



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la  
Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**Département : Microbiologie..... قسم**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Biotechnologie Fongique / Fermentation et production de substances fongiques**

Intitulé :

---

## **Production des protéases extracellulaires des moisissures du sol : effet du pH et de la température.**

---

*Présenté et soutenu par :*

*Le : 26/06/2016*

**ANANI Bouchra**

**BENTALEB Samira**

*Jury d'évaluation :*

**Président du jury :** M<sup>me</sup> LEGHLIMI Hind

Maître de conférences - UFM Constantine.

**Rapporteur :** M<sup>me</sup> MIHOUBI Ilhem

Professeur - UFM Constantine.

**Examinatrice :** M<sup>me</sup> BENSERRADJ Ouafa

Maître de conférences - CU Mila.

**Tutrice :** M<sup>me</sup> GHORRI Sana

Docteur - UFM Constantine.

*Année universitaire  
2016 - 2017*

## **Remerciements**

*Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude avant tous au bon **Dieu** qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.*

*Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biotechnologie et de l'activité microbienne, (LAMYBAM). J'exprime ma reconnaissance à toute personne ayant contribué à sa réalisation.*

*Nos premiers remerciements à notre encadreur **M<sup>me</sup> DJEZZAR MIHOUBI I.** Professeur –UFM constantine pour sa disponibilité, ses conseils, pour sa gentillesse, sa bienveillance et son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire.*

*Un merci particulier à notre présidente de jury, **M<sup>me</sup> LEGHLIMI H.,** Maître de conférences-UFM Constantine ; de nous avoir faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de mémoire.*

*Un Merci Particulier à l'examinatrice de ce mémoire ; **M<sup>me</sup> BENSERRADJ O.,** Maître de conférences - CU Mila , pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.*

*Nous remercions également chaleureusement **M<sup>me</sup> GHORRI S.,** encadreur de notre mémoire pour sa gentillesse, son soutien et pour le fait de m'avoir fait partager son expérience. On les adresse toute mes reconnaissances pour sa patience, sa disponibilité.*

*Merci à tous*

# *Dédicace*

*Du profond de mon cœur ; je dédie travail à tous ceux qui me sont chers*

## **A MA CHERE MERE**

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect ;*

*Mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon  
instruction et mon bien être*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez mon enfance et j'espère  
que votre bénédiction m'accompagne toujours*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés le fruit de vos  
innombrables sacrifices .Puisse Dieu .le Très Haut vous .vous accorder santé .bonheur et  
longue vie*

## **A LA MEMOIRE DE MON PERE**

*Ce travail est dédié a mon père .décidé trop tôt ; qui m'a toujours poussé et motivé dans mes  
études*

*J'espère que ; du monde qui est sien maintenant ; il apprécié cet humble geste comme  
preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son  
âme .Puisse Dieu ; le tout puissant ; l'avoir en sa sainte miséricorde !*

*A mon fiancé « **Mohamed** »*

*La source de grand courage tout le moment de travail et toujours à côté de moi merci.*

***Je dédie ce travail***

*A mon frère **Badis***

*A mes sœurs **Ikram ; Inssaf et Manar.***

*A mon binôme **Samira***

*A ma familles, mes amis, tous nos professeurs qui nous enseigner et a tous ceux qui nous  
sont chers*

***Bouchra***

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à :*

*A la personne la plus chère à mon cœur **Maman**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*A toi **papa** rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être ; j'espère avoir répondu aux espoirs que tu as fondé en moi, que Dieu tout puissant te garde santé, bonheur et longue vie pour que tu demeureras le flambeau illuminant mon chemin.*

*A mes frères **FAOUAZ** ; **BASSEM** et le petit **MOHAMED AMINE** ;*

*A ma sœur **BESMA** l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.*

*A les petits **AYOUB** ; **ILYAS** ; **ZIZOU** ; **SADJA** ; **BATOUL** et la petite **IMENE**.*

*A mon binôme **BOUCHRA** on a passé des bons moments ensemble que Dieu garde notre amitié pour toujours.*

*Mes camarades de promotion.*

*Tous ceux qui sont proche de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom  
Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai  
toujours eu pour vous.*

*A tous ceux que j'aime*

***Samira***

# Table des matières

## Les abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Introduction.....01

## Revue bibliographique

## Chapitre I : Les champignons

### 1- Généralité.....02

### 2- Structure cellulaire.....02

### 3- Classification.....03

#### 3.1- Zygomycètes.....04

#### 3.2- Ascomycètes.....06

#### 3.3- Basidiomycètes.....06

#### 3.4- Deutéromycètes.....06

### 4- Habitat et pouvoir pathogène.....06

### 5- Conditions de croissance des moisissures.....07

#### 5.1- Eléments nutritifs.....07

##### 5.1.1- Source de carbone et d'énergie.....07

##### 5.1.2- Source d'azote.....08

##### 5.1.3- Eléments minéraux.....08

#### 5.2- Facteurs physico-chimique.....08

### 6- Cycle de vie.....10

7- Les principaux genres fongiques.....	11
7.1- Le genre <i>Aspergillus</i> .....	11
7.2- Le genre <i>Penicillium</i> .....	14
7.3- Le genre <i>Fusarium</i> .....	18
7.5- Le genre <i>Trichoderma</i> .....	21
7.4- Le genre <i>Paecilomyces</i> .....	23
8- Intérêts industriels des moisissures.....	24
8.1- Intérêt alimentaire.....	25
8.2- Intérêt chimique.....	25
8.3- Intérêt pharmaceutique.....	26
8.4- Intérêt médical.....	26

## **Chapitre II : Les enzymes protéolytiques**

1- Généralités.....	27
2- Propriétés.....	28
3- Sources des protéases.....	29
4- Classification des protéases.....	30
4.1- Selon longueur de la chaîne polypeptidique.....	31
4.2- Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	31
4.3- Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif.....	32
4.4- Selon le pH d'activité.....	33
5- Mode d'action.....	33

6- Production des protéases par fermentation.....	34
6.1- Fermentation sur milieu liquide.....	34
6.2- Fermentation sur milieu solide.....	34
7- Extraction et purification des protéases.....	36
7.1- Broyage.....	36
7.2- Précipitation.....	36
7.3- Centrifugation.....	36
8- Application industriel des protéases.....	37
8.1-Industrie alimentaire.....	37
8.2- Domaine pharmaceutique et médical.....	38
8.3- Traitement des eaux usées industrielles.....	38
8.4- Autres applications.....	38

## **Matériel et méthodes**

1- Présentation de la zone d'études.....	39
2- Prélèvements des échantillons.....	39
2.1-Préparation des milieux de cultures.....	40
2.2-Préparation des dilutions.....	40
2.3-Méthode d'isolement.....	40
2.4- Ensemencement et incubation.....	40
3-Purification des souches.....	41
3.1- Identification des isolats.....	41
3.2- Conservation.....	42
3.3- Sélection des souches protéolytiques.....	42

4- Méthode de fermentation et de production.....	42
4.1- Préparation de l'inoculum.....	42
4.2- Préparation du milieu de fermentation.....	43
4.2.1- Fermentation sur milieu liquide non agitée (N°1).....	43
4.2.2- Fermentation sur milieu liquide agitée (N°2).....	43
4.2.3- Fermentation sur milieu liquide (N°3).....	44
4.2.4- Fermentation sur milieu liquide (N°4).....	44
4.2.5- Fermentation sur milieu semi liquide agitée.....	45
4.2.6- Fermentation sur milieu solide.....	45
4.3- Ensemencement des milieux de fermentation.....	46
5- Etude de l'activité protéolytique produite.....	46
5.1- Préparation des extraits enzymatiques.....	46
5.2- Méthode de dosage de l'activité protéolytique.....	47
5.2.1- Principe.....	47
5.2.2- Réaction enzymatique.....	47
5.2.3- Protocole de dosage.....	48
6- étude de l'influence de la température et du pH.....	48
6.1- Influence du pH.....	48
6.2- Influence de la température.....	48



## **Résultats et discussion**

1- Isolement des champignons de sol.....	49
2- Identification des souches.....	49
2.1- Etude macroscopique.....	49
2.2- Etude microscopique.....	54
3- Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	60
4- Cinétique de la production de protéase.....	64
4.1- Influence du pH.....	66
4.2- Influence de la température.....	68
<b>Conclusion.....</b>	<b>70</b>

## **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumés**

*Liste*  
*Des Figures*  
*Des Tableaux*  
*Des Abréviations*

$A_w$  : Activité en eau

PDA : Potato dextrose agar

TCA : TriChloroacetic Acid

SSF : Solid state fermentation

SmF : Submerged Fermentation

UI : Unité internationale

Ap : Activité protéolytique

Rpm: Rotation par minute

Figure 1 : Structure de l’hyphe chez les moisissures .....	03
Figure 2 : Principales classes des moisissures.....	04
Figure 3 : Quelques champignons filamenteux.....	05
Figure 4 : Cycle de vie des moisissures.....	11
Figure 5 : Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> .....	12
Figure 6 : Quelques espèces du genre <i>Aspergillus</i> .....	13
Figure 7 : Culture de <i>Penicillium sp</i> .....	15
Figure 8 : Caractères du thalle de genre <i>Penicillium</i> .....	16
Figure 9 : Caractères morphologiques des <i>Penicillium</i> .....	17
Figure 10 : Aspects macroscopique et microscopique de <i>Fusarium sp</i> .....	19
Figure 11 : Aspects macroscopique et microscopique de <i>Fusarium graminearum</i> et <i>Fusarium oxysporum</i> .....	20
Figure 12 : Aspects macroscopique et microscopique de <i>Trichoderma sp</i> .....	22
Figure 13 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Trichoderma harzianum</i> ), <i>Trichoderma viride</i> ,et <i>Trichoderma reesei</i> .....	23
Figure 14 : Aspects macroscopique et microscopique de <i>Paecilomyces sp</i> .....	24
Figure 15 : Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert).....	27
Figure 16 : Mode d’attaque de la chaîne polypeptidique.....	32
Figure 17 : Mécanisme d’action des protéases.....	34
Figure18 : Prélèvement d’échantillonnage à Chaabet Erssas.....	39
Figure 19 : Fermentation liquide statique.....	43
Figure 20 : Fermentation liquide.....	44
Figure 21 : Fermentation semi liquide agitée.....	45

Figure 22 : Fermentation solide.....	46
Figure 23 : Genres fongiques isolés du sol de Chaabet_Erassas.....	57
Figure 24 : Histogramme des diamètres des souches protéolytiques observés précédemment par ces différentes concentrations.....	60
Figure 25 : Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche <i>Paecilomyces sp 1</i> . dans les milieux de fermentations testées.....	61
Figure 26 : Effet du pH sur l'activité protéolytique de la souche <i>Paecilomyces sp 1</i> . dans les différentes fermentations testées.....	63
Figure 27 : Effet de la température sur l'activité protéolytique de la souche <i>Paecilomyces sp1</i> . dans les différentes fermentations testées.....	64

Tableau 1 : Exemples des protéases microbiennes.....	29
Tableau 2 : Etude macroscopique des souches fongiques isolées à partir du sol.....	50
Tableau 3 : Etude microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol.....	55
Tableau 4 : Mise en évidence de l'activité protéolytique sur le lait gélosé à des différentes concentrations.....	61

# *Introduction*

Le développement de la microbiologie au cours des deux dernières décennies, a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers à partir des microorganismes, et susceptibles d'être utilisées dans des applications biotechnologiques très étendues, grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé, dû à un patrimoine génétique particulier qui explique leur grande capacité d'adaptation (Leveau et Bouix, 1993 ; Botton *et al.*, 1999).

Les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et spécificité divers. Cependant, l'industrie exige l'emploi d'enzymes thermostables qui ont la capacité de supporter des températures élevées.

Par la diversité de leurs applications, les protéases représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles. De plus, les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les animaux et les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pourcent des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, des souches fongiques (Garcia-Gomez *et al.*, 2009).

Dans ce cadre nous somme intéressées à l'isolement et identification des moisissures productrices des protéases à partir d'un sol forestier.

Pour atteindre notre objectif, nous avons procédé à certaines applications pratiques :

- Echantillonnage et prélèvement du sol à partir du sol forestier à Chaabet-Erssas.
- la mise en évidence de l'activité protéolytique des isolats fongiques sur milieu gélosé à base de lait, dans le but de sélectionner la souche la plus performante ;
- Production et extraction des protéases extracellulaire par fermentation
- Et enfin, l'étude de la cinétique de production d'enzyme et l'influence du pH et de la température sur l'activité protéolytique.



## 1- Généralités

Les moisissures peuvent être définies comme étant des microorganismes hétérotrophes (Nicklin *et al.*, 2000). Ce sont des eucaryotes qui possèdent un appareil végétatif dépourvu de tiges, de racines et de feuilles appelé *thalle ou mycélium* (Botton *et al.*, 1990). Ce thalle détectable à l'œil nu est formé par ramification des hyphes (filaments) au cours de leur croissance sur un substrat donné. La paroi de la plupart des moisissures est composée de la chitine : un polymère formé d'unité de N-acétyl glucosamine (Guiraud, 1998 ; Perry *et al.*, 2004 ; Walker et White, 2005).

Elles sont communément observées sur les déchets organiques. Ce sont des champignons pluricellulaires (filamenteux), alors que les levures sont des champignons unicellulaires (Madigan et Martinko, 2007).

Les moisissures étant qualifiées comme « *Septomycètes* » lorsque des cloisons transversales s'y forment et donne une apparence subdivisée en éléments uni ou plurinucléés. Les « *siphomycètes* » sont ceux dépourvus de cloisons et présentent un appareil végétatif formé d'une série de boyaux (Lanier, 1978).

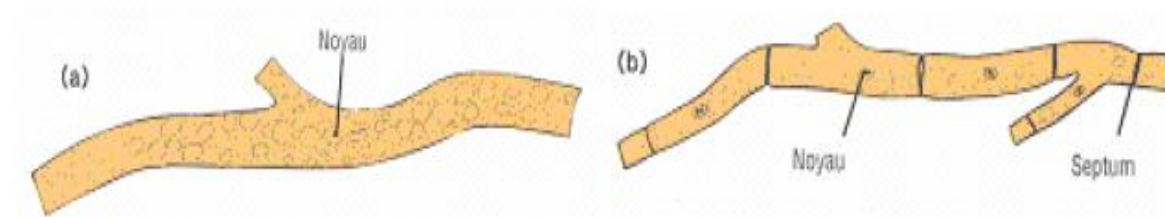
Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989). Elles peuvent être noires, bleues, vertes, rouges, jaunes ou brunes ; leur présence donne au mycélium un aspect poussiéreux (Madigan et Martinko, 2007).

Le mode de vie des moisissures est généralement saprophytique, celles-ci se développent aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1996). Certaines sont parasites des animaux ou végétaux, d'autres sont symbiotes comme ceux des mycorhizes (Lanier, 1978).

## 2- Structure cellulaire

L'hyphe ou filament, en est l'élément structurel des moisissures, divisé ou non par des parois transversales. Plusieurs hyphes constituent un réseau visible à l'œil nu : le mycélium ou partie végétatives du champignon (Chasseur et Nolard, 2003).

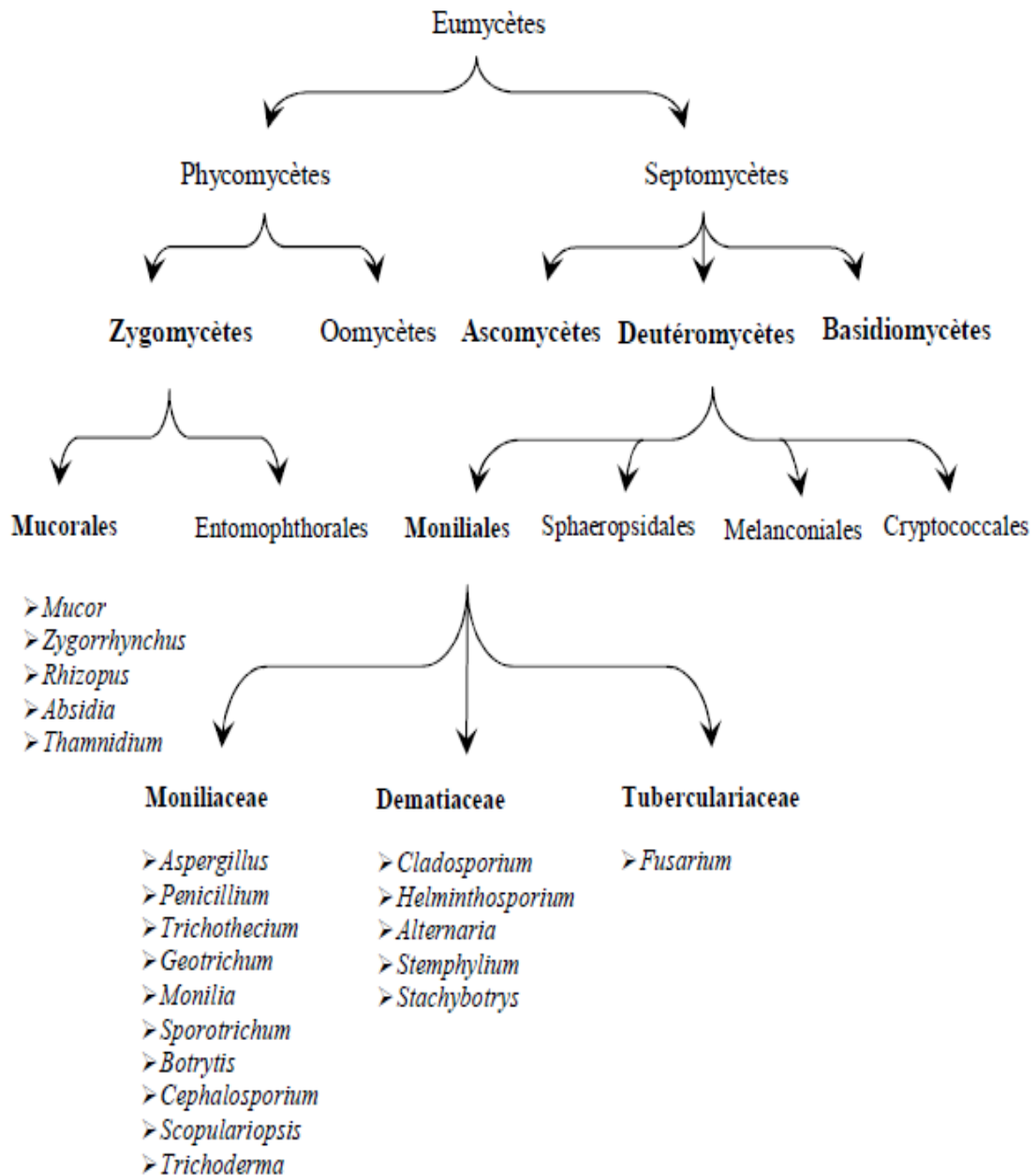
Chez les phycomycètes, les cellules ne sont pas séparées par des cloisons transversales : le thalle est dit coenocytique ou <siphonné> : Mucorales (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*...). Par contre, chez les septomycètes, l'hyphe est cloisonnée : le thalle est dit <septé> : dans ce cas, des perforations assurent la communication entre les cellules : *Penicillium*, *Aspergillus*, etc... (Figure 1) (Botton *et al.*, 1990).



**Figure 1** : Structure de l'hyphe chez les moisissures : (a) thalle siphonné, (b) thalle septé  
(Botton *et al.*, 1990).

### 3- Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois, 1989), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (Figure 2).



**Figure 2** : Principales classes des moisissures (Frazier, 1967)

### 3.1- Zygomycètes

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998). La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (mucormycoses) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron,

1996). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (Guiraud, 1998). La figure 3 montre des exemples de quelques genres appartenant à ces différentes classes.

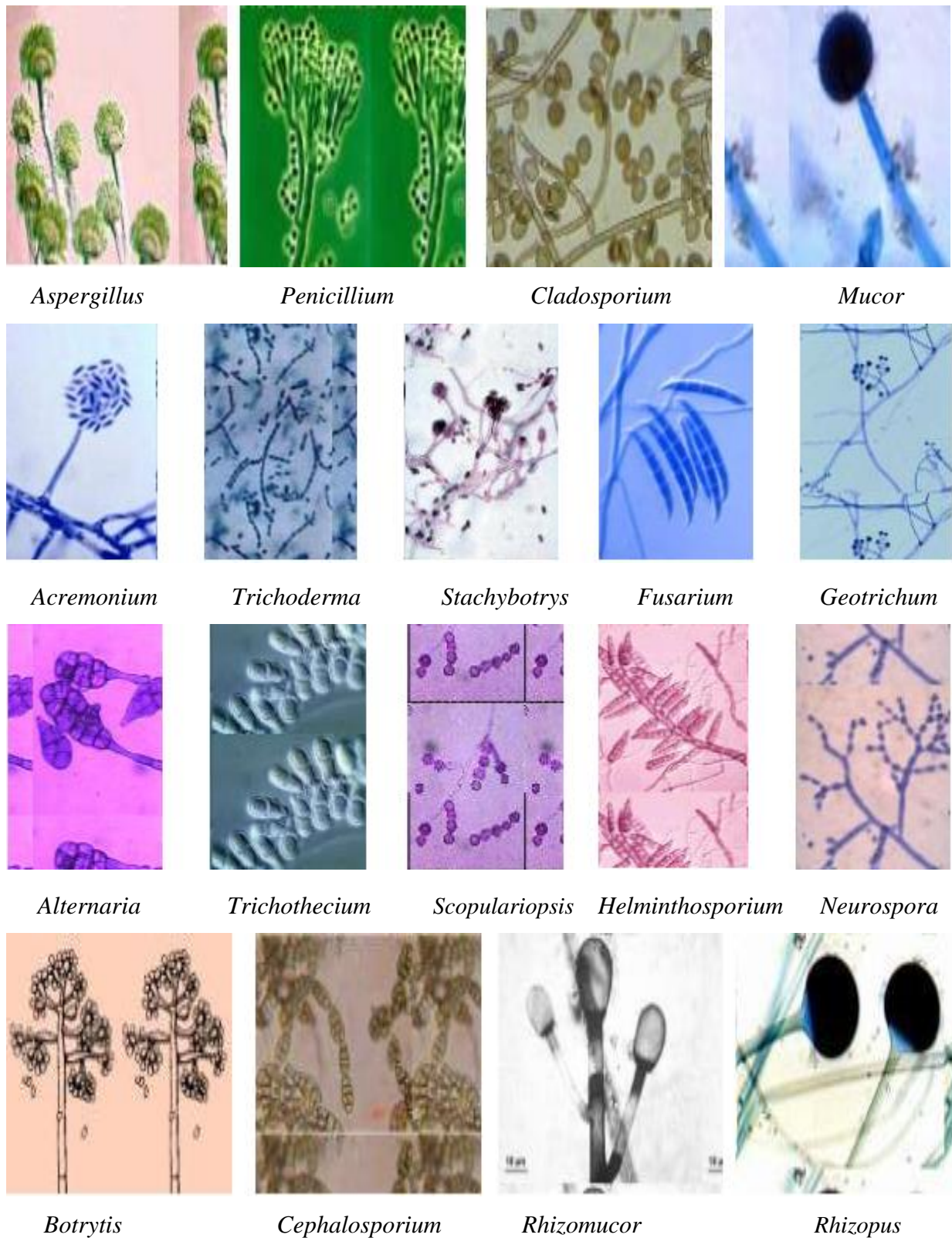


Figure 3 : Quelques champignons filamenteux (Dendouga, 2006)

### 3.2- Ascomycètes

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microscales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1998).

### 3.3- Basidiomycètes

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores), c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (Botton *et al.*, 1999).

### 3.4- Deutéromycètes

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (Frazier, 1967 ; Punt *et al.*, 2002).

## 4- Habitat et pouvoir pathogène

Lorsque les conditions environnementales sont favorables (humidité, température et substrats organiques disponibles), les moisissures peuvent se développer. Cependant, certaines espèces se produisent dans les habitats froids, périodiquement arides ou autres, apparemment inhospitaliers (Isaac *et al.*, 1993).

Il est important de souligner que les conditions optimales pour la croissance et la reproduction des moisissures changent considérablement d'une espèce fongique à une autre, d'où une biodiversité de mycètes qui tend à augmenter dans les régions tropicales, certaines sont spécifiques à des endroits étroitement limités (Swann *et al.*, 1999). Environ 70.000 espèces de mycètes sont décrites. L'intervention néfaste des champignons filamenteux se

manifeste essentiellement dans l'industrie alimentaire avec une activité phytopathogène en particulier sur les fruits et légumes.

Les moisissures les plus connues pour leur pathogénicité sont : *Aspergillus flavus*, *A. nomius* et *A. parasitica* connus pour leur production d'aflatoxine (substance cancérigène puissante). Ces espèces se développent à la surface de certains aliments tels que les céréales et les arachides (Guiraud, 1998). La moisissure *Penicillium citreonigrum* produit la citreoviridine (mycotoxine neurotoxique responsable du bériberi cardiaque), alors que *P.citrinum* produit la citrinine un néphrotoxique, *Fusarium sporotrichoides* et des espèces voisines produisent divers toxines comme les trichothécènes, la zéaralénone, les fumonisines etc... Certaines de ces toxines sont très thermostables (30 min à 200°C). Certaines maladies dues à l'aleucie alimentaire toxique (ATA) se présentent sous forme de simples malaises (Guiraud, 1998). D'autres exemples existent encore, telle que l'action de *Cryphonectria parasitica* responsable de la cessation de quatre milliards d'arbres de châtaigne aux Etats-Unis (Alexopoulos *et al.*, 1996).million d'espèces (Hawksworth, 1991 ; Hawksworth *et al.*, 1995).

## 5- Conditions de croissance des moisissures

### 5.1- Eléments nutritifs

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

#### 5.1.1- Source de carbone et d'énergie

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000).

### 5.1.2- Source d'azote

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels ( $\text{NH}_4^+$ ) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (Boiron, 1996), alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt *et al.*, 2002).

### 5.1.3- Eléments minéraux

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchicoba *et al.*, 2001). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc... (Boiron, 1996).

## 5.2- Facteurs physico-chimiques

Les facteurs physico-chimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination. Nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

### ➤ Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (Botton *et al.*, 1999 ; Julien, 2002). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environs de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple (Botton *et al.*, 1999 ; Nicklin *et al.*, 2000). D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (Davet, 1996 ; Botton *et al.*, 1999).

➤ **Humidité**

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (Bourgeois, 1989).

Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au-dessous de - 4 MPa (Méga Pascal). Les moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'à -10 MPa. Cependant, les *Aspergillus* et les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de - 20 MPa (Davet, 1996).

➤ **pH**

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 (Botton *et al.*, 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide . C'est le cas de *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae*. (Urbanek *et al.*, 1984 ; Delgado-Jarana *et al.*, 2002). Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (Botton *et al.*, 1999). Par ailleurs, les champignons modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de CO<sub>2</sub> ou de NH<sub>3</sub> ou par production d'acides (Boiron, 1996).

➤ **Oxygène**

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (Bourgeois, 1989 ; Botton *et al.*, 1999).

➤ **Lumière**

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (Botton *et al.*, 1999).



➤ **Activité en eau ( $a_w$ )**

L' $a_w$  d'un aliment dépend de sa composition chimique, c'est-à-dire de la quantité d'eau retenue par les sels, sucres et protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure).

Les moisissures sont, de façon schématique, plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures se développent bien pour des activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures. Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des  $a_w$  voisines de 0,7 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures,...) (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002). Par comparaison, les *Fusarium* ne peuvent se développer qu'à des  $a_w$  supérieures à 0,9. Il s'agit donc d'espèces se développant au champ, sur les plantes vivantes (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

## 7- Cycle de vie

Le cycle de vie des moisissures est illustré par 4 principales étapes (Figure 4) : germination, développement, reproduction et la dormance/latence.

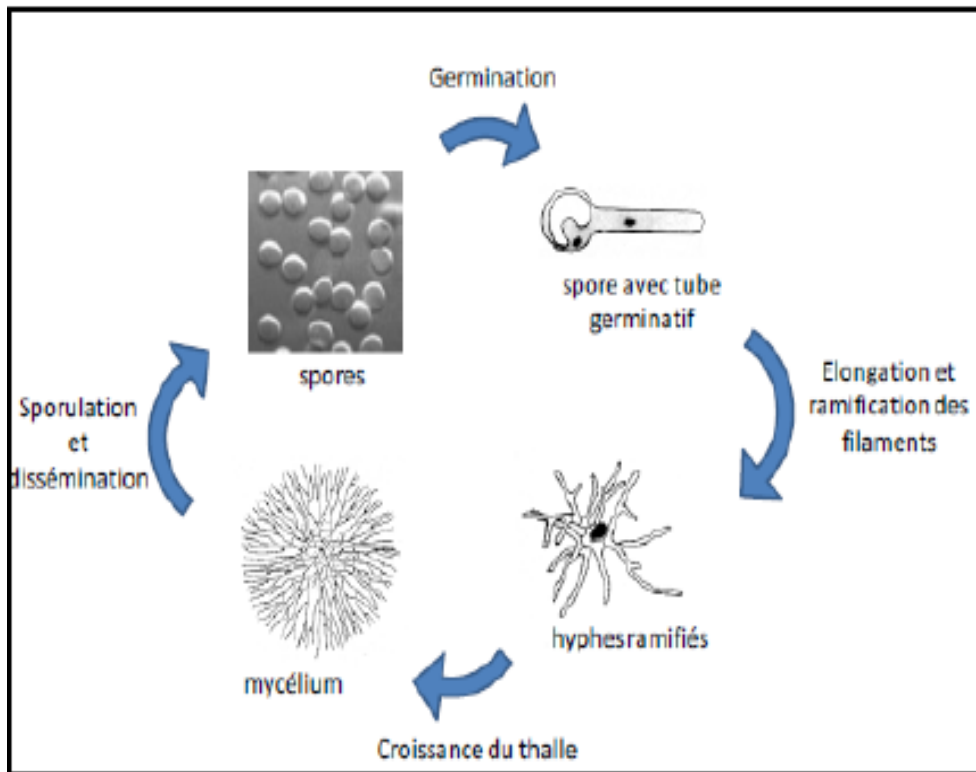


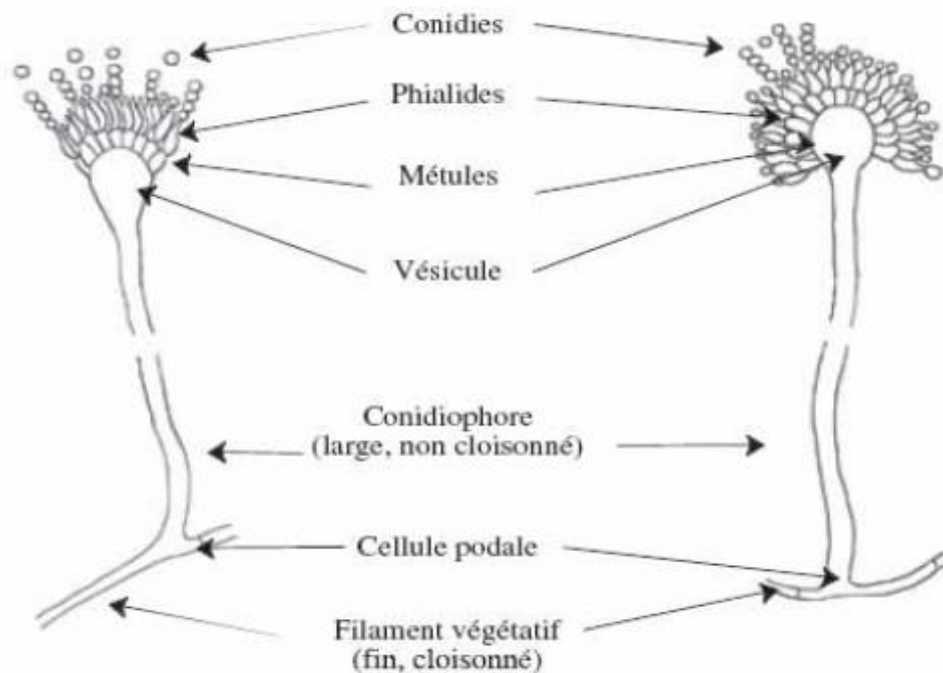
Figure 4 : Cycle de vie des moisissures ([www.Aspergillus.man.ac.uk](http://www.Aspergillus.man.ac.uk))

## 7- Les principaux genres fongiques

### 7.1- Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure 5) (Raper et Fennell, 1965). Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990 ; Roquebert, 1998). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines.

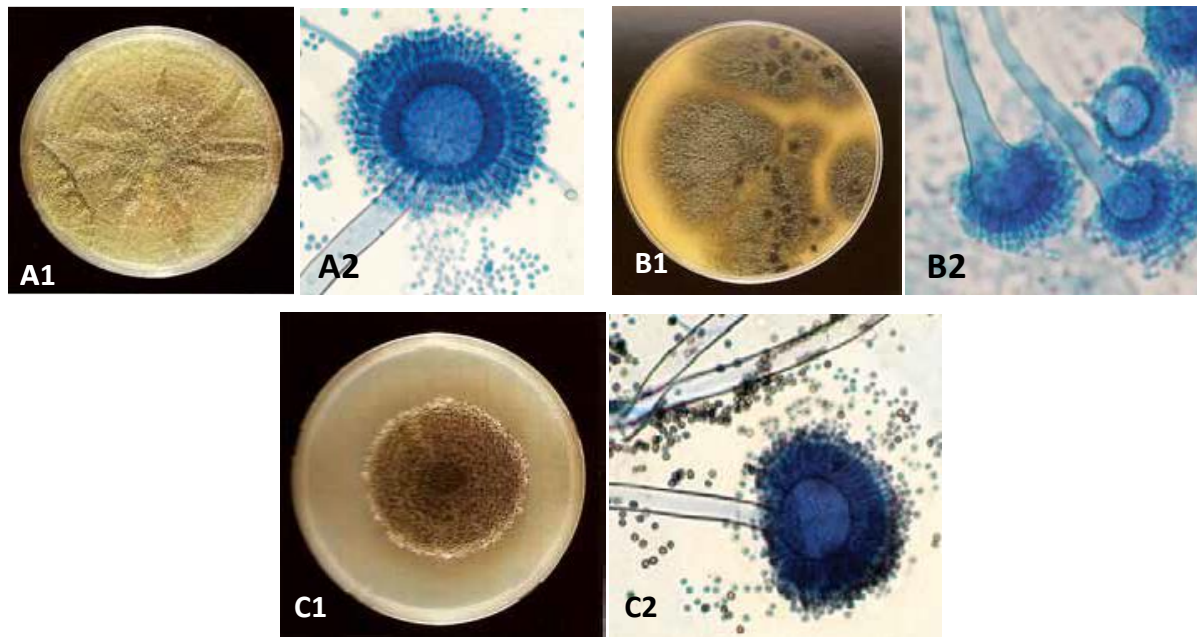
Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002) ; ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales.



**Figure 5 :** Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*  
(Tabuc, 2007)

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif) (Figure 6) (Morin, 1994).

Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Botton *et al.*, 1990).



**Figure 6 :** Quelques espèces du genre *Aspergillus* : A1 et A2 : *Aspergillus flavus* ; B1 et B2 : *Aspergillus fumigatus* ; C1 et C2 : *Aspergillus niger* (Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et aspect microscopique) (Tabuc, 2007).

Il est à noter que certaines espèces d'*Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes ; leur développement nécessite des conditions locales favorables (cavernes tuberculeuses, cancer broncho-pulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques obstructives, emphysèmes, mucoviscidose...) ou générales (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, chimiothérapies aplaisantes, SIDA...). (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994) Les principales espèces responsables de mycoses (aspergilloses) sont :

- *Aspergillus fumigatus* considéré comme le principal agent d'aspergillose aviaire et humaine (représentant 80-90% des aspergilloses humaines) (Morin, 1994) ;
- *Aspergillus flavus* responsable d'aspergilloses pulmonaires ou généralisées principalement chez les patients immunodéprimés (Baculard et Tournier, 1995) ;
- *Aspergillus niger* rarement rencontré chez l'immunodéprimé ; chez le sujet non immunodéprimé il peut provoquer des aspergilloses, des otites et des sinusites ; il est aussi à l'origine d'infections cutanées, pulmonaires et généralisées (Morin, 1994) ;
- *Aspergillus terreus* est un agent important d'aspergilloses pulmonaires et cérébrales chez les patients immunodéficients ; il est souvent isolé des expectorations chez les patients

atteints de mucoviscidose (Baculard et Tournier, 1995 ; Khan *et al.*, 1999) ; c'est aussi une espèce fréquemment isolée dans des prélèvements de peau et de phanères. Il est considéré comme le principal agent d'onychomycoses (Morin, 1994).

Par ailleurs, d'autres espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la fermentation de divers substrats et la production d'enzymes ou d'acides organiques :

- *Aspergillus awamori*, agent lipolytique d'oléagineux, est utilisé fréquemment au Japon pour la fermentation alcoolique.

- *Aspergillus niger* est utilisé dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes : alpha-amylase, beta-glucanase, catalase, glucose oxydase, lipase, pectinase, polygalacturonase.

- *Aspergillus oryzae* est utilisé, dans les pays asiatiques, pour la fabrication de produits fermentés à base de soja. Il est utilisé aussi dans des processus biotechnologiques pour la production de certaines enzymes comme : alpha-amylase, beta-glucanase, lipase (Botton *et al.*, 1990).

## 7.2- Le genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales.

Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons

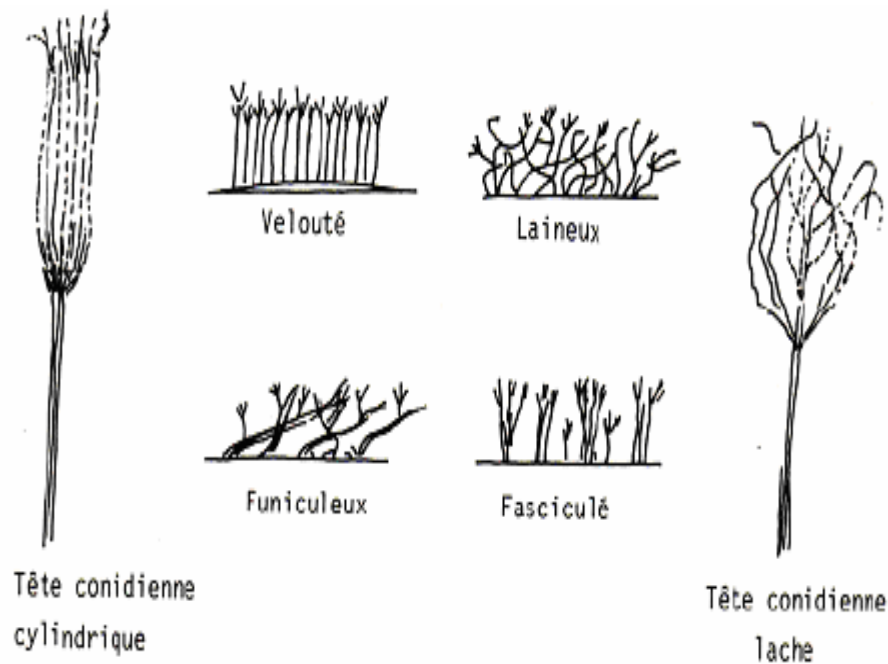
vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge (Figure 7). Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces : vert-gris pour *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, vert-jaune pour *P. chrysogenum*, vert sombre pour *P. roquefortii*, *P. fellutatum*, jaune pâle, chamois pour *P. nalgiovense*, jaune vif à rouge pour *P. purpurogenum*, mélange d'orange et verdâtre pour *P. islandicum*, et blanche pour *P. camembertii*. Le revers de colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture (Chermette et Bussieras, 1993).



**Figure 7 :** Culture de *Penicillium* sp.

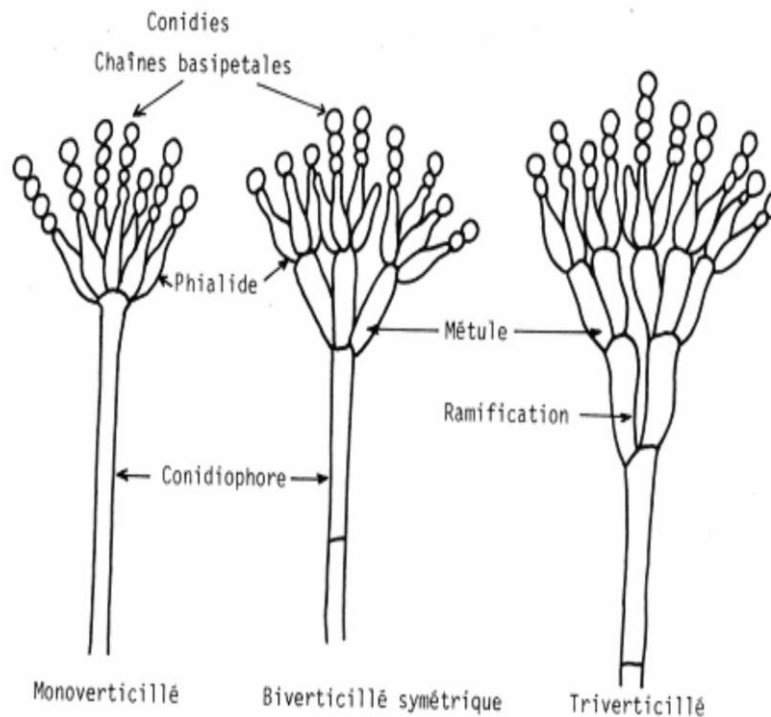
([http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Penicillium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Penicillium/))

Les *Penicillium* peuvent former des colonies floconneuses (*P. camembertii*, *P. nalgiovense*), funiculeuses (*P. funiculosum*), granuleuses (*P. expansum*, *P. griseofulvum*), veloutées (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. roquefortii*...) (Figure 8).



**Figure 8 :** Caractères du thalle de genre *Penicillium* (Botton *et al.*, 1990)

Au point de vue morphologie microscopique, les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (Figure 9).



**Figure 9** : Caractères morphologiques des *Penicillium* (Tabuc, 2007)

Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Les phialides peuvent être insérées directement (*Penicillium* monoverticillé) ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules (*Penicillium* biverticillé) ; de deux rangées successives de métules (*Penicillium* triverticillé) ; parfois de trois rangées de métules (*Penicillium* quadriverticillé) sur les conidiophores. Les phialides, ampulliformes ou lancéolées, sont serrées les unes contre les autres donnant à l'ensemble un aspect de pinceau. Les phialides (cellules conidiogènes) donnent naissance à des conidies disposées en longues chaînes. Ces dernières sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres (Botton *et al.*, 1990).

Les *Penicillium* sont très rarement incriminés en pathologie animale et humaine, parce que la température de croissance de la plupart des espèces est inférieure à 30°C (Hennequin et Lavarde, 1998). Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires. Des espèces de *Penicillium* sont responsables de kératomycose (inflammation de la cornée), d'otomycose (infection de l'oreille externe), d'onychomycose (infection des ongles) et parfois d'infections profondes (Hennequin et Lavarde, 1998).



Par ailleurs, de nombreuses espèces des *Penicillium* sont utilisées au niveau industriel pour la fabrication de fromages et salaisons ou pour la production des différents métabolites d'intérêt :

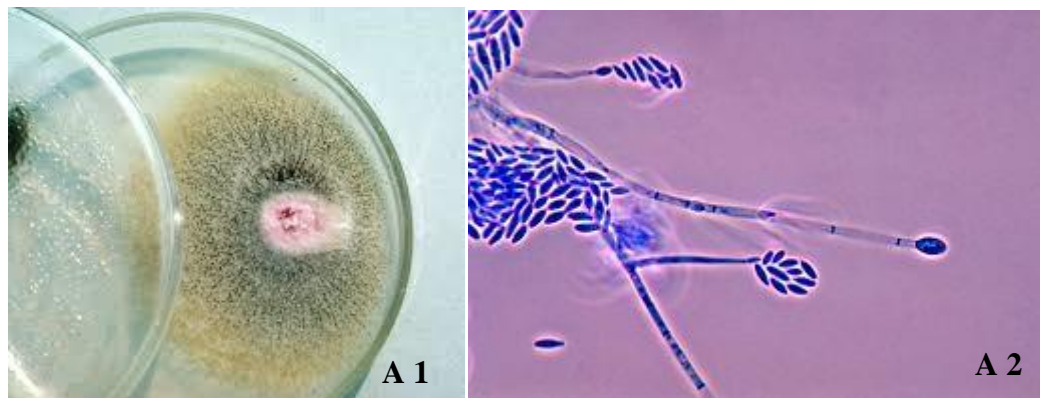
- *Penicillium camembertii* est utilisé dans la fromagerie pour la fabrication des fromages à pâte molle et croûte fleurie ;
- *Penicillium roquefortii* pour l'affinage des fromages à pâte persillée ;
- *Penicillium nalgiovense* pour l'amélioration des qualités organoleptiques des saucissons ;
- *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium jensenii* (*P. nalgiovense*), sont utilisés pour l'obtention de différentes substances antibiotiques (Botton *et al.*, 1990).

### 7.3- Le genre *Fusarium*

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des *Deutéromycètes*. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des *Ascomycètes* (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*). Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le stade parfait n'est pas connu. Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues (Nelson *et al.*, 1983).

Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage.

Les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA (potato-dextrose-agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37°C. Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces (Figure 10). Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993).



**Figure 10** : Aspects macroscopique (A1) et microscopique (A2) de *Fusarium sp.*

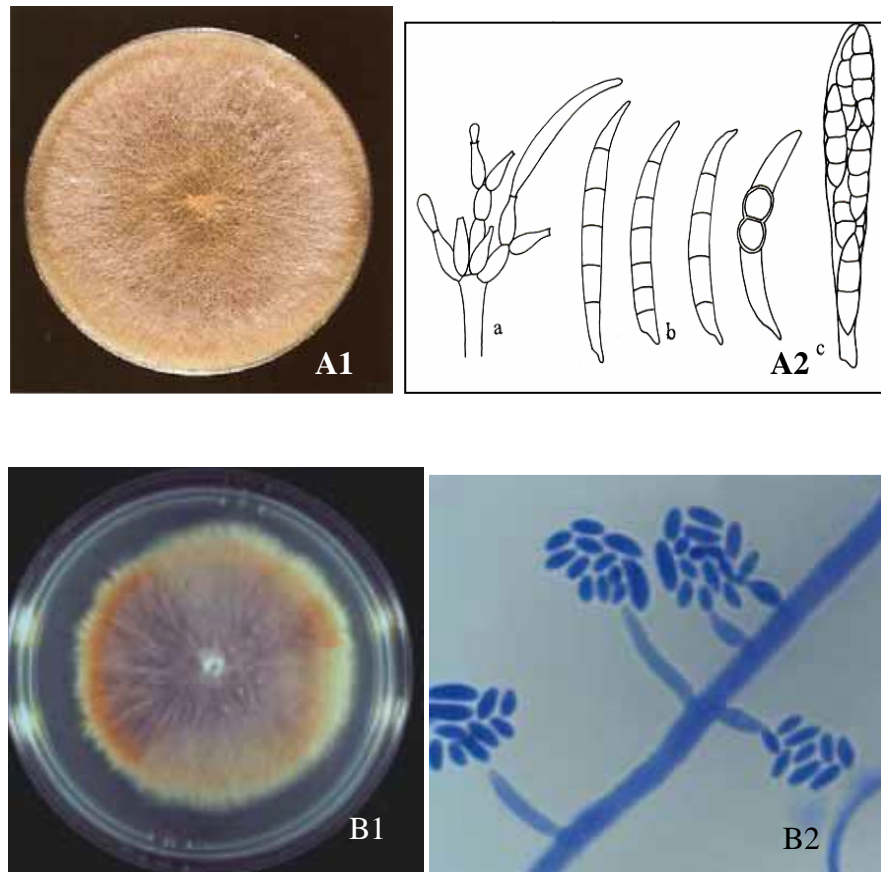
Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (le nom de *Fusarium* vient du latin « *fuscus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau).

Les phialides, plus ou moins allongées, présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé (*F. solani*) ou court et trapu (*F. oxysporum*). Chez d'autres espèces comme *F. proliferatum*, les phialides présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides). Les phialides produisent deux types de conidies :

- microconidies – uni- ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticille ou plus rarement en chaînettes (*F. verticilloides*) ;
- macroconidies – conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant un sort de talon plus ou moins visible.

Les chlamydozspores, sont parfois présentes, en position terminale ou intercalaire (Roquebert, 1998).

Les principales espèces de *Fusarium* les plus couramment étudiées sont : *Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum* (Figures 11).



**Figure 11** : Aspects macroscopique et microscopique de *Fusarium graminearum* (A1 et A2)  
Et *Fusarium oxysporum* (B1 et B2) (Tabuc, 2007).

Concernant leur pathogénicité, les *Fusarium* sont, principalement, des phytopathogènes. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Les *Fusarium* sont généralement impliqués dans la pourriture des racines, tiges et fruits ; dans la dégradation du système vasculaire (Trenholm *et al.*, 1988).

Le pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux est varié. Certaines espèces sont à l'origine des kératites et endophtalmies. D'autres espèces (*F. solani*, *F. moniliforme*) sont impliquées dans des infections systémiques (Guarro et Gene, 1992), *Fusarium verticillioides* peut être un agent de fusarioses disséminées chez les patients infectés par le HIV (Duran *et al.*, 1989), *Fusarium oxysporum* est un agent d'onyxis, de kératites, d'endophtalmies, de péritonites et d'infections disséminées chez les patients atteints d'hémopathie maligne (Thomas et Geraldine, 1992)

#### 7.4- Le genre *Trichoderma*

Le terme « *Trichoderma* » a été introduit dans la mycologie en 1974 par person (Rouso, 1985 ; Bisset, 1991). Ce terme désigne des champignons microscopiques considérés durant 200 ans comme étant des « gastéromycètes » (Fujita *et al.*, 1994 ; Roquebert ,1996 ; Benkada, 2006).

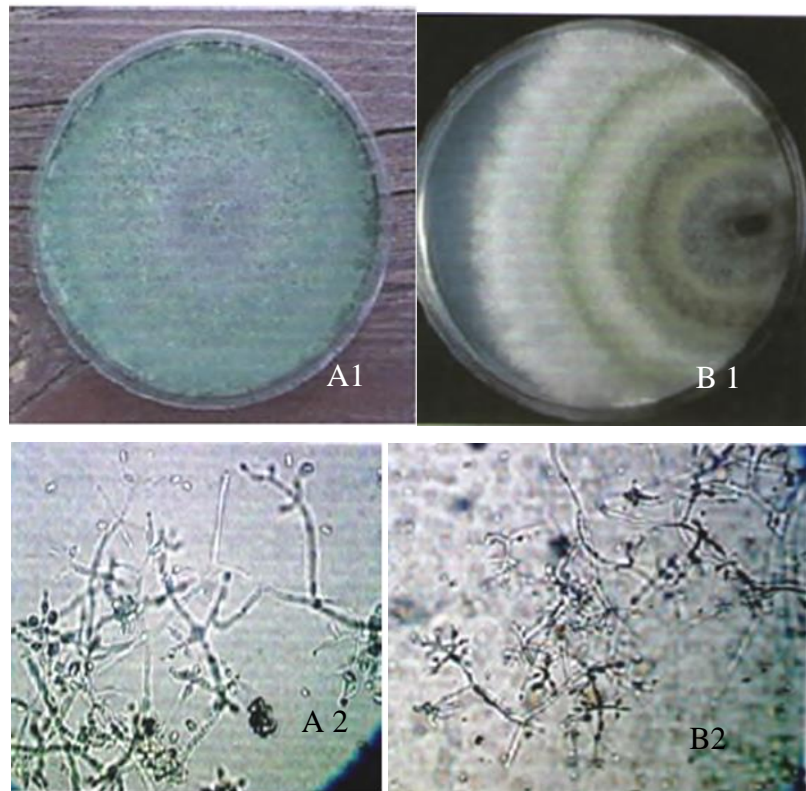
Les *Trichoderma* sont des agents potentiels surtout en agroalimentaire grave à leurs production d'enzymes, de substance bioactives et leur développement rapide (Prieto *et al.*,1997 ; cité par Benkada,2006). Plusieurs genre de *Trichoderma* ont montré durant les années passés des effets appréciables en lutte biologique en raison de leur effet antagoniste vis-à-vis d'autre espèces fongiques pathogènes tels que *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*...(Grondona *et al.*,1997 ; Benkada 2006). Les espèces du genre *Trichoderma* se développent à une température optimale qui se situe entre 25°C et 30°C avec un minimum de 0°C et un maximum de 30 à 37°C (Gary *et al.*, 2011).

Grâce à sa grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques, le genre *Trichoderma* est très répandu dans la nature, aussi bien en milieu terrestre que marin .En effet, les *Trichoderma sp.* Sont remarquables pour leur croissance rapide et leur capacité à utiliser différents substrats, par conséquent, l'élément majeur dans la microflore terrestre et marine. Les *Trichoderma sp.* terrestres se développent quasiment dans tous les sols (forestiers ou cultivés) et sur les végétaux en décomposition. Ils contaminent fréquemment le compost de la culture industrielle des champignons comestibles, mais sont rarement parasites de plantes vivantes.

Le genre *Trichoderma* est l'un des 3 prédominants. Il vient à la 3ème position après les genres *Penicillium* et *Aspergillus* en importance numérique. La présence des *Trichoderma sp.* en milieu terrestre (6% du nombre total des espèces fongiques) semble comparable à celle en milieu marin (6,4% à 10,4%) (Landreau., 2001). Leur abondance dans les écosystèmes est due à leur capacité à produire diverses substances bioactives et des enzymes. Ils sont de ce fait un maillon important dans les chaînes biologiques (Benkada .,2006).

L'aspect macroscopique de *Trichoderma sp.* est apprécié à partir de cultures sur géloses nutritives appropriées. Les colonies fongiques peuvent être légèrement floconneuses ou bien compactées en touffes. Entre ces deux extrêmes, existent des aspects intermédiaires (Figure 13). Les colonies sont colorées en fonction de la pigmentation des phialides.

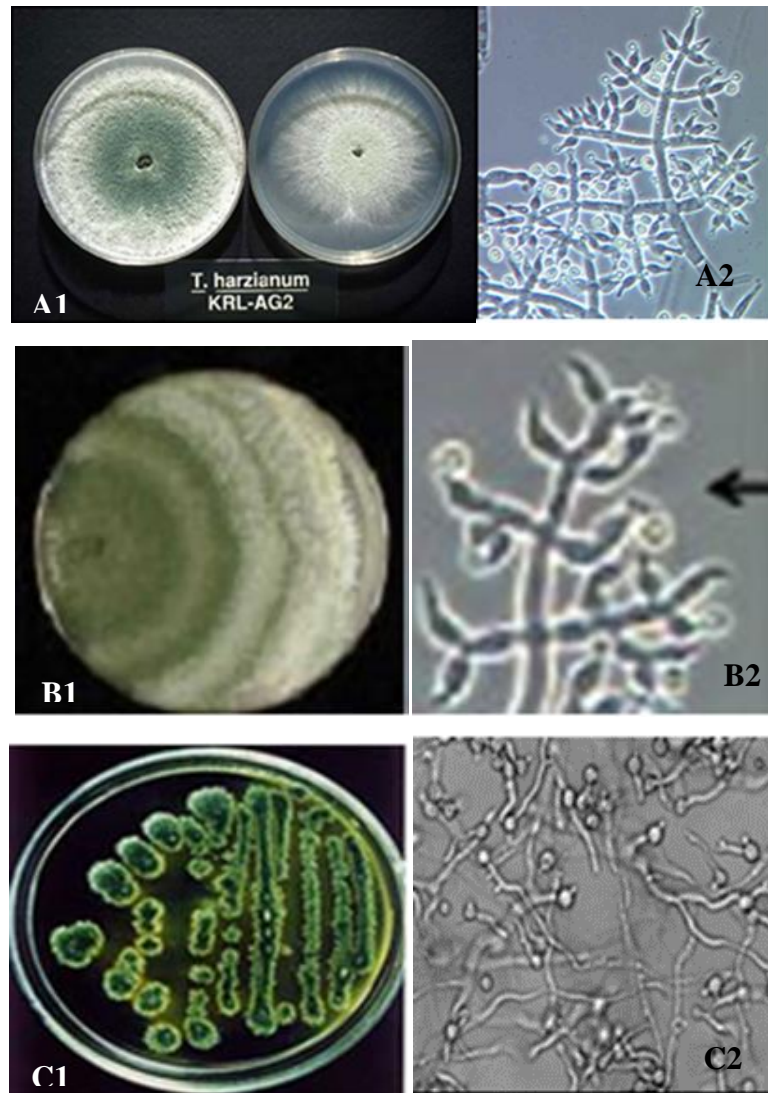
Sous microscope optique, le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies) (Figure 12). (Kubicek *et al.*, 2003 ; Benkada M., 2006).



**Figure 12 :** Aspects macroscopique et microscopique de *Trichoderma sp.* (A1, A2 et B1, B2)

<http://www.imep-cnrs.com/licence/planches%20tp%20myco%20.pdf>

Les espèces de *Trichoderma* les plus connues sont : *Trichoderma harzianum*, espèce largement répandu dans le sol, céréales, papiers, textiles.... etc... (Botton *et al.*, 1990) ; *Trichoderma viride*, espèce cosmopolite très répondeue, très résistante et *Trichoderma ressei* (Figure 13).

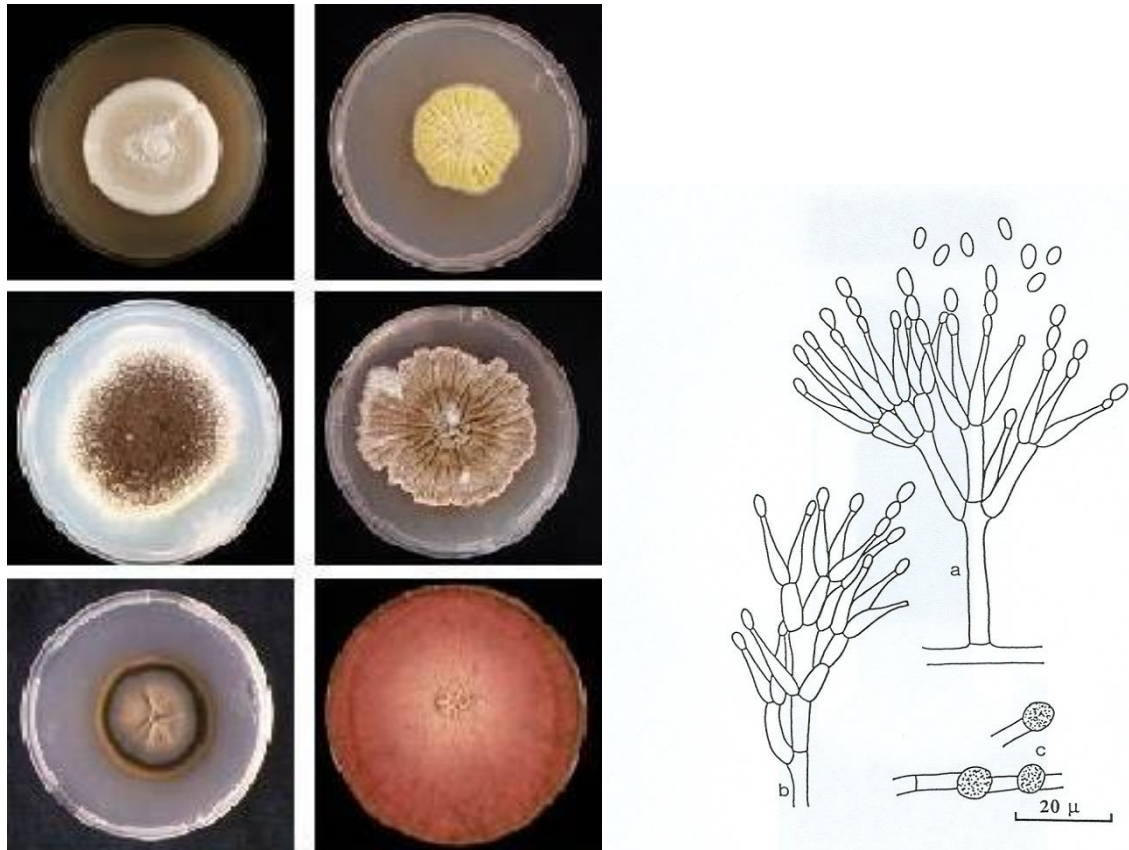


**Figure 13 :** Aspect macroscopique et microscopique de *Trichoderma harzianum* (A1 et A2), *Trichoderma viride* (B1 et B2) et *Trichoderma ressei* (C1 et C2)

### 7.5- Le genre *Paecilomyces*

Les *Paecilomyces* sont des champignons filamenteux imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. La forme sexuée appartient à la classe des Ascomycètes (*Byssochlamys*, *Talaromyces*, *Thermoascus*). Le genre comprend 31 espèces.

Les colonies poudreuses, à croissance rapide, sont généralement de couleurs claires (blanc, rose, chamois à brun-verdâtre) mais jamais vert. Les conidiophores ramifiés en verticilles portent des phialides cylindriques ou renflées dans la partie inférieure et terminées par un long col effilé et étroit. Les conidies unicellulaires, lisses ou échinulées, ovoïdes, sont disposées en très longues chaînes basipétales, divergentes ou enchevêtrées (Figure 14).



**Figure 14 :** Aspects macroscopique et microscopique de *Paecilomyces* sp.  
(<http://mycotacrcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=32&n=Paecilomyces>).

Les *Paecilomyces* sont des champignons cosmopolites et ubiquitaires (air, végétaux, sol, etc.). Certaines espèces sont entomopathogènes, d'autres impliquées dans des allergies de type I et III et parfois dans certaines infections (mycoses, endocardites, péritonites, sinusites). Elles peuvent produire de nombreuses mycotoxines relativement dangereuses (acide byssochlamique, acide indole-3-acétique, ferrirubine, fusigène, paecilotoxines, patuline, variotine, viriditoxine)(<http://mycotacrcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=32&n=Paecilomyces>).

## 8- Intérêts industriels des moisissures

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de

molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgau et Sanglier, 1992).

### 8.1- Intérêt alimentaire

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (Botton *et al.*, 1999).

La production de biomasse peut être une source importante pour l'alimentation animale et même humaine, en servant de complémentation des produits céréaliers. Quelques espèces fongiques ont un grand usage, c'est le cas d'*Aspergillus niger*, de *Fusarium graminearum* et de *Trichoderma harzianum* (Botton *et al.*, 1999 ; Larpend- Gourgau et Sanglier, 1992 ; Delgado-Jarana *et al.*, 2002)

Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. *Aspergillus niger* est un bon exemple, il produit la cellulase, l'amylase, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons. Cette moisissure secrète aussi des protéases, des lipases et des estérases utilisées dans différentes applications alimentaires (Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999).

### 8.2- Intérêt chimique

Il s'agit essentiellement de l'utilisation des protéases alcalines d'*Aspergillus oryzae* et de *Stachybotrys chartarum* dans les détergents (Miller, 2002).

La production de cellulase par *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum* présente une diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et le genre *Penicillium* est utilisée pour l'industrialisation des papiers et les textiles (Delgado-Jarana *et al.*, 2002).

Certains genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Mucor* et *Penicillium* sont capables de produire des lipides en quantités importantes et constituent une source potentielle d'utilisation chimique (Botton *et al.*, 1999).

En biolixiviation seules les bactéries présentent un intérêt industriel. Cependant, certaines moisissures possèdent d'intéressantes propriétés ; *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium*



*funiculosum* et *Rhizopus arrhizus* sont capables d'absorber de l'uranium du minerai. Les milieux de culture carencés en facteurs de croissance et en sels minéraux, diminuent le taux de croissance, mais stimulent ce phénomène (Boiron, 1996 ; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Botton *et al.*, 1999).

En biotransformation les moisissures ont une zone étroite d'application. Un exemple remarquable est l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline V par *Penicillium chrysogenum* et *Fusarium* entraînant la formation d'acide amino-6-pénicillanique qui est un intermédiaire important de la production de pénicillines semi synthétiques telles que l'ampicilline et l'amoxicilline (Durand et Monson, 1988).

### 8.3- Intérêt pharmaceutique

La production industrielle en vitamines se limite à une partie de la synthèse de la riboflavine produite spécialement par *Eemothecium ashbyii* cultivé en milieu agité et supplémenté en lipides. La vitamine A pourrait faire l'objet d'une production microbiologique par les champignons notamment les espèces de l'ordre des mucorales (Botton *et al.*, 1999). Les champignons filamenteux sont des grands producteurs d'antibiotiques tel que la pénicilline produite par le genre *Penicillium* et la céphalosporine produite par *Cephalosporium* (Larpent- Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Botton *et al.*, 1999). Cependant les acides organiques d'origine fongique n'ont pas une application pharmaceutique importante (Divies, 1984).

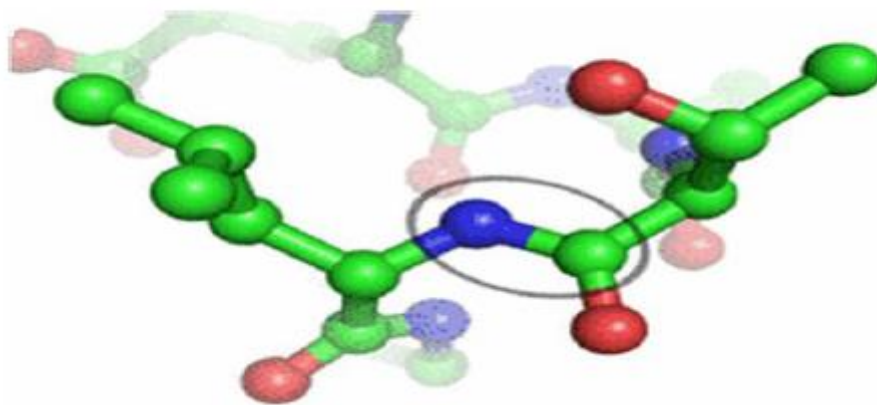
### 8.4- Intérêt médical

Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications (Boiron, 1996 ; Botton *et al.*, 1999).

La découverte de la cyclosporine, puissant agent immunodépresseur, puis la mise en évidence de corrélation entre l'activité de certaines enzymes et diverses pathologies ont permis de donner un grand essor aux sciences médicales et pharmaceutiques (Botton *et al.*, 1999 ; Richard, 2005).

## 1- Généralités

Les protéases sont un groupe d'enzymes très complexe Elles appartiennent à la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (Kumar *et al.*, 2008). Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique (Figure 15). Elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Frazier, 1967; Scriban, 1999). La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysat de protéines ou d'un mélange d'acides aminés.



**Figure 15 :** Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont hydrolysées par les protéases (<http://www.Futura-sciences.com>)

Elles représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicale et dans les domaines de recherche (Coral *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005). Elles ont été utilisées pour la première fois dans l'industrie alimentaire comme des agents de coagulation pour la production de fromage (Sandhya *et al.*, 2004). Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes 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). Cependant, les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques :

- La susceptibilité à la manipulation génétique ;
- La grande diversité biochimique des produits obtenus (Coral *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2008).

Les microorganismes élaborent une large gamme des protéases qui peuvent être intra et/ou extracellulaires :

- Les premières sont importantes dans les différents processus cellulaires et métaboliques, tel que la sporulation, la différenciation, la maturation des enzymes et la maintenance de la réserve cellulaire en protéines.
- Tandis que les autres sont essentielles pour l'hydrolyse des sources nutritionnelles protéiques et pour inhiber la cellule d'absorber ou d'utiliser des produits hydrolytiques (Gupta *et al.*, 2002).

## 2- Propriétés

Les protéases constituent un groupe très large et complexe contenant des enzymes qui diffèrent dans leurs propriétés tels que : le site actif, le mécanisme catalytique, les optima de pH et de température, le profil de la stabilité et la spécificité du substrat (Sumantha *et al.*, 2006; Vishwanatha *et al.*, 2009). La spécificité d'action des enzymes protéolytiques est régie par la nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels (aromatiques, aliphatiques ou la présence de soufre) autour de la liaison à hydrolyser (Sumantha *et al.*, 2006; Benedykt et Katarzyana, 2008). Ces enzymes sont très importantes du fait qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tels que la décomposition des lipides et des glucides. Les protéases sont capables de modifier les propriétés biologiques des chaînes polypeptidiques suite à la coupure des liaisons peptidiques (activation, inactivation ou une protéolyse non spécifique pendant la dégradation). La raison pour laquelle les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnelles, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines) (Benedykt et Katarzyana, 2008).

### 3- Sources des protéases

Les protéases peuvent avoir différentes origines :

➤ **Protéases d'origine végétale**

Les enzymes d'origine végétale, en particulier les protéases sont par ordre décroissant en technologie : la papaine, la bromélaïne, la kératinase et la ficine représentent une partie des protéases les plus répandues (Rao *et al.*, 1998).

➤ **Protéases d'origine animale**

Une grande partie de protéases animales sont synthétisées par le pancréas sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon auto-catalytique dans des conditions bien déterminés (Rao *et al.*, 1998). Telles que : la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine.

➤ **Protéases d'origine microbienne**

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toute les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya *et al.*, 2005). Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries, (Devi *et al.*, 2008).

**Tableau 1** : Exemples des protéases microbiennes (Devi *et al.*, 2008).

Sources	Espèces	Références
• Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus</i> ES1	García-Gómez <i>et al.</i> , 2009 Sathya <i>et al.</i> , 2009 Laxman <i>et al.</i> , 2005 Germano <i>et al.</i> , 2003 Wu <i>et al.</i> , 2006 Agrawal <i>et al.</i> , 2005 Hajji <i>et al.</i> , 2007
• Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lypolytica</i>	Chi <i>et al.</i> , 2007 Tobe <i>et al.</i> , 1976
• Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 <i>Synergistes</i> sp.	Ferrero <i>et al.</i> , 1996 George <i>et al.</i> , 1995 Soares <i>et al.</i> , 2005 Patel <i>et al.</i> , 2005 Sinsuwan <i>et al.</i> , 2008 Kumar <i>et al.</i> , 2008a
• Actinomycètes	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Nocardiopsis alkaliphila</i> sp.	Mehta <i>et al.</i> , 2006 Hozzein <i>et al.</i> , 2004

#### - Protéases bactériennes

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus Subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (Calk *et al.*, 2000 ; Frazier, 1967). Les bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida* produisent des métalloprotéases thermorésistantes utilisées en particulier pour la coagulation du lait et pour l'affinage des fromages. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (Cousin *et al.*, 1982). Les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* jouent un rôle très important dans l'affinage des fromages (Desmazeaud, 1978).

#### - Protéases des moisissures

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques (Tableau 2) tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc... (Frazier, 1967 ; Ul-haq *et al.*, 2003).

#### - Protéases des levures

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartyl protéase, une sérine protéase et une métallo protéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (Kresze, 1991 ; Boiron, 1996).

### **4- Classification des protéases**

La classification des protéases se base sur plusieurs critères tels que la longueur de la chaîne polypeptidique, le mode d'attaque de la chaîne, le pH d'activité et la nature de résidu impliqué dans le site actif (Colwell et Grigorova, 1989 ; Rao *et al.*, 1998).

#### **4.1- Selon longueur de la chaîne polypeptidique**

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il existe deux catégories : les protéases qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques et les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres (Frazier, 1967 ; Colwell et Grigorova, 1989).

#### **4.2- Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique**

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisés en deux classes : les endopeptidases et les exopeptidases (Scriban, 1999 ; Moodie, 2001). Ces dernières sont-elles mêmes subdivisées en deux sous-classes les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Les aminopeptidases commencent leur action par l'extrémité NH<sub>2</sub> libre du polypeptide et leur activité dépend souvent de la présence d'ion métallique ; les carboxypeptidases commencent leur attaque par l'extrémité COOH libre du polypeptide (Figure 16) (Scriban, 1999 ; Trap et Boreau, 2000). L'activation de ces différentes enzymes conduit à la libération de di et tripeptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés (Scriban, 1999).

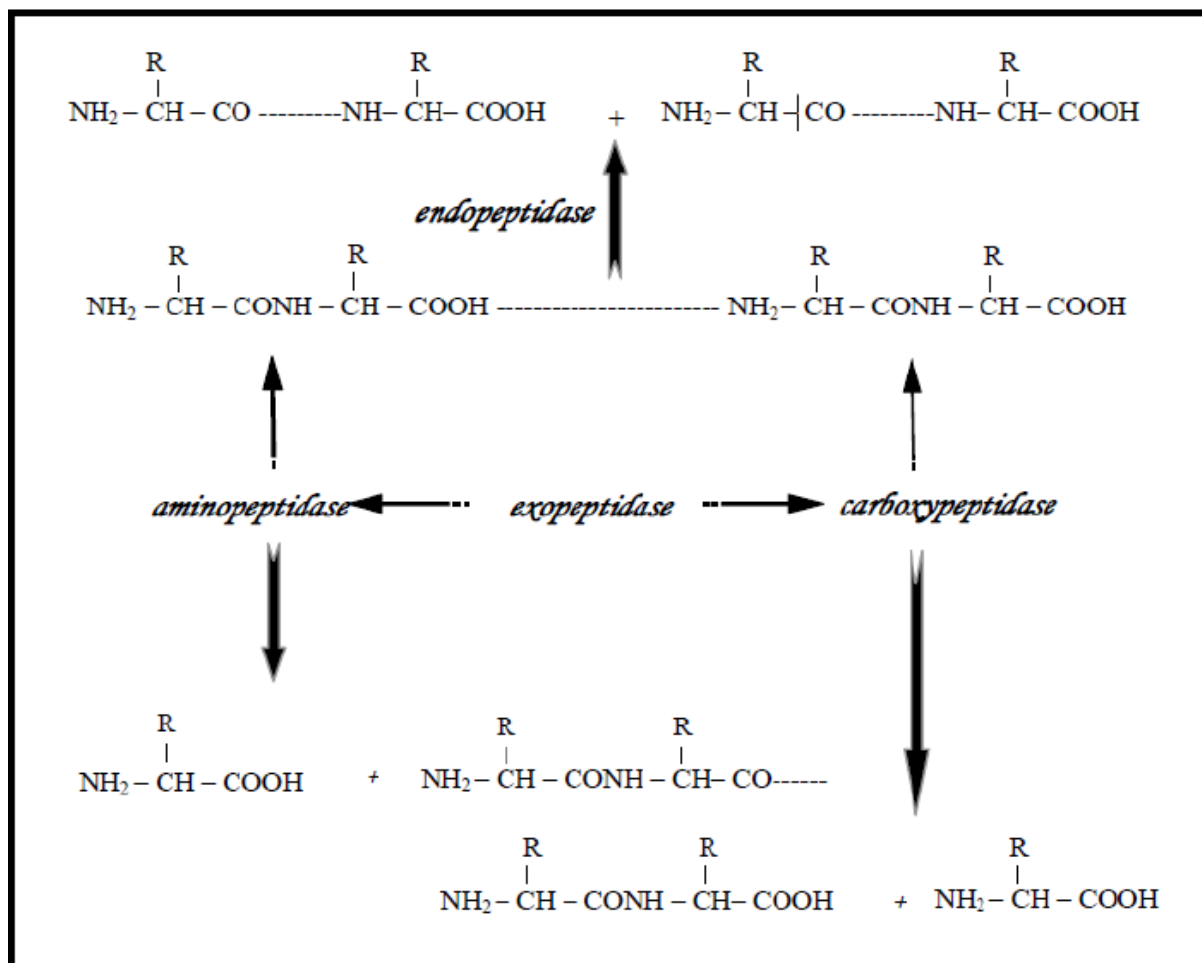


Figure 16 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

#### 4.3- Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif

Les séquences primaires et la spécificité des acides aminés de leur site actif ont permis la classification des endopeptidases en quatre grandes familles, les sérylprotéases, les cystéylprotéases, les aspartylprotéases et les métalloprotéases (IUBMB, 1998).

##### ➤ Protéases à sérine

Les protéases à sérine sont très répandues dans la nature, aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes. Leur mécanisme catalytique implique l'intervention d'un résidu sérine (Reginald *et al.*, 1975 ; Kortt *et al.*, 1994 ; Pelmont, 1995 ; Trap et Boreau, 2000).

##### ➤ Cystéyl-protéases

Les protéases cystéines, ou thiols, sont très peu utilisées en industrie. Ces protéases sont présentes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La plupart des protéases de cette

classe sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme l'histidine, l'aspartate et la cystéine (Kresze, 1991 ; Pelmont, 1995).

#### ➤ **Aspartyl-protéases**

Les protéases aspartiques appelées également protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu d'acide aspartique présent au niveau du site actif de l'enzyme. Ces enzymes présentent un intérêt industriel dans les secteurs où l'hydrolyse des protéines à faible pH est désirée (Pelmont, 1995 ; Rao *et al.*, 1998).

#### ➤ **Métallo-protéases**

Les métallo-protéases forment un groupe de protéases très variées. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le  $Zn^{2+}$  nécessaire à leur activité. Ces enzymes sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7,0. Toutefois, certaines métallo-protéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10 (Wilkesman et Kurz, 2009 ; Belitz *et al.*, 2009).

### **4.4- Selon le pH d'activité**

Selon ce paramètre, les enzymes protéolytiques de différentes origines sont classées en trois groupes : des protéases acides, neutre et alcalines (Cingöz, 2009).

## **5- Mode d'action**

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé dans trois étapes : Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce-la polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique. Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le  $OH^-$  d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l' $H_2O$ ) (Figure 17) (Pelmont, 1995).



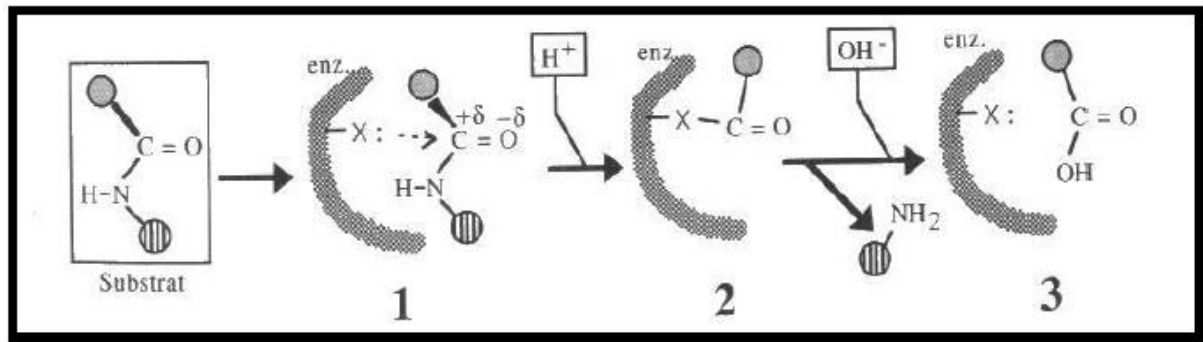


Figure 17 : Mécanisme d'action des protéases (Pelmont, 1995).

## 6- Production des protéases par fermentation

La nature de la fermentation, solide ou liquide (submergée), influe divers aspects de la croissance des microorganismes ainsi que la production des substances d'intérêt (Sumantha *et al.*, 2005).

### 6.1- Fermentation sur milieu liquide

La fermentation sur milieu liquide peut être considérée comme une violation de l'habitat naturel des microorganismes, en particulier les champignons. Elle consiste à faire croître les microorganismes sur un substrat nutritif liquide. Ce type de fermentation a été traditionnellement utilisé pour la production industrielle des enzymes, en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité (Singhania *et al.*, 2009).

### 6.2- Fermentation sur milieu solide

La fermentation sur milieu solide est généralement définie comme une croissance microbienne sur des particules solides humides en l'absence d'eau libre (Durand, 2003 ; Gervais *et al.*, 2003 ; Rahardjo *et al.*, 2006). De façon simplifiée, les microorganismes se développent dans un système à trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège dans les particules. Le développement des champignons filamenteux en fermentation solide se fait par extension et ramification des filaments formant le mycélium. Après l'inoculation d'un substrat par des conidies, les hyphes se développent pour former un tapis mycélien qui s'étend à la surface des particules solides. A partir de ce tapis

mycélien, des filaments se développent dans les espaces gazeux et des filaments pénètrent à l'intérieur des particules (de la matrice solide) ou dans les espaces inter-particulaires (par croissance) à la recherche de composés nutritifs, notamment dans les pores remplis de liquide. A des taux normaux d'humidité, les espaces entre les filaments aériens sont remplis de gaz (aérobie), tandis que les filaments en contact avec le substrat sont remplis d'eau (anaérobie). Les activités métaboliques se produisent principalement près de la surface où à l'intérieur des pores, mais les filaments aériens peuvent présenter une activité due à des phénomènes de diffusion. Pour finir, les enzymes hydrolytiques diffusent dans la matrice solide et dégradent les polymères afin de permettre la production de molécules assimilables par le champignon (Holker et Lenz, 2005 ; Rahardjo *et al.*, 2006).

➤ *Avantages et inconvénients de la fermentation solide*

La production industrielle des enzymes et d'autres métabolites fait appel aux deux procédés de fermentation. La décision de choisir l'un ou l'autre est probablement basée sur le coût et l'efficacité du processus. Il est donc important de connaître les avantages et les inconvénients de la fermentation sur milieu solide par rapport à la fermentation liquide. Parmi ces avantages on note :

- ❖ L'absence d'eau libre permet de réduire considérablement le volume des installations de fermentation et les contaminations bactériennes.
- ❖ Le peu d'eau disponible favorise la production de certains métabolites qui n'apparaissent pas ou peu en culture liquide. ainsi il minimise les contaminations bactériennes qui réclament des taux d'humidité élevés pour croître (Mathot, 1996).
- ❖ Les opérations de mélange étant facilement modulables, il n'y a pas de production de mousses lors des fermentations solides, contrairement aux fermentations liquides.
- ❖ En calibrant bien les particules du substrat, l'aération peut être assurée passivement et/ou sans agitation ou par agitation discontinue (Durand, 1983).
- ❖ La réduction des coûts et du temps consommé pendant l'extraction et la récupération du produit (moins de techniques à appliquées et volumes réduits en solvants d'extraction), ainsi que pour le traitement des effluents (en raison de la faible teneur en eau).

## 7- Extraction et purification des protéases

### 7.1- Broyage

L'extraction des protéases se fait par des méthodes physiques ainsi que des méthodes chimiques qui permettent la libération des différents composants de la cellule. Le broyage est souvent la méthode la plus utilisée. Actuellement, le broyage est effectué en présence de l'azote liquide qui permet la libération de la quasi-totalité des protéases intra- ou extracellulaire sans provoquer des dénaturations. (Llorente *et al.*, 2004; Silva and Malcata, 2005; Salvador SM., 2006; Vairo Cavalli *et al.*, 2008; Hashim *et al.*, 2011; Brutti *et al.*, 2012, Benchiheub M.,2015).

### 7.2-Précipitation

Le sulfate d'ammonium est en particulier le sel utilisé pour la précipitation. Son addition, à une concentration comprise entre 0,5 et 3 M, à une solution protéique aqueuse entraîne une diminution de la constante diélectrique, donc de la stabilité des protéines, ce qui conduit à leur précipitation (Hainque, 2008). Après la séparation de précipité par centrifugation, les protéines et en particulier l'enzyme à étudier subissent une dialyse.

La précipitation est toujours utilisée afin d'éliminer un taux important des protéines dans les extraits enzymatiques. Afin de purifier la protéase des graines de *C. calcitrata*, l'AS est rajouté à l'extrait brut à une concentration entre 30 et 100% suivi par une dialyse (Salvador SM. 2006). Elle est utilisée comme première étape pour la purification des protéases de *Centaurea calcitrapa*, *Synergistes sp.*, *Mucor Pusillus*, (Salvador SM. *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2008; Nouani *et al.*, 2009). Alor que pour la cystéylprotéase du gingembre, la précipitation est réalisée l'acétone froid (- 23°C) (Hashim *et al.*, 2011 ; Benchiheub M.,2015).

### 7.3-Centrifugation

C'est une méthode qui se base sur la séparation des molécules d'un mélange sur la base de leur différence de densité dans un solvant. Une molécule soumise à un champ gravitationnel se déplace jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance capable de l'arrêter. Une centrifugation réfrigérée est utilisée pour la séparation des protéines (Hainque, 2008 ; Benchiheub M., 2015).

## 8- Application industriel des protéases

Les protéases sont parmi les trois plus grands groupes d'enzymes industrielles (hydrolases). Elles représentent environ 60-65% des ventes totales dans le monde entier des enzymes, en raison de leurs applications dans plusieurs secteurs industriels (Wang *et al.*, 2005; Chellappan *et al.*, 2006; Barnali *et al.*, 2008 ; Mukherjee *et al.*, 2008).

### 8.1-Industrie alimentaire

#### ➤ Boulangerie

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Également des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao *et al.*, 1998).

#### ➤ La fabrication fromagère

Des recherches approfondies ont permis de prouver que la majorité des protéases microbiennes acides possède une grande capacité à coaguler le lait pour former le caillé, l'étape clé dans la production fromagère (Neelakantan *et al.*, 1999; Sumantha *et al.*, 2006); ce qui facilite l'expansion de l'industrie fromagère, dont le développement a été limité par la pénurie de la présure animale. (Aguilar *et al.*, 2008).

Dans l'industrie du lait, les protéases acides, neutres et basiques produites par *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Thermoascus aurantiacus*, *Irpex lactis*, *Endothia parasitica* et autres espèces du genre *Mucor* ont été également utilisées (Channe et Shewale, 1998; Merheb *et al.*, 2007; Aguilar *et al.*, 2008). La protéase produite par *Pseudomonas fluorescens* R098 s'utilise actuellement comme un agent d'amélioration (Koka et Weimer, 2000).

### 8.2- Domaine pharmaceutique et médical

Les enzymes protéolytiques sont également utilisées pour développer des produits d'importance médicale. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies. Une élastotérase provenant de *Bacillus subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles d'abcès et de plaies profondes (Kudrya et Simonenko, 1994). Enfin, une asparaginase provenant de *E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002).

### 8.3- Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (Kumar *et al.*, 1999). Les enzymes protéolytiques de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyliquefaciens*, *Streptomyces sp* et de différentes souches d'*Aspergillus* sont actuellement utilisées dans ce domaine (Gupta *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2006).

### 8.4- Autres applications

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (Dalev, 1994; Ichida *et al.*, 2001). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine (Sumantha *et al.*, 2006).

*Matériels*  
*Et Méthodes*

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Il porte sur la production et l'extraction des protéases extracellulaires par les moisissures du sol et la mise en évidence de l'effet de la température et du pH sur l'activité protéolytique.

## **1- Présentation de la zone d'étude**

Chaabet Erssas : c'est un lieu situé à Constantine adjacente de l'Université des frères Mentouri l'une des wilayas de l'EST algérien. La zone de prélèvement de l'échantillon est située à côté du laboratoire LaMyBAM.

## **2- Prélèvements des échantillons**

Afin de permettre l'expérimentation en laboratoire, il a été procédé à un prélèvement d'échantillon à partir d'un sol forestier à Chaabet Erssas (Figure 18).

Le prélèvement du sol est réalisé à l'aide d'une cuillère stérile, la couche supérieure des trois premiers centimètres est écartée (Buhot, 1973 ; Mihaili et Alcoren, 1987 ; Saadoune et Momant, 1997). Le sol est, ensuite, recueilli dans des flacons stériles soigneusement fermés et l'analyse mycologique est effectuée dès l'arrivée au laboratoire (Rodriguez-Zaragoza *et al.*, 2005).



**Figure 18** : Prélèvement d'échantillonnage à Chaabet Erssas ([A] : Site de prélèvement, [B] échantillon du sol pour l'analyse)

## **2.1- Préparation des milieux de cultures**

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont principalement le milieu PDA (potato dextrose agar) jugé comme milieux standard pour le développement des champignons) (voir Annexe 1) ; le milieu Sabouraud (Annexe 2) et le milieu au lait gélosé (Annexe 3).

## **2.2- Préparation des dilutions**

### ➤ **But**

La diminution de la charge microbienne par dilution de l'échantillon de sol à analyser est réalisée dans le but d'une purification ultérieure plus aisée et l'obtention de colonies bien séparées à partir des cultures mixtes.

## **2.3- Méthode d'isolement**

Avant d'entamer le travail, il est important de créer une zone stérile, par la flamme du bec Bunsen, sur une paillasse soigneusement nettoyée.

L'isolement des champignons a été réalisé sur milieu PDA selon la méthode de dilutions décimales. En effet, 1g du sol est ajouté à 9 ml d'eau distillée stérile suivit d'une homogénéisation.

Un volume d'1 ml de la solution mère obtenue est introduit dans un nouveau tube contenant un volume de 9 ml d'eau distillée stérile afin d'obtenir la dilution  $10^{-1}$  et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-5}$  ; on est arrêté à cette dilution parce que la dilution  $10^{-5}$  n'a pas donner un développement sur boite.

## **2.4- Ensemencement et incubation**

Bien homogénéiser le contenu des tubes à essai contenant les suspensions ;

- prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, 1 ml de chaque suspension ;
- l'étaler à l'aide d'un râteau, sur toute la surface de la boite de Pétri coulée (Le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation).
- sur les boites ensemencées on indique le numéro de l'échantillon, la dilution ainsi que la date d'ensemencement.



Il est à noter que deux répétitions sont réalisées pour chaque dilution.

Les boîtes sont incubées à 28°C et sont observées quotidiennement pendant trois jours.

### **3-Purification des souches**

Les boîtes issues d'isolement comprennent plusieurs colonies d'aspect, de couleur et de texture différentes. La purification des colonies consiste à prélever quelques spores, de chaque colonie, à l'aide d'une anse de platine stérile par une pique centrale sur des boîtes de pétri contenant le milieu de culture PDA.

L'incubation se fait à 30°C jusqu'à l'apparition des champignons.

#### **3.1- Identification des isolats**

L'identification morphologique des isolats, fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques, macro et microscopiques, des moisissures isolées à l'état pure (Botton *et al.*, 1990).

##### **➤ Identification macroscopique**

D'après Guiraud (1998), pour faire une identification macroscopique, les caractères cultureux étudiés sont : la vitesse de croissance des colonies, la couleur des colonies et sa variation en fonction du temps, la texture de la surface, la couleur de l'envers des boîtes, l'odeur des colonies et changement de la couleur du milieu utilisé.

##### **➤ Identification microscopique**

L'identification microscopique des moisissures repose sur plusieurs méthodes, les deux méthodes utilisées sont celles du scotch pour les cultures filamenteuses et poudreuses et la méthode de coloration par le lactophénol bleu de coton (Chabasse *et al.*, 2002).

- Méthode de Scotch : un petit morceau de scotch est appliqué par la face collante sur la colonie à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame porte –objet (Chabasse *et al.*, 2002).
- Coloration par le lactophénol bleu coton : un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de

colorant, recouvert d'une lamelle couvre-objet servant à écraser la préparation (Chabasse *et al.*, 2002).

L'observation microscopique est effectuée au microscope optique aux différents grossissements (GX4, GX10, GX40), et par immersion à (GX100). Les caractéristiques prises en considération dans cette technique sont la nature du filament, la fructification, la morphologie des spores asexuées et la présence de structures particulières comme les sclérotés.

### **3.2- Conservation**

Les souches purifiées sont été conservées par la méthode la plus simple et la plus communément utilisée au laboratoire, qui consiste à repiquer ces souches à la fin de leur croissance en tubes sur gélose inclinée, en utilisant comme milieu de conservation la gélose PDA. Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C (Botton *et al.*, 1990).

### **3.3- Sélection des souches protéolytiques**

Afin de mettre en évidence leurs activités protéolytiques, les souches obtenues ont été ensemencées sur le milieu sélectif (lait gélosé) (Annexe 3) par un repiquage au centre ; l'incubation à lieu dans une étuve à 30°C. Le lait gélosé est préparé à quatre différentes concentrations en lait écrémé : 10%, 20%, 30% et 40% (Harrigan et McCance, 1976).

Ce milieu présente plusieurs avantages tels que la simplicité de préparation, la variété et la richesse en protéines et le faible coût (Smith, Gordon et Clark, 1952). L'utilisation de ce milieu permet la mise en évidence de l'activité protéolytique par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice (Anagnostakis et Hankin, 1975 ; Harrigan et McCance, 1976).

## **4- Méthode de fermentation et de production**

### **4.1- Préparation de l'inoculum**

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique sélectionnée. Cette dernière, est préparée par addition de 10 ml d'eau physiologique stérile aux souches cultivées pendant sept jours sur milieu PDA en boîte de Pétri. Les spores sont récupérées superficiellement en utilisant un râteau sous des conditions aseptiques. Ensuite, la

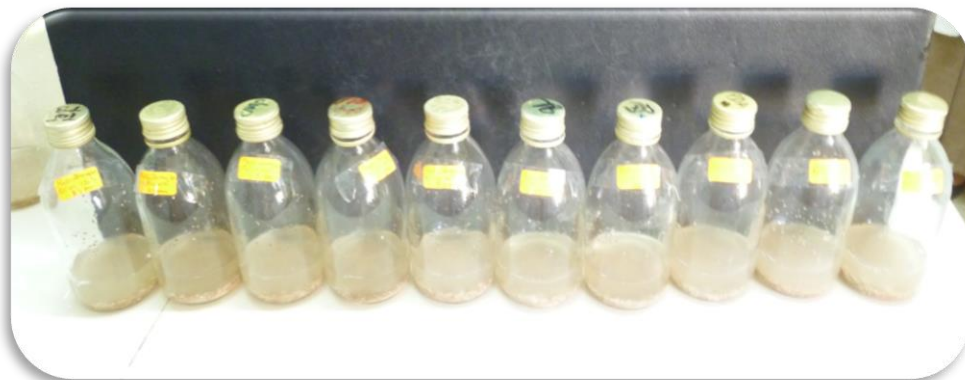
détermination de la concentration de la suspension sporale est effectuée par dénombrement des spores sur cellule de Thomas.

#### **4.2- Préparation du milieu de fermentation**

Cinq fermentations ont été testées, afin de mettre en évidence l'activité : fermentation liquide non agitée ; deux fermentations liquide agitée ; fermentation semi liquide agitée et fermentation solide.

##### **4.2.1- Fermentation sur milieu liquide non agitée (N°1)**

Cette fermentation a été réalisée selon la méthode de Prakash et Padmaja (2012). Le substrat testé est le son de blé, ce substrat a été dissous dans 50 ml d'un milieu minérale (MM) sa composition par litre : 5g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ; 2g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 1g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 0,5 g  $\text{MgSO}_4$ , le pH est de 6.8. Les flacons ont été mis en incubation avec agitation orbitale (150 rpm) à 28° C, pendant 240 heures (10 jours). Des échantillons ont été prélevés toutes les 24 heures.



**Figure 19** : Fermentation liquide statique

##### **4.2.2- Fermentation sur milieu liquide agitée (N° 2)**

Cette fermentation a été réalisée sur milieu Saboureaud liquide. Le substrat testé est le Peptone de Caséine. La composition du milieu de fermentation par litre est : 20g Peptone de Caséine, 10g Glucose. Le pH est de 6.8. Les flacons ont été mis en incubation avec agitation orbitale (150 rpm) à 28° C, pendant 240 heures (10 jours). Des échantillons ont été prélevés toutes les 24 heures.

#### **4.2.3- Fermentation sur milieu liquide (N°3)**

Selon le protocole utilisé (Prakash et Padmaja ,2012) (modifier), le milieu de culture de base est préparé à partir du son de blé fourni par le moulin d'ELKHROUB, à Constantine. Le son de blé est réduit en poudre à l'aide d'un broyeur est d'un tamis (diamètre 0.5 mm), il est mis en solution dans de l'eau distillée tiède ( sous une agitation continue) pendant 30 min à une concentration de 3% afin de déterminer la concentration optimale pour la production de la protéase ,ensuite, le mélange subit une filtration. Les flacons ont été mis en incubation avec agitation orbitale (150 rpm) à 28° C, pendant 240 heures (10 jours).

#### **4.2.4- Fermentation sur milieu liquide (N°4)**

Selon le protocole de Prakash et Padmaja ,2012 (modifier) ; le milieu de culture de base est préparé à partir du son de blé fourni par le moulin d'ELKHROUB, à Constantine. Le son de blé est réduit en poudre à l'aide d'un broyeur est d'un tamis (diamètre 0.5 mm),il est mis en solution dans de l'eau distillée tiède ( sous une agitation continue) pendant 30 min à une concentration de 3% afin de déterminer la concentration optimale pour la production de la protéase ,ensuite, le mélange subit une filtration. Le filtrat obtenu constitue alors le milieu de culture de base additionnée de 2ml de lactosérum pour enrichir le milieu de fermentation. Dans chaque flacon on a met 50 ml de milieu de fermentation et Puis ajouter du lactosérum pour enrichir le milieu de fermentation. Les flacons ont été mis en incubation avec agitation orbitale (150 rpm) à 28°C, pendant 240 heures (10 jours).



**Figure 20** : Fermentation liquide

#### **4.2.5- Fermentation sur milieu semi liquide agitée**

Selon le protocole de Casteltanos-Mogealet *et al.*(2008) ; une culture de la souche protéolytique sélectionnée a été cultivée dans des Erlenmeyer de 125 ml contenant 25 ml d'un milieu liquide synthétique contient (par litre): 0,375 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,375 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,250 g de  $\text{NaCl}$ ; 0,275 g de  $\text{MgSO}_4$ ; additionné de 3.5g de son de blé dans chaque flacon. Les flacons ont été mis en incubation avec agitation orbitale (150 rpm) à 28° C, pendant 240 heures (10 jours).



**Figure 21 :** Fermentation semi liquide agitée

#### **4.2.6- Fermentation sur milieu solide**

Pour la fermentation solide, le milieu de culture choisi est un milieu solide à base de son de blé ; il est favorable à la production des protéases extracellulaires (Kumar *et al.*, 2005). Dans des Erlen-Meyers de 250 ml, on introduit 10g du son de blé supplémenté à 10ml du milieu minéral, ayant la composition suivante (g/l) :  $\text{KNO}_3$  2.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.437,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.116,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.204, dont le pH est égal à 6,5. La préparation est stérilisée par la suite à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. Les flacons ont été mis en incubation avec agitation orbitale (150 rpm) à 28° C, pendant 240 heures (10 jours).



**Figure 22 :** Fermentation solide

### **4.3- Ensemencement des milieux de fermentation**

Après stérilisation, les milieux de fermentation ont été inoculés avec 1ml de la solution sporale préparée précédemment ( $10^6$  spores/ ml) et incubées à 30°C dans un bain Marie agité ou dans une étuve, selon le cas de la fermentation. Des prélèvements du milieu de fermentation sont effectués chaque 24 h afin d'établir la cinétique de production de protéase de la souche sélectionnée.

## **5-Etude de l'activité protéolytique produite**

### **5.1- Préparation des extraits enzymatiques**

Après la fermentation, les extraits enzymatiques ont été extraites avec 100 ml d'eau distillée stérile en assurant une agitation, pendant 2 heures dans un incubateur agitateur, le mélange est alors filtré à travers une passoire pour éliminer les solides (Tunga *et al.*, 2003). Le filtrat est, lui-même, clarifié par une autre filtration sur papier filtre (Whatman n° 1) pour obtenir l'extrait enzymatique. Ce dernier, est conservé au congélateur pour le dosage de l'activité enzymatique.

## **5.2- Méthode de dosage de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique est déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés (Mathieu, 2005). Cette quantité de tyrosine libérée, peut être mesurée directement par la méthode colorimétrique, décrite par, Tsuchida *et al.*, 1960

### **5.2.1- Principe**

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et les polypeptides en libérant des acides aminés libres et des peptides simples, qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines que l'on utilise comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéasique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

### **5.2.2- Réaction enzymatique**

L'activité protéolytique est déterminée par l'utilisation de la caséine comme substrat. Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage.
- 1 ml de substrat (solution de caséine à 2% dans le citrate de sodium (0,02 M) à pH 7,0. Après agitation, et incubation pendant 30 min au bain marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 2 ml de TCA froid à 4%. Le mélange est agité et laissé reposer pendant 15 min à 4°C (Tsuchida *et al.*, 1986) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya *et al.*, 2005). Le produit obtenu est, ensuite, filtré sur papier Whatman N°1.
- Le blanc est préparé de la manière suivante, 1 ml de caséine est ajouté à 2 ml TCA à 4°C (Tsuchida *et al.*, 1986) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules. Le filtrat obtenu est rajouté de 1 ml de l'extrait enzymatique.

### **5.2.3- Protocole de dosage**

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode de Tsuchida *et al.*, 1986.

- 1 ml du filtrat.

- 5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.4M).

- 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 10%. Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 20 min. L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm) ; l'activité est calculée par référence à une courbe étalon de la tyrosine comme standard (Annexe 4). Une unité (UI) de protéase est l'équivalent de 1 $\mu$ g de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml de la solution d'enzyme. Le blanc est préparé de la manière suivante, 1 ml de caséine est ajouté à 2 ml TCA est rajouté avant le substrat.

Chaque dosage est effectué en trois répétitions.

## **6- étude de l'effet de température et du pH**

### **6.1- Influence du pH**

L'influence du pH sur l'activité enzymatique est estimée par l'addition (au mélange réactionnel) de tampons afin d'obtenir différentes valeurs de pH, c'est-à-dire des pH compris dans l'intervalle [5-10]. Pour cela, on ajoute les systèmes tampons suivants :

- Pour l'intervalle [5 –6] : citrate de sodium (0,1 M) / phosphate monosodique (0,2 M) ;

- Pour l'intervalle [7 –8] : phosphate monosodique (0,2 M) / phosphate disodique (0,2 M) ;

- Pour l'intervalle [8 –9] : phosphate disodique (0,2M) /NaOH (1N).

- Pour l'intervalle [9-10] : Phosphate monosodique (0,2M) .

### **6.2- Influence de la température**

L'effet de la température d'incubation est déterminé par mesure de l'activité protéasique de l'extrait brut, incubé pendant 1 heure dans de différentes températures (30°C, 40°C, 50°C, et 60°C), à pH optimal.



Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire LaMyBAM (Université des Frères Mentouri – Constantine) et son objectif tendait vers la production et l'extraction des protéases extracellulaire des moisissures telluriques ainsi que l'effet de certains facteurs physico-chimiques sur l'activité protéolytique de celles-ci.

## **1-Isolement des champignons de sol**

Les cultures réalisées à partir des dilutions décimales d'échantillon de sol de la forêt de Chaabet Erssas ont abouti à des aspects, de texture et de couleurs différentes sur milieu PDA. En effet 12 colonies fongiques ont été isolées ; purifiées ; identifiées puis conservées.



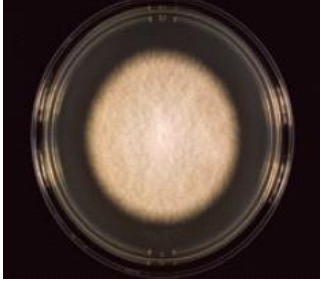

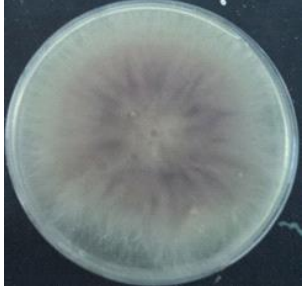

## **2- Identification des souches**

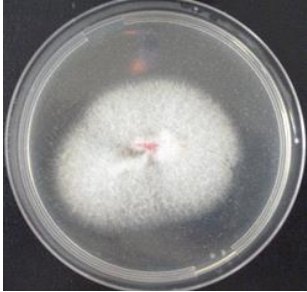
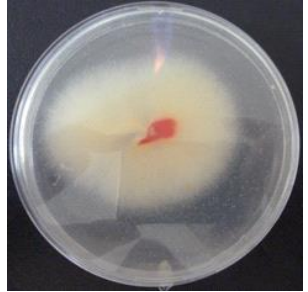

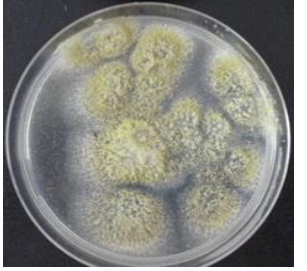
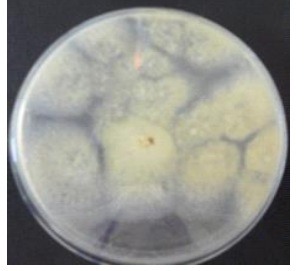




L'identification des isolats obtenus étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (Botton *et al*, 1990 ; Guiraud, 1998), en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc.).

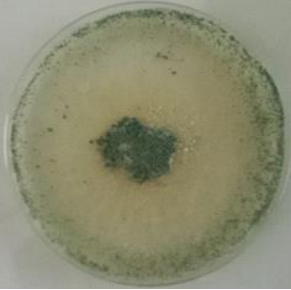

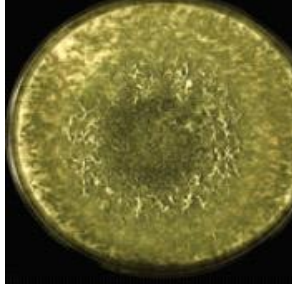






### **2.1- Etude macroscopique**



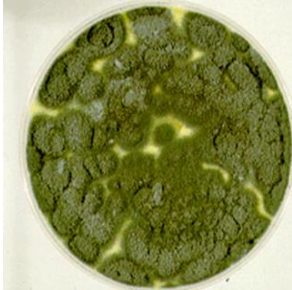


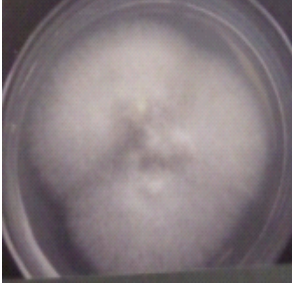


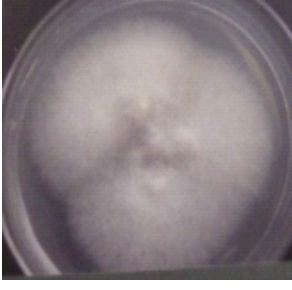
Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés sur le milieu de culture PDA (Botton, 1990). Le Tableau 2 résume l'aspect macroscopique des colonies, leur consistance, la couleur du revers ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques.


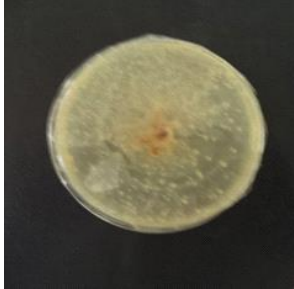

Tableau 2 : Etude macroscopique des souches fongiques isolées à partir du sol

Souches obtenus	Description	Aspect macroscopique		Photos référenciées
		Surface	Revers	
A1	<p>Couleur : blanc</p> <p>Aspect : cotonneuse</p> <p>Revers : pas de pigment</p>			 Chabasse <i>et al.</i> , 2002
A2	<p>Couleur : blanc au départ puis devenant rose à pourpres</p> <p>Aspect : duveteuse à floconneuse</p> <p>Revers : beige et au centre rose à pourpre</p>			 Chabasse <i>et al.</i> , 2002

<p><b>A 3</b></p>	<p>Couleur : blanc</p> <p>Aspect : cotonneuse</p> <p>Revers : pas de pigment</p>			 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2002</p>
<p><b>A 4</b></p>	<p>Couleur : verte</p> <p>Aspect : poudreuse</p> <p>Revers : pas de pigment</p>			 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2008</p>
<p><b>A 5</b></p>	<p>Couleur : vert foncé</p> <p>Aspect : laineuse à poudreuse</p> <p>Revers : orange</p>			 <p><a href="http://www.fungi.myspecies.com">http://www.fungi.myspecies.com</a></p>

<p><b>A 6</b></p>	<p>Couleur : verte</p> <p>Aspect : poudreuse</p> <p>Revers : pas de pigment</p>			 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2002</p>
<p><b>A 7</b></p>	<p>Couleur : blanc et marron</p> <p>Aspect : Dure</p> <p>Revers : marron foncé</p>			 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2002</p>
<p><b>A 8</b></p>	<p>Couleur : blanc et marron</p> <p>Aspect : Dure</p> <p>Revers : marron foncé</p>			 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2002</p>

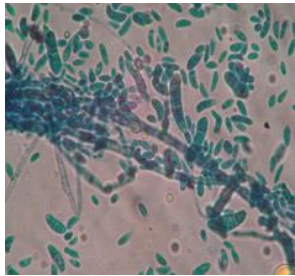
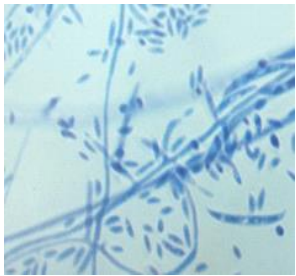
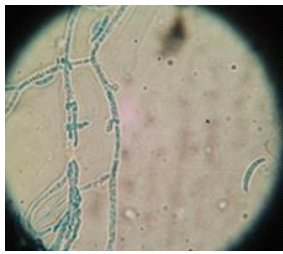

<p><b>A 9</b></p>	<p>Couleur : verte</p> <p>Aspect : laineuse à poudreuse</p> <p>Revers : Orange</p>			 <p><a href="http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Penicillium.com">http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Penicillium.com</a></p>
<p><b>A 10</b></p>	<p>Couleur : blanc</p> <p>Aspect : duveteuse floconneuse</p> <p>Revers : pas de pigment</p>			 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2008</p>
<p><b>A 11</b></p>	<p>Couleur : blanc</p> <p>Aspect : cotonneuse</p> <p>Revers : pas de pigment</p>			 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2008</p>

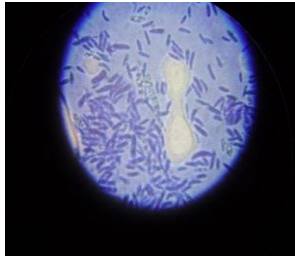

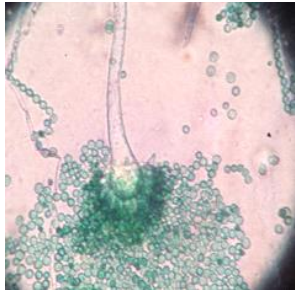

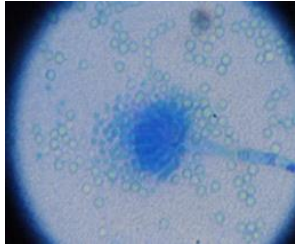

<b>A 12</b>	Couleur : verte Aspect : poudreuse Revers : orange			 Chabasse <i>et al.</i> , 2008
-------------	--	---	--	--

## 2.2- Etude microscopique

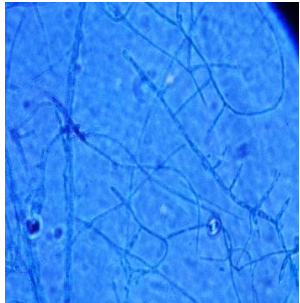
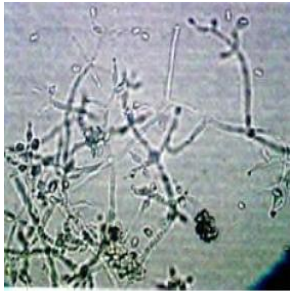

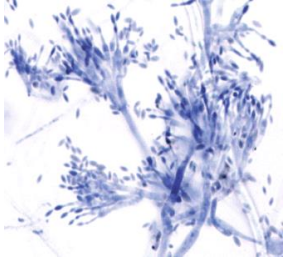
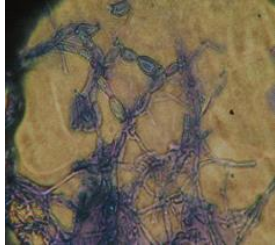
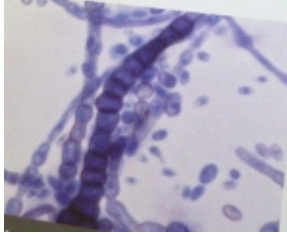
Les caractères microscopiques des isolats obtenus ont été résumés dans le tableau 3.

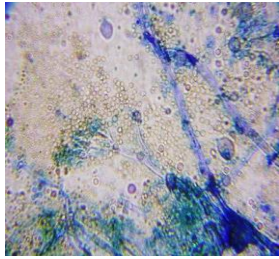
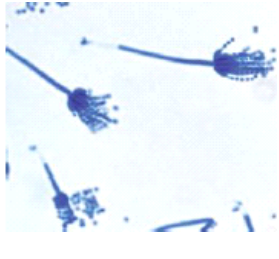
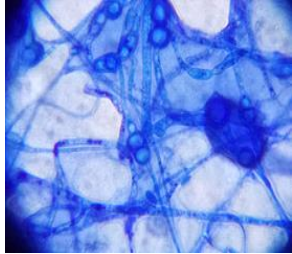

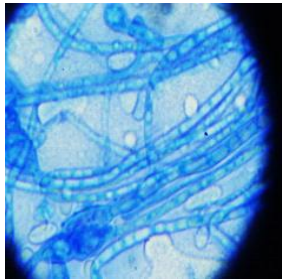
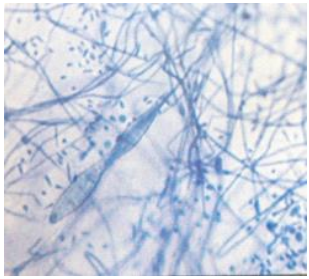
**Tableau 3 :** Etude microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol

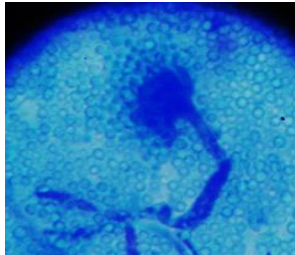
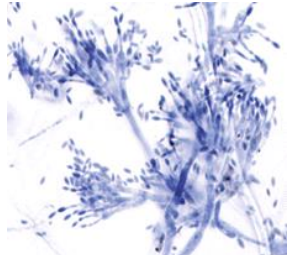
Souches identifiées	Description	Aspect microscopique	Photos référencées
<p><b>A 1</b></p> <p><i>Fusarium sp1</i></p>	<p>-Les microphialides, subulées, sont formées sur le mycélium</p> <p>Aérien.</p> <p>-Les microconidies ellipsoïdales sont disposées en chaînes.</p> <p>-Elles ont un aspect fusiformes, unicellulaires ou parfois uniseptées.</p> <p>-Les macrophialides sont groupées par 2 ou 3 sur une ramification courte.</p> <p>-Les macroconidies sont rares, en fuseau allongé, avec 3 à 7 cloisons.</p> <p>-Les chlamydozoospores sont absents.</p>		 <p>Chabasse <i>et al.</i>,2008</p>
<p><b>A 2</b></p> <p><i>Fusarium sp2</i></p>	<p>-Les microphialides, subulées, sont formées sur le mycélium</p> <p>Aérien.</p> <p>-Les microconidies ellipsoïdales sont disposées en chaînes.</p> <p>-Elles ont un aspect fusiformes, unicellulaires ou parfois uniseptées.</p> <p>-Les macrophialides sont groupées par 2 ou 3 sur une ramification courte. -Les macroconidies sont rares, en fuseau allongé, avec 3 à 7 cloisons.</p> <p>-Les chlamydozoospores sont absents.</p>		 <p>Tabuc ,2007</p>

<p><b>A 3</b></p> <p><i>Fusarium sp3</i></p>	<p>-Les microconidies ellipsoïdales sont disposées en chaînes.</p> <p>-Elles ont un aspect fusiformes, unicellulaires ou parfois uniseptées.</p> <p>-Les macrophialides sont groupées par 2 ou 3 sur une ramification courte.</p> <p>-Les macroconidies sont rares, en fuseau allongé, avec 3 à 7 cloisons.</p> <p>-Les chlamydozoospores sont absents</p>		 <p><a href="http://www.moldtestingma.com">http://www.moldtestingma.com</a></p>
<p><b>A 4</b></p> <p><i>Aspergillus sp1</i></p>	<p>-Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores non ramifiés, terminés en vésicules;</p> <p>-Phialides formées directement sur la vésicule</p> <p>-Têtes conidiennes unisériées</p> <p>-Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires</p>		 <p>Tabuc ,2007</p>
<p><b>A 5</b></p> <p><i>Aspergillus sp2</i></p>	<p>-Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux</p> <p>-conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicules;</p> <p>-Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules;</p> <p>-Têtes conidiennes unisériées ou bisériées;</p> <p>-Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires</p>		 <p>Chabasse <i>et al.</i> , 2002</p>



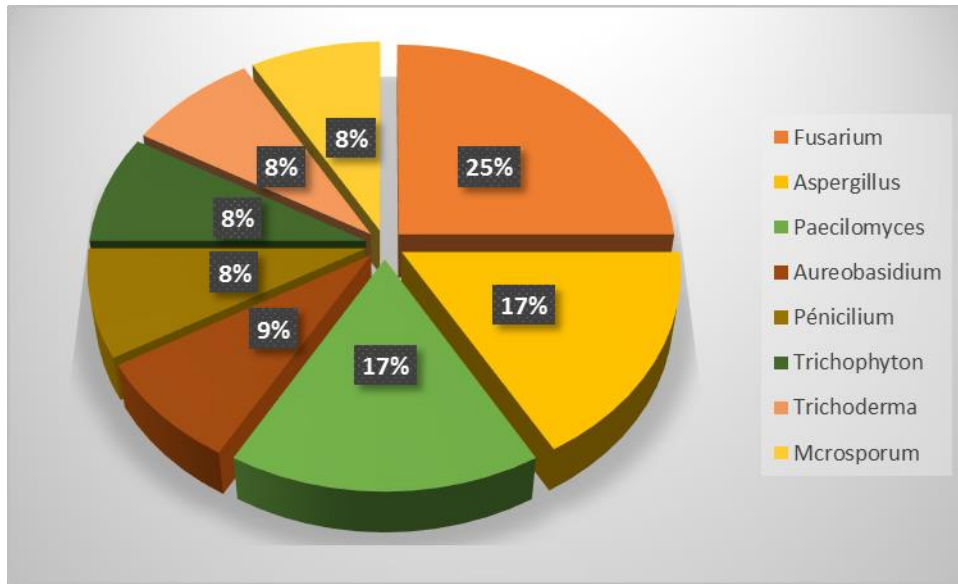
<p><b>A 6</b> <i>Trichoderma sp</i></p>	<p>-le mycélium est composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique ou pyramidale. Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de flasques ou de quilles. A leur tour, les phialides portent les spores (phialospores ou bien conidies)</p>		 <p><a href="http://www.imep-cnrs.com/licence/planches%20tp%20myco%202.pdf">http://www.imep-cnrs.com/licence/planches%20tp%20myco%202.pdf</a></p>
<p><b>A 7</b> <i>Paecilomyces sp 1</i></p>	<p>-Les conidiophores ramifiés en verticilles portent des phialides cylindriques ou renflées dans la partie inférieure et terminées par un long col effilé et étroit. Les conidies unicellulaires, lisses ou échinulées, ovoïdes, sont disposées en très longues chaînes basipétales, divergentes ou enchevêtrées.</p>		 <p>Tabuc ,2007</p>
<p><b>A 8</b> <i>Aureobasidium sp</i></p>	<p>-Des spores unies ou bicellulaire disposées en chaines. -Des arthrospores brunes, des blastospores hyalines en grappes le long d'hyphes épais.</p>		 <p>Chabasse <i>et al.</i>,2008</p>

<p><b>A 9</b> <i>Penicillium sp</i></p>	<p>-Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).</p>		 <p>Link, 1909</p>
<p><b>A 10</b> <i>Trichophyton sp</i></p>	<p>-De nombreuses microconidies piriformes sont présentes sur des filaments articulés à angle droits.  Des macroconidies en masses peuvent se voir, des éléments irréguliers de grande taille.</p>		 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2008</p>
<p><b>A 11</b> <i>Microsporium sp</i></p>	<p>-Le mycélium est épais, les chlamydospores intercalaires ou terminales qui présentent une sorte de pointe à leur sommet.  -Des microconidies piriformes et de rares macroconidies à paroi rugueuse et épaisse.  Des organes pectinés et des filaments filamenteux en &lt;raquettes&gt; peuvent se voir.</p>		 <p>Chabasse <i>et al.</i>, 2008</p>

<p><b>A 12</b> <i>Paecilomyces sp2</i></p>	<p>-Les conidiophores ramifiés en verticilles portent des phialides cylindriques ou renflées dans la partie inférieure et terminées par un long col effilé et étroit. Les conidies unicellulaires, lisses ou échinulées, ovoïdes, sont disposées en très longues chaînes basipétales, divergentes ou enchevêtrées.</p>		 <p>Tabuc.,2007</p>
--	--	--	--

La technique d'isolement employée dans ce travail, à savoir l'isolement à partir du sol forestier, a permis d'isoler 12 souches fongiques.

L'étude macroscopique et microscopique effectuée sur les 12 souches isolées, a abouti à la répartition de ces dernières en 7 genres, classés par ordre de prédominance comme suit : *Fusarium* (3 souches : A1 ; A2 et A3), *Aspergillus* (2 souches : A4 et A5), *Paecilomyces* (2 souches : A7 et A12), *Tichoderma*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Trichophyton* et *Microsporium* (1 souches par ordre : A6 ; A8 ; A9 ; A10 et A11). Les pourcentages des genres obtenus ont été calculés et présentés dans la figure 23.



**Figure 23 :** Genres fongiques isolés du sol de Chaabet-Ersas

Ces genres fongiques sont présents dans la majorité des sols de toutes natures, Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2003 et Boiron en 1996 ont déclaré qu' *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, sont des souches autochtones, habituellement isolées à partir de la plupart des terrains.

Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, il peut être influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark and Zarnoch, 1992 ; Madigan *et al.*, 1997 ; Subler and Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith *et al.*, 2000 ).

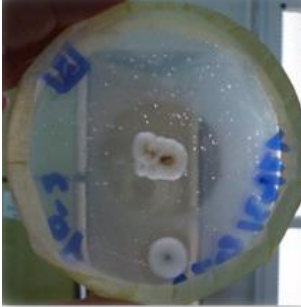
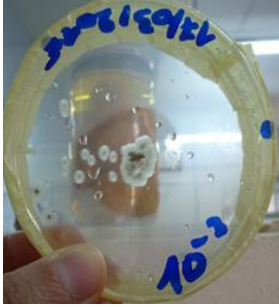

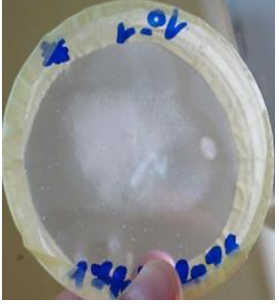



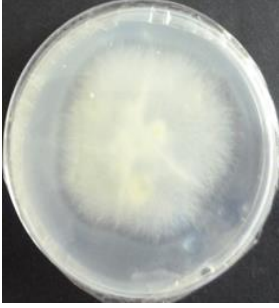
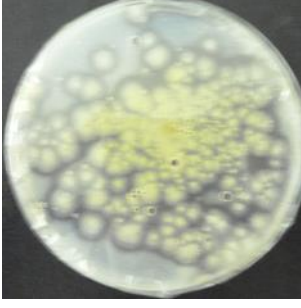
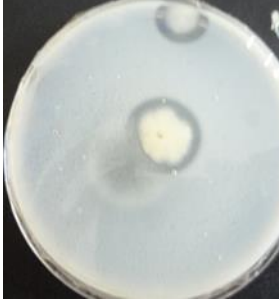
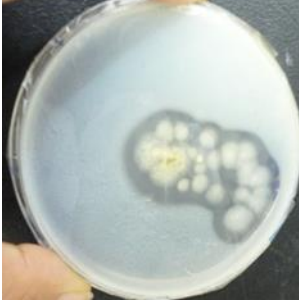
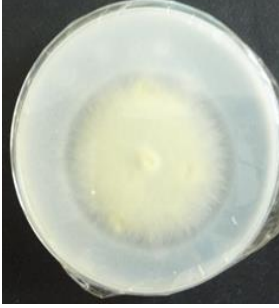
### 3- Mise en évidence de l'activité protéolytique

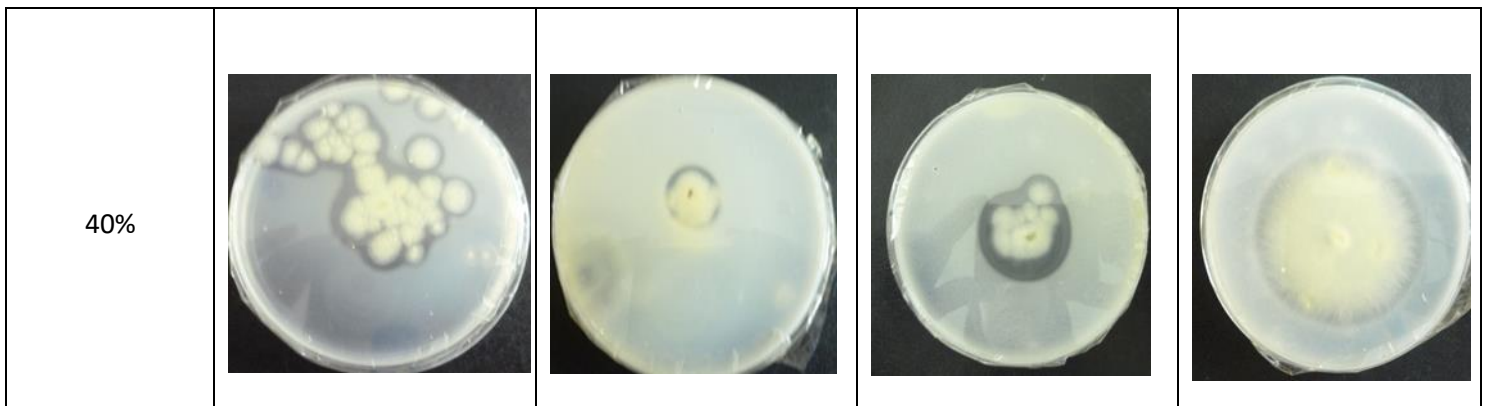
Les protéases sont des enzymes essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicinale et dans les domaines de recherche (Coral *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005). Elles sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (Gupta *et al.*, 2002; Sandhya *et al.*, 2005).

Cependant, les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques.

Pour cet objectif les 12 souches isolées ont subi un test de l'activité protéolytique sur un milieu gélosé à base de lait écrémé à différentes concentrations 10%; 20%; 30% et 40%. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.

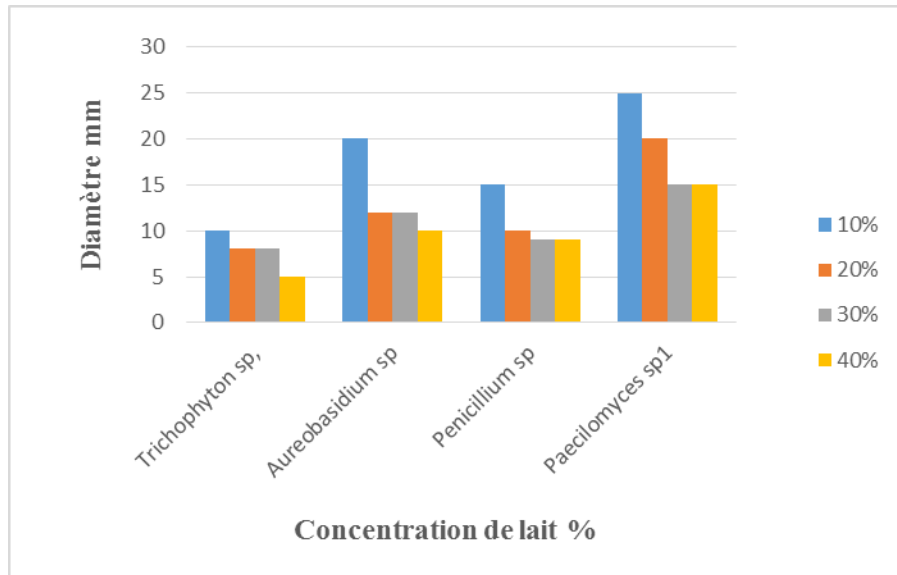
**Tableau 4 :** Mise en évidence de l'activité protéolytique sur le lait gélosé à des différentes concentrations

Souche Concentration	<i>Paecilomyces sp 1</i>	<i>Aureobasidium sp</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Trichophyton sp</i>
10%				
20%				
30%				



Les tests de protéolyse réalisés sur le lait gélosé à différents concentration ; ont permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez quatre moisissures parmi les douze souches testées. Une souche est caractérisée par des zones d'hydrolyse très faibles; juste autour du leurs mycélium : c'est celle du genre *Trichophyton*. Alors que les autres souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse dont le diamètre varie de 9 à 25 mm. Ces résultats permettent de considérer ces souches comme des moisissures productrices de protéases exocellulaires (Smith *et al.*, 1952 ; Duce et Thomas, 1959). Parmi ces souches, une a un diamètre de 25 mm, c'est la souche du genre *Paecilomyces sp.* Cette dernière a été sélectionnée pour les prochaines étapes de production de protéase.

L'histogramme ci-dessus résume les résultats des diamètres obtenus chez les souches protéolytiques avec les différentes concentrations.



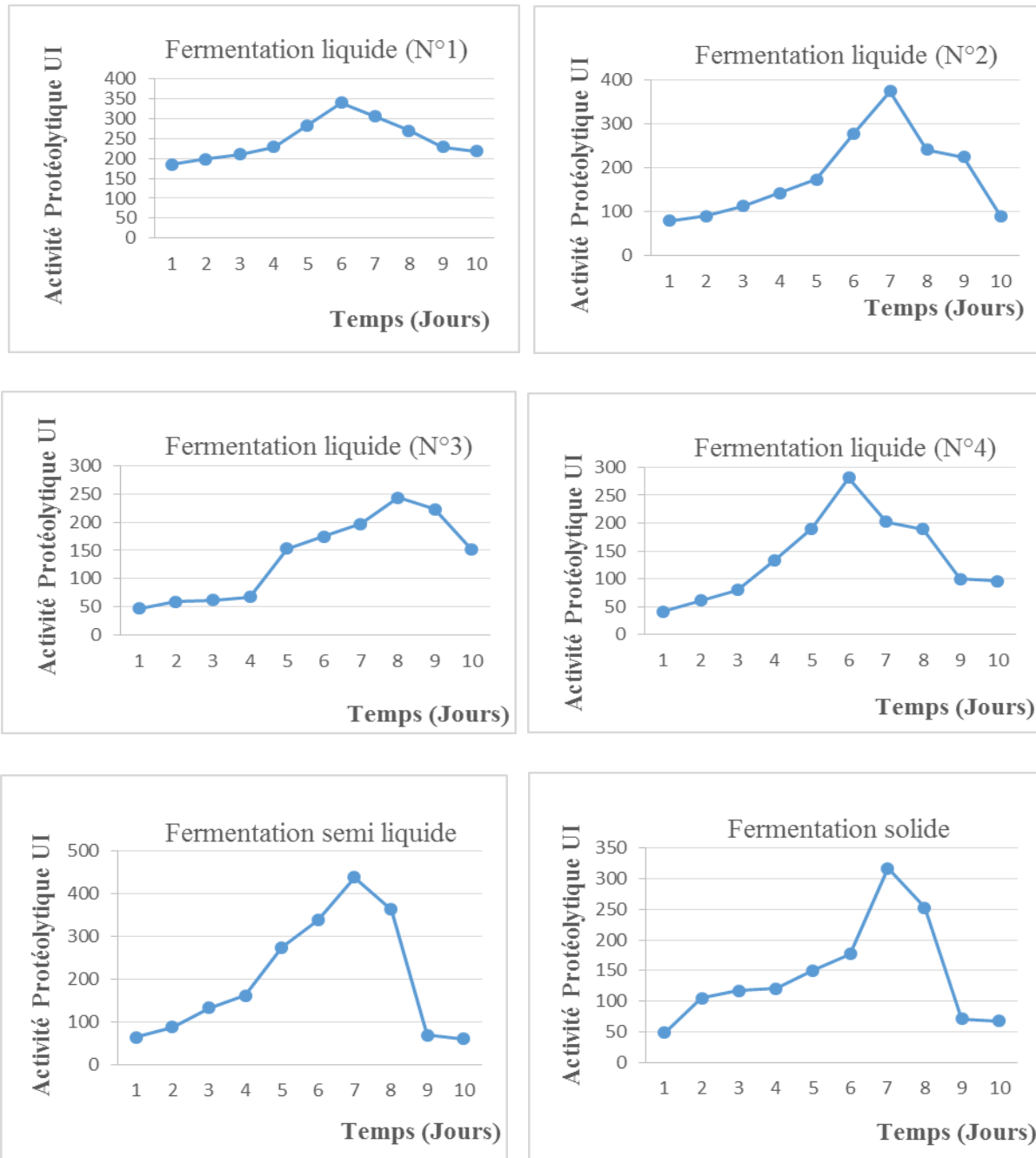
**Figure 24 :** Histogramme des diamètres des souches protéolytiques observés précédemment par ces différentes concentrations

#### 4- Cinétique de la production de protéase

L'analyse des résultats et la comparaison des activités protéolytiques sur les différents milieux de fermentation testés indiquent que la production de protéase exocellulaires par la souche *Paecilomyces sp1*. obtenue sur les différents milieux de fermentation sont très proches. L'activité protéolytique a été détectée dans le filtrat de la culture dès les premiers jours, durant cette période l'activité est très faible. La production maximale de l'enzyme est obtenue après sixième et septième jour de fermentation, au-delà de 9<sup>ème</sup> jours, la production montre un déclin du rendement en enzyme dans les milieux de culture (figure 25).

La meilleure production a été remarquée dans le milieu de fermentation semi liquide à base de son de blé avec un taux de 437.93 UI au septième jour. Ces résultats sont très proches de ceux obtenus par Vishwanatha *et al.* (2010) et Freitas Soares *et al.* (2010), qui ont prouvés dans leurs travaux que le son de blé est le meilleur substrat pour la production des protéases par la souche *Paecilomyces sp.*





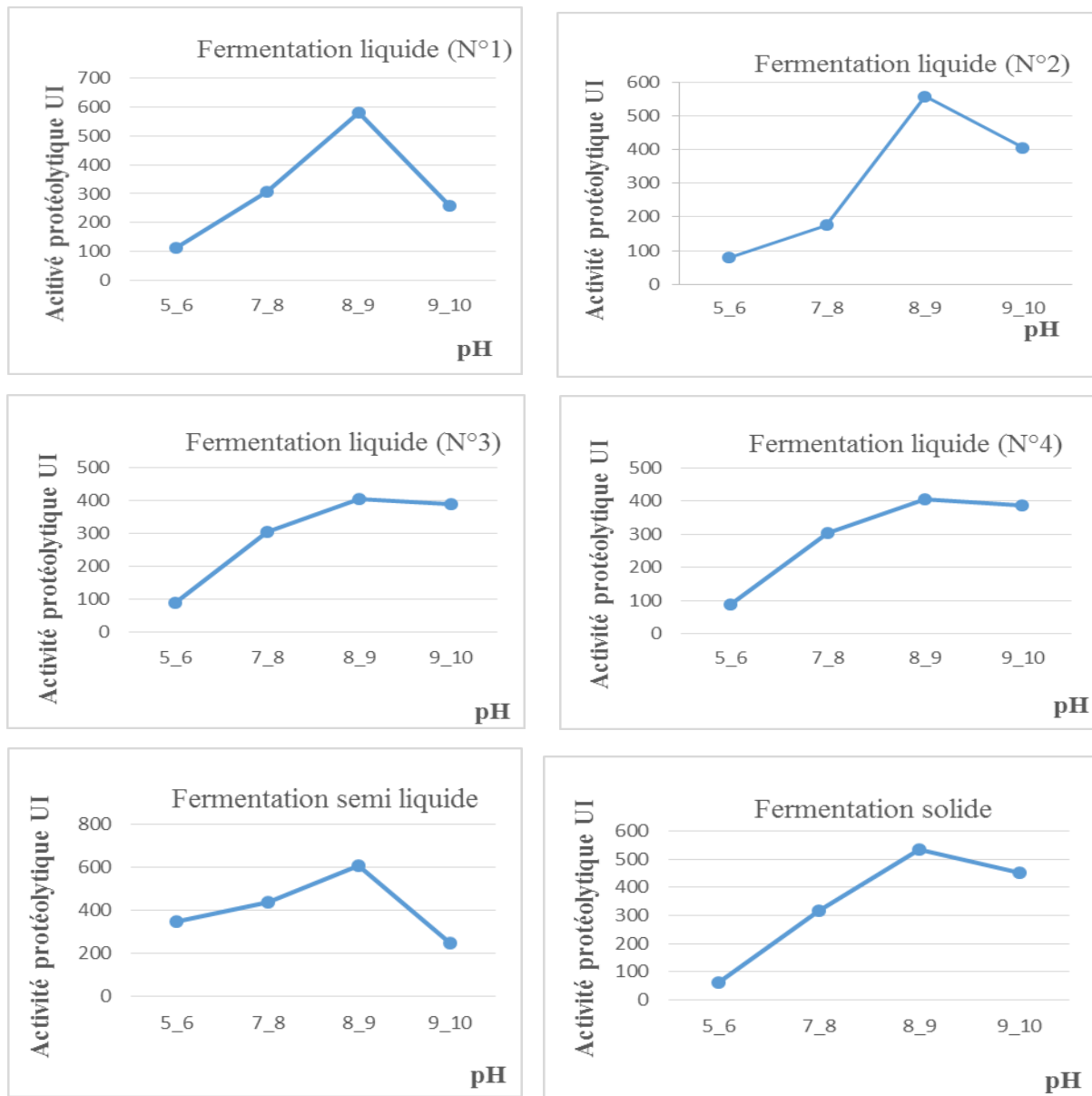
**Figure 25 :** Evaluation de l'activité protéolytique développée par la souche *Paecilomyces sp 1*. dans les milieux de fermentations testées

#### **4.1- Influence du pH**

Chaque enzyme possède un pH optimal auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (Hames *et al.*,2006).L'effet du pH sur l'AP par la souche *Paecilomyces sp1*.dans les différentes fermentations testées (Figure 26) a montré qu'il y a une augmentation de l'AP jusqu'au l'atteint du pH maximale dans l'intervalle 8-9 avec une concentration de l'AP entre 405,7 et 704 UI ; Puis il y'a une diminution de cette dernière.

Cette diminution était probablement due à l'épuisement des éléments nutritifs, l'inactivation d'enzyme par d'autres métabolites toxiques libérés dans le milieu et les variations du pH de milieu (Sumantha *et al.*,2006 ; Paranthman *et al.*, 2009).

La figure ci-dessous, montre l'effet du pH sur l'activité protéolytique de la souche sélectionnée dans une gamme de pH allant de 5 à 10. D'après cette figure on remarque dans l'intervalle allant de 5 jusqu'à 9, une augmentation progressive de l'activité protéolytique avec l'augmentation du pH réactionnel ; une meilleure activité est observée à pH 9, Au-delà de cet pH, on observe une diminution graduelle de l'activité protéolytique.

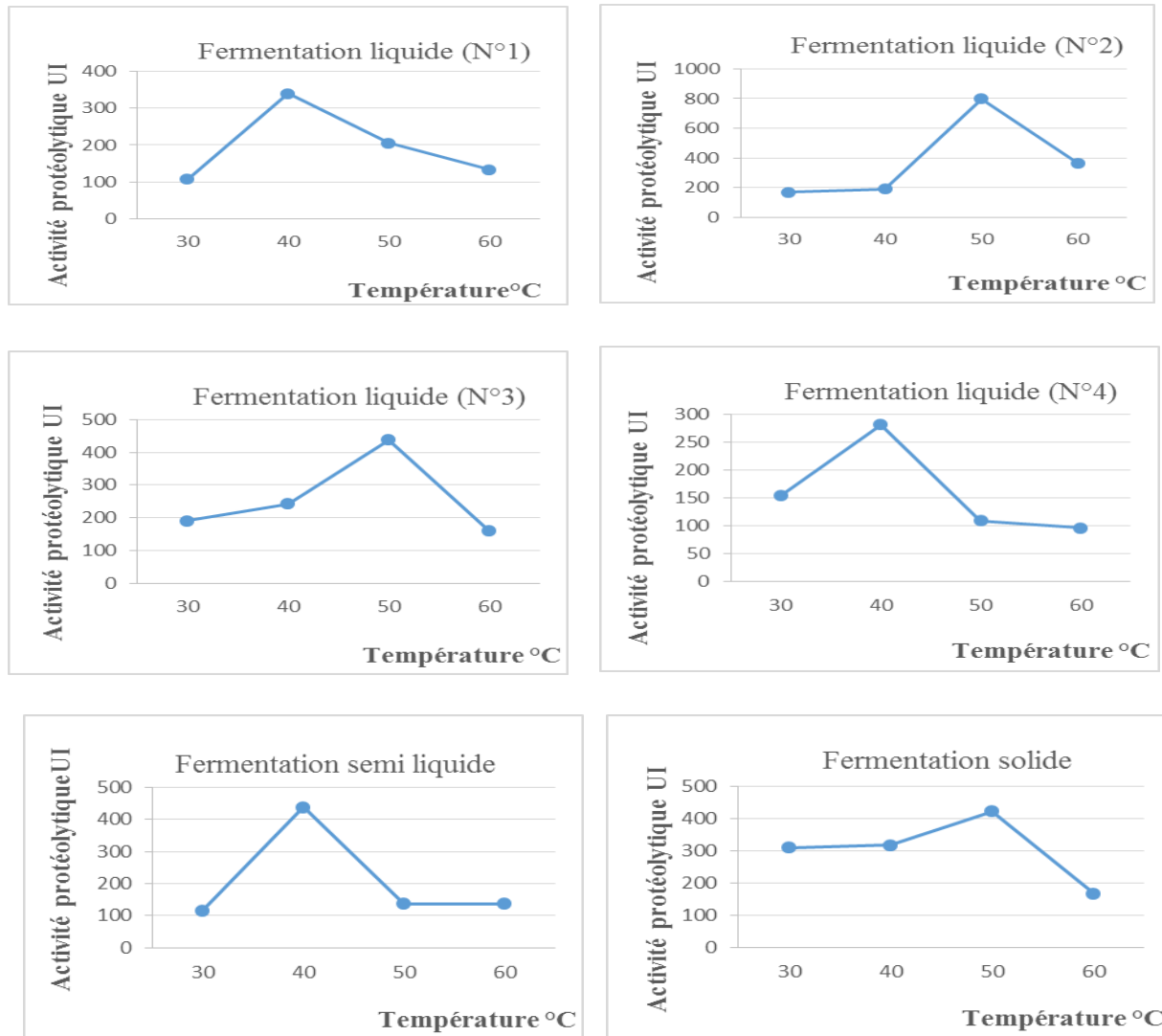


**Figure 26 :** Effet du pH sur l'activité protéolytique de la souche *Paecilomyces sp. 1* dans les différentes fermentations testées

Ces résultats sont proches à ceux de Wang *et al.* 2005, qui ont produit une protéase alcaline à partir d'une souche de *Paecilomyces sp.* Ils ont prouvé que 73% de l'activité protéolytique est retenue après 2h d'exposition à un pH de 8 à 12, par contre juste 5% à 35% est retenue dans les milieux à pH acide et neutre.

## 4.2-Influence de la température

La figure 27 représente l'effet de la température sur l'activité protéolytique ; on observe une augmentation de l'activité protéolytique jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur maximale de 799.1 UI dans un intervalle de température entre 40°C et 50°C. Après cette température, une diminution réactionnelle de l'activité protéolytique est observée.



**Figure 27 :** Effet de la température sur l'activité protéolytique de la souche *Paecilomyces sp 1*. dans les différentes fermentations testées

Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par plusieurs chercheurs Singh *et al.*(1994) ; Moreira *et al.* (2001) ; Boukhalfa, (2003) ; Sumantha *et al.* (2005). Par ailleurs, quelques protéases fongiques présentent des optima de température de 60°C (Singh *et al.*,1994; Chellappan *et al.*, 2006) avec une concentration de l'activité protéolytique entre 0,369 et 0,997. Ce résultat est proche de celui rapporté par plusieurs références bibliographiques (Singh *et al.*,1994 ; Moreira *et al.*, 2001).

*Conclusion*  
*ET*  
*PERSPECTIVES*

Le présent travail a concerné la production des protéases fongique mettant en évidence l'effet de la température et du pH. En effet, 12 souches fongiques ont été isolées à partir du sol forestier de Chaabet-Erssas.

L'identification du genre a été effectuée selon les caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques au sein du laboratoire du LaMyBAM (Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne).

L'étude morphologique a abouti à la répartition de ces souches en 7 genres, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Trichophyton* et *Microsporium*. Parmi ces dernières, une moisissure *Paecilomyces sp 1*. a été sélectionnée en raison de son activité protéolytique relativement importante.

Cette dernière a été cultivée dans différents milieux de fermentation pour la production et l'extraction des protéases extracellulaires. L'effet de la température et du pH sur cette activité protéolytique a été étudié.

Les résultats de cette modeste recherche nous ont permis de déduire que la souche *Paecilomyces sp1* est une souche qui se développe dans un milieu basique pH entre 8 et 9 et à une température comprise entre 40 et 50 °C.

Afin de poursuivre ce travail et en se basant sur les résultats obtenus, il serait intéressant de fixer les points suivants comme perspectives :

- Identification moléculaire de l'espèce *Paecilomyces* productrice de protéase.
- Reprendre la même étude, mais sur des sols différents (fruitier, céréalier, etc...) afin de voir si la qualité de ces derniers a un impact ou non sur la production des protéases par la même souche.
- Vérifier si d'autres souches fongiques seraient meilleures, en termes de production de protéases, en jouant sur la nature du sol.

*Références  
Bibliographiques*



- **Aguilar C. N., Gerardo G.-S., PLilia A., Raul R.-H., José M.-H. and Juan C.-E. (2008).** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *Am. J. Biochem .Biotechnol.* 4 (4): 354-366.
- **Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996) .** Introductory Mycology (4 th Ed). p:868. New York, USA .aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus L.*). *J. Agr. Resour. Econ.*
- **Baculard A., Tournier G., (1995),** Aspergilloses broncho-pulmonaires et mucoviscidose, *Rev. Pneumol. Clin.* 51, 159-162.
- **Badillet G., de Briève C., Guého E., (1987),** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris.
- **Belitz H. D., Grosch W. and Schieberle P. (2009).** Food chemistry.4ème Ed Springer Verlag Berlin. P.1070.
- **Benchiheb Meriem,(2015).**Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques .Thèse de Doctorat en Biotechnologie, Biologie et Environnement. Université Constantine 1.
- **Benedykt W. and Katarzyana P. (2008).** Regulation of bacterial protease activity. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 13: 212-229.
- **Benkada M.,(2006).** Evaluation du risque fongique en zone conchylicoles, substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma* .Thèse de doctorat, chimie biologique, Université de Nantes: faculté des sciences pharmaceutiques.
- **Bhanu Prakash G-V-S and Padmaja V..(2012).** Substrate effects and abiotic factors influencing protease enzyme production in the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. p : 2.
- **Boiron P., 1996.** Organisation et biologie des champignons. *Edition Nathan.* P :13-80.Bordas. Paris. P. 36-153.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J. P., Reymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris. pp. 16-41. 110-364.

- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., VAYSSIER Y., VEAU P., (1999).** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. *Masson*. Paris. pp. 12-426.
- **Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris. Collect. Biotech. p : 34-428.
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. *Lavoisier*. Paris. P. 216-244.
- **Brutti C B., Marcelo F P., Nestor OC. and Claudia L N. (2012).** *Onopordum acanthium* (*Asteraceae*) flowers coagulating agent for cheese making. *Food Sci. Technol.* 45:172-179.
- **Calk P., Takaç S., Calk G. & Ozdamar T. H. (2000).** Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enz. Microbiol. Technol.* 26(1). 45-60.
- **Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002).** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.
- **Chabasse , D , Bouchra , J-P ; Degentdl , L., Brun ,S ; Cimon B ; Penn P ; (Mars 2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Paris : bioforma Ed. Paris. Cahier de formation N°25 biologie médical.
- **Chabasse D., Contet-Audonneau N., Bouchara J-p., Bassile A-M.(2008).** Moisissures dermatophytes., édition Biomérieux.
- **Chermette R., Bussieras J., (1993).** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- **Colwell R. R. et Grigorova. R. (1989).** Methods in microbiology. (Ed) St E dimundsbert press limited. Great Britain. P: 133-138.
- **Coral G., Arikan B., Ünalı M. N. and Güvenmez H. (2003).** Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Ann. Microbiol.* 53 (4): 491-498.
- **Cousin D., Matagne A., Laemmlı U. K. & Stewart D. J. (1982).** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34. 1157-1166.

- **Dalev P.G., 1994.** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, 48 ; 265–267.
- **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.
- **Delgado-Jarana J., Rincon A. M. et Benitez T. (2002).** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *Cloning and characterization. Microbiology.* 148: 1305-1315.
- **Dendouga W. (2006).** Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite Mémoire de Magistère En Biochimie-Microbiologie appliquées .Université Mentouri. Constantine.
- **Desmazeaud M. et Hermier J. (1978).** Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8(4). 565-577.
- **Devi M-K., Banu A-R., Gnanaprabhal G-R., Pradeep B-V et Planiswamy M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.* 1(7). 1-6.
- **Divies K., Jost R., Mahadevan J. & Monti J. C. (1984).** Utilisation de la méthodologie expérimentale pour la production des acides organiques par les bactéries acétiques. *J. Milk*
- **Duran J.A., Malvar A., Pereiro M., Pereiro Jr. M., (1989).***Fusarium moniliforme* keratitis, *Acta ophthalmol., Scand.* 67, 710-713.
- **Durand G. et Monson P. (1982).** Les enzymes. Production et utilisations industrielles. Bordas. Paris. P. 36-153. *Food Chem.*, 52: 8182–9.
- **Frazier W. C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. P: 3-429.
- **Gari-Toussaint M., Leguay J.M., Zur C., Michiels J.F., Ferraen L., Negre S., Le Fichoux Y., (1997).** Keratite à *Fusarium solani* chez une patiente diabétique, *J. Mycol. Med.*, 7, 227-231.
- **Guiraud J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.
- **Gupta R., Beg Q. K. and Lorenz P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 59: 15-32.
- **Hainque B., Baudin B. et Lefebvre P. (2008).** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Ed Flammarion. Paris. 34- 46.

- **Hajji M., Rebai A., Gharsallah N. and Nasri M. (2008).** Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Appl. Biochem. Biotechnol.*79: 915-923.
- **Harrigan W.F. &McCance M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.
- **Hashim M M., Mingsheng D., Iqbal M F. and Xiaohong C. (2011).** Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*, **72**: 458–464.
- **Hawksworth D. L. (1991).** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Myco. Res.*95 p: 641-655.
- **Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C., & Pegler D. N. (1995).** Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi.CAB International, Wallingford, United Kingdom. 8,p: 616.
- **Hennequin C., Lavarde V., (1998).** Infections à *Penicillium*, *Encycl. Med. Chir.* (Elsevier, Paris), *Maladies Infectieuses*, 850-A-11.
- **Hernández M. S., Marilú R., Nelson P. G. et Renato P. R. (2006).** Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J. Food Eng.*73. 93-100.
- **Issac S., Frankland J.C., Watling R., Whalley A.J.S.(1993).** Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (8 th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. p:616.
- **Judith Castellanos-Moguell , Ramón Cruz-Camarillo, Eduardo Aranda, Teresa Mier, Conchita Toriello,(2008).** Relationship between protease and chitinase activity and the virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* in *Trialeurodes vaporariorum* p : 02.
- **Julien R.( 2002).** Les moisissures parlons-en. Objectif prevention. 25 p : 7-8.
- **Kortt A. A., Burns J. E. Vaughan J.A. et Stewart D. J. (1994).** Purification of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*. *Biochem. Mol. Biology Int.* 34(6). 1157-1166.
- **Kosikowski F. V. (1988).** Dairy foods research papers. Enzyme behavior utilization in dairy technology. *J. Dairy Sci.* 71: 557-573.
- **Kresze G. B. (1991).** Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* 12. 85-120.

- **Kudrya. V. A. Simonnenko. I. A. (1994).** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbial biotechnol.* 41. 505-509.
- **Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R. and Bhalla T.C., (2008).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. of Microbiol.*, 3(12): 661–672.
- **Kumar S., Sharma N.S., Saharan M. R. and Singh R. (2005).** Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*. Purification and characterization. *Process Biochem.* 40. 1701-1705.
- **Lanier L., Joly P., Bondoux P., Bellemere A., (1978).** Mycologie et pathologie forestière, mycologie forestière. Tome 1. *Masson*. Paris : 09-18.
- **Larpent-Gourgand M. & Sanglier J. J. (1992).** Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris. P. 574-587.
- **Leveau S. B. & Bouix M. (1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Paris. P. 110-163.
- **Llorente B., Brutti C., Caffini N.(2004).** Purification and characterization of a milk clotting
- **Madigan M.T., Martinko J.M., (2007).** Biologie des microorganismes. 11<sup>ème</sup> édition. *Pearson Education*. France. pp. 478-479.
- **Miller J. D. (2002).** Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. *J. Ferment. Technol.* 54. 872-884.
- **Moodie P. (2001).** Traditional baking enzymes-proteases. *Enzyme Development Corporation*. 212. 736-1580.
- **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. *Biochem. Eng. J.* 39: 353-361.
- **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R., (2000).** L'essentiel en microbiologie. *Edition Berti*. pp. 210-216.
- **Pelmont J. (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.

- **Perry J.J., Staley J.T., Lory S., (2004).** Microbiologie. *Sinauerassociates*. Paris. pp. 575-576.
- **Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C. (2002).** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20 (5): 200-206.
- **Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. & Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biology Rev.* 62(3). 597-635.
- **Raper K., Fennell D.J., (1965).** The genus *Aspergillus*", Williams and Wilkins editors, Baltimore.
- **Reginald T., Monod M. A., Faith Y. K. et Jatton-Ogay R. (1975).** The secreted protease of *Aspergillus* and their possible role in virulence. *Can. J. botany.* 73 (1). 1081-1086.
- **Richard K. F. (2005).** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université Laval, Québec.
- **Roquebert M.F, (1998),** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés", Ed. Tec & Doc, 39-95.
- **Salvador SM., Novo C., Domingos A. (2006).** Evaluation of the presence of aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* during seed germination. *Enzyme and Microbial Technology*, 38 : 893–898.
- **Sandhya C., Sumantha A., Pandey A. (2004).** Proteases. In: *Enzyme Technology*, A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.), *Asiatech Publishers Inc.*, New Delhi, (India) pp. 312–325.
- **Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. and Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.* 40. 2689-2694.
- **Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.
- **Sumantha A., Deepa1 P., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C. R. and Pandey A. (2006).** Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Archives of Bio.Tech.* 49 (5): 843-851.

- **Sumantha A., Larroche C. and Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. *Food Tech. Biotech*, 44 (2): 211-220.
- **Swann E.C., Frieders E.M., & McLaughlin D.J.( 1999).** Microbotryum, Kriegeria and the changing paradigm in basidiomycete classification. *Mycologia* 91. p:51-66.
- **Tabuc C., (2007).** Incidence of *Fusarium* species and of their toxins in the compound feeds for poultry, International Scientific symposium: Performances and competitiveness in animal production, 26-27 avril 2007, Iasi, Roumanie.
- **Thomas P.A., Geraldine P., (1992).**Fungal keratitis due *Fusarium* and other fungi, *J. Mycol. Med.*, 2, 121-131.
- **Trap C. Boreau P. (2000).** Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.* 31. 461-471.
- **Tsuchida O.Y., Yamagata T., Ishizuka. T., Arai J., Yamada-Takeuchi M., Ichishima E., (1986).** An alkaline protéase of an alkalophilic *Bacillus sp.* *Cur.Microbiol.* 14: 7-12.
- **Tunga R., Shrivastava B., Banerjee R. (2003).** Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Proc. Biochem .* 38. 1553-1558.
- **Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. &Kaneda M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protase from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* 382. 1509-1513.
- **Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. & Quadeer M. A. (2003).** Production of proteases by a lacally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology.* 2(1). 30-36.
- **Urbanek H., Yirdaw G. (1984).** Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* 33 (2): 131.
- **Vairo Cavalli S., Claver S., Priolo N. and Natalucci C L. (2005).** Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *J. Dairy Res*, 72(3): 271-275.
- **Vishwanatha K. S., Appu Rao A. G. and Singh S. A. (2009).** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chem.* 114: 402-407.
- **Walker G.M., White N.A., (2005).** Introduction to Fungal Physiology in Kavanagh K., *Fungi: Biology and applications.* John Wiley & Sons Ltd. England. pp. 2.

- **Wilkesman J. et Kurz L. (2009).** Protease Analysis by Zymography. A review on techniques and patents. *Recent Pat on Biotechnol.* 3. 175-184.

**Sites web :**

- <http://www.Aspergillus.man.ac.uk> (2016)
- <http://www.im-ep-cnrs.com/licence/planches%20tp%20myco%20.pdf> (2014)
- <http://mycotacrcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=32&n=Paecilomyces>(2016)
- <http://www.Futura-sciences.com> (2016)
- [http://mycotacrcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php? num=32&n=Paecilomyces](http://mycotacrcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=32&n=Paecilomyces) (2016)
- [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/  
Penicillium](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Penicillium) (2016)
- <http://www.fungi.myspecies.com> (2016)



# *Annexes*

### **Annexe 01 : Potato Dextrose Agar (PDA)**

Pomme de terre .....200 g

Glucose .....20 g

Agar .....20 g

Eau distillée.....compléter jusqu'à 1000 ml

- Laver la pomme de terre non pelée.
- Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
- Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
- D'autre part faire fondre l'agar dans 500 ml d'eau distillée.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- ajuster le pH= 6,4 ± 0,2 à 25°C
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

### **Annexe 2 : Le milieu Sabouraud liquide**

Composition par un litre

Glucose..... 20g.

Peptone .....10g.

Eau distillée 1000ml

pH 7±0.2 à 25°C.

Stérilisée 20 minutes à 120°C.

---

### Annexe 3 : Milieu au Lait gélosé à différentes concentrations

➤ **10%**

Le lait gélosé est un milieu utilisé pour la mise en évidence de l'activité protéolytique.

Lait.....20 ml

Agar.....4 g

Eau distillée stérile.....180 ml

➤ **20%**

Lait.....20 ml

Agar.....2 g

Eau distillée stérile.....80 ml

➤ **30%**

Lait.....30 ml

Agar.....2 g

Eau distillée stérile.....70 ml

➤ **40%**

Lait.....40 ml

Agar.....2 g

Eau distillée stérile.....60 ml

- Dissoudre l'agar dans les flacons.

- Compléter chaque flacon avec du l'eau distiller par la concentration voulu.

- Met la quantité du lait da chaque concentration dans un nouveau flacon.

- Stériliser 30 minutes à 110°C.

- Après stérilisation ajouter le lait écrémé aux flacons de l'agar.

### Annexe 04 : Préparation de la caséine

2g caséine dans 98 ml du tampon phosphate pH=7

### Annexe 05 : Préparation du courbe étalonnage de tyrosine

La gamme-étalon est à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg/ml, comme l'indique le tableau suivant :

**Tableau** : préparation de la courbe d'étalonnage de tyrosine

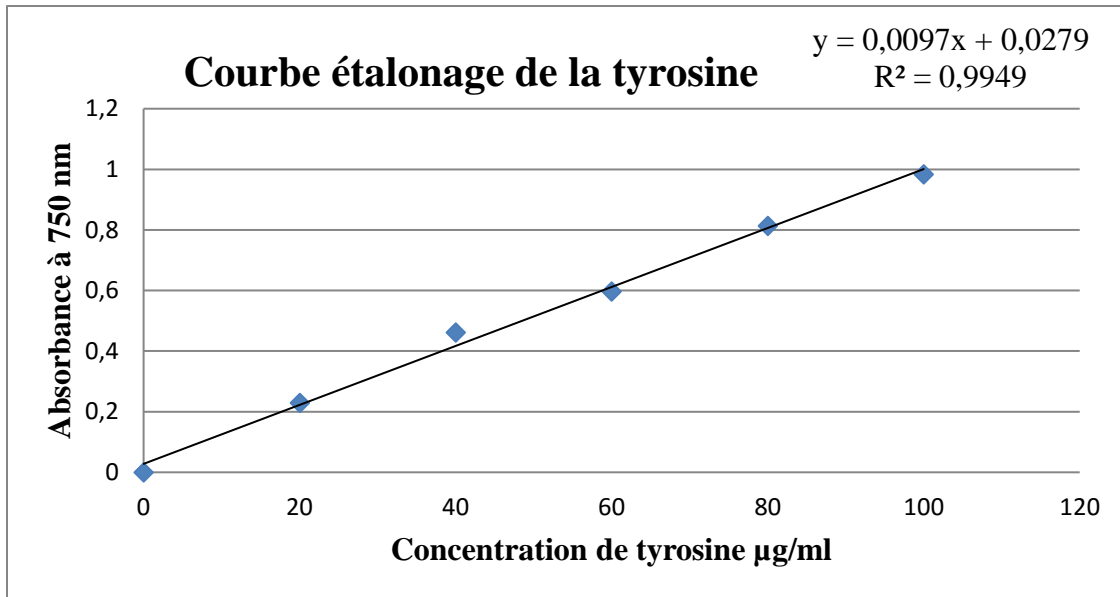
Dilution	0	20	40	60	80	100
Concentration en tyrosine (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (µl)	0	100	200	300	400	500
Eau distillée (µl)	500	400	300	200	100	0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Le mélange est agité et laisser pendant 10 min.

Folin-Ciocalteu dilué à 1/10 <sup>ème</sup> (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----

La solution est mélanger et laisser à l'ombre pendant 30 min.

La lecture de l'absorbance a lieu à 750 nm.



الانزيمات الفطرية لها خصائص وسمات مختلفة ؛ وذات أهمية كبيرة في العديد من المجالات. من تنوع تطبيقاتها ، البروتياز هي واحدة من أكبر مجموعات من الإنزيمات الصناعية. في هذا السياق، تم أخذ عينة من تربة أرضية في غابة بشعبة الرصاص ( جامعة منتوري- قسنطينة) سلالات فطرية تم عزلها، تنقيتها و تحديدها. السلالات التي لها نشاط انزيمي زرعت في وسط الأجار الذي يحتوي على الحليب. من بين هذه الأخيرة، *Paecilomyces sp 1* تم اختيارها للتخمير وفقا لقطر المستعمرة ومجال التحلل المقاسة. ويزرع هذا الأخير في وسائل تخمير مختلفة : السائل . شبه السائلة والصلبة. ويقدر إنتاج إنزيم البروتياز من تقرير النشاط بروتيو ليتيك. وكشفت النتائج أن *Paecilomyces sp 1* أعطى نشاطا ممتازا مقدر ب 437,93 وحدة دولية في اليوم السابع من التخمير. أظهرت دراسة درجة الحموضة المثلى ودرجة الحرارة التي البروتيني التي تنتجه، *Paecilomyces sp 1* . لديه الأمثل درجة الحموضة ما بين 8 و 9 و درجة الحرارة المثلى 40 و 50 درجة مئوية.

**الكلمات المفتاحية :** فطريات *Paecilomyces sp 1* ، بروتياز، النشاط بروتيو ليتيك ، التخمير.

Enzymes of fungal origin have properties and various characteristics; and are of great interest in many fields. By the diversity of their applications, proteases are one of the largest groups of industrial enzymes. In this context, a sample of a forest soil was sampled at Chaabet-Erassas (University of Mentouri Constantine brothers) and fungal isolates were isolated, purified and identified. Strains with proteolytic activity were grown on agar medium containing milk. Of these, only one mold, *Paecilomyces sp 1*, was selected for the fermentation according to the diameter of the colony and lysis zone. The latter is grown in different fermentation media : liquid; semi liquid and solid. The production of the protease was estimated by the determination of proteolytic activity. The results showed that the strain *Paecilomyces sp1.*, Gave an excellent activity reaching 437.93 IU after the seventh day of fermentation. The study of optimum pH and temperature showed that the protease produced by *Paecilomyces sp 1.* with pH optimum between 8 and 9 and optimum temperature 40 to 50 ° C.

**Keywords :** Moisissures- *Paecilomyces sp*- Protéase- Activity proteolytically fermentation.

**Thème** : Production des protéases extracellulaires des moisissures du sol : effet du pH et de la température

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de substances fongiques.

**Résumé :**

Les enzymes d'origine fongique présentent des propriétés et des spécificités diverses ; et sont d'un grand intérêt dans de nombreux domaines. Par la diversité de leurs applications, les protéases représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles. Dans ce contexte, un échantillon d'un sol forestier a été prélevé au niveau de Chaabet-Ersas (Université des frères Mentouri-Constantine) et des isolats fongiques ont été isolés, purifiés et identifiés. Des souches ayant une activité protéolytique ont été cultivées sur milieu gélosé à base de lait. Parmi ces dernières, une seule moisissure, *Paecilomyces sp 1.*, a été sélectionnée pour la fermentation selon le diamètre de la colonie et la zone de lyse. Cette dernière est cultivée dans des différents milieux de fermentation : liquide ; semi liquide et solide. La production de la protéase est estimée par le dosage de l'activité protéolytique. Les résultats obtenus ont révélé que la souche *Paecilomyces sp1.*, a donné une excellente activité atteignant 437,93 UI au bout du septième jour de fermentation. L'étude des optima du pH et de température a montré que la protéase produite par *Paecilomyces sp 1.* a un pH optimum entre 8 et 9 et une température optimale 40 et 50°C.

**Mots clés** : Moisissures- *Paecilomyces sp*- Protéase- Activité protéolytique- Fermentation.

**Laboratoire de recherche** : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).

**Jury d'évaluation** :

<b>Président du jury</b> :	M <sup>me</sup> LEGHLIMI Hind	Maître de conférences - UFM Constantine.
<b>Rapporteur</b> :	M <sup>me</sup> MIHOUBI Ilhem	Professeur - UFM Constantine.
<b>Examineur</b> :	M <sup>me</sup> BENSERRADJ Ouafa	Maître de conférences - CU Mila.
<b>Tutrice</b> :	M <sup>me</sup> GHORRI Sana	Docteur - UFM Constantine.

**Date de soutenance** : 26/06/2016