

## Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée

Lekchiri.S., Moueqqit.M.,Lekchiri.A

Laboratoire de Biochimie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed I<sup>er</sup>, Oujda.

[Lekchirisouad@yahoo.fr](mailto:Lekchirisouad@yahoo.fr)

### Résumé

Différents champignons filamenteux ont été cultivés sur milieux liquide enrichi de cellulose (purifiée à partir de la sciure du bois) comme seule source de carbone afin d'isoler les souches les plus productrices de cellulases.

Les sucres réducteurs, libérés par l'activité de la cellulase, sont dosés dans des aliquotes de milieu de culture, à pH=5 et à une température de 50 °C, à l'aide d'enzymes auxiliaires (glucose oxydase, peroxydase) et d'ABTS (2,2 Azino-bis 3-ethyl benz-thiazoline-6-sulfonique acid diammonium salt). Ce dernier (accepteur de peroxyde) donne une coloration verte mesurable à 420 nm en présence de glucose ou cellobiose.

L'activité enzymatique la plus importante a été observée chez les souches d'*Aspergillus niger* et *Trichoderma harzanium* productrices de cellulases. Nos résultats concordent donc avec ceux de la littérature. Par ailleurs, le *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (F.o.a) présente une activité cellulase mais relativement faible comparée aux souches précitées.

**Mots clés :** Cellulose, Cellulase, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Trichoderma harzanium*.

### Introduction

La cellulose est le constituant majeur des cellules végétales. C'est un polymère linéaire d'unités anhydroglucose liées entre elles par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -1-4 (Gielkens *et al.*,1999). La biodégradation de la cellulose est un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur Terre. Elle est assurée par des organismes cellulolytiques qui secrètent à cet effet des enzymes aux propriétés très particulières, les cellulases. Ces enzymes peuvent être classées en trois types :

Endoglucanases (Endo  $\beta$ -1-4- glucanase, EC 3.2.1.4),  
Exoglucanase ou cellobiohydrolases

(exo- $\beta$ -1-4-glucanase, EC 3.2.1.91) et Cellobiases ou  $\beta$ -glucosidases ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC.3.2.1.21). Les endoglucanases sont capables de rompre les liaisons internes de la chaîne cellulosique. L'attaque se fait au hasard et entraîne une libération des sucres réducteurs. Les exoglucanases attaquent les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libèrent exclusivement du cellobiose. Les cellobiases attaquent la liaison  $\beta$ -glucosidique du cellobiose et libèrent deux molécules de glucose (Onsori *et al.*, 2004).

Dans ce présent travail nous allons utiliser la cellulose hydrosoluble purifiée comme seule source de carbone

pour la croissance fongique afin de montrer que cette forme de cellulose joue un rôle inducteur pour les cellulases et pour apporter une nouvelle contribution dans le domaine de screenig des souches cellulolytiques.

### Matériel et Méthodes

#### 1-Cellulose

La cellulose utilisée dans ces expériences est purifiée à partir de la sciure du bois. C'est une cellulose qui se disperse bien dans un milieu aqueux (jusqu'à 2 %) et qui peut cristalliser dans certaines conditions pour donner des macrocristaux hydratés de cellulose (Fig 1).

Les macrocristaux sont évaporés (par séchage à l'étuve) pour donner une poudre blanchâtre (Fig 2) de cellulose directement utilisable dans les milieux de culture (solide ou liquide).

#### 2-Materiel fongique

Les champignons filamenteux (*Aspergillus niger* et *Trichoderma harzanium*) testés pour leur activité cellulastique proviennent du Laboratoire de Mycologie de la Faculté de Pharmacie de Lyon, la souche de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* a été isolée à partir du palmier dattier infecté (*Phoenix dactylifera*.L) tandis que la souche (X) provient d'une culture à

partir d'un échantillon de sol.

### 3- Milieux de culture

#### 2-1-Milieu Cellulose- Agar

Les conidiospores obtenus à partir des cultures sur milieu solide Potato Dextrose Agar (PDA) ont été repiquées sur milieu solide Cellulose -Agar. Ce milieu contient :  $\text{NaNO}_3$  2g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g, KCl 0,5g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,005g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,001g,  $\text{MnCl}_2$  0,001g, Cellulose 2,5g, Agar 16 g, 1000 ml d'eau distillée, pH 5.

#### 2-2-Milieu liquide

Les conidiospores obtenus à partir du milieu cellulose-agar sont repiquées sur milieu liquide modifié de Czapek et Dox qui contient ( $\text{NaNO}_3$  2g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g, KCl 0,5g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,005g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,001g,  $\text{MnCl}_2$  0,001g, Cellulose 2,5g, Tween 80 2ml, 1000ml d'eau distillée), pH 5. Ce milieu a été réparti dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu et les cultures en été maintenues à 25°C sous agitation pendant 72 heures.

### 4- Activité cellulasique :

Les cellulases sont dosées par la glucose oxydase qui permet de doser aussi bien le glucose que le cellobiose.

L'hydrolyse de la cellulose libèrent les sucres (glucose ou cellobiose) qui en présence d'une glucose oxydase produit du peroxyde. Ce dernier réagit à son tour avec l'ABTS (2,2 Azino-bis 3-ethyl benz-thiazoline-6-sulfonique acid diammonium salt) en présence de peroxydase de Raifort, pour donner un dérivé coloré vert qui absorbe à 420 nm (Grano et al., 2004). Le dosage est effectué à pH 5 et à 40 °C à partir de 4 ml de filtrat de la culture incubé durant 4 h.

Une gamme étalon a été réalisée avec du glucose afin d'exploiter nos résultats.

## Résultats et discussion

### 1-Développement des souches sur milieu sélectif cellulose Agar

Dans les résultats présentés dans la figure 3, on peut constater que les souches de *Trichoderma harzanium* et *Aspergillus niger* se développent bien sur ce milieu sélectif à base de cellulose purifiée tandis que le *Fusarium* croit de manière plus lente, par opposition la souche X qui présente une croissance presque nulle dans ce milieu. Ce test est utilisé comme un test préliminaire de screening pour isoler des souches productrices de cellulases.

On peut conclure que la cellulose utilisée a induit la sécrétion des cellulase chez les souches étudiées (*T harzanium*, *A niger* et le *Fusarium*) excepté la souche X. Ces trois souches sont déjà connues dans la littérature comme productrices de cellulases ( Roussos et Raimbault, 1982).

### 2-Hydrolyse de la cellulose en milieu liquide

Nous avons testé la croissance de diverses souches de champignons filamenteux sur un milieu liquide Czapek-Dox modifié en utilisant la cellulose comme unique source de carbone et d'énergie.

Le développement de la masse fongique dans les erlenmeyers de culture concorde avec l'activité cellulase dosée dans le filtrat du milieu de culture (Fig 4 et 5). Les meilleures activités sont obtenues avec les souches *Trichoderma harzanium* et *Aspergillus niger*. Le *Fusarium oxyporum f.sp albedinis* présente une activité cellulase relativement moindre par rapport aux souches précitées. Pour la souche X, on note une activité presque nulle et donc cette souche n'a pas pu se développer sur ce milieu à base de cellulose (voir tableau ci-dessous).

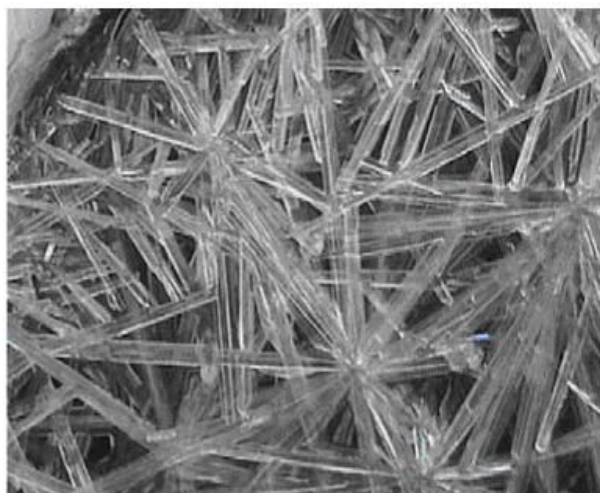


Fig 1 : Cellulose hydratée macrocristalline

Fig 2 : Cellulose déshydratée

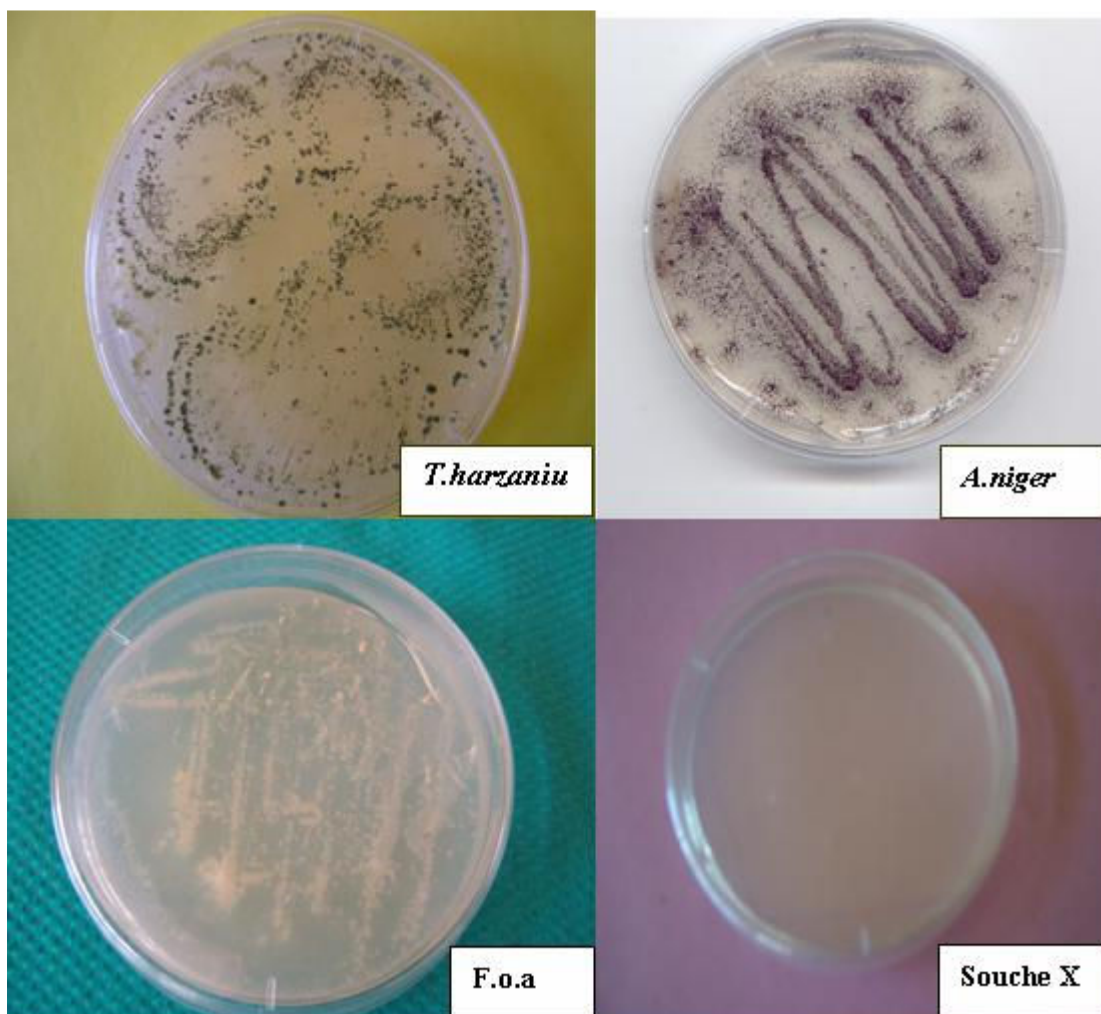


Fig 3 : Photos de différentes souches de champignon filamenteux cultivées sur milieu solide Cellulose-agar.



Fig 4 : Culture des différentes souches sur milieu liquide Czapek-dox modifié

T : Témoin, 1- *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, 2-*A. niger*, 3-Souche X 4-*T.harzanium*.

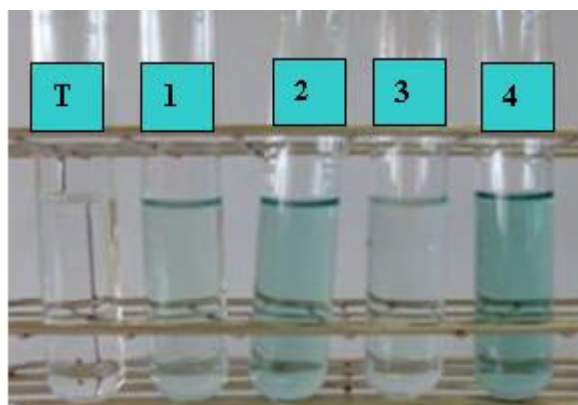


Fig 5 : Dosage du filtrats des différentes souches

Tableau : Tableau comparatif des densités optiques de différentes souches fongiques

Souches fongiques	<i>Fusarium oxysporum f.sp albedinis</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Souche X	<i>Trichoderma harzanium</i>
DO à 420 nm)	0.21	0.46	0.06	0.60
Equivalent glucose en $\mu\text{M}$	40	86	14	110

Dans le milieu liquide comme dans le milieu solide, il y'a croissance de *Trichoderma harzanium*, *Aspergillus niger* et *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*(F.o.a). Cela confirme bien que notre cellulose joue un rôle d'inducteur et source de carbone surtout pour les souches de *Trichoderma* et d'*Aspergillus* qui sont très utilisées dans le domaine industriel pour leur production importante de cellulases (Nighat 2004, Fadel,2000).

### Conclusion

D'après les résultats obtenus , on peut conclure que notre cellulose joue un rôle d'inducteur des cellulases et peut être utilisé comme seule source de carbone pour la croissance des champignons filamenteux productrices de cellulases comme *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *A. niger* et *T. harzanium*. D'autre part l'activité cellulase mise en évidence chez F.o.a peut contribuer à la compréhension des mécanismes biochimiques de la pathogénie de ce champignon. Donc on peut proposer comme hypothèse que le champignon en contact avec la lignocellulose du Palmier dattier induit en premier les cellulases qui vont libérer des sucres réducteurs en particulier du glucose nécessaire à la croissance du champignon. Par la suite d'autres enzymes seront induites (Glucose oxydase qui libère le peroxyde, ce dernier est utilisé ensuite par les ligninases pour dégrader la lignine.).

Le milieu sélectif solide et liquide à base de cellulose purifiée que nous avons utilisé nous a permis de mettre en évidence l'activité cellulase dans des souches connues dans la littérature comme productrices de cette enzyme (*Trichoderma* et

*Aspergillus*).

### Bibliographie

- Fadel.M. 2000.Production physiology of cellulases and glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions.Microb.cheme.1(5) :401-411.
- Gielkens MMC., Dekkers Evisser J et Graaff LH .1999. Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XInR for their expression. Appl environ.Microbiolo.65.(10) 43-45.
- Gruno, M., Valjamae, P., Pettersson, G et Johansson, G.2004.Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulose by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate.Biotechnology and bioengineering.86,503-511.
- Nighat, A., Faraoq, L.,Sibtain, H et Amer, J. 2004.Molecular cloning of glucosidase gene from *Trichoderma harzanium*.Biotechnol.3(1).63-66.
- Onsori H,Zamani RM., Motallebi M., Zarghami N.2004 Identification of over producer strain of endo- $\beta$ -1-4-glucanase in *Aspergillus* Species: Characterization of crude carboxymethyl cellulase.Biotechnol Vol.4(1),pp.26-30.
- Roussos S ., Raimbault M.1982 Hydrolyse de la cellulose par les moisissures.Ann,Microbiol.(Institut Pasteur),133B,455-464.