

Université Sidi Mohamed Ben Abdallah
Faculté des Sciences et Techniques



Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat National

UFR Biotechnologie Microbienne

Spécialité Biotechnologie

TB
267

**Expertise : Isolement, Identification et lutte contre les
microorganismes impliqués dans la biodégradation du
bois de l'ancienne Médina de Fès**

Par Mourad ZYANI

Soutenue le 15 Juin 2013, devant le jury composé de :

C. EL MODAFAR, Faculté des Sciences et Techniques-Marakech	Président
A. EL MOUSADAK, Faculté des Sciences -Agadir	Rapporteur
A.REMMAL, Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-Fès	Rapporteur
K. F. BENBRAHIM, Faculté des Sciences et Techniques-Fès	Rapporteur
R. BENSLIMANE, Ecole Supérieure de Technologie - Fès	Examineur
N. EL GHACHTOULI, Faculté des Sciences et Techniques-Fès	Examinatrice
S. K. IBNSOUDA, Faculté des Sciences et Techniques-Fès	Directeur de thèse

Résumé

Les Monuments historiques de la ville de Fès sont menacés par différents agents d'altérations, parmi lesquels la biodétérioration sous l'effet d'organismes vivants tels que les bactéries, les levures et les champignons provoquant ainsi des dégradations massives. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des microorganismes participant à cette dégradation notamment celle du bois. Ces microorganismes partagent une stratégie unique de dégradation des polymères du bois, en sécrétant des enzymes qui décomposent les principaux constituants du bois tels la cellulose et la lignine. Dans cette étude, nous avons isolé 36 souches à partir des six échantillons du bois et qui ont fait l'objet d'une détermination de la production d'enzymes cellulolytique et lignolytique. Le test de pourriture a montré que les champignons isolés sont capables de provoquer des pourritures (brune et blanche) sur des fragments de bois, chose qui confirme leurs participation à la dégradation des monuments historiques essentiellement le bois. L'identification de ces souches a reposé sur l'observation microscopique et morphologique, l'identification biochimique et l'identification moléculaire. Les résultats obtenus montrent, que les champignons appartiennent principalement au genre *Penicillium* et *Cladosporium*, et les bactéries appartiennent tous au genre *Bacillus*. La souche *Thielavia hyalocarpa* a été décrite pour la première fois comme agent destructeur du bois.

Deux méthodes de lutte biologique (huiles essentielles et antagonistes) contre les champignons destructeurs du bois ont été étudiées, ces dernières ont donné des résultats satisfaisants. Les cinq huiles essentielles testées possèdent une activité antifongique contre les champignons destructeurs du bois de la médina de Fès (*Thielavi hyalocarpa*, *Cladosporium cladosporidies*, *Penicillium commune*, *Penicillium expansum* and *Penicillium chrysogenum*). Les deux huiles *O. compactum* et *E. caryophyllata* ainsi que les huiles mélangées ont montré une inhibition maximale de la croissance fongique par rapport au témoin démontrée in vitro et in vivo. Cependant, pour les souches d'actinomycètes testées, elles se sont toutes révélées inhibitrices de la croissance fongique, mais le degré d'inhibition varie selon la souche d'actinomycète et le champignon en question.

Mots clés : Bois, biodégradation, Champignons, Huiles essentielles, Antagoniste, actinomycète.

Abréviation	
Liste des Figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	1
Revue Bibliographique	
<hr/>	
I Formation et composition chimique du bois.....	4
I.1 Constitution du matériau bois.....	4
I.2 Composition chimique du bois.....	5
I.3 Composantes macromoléculaires du bois.....	7
I.3.1 La cellulose.....	7
I.3.2 Les hémicelluloses.....	9
I.3.3 La lignine.....	10
I.3.4 Les extractibles.....	12
I.3.4.1 Les Terpènes et terpénoïdes.....	13
I.3.4.2 Les glycérides, les cires et leurs constituants.....	13
I.3.4.3 Les constituants phénoliques.....	14
II Les mécanismes de dégradation des principaux composants du bois.....	15
II.1 Les cellulases.....	15
II.1.1 Les cellulase bactériennes.....	17
II.1.2 Les Cellulases Fongiques.....	19
II.2 Les enzymes de dégradation des hémicelluloses.....	22
II.3 Les enzymes de dépolymérisation de la lignine.....	23
II.3.1 Les microorganismes ligninolytiques et les conditions d'expression du système ligninolytique.....	23
II.3.2 Les Enzymes du système ligninolytique.....	25
II.3.2.1 Les lignine peroxydases (LiPs).....	26
II.3.2.2 Les manganèse peroxydases (MnPs).....	27
III La détérioration du bois.....	28
III.1 La détérioration mécanique.....	28
III.2 La détérioration par les agents biologiques.....	29
III.2.1 L'altération du bois par les insectes.....	29
III.2.2 L'altération par les microorganismes.....	30
III.2.2.1 Les bactéries du bois.....	30
III.2.2.2 Les champignons du bois.....	31
III.2.2.2.1 La pourriture brune du bois.....	32
III.2.2.2.2 La pourriture blanche du bois.....	35
III.2.2.2.3 La pourriture molle du bois.....	37
III.2.2.2.4 La pourriture rouge du bois.....	38
III.2.2.2.5 L'échauffure du bois.....	39
III.2.2.2.6 Les champignons du bleuissement du bois.....	39
III.2.2.3 Les Conditions de développement.....	40

IV Préservation du bois.....	41
IV.1 Préservation du bois par imprégnation de produits chimiques	41
IV.1.1 Le cuivre	42
IV.1.2 Le bore.....	42
IV.2 Traitements curatifs.....	42
IV.2 Préservation du bois par méthode biologique	43
V Les huiles essentielles.....	44
V.1 Définition.....	44
V. 2 Les activités biologiques.....	44
V.3 Mode d'action des huiles essentielles.....	46
 Matériel et Méthodes	
<hr/>	
Chapitre I : Isolement et Identification des microorganismes impliqués dans la biodégradation du bois de l'ancienne Médina de Fès	
I Prospection et échantillonnage.....	47
II Préparation des milieux de culture	48
III Isolement des microorganismes	48
IV Mise en évidences des microorganismes doués d'activités cellulase :	
IV.1 Criblage des souches capables de pousser sur milieu à base de cellulose MC	
IV.1.1 Préparation des milieux de culture révélant l'activité cellulase.....	49
IV.1.2 Mesure de l'activité Cellulase.....	49
IV.1.2.1 Mesure de l'activité CMC	51
IV.1.2.2 Mesure de l'activité FPUase	51
IV.2 Détermination de l'activité spécifique.....	53
IV.2.1 Principe.....	53
IV.2.2 Gamme étalon de protéines : préparation et dosage	53
IV.2.3 Mode opératoire.....	53
V. Mise en évidences des microorganismes doués d'activités ligninolytique.....	54
V.1 Criblage des souches capables de dégrader la lignine.....	54
V.2 Criblage des souches capables de produire la peroxydase.....	54
V.3 Analyse colorimétrique de l'activité ligninolytique.....	54
V.3.1 Principe.....	54
V. 3.2 Réactifs.....	55
V.3.3 La Mesure de l'absorbance.....	55
V.4 Test de la pourriture.....	56
VI. Identification des microorganismes capable de dégrader le bois.....	56
VI.1 observation microscopique et coloration de Gram.....	56
VI.2 Test de température.....	57

VI.3 Traitement thermique.....	57
VI.4 Résistance au NaCl.....	57
VI.5 Hydrolyse de l'amidon.....	58
VI.6 Hydrolyse de la pectine.....	58
VI.7 Test catalase.....	59
VI.8 Identification moléculaire.....	59
VI.8.1 Extraction de l'ADN génomique.....	59
VI.8.2 Amplification de l'ADNr 5,8S (levures, champignons) et ADNr 16S pour les bactéries par PCR.....	60
VI.8.2.1 Protocole de PCR.....	60
VI.8.2.2 Amorces utilisées.....	60
VI.8.3.3 Mélange réactionnel.....	60
VI.8.3.4 Amplification.....	61
VI.8.4 Electrophorèse sur gel d'agarose.....	62
VI.8.4.1 Préparation du gel.....	62
VI.8.4.2 Dépôt des produits d'amplification.....	62
VI.8.4.3 Migration.....	62
VI.8.4.4 Visualisation.....	62
IV.8.5.2 Lavages.....	63
IV.8.5.3 Elution de l'ADN.....	63
IV.8.5.4 Réaction de séquençage.....	63
IV.8.5.5 PCR de séquence.....	63
IV.8.5.6 Amplification.....	64
IV.8.5.8 Analyse informatique des séquences.....	65

Chapitre II : Lutte contre les microorganismes impliqués dans la biodégradation du bois de l'ancienne Médina de Fès par l'application des Huiles essentielles

I. Lutte par utilisation des huiles essentielles (HE)	66
I.1 Composition chimique.....	66
I.2 La technique de diffusion sur disques (Aromatogramme)	67
I.3 Les microatmosphères ou méthode en phase vapeur.....	69
I.4 La méthode des dilutions sur milieu solide	69
I.5 La méthode des microdilutions ou micro-méthode.....	70
I.6 La méthode d'exposition à la vapeur des HE.....	70
I.7 Test de lutte par les huiles essentielles in vivo.....	70

Chapitre III : Lutte contre les microorganismes impliqués dans la biodégradation du bois de l'ancienne Médina de Fès par l'effet antagoniste des actinomycètes.

I Mise en évidence de l'effet antagoniste des actinomycètes.....	72
I.1 Les souches d'actinomycètes étudiées.....	72
I.2 Milieu de culture	72
I.3 Criblage des actinomycètes doués d'activités antifongiques.....	72

I.3.1 Confrontation des actinomycètes et des champignons	72
I.3.2 La méthode des disques d'agar	73
I.3.3 La méthode de diffusion sur disques	73

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre I : Isolement et Identification des microorganismes impliqués dans la biodégradation du bois de l'ancienne Médina de Fès

INTRODUCTION.....	74
BUT DU TRAVAIL.....	74
I Résultats des isolements des différents sites en bois de l'ancienne Médina de Fès	
II Mise en évidence des microorganismes doués d'activités cellulase.....	76
II.1 Criblage des souches capables de pousser sur milieu à base de cellulose.....	76
II.2 Mise en évidence des microorganismes doués d'activité cellulase.....	78
II.3.2 Mesure de l'activité FPUase.....	81
II.4 Effet de substrat sur l'activité cellulase.....	82
II.5 Détermination de l'activité spécifique.....	83
III Mise en évidence des microorganismes doués d'activités ligninolytique.....	84
III.1 Criblage des souches capables de dégrader la lignine.....	84
III.2 Analyse colorimétrique de l'activité ligninolytique.....	84
III.3 Criblage des souches capables de produire la peroxydase.....	85
III.4 Test de la pourriture du bois.....	86
VI Identification des microorganismes destructeurs du bois.....	87
VI.1 Observation microscopique et coloration de Gram.....	87
VI.2 Test de Température.....	88
VI.3 Résultats des tests biochimiques.....	90
VI.4 Identification moléculaire.....	91
VI.4.1 Amplification de l'ADNr 16S et l'ADNr 5.8S par PCR.....	91
VI.4.2 Purification des produits PCR.....	92
VI.4.3 Séquençage.....	92
VI.4.4 Analyse informatique des séquences.....	92
VI.4.4.1 Identification de la souche PDL 2'	93
VI.4.4.2 Identification de la souche PDL f1.....	94
VI.4.4.3 Identification de la souche PDL d1.....	94
VI.4.4.4 Identification de la souche PDLb1.....	94
VI.4.4.5 Identification de la souche d'.....	95
VI.4.4.6 Identification de la souche e9.....	95
VI.4.4.7 Identification de la souche PDLd11.....	96
VI.4.4.8 Identification de la souche PDLd10.....	96
VI.4.4.9 Identification de la souche PDLd8.....	97
VI.4.4.10 Identification de la souche PDLf4.....	97

VI.4.4.11 Identification de la souche PDLC'	98
CONCLUSION.....	99

Chapitre II : Lutte contre les microorganismes impliqués dans la biodégradation du bois de l'ancienne Médina de Fès par l'application des Huiles essentielles

INTRODUCTION.....	100
BUT DU TRAVAIL.....	100
I L'activité antifongique des cinq huiles essentielles.....	101
II La réponse des champignons aux vapeurs des huiles essentielles.....	103
III Test de lutte par les huiles essentielles in vivo	104
CONCLUSION.....	105

Chapitre III : Lutte contre les microorganismes impliqués dans la biodégradation du bois de l'ancienne Médina de Fès par l'effet antagoniste des actinomycètes.

INTRODUCTION.....	106
BUT DU TRAVAIL.....	106
I Criblage des actinomycètes doués d'activités antifongiques.....	107
I.1 Confrontation des actinomycètes et des champignons.....	107
I.2 Estimation de l'activité antifongique.....	108
CONCLUSION.....	109

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	110
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	114
ANNEXES.....	128