



*THÈSE*

*Présentée pour l'obtention du diplôme de*

*DOCTORAT NATIONAL*

*UFR: Biotechnologie*

*Spécialité : microbiologie*

*Par*

**ELHARCHLI ELHASSAN**

***Caractérisation des tanneries traditionnelles de la ville  
de Fès et isolement de levures lipolytiques***

*Soutenue le 14 Juin 2013*

**Memres de jury :**

<b>Pr. IRAQUI HOUSSAINI Mohammed</b>	<b>P.E.S</b>	<b>F.S.T Fès</b>	<b>Président</b>
<b>Pr. EL MODAFAR Cherkaoui</b>	<b>P.E.S</b>	<b>F.S.T Marrakech</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. MERZOUKI Mohammed</b>	<b>P.E.S</b>	<b>F.S.D.M Fès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. HAGGOURD Abdellatif</b>	<b>P.E.S</b>	<b>F.S.T Fès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. EL MOUSADIK Abdelhamid</b>	<b>P.E.S</b>	<b>F.S Agadir</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr. IBNSOUDA KORAICHI Saad</b>	<b>P.E.S</b>	<b>F.S.T Fès</b>	<b>Directeur de thèse</b>

## *RESUME*

L'ensemble d'opérations réalisées lors du tannage traditionnel transforment les peaux brutes en cuirs imputrescibles. Ces tanneries se basent principalement sur l'utilisation des substances végétales naturelles et des fientes de pigeon. Le dégraissage des peaux est accompli par l'activité lipase des micro-organismes originaires des fientes de pigeon.

Aucune étude microbiologique des différentes étapes de tannage traditionnel n'a été réalisée à ce jour. C'est alors la première étude qui a permis de mettre en évidence des micro-organismes provenant probablement des fientes de pigeon et qui sont doués d'activité lipase impliquée en dégraissage des peaux.

Le présent travail concerne l'étude microbienne et la caractérisation des tanneries traditionnelles "CHOUARA" de Fès médina. Nous avons ainsi déterminé les paramètres physico-chimiques des eaux des différentes phases de tannage et nous avons déterminé leur composition microbienne par l'isolement et la caractérisation des micro-organismes de ces biotopes. Une banque de 55 bactéries et 29 levures a été purifiée.

Le criblage des enzymes (lipase, cellulase, pectinase, amylase, et tannase) produites par ces micro-organismes a été réalisé et certains micro-organismes manifestent des activités enzymatiques importantes.

En deuxième étape, notre étude s'est focalisée sur la production de la lipase de trois levures. La caractérisation moléculaire de ces levures a révélé leur appartenance au genre *Trichosporon*., nous avons par la suite étudié la cinétique d'activité lipase associée à la biomasse pour une mise en culture de 72 heures de ces levures. Ceci a montré la présence de deux pics d'activité lipase. Des travaux similaires mentionnés en littérature ont montré que deux lipases différentes sont produites par une même levure à différents moments de mise en culture.

**Mots clés** : tanneries, micro-organismes, levures, activité lipase, fientes de pigeon, physico-chimie.

# SOMMAIRE

Page

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I- TANNERIES</b>	<b>4</b>
1-HISTORIQUE	4
2- TANNERIE ARTISANALE	5
3-TANNERIE INDUSTRIELLE...	7
3-1- Reverdissage	8
3-2- Epilage pelanage	8
3-3- Déchaulage	8
3-4- Confitage et picklage.	8
3-5- Tannage	8
3-6- Basification	8
3-7- Teinture – Nourriture	9
3-8 - compositions chimiques et impacts des tanneries industrielles	9
<b>II- LES LEVURES</b>	<b>13</b>
1- DECOUVERTE	13
2- CLASSIFICATION	14
3- MORPHOLOGIE ET STRUCTURE	14
4- REPRODUCTION DES LEVURES	15
5 - PHYSICOCHIMIE ET CONDITIONS DE CROISSANCE DES LEVURES	16
5-1- Besoins nutritifs des levures	16
5-2- Conditions de croissance des levures	18
5-3- Métabolisme des levures	20
5-4- Biotechnologies des levures	21
<b>III- LES LIPASES</b>	<b>27</b>
1- DEFINITION	27
2- CARACTERISTIQUES STRUCTURALES	27
2-1- Le repliement $\alpha / \beta$	27
2-2- La triade catalytique	29
2-3- Le trou de l'oxyanion	30
3- CARACTERISTIQUES CINETIQUES	30
3-1- Phénomène cinétique d'activation interfaciale	30
3-2- Modèle cinétique interfacial	33
4- MECANISME CATALYTIQUE DES LIPASES	35
4-1- Etape d'acylation	35
4-2- Etape de désacylation	37
5- SPECIFICITE DES LIPASES AUX ACYLGLYCEROLS	37
6- LIPASES MICROBIENNES	41
6-1- Généralités	41
6-2- Localisation membranaire des lipases chez les levures	43

7- Applications biotechnologiques des lipases	44
7-1- Les lipases en dégraissage du cuir	48
7-2- - Les lipases en synthèse d'ester	49
7-3- Les lipases en synthèse organiques	50
7-4- Les lipases en chimie fine	51
7-5- Les lipases en en bioremédiation	51
7-6- Les lipases en biocatalyse	53
7-7- Les lipases en applications médicales et pharmaceutiques	54
<b>MATERIEL &amp; METHODES</b>	
<b>I- STATION D'ETUDE</b>	56
<b>II- CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES TANNERIES TRADITIONNELLES DE FES</b>	57
1- TEMPERATURE ET PH	57
2- OXYGENE DISSOUS	57
3- CONDUCTIVITE ELECTRIQUE	57
4- DEMANDE BIOLOGIQUE EN OXYGENE (DBO5)	58
5- DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE (DCO)	58
<b>III- DETERMINATION DE LA COMPOSITION MICROBIENNE DES TANNERIES</b>	59
1- ECHANTILLONNAGE	59
2- MISE EN CULTURE	59
2-1- Préparation des dilutions	60
2-2- Purification par épuisement	61
<b>IV- POTENTIELS ENZYMATIQUES DES MICROORGANISMES ISOLEES</b>	61
1- ACTIVITE CELLULASE	61
2- ACTIVITE PECTINASE	62
3- ACTIVITE AMYLASE	63
4 - ACTIVITE LIPASE	64
4-1- Révélation de l'activité lipase par le Bleu Victoria	64
4-2- Révélation de l'activité lipase par la rhodamine B	64
5- ACTIVITE TANNASE	65
<b>V- ISOLEMENT DE TROIS LEVURES LIPOLYTIQUES</b>	65
1- MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITE LIPASE DES LEVURES	65
2- CARACTERISATION MOLECULAIRE DES LEVURES	66
2-1- Extraction de l'ADN génomique	66
2-2- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	66
2-3- ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE	69
2-4- Réaction de séquençage d'ADN levuriens amplifiés	70
2-5- Analyse informatique des séquences	73
<b>VI- CINETIQUE DE PRODUCTION DE LIPASE ASSOCIEE A LA BIOMASSE DES LEVURES</b>	74
1- MILIEU DE CULTURE POUR PRODUCTION DE LA LIPASE DES TROIS LEVURES	74
2- PREPARATION DE LA GAMME ETALON D'ACIDE OLEIQUE	74
3- DOSAGE COLORIMETRIQUE DE L'ACTIVITE LIPASE DES TROIS LEVURES	75
4- DOSAGE DE LA BIOMASSE DES LEVURES	76



5-ELECTROPHORESE DES LIPASES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE	76
5-1- PRECIPITATION DES LIPASES PAR LE SULFATE D'AMMONIUM	76
5-2- Préparation des solutions	76
<b>VII- PHYLOGENIE MOLECULAIRE DES LEVURES</b>	78
<i>RESULTATS &amp; DISCUSSION</i>	
<b>I - ENQUETE SUR LES PROCEDES DE TANNERIES TRADITIONNELLES "CHOUARA" DE FES</b>	80
1-Tannage artisanal des peaux de bovin	80
a-Lavage et trempage aux bassins de chaux	80
b- dégraissage et trempage aux "Kasriats" de son	81
c- tannage à la poudre de mimosa	81
2- Tannage artisanal de peaux d'ovins et de caprins	81
a-Lavage et trempage aux bassins de chaux	81
b-Trempage aux kassriats de fientes de pigeon	82
c - Trempage aux kassriats de son et de tannin	82
<b>II- CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE &amp; MICROBIOLOGIQUE DES TANNERIES TRADITIONNELLES</b>	84
1-Température et pH	84
2- Teneur en oxygène dissout	84
3- Conductivité électrique	84
4- Demande biologiques et chimiques en oxygène	85
<b>III-ETUDE DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DES EAUX DE TANNERIES</b>	86
1- Mise en culture et dénombrements des micro-organismes	86
a- prélèvement de mai 2010	86
b- prélèvement de décembre 2010	88
<b>IV-ETUDE DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DES FIENTES DE PIGEON</b>	90
1- Mise en culture et dénombrements des micro-organismes	90
a- prélèvement mai 2011	91
b- prélèvement décembre 2011	92
2- purifications par épuisements des isolats	94
<b>V- CARACTERISATION DES POTENTIELS ENZYMATIQUES DES SOUCHES ISOLEES</b>	98
1- ACTIVITE CELLULASE	98
2- ACTIVITE PECTINASE	98
3- ACTIVITE AMYLASE	99

4- ACTIVITE TANNASE	100
5- ACTIVITE LIPASE	100
<b>VI- ISOLEMENT DE TROIS LEVURES LIPOLYTIQUES</b>	<b>107</b>
1- MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITE LIPASE	107
2- CARACTERISATION MOLECULAIRE DES TROIS LEVURES	107
3- ANALYSE INFORMATIQUE DES SEQUENCES	108
4- PHYLOGENIE MOLECULAIRE DES LEVURES 7H, 8H, 9H DES LEVURES 7H, 8H ET 9H	112
5- DOSAGE COLORIMETRIQUE DE L'ACTIVITE LIPASE ASSOCIEE A LA BIOMASSE	113
6- ELECTROPHORESE DES LIPASES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE	115
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>123</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>125</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>146</b>

INTRODUCTION GENERALE