosphore (72%), les vitamines(A,B2,B3,B5,B6,et B9), les acides organiques (citrique, malique, et acide oxalique), et les composés phénoliques (Abekhti et al., 2013). Malgré cette richesse en nutriments et surtout dans le dernier stade de maturation (tamar), la surface des dattes ne favorise pas la croissance des bactéries ou d'autre microorganisme, ceci est due aux changements des caractéristiques physico-chimique du fruit, à l'augmentation de la concentration en sucre et la diminution de l'activité de l'eau au-delà du seuil ne permettant pas la prolifération microbienne (Shenasi et al., 2002 ; Hasnaoui et al., 2010).

La présence des bactéries sur les dattes a été mentionnée dans plusieurs travaux. L'isolement et le dénombrement des bactéries à la surface des dattes préemballées et vendues à Greater Glasgow ont révélé la présence des coliformes à des niveaux élevés, et la présence de *Staphylococcus aureus* en très faible quantité (Aidoo et al., 1996). Une étude effectuée sur six cultivars de palmier dattier au stade rutab vendu à différents points à Al-Hofuf Ville en Arabie saoudite a révélé la présence des bactéries aérobies mésophiles, satphylocoques, et des coliformes (Hamad et al., 2012).

L'analyse microbiologique des dattes de plusieurs variétés a été effectuée sur les différents stades des maturations en prenant en compte la variation différenciable dans la composition chimique des dattes comme facteur influençant la flore microbienne. Ils ont conclu qu'on peut attribuer la différence dans la composition microbienne aux différents stades de maturation et aux sélections exercées par le génotype de la variété de dattier (Shenasi et al., 2002). Dans une autre étude (Al-Shaickly et al. 1986) ont déterminé l'ampleur de la contamination des dattes durant la maturation, ils ont suivi l'apparition de la flore bactérienne sur 4 variétés de dattes iraqiennes, ceci leurs a permis de constater que la contamination par les bactéries n'étaient pas régulière durant tous les stades de maturation. La flore naturelle des dattes est constituée par des microorganismes sous formes de spores, formes végétatives, bactéries, levures et moisissures

**Tableau : La flore endogène des dattes (Al. Shaickly et al., 1986)**

Bactéries	Moisissures	Levures
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Bacillus megaterium</i></li> <li>- <i>B. Lichiniformis</i></li> <li>- <i>B. Pumilus</i></li> <li>- <i>B. Pasteurii</i></li> <li>- <i>B.Cereus</i></li> <li>- <i>B.Subtilis</i></li> <li>- <i>Microoccusureae</i></li> <li>- <i>M. Luteus</i></li> <li>- <i>M. varians</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Aspergillus</i></li> <li>- <i>Penallium</i></li> <li>- <i>Alternaria</i></li> <li>- <i>Pythium</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Zygosaccharomyces cavarae</i></li> <li>- <i>Z.Globiformis</i></li> <li>- <i>Z.Barkeri</i></li> <li>- <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> <li>- <i>Torula spp</i></li> <li>- <i>Mycoderma spp</i></li> <li>- <i>Candida krusei</i></li> <li>- <i>mycoderma</i></li> </ul>

### 5-2 Identification des endophytes fongiques des racines :

Des champignons ont été identifiés à partir de colonies en croissance sur PDA. Les cultures ont été examinées périodiquement en fonction de l'aspect général de la colonie et des structures de reproduction (couleur, croissance du diamètre et fructification) pour l'identification morphologique décrite par Watanabe et Ellis et al . Enfin, les isolats fongiques ont été regroupés en taxons et affiliés aux espèces, au genre, à l'ordre ou à la famille selon leurs caractéristiques morphologiques

Les autres parties constitutives du palmier dattier comme le tronc, et les feuilles, sont formées par différents éléments qui permettent aux microorganismes de coloniser et de créer des niches écologiques. En plus, la cuticule des autres organes végétaux tels que les feuilles, ont la capacité de retenir l'eau. Cette rétention dépend de l'humidité relative de façon à ce que lorsque les valeurs d'humidité sont plus élevées, l'absorption de l'eau sera plus importante. La présence d'eau cuticulaire est un facteur essentiel pour la croissance des microorganismes (Kerstiens, 1996).

Le tronc, les feuilles, les bourgeons, les fleurs puis les futurs fruits de datte constituent les parties aériennes du palmier dattier. La présence des microorganismes n'a pas été vérifiée dans ces organes, sauf pour les dattes

La microflore présente à la surface des dattes a été vérifiée dans plusieurs études. Les conclusions de ces travaux montrent l'existence d'une variété de moisissures, levures et de bactéries (Aidoo et al., 1996; Ragab et al., 2001; Mohammed et Hossein, 2005; Al-sheikh, 2009; Shenasi et al., 2002 ; Hasnaoui et al., 2010 ; Hamad et al., 2012; Umar et al., 2014).

## Partie théorique

De nombreuses études ont permis d'identifier les différents intervenants de ce consortium microbiologique, et les facteurs qui peuvent l'influencer. Les différents facteurs contribuant à la contamination des dattes: les transformations physico-chimiques du fruit ; évolutions du taux de sucres, effet du pH neutre, effet de la température et de l'humidité (Al- Shaikly et al., 1986).

**6 - Dégradation hydrolytique :** Les lipides en tant qu'esters d'acides gras peuvent être hydrolysés en acides gras libres, diacylglycérols et monoacylglycérols. Saveur et très bien digérés, mais ce n'est pas aussi simple en ce qui concerne les libres. (POKORNY. 2003).

L'hydrolyse des corps gras qu'elle soit d'origine enzymatique ou chimique conduit à l'apparition d'acides gras libres et de glycérides partiels (mono et di glycérides) dont les propriétés sont plus ou moins désagréables sur le plan organoleptique (Denise J, 1992).

La dégradation des lipides par hydrolyse des triglycérides provoque l'apparition d'un goût et d'une odeur rance, cette réaction peut se produire par deux voies :

1-Hydrolyse chimique                      2- Hydrolyse enzymatique

### 6-1 HYDROLYSE CHIMIQUE :

Ces procédés utilisent un ou plusieurs réactifs chimiques dans le but d'hydrolyser à la fois les hémicelluloses et la cellulose. Les hémicelluloses de structure hétérogène et de faible degré de polymérisation sont hydrolysées en premier (Gong, C.S., Maun C.M., et Tsao, G.T. 1981)(Grethlein, H.E. 1985). Quant à l'hydrolyse de la cellulose, elle est rendue plus difficile par sa structure cristalline et son étroite association avec la lignine. L'un des objectifs majeurs de ces procédés est d'aboutir à une hydrolyse totale de la cellulose, tout en évitant des conditions trop sévères susceptibles d'entraîner la dégradation des sucres. (Figure 05)



Figure : Hydrolyse chimique

### 6--2 Hydrolyse enzymatique :

L'hydrolyse enzymatique constitue une méthode spécifique, réalisée dans des conditions relativement douces (50 °C), et permettant des rendements d'hydrolyse supérieurs à ceux obtenus à partir des procédés chimiques. C'est la raison pour laquelle l'hydrolyse enzymatique a fait l'objet de nombreux travaux de recherche ces 10 dernières années, dans le but d'optimiser la production d'enzymes et leur efficacité, mais aussi d'améliorer les étapes de prétraitement. L'objectif est avant tout d'améliorer sa rentabilité économique, car elle constitue encore une méthode

## Partie théorique

onéreuse, en raison notamment du coût élevé des enzymes et de la lenteur des réactions. (Ogier, J. C., Leygue, J. P., Ballerini, D., Pourquie, J., & Rigal, L. 1999) (Figure).

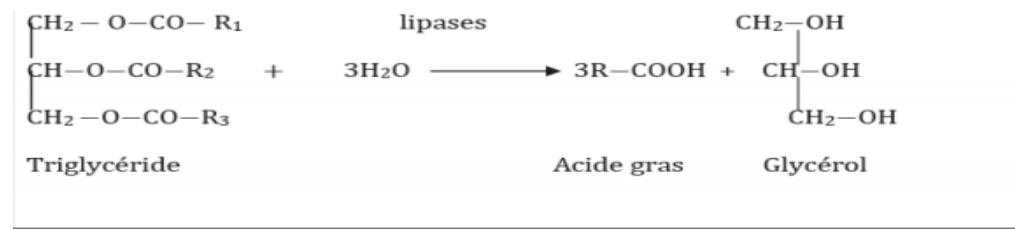


Figure : Hydrolyse enzymatique

### 7- L'activité protéolytique :

Les enzymes protéolytiques sont omni présentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (Gupta et al, 2002; Sandhya et al., 2005)

L'action de l'hydrolyse des protéines on s'appelle l'activité protéolytique, en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaine peptidique. Les protéases sont normalement générées comme des pro-enzymes inactives (zymogènes) et selon les exigences, elles seront converties en forme active par une protéolyse limitée (Mukerjee et al. 2008; Benedykt & Katarzyana, 2008; Reddy et al, 2008; Wilkesman & Kurz, 2009).

### 8- Technique d'étude l'activité enzymatique :

Lors de la conversion de la biomasse, la dégradation de la matière première s'effectue donc par une action concertée de plusieurs enzymes ; la bioconversion de la biomasse lignocellulosique à l'aide d'enzymes suscite un regain d'intérêt. L'invertase et l'amylase ont été les premières enzymes à être isolées et produites à l'échelle industrielle. Depuis lors, de nombreuses enzymes sont devenues un outil central dans les processus de fermentation industrielle. En outre, les cellulases et les pectinases trouvent d'autres usages dans l'industrie alimentaire, y compris la clarification des jus de fruits. (Vitolo M, 2019).

La conversion de la biomasse lignocellulosique en éthanol comporte quatre étapes : prétraitement, hydrolyse, fermentation et récupération de l'éthanol par distillation (C. A. Cardona and Ó. J. Sánchez 2007.)

En raison de la structure complexe et récalcitrante de la biomasse lignocellulosique, différents processus de prétraitement sont nécessaires pour l'hydrolyse des glucides, en fonction de la biomasse. Le prétraitement augmente la digestibilité de la biomasse pour une production efficace de sucre fermentescible, ce qui réduit le coût de la production de *bioéthanol* (S. Imman, J. Arnthong, V. Burapatana, V. Champreda, and N. Laosiripojana, 2014.)

### **9 - Isolement des endophytes fongiques à partir des racines du palmier dattier**

Les échantillons de racines des palmiers dattiers ont été lavés à l'eau du robinet pour enlever les débris du sol, puis rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile (EDS). Ils ont ensuite subi une désinfection dans du NaOCl à 3% (v/v) avec du Tween 20 à 0,02% (v/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) pendant 3 min. Cette dernière opération est suivie de trois rinçages successifs dans l'EDS pendant 3, 2 et 1 min, respectivement (Macia Vicente et al., 2008a).

### 10- La biomasse du palmier dattier :

#### 10-1 Complexifié du composé ligoncellulosique :

Du fait de la complexité et de la composition hétérogène, le xylane n'est pas hydrolyté complètement sans l'action intégrée de plusieurs enzymes hydrolytiques.

Ce complexe enzymatique comprend :

-1,4-b-D-xylanases (EC 3.2.1.8).

b-D xylosidases (EC 3.2.1.37),

a-L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55),

D-glucuronidases (EC 3.2.1.139),

d'acétylxylanases estérases (EC 3.1.1.72),

d'estérases d'acide férulique (EC 3.1.1.73)

d'estérases pcoumariques (EC 3.1.3.3). B10) (*Subramaniyan et Prema 2002*).

Les xylanases dégradent le squelette xylose

les b- xylosidases

attaque le lien à l'intérieur des monomères xylose et les enzymes xylanolytiques restantes catalysent l'élimination des chaînes latérales du xylane .

**10-2 Lignine:** C'est le troisième polymère organique le plus abondant dans la nature.

Ce composé est exclusivement existant dans les plantes appartenant des angiospermes et les gymnospermes. En plus d'aider à fournir une certaine résistance mécanique protège contre le stress oxydatif, l'attaque des insectes l'infection par les agents pathogènes, la lignine joue un rôle aussi dans le transport d'eau à travers le xylème vasculaire et des cellules du phloème (*Del Rio et al., 2007*).

Il se présente sous forme d'un réseau d'unités de propane polyphénolique, liés par diverses liaisons non covalentes (*Hendriks et Zeeman 2009*).

La lignine fonctionne en tant qu'une colle entre la cellulose et l'hémi-cellulose. sa présence entre ces deux constituants est la première barrière contre l'action enzymatique microbienne de dégradation de la biomasse cellulosique. L'élimination de la lignine par les procédés de prétraitement et la délignification facilite l'activité de lyse du cellulose et l'amélioration de la digestibilité, de la biomasse cellulosique.



### 11- Enzymes hydrolytiques (cellulolytiques/xylanolytiques)

Les enzymes, connues aussi par les biocatalyseurs sont des macromolécules qui augmente, le rythme et la spécificité des réactions biochimiques et métaboliques. Ces dernières années, les enzymes ont connu un usage grandissant pour faire des synthèses chimiques éco-énergétique et plus efficaces. (*Thapa et al., 2019*)

Ils offrent une économie dans leur utilisation avec moins de consommation d'énergie, et sont respectueux à l'environnement et une offre une meilleure efficacité. Dans cette optique il y a un intérêt réel dans la recherche de nouvelles enzymes d'origine biologiques. Les propriétés exceptionnelles des enzymes ont conduit les chercheurs à faire plus des efforts pour optimiser leur production et dont l'usage est devenu très compétitives dans de nombreux bioprocédés industriels (*Adrio et Demain 2014 ; Gurung et al., 2013*).

Néanmoins, le secteur des enzymes souffre de certains problèmes tels que la compétitivité pour les matières premières, le concept de la biosécurité d'usage et la sensibilité des enzymes aux conditions extrêmes et aussi leur prix flambant. Ces handicaps affectent le développement rapide du marché des enzymes.

La découverte d'approches de synthèse programmée par les méthodes dites "omique" couplées avec les dernières technologies de l'ingénierie des protéines, à la biologie desynthèse, à l'enzymologie, à la modélisation computationnelle et aux outils de la bioinformatique vont sans doute révolutionner la recherche des nouvelles enzymes comme de nouveaux, cellulase/xylanase provenant de différentes sources inexploitées et présentant de meilleurs attributs biochimiques et des fonctions catalytiques améliorées. La flore des palmiers dattiers dans les régions extrêmes comme Adrar pourrait constituer un candidat de ce type.

Les applications des enzymes cellulolytiques/xylanolytiques sont diversifiées et touchent, un éventail d'industries, notamment le secteur des biocarburants, les biopolymères, les textiles, les boissons, les aliments et le bétail, les pâtes et papiers.

Très récemment, le rapport sur le marché mondial de cellulase (CAS 9012-54-8), a montré que l'industrie de l'alimentation animale occupe environ 30 % du marché total, en second lieu vient, l'industrie alimentaire puis le secteur des textiles qui représentent respectivement environ 26% et 14% (*Garner Insights, 2020*).

L'application d'enzymes cellulolytiques et xylanolytiques microbiennes dans le traitement, de la biomasse cellulosique a acquis un intérêt sans précédent.

Les techniques de la bioingénierie ont permis de développer de nouvelles enzymes avec une grande tolérance aux concentrations élevées de glucose, une thermostabilité élevée et une meilleure efficacité catalytique.

Les prévisions déterminent que l'exploitation des enzymes de la cellulase et de la xylanase dans

les industries des biocarburants devrait connaître un taux de croissance annuel d'environ 7 % au cours des cinq prochaines années. Le marché mondial des enzymes cellulases s'élève à environ 1500 millions de dollars en 2019, ce qui devrait atteindre 2320 millions de dollars en 2024 (Singh, 2020). On estime aussi que ces enzymes d'importance biotechnologique et pharmaceutique auront le taux de croissance le plus élevé d'ici 2024.

### **11-1 Le commerce des enzymes hydrolytiques**

Le commerce mondial de la cellulase est dominé, par l'Amérique du Nord représentant environ 75 % de l'ensemble du marché mondial en 2017 en raison de la rapidité du développement technologique et de l'intégration de la cellulose dans le secteur industriel (Business wire, 2020).

Les estimations, prévoient une augmentation de la demande en Chine et l'Inde et qui pourront être les leaders des biomolécules dans un proche avenir. Les sociétés saillantes dans le domaine sont : Novozymes, la BASF Corporation, DowDuPont, AB Enzymes et Royal DSM, représentant près de 75 % de l'ensemble de l'industrie des enzymes. Les acteurs du marché mondial des enzymes sont Worthington Biochemical Corporation, Sigma-Aldrich Co. LLC, Amano Enzyme U.S.A., Hunan Hong Ying Biotech Co. Ltd, BIOCATALYSIS LTD., DONG Energy, GmbH (Research et Marchés 2020).

**Partie**

**pratique**

### Partie pratique

L'hydrolyse de la cellulose et de l'hémicellulose en unités monomères c'est très délicat en raison du puissant montage de leurs liaisons glycosidiques, de la diversité et la nature récalcitrante de leurs structures, la nature cristalline. Certains chercheurs ont démontré que, la souche de *penicillium janthinellum* FS22A et *Trichoderma virens* FS5A sont les plus préformantes, dans la coproduction d'enzymes cellulolytiques et xylanolytiques à l'échelle du laboratoire. Cependant, il n'est pas facile de produire les enzymes et maintenir une activité optimale au niveau industriel, cela demande plus de recherche et des expériences sur plusieurs échelles (Okeke et al., 2015).

#### 1 - Domaine d'application d'enzymes hydrolytiques

Généralement les enzymes les plus, utilisée dans les bioprocédés industriels sont de nature hydrolytique .

**1-2 Dans les industries de l'alimentation de bétail :** ces enzymes trouvent leur utilisation dans l'amélioration de la digestibilité des nutriments. De nombreux animaux sont déficients en enzymes qui font la digestion du les lignocellulose, en particulier les polysaccharides non amylacés

(NSP), qui sont abondant dans le son de blé, le son de riz, la farine de maïs et la farine de soja. L'accumulation de ces polysaccharides entraîne une faible digestibilité, une diminution de l'absorption des autres nutriments et augmente la formation d'agrégats visqueux dans les cavités gastro-intestinales des animaux (*Del Rio et al., 2007 ; Hendriks et Zeeman 2009*).

Donc l'introduction d'enzymes comme les cellulases ou les xylanases dans l'alimentation de l'animal permet d'accélérer l'hydrolyse des NSP, réduisant ainsi la viscosité qui, à terme, permet d'améliorer la production de lait et la biomasse de qualité. Cependant, il reste encore beaucoup à faire pour améliorer la production de ces biocatalyseurs efficaces de manière rentable afin d'étendre leur utilisation dans des applications biotechnologiques vastes et diversifiées.

#### 1-3 Acidophiles

Les cellulases d'acidophiles ont une grande valeur commerciale (*Kuhad et al., 2011*). Certaines bactéries acidophiles ont été rapportées pour les cellulases tolérantes à l'acide et en outre, il a été constaté que peu d'entre elles pourraient agir comme thermoacidophiles ainsi. (*Kusube et al. 2014*) ont pour la première fois signalé la production de cellulase à un pH optimal valeur de température de 4,8 et 55 °C par une bactérie thermoacidophile *Alicyclobacillus cellulolyticus* (*Kusube et al., 2014*). (*Dos Santos et al., 2018a*) ont signalé la production de cellulase thermostable (endoglucanase) tolérant le sel, stable dans la plage de pH de 6,5 et la température optimale étant de 60 °C, par un *Bacillus* sp. marin. Certains travailleurs ont également signalé des cellulases résistantes au froid et à l'acide. Par exemple, *Paenibacillus* sp. est connue pour son activité cellulolytique à 20 °C et à pH 4,0-5,5 (*Lee et al. 2017*). De même, (*Caf et al. 2014*) ont également signalé la coldactive et la

cellulase acidophile (CMCase) de *Bacillus* sp. avec une température optimale de 20 °C et un pH de 4,0 (Caf et al., 2014). Plusieurs thermoacidophiles les champignons peuvent produire de la cellulase à faible pH et à haute température. Par exemple, *Aspergillus fumigatus* isolée de la bagasse de canne à sucre a montré une activité CMCase plus élevée à 65 °C et pH 2,0 (Grigorevski- Lima et al., 2009).

### 1-4 Alkaliphiles

Les cellulases alcalophiles présentant une stabilité à un pH élevé sont utilisées efficacement dans l'industrie des détergents. À la fin 90, potentiel de *Bacillus* spp. pour la production de cellulases stables à un pH élevé (Hakamada et al. 1997).

Plus tard, certaines études ont révélé que *B. pseudofirmus* et *B. agaradhaerens* peuvent produire de l'alcalinite Endo-1,4-b

glucanase alcaline thermostable fonctionnant dans la gamme de pH 6-10 (Hakamada et al., 2000).

### 2- Champignons endophytes en agriculture

De nombreuses recherches sur les endophytes fongiques sont en cours, ce qui signifie qu'ils sont la source la plus importante d'agents de biocontrôle. Ils ont un effet considérable sur les actions physiologiques de leurs plantes hôtes. En outre, divers facteurs environnementaux, y compris les précipitations et l'humidité, peuvent avoir une influence sur la présence de certaines espèces endophytes fongiques (Khiralla et al., 2017 ; Petrini 1991 ; Selvanathan et al., 2011).

Un certain nombre d'études suggèrent que l'inoculation de cultures avec des champignons endophytes pourrait améliorer la croissance par divers caractères favorisant la croissance des plantes et pourrait également atténuer l'effet des conditions de stress. Khan et al. (2011b) ont démontré le rôle d'un champignon endophyte nouvellement isolé, *Penicillium funiculosum*, dont les divers attributs favorisant la croissance des plantes chez *G. max* poussent sous le stress de la salinité. L'étude a révélé que le champignon améliorerait l'effet du stress de salinité.

### 3- Mise en place d'une station de production enzymatique :

#### 3-1 technique de production d'enzymes :

La production de l'enzyme en tant que telle est l'une des parties les plus importantes. Pour que le projet soit acceptable, la production doit être efficace: les enzymes doivent avoir un bon pouvoir enzymatique, la méthode de production doit être peu coûteuse et l'enzyme doit être facilement récupérable (Meunier, 1999). Il existe différentes techniques de fermentation qui peuvent être utilisées. La fermentation liquide se fait dans un milieu composé en grande partie d'eau. L'utilisation d'un milieu de culture synthétique apporte tous les éléments essentiels à la croissance des microorganismes. Ces derniers sont continuellement en mouvement grâce à des systèmes d'agitation

**4- Matériels et appareilles utilisés dans station de production enzymatique à l'échelle semi-pilot**

Type de matériels	Matériels
Matériel végétal	Dattes algériennes
Matériel biologique (micro-organisme)	- Pleurotus - Pycnoporus - Ischnoderma - Phlebia
Milieu nutritionnel	- NaOH - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - HCl . H <sub>2</sub> O - NH <sub>4</sub> , SO <sub>4</sub>
Appareils utilisés	- PH mètre - Spectrophotomètre - Thermomètre - Centrifugeuse - Balance - Microscope optique - Plaque chauffante
Réactifs Chimiques	- L'hydroxyde de sodium NaOH - L'hydroxyde de calcium - Acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) - Acide Chlorhydrique (HCl)

**4-1 Exemple 1:** C'est à la voie biochimique que le projet Futurol est dédié. Ce démonstrateur retenu début 2008 consacre au total 72 M€ financés par des fonds publics (Oséo Innovation) à hauteur de 40 %. Le projet qui mobilise de nombreux partenaires publics et privés pour une durée de 8 ans, comporte une première phase pilote dont l'installation pilote vient d'être inaugurée sur le site agro-industriel de Pomacle-Bazancourt (Marne). (*Baptiste Clarke 2011*)

**4-2 Les objectifs :** mettre sur le marché un procédé, des technologies et des produits (enzymes et levures) permettant de produire du bioéthanol à un prix "compétitif" grâce à une matière première diversifiée (coproduits agricoles, biomasse forestière, cultures dédiées, ...) et obtenir "les meilleurs bilans énergétiques et de gaz à effet de serre (GES) possibles" sur l'ensemble de la chaîne de production. Le programme d'expérimentation inclut à la fois la problématique de la ressource (systèmes de culture, amélioration des variétés, bilans environnementaux...), du prétraitement (broyage, catalyseurs, séparation), de l'hydrolyse (optimisation du procédé, sélection des souches d'enzymes), de la fermentation (pentoses, minimisation des inhibiteurs, valorisation du CO<sub>2</sub>). (*Baptiste Clarke 2011*)

### **4-3 Exmple 2 : Estimation de l'activité de la cellulase par la méthode DNS**

souches bactériennes sélectionnées ont été inoculées dans un milieu de production d'enzyme contenant la composition suivante : 20 g de carboxyméthyl cellulose, 5 g d'extrait de levure 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 g de NaCl dans 1000 ml à pH 7 et incubés pendant une nuit à 37 ° C dans un agitateur. Après incubation, la culture a été centrifugée et le surnageant a été utilisé pour le dosage de la cellulase (*Lokhande et al., 2017*).

### **5 - Techniques d'isolement des champignons endophytes**

Les champignons endophytes ont été isolés de l'intérieur des tissus de racines et de feuilles d'un palmier dattier en bonne santé. Les feuilles et les racines ont été lavées dans le robinet couranteau pendant 30 min. Seize à côté 1 mm 2 mm des segments ont été coupés de chaque racine et de chaque feuille lavées. Les échantillons ont été stérilisés en surface par lavage dans l'éthanol à 90 % pendant 10 min, 2,5 % de sodium hypochlorite pendant 2 min et éthanol à 80 % pendant 3 min. Ils ont ensuite été rincés cinq fois à l'eau distillée stérile et laissés sécher à la surface dans des conditions stériles. En fait, la stérilisation de surface a déjà été présentée une méthode efficace pour le retrait des levures, des zygomycètes à croissance rapide, et autres organismes épiphytes de cultures endophytes (*Schulz et al., 1993; Arnold et al., 2000*).

### **6- Mode d'identification des endophytes fongiques des racines :**

Les cultures des champignons sont identifiées à partir de colonies développées sur PDA. On considère l'aspect général de la colonie et des structures de reproduction (couleur, croissance du diamètre et fructification) pour l'identification morphologique décrite par (Watanabe 1994 et Ellis et al .2007)

Puis Enfin, les isolats fongiques ont été regroupés en taxons et affiliés aux espèces, au genre, à l'ordre ou à la famille selon leurs caractéristiques morphologiques.

### 7- Détermination de l'activité enzymatique :

#### 7-1 Protocol 01 :

**Yousef et al. 2019** se sont intéressés aux bactéries endophytes décomposant le cellulose. Cette bactérie a été isolée de la plante médicinale *Chiliadenus montanus* qui est endémique de Sainte Catherine (Sinaï) en Égypte. Il s'agit de *Lysinibacillus xylanilyticus*. C'est une bactérie spectaculaire qui a pu dégrader 58 % du papier filtre cellulosique (100 g/l) durant 15 jours d'incubation. L'activité maximale de la cellulase (0,18 U/min) a été détectée après 12 jours d'incubation, tandis que la libération maximale de sucres solubles (11,85 mg/ml) a été détectée après 15 jours d'incubation. Le procédé a été amélioré par une technique innovante utilisant 0,6% des nanoparticules de CaCl<sub>2</sub> (100 nm) qui ont nettement amélioré l'activité de l'enzyme. Cet isolat a montré un potentiel de conversion de la cellulose en sucres réducteurs propice à plusieurs applications.

#### 7-2 Protocole 02

Différents substrats ont été évalués pour la synthèse optimale de la cellulase par CPF2. Les meilleures activités pour la FPase (1,2 UI/ml), l'endocellulase (19 UI/ml), la xylanase (40 UI/ml) et la  $\beta$ -glucosidase (2,8 UI/ml) avec une teneur en protéines de 0,86 mg/ml ont été détectées lorsque la cellulose (1,5 % p/v) a été utilisée en association avec la peptone (0,2 % p/v) dans le milieu de croissance. La température et le pH optimaux pour la production de la cellulase extracellulaire ont été de 28 °C et de 5,5 °C respectivement. **Onofre et al. (2013)** ont évalué la production de cellulases par des champignons endophytes, *Fusarium oxysporum*, isolés de *Baccharis dracunculifolia*. Les résultats ont montré qu'après 55 jours de fermentation, le pic maximal de production d'enzymes avec un rendement de  $55,21 \pm 10,54$  UI/g de substrat offert était à un pH de 5,96.

#### 7-3 Protocole 03

m de taille de pore) pour séparer le surnatant de la culture cellulaire afin d'isoler les composants enzymatiques du complexe cellulosique. L'activité de la cellulase en solution a été déterminée par la méthode Wood et Bhat en utilisant Na-CMC (1%) comme substrat. La solution (220 ml) contenait 106,1 unités d'activité totale de la cellulase. Le liquide de culture diurne d'*A. terreus* a d'abord été filtré à travers de la laine de verre, puis à travers un filtre millipore (0,2

La concentration de protéines déterminée par la méthode de Lowry a indiqué 154 mg de protéines dans le milieu de culture recueilli à partir de *A. terreus*. L'activité spécifique de l'enzyme cellulolytique dans le milieu de culture a été de 0,688 U/mg de protéine, puis le milieu de culture a été concentré dans un évaporateur rotatif à 17 mL. L'activité totale de la cellulase et la concentration de protéines dans la solution enzymatique concentrée étaient respectivement de 83,38 U et de 108,56 mg. L'analyse des protéines par électrophorèse de SDS-PAGE a montré neuf bandes de protéines avec des poids moléculaires de 17 à 120 kDa dans la solution enzymatique concentrée.

Les enzymes cellulolytiques de la solution enzymatique concentrée ont été d'abord isolées et purifiées par dessalement sur une colonne de Sephadex G-10. Les fractions contenant de



## Partie pratique

---

l'activité cellulolytique (150 mL) ont été recueillies et séchées. On a observé que la protéin solution (63,38 mg) contenait 64,54 unités d'activité totale de la cellulase. Ainsi, l'activité spécifique de la préparation enzymatique résultante était de 1,018 U/mg de protéin après dessalement. La masse de l'enzyme dessalée avait 60% de l'activité endoglucanase initiale

La poudre lyophilisée a été dissoute dans un tampon d'acétate de sodium (0,01 M, pH 4,9) pour isoler l'enzyme. Filtration de gel sur une colonne de TSK HW-55f a donné le profil d'élution

La séparation produit même des fractions protéiques. Les fractions protéiques contenant l'activité cellulase ont été combinées (59,82U/340 mL). La fraction combinée contenait 35,12 mg de protéine avec une activité cellulase spécifique de 1,70 U/mg. Le degré de purification était de 2,47 fois.

On a utilisé une chromatographie échangeuse d'ions pour purification supplémentaire sur une colonne de gel DEAE-TSK HW-650S qui a été préalablement équilibrée avec un tampon d'acétate de sodium (0,01 M, pH 4,9) avec élution par un gradient linéaire de NaCl (0-0,5 M) à un débit de flux de 30 mL/h. (Mirzaakhmedov et al., 2007)

**CONCLUSION!**

### **Conclusion :**

#### **Perspectives et conclusion futures**

Depuis deux décennies et demie, la communauté scientifique est au courant le rôle efficace des endophytes fongiques dans l'agriculture, l'écologie, la biotechnologie et industrie. Les endophytes fongiques sont également une alternative aux procédés industries existants de transformation de la biomasse lignocellulosique, possédant un grand potentiel d'application dans l'industrie lignocellulosique.

La capacité des enzymes hydrolytiques à synthétiser peut être employé dans les industries de fermentation enzymatique. Nouvelles techniques avancées la sensibilité est requise pour la quantification des enzymes, comme la spectrophotométrie par fluorescence les méthodes infrarouges à transformée proche et Fourier.

Les conséquences des enzymes générant des endophytes avec une attention particulière la dépollution des polluants environnementaux, tels que les métaux, les hydrocarbures polyaromatiques, et les hydrocarbures polychlorés, ont été minimisés au minimum. La production de métabolites secondaires présentant un intérêt pour l'industrie pharmaceutiques est un domaine de recherche très attrayant utilisant des méthodes biotechnologiques.

L'intégration la technologie de manipulation génétique pour faire progresser la recherche visant à reconnaître la réglementation gène/s de nombreuses voies de biosynthèse de la construction du métabolite peut conduire à une augmentation de la production de croissance des composés à utiliser pour le bien-être humain. La participation des endophytes fongiques au cycle des nutriments a des effets significatifs conséquences pour les organismes vivants et la santé humaine. Pour la recherche future, il y a encore de nombreux domaines à explorer, y compris les nouvelles technologies et les Nouvelles cultures avec des endophytes. Techniques modernes de biologie moléculaire, impliquant des métagénomés, les protéomes et les transcriptomes aideront à définir les caractéristiques des endophytes et trouver de nouveaux produits pour le développement industriel. L'avenir de la recherche l'endophyte est brillant, car la demande de produits pharmaceutiques et agricoles est forte augmente de jour en jour avec une population toujours croissante.

**Les**

**références**

## Les references

- 
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., Kursar, Agriculture and Agri-Food Canada (2003)
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., Kursar,
  - Abdullah S. K., Monfort E., Asensio L., Salinas J., Lopez Llorca L. V. et Jansson H. B., 2010. Soil mycobiota of date palm plantations in Elche, SE Spain. *Czech Mycology*, 61: 149-162.
  - Abekhti, A., K. Zarour, A. Boulal, Z. Benmechernene, M. and Kihal, 2013. Evaluation of Microbiological Quality of the Date Fruit Product “ Btana ” Produced in Adrar South Algeria, *Journal Of Microbiology Research*, 3(5): 163-170.
  - Adrio JL, Demain AL (2014) Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* 4:117–139
  - Ahmad F., Ahmad I., Aquil F., Khan M. S. et Hayat S., 2008. Diversity and potential of non-symbiotic diazotrophic bacteria in promoting plant growth. In: *Plant- Bacteria Interactions* (Ahmad, I., Pichtel, J. and Hayat, S.), ed., 81-82.
  - Aimene, W., & Benhizia, Y. (2018). Biodiversité de la flore bactérienne du palmier dattier poussant au sud est Algérien. Effet du climat sur le comportement de cette flore (Doctoral dissertation, univ constantine ).
  - Al -Shaikly, M. A. S., Al Dulaimi, A. (1986). Types of extent of microbial contamination in fresh iraqi dates during maturation. *The date palm*; 4(2): 205-220. In : Arfa, D.(2008). Suivi des Caractéristiques Microbiologiques et Physico-chimiques des Jus des Dattes Conservés par Irradiation Gamma. Rapport de projet de fin d'études.
  - Al-sheikh, H. (2009). Date-Palm Fruit Spoilage and Seed-Borne Fungi of Saudi Arabia. *Research Journal of Microbiology*; 4(5): 208-213.
  - Andrews, J.H., and Kenerley, C.M. 1978. The effects of a pesticide program of non-target epiphytic microbial populations on apple leaves. *Can. J. Microbiol.* 24: 1058–1072
  - Baptiste Clarke, 19 Octobre 2011, Inauguration du premier pilote de production d'agrocarburants de deuxième génération – 16/05/2021 , -<https://www.actu-environnement.com/ae/news/futurolog-agrocarburant-deuxieme-generation-13839.php4>
  - Ben Chobba I., Elleuch A., Ayadi I., Khannous L., Namsi A., Cerqueira F., Drira N., Gharsallah N. et Vallaeyts T., 2013. Fungal diversity in adult date palm (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 14: 1084-1099.

- **Benedykt W. and Katarzyana P. (2008). Regulation of bacterial protease activity. Cellular & Molecular Biology Letters, 13: 212-229**
  - **Buck, J.W., Lachance, M.-A., and Traquair, J.A. 1998. Mycoflora of peach bark: population dynamics and composition. Can. J. Bot. 76: 345–354**
  - **Caf Y, Valipour E, Arikan B (2014) Study on cold-active and acidophilic cellulase (CMCase) from a novel psychrotrophic isolate Bacillus sp. K-11. Int J Curr Microbiol App Sci 3:16–25**
  - **Cao Ronghua., Liu, X., Gao, K., Mendgen, K., Kang, Z., Gao, J., Dai, Y and Wang, X., 2009. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. Current Microbiology, 59: pp584-592**
  - **Cardona CA, Sánchez ÓJ. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. Bioresour Technol 2007; 98: 2415–2457**
  - **Chand-Goyal, T., and Spotts, R.A. 1996. Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. Postharvest Biol. Technol. 7: 51–64.**
  - **Chatterton S, Punja ZK (2009) Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. Can J Microbiol 55:356–367**
  - **continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 29:319-343.**
  - **Daddi Bouhoun M., Saker M. L., Ould El-Hadj M. D. et Brinis L., 2013. Impact of hydro-edaphic stress on rooting and productivity of “Deglet Nour” date palm of the Ouargla basin (Northern Algerian Sahara). First IS on Date Palm. Acta Horticultura. ISHS, 994: 93-97.**
  - **Del Río JC, Marques G, Rencoret J, Martínez A T, Gutiérrez A (2007) Occurrence of naturally acetylated lignin units. J Agric Food Chem 55:5461–5468**
  - **Denise J.(1992). Raffinage des corps gras. In : "Manuel des corps gras ", Paris. ISBN : -85206-662-9. P. 789-88.**
  - **Dickinson, C.H., and Wallace, B. 1976. Effects of late applications of foliar fungicides on activity of micro-organisms on winter wheat flag leaves. Trans. Br. Mycol. Soc. 67: 103–112**
  - **Dik, A.J., Fokkema, N.J., and van Pelt, J.A. 1991. Consumption of aphid honeydew, a wheat yield reduction factor, by phyllosphere yeasts under field conditions. Neth. J. Plant Pathol. 97: 209–232.**
- diversity estimates realistic? Biodiv Conserv 1999; 8: 977-1004.**
- **Djerbi, M. (1991). Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.): Voies de propagation des clones résistants au bayoud et de haute qualité dattière. CIHEAM - Option Méditerranéennes; 14: 31–38.**
  - **Dos Santos YQ, De Veras BO, De Franca AFJ, Górlach-Lira K, Velasques J, Migliolo L, Dos Santos EA (2018a) A new salt-tolerant thermostable cellulase from a marine Bacillus sp. strain. J Microbiol Biotechnol 28:1078–1085**
  - **Elad, Y., Köhl, J., and Fokkema, N.J. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. Phytopathology, 84: 1193–1200**

- El-Deeb H. M. et Arab A. Y., 2013. Acremonium as an endophytic bioagent against date palm Fusarium wilt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46: 1214-1221.
- Ellis D., Davis S., Alexiou H., Handke R. et Bartley R., 2007. *Descriptions of medical Fungi*. 2nd Edition. Nexus Print Solutions, Underdale, South Australia.

Enhancement of defense responses by *Clonostachys rosea* against *Botrytis cinerea* in

- FADHELA, Mohammed Mahmmoud . (2017). *Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.)* (Doctoral dissertation, ENSA).
- Fang W. et Leger R. J. S., 2012. Enhanced UV resistance and improved killing of malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi. *PLoS One*, 7 (8), e43069.
- Fang W., Leng B., Xiao Y., Jin K., Ma J., Fan Y., Feng J., Yang X., Zhang Y. et Pei Y., 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 363-370.
- Farrar K., Bryant D. et Cope-Selby N., 2014. Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnology Journal.*, 12: 1193-1206.
- Filonow, A.B., Vishniac, H.S., Anderson, J.A., and Janisiewicz, W.J. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biol. Control*, 7: 212–220.
- Fokkema, N.J., den Houter, J.G., Kosterman, Y.J.C., and Nelis, A.L. 1979. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 72: 19–29.
- Fokkema, N.J., Van de Laar, J.A.J., Nelis-Blomberg, A.L., and Schippers, B. 1975. The buffering capacity of the natural mycoflora of rye leaves to infection by *Cochliobolus sativus* and its susceptibility to benomyl. *Neth. J. Plant Pathol.* 81: 176–186.
- Fröhlich J, Hyde KD. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal  
from herbaceous plants and shrubs: effectiveness
- Gong, C.S., Maun C.M., et Tsao, G.T. (1981) Direct Fermentations of Cellulose to Ethanol by a Cellulolytic Filamentous Fungus *Monilia* sp. *Biotech. Lett.*, 3, 2, 131-144
- Grethlein, H.E. (1985), Acid Hydrolysis review. In *Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of Waste*, Ferraro, G.L., Ferranti, M.P., et Naveau, H., eds., Elsevier, Londres, 14.
- Grethlein, H.E. (1985), Acid Hydrolysis review. In *Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of Waste*, Ferraro, G.L., Ferranti, M.P., et Naveau, H., eds., Elsevier, Londres, 14.
- Grigorevski-Lima A, Da Vinha F, Souza D, Bispo A, Bon E, Coelho R, Nascimento R (2009) *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Appl Bio-chem Biotechnol* 155:18–26

- Gupta R., Beg Q. K. and Lorenz P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15-32.
- Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V (2013) A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Res In*
- Hakamada Y, Koike K, Yoshimatsu T, Mori H, Kobayashi T, Ito S (1997) Thermostable alkaline cellulase from an alka-liphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. *Extremophiles* 1:151–156
- Hakamada, Y., Y. Hatada, K. Koike, T. Yoshimatsu, S. Kawai, T. Kobayashi and S. Ito. 2000. Deduced amino acid sequence and possible catalytic residues of a thermostable, alkaline cellulase from an alkaliphilic *Bacillus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,64(11):2281-2289.
- Hamad, S. H., Saleh, F. A., Al-Otaibi, M. M. (2012). Microbial Contamination of Date Rutab Collected from the Markets of Al-Hofuf City in Saudi Arabia. *The Scientific World Journal*, 1–4.
- Hasnaoui, A.M., A. Elhoumaizi, A. Asehrou, M. Sindic, C. Deroanne and A. Hakkou, 2010. Chemical composition and microbial quality of dates grown in Figuig oasis of Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(2): 311-314
- He R., Wang G. et Liu X., 2009. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. *African Journal of Biotechnology*, 8 (2): 191- 195
- Hendriks AT, Zeeman G (2009) Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 100:10–18.
- Hislop, E.C., and Cox, T.W. 1969. Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves. *Trans. Br. Mycol. Soc.*52:223–235  
<http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html> (25/05/2003).
- Kerstiens, G. (1996). Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of experimental botany*; 47(305), 1813–1832
- Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011) Microbial cellulases and
- Kusari S. et Spiteller M., 2012. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In *Metabolomics*, U. Roessner, ed. (Rijeka, Croatia: InTech), 241-266.
- Kusube M, Sugihara A, Moriwaki Y, Ueoka T, Shimane Y, Minegishi H (2014) *Alicyclobacillus cellulolyticus* sp. nov., a thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from steamed Japanese cedar chips from a lumbermill. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:2257
- Lambais, M. R., Crowley, D. E., Cury, J. C., Rodrigues, R. R. (2006). Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. *Science AAAS*; 6-16
- Lee JP, Seo G-W, An S-D, Kim H (2017) A cold-active aci-dophilic endoglucanase of *Paenibacillus* sp. Y2 isolated from soil in an alpine region. *J Appl Biol Chem* 60:257–263
- Lindow, S. E., Brandl, M. T.(2003). *Microbiology of the Phyllosphere*. *Applied and environmental microbiology*; 69(4):1875-1883
- Lokhande, S., &Pethe, A. S. (2017). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production. *International J. of Life Sciences*,5(2), 277-282



- Lopez-Llorca L. V. et Maciá-Vicente J. G., 2009. Plant symbioses with fungal endophytes: perspectives on conservation and sustainable exploitation of Mediterranean ecosystems. *Mediterranea. Serie de Estudios Biologicos*, 20: 10-47.
- Maciá-Vicente J. G., Jansson H. B., Abdullah S. K., Descals E., Salinas J. et LopezLlorca L. V., 2008a. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. *FEMS Microbiol Ecol.*, 64: 90-105.
- Marlida Yetti 2001 ISOLATION AND PURIFICATION OF RAW STARCH DEGRADING ENZYME FROM ENDOPHYTIC FUNGI AND ITS APPLICATION FOR GLUCOSE PRODUCTION , Thesis Submitted in Fulfilment of the Requirement for the Degree of Doctor of Philosophy in the Faculty of Food Science and Biotechnology Universiti Putra Malaysia
- McBride, R.P., and Hayes, A.J. 1977. Phylloplane of European larch. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69: 39–46.
- McLaughlin, R.J., Wilson, C.L., Droby, S., Ben-Arie, R., and Chalutz, E. 1992. Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Dis.* 76: 470–473.
- Mefteh FB, Daoud A, Chenari Bouket A, Alenezi FN, Luptakova L, Rateb ME, Kadri A, Gharsallah N and Belbahri L (2017) Fungal Root Microbiome from Healthy and Brittle Leaf Diseased Date Palm Trees (*Phoenix dactylifera* L.) Reveals a Hidden Untapped Arsenal of Antibacterial and Broad Spectrum Antifungal Secondary Metabolites. *Front. Microbiol.* Laboratory of Plant Biotechnology, Faculty of Science, University of Sfax, Sfax, Tunisia
- MEUNIER N., 1999. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 168 pages.
- Mirzaakhmedov, S.Y., Ziyavitdinov, Z.F., Akhmedova, Z.R. et al. Isolation, purification, and enzymatic activity of cellulase components of the fungus *Aspergillus terreus* . *Chem Nat Compd* 43, 594–597 (2007).
- Mohamed Mahmoud F, Krimi Z, Maciá-Vicente JG, Brahim Errahmani M, Lopez-Llorca LV (2017) Endophytic fungi associated with roots of date palm (*Phoenix dactylifera*) in coastal dunes. *Rev Eberroam Mycol* 34(2):116–120
- Morris, C., Kinkel, L. (2002). Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields, p. 365–375. In: Lindow, S. E., Brandl, M. T. *Microbiology of the Phyllosphere. Applied and environmental microbiology*, 69(4): 1875–1883
- Mouekouba L. D. O, Wang A., Zhang Z., Erinle K. O., Chen X. et Wang A., 2013.
- Mukherjee A. K., Adhikari H. and Rai S. K. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 39: 353-361

- of surface sterilization methods. *Mycol. Res.*, 97(12): 1447-1450
- Ogier, J. C., Leygue, J. P., Ballerini, D., Pourquoi, J., & Rigal, L. (1999). Production d'ethanol a partir de biomasse lignocellulosique. *Oil & Gas Science and Technology*, 54(1), 67-94.
  - Okeke BC, Hall RW, Nanjundaswamy A, Thomson MS, Deravi Y, Sawyer L, Prescott A (2015) Selection and molecular characterization of cellulolytic–xylanolytic fungi from surface soil-biomass mixtures from Black Belt sites. *Microbiol Res* 175:24–33
  - Onofre et al. (2013)
  - Petrini O., 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves* (eds) Andrews J. H. et Hirano S. S., Springer-Verlag, New York, New York (U.S.A), 179-197
  - Pinnoi, A., Lumyong, S., Hyde, K.D. and Jones, E.B.G. (2006). Biodiversity of fungi on the palm *Eleiodoxa conferta* in Sirindhorn peat swamp forest, Narathiwat, Thailand. *Fungal Diversity* 22: 205-218.
  - Pinruan, U., Hyde, K.D., Lumyong, S., McKenzie, E.H.C. and E.B.G. Jones (2007). Occurrence of fungi on tissues of the peat swamp palm *Licuala longicalycata*. *Fungal Diversity* 25: 157-173
  - POKORNY J. (2003). Problème de stabilité des produits alimentaires liés à la présence des lipides. In: *Lipides et corps gras alimentaires*. Edition: Tec& Doc, Lavoisier, Paris. PP: 51-74
  - Potshangbam Momota 2017 Functional Characterization of Endophytic Fungal Community Associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. Department of Biotechnology, Microbial Resources Division, Institute of Bioresources and Sustainable Development, Imphal, India
  - Ragab, W.S.M., Ramadan, B.R., Abdel-Sater, M.A. (2001). Mycoflora and Aflatoxins Associated with Saidu Dates as Affected by Technological processes. The Second International Conference on Date Palms, pp. 409-421.
  - Reddy L. V., Wee Y.-J., Yun J.-S. and Ryu H.-W. (2008). Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Placket Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*, 99: 2242-2249
  - Rivas R, García-Fraile P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. Characterization of xylanolytic bacteriapresent in the bractphylosphere of the date palm *Phoenix dactylifera*. *LettApplMicrobiol*. 2007 Feb;44(2):181-7.
  - Rosenblueth, M. and Martinez-Romero, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol PlantMicrobe Interact* 19, 827–837.
  - Rungjindamai, N., Pinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T. and Jones, E.B.G. (2008). Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. *Fungal Diversity* 33: 139-161
  - S. Imman, J. Arnthong, V. Burapatana, V. Champreda, and N. Laosiripojana, “Effects of acid and alkali promoters on compressed liquid hot water pretreatment of rice straw,” *Bioresource Technology*, vol. 171, pp. 29–36, 2014
  - Saikkonen K., Faeth S., Helander M. et Sullivan T., 1998. Fungal endophytes: A

- Saikkonen K., Saari S. et Helander M., 2010. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi ? *Fungal Divers.*, 41: 101-113.
- Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A., 2005a. Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, 17; 165–179.
  - Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S., Aust, H.J., 1993. Endophytes
- Shenasi, M., K.E. Aidoo and A.A.G. Candlishm, 2002. Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. *Int. J. Food. Microbiol.*, 79(1-2):113-119.
- Sheng Li Z. et Li Z., 2010. Antagonism of *Beauveria bassiana* against Two *Fusarium* spp. Pathogenic to Cotton, Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Heifei (China).
- Siala R., Ben Chobba I., Vallaeyts T., Triki M. A., Jrad M., Cheffi M., Ayedi I., Elleuch A., Nemsi A., Cerqueira F., Gdoura R., Drira N. et Gharsallah N., 2016. Analysis of the cultivable endophytic bacterial diversity in the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and evaluation of its antagonistic potential against pathogenic *Fusarium* species that cause date palm bayound disease. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 4: 93-104.
- Southwell, R.J., Brown, J.F., and Welsby, S.M. 1999. Microbial in-teractions on the phylloplane of wheat and barley after applications of mancozeb and triadimefon. *Australas. Plant Pathol.*28: 139–148
- Sturz, A.V., and J. Nowak, 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15: 183
- Subramaniyan S, Prema P (2002) Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit Rev Biotechnol* 22:33–64
- T.A., 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.*, 3:267-274.
- T.A., 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecol. Lett.*, 3:267-274.
- Thapa S et al (2019) Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Mol Biotechnol* 61:579–601
- their industrial applications. *Enzyme Res tomatoes. Agric Sci.*, 4: 709-714.
- Umar, Z.D., Bilkisu, A. and Bashir, A. (2014). Bacteriological analysis of date palm fruits sold in katsina metropolis. *International journal of environment (IJE)*; 3(2): 205–215.
- Wang X., 2009. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro, Springer Science and Business Media.
- Watanabe T., 1994. Pictorial atlas of soil and seed fungi morphologies of cultured fungi and key to species. Second edition, 506 p
- Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D., Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*; 105(6):1744–1755
- Wilkesman J. and Kurz L. (2009). Protease Analysis by Zymography: A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*, 3: 175-184
- Yousef et al. 2019

# RÉSUMÉ

## Résumé

La biomasse lignocellulosique représente l'une des ressources renouvelables les plus abondantes de la planète, et bien sûr la moins chère. Notre travail présente les connaissances sur les enzymes d'origines microbienne et naturelles utilisées dans la valorisation de la biomasse agricole par bioconversion et transformation.

Nous avons visé en premier ordre les cellulases et les pectinases et les domaines de leur application, leur importance économique ainsi que les recherches actuelles faites sur ces substances d'origines microbiennes. Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne, leurs méthodes d'obtention diffèrent selon leur source. Leur production nécessite la préparation de milieux à moindre coût, car le coût estimé des milieux de croissance connus représente entre 30 à 40% du coût de la production industrielle d'enzymes.

**Les mots clés :** biomasse lignocellulosique , les enzymes , les pectinases , production industrielle d'enzymes

## Abstract

Lignocellulose biomass represents one of the most abundant renewable resources on the planet, and of course the cheapest. Our work presents knowledge on enzymes of microbial and natural origin used in the valorization of agricultural biomass by bioconversion and transformation.

We focused primarily on cellulose and pectinases and their areas of application, their economic importance as well as current research on these substances of microbial origin. Industrial enzymes come from plant, animal or microbial sources, their methods of obtaining differ according to their source. Their production requires the preparation of media at lower cost, since the estimated cost of known growth media represents between 30 to 40% of the cost of industrial production of enzymes.