



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث 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 الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكربولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie fongique

Intitulé :

---

***Production de l'enzyme alpha amylase par des champignons entomopathogènes cultivées sur milieu à base de déchets de bananes***

---

Présenté et soutenu par : MERSAOUI Kaouther  
BOUCHELAGHEM Imane

Le : 27-06-2018

Jury d'évaluation :

Président : Dr.ALMI.H

M.C.B. Université des Frères Mentouri Constantine.

Encadreur : Mme ABDALAZIZ O.

M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine.

Examineur : Mme BENMASIKH A.

M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine.

***Année universitaire  
2017- 2018***

# *Remerciements*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant, qui en son nom et avec  
Sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.*

*Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur  
Melle **ABDELAZIZ OUIDED M .A.A** Université des Frères Mentouri Constantine.  
Constantine pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'elle Nous a  
accordé pour notre encadrement.*

*Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury  
Pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire :  
M<sup>me</sup> **ALMI HIBA M.C.B** Université des Frères Mentouri Constantine.*

*.En tant que présidente du jury Melle **BENMASIKH AICHA M .A.A** Université  
des Frères Mentouri Constantine. en tant qu'examinatrice*

*Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de  
Microbiologie .*

# *Dédicaces*

*Grace à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie A  
celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage pour  
la personne qui attendait ce jour :*

*« ma chère mère **NASSIRA** »*

*Pour Mon père **MOUHAMED**, qui a toujours été un soutien dans ma vie*

*Pour ma sœur et ma princesse : **Wassila***

*Pour mon grand frère qui était un fan et à la place de mon père : **Kheireddine***

*et mes frères **Younes** et **Borhane***

*Ma tante Rbiha et ses filles Fatima zouhra , samer, lina*

*A toute ma famille et toutes mes amies*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes parents :*

*Ma mère, qui a oeuvré 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.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi .*

*J'espère que Dieu prendra soin de vous dans votre vie et vous fournira la santé et le bien-être.*

*Mes frères Islam et Naim Ce sont mes yeux que je vois et qui me soutiennent dans la vie .*

*Mes grands parents et tous la familles .*

*Mes amis qui m'ont donné la motivation d'encouragement et se sont tenus avec moi dans le doux et Mauvais temps et je remercie mon collègue dans le travail Kawthar, qui patientent avec moi pendant le travail dans des moments difficiles sans oublier la foi Imane et Ikram .*

## *Liste des abréviations*

<i>ADN : Acide Désoxyribonucléique</i>
<i>DDT :Dichlorodiphényltrichloroéthane</i>
<i>DNSA: Acide3,5-dinitrosalicylique</i>
<i>E .C: Enzyme Commission numbers</i>
<i>EPF :champignon entomopathogène</i>
<i>PDA: Potato Dextrose Agar</i>
<i>pH: potential Hydrogène</i>
<i>Sp : Specie</i>

## *Liste des figures*

<b>Numéro</b>	<b>Titre</b>	<b>page</b>
<b>Figure 1</b>	<i>Palmiers dattiers en Algérie d'après (Anonyme, 2007)</i>	<b>3</b>
<b>Figure 2</b>	<i>Coupe longitudinale d'une datte (Richarde., 1972)</i>	<b>5</b>
<b>Figure 3</b>	<i>Classification de dattes selon leurs consistances (Absi., 2010)</i>	<b>7</b>
<b>Figure 4</b>	<i>les œufs d'Ectomyelois ceratoniae</i>	<b>12</b>
<b>Figure 5</b>	<i>Larve d'Ectomyelois ceratoniae</i>	<b>13</b>
<b>Figure 6</b>	<i>Chrysalide d'E. ceratoniae.</i>	<b>13</b>
<b>Figure 7</b>	<i>Adulte d'E. ceratoniae.</i>	<b>14</b>
<b>Figure 8</b>	<i>Cycle de vie Ectomyelois ceratoniae</i>	<b>14</b>
<b>Figure 9</b>	<i>Cycle biologique d'Ectomyelois ceratoniae (Doumandji-Mitiche,1983)</i>	<b>15</b>
<b>Figure 10</b>	<i>Cycle biologique d'Ectomyelois ceratoniae</i>	<b>16</b>
<b>Figure 11</b>	<i>Dégâts d'Ectomyelois ceratoniae sur la datte Deglet Nour</i>	<b>17</b>
<b>Figure 12</b>	<i>Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des Insectes (Clarkson and Charnley,1996)</i>	<b>26</b>
<b>Figure 13</b>	<i>La représentation des domaines et des éléments de la structure secondaire de l'<math>\alpha</math>-amylase (Kadziola et al., 1994)</i>	<b>28</b>
<b>Figure 14</b>	<i>Biosynthèse enzymes végétales de l'<math>\alpha</math>-amylase (Brawn et al., 1993).</i>	<b>30</b>
<b>Figure 15</b>	<i>Mécanisme catalytique (Merabti., 2006).</i>	<b>31</b>
<b>Figure 16</b>	<i>Observation directe des dattes</i>	<b>34</b>
<b>Figure 17</b>	<i>Observation directe des larves et de nymphes</i>	<b>35</b>
<b>Figure 18</b>	<i>Désinfection et séchages des larves E. ceratoniae (zeller)</i>	<b>36</b>
<b>Figure 19</b>	<i>Technique d'isolement</i>	<b>36</b>
<b>Figure 20</b>	<i>Technique de purification</i>	<b>37</b>
<b>Figure 21</b>	<i>Technique de préparation des lames par solution du lactophénol-bleu de coton</i>	<b>38</b>
<b>Figure 22</b>	<i>Dénombrement par la cellule de Malassez</i>	<b>39</b>
<b>Figure 23</b>	<i>Technique du préparation du milieu de fermentation à base de déchets de bananes</i>	<b>39</b>
<b>Figure 24</b>	<i>Technique du la production de l'<math>\alpha</math>-amylase à base de déchets de bananes</i>	<b>40</b>

<b>Figure 25</b>	<i>Mesure le pH mètre de l'extrait enzymatique de chaque pH (4, 7, 10).</i>	<b>41</b>
<b>Figure 26</b>	<i>Technique dosage de l'activité amylasique</i>	<b>41</b>
<b>Figure 27</b>	<i>Pourcentages (%) des isolats fongiques</i>	<b>42</b>
<b>Figure 28</b>	<i>Activité amylasique selon la variation du pH ; a : Ph4 , b : pH7, c :pH 10</i>	<b>47</b>
<b>Figure 29</b>	<i>Préparation du milieu PDA</i>	<b>57</b>
<b>Figure 30</b>	<i>Préparation de Tampon phosphate</i>	<b>58</b>
<b>Figure 31</b>	<i>Technique de préparation de DNSA</i>	<b>58</b>
<b>Figure 32</b>	<i>Technique de préparation de la suspension sporale des champignons</i>	<b>60</b>
<b>Figure 33</b>	<i>Préparation du milieu de fermentation à base de déchets de bananes</i>	<b>60</b>
<b>Figure 34</b>	<i>Technique du filtration de la biomasse</i>	<b>61</b>
<b>Figure 35</b>	<i>Technique de Préparation la solution mère du glucose</i>	<b>61</b>
<b>Figure 36</b>	<i>La courbe d'étalonnage</i>	<b>62</b>
<b>Figure37</b>	<i>Evolution du pH 4, 7 et 10 des souches: Aspergillus (S1),Fusarium (S4) ,Cladosporium (S17)</i>	<b>63</b>
<b>Schéma1</b>	<i>Cycle biologique des champignons entomopathogènes (Ferron et al., 1993)</i>	<b>24</b>

## *Liste des tableaux*

<i>Numéro</i>	<i>Titre</i>	<i>page</i>
<i>Tableau 1</i>	<i>Nombre de palmiers dattiers en Algérie d'après (Anonyme, 2007)</i>	<b>4</b>
<i>Tableau 2</i>	<i>Les dattes dans les préparations culinaires et la confiserie et pâtisserie (Belguedj et al., 2008) .</i>	<b>7</b>
<i>Tableau 3</i>	<i>Différentes nomenclatures d'<math>\alpha</math>-amylase (Mercier, 1985).</i>	<b>28</b>
<i>Tableau 4</i>	<i>Exemples de production de l'<math>\alpha</math>-amylase par des fongiques et leurs propriétés physico-chimiques</i>	<b>33</b>
<i>Tableau 5</i>	<i>l'observation macro-microscopique des souches fongiques</i>	<b>43</b>
<i>Tableau 6</i>	<i>Résultats du pH pour les souches fermentées à différentes température</i>	<b>45</b>



# *Table des matières*

<i>Titre</i>	<i>page</i>
<i>Abréviation</i>	
<i>Liste des figures</i>	
<i>Liste des tableaux</i>	
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : les dattes</b>	<b>3</b>
<i>1.1 Production de la datte en Algérie</i>	<b>3</b>
<i>1.2 Le palmier dattier</i>	<b>3</b>
<i>1.3 La datte</i>	<b>5</b>
<i>1.3.1 Les compositions des dattes</i>	<b>5</b>
<i>1.3.2 Formation et maturation de la datte</i>	<b>6</b>
<i>1.3.2.1 Stades de maturation des dattes</i>	<b>6</b>
<i>1. 4. Classification des dattes</i>	<b>7</b>
<i>1.5 Importance des dattes en Algérie</i>	<b>7</b>
<i>1.6 Les ravageurs des dattes</i>	<b>8</b>
<i>1.6.1 Bayoud (Fusariose)</i>	<b>8</b>
<i>1.6.2 Khamedj (Pourriture des inflorescences)</i>	<b>8</b>
<i>1.6.3. Déprédateurs</i>	<b>9</b>
<i>1.7.3.1. Insectes</i>	<b>9</b>
<b>CHAPITRE 2 : La Pyrale des dattes <i>Ectomyelois ceratoniae</i> Zeller</b>	<b>11</b>
<i>2-1 Position systématique</i>	<b>11</b>
<i>2-2 Morphologie et description</i>	<b>11</b>
<i>2.2.1 les œufs</i>	<b>12</b>
<i>2.2.2 Les larves</i>	<b>12</b>
<i>2.2.3 La chrysalide</i>	<b>13</b>
<i>2.2.4 Papillon adulte</i>	<b>13</b>
<i>2-3 Plantes hôtes</i>	<b>14</b>
<i>2-4 Cycle biologique</i>	<b>14</b>

2-5 Dégâts	16
2-6 Moyens de luttés	17
2.6.1 Lutte Chimique	17
2.6.2 Lutte Biologique	18
2.6.3 Lutte physique	18
2.6.4 La lutte intégrée	18
2.6.5 Contrôle cultural	19
<b>CHAPITRE 3 : Le champignon entomopathogène</b>	<b>20</b>
3-1 Généralités sur les champignons	20
3.1.2 La Morphologie	20
3-2 Généralités sur les champignons entomopathogènes	21
3-3 Quelques champignons entomopathogènes	21
3-4 Taxonomie	22
3-5 Mode d'action	23
3-6 Cycle de vie des champignons entomopathogènes	23
3-7 Mécanisme de l'attaque	24
3.7.1. Fixation des spores sur l'hôte	25
3.7.2 Germination des spores sur la cuticule de l'hôte	25
3.7.3. Développement du champignon à l'intérieur de l'hôte	25
<b>CHAPITRE 4 : l'<math>\alpha</math>-amylase</b>	<b>27</b>
4-1 Données sur l' $\alpha$ -amylase	27
4-2 la structure de l' $\alpha$ -amylase	27
4-3 Nomenclature	28
4-4 Différentes origines	29
4.4.1 L'origine animale	29
4.4.2 Origine végétale	29
4.4.3 Origine microbienne	30
4.4.3.1 Les $\alpha$ -amylases fongiques	30
4.4.3.2 L' $\alpha$ -amylase bactérienne	31
4-5 Mécanisme d'action	31
4-6 Caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase	32
4.6.1 Spécificité de substrat	32

4.6.2 Poids moléculaire	32
4.6.3 Température optimale	32
4.6.5 Ions métalliques	33
<b>CHAPITRE 5 : Déchets de fruit de banane</b>	<b>34</b>
<b>Matériels et méthodes</b>	<b>36</b>
1-Echantillonnage	36
1 Matériel végétal : Les dattes	36
2 Matériel animal : La pyrale des dattes ( <i>Ectomyelois ceratoniae</i> )	37
3-Partie mycologique	37
3.1. Le milieu de culture	37
3.2. Désinfection et séchages des larves <i>E. ceratoniae</i> (zeller)	37
3.3 Isolement	38
1.3 Purification des moisissures	38
1.4 Identification des moisissures	39
1.4.1. Identification macroscopique	39
1.4.2 Identification microscopique	39
4. Enzyme $\alpha$ -Amylase	40
4.1. Méthode de fermentation	40
5- Dosage des activités enzymatiques	43
<b>Résultats et discussion</b>	<b>45</b>
1-Isolement et purification et identifications macro-microscopique des souches fongiques	45
2. Activité Enzymatique	47
2.1. Le pH	47
2.2. L'activité enzymatique	48
<b>Conclusion générale</b>	<b>51</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>53</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Summary</b>	
<b>ملخص</b>	

## INTRODUCTION

La palmeraie des dattes, constitue la principale ressource et l'activité agricole la plus importante dans les régions sahariennes. Plus de 100 millions de palmiers seraient cultivés dans le monde, dont plus de 80 % dans les pays arabes. Quant à la production mondiale de dattes,

elle est évaluée à 3.7 millions de tonnes, dont environ 70 % en existe près de 3 000 cultivars dans le monde, dont la composition varie d'un pays à l'autre. Le palmier dattier de par ses particularités représente le point central de la structure d'une oasis autour duquel gravitent un ensemble d'autres cultures maraîchères et fourragères, mais aussi le moyen essentiel de fixation et assure le maintien des oasis contre les influences désertiques.

La culture de palmier dattier repose sur la production des dattes, un fruit à valeur nutritive très élevée et une source appréciable de revenu pour les pays producteurs (**Petit, 2010**). Le potentiel palmeraie des dattes, algérien dépasse les dix sept millions de pieds dont plus de dix million sont en production et cultivé sur une superficie de 154 372 hectares, en produisant environ 500 000 tonnes par an (**Anonyme, 2006a**).

La région des Ziban fait partie des régions palmeraie des dattes les plus importantes du pays de point de vue patrimoine et qualité de production (**Benziouche e Chehat, 2010**). Elle fournit plus de 30 % de la production nationale et de 35 % de la datte Deglet Nour (**Messak et al., 2008**).

Malheureusement l'écosystème oasien représente un milieu très fragile et favorable pour la prolifération des bioagresseurs (**Belguedj et al., 2008**). La palmeraie des dattes algérienne souffre de plusieurs contraintes surtout d'ordre phytosanitaire, qui réduisent la quantité de la production, et altèrent la qualité des récoltes par l'attaque de certaines **maladies** (**Fusarium oxysporum**, **Mauginiella scaetiae**, **Phytophthora sp..**) et ravageurs (*Oligonychus afrasiaticus*, *Parlatoria blanchardi*, *Apatte monachus*, etc) dont le plus important est la pyrale des dattes (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller), cette dernière est considérée comme l'ennemi le plus redoutable du palmier dattier en Algérie, elle peut causer des dégâts considérables pouvant atteindre 20 à 30 % de la production dattière dans le bassin méditerranéen (**Abdelmoutaleb, 2008**).

Les champignons entomopathogènes méritent une attention particulière et pourraient être utilisés dans cette lutte biologique (**Lacey et Undeen, 1986**). Ils jouent un rôle considérable dans la régulation des populations d'insectes (**Roberts, 1973; Ferron, 1975**). L'un des plus intéressants appartient à la classe des *Ascomycètes* : il s'agit de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* connu comme agent pathogène sur plus de 8 ordres d'insectes (**Veen, 1968; Samuels et al., 1989**)

## INTRODUCTION

.En effet, lors de l'invasion de l'insecte par les hyphes du champignon, des métabolites toxiques et les enzymes sont émis par le pathogène. Ces métabolites accélèrent la mort de l'hôte (Vey *et al.*, 1986; Ignoffo, 1988; Ravallec *et al.*, 1989).

La production d' $\alpha$ -amylase par des procédés biotechnologiques (fermentations), nécessite non seulement l'identification et la sélection des microorganismes amylolytiques, mais également le choix d'un substrat de fermentation à faible coût d'une part, et convenable en point de vu de son composition en élément nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production d' $\alpha$ -amylase d'autre part.

Dans ce cadre, les objectifs de notre étude sont :

- Isolement , purification et identification des moisissures à partir d'*Ectomyelois certomiae* (Zeller).
- Production de l'enzyme alpha amylase à base de déchets de banane .

## 1-Les Dattes

### 1.1 Production de la datte en Algérie

L'Algérie est l'un des plus importants pays producteurs de dattes. La production est estimée à 492.217 tonnes dont 244.636 tonnes (50 %) de dattes demi molles (Deglet-Nour) est très apprécié par les consommateurs (Ma/Dsae., 2001), 164.453 tonnes (33 %) des dattes sèches (Degla Beida et analogues) et 83.128 tonnes soit 17 % des dattes molles (Ghars et analogues). Actuellement, la palmeraie algérienne est constituée de plus de 11 millions de palmiers répartis à travers 09 wilayas sahariennes : Biskra, El-Oued, Ouargla, Ghardaïa, Adrar, Béchar, Tamanrasset, Illizi et Tindouf (Buelguedj., 2007).

Près de 58.14% de la production nationale de dattes est réalisée par les deux wilayas suivantes : El-Oued (29.54%) et Biskra (28.6%) (Anonyme., 2002). Les cultivars sont le fruit de la sélection paysanne, ils sont qualifiés de "variétés locales". Deglet Nour pour sa haute qualité et son appréciation à travers le monde (Hannachi et al., 1998 ; Ma/Dsae) (Figure 1).

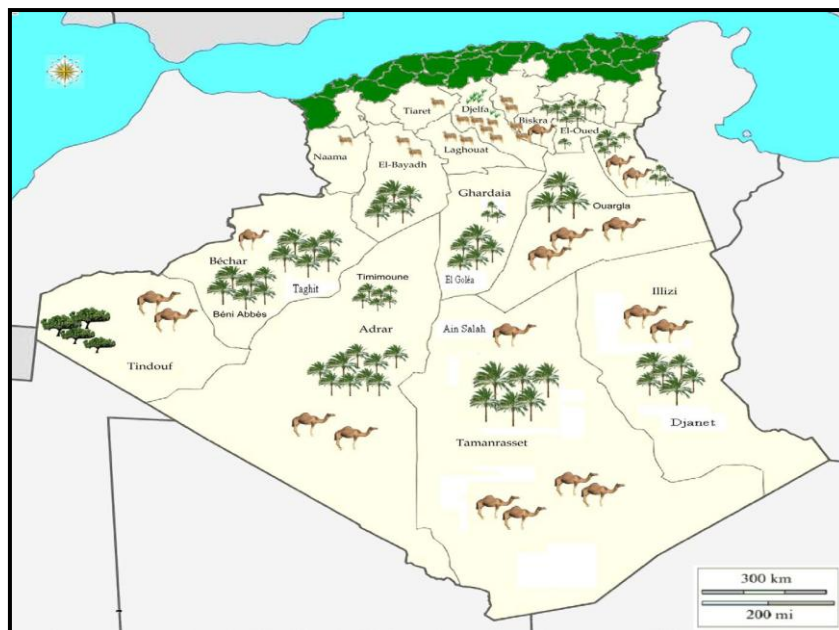


Figure 1 : palmiers dattiers en Algérie d'après (Anonyme, 2007).

### 1.2 Le palmier dattier

a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1753. *Phoenix* dérivé de *Phoinix*, nom du dattier chez les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme arbre des phéniciens *dactylifera* vient du latin *dactylus*, dérivant du grec *dactylos*, signifiant doigt (en raison de la forme du fruit), associé au mot latin *fero* porté, en référence aux fruits est un monocotylédone

## Partie bibliographique

arborescente et diploïde ( $2n=36$ ). Selon **Munier (1973)**, la classification botanique du palmier dattier est comme suit :

- **Embranchement** : Phanérogames.
- **Sous-embranchement** : Angiospermes.
- **Classe** : Monocotylédones.
- **Groupe** : Phoenocoides.
- **Famille** : Arecaceae.
- **Sous-famille** : Coryphoideae.
- **Genre** : *Phoenix*.
- **Espèce** : *Phoenix dactylifera* L.

**Tableau 1 : Nombre de palmiers dattiers en Algérie d'après (Anonyme, 2007).**

<b>Wilaya</b>	<b>Deglet-Nour(datte fine)</b>	<b>Ghars (datte molle)</b>	<b>Degla Beida(datte sèche)</b>	<b>Total palmier dattier</b>
Adrar	0	0	2150904	2904150
Laghouat	8470	7650	11580	27 700
Batna	700	3900	21270	25870
Biskra	1 964 460	436530	748 200	3149190
Bechar	5650	0	0	770 030
Tamanrasset	2970	0	0	167 760
Tébessa	49 550	49 550	10 650	68 970
Djelfa	2610	860	210	3 680
M'sila	18 000	0	0	18 000
Ouargla	1092330	783850	193130	2310069
El-Bayedh	0	45 900	0	193130
Illizi	2250	16340	73030	91620
Tindouf	350	24250	0	24600
El-Oued	1 884030	703330	296300	2660883
Khenchla	21 290	44 800	73 70	73460
Naama	0	19600	2600	22 200

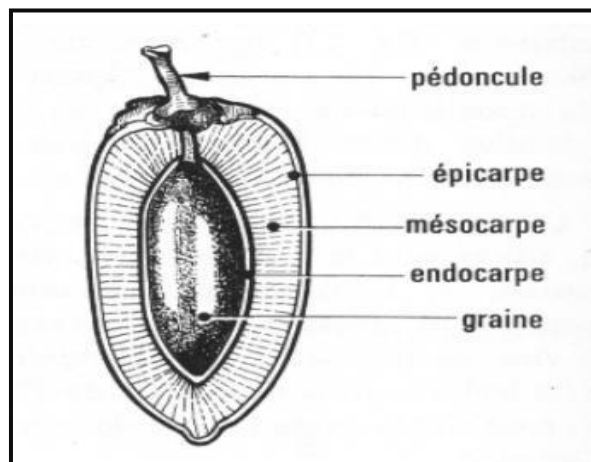
Ghardaïa	377 100	154400	378 900	910 400
total	3559930	1660761	4048710	13505880

### 1.3 La datte

La datte est le fruit du palmier dattier, généralement de forme allongée, ou arrondie. Elle est composée d'un noyau ayant une consistance dure, entouré de chair. La partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée de :

- Un péricarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau .
- Un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et est de couleur soutenue.
- Un endocarpe de teinte plus claire et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau (**Espiard., 2002**).

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouges, brunes plus ou moins foncées (**Djerbi., 1994**)(Figure 2).



**Figure2** : Coupe longitudinale d'une datte (**Richarde., 1972**).

#### 1.3.1 Les compositions des dattes

- Les dattes contiennent une grande quantité de vitamines (B6, C), de minéraux (calcium, phosphore, fer, magnésium, potassium et chrome), de fibres et de cellulose (noyaux).
- Les dattes constituent l'ingrédient de base du diaphoenix, remède contre le mal de mer.
- Riches en graisse et en protéines, elles sont très calorifiques car leur taux de sucres (Glucose, Fructose et Saccharose) avoisine les 70%).



### 1.3.2 Formation et maturation de la datte

Pendant sa formation et sa maturation, le fruit passe par un certain nombre de phases, se résumant en quatre stades appelés par leurs dénominations arabes : Kimri, khalal, Routab et tamar (Booij et al., 1992).

On peut distinguer différents stades d'évolution de la datte (AL-Shahib et al., 2003; Sawaya et al., 1983) ; chaque stade porte une appellation particulière selon les pays. En Algérie se sont : Loulou, Khalal, Bser, Martouba et Tmer ; cependant, la majorité des auteurs ont adopté la terminologie utilisée en Irak et de nombreux pays arabes.

Les cinq stades de maturation phénologiques utilisés ultérieurement sont repris dans toute la bibliographie de (Dawson., 1963 ; Munier., 1973 ; Akidi., 1987 ; Barreveld., 1993 ; Beker., 2002 ; Belguedj., 2002 (b) ; Ipigri., 2005) et ce sont les suivants :

#### 1.3.2.1 Stades de maturation des dattes

Les différents stades de maturation des dattes peuvent être définis comme suit :

##### a) *Bounoune, Loulou*

Ce stade commence juste après la fécondation et dure environ cinq semaines. A ce stade, le fruit est entièrement recouvert par le périgone et se caractérise par une croissance lente (Djerbi., 1994).

##### b) *Blah, Khalal ou Kimri*

Ce stade dure sept semaines environ et se caractérise par une croissance rapide en poids et en volume des dattes. Les fruits ont une couleur verte vive et un goût âpre à cause de la présence des tanins (Djerbi., 1994).

##### c) *Bser ou souffar*

Les sucres totaux atteignant son maximum en fin du stade. La couleur verte vire au jaune, au rouge et au brun, âtre suivant les clones. La datte atteint son poids maximal au début de ce stade. Il dure en moyenne quatre semaines (Djerbi., 1994).

##### d) *Nokar, Routab ou Martouba*

La couleur jaune ou rouge du stade khalal passe au foncé ou au noir. Ce stade se caractérise par la perte de la turgescence du fruit suite à la diminution de la teneur en eau, l'insolubilisation des tanins qui se fixent sur l'épiderme du fruit et l'augmentation de la teneur des

monosaccharides qui donne un goût sucré au fruit. Ce stade dure de deux à quatre semaines (Djerbi., 1994).

e) *Tamr ou Tamar*

C'est le stade final de la maturation de la datté. Le fruit perd beaucoup d'eau, ce qui donne un rapport sucre/eau élevé (Djerbi., 1994).

1. 4. Classification des dattes

La classification des dattes représente dans la (Figure3) (Tableau2).

Tableau 2 : quelques variétés de dattes algériennes (Belguedj., 2002)

Catégories	Variétés
Dattes molles	Ghars
Dattes demi-molles	Deglet-Nour
Dattes sèches	Mech-Degla



Figure 3 : Classification de dattes selon leurs consistances (Absi., 2010)

**1.5 Importance des dattes en Algérie** Sur le plan mondial, l'Algérie occupe le cinquième rang en terme de production. Elle est classée après l'Irak, l'Emirat, l'Egypte et l'Arabie

Saoudite, soit 538000 tonnes, avec un nombre de palmier de 13,3 millions. Sur le plan qualité, l'Algérie occupe le premier rang pour la variété Deglet-Nour, avec une moyenne de production de 250000 tonnes/an (statistique agricoles, 2008).

La phoeniculture offre une large gamme de fruits allant de la dattes mûres ou demi-mûres à la dattes sèches avec aussi un étalage du calendrier de maturation en fonction du cultivar et du terroir. Selon sa consistance, son arôme et son taux de sucre.

La dattes est préférentiellement destinée à tel ou tel usage (comme fruit frais de table, comme fruit sec apte au transport ou encore pour la transformation en produits du terroir/ savoir faire local préservé jalousement par les femmes).

### 1.6 Les ravageurs des dattes

- Dattes palmiers sont infectés par nombreux insectes nuisibles. champignons. nématodes...etc.
- La perte de fruits à la suite d'une infection plus de 35%.
- Plus de 103 lésions ont été enregistrées à ce jour le monde arabe.

#### 1.6.1 Bayoud (Fusariose)

La maladie cryptogamique la plus grave du palmier dattier, le bayoud est causé par un champignon *Fusarium oxysporum* forme spéciale albedinis. En Algérie la maladie est apparue à Boudnib en 1890 et à atteint Figuig et Béni Ounif en 1898 (Djerbi, 1988). De nos jours, elle se retrouve à Ghardaïa (Metehri, 2001). (Idder-ighili h., 2008)- Interactions entre la pyrale des dattes et son hôte à Ouargla 36 premier signe de la maladie s'observe sur la couronne moyenne qui prend un aspect plombé. Elle se dessèche et blanchit progressivement. Une coupe longitudinale d'un arbre, permet d'observer le cheminement du champignon, car son passage dans les tissus vasculaires provoque une coloration brune-rougeâtre, très typique. Quelques variétés seulement de dattiers résistantes à cette maladie, peuvent donner l'espoir de trouver des remèdes. Boudfer (2000), note les variétés Takerboucht, Agaz et Tinasser comme résistantes à la maladie.

#### 1.6.2 Khamedj (Pourriture des inflorescences)

Cette maladie des inflorescences mâles ou femelles est l'une des plus graves (Munier, 1973). Elle est causée par *Mauginiella scaettae* Cavara, *Fusarium moniliforme* Sheld, et plus rarement par *Thielaviopsis paradoxa* De Seynes (Djerbi, 1988). Les premiers symptômes apparaissent sur les tissus jeunes. Destaches de couleur rouille ou brune se développent sur les spathes (Munier, 1973).

Les inflorescences se dessèchent et se recouvrent par un feutrage mycélien (Djerbi, 1994).

### 1.6.3. Déprédateurs

#### 1.6.3.1. Insectes

##### a) Homoptères

La cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* Targioni Tozzetti (**Hemiptera, Diaspididae**) est l'un des ravageurs du palmier dattier les plus redoutables. Elle s'attaque à la fois à la partie verte de l'arbre et aux fruits, entravant les fonctions de photosynthèse et de respiration. De ce fait la production connaît de fortes réductions et devient même parfois totalement impropre à la consommation humaine (Idder et al., 2007). Idder (1992), lors d'une prospection dans presque la totalité des palmeraies algériennes, a constaté qu'aucun palmier dattier n'était indemne de l'attaque de ce ravageur. D'après Boussaid et Maache (2000), cet insecte présente dans la région de Ouargla trois générations ; printanière qui est la plus redoutable, estivale, et automnale.

##### b) Coléoptères

L'*Apate monachus* Fabricius (**Coleoptera, Bostrichidae**) est un coléoptère de grande taille est répandu au Moyen Orient et en Afrique du Nord. C'est une espèce xylophage qui s'attaque en plus des dattiers à d'autres genres végétaux: Casuarina (Magnoliopsida, Casuarinaceae), Acacia (Magnoliopsida, Mimosaceae), etc. (Djerbi, 1994). Selon Lepesme (1947), ses galeries renferment généralement un amas gommeux de couleur rouille provenant de la réaction du sujet. Les palmes desséchées servent souvent de site d'hibernation pour ce coléoptère qui reprend ses activités au printemps (djerbi, 1994). Sakhri (2000) estime le taux d'attaque moyen causé par l'*Apate monachus* dans 10 exploitations de Mekhadma (Ouargla) à 7,80%.

##### c) Lépidoptères

Dans les Oasis algériennes, les dattes sont attaquées par diverses espèces de Lépidoptères, de la famille des Pyralidées et de la sous famille des Phycitinées. Ce sont quelques espèces du genre *Cadra*, *Plodia*, *Ephestia* et essentiellement l'espèce *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Doumandji-Mitiche, 1983).

Les différentes espèces du genre *Cadra*, présentent des caractères (Idder-Ighili H., 2008)- Interactions entre la pyrale des dattes et son hôte à Ouargla 38 morphologiques et de comportement se rapprochant de ceux d'*Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Balachowsky, 1972). D'après Doumandji-Mitiche (1983), les espèces trouvées dans les oasis algériennes sont

## Partie bibliographique

*Cadra cautella* **Walker**, *Cadra calidella* **Guenée** et *Cadra figulilella* **Gregson**. Elles sont rencontrées dans les lieux de stockage et rarement dans les dattes demeurées par terre et dès leur émergence, les imagos s'accouplent dans les lieux où ils sont issus. Ces espèces ont une envergure de 20 à 25 mm, les ailes antérieures sont relativement longues et étroites, grises satinées, les ailes postérieures sont blanchâtres (**Balachowsky, 1972**). *Plodia interpunctella* Hubner est un important déprédateur des produits stockés (**Doumandji-Mitiche, 1977**). L'imago mesure 15 à 16 mm d'envergure, les ailes antérieures sont d'un blanc sale de l'insertion à la moitié, le reste est rougeâtre. Les ailes postérieures sont d'un gris clair sale. L'accouplement a lieu peu après l'émergence et dure 3 à 10 heures (**Lepigre, 1963**). *Ephestia calidella* Guenée infeste les entrepôts de datte. L'imago mesure 10 à 15 mm de longueur. Il présente des ailes supérieures grises plus ou moins foncées, les inférieures d'un gris- clair, blanc sales ou blanc jaunâtre. Plusieurs espèces d'*Ephestia* peuvent coexister; *Ephestia cautella* **Walker**, *Ephestia figulilella* **Gregson**, *Ephestia elutella* **Hübner** (**Idder, 1984**). à partir de ces ravageurs nous choisisons les pyrales des dattes.

## 2- La Pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller

La pyrale des dattes est citée pour la première fois en tant que parasite de datte par Delassus et Pasquier en 1931 au cours de sa présence à Biskra. L'apparition de la pyrale des dattes à Biskra est liée à l'implantation de Deglet Nour et avec l'augmentation de nombre de palmiers de cette variété (Le Berre ,1978).

La pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* est considérée comme étant le déprédateur le plus redoutable de la datte. Elle constitue une contrainte principale à l'exportation (**Doumandji, 1981; Doumandji-Mitiche, 1983; Raache, 1990 ; Benaddoun, 1987**).

Selon (**Doumandji, 1981**), *Ectomyelois ceratoniae* à deux zones de multiplications en Algérie. La première, une bordure littorale de 40 à 80 km de large, s'allongeant sur près de 1000 Km, la seconde constitué par l'ensemble des Oasis (Doumandji, 1981).

### 2-1 Position systématique

D'après **Doumandji (1981)**, l'espèce *ceratoniae* a été décrite à partir d'un spécimen provenant d'Autriche. Le type du genre selon Hubner correspondait à l'espèce *cribrella* Le genre *Ectomyelois* a été créé en 1966 par Heinrich regroupant cinq espèces ***ceratoniae* Zeller 1839, *decolor* Zeller 1881 , *furvidorssela* Raganot 1888, *muriscis* Dyar 1914, et *zetecki* Heinrich 1956.**

La taxonomie de la pyrale des dattes se base essentiellement sur les critères morphologiques des adultes (**Grasse, 1951 et Doumandji, 1981**).

**Embranchement :** Arthropoda

**Sous embranchement :** Mandibulata

**Classe :** Insecta

**Sous classe :** Ptérygota

**Division :** Exopterygota

**Ordre :** Lepidoptera

**Famille :** Pyralidae

**Sous famille :** Phycitinae

**Genre :** *Ectomyelois*

**Espèce :** *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, 1839.

## 2-2 Morphologie et description

*Ectomyelois ceratoniae* est un lépidoptère connu par son extrême polychromie, ainsi les différents stades de développement se présentent comme suit :

### 2.2.1 les œufs

Les œufs sont de forme ovoïde et a surface chagrinée ne dépassant guère 0,56 mm. Blanc au début, La coloration est variable ; elle est parfois rouge orangé avec un réseau interne d'entrelacs foncés visible, le plus souvent grisâtre à incolore (Wertheimer, 1958). Il est entouré par une cuticule translucide. Sa surface présente un aspect réticulé (Doumandji, 1981). LE BERRE (1978) rapporte qu'il y a un léger aplatissement qui peut se manifester au niveau de la zone d'adhérence au substrat.(Figure4).



**Figure 4 :** les œufs d'*Ectomyelois ceratoniae*

### 2.2.2 Les larves

Le Berre (1978), montre que les chenilles de la pyrale des dattes sont éruciformes. leur corps est constitué de 12 segments en sus le segment céphalique. Les segments thoraciques portent les trois paires de pattes locomotrices et les segments abdominaux présentent les quatre paires de fausses pattes ou ventouses (Wertheimer, 1958 et Dhouibi, 1991). La chenille de *E.ceratoniae* est incolore ou grisâtre à sa naissance puis se teinte peu à peu de rose claire (Wertheimer, 1958). Lepigre (1963), mentionne que les larves de *E.ceratoniae* ont une longévité de 1 à 8 mois, cette dernière dépend des conditions climatiques favorables ou défavorables pour leur développement.(Figure 5).



**Figure 5:** Larve d'*Ectomyelois ceratoniae*

### 2.2.3 La chrysalide

Le Berre, (1978) mentionne que la chrysalide d'*Ectomyelois ceratoniae* ne présente pas des caractères particuliers. Elle mesure environ 8 mm de longueur et possède un corps de forme cylindroconique (**Doumandji, 1981**). Son enveloppe chitineuse de couleur brune testacée est entourée par un fourreau de soie lâche tissé par la chenille avant sa mue nymphale, dans la plupart des cas la chrysalide se trouve dans la datte où la chenille a effectué son développement (Figure6) (**Wertheimer, 1958**).



**Figure 6:** Chrysalide d'*E. ceratoniae*.

### 2.2.4 Papillon adulte

l'adulte est de couleur gris clair, la longueur du corps varie de 6 à 12 mm, avec une longueur moyenne 9,32 mm pour les mâles et 10,35 mm pour les femelles, dont l'envergure varierait de 16 à 24 mm. Les ailes antérieures sont grises pales avec deux lignes claires bordées d'écailles noirâtres tandis que les ailes postérieures sont homochromes et plus claires, bordées d'une frange soyeuse (Figure7 et 8) (**Dhouibi et Jarraya, 1988 ; Dhouibi, 1991**).

Le dimorphisme sexuel est peu apparent dans cette espèce, nous noterons que dans l'ensemble des mâles sont plus petits que les femelles (9.32mm contre 10.35mm) et que la forme des derniers segments de l'abdomen est différente dans les deux sexes (**Le Berre, 1978**).





Figure7 : Adulte d'*E. ceratoniae*.

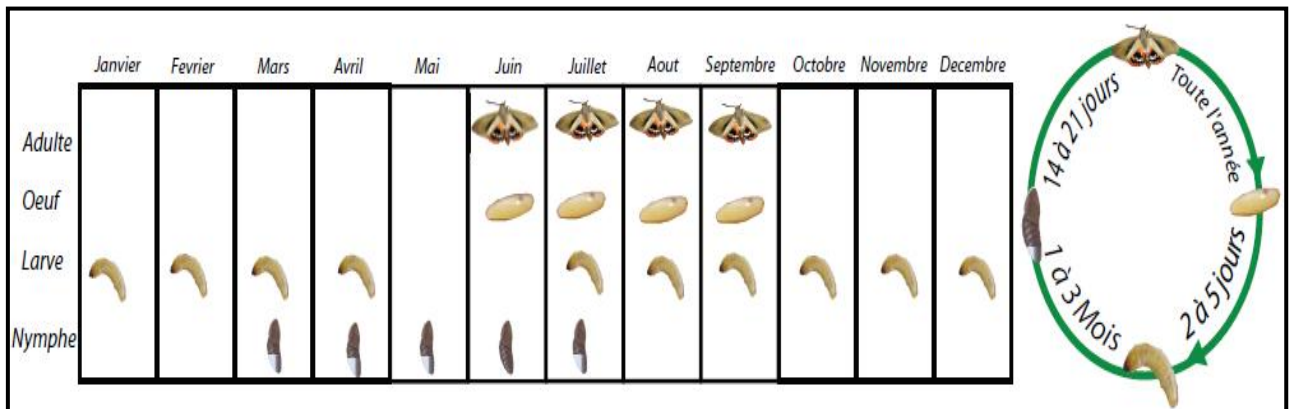


Figure8 : Cycle de vie *Ectomyelois ceratoniae* Wertheimer (1958)

### 2-3 Plantes hôtes

*Ectomyelois ceratoniae* est une espèce cosmopolite et polyphage à vaste répartition géographique (Doumandji, 1981 et Dhouibi, 1991). Recensé en Algérie sur 32 plantes hôtes ; grenadier, palmier dattier, figuier, caroubie , ect . (Doumandji-Mitiche, 1983 et Ben hamouda, 2011).

En Algérie, la présence de *Ectomyelois ceratoniae* dans les dattes algériennes est datée depuis 1904, ainsi d'autres études montraient sa présence dans les dattes du Moyen-Orient en 1933, Le Berre (1978). signalé deux zones de multiplication de *E.ceratoniae*, la première, une bordure littorale de 40 à 80 km de large, s'allongeant sur près de 1000 km et la seconde constituée par l'ensemble des oasis dont les plus importantes sont situées le long de la région Sud-est ( Doumandji, 1981).

## 2-4 Cycle biologique

Le cycle biologique de *E. ceratoniae* fait sur plusieurs plantes hôtes dont les principaux sont le caroubier, le néflier du japon, l'amandier, le figuier, le grenadier et le palmier dattier (Doumandji, 1981). Comme tous les membres de son groupe entomologique, le pyralide *Myelois* passe successivement par les stades d'oeuf, chenille, chrysalide et adulte ailé (Figure9)(Wertheimer, 1958).

L'insecte passe l'hiver dans les fruits momifiés sous forme de larve âgée et l'adulte apparaît au printemps suivant pour se développer sur plusieurs plantes hôtes. Il commence par l'attaque des grenades de mai à août, puis s'installe sur les premières dattes non nouées se trouvant sur les régimes et à partir de Septembre, l'insecte commence à attaquer les dattes mûres et s'y développe jusqu'à la récolte (Figure10)(Dhouibi, 1991) .

Il est extrêmement rare de trouver dans la même datte deux larves d'*Ectomyelois ceratoniae* (Le Berre, 1978). Aussi Gothilf (1969), signale que les émergences des adultes ont lieu dans la première partie de la nuit.

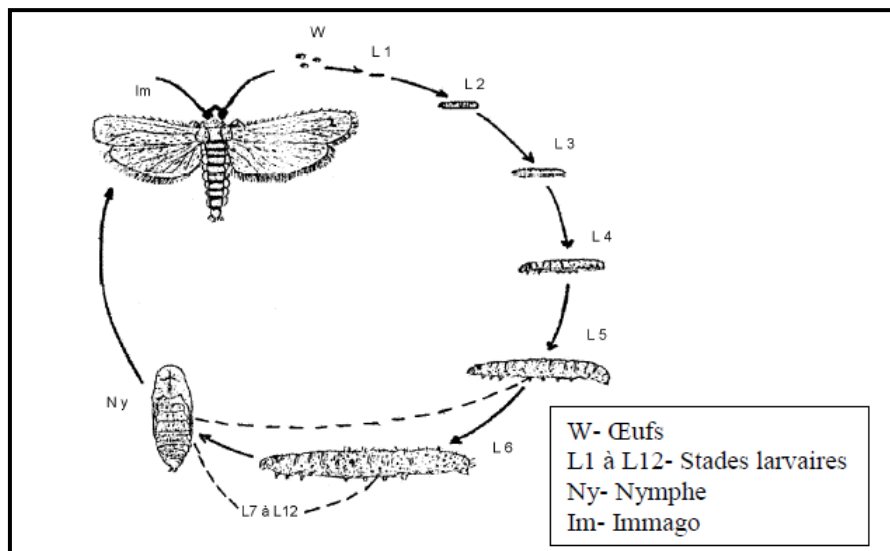


Figure9 : Cycle biologique d'*Ectomyelois ceratoniae* (Doumandji-Mitiche,1983)

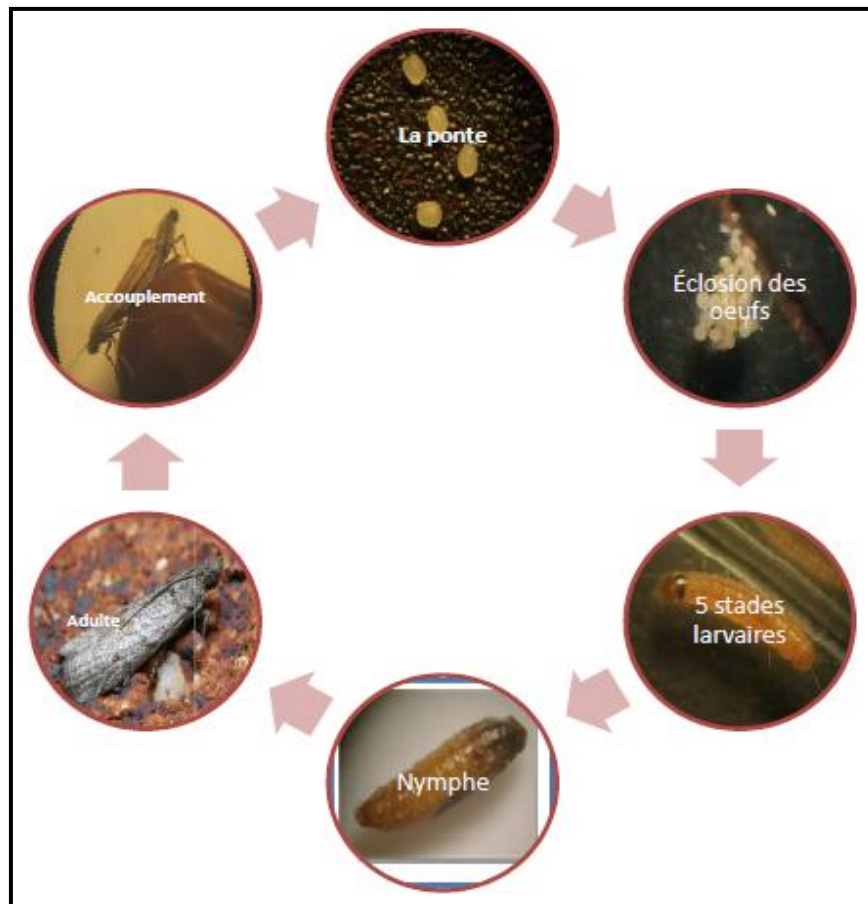


Figure10 : Cycle biologique d'*Ectomyelois ceratoniae*

## 2-5 Dégâts

L'*Ectomyelois ceratoniae* constitue l'un des principaux déprédateurs qui occasionne des dégâts considérables sur les dattes. Selon Wertheimer (1958), Lepigre (1963), Ben Addoune (1978) et Idder (1984), le pourcentage d'attaque le plus élevé est de 8 à 10 % et peut atteindre 30 % au Nord de l'Algérie, mais cette proportion peut être plus élevée jusqu'à 80%, (Munier, 1973). Il est extrêmement rare de trouver dans la même datte deux larves d'*Ectomyelois ceratoniae* (Le Berre, 1978 et Ksentini, 2009). D'après Doumandji - Mitiche (1983), le pourcentage d'attaque peut aller jusqu'à 96% dans les palmeraies de Sud Algérien. A Ouargla, le même auteur a estimé en 1985 les dégâts provoqués par ce déprédateur sont de 42,5% de fruits attaqués au sol et qui augmente au niveau des lieux de stockages et cela jusqu'à 64,7%. Certains auteurs indiquent que le taux d'attaque peut aller de 4,4 à 23,8 % sur les dattes de la variété Deglet Nour. (Idder, 1984, Ben Adoune 1987, Dhouibi 1989, Haddad, 2000 et Saggou, 2001) Ce taux d'infestation varie de 10 à 40 % sur la variété Deglet Nour des Etats Unis (Nay et Perring 2005) (Warner, 1988).(Figure11).



**Figure11** : Dégâts d'*Ectomyelois ceratoniae* sur la datte Deglet Nour

## 2-6 Moyens de luttés

Pour contrôler les ravageurs, l'agriculture d'aujourd'hui fait appel à cinq types de méthodes de protection: la lutte chimique, la lutte biologique, la lutte physique, le contrôle génétique et le contrôle cultural. Les termes «lutte» et «contrôle» renvoient ici respectivement aux notions de thérapie et de prophylaxie pour la maîtrise des ennemis de cultures (**Dore et al, 2006**). A part le contrôle génétique, toutes les autres méthodes de luttés sont utilisées en vue de limiter le développement des populations d'*Ectomyelois ceratoniae*.

### 2.6.1 Lutte Chimique

Il s'agit d'assurer une couverture des régimes (fruit) par une pulvérisation d'insecticide afin de détruire les œufs et les larves du premier stade larvaire (**Lepigre, 1963**). Plusieurs molécules chimiques ont été utilisées.

**-Lepigre (1961)**, a fait un traitement de DDT à 10%, les résultats de cette lutte ont montré un pourcentage d'efficacité de 67%, mais son inconvénient est que les dattes molles fixent fortement l'insecticide. Ce produit chimique a été interdit durant les années 1970.

**-Toutain (1972)**, a utilisé des fumigènes au niveau des stocks, mais cette méthode n'a pas montré une grande efficacité. L'inconvénient c'est qu'elle laisse les cadavres à l'intérieur des dattes.

**-Knipling (1962)** cité par (**Dridi et al, 2000**) a proposé une méthode de lutte chimique qui se base sur l'utilisation des chimiostérilisants qui provoquent une stérilisation totale des mâles. Théoriquement cette méthode a donné de bons résultats. Généralement la période d'intervention par des insecticides chimiques est au mois de Juillet-Août jusqu'à Septembre (stade Bser prés récolte) par trois traitements dont le premier et le deuxième peuvent être

mixtes (Boufaroua /Myelois). Toutefois, il faut noter qu'aucun produit chimique n'est accepté par les pays importateurs de dattes.

### 2.6.2 Lutte Biologique

Actuellement la lutte biologique reste comme méthode alternative et perspective d'avenir pour lutter d'une manière efficace contre la pyrale des dattes. Il s'agit de détruire les insectes par l'utilisation de leurs ennemis naturels.

Selon Bouka et al. (2001), les populations de *E.ceratoniae* peuvent être limitées par deux parasitoïdes hyménoptères, *Phanerotoma ocuralis* sur les dattes en régime et *Bracon hebetor* dans les dattes tombées au sol.

D'après Doumandji-Mitiche et Doumandji (1993), signalent la présence de trois ennemis naturels qui sont :

- *Trichogramma embryophagum* Hartigest un parasitoïde des œufs (ovoparasite)
- *Phanerotoma flavitestacea* Fischer et *Phanerotoma ocuralis* Khl, sont des parasitoïdesovo - larvaires .
- *Bracon hebetor* Say est un parasitoïde des larves.

### 2.6.3 Lutte physique

La lutte physique regroupe toutes les techniques de lutte dont le mode d'action primaire ne fait intervenir aucun processus biologique ou biochimique (**Dore et al, 2006**). Cette lutte se base sur plusieurs techniques :

- L'ensachage des régimes est une technique de plus en plus utilisée. Elle permet de réduire notablement l'infestation des dattes par les populations d'*Ectomyelois ceratoniae* (**Ben Othman et al., 1996; Bouka et al., 2001**).
- L'utilisation des radiations (Gamma) pour provoquer la mort ou la stérilité d'*Ectomyelois ceratoniae*. L'irradiation provoque la stérilité des mâles, mais ils gardent tout leur potentiel d'activité sexuelle. Leur accouplement entraîne de la part des femelles des pontes stériles (**Benaddoun, 1987; Dridi et al., 2000**).

### 2.6.4 La lutte intégrée

C'est une combinaison rationnée de diverses méthodes de lutte utilisées contre un ou plusieurs déprédateurs. le principe de leur combinaison a conduit au concept de lutte intégrée à la fin des années 1950 (**Ferron, 1999**). En palmeraies un model de lutte intégrée contre la

pyrale des dattes a été conçu par Idder (2002). Il s'appuie sur l'utilisation des plantes répulsives, conduite du palmier dattier et lâchers de trichogrammes.

### **2.6.5 Contrôle cultural**

Selon **Dore et al., (2006)**, le Contrôle cultural est l'ensemble des adaptations du système de culture mises en place en vue de limiter le développement des ravageurs. Cela couvre une gamme très large de choix techniques allant de la succession des cultures à l'implantation des cultures intermédiaires ou à l'association des espèces ou cultivars différents dans le même espace.

### **3- Le champignon entomopathogène**

#### **3-1 Généralités sur les champignons**

Les champignons (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, riche de quelques 120000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptées au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (**Senal *et al.*, 1993 ; Anonyme a, 2000 ; Anonyme b, 2000 ; Kirk *et al.*, 2001**).

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes filamenteux, aérobies strictes et rarement anaérobies (**Mathew, 1995 ; Tortora *et al.*, 2003**), ayant un métabolisme hétérotrophe car ils tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles disponibles dans leur environnement (**Leveau et Bouix, 1993 ; Nicklin *et al.*, 1999**).

#### **3.1.2 La Morphologie**

Sur le plan morphologique, le champignon est constitué d'un thalle qui forme son appareil végétatif (**Hawksworth *et al.*, 1994**). L'appareil végétatif se compose d'éléments de base appelé hyphes qui forme un réseau de filaments ramifiés ; le mycélium (**Mathew, 1995**). Chez la plupart des champignons les hyphes sont divisés par des cloisons, ou septa (septum au singulier) formant des unités qui ressemblent à des cellules distinctes avec un seul noyau, on les appelle alors hyphes segmentés ou septés. Dans quelques classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas des cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyau multiples ; ils sont appelés cénocytes (**Tortora *et al.*, 2003**).

Les hyphes, segmentés ou non, sont en fait de petits tubules transparents s'entourent d'une paroi cellulaire rigide formée de polymère de chitine et des polymères de la cellulose, éléments chimiques qui lui confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées. De ces faits, les champignons sont donc capables de vivre dans un environnement rude (**Tortora *et al.*, 2003**). En effet, les champignons se développent à pH légèrement acide (3 et 7) et à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C, cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à des températures très basses <15°C ou même parfois à <0°C (**Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Tortora *et al.*, 2003**).

### 3-2 Généralités sur les champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes sont des eucaryotes avec des noyaux, des organites bien définis et une paroi cellulaire chitineuse. Ils se présentent parfois sous forme de cellules individuelles, mais le plus souvent sous forme de filaments (hyphes) constituant le mycélium et dans lesquels sont rangées les cellules. Leur reproduction se fait par formation de spores sexuées ou asexuées. La sous-division des deutéromycètes regroupe les ascomycètes et les basidiomycètes qui sont des champignons filamenteux, à hyphes septés, se reproduisant de façon végétative dont on ne connaît pas leur forme de reproduction sexuée (champignons imparfaits) (Humber, 1997 ; Tzean et al. 1997). Les champignons entomopathogènes (EPF) sont largement distribués avec des gammes d'hôtes restreintes et larges qui ont des potentiels de lutte biologique différents contre les insectes arthropodes et les champignons pathogènes des plantes. Les champignons entomopathogènes ont été parmi les premiers organismes à être utilisés pour le contrôle biologique des ravageurs. Plus de 700 espèces de champignons d'environ 90 genres sont pathogènes pour les Insectes (**Khachatourians et Sohail; 2008**). La plupart des espèces EPF proviennent des divisions fongiques Ascomycota et Zygomycota. Les champignons ascomycètes étaient auparavant divisés en deux groupes, l'Ascomycota et le Deuteromycota. Le Fungi Imperfecti de Deuteromycota était connu pour n'avoir aucun stade sexuel connu sous le nom de. Mais plus tard, des études culturelles et moléculaires ont démontré que certains de ces "champignons imparfaits" (officiellement Hyphomycètes de classe dans le Deuteromycota) étaient en fait anamorphes (asexués) des Ascomycota dans l'ordre Hypocreales et la famille des Clavicipitaceae (**Fukatzu, 1997, Hodge, 2003, Krasnoff 1995, Shimazu, 1998**). Au sein des zygomycètes: les espèces les plus entomopathogènes sont de l'ordre des entomophthorales (**Roy et al., 2006**).

### 3-3 Quelques champignons entomopathogènes

La taxonomie des champignons entomopathogènes a connu un grand intérêt à partir des années 1970. En effet, plus de 700 espèces entomopathogènes ont été décrites comme antagonistes d'insectes et d'acariens (**Samson et al., 1988**). Ces espèces appartiennent aux Mastigomycotina, Zygomycotina ou Ascomycotina. Les espèces des genres *Cordyceps*, *Hypocrella* et *Torrubiella* représentent à elles seules environ 70 % des champignons entomopathogènes (**Rombach, 1987**).



L'ordre des Hyppocréales, qui appartient à la classe des Ascomycètes, regroupe pas moins de 80 genres entomopathogènes (**Samuels et Pinnock, 1990**) dont 27 (Avec plus de 237 espèces) appartiennent à la famille des *Clavicipitaceae*. Les champignons de cette dernière infectent les adultes ou les stades larvaires de Coléoptères, de Lépidoptères, d' Hyménoptères ou d' Homoptères ; ainsi que des acariens. Parmi ces espèces, il y a *Hypocrella badia*, *H. palmicola* et *Aschero sonia placenta* (**Goettel, 1992**).

L'ordre des Entomophthorales renferme plusieurs espèces comme *Entomophthora plutellae*, *Entomophaga praxibulli* et *Zoophthora radicans*. Cette dernière espèce a constitué un important agent de lutte biologique contre les pucerons en Australie (**Ainsworth et Grove, 1977**). *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, *B. brogniarti* et *Verticillium lecanii* constituent les espèces des Deutéromycètes qui ont été largement étudiées et produites à grande échelle sous diverses formulations pour servir la lutte biologique (**Aseno et al., 2003**).

### 3-4 Taxonomie

Il y a deux ordres taxonomiques principaux de champignons entomopathogènes. Les entomophthorales se produisent dans le phylum Zygomycota et comprennent des genres tels que Pandora, Entomophthora et Conidiobolus. Beaucoup d'espèces sont co-évoluées, pathogènes obligatoires qui montrent spécifique adaptations écomorphologiques aux cycles de vie de leurs hôtes, comme la production de spores infectieuses éjectées de force qui sont produites sur des cadavres d'insectes pendant la nuit, lorsque les conditions environnementales sont les plus propices à l'infection. Ces champignons causent souvent Épizooties naturelles chez les populations d'insectes et d'acariens. Cependant, certains d'entre eux sont très difficiles produire en masse dans la culture, ce qui est un défi pour les personnes qui veulent les développer biopesticides.

Malgré cela, ils peuvent être utilisés pour lutter contre les ravageurs en les appliquant sur le terrain (comme le mycélium).

Plusieurs espèces de champignons ont été associées avec des membres de la division des *Ascomycota* sur une base d'homologie d'ADN, dont l'espèce *M.anisopliae* (**Inglis et al., 2001**). Cette espèce fait dès lors partie du règne des *Mycota*, de la division des *Ascomycota* et de l'ordre des *Hypocreales*.

### 3-5 Mode d'action

Généralement, les champignons entomopathogènes tuent ou réduisent la vigueur des hôtes qu'ils infectent. Ces ennemis naturels sont plus efficaces lorsque l'insecte ciblé est préalablement affaibli par un autre facteur comme un stress nutritif. Compte tenu de leur mode de transmission et de leurs besoins abiotiques. Aussi, ils sont généralement très efficaces lorsque la densité des populations d'insectes ciblés est très élevée. Quoi qu'il en soit, le système immunitaire des insectes peut fortement influencer la pathogénicité de ces ennemis naturels.

Le champignon croît rapidement dans l'hémocoel. Les insectes susceptibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte.

La cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épicuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols (Andersen, 1979). La pro cuticule contient de nombreuses fibrilles de chitine enfouies dans une matrice protéinique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 70 % du poids sec de la cuticule.

### 3-6 Cycle de vie des champignons entomopathogènes

Le cycle de vie de l'EPF est composé de la spore qui germe en mycélium et les mycéliums en spores de spores (spores-mycélium-spores). Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les champignons entomopathogènes. Le processus de pénétration est l'étape la plus importante de la pathogénèse (**Ferron et al., 1993**). Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes: **l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination.**

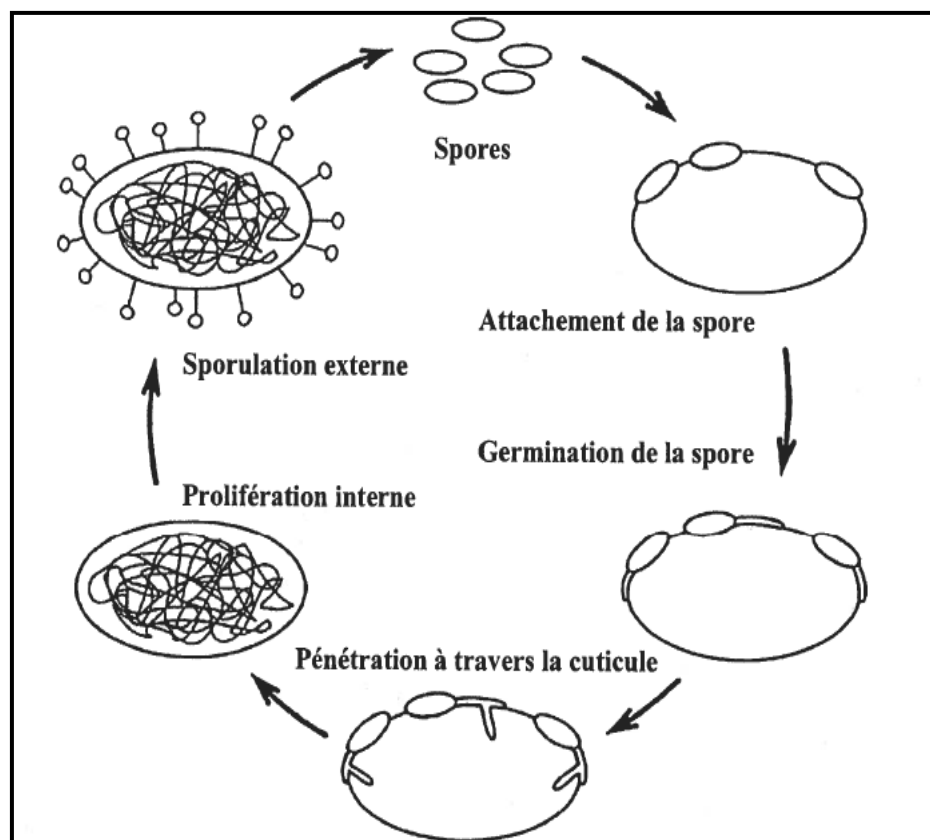


Schéma 1 : cycle biologique des champignons entomopathogènes (Ferron *et al.*, 1993)

### 3-7 Mécanisme de l'attaque

Les champignons entomopathogènes ont la capacité d'infecter leurs hôtes par plusieurs voies. Ces microorganismes peuvent pénétrer à l'intérieur de l'hôte par les ouvertures naturelles comme la bouche, notamment avec les aliments lors du prélèvement de la nourriture. Ils peuvent également se fixer sur la surface extérieure de l'insecte et procéder à la dégradation de l'exosquelette au moyen de leurs enzymes pour atteindre enfin, les organes internes de son hôte (Hong Wan, 2003). Malgré la présence d'un système de défense qui permet aux insectes de contrarier les attaques des champignons, ces derniers peuvent montrer une grande virulence qui se manifeste généralement par la rapidité de germination qui leur permet de surmonter ces obstacles et pénétrer à l'intérieur de l'hôte (Boucias *et al.*, 1988). Trois phases peuvent être observées lors du développement du champignon entomopathogène.

### 3.7.1. Fixation des spores sur l'hôte

L'infection de l'hôte est généralement assurée par les spores qui se fixent sur la cuticule au premier contact avec l'insecte. La réussite de l'infection dépend, entre autre, de la quantité de l'inoculum, des conditions climatiques et de la densité de l'hôte (**Boucias et al., 1988**). Deux types de spores peuvent assurer l'infection des insectes, les spores sèches et les spores visqueuses (**Samson et al., 1988**). Le premier type utilise une combinaison de forces électrostatique et chimique pour s'adhérer à la cuticule de l'hôte (**St Leger et al., 1992**). Quant au deuxième type, il s'attache à son hôte à l'aide d'une substance visqueuse adhésive. L'infection peut être également assurée par les mycéliums (**Boucias et al., 1988**).

### 3.7.2 Germination des spores sur la cuticule de l'hôte

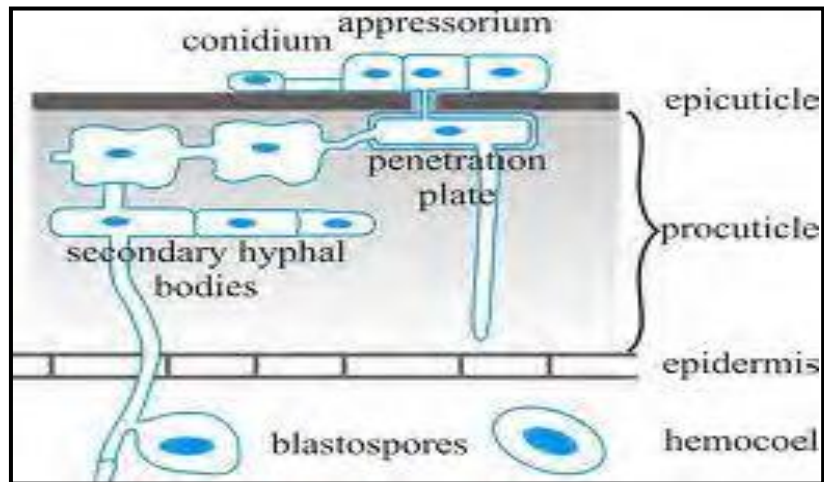
La germination des spores dépend à la fois de la température et de l'humidité du milieu, ainsi que sur les substances nutritives contenues dans celles-ci (**Samuels et Pinnock, 1990**). Après la fixation des spores sur l'hôte, ces dernières émettent un tube germinatif qui traverse les assises supérieures de l'insecte pour pénétrer à l'intérieur de celui-ci (**Hong Wan, 2003**). Des moyens physiques et enzymatiques facilitent la pénétration. Aussitôt pénétré, le champignon forme l'appressorium qui lui permet le prélèvement des substances nutritives nécessaires à son développement et à sa reproduction (**Samson et al, 1988**). Cependant, il existe des champignons entomopathogènes qui ne pénètrent jamais à l'intérieur de l'hôte, mais ils forment leur appressorium sur la cuticule même et procèdent au prélèvement de la nourriture en employant une combinaison de substances enzymatiques leur permettant la dégradation de la cuticule de l'arthropode (**Goettel et Leger., 1990**).

### 3.7.3. Développement du champignon à l'intérieur de l'hôte

A l'intérieur de l'hôte, le champignon commence son développement et sa propagation dans les tissus de l'arthropode. La réussite de l'attaque dépend, entre autre, de la capacité de l'entomopathogène à dépasser les mécanismes de défense employés par l'hôte (quinines et mélanines) pour faire face à cette attaque (**Latge Et Monsign., 1988**). L'aptitude de surmonter le système immunitaire de l'insecte peut être facilitée par une rapide reproduction et formation de mycéliums par le champignon, ainsi qu'une forte production de toxines qui paralysent et tuent l'hôte (**St. Leger et al., 1992**). Rapidement, tous les tissus de l'hôte sont détruits et, si les conditions de l'environnement sont favorables, le champignon apparaîtra à la surface de l'hôte en formant des structures de reproduction qui engendreront des spores assurant ainsi l'infection d'autres individus. Aux conditions défavorables, le champignon peut

## Partie bibliographique

rester inactif sous forme de différentes formes de résistance (chlamydozoospores, zygospores ou oospores) (Michael *et al.*, 1998). (Figure 12).



**Figure 12 :** Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des Insectes (Clarkson and Charnley, 1996)

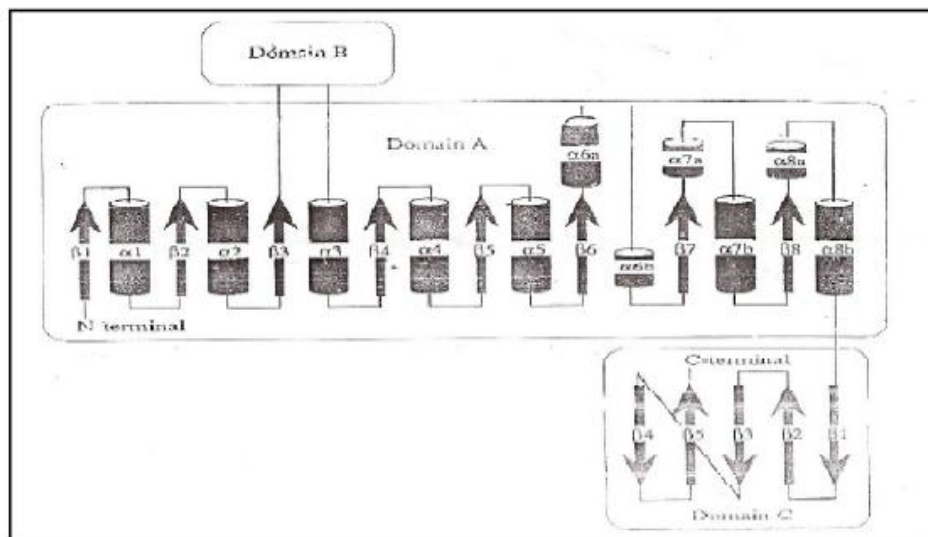
### 4- L' $\alpha$ -amylase

#### 4-1 Données sur l' $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$  amylase est considérée l'une des enzymes industrielles la plus importante et la plus ancienne (**Gupta *et al.*, 2008**). C'est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases, de la classe des hydrolases, qui agit sur les liaisons  $\alpha$  (1-4) de l'amidon. Elle est largement représentée chez les animaux, les végétaux et les micro-organismes. Bien que l' $\alpha$ -amylase de différentes origines ait très peu de séquences d'acides aminés identiques, leur structure tridimensionnelle et l'organisation de leur site actif sont similaires (**Mercier, 1985**). En fin de réaction elle fournit du glucose et des résidus correspondant aux liaisons  $\alpha$  (1-6) situées aux points de ramification des chaînes (**Raimbault, 1981; Alais *et al.*, 2008**). Leur chaîne polypeptidique est organisée en trois domaines formé chacun d'un tonneau de huit segments bêta entourés par huit hélices alpha. Leurs sites actifs sont constitués d'un ensemble de sous-sites pouvant accueillir chacun un résidu glucose dont le nombre varie selon l'origine de l'enzyme (**Scriban, 1993**).

#### 4-2 la structure de l' $\alpha$ -amylase

L' $\alpha$ -amylase fongique est une glycoprotéine, comportant trois domaines globulaires (A, B et C) (**Farber et Petsko., 1990**). Elle renferme une partie glucidique, qui est formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose et Dglucosamine (**Stefanova et Emanuilova .,1992**) associés chimiquement à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfures (**Heslot., 1996**). Structurellement, les  $\alpha$ -amylases sont également considérées comme des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes. La partie glucidique est formée essentiellement de mannose, les résidus constituant le site de fixation du substrat ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A qui montre que l'  $\alpha$ -amylase est formée de 8 feuillets  $\beta$  plissés et de 8 hélices  $\alpha$  (**Chiba, 1988 et Burhan, 2003**). (Figure13).



**Figure13** : La représentation des domaines et des éléments de la structure secondaire de l' $\alpha$ -amylase (Kadziola et al., 1994)

### 4-3 Nomenclature

Son action, de type endomoléculaire, conduit à la formation du D- glucose, de maltose et d'une petite quantité de maltodextrines. L'enzyme hydrolyse les molécules d'amidon exactement au niveau de la liaison  $\alpha$  (1-4) glucanes (Tableau 4) (Mercier, 1982). Le tableau récapitule les différentes nomenclatures d' $\alpha$ -amylase.

**Tableau 3** : Différentes nomenclatures d' $\alpha$ -amylase (Mercier, 1985).

<b>Nom systématique</b>	$\alpha$ (1 - 4) D-glucane glucanohydrolase
<b>Non codifié</b>	E.C .3.2.1.1
<b>Nom recommandé</b>	Alpha-amylase.
<b>Synonymes</b>	glycogenase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon s'effectue par 2 types d'enzymes amylolytiques de genre glycosyl hydrolases .

#### 1- Les enzymes spécifiques des liaisons $\alpha$ (1→ 4) dont :

- L' $\alpha$ - amylase (E.C.3.2.1.1)
- L' $\beta$ -amylase (E.C.3.2.1.2)
- L' $\gamma$ -amylase ( glucoamylase) ( E.C.3.2.1.3)

### 2-Les enzymes spécifiques des liaisons $\alpha$ (1→ 6) :

- L'Iso amylase (E.C. 3.2.1.68)

-La pullulanase (E.C. 3.2.1.41)

### 3-Les enzymes spécifiques des liaisons $\alpha$ (1→ 6) et $\alpha$ (1→ 4) :

-L'amyloglucosidase (E.C.3.2.1.31),

### 4-4 Différentes origines

L' $\alpha$ -amylase est une enzyme produite par des plantes, des animaux et des micro-organismes.

Cependant, les sources microbiennes sont les plus préférées pour la production à grande échelle (**Haq et al., 2002**) :

#### 4.4.1 L'origine animale

Les amylases d'origine animale sont généralement extraites à partir de la salive et du pancréas des mammifères (**French, 1975**). Les  $\alpha$ -amylase animales sont incapables d'hydrolyser la liaison  $\alpha$  (1→ 6) de l'amylopectine ou du glycosyl oligosaccharides, l'hydrolyse complète de l'amylose et de l'amylopectine par les  $\alpha$ -amylases animales donne respectivement du maltose et du D-glucose pour l'amylose et du glucose, maltose et des dextrans limites pour l'amylopectine (**Coolbear et al., 1992**).

#### 4.4.2 Origine végétale

Les  $\alpha$ -amylases végétales possèdent une importance primordiale dans le métabolisme glucidique où elles participent à la conversion de l'amidon en le réduisant en sucres réducteurs qui sont la source énergétique nécessaire à la germination et elles sont généralement incapables d'hydrolyser le maltose (**Nouadri ., 2011**).

Ces enzymes végétales sont généralement obtenues par extraction à partir des céréales notamment le blé, l'orge, le son ou le riz (**Srinivasa et al., 2004**). Elles sont souvent formées au cours de la germination des grains (Figure14)(**Brawn et al., 1993**).



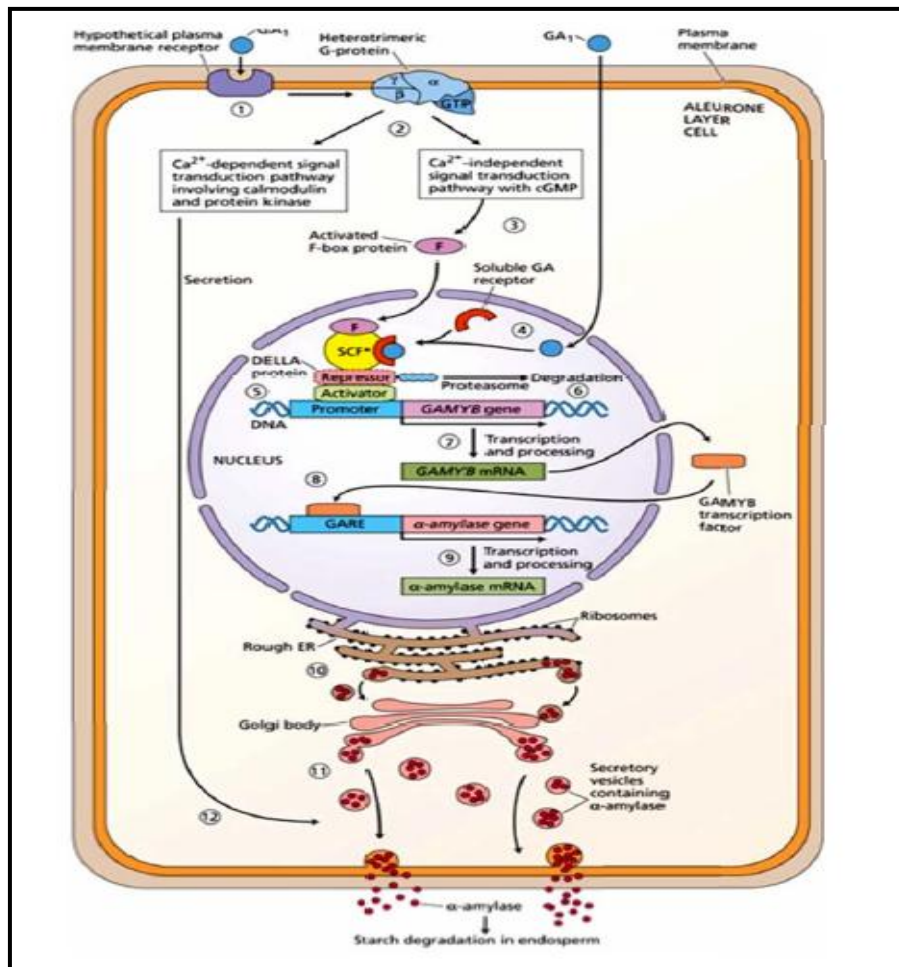


Figure14 : Biosynthèse enzymes végétales de l' $\alpha$ -amylase (Brawn *et al.*, 1993).

**4.4.3 Origine microbienne :** Deux types sont distingués : les  $\alpha$ -amylases bactériennes et les  $\alpha$ -amylases fongiques.

#### 4.4.3.1 Les $\alpha$ -amylases fongiques

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques appartenant surtout aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, existe depuis longtemps, du fait que la première production d' $\alpha$ -amylase a été réussie par Takamine en 1894. L' $\alpha$ -amylase fongique est d'une thermostabilité assez faible, son optimum d'action se situe entre 50°C et 55°C (Fogarty et Kelly, 1994 ; Duo-Chuan *et al.*, 1997).

Actuellement d'autres genres de moisissures dont *Rhizopus* et *Alternaria* ont été utilisés pour la production d' $\alpha$ -amylase relativement thermostable (Lateef *et al.*, 2004 ; Ait Kaki *et al.*, 2012). Les levures participent également à la production d' $\alpha$ -amylase (Leveau et Bouix, 1993).

#### 4.4.3.2 L' $\alpha$ -amylase bactérienne

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par fermentation de *Bacillacées*. Historiquement la première enzyme a été produite à partir de souches de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* ou *B. subtilis* fermentant en surface (Mctigue et al., 1995). Par ailleurs, les levures participent également à la production de l' $\alpha$ -amylase (Nouadri, 2011).

#### 4-5 Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de l'  $\alpha$ -amylase nécessite la participation de 3 fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile, un stabilisateur de la charge positif de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplacé ; ceci signifie que le rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat. Les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acides carboxyliques et un noyau imidazole (Parkc et al., 1997).

L'activité catalytique de l'enzyme impliquée la participation des trois acides aminés du site actif : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261(donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp328 (l'aide de catalyse) (Mc Carter., Withers., 1996 et Uitdehaag et al., 1999). En effet, la réaction catalytique est réalisée en trois étapes (Figure 15). Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme dans les conditions expérimentales telles que la T°, pH, taille et d'action des  $\alpha$ -amylases :

- **Attaque aléatoire:** l' $\alpha$ -amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glucosidiques, libérant deux fragments qui seront séparément attaqués.
- **Attaque préférée :** l'  $\alpha$ -amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat.
- **Attaque répétitive ou multiple :** elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (Berry et Paterson, 1990).

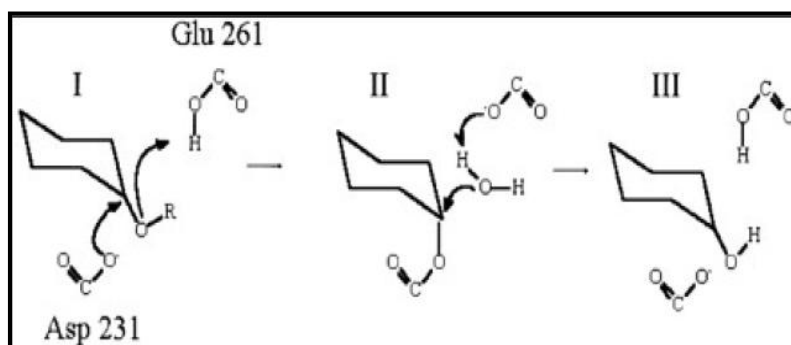


Figure15 : Mécanisme catalytique (Merabti., 2006).

### 4-6 Caractéristiques de l' $\alpha$ -amylase

#### 4.6.1 Spécificité de substrat

Le substrat naturel de l' $\alpha$ -amylase est l'amidon (**Pandey *et al.*, 2000 ; Alais *et al.*, 2008**). Dans la molécule d'amidon comme dans celle de glycogène, des unités de glucose reliées par des liaisons osidiques alpha 1-4 formant des chaînes hélicoïdales d'amylose, sur lesquelles de courtes chaînes de même constitution se branchent par des liaisons osidiques alpha 1-6 (**Mercier, 1982**).

Dans l'amidon, les ramifications sont présentes environ tous les trente résidus glucose tandis que dans le glycogène, elles sont présentes environ tous les dix résidus. En présence d'iode, l'amidon se colore en bleu violet alors que le glycogène se colore en brun acajou (**Berry et Paterson, 1990**).

#### 4.6.2 Poids moléculaire

Le poids moléculaire des  $\alpha$ -amylases varie d'une origine à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il est compris entre 40.000 et 90.000 daltons (**Schombury., Salzmann., 1991**). Celui des  $\alpha$ -amylases levuriennes, s'échelonne entre 40.000 et 70.000 daltons (**Panchal., 1990**).

#### 4.6.3 Température optimale

En général, les  $\alpha$ -amylases ont une température optimale comprise entre 25 °C et 70 °C, avec une grande stabilité thermique pour les  $\alpha$ -amylases bactériennes (**Larpen-gourgaud et Sanglier, 1992**). Selon Bakri (2003), la température optimale des amylases fongiques varie selon leur origine et se situe entre 30 et 40°C avec une faible thermostabilité. Les amylases microbiennes, quant à elles, ont une forte thermostabilité (30°C–60°C) et leur température optimale peut être plus élevée, se situant entre 40°C et 70°C et (**Park *et al.*, 1997**). (**Vertiani *et al.*, 1998**), signalent que la température optimale des  $\alpha$ -amylases bactériennes varie de 50 °C à 90 °C, avec possibilité de résistance à des températures dépassant 100 °C, pour celles isolées des souches hyperthermophiles.

#### 4.6.4 pH optimum :

Les  $\alpha$ -amylases sont généralement stables dans une gamme de pH de 5 à 8, avec un optimum se situant entre 4 à 5 pour les  $\alpha$ -amylases fongiques et un optimum supérieur à la neutralité 6 à 8.5 pour les  $\alpha$ -amylases bactériennes (**Ait Kaki-El-Hadef A., 2012**). Pour les levures, l'enzyme requiert, selon les espèces, des pH entre 4 à 6 (**Panchal., 1990**). (tableau5).

**Tableau 4:** Exemples de production de l' $\alpha$ -amylase par des fongiques et leurs propriétés physico-chimiques( **les références dans le tableau**)

<b>Moisissures</b>					
<i>Aspergillus awamori</i>	50	4.8-5.0	54.000	4.2	Bhella et altosar (1985)
<i>Aspergillus flavus</i>	55	6.0	52.500	-	Khoo <i>et al.</i> , (1994)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	5.5	65.000	-	Plancho colona, (1995)
<i>Aspergillus oryzae</i>	50	4.5-5.0	59.000	-	Kundu and Das (1970)
<i>Penicillium expansum</i>	60	4.5	64.000	-	Doyle <i>et al.</i> ,(1989)
<i>Rhizopus sp</i>	60-65	4.0-5.6	64.000	-	Vayssier <i>et al.</i> , (1990)
<b>Levures</b>					
<i>Saccharomyopsis cerevisiae</i>	60	5.0	-	-	Olasupo <i>et al.</i> , (1996)

#### 4.6.5 Ions métalliques

Les amylases sont des métalloprotéines absolument dépendantes du  $Ca^{2+}$  qui est vraisemblablement un activateur allostérique (Egas *et al.*, 1998). Le calcium ne participe pas directement à la formation de complexe enzyme-substrat mais il maintient l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité vis à vis de la dénaturation thermique (Savcheko *et al.*, 2002 ;Peixoto-Nogueira *et al.*, 2008) et de la dénaturation acide vis à vis de la protéolyse (Nigam *et al.*,1995, Mctigue *et al.*, 1995).

Cependant les ions  $Cl^-$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{2+}$  sont également des activateurs de l' $\alpha$ -amylases (**Schomburg et Salzmänn., 1991**), De plus, l'histidine , le mercaptoéthanol, le dithiothriitol sont aussi considérés comme des activateurs et l'acide acétique stimule l'  $\alpha$ -amylase.

L'activité enzymatique de l'  $\alpha$ -amylase n'est pas modifiée par les ions  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  mais elle est fortement inhibée par l'EDTA (agent chélateur du calcium), l'urée 8M, certains composants amides (**Toralballa et Eitingon., 1967**), l'acide formique, l'acide oxalique, l'acide lactique et l'acide citrique et les métaux lourds (**Talamond et al., 2002**).D'autres éléments, ont une action négative sur l'activité amyliasique : l'iodoacétate, l'acide ascorbique, l'isopanitole et le maltotriitol (**Schomburg et Salzmänn .,1991**).

### 5- déchets de fruit de banane

#### 5-1 Déchets Agricoles

Le terme déchets est défini par celui qui représente un tonnage important, de prix bas, concentré géographiquement et représentant des sources énergiques non négligeables (Sauvant,1984). Les déchets des activités agricoles et des industries agro-alimentaires sont considérés actuellement comme matière premières dans le but d'une valorisation.

#### 5 -2 Déchets de bananes

##### 5-2-1 Définition

La banane est le fruit ou la baie dérivant de l'inflorescence du bananier. Les bananes sont des fruits très généralement stériles issus de variétés domestiquées. Seuls les fruits des bananiers sauvages et de quelques cultivars domestiques contiennent des graines. Les bananes sont généralement jaunes avec des taches brunâtres lorsqu'elles sont mûres et vertes quand elles ne le sont pas.

Le bananier fut introduit en Afrique de l'Est, en Chine, en Mélanésie, dans le Pacifique Sud à partir du commencement de l'ère chrétienne. Sa culture commence à Madagascar vers 500 de notre ère. Il fut amené en Méditerranée (Afrique du nord et Espagne) par les Arabes à partir de 650. Début XVI<sup>e</sup> siècle les Portugais l'implantent dans les Canaries et de là en 1516 le frère Tomas de Berlanga prélève des rejets dans le cloître des franciscains près de Las Palmas et les transporte à Hispaniola.

##### 5-2-2 Description

La banane est une bonne source de potassium, bien que moins riche que ce qui est habituellement cru .

La banane est un long fruit légèrement incurvé, souvent regroupé sur le bananier en grappes nommées « régimes ». La banane possède une peau de couleur jaune, verte ou rouge, selon les espèces, facile à détacher.

Le bananier (*Musa acuminata* L.) appartient à la famille des Musaceae (Xu, 2014).

C'est une plante que l'on retrouve dans les régions au climat tropical ou subtropical (Xu, 2014). Il semblerait que le bananier soit originaire des îles d'Asie du Sud-Est (Li, 2013).

La banane est un fruit frais très apprécié dans le monde entier (Xu, 2014) et plus particulièrement dans les pays avec des problèmes de malnutrition (Borges, 2014).

Les principales variétés que l'on retrouve pour la banane sont Enano, Morado, Valery et Macho (Utrilla-Coello, 2014).

### **-Caracteristiques physiques**

La banane est un long fruit comportant une peau épaisse jaune à maturité.

### **-Caracteristiques de composition (hors macronutriments, vitamines et minéraux)**

L'amidon est la principale source de glucides dans la banane verte (61,3 à 76,5%). L'amidon est dégradé en 2 principaux composés l'amylose et l'amylopectine.

La concentration en amylose impacte directement sur le goût et la texture de l'aliment (**Miao, 2014**). Au cours du développement de la banane, la concentration en amylose augmente puis diminue au cours du stockage du fruit mûr (**Miao, 2014**). Elle varie de 19,32% à 26,35% (**Utrilla-Coello, 2014**).

La maturation de la banane est une phase importante durant laquelle le fruit subit des changements physiologiques et biochimiques importants, tels que la conversion de l'amidon en sucres, l'évolution de la couleur, de la saveur, de l'arôme et de la texture (**Srivastava, 2012**).

### **-Caracteristiques organoleptiques**

Une analyse des composés aromatiques de la banane a mis en évidence la présence de 146 composés, dont 126 ont été identifiés. Trente et un d'entre eux sont considérés comme des composants activement odorants et contribuant à l'arôme de la banane (**Pino, 2013**).

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'influence de la production de l'enzyme alpha amylase par des champignons entomopathogènes à partir d'*Ectomyeloides ceratoniae* (zeller) des dattes cultivées sur milieu à base de déchets de bananes.

La partie expérimentale est réalisée au sein du Laboratoire de microbiologie (RDC), faculté des sciences de la nature et de la vie. Université des Frères Mentouri, Constantine.

### 1- Matériel végétal : Les dattes

Le matériel végétal provient des dattes commercialisées dans le marché de Sonatipa de Constantine (**Figure16**).



**Figure 16** : Observation directe des dattes

### 2 Matériel animal : La pyrale des dattes (*Ectomyeloides ceratoniae*)

Les échantillons des larves *Ectomyeloides ceratoniae* (zeller) sont prélevés à partir des dattes stockées. observation directe à l'oeil nu (**Figure 17**), pour vérifier la présence de larves ou de nymphes de la pyrale.



**Figure17** : Observation directe des larves et de nymphes

### 3-Partie mycologique

#### 3.1. Le milieu de culture

Dans notre étude, nous avons utilisé le milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe 1) qui a servi à la fois à l'ensemencement, la purification des souches fongiques. Ce milieu est largement employé et il fournit les nutriments nécessaires à la croissance mycélienne des champignons. C'est milieu sélectif pour les champignons entomopathogènes.

#### 3.2. Désinfection et séchages des larves *E. ceratoniae* (zeller)

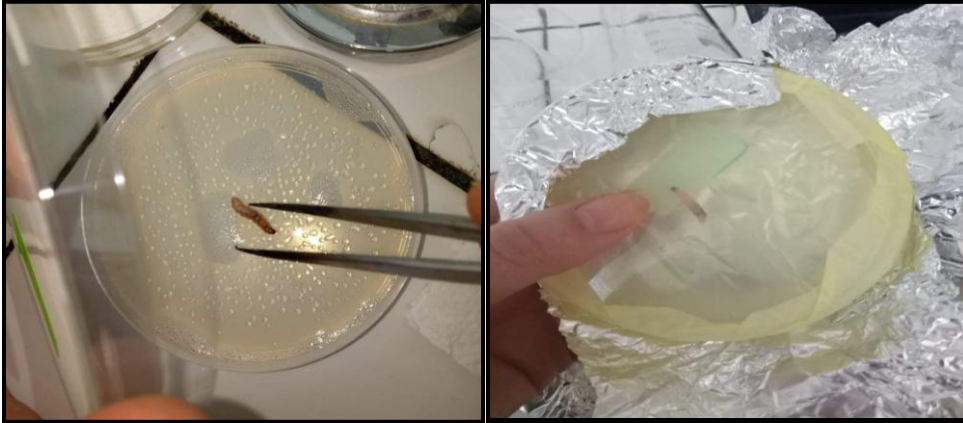
Les larves *E. ceratoniae* sont désinfectés à l'hypochloride de Sodium (Eau de Javel 2%) pendant trois minutes. Cette opération a pour but d'éliminer la flore saprophyte. Les larves sont ensuite rincées à l'éthanol pendant trois minutes et en fin à l'eau distillé stérile pendant 3 minutes, séchés par un papier filtre sétrile

#### 3.3 Isolement

##### Isolement des champignons entomopathogènes

Les larves d' *E. ceratoniae* (zeller) est déposé dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato- Dextrose- Agar), additionnés d'un antibiotique, Gentamicine (10mg/L). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 15 jours (**Figure19**) (**Zimmermann,1986**).





**Figure 18** : technique d'isolement

### 1.3 Purification des moisissures

La purification a concerné principalement les colonies dont les caractères cultureux sont différents. Il s'agit donc de prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle et de l'ensemencer de manière aseptique dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte (**Figure 20**) (**Botton et al. ,1990**).



**Figure20** : technique du purification

### 1.4 Identification des moisissures

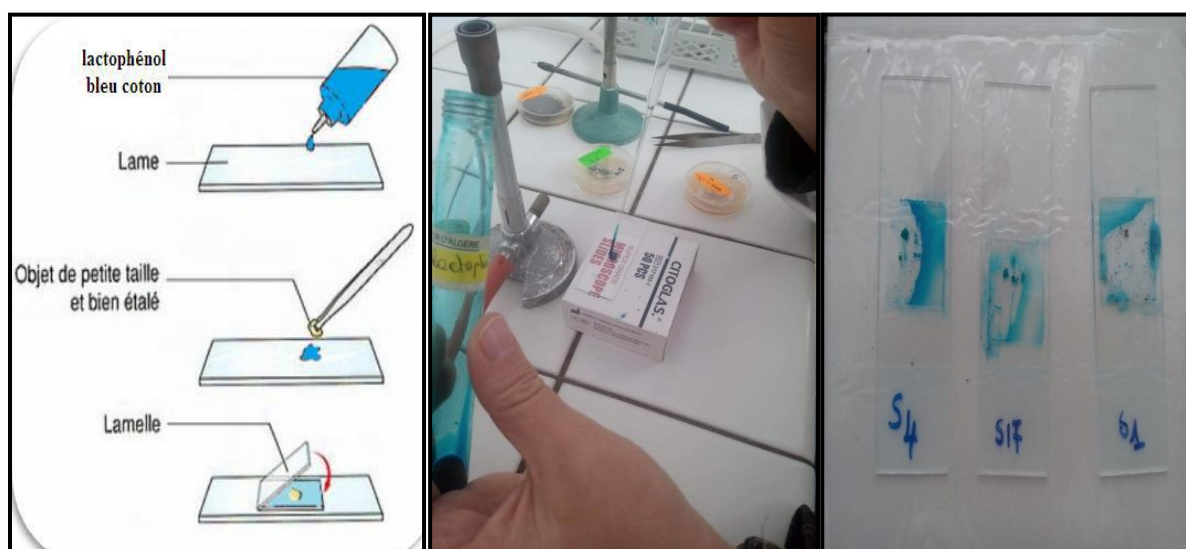
L'identification des champignons fait essentiellement appel aux caractères cultureux et à la morphologie, mais aussi à des propriétés biochimiques qui nécessitent l'utilisation de milieux standards favorisant le développement des colonies. Par conséquent, nous nous sommes basés sur les aspects macroscopiques et microscopiques pour la caractérisation des isolats.

### 1.4.1. Identification macroscopique

L'examen macroscopique des souches isolées, permet de déterminer les caractères cultureux suivants : la croissance et le développement du champignon, le diamètre de la colonie, sa texture, la couleur du thalle, la couleur du revers ainsi que son odeur (Harrigan et Mc Cance, 1976 ; Rinaldi *et al.*, 1998 ; Botton *et al.*, 1990).

### 1.4.2 Identification microscopique

L'observation microscopique s'effectue sur un petit fragment mycélien soigneusement prélevé à la marge du thalle à l'aide d'une Anse de Platine stérile. Le fragment prélevé est ensuite coloré avec de Lactophénole Bleu de Cotton (Packer et Thomas, 1990), ce qui permet ainsi de détecter la présence et la nature du mycelium, la présence ou l'absence du septum, les caractéristiques des fructifications et spores etc... (Figure21 ). (Samson *et al.*, 1988 ; Hawkswarth *et al.*, 1994 ; Hoogand, 1995 ; Gams *et al.*, 1998).



**Figure 21:** Technique de préparation des lames par solution du lactophénol-bleu de coton

## 4. Enzyme $\alpha$ -Amylase

### 4.1. Méthode de fermentation

#### a. Préparation de l'inoculum

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique utilisée. Cette dernière est préparée par addition de 10 ml d'eau tweenée (0.1%) stérile à la souche cultivée 14 jours sur milieu PDA. En boîte de Pétri. À l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose afin de mettre en suspension les spores

fongiques. Ensuite, cette suspension a été récupérée superficiellement en utilisant une micropipette sous des conditions stérile.

Avant chaque inoculation, le nombre de spores est dénombrés à l'aide d'une cellule de comptage ou de numération ( cellule de Malssez) des spores (**Annexe 6**) (**Sumantha et al., 2008; Paranthaman et al., 2009; Murthy et Naidu, 2010**).

### b. Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture est préparé à partir de farine de déchets de Banane (**Bananier**).

Les déchets sont séchés à l'air libre (30°C) pendant 3 - 4 jours puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager (**Katapodis et al., 2006**) de manière à obtenir une farine avec des particules de  $\Phi : 0,5$  mm pour la culture liquide (**figure 23**) (**Annexe 7**) (**Murthy et Naidu, 2010**).

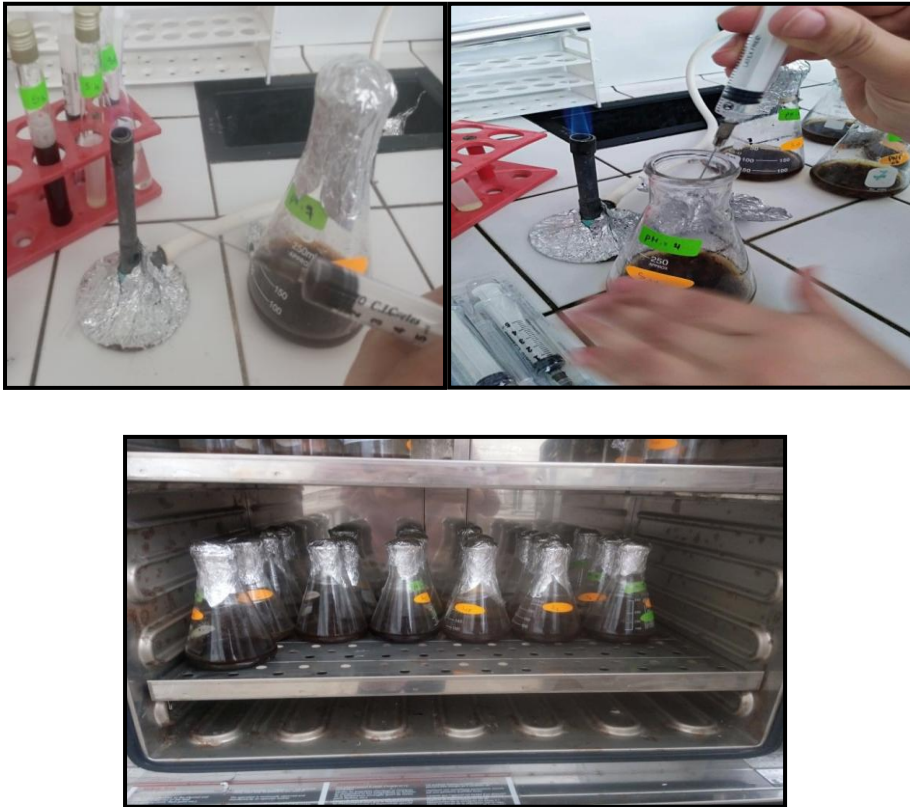


**Figure23** : Technique du préparation du milieu de fermentation à base de déchets de bananes

### c. Conduite des fermentations

Chaque souche de moisissure sélectionnée a été inoculée avec 1 ml de sa suspension sporale ( $3,73 \times 10^7$  spore /ml) dans un erlenmeyer contenant le bouillon de production (2 g Farine des déchets de banane dans 50 ml de l'eau distillée). Ces erlenmeyers ont été incubés à 28°C pendant 3 jours (**Annexe6**). La gamme du pH testée est comprise entre 4 et 10 avec un intervalle de 3. Les expérimentations sont réalisées en triple.

Après fermentation, les bouillons de culture ont été filtrés à travers le papier Whatman n°1 préalablement séché et pesé. Le filtrat clair ainsi obtenu représente l'extrait enzymatique brut. Il a été congelé pour les dosages amylolytique. A la fin des fermentations, les paramètres (pH et activité amylolytique) sont estimés (**figure 23**).



**Figure24** : technique de la production de l' $\alpha$ -amylase à base de déchets de bananes

### *c. Techniques analytiques*

#### ➤ **La biomasse**

Pour déterminer le poids sec du mycélium, l'échantillon est filtré sur papier Wattman. Le mycélium est lavé deux fois avec de l'eau distillée, séché à 105° C, jusqu'à poids constant (**Annexe7**).

#### ➤ **Mesure du pH**

Pour chaque prélèvement réalisé lors des fermentations (erlens et fermenteurs) une mesure de pH de l'extrait enzymatique est réalisée à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné (**figure 25**).



**Figure25** : mesure le pH mètre de l'extrait enzymatique de chaque pH (4, 7 ,10).

### ➤ Dosage des activités enzymatiques

Un volume de 0,5 ml de l'extrait enzymatique est additionné de 0,5mL de substrat contenant 1% d'amidon dans du tampon phosphate de sodium 100 mM à pH 6,5 (mélange réactionnel) (**Annexe2**), l'incubation est opérée dans un bain marie à 40°C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide 3, 5-dinitrosalicylique (DNSA) (**Annexe3**) suivi d'un chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 10ml d'eau distillée sont ajoutées. La densité optique est mesurée à 575 nm (**Figure 26**). La quantité des sucres réducteurs est déterminée sur une droite d'étalonnage préparée avec des solutions de glucose de différentes concentrations (**Annexe8**).



**Figure26** : Technique dosage de l'activité amylique

Ce travail porte sur l'effet du pH sur la production de  $\alpha$ - amylase par des champignons isolés à partir des larves *Ectomyelois ceratoniae* (zeller). En effet, les larves utilisés pour cet objectif sont prélevés à partir des dattes stockées .

### 1. Isolement, purification et identifications des champignons entomopathogènes

L'isolement des souches fongiques, à partir des *Ectomyelois ceratoniae*, a permis de répertorier 14 isolats représentant 3 genres : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*.

Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 50% regroupant 7 espèces : *Aspergillus sp<sub>1</sub>*, *Aspergillus sp<sub>2</sub>*, *Aspergillus sp<sub>3</sub>*, *Aspergillus sp<sub>4</sub>*, *Aspergillus sp<sub>5</sub>*, *Aspergillus sp<sub>6</sub>* et *Aspergillus sp<sub>7</sub>*, suivie par le genre *Fusarium* avec un pourcentage de 28,57 % (*Fusarium sp<sub>1</sub>*, *Fusarium sp<sub>2</sub>*, *Fusarium sp<sub>3</sub>*, *Fusarium sp<sub>4</sub>*), et enfin le genre *Cladosporium* avec un pourcentage de 21,43% regroupant 3 espèces : *Cladosporium sp<sub>1</sub>*, *Cladosporium sp<sub>2</sub>*, *Cladosporium sp<sub>3</sub>* (Figure 27) et (Tableau5) .

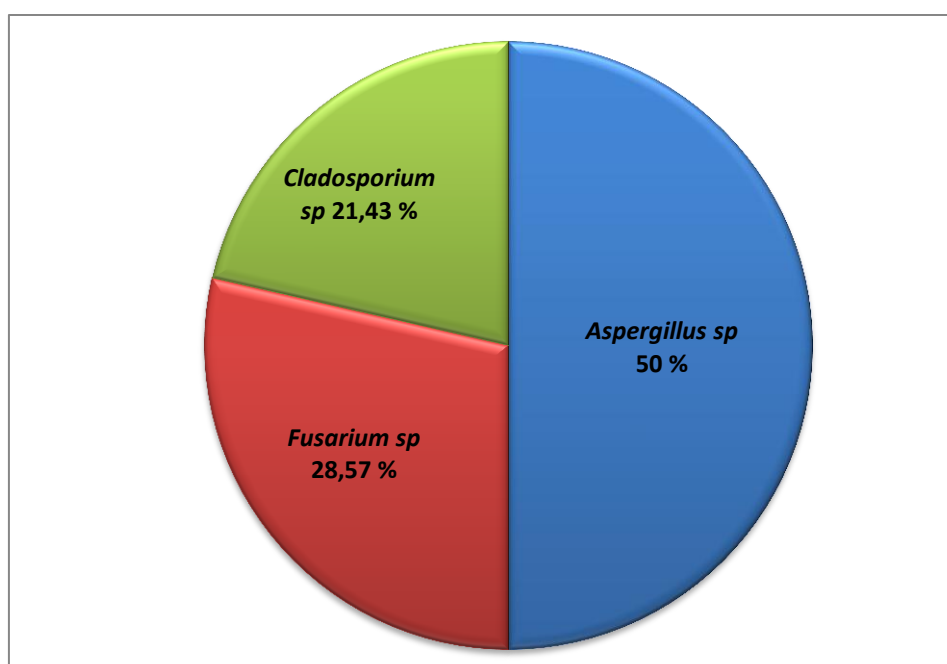
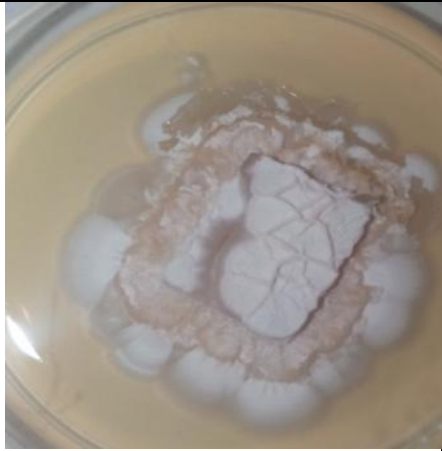
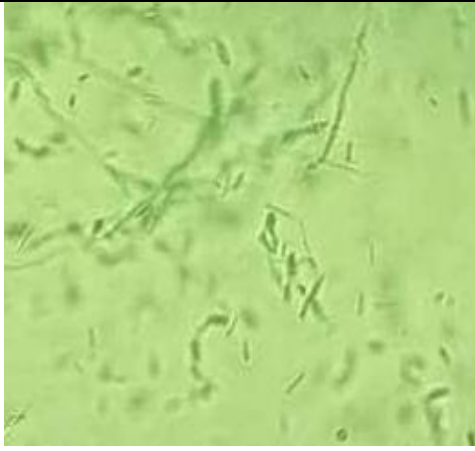
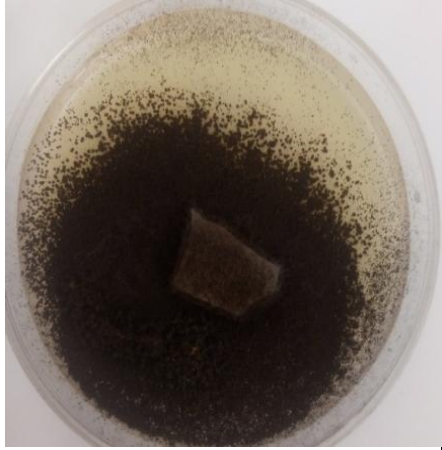





Figure 27 : Pourcentages (%) des isolats fongiques

## Résultats et discussion

**Tableau 5 :** l'observation macro-microscopique des souches fongiques

<i>La souche</i>	L'observation macroscopique	L'observation microscopique	<i>sp</i>
<i>S4</i>			<i>Fusarium sp</i>
<i>S1</i>			<i>Aspergillus niger</i>
<i>S17</i>			<i>Cladosporium sp</i>

Les résultats obtenus montrent que *Aspergillus niger* à un fort effet sur *Ectomyeloides ceratoniae* (zeller) avec un pourcentage **50%** , suivie par *Fusarium sp* qui représente un

pourcentage **28,57 %** . La dernière souche *Cladosporium sp* a un petit effet sur *Ectomyelois ceratoniae* avec un pourcentage **21,43%** .

Plusieurs auteurs ont étudiés l'évolution de l'infestation dans des périodes différentes en Algérie et dans d'autres pays ont trouvés des taux variables. Il est connu comme teigne de la caroube, le ver du cou de la grenade et le papillon de la datte à travers le monde. *E. ceratoniae* (Synonyme : *Ectomyelois ceratoniae*) est polyphytophage qui endommage de nombreux arbres fruitiers (**Warner, 1988**). **Wertheimer (1958)** rapporte un pourcentage d'attaque supérieur à 10% et pouvant atteindre 30% en Afrique du Nord. Pour **Munier (1973)**, le pourcentage de fruits véreux à la récolte est de 8 à 10%, mais cette proportion peut être plus élevée jusqu'à 80%. Dans les oasis tunisien, la culture de grenadier est en voie de disparition à cause des attaques de la pyrale qui peuvent atteindre jusqu'à 80% de la production (**khoualdia et al., 1995**). **Doumandji-Mitiche (1983)** signale qu'au sol, le pourcentage de fruits attaqués est de 42,5% à Ouargla et augmente au niveau des lieux de stockage jusqu'à 64,7%. Un taux de 2 à 10% de perte en moyenne (**Nay et Perring, 2005**), jusqu'à 57% dans certaines conditions (**Idder et al., 2009**).

La lutte contre ce ravageur pose une problématique quant à la stratégie et les moyens à utiliser; il constitue de nouveaux défis à relever. Les méthodes de lutte biologique, peuvent constituer une réponse aux attaques de cet insecte. En plus de l'utilisation des parasitoïdes, la lutte microbiologique pourrait être envisageable en particulier après les résultats fort satisfaisants qu'elle a donné contre d'autres ravageurs des cultures. Il s'agit évidemment de la lutte par l'utilisation des entomopathogènes (champignons et bactéries) inféodés à ce parasite (**Saiah et al., 2011**).

Approximativement 750 espèces de champignons décrites sont des pathogènes obligatoires ou facultatifs sur un ou plusieurs stades de développement des insectes dans des habitats aquatique, terrestres et souterrains (**McCoy et al, 1988**).

Les champignons entomopathogènes et leur métabolites affectent plusieurs traits de la biologie de l'insecte tels que : la survie, le développement, la fécondité et la prise de nourriture (**Amiri et al, 1999 ; Eskesi et al, 2001**).



## 2. Activité Enzymatique

### 2.1. Le pH

L'étude de l'effet du pH initial de milieu de culture sur la production de l'  $\alpha$ -amylase des souches fongiques a révélé que l'enzyme se développe dans une zone de pH située entre 4 et 10, cependant, la meilleure activité (**284,64 U**) est obtenue à pH 10 .

En outre, il a été constaté que, au cours de la fermentation, le pH était diminué dans toutes les cultures avec une grande acidité s'est produite (**Tableau6**).

Le tableau 6 montre les variations du pH de la culture après fermentation dans une gamme de pH de 4 à 10 avec un intervalle de 3 . D'après ce tableau, on remarque que le pH reste dans l'intervalle allant de 2 Jusqu' à 5 sous les trois pH.

Les trois valeurs du pH 4, 7 et 10, une diminution significative du pH a été observée après 3 jours de fermentation à base de la farine de déchets de bananes pour l'ensemble de toutes les souches. La diminution s'explique par production d'acides organiques. Cela indique que les souches ont certainement utilisé mais différemment les déchets de bananes constituant la seule source de carbone et donc de sucres dans le milieu. En effet, les variations du pH sont des indicateurs des changements dans les activités métaboliques car, le pH du milieu est affecté par les processus métaboliques, notamment enzymatiques (**Sandhya et Al,2005**).

**Tableau 6:** Résultats du pH pour les souches fermentées à différentes température

pH	pH=4	pH=7	pH=10
<b>Souches</b>			
<i>Aspergillus niger</i>	2,37	2,46	2,51
<i>Cladosporium sp.</i>	3,71	4,92	5,50
<i>Fusarium</i>	4,09	5,51	5,96

La diminution de pH des trois souches *Aspergillus niger*, *Fusarium sp*, *Cladosporium sp* peut être expliquée par la fermentations des sources carbonées disponibles dans le milieu par ces souches, puis elles en fabriquent des acides organiques, qui augmentent l'acidité du milieu, ce qui se traduit par une diminution de pH (**Panchal., 1990 et Refice et al., 2011**). Mais l'augmentation de pH, peut être engendrée par de la de dégradation des protéines par les

champignons qui libèrent progressivement des acides aminés hydrolysés en suite en ammoniacque par désamination (Benaouida., 2008).

Selon Bellon-Maurel *et al.*, (2003), Ces variations du pH résultent d'une consommation en substrat (hydrolyse des protéines) et/ou des synthèses métaboliques (synthèse d'acides organiques) ; elles sont donc des indicatrices des changements dans les activités métaboliques. Pour les souches *Fusarium sp* et *Aspergillus .* , nos résultats corroborent ceux de Soccol *et al.* (1994) et Saito *et al.* (2003), qui montrent que la diminution du pH à la fin des fermentations réalisées par *Aspergillus niger* est due à la synthèse des acides fumarique et lactique qui s'accumulent dans le milieu. Par contre l'augmentation du pH, surtout dans le milieu d'extrait de levure est probablement expliquée par la libération des acides aminés et des ions ammonium rendant ainsi le milieu alcalin (Botton *et al.*, 1990).

### 2.2. L'activité enzymatique

Résultats de l'activité amylasique testée dans le milieu de fermentation liquide à base de déchets de banane a montré que la production de  $\alpha$ - amylase diffère d'un pH à un autre chez les différentes souches fongiques (Figure 28).

Par ailleurs, on remarque que ces trois souches ne produisent pas la même quantité de l'enzyme ciblée ; la meilleure activité obtenue (284,64 U) est produite par la souche *Fusarium sp* , suivie par *Aspergillus niger* (237,76 U), puis *Cladosporium sp*( 170,48U) .

En commençant par le pH=4 , la meilleure activité est remarquée chez la souche *Fusarium sp.*(171,04 U), suivie par la souche *Aspergillus niger* (148,4U). *Cladosporium sp.* produit une moyenne activité (113,68U) .

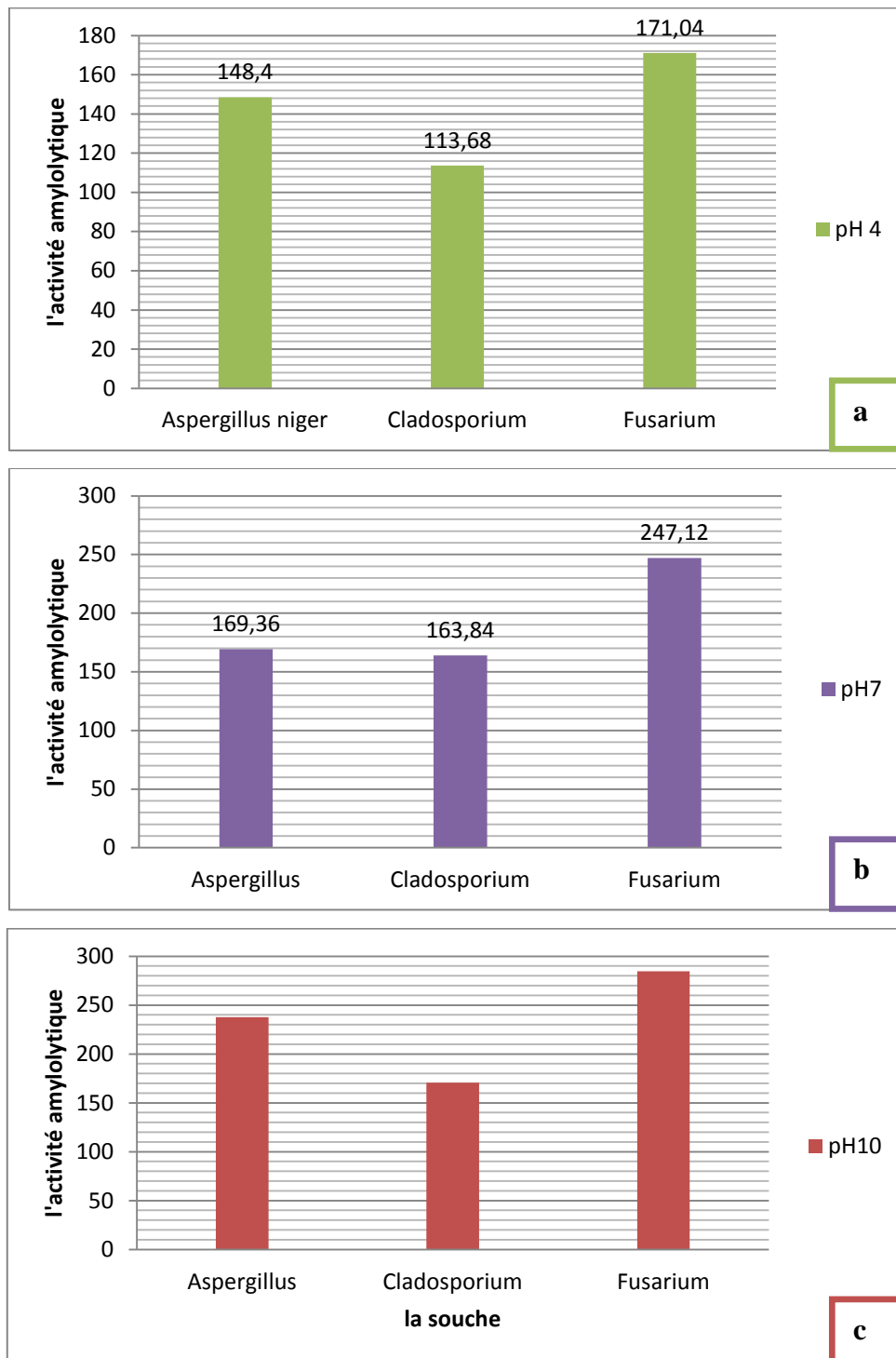
Par ailleurs, les rendements maximaux en  $\alpha$ - amylase pour le pH=7 sont constatés successivement chez les souches : *Fusariumsp.* (247,12 U), *Aspergillus niger* (169,36U) et *Cladosporium sp* (163,64 U) ,

En effet, la comparaison des résultats de toutes les souches révèle que la meilleure activité amylasique observée est celle obtenue par la souche *Fusarium sp.* (284,64 U) à pH=10

Il ressort des ces résultats que la production sur milieu à base de déchet de banane est significatifs .

Par ailleurs il est à signaler que l'estimation de la biomasse n'a pas été réalisée à cause l'utilisation de déchet solide non totalement soluble .

## Résultats et discussion



**Figure 28:** Activité amylasique selon la variation du pH ; a : Ph4 , b : pH7, c :pH 10

## Résultats et discussion

L'activité amylasique de l'alpha amylase produite par les trois souches fongiques est tout à fait considérable ce qui révèle l'induction efficace et disponible des sources de carbone dans le milieu de culture. Il est bon de noter que les déchets de banane ont servis de matière première économique et facilement disponible pour la production des enzymes utiles comme l'alpha amylase.

Les déchets de bananes sont considérés comme un milieu très riche en source de carbone et d'azote (**Nishio et Nagai, 1981 ; Mahmood et al., 1998**) en effet, beaucoup de travaux de recherches se sont orientés vers l'utilisation de déchets de bananes comme substrat fermentescible : production polygalacturonase par *Rhizopus oryzae* (**Hart et al., 1991**), de pectinase par *Tubercularia vulgaris* (**Fonsec et Said, 1994**) des protéase alcalines et neutres de polygalacturonate-lyase et d'  $\alpha$ -amylase par *Bacillus subtilis* (**Mahmood et al., 1998**) et par l'*Aspergillus niger* (**Djekrif-Dakhmouche et al. 2006 ; Mukesh et al., 2010**), *Trichoderma reesei* (**Momein et al., 2003**) et *Aspergillus oryzae* (**Raviyan et al., 2003**).

Notre résultat peut s'expliquer par le fait que les déchets de bananes renferment une quantité suffisante en glucides ce qui est corroboré par les travaux de (**Belitz et Grosch, 1987**).

## Conclusion générale

L' $\alpha$ -amylase est l'une des plus importantes hydrolases actives sur l'amidon dont les domaines d'application s'élargissent de plus en plus. La production de cette enzyme a été réussie par certaines bactéries, levure et certains genres de moisissures.

Notre étude comporte deux axes de recherche. Le premier axe est l'isolement et identification des champignons entomopathogènes à partir *d'Ectomylois ceratoniae*. Le seconde est la production de l' $\alpha$ -amylase par fermentation dans un milieu à base de déchets de bananes.

Pour l'isolement et la sélection des souches fongique à partir *d'Ectomylois ceratoniae* sur milieu PDA, permis de répertorier 14 souches fongiques, l'examen macroscopique et microscopique nous ont permis d'identifier trois souches *Aspergillus niger*, *Cladosporium sp.* et *Fusarium sp.*

Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 50% regroupant 7 espèces : *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2*, *Aspergillus sp3*, *Aspergillus sp4*, *Aspergillus sp5*, *Aspergillus sp6* et *Aspergillus sp7*, suivie par le genre *Fusarium* avec un pourcentage de 28,57 % (*Fusarium sp1*, *Fusarium sp2*, *Fusarium sp3*, *Fusarium sp4*), et enfin le genre *Cladosporium* avec un pourcentage de 21,43% regroupant 3 espèces : *Cladosporium sp1*, *Cladosporium sp2*, *Cladosporium sp3*.

L'effet de pH sur la production d' $\alpha$ -amylase a été étudié par réalisation des fermentations en erlenmeyers de 250 ml, contient chacun une 2g de déchets de bananes.

Les milieux ont été ajusté à différent pH (4, 7 et 10), ces cultures ont été incubées pendant trois jours à 28°C. L'analyse des résultats sa révélé que les meilleures activités amylasique a obtenue par la souche *Fusarium sp* (284,64 U) à pH=10.

De ce fait, le pH= 4, la meilleure activité est remarquée chez la souche *Fusarium sp* (171,04 U), suivie par la souche *Aspergillus niger* (148,4U), *Cladosporium sp* produit une moyenne activité (113,68U).

Par ailleurs, les rendements maximaux en  $\alpha$ -amylase pour le pH=7 sont constatés successivement chez les souches : *Fusariumsp.* (247,12 U), *Aspergillus niger* (169,36U) et *Cladosporium sp* (163,64 U),

## Références bibliographiques

- ✓ **Ait Kaki- El-Hadef El-Okki H., Leghlimi<sup>2</sup> S., Dakhmouche L., Bennamoun., Z Meraihi., (2012).** utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'  $\alpha$  - amylase par *rhizopus oryzae*. Rev. Microbiol. Ind.
- ✓ **Belhoucine , L(2013).** Les champignons associés au *Platypus cylindrus* Fab. (Coleoptera, Curculionidae, Platypodinae) dans un jeune peuplement de chêne-liège de la forêt de M'Sila (Oran, nord-ouest d'Algérie) : Etude particulière de la biologie et l'épidémiologie de l'insecte. Sciences d 'Agriculture et des Forêts. Tlemcen Abou Bakr Belkaid,149-154.
- ✓ **Benaouida ,K(2012).** étude de l'alpha amylase de levure isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse magister. Biotechnologie microbiennes. Constantine. UM. 104p.
- ✓ **Bennamoun L., Meraihi Z., Dakhmouche S(2004).** Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l'a-amylase par *Aspergillus oryzae Ahlburg* (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. Journal of Food Engineering 64. 257–264.
- ✓ **Benserradj, O(2014).** Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques. Biotechnologies, Biologie et Environnement. Constantine 1,4-13.
- ✓ **Berretta MF, Lecuona RE, Zandomeni RO, Grau O(1998).** Genotyping isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by RAPD With fluorescent labels. J. Invertebr. Pathol. 71, 145-150.
- ✓ **Bouatenin Koffi Maïzan Jean-Paul., Djéni N'dédé Théodore., Kakou Abodjo Célah(2016).** Optimisation De La Production De L'  $\alpha$ -Amylase Par Les Microorganismes Isolés Des Ferments Traditionnels De Manioc Provenant De Trois Zones De Production De *L'attiéké* En Côte d'Ivoire. European Scientific Journal , vol.12, No.9. 1857- 7431.

## Références bibliographiques

- d'Arabidopsisthaliana .Thèse de doctorat école doctorale biologie santé.  
*decolor*. Fruit, volume 13, n°8,109-128.
- ✓ **Devin, A(2012)** Etablissement de l'implication des  $\alpha$  et  $\beta$  amylases et des  $\alpha$ -glucanes
  - ✓ **Dhouibi M. H et Jammazi A (1993)** .Lutte biologique contre la pyrale des caroubes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) par *Hebrabracon hebetor* (Hymenoptera, Braconidae) en verger de grenadier. Med. Fac. Landbouv.w .Univ.Gent. pp 427-436.
  - ✓ **Dhouibi, M.H(1982)**. Bio-écologie d'*Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera, Pyralidea). Ed. INRAT. Tunis. Vol 55, p 48.
  - ✓ **Dhouibi, M.H(1989)** ).Essai de traitement avec la Bactospeine *Bacillus thuringiensis* contre la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera, Pyralidae) en palmeraies. Rapport d'expérimentation.
  - ✓ **Djazouli., Alem., Drir., Mostefaoui., et Doumandji.Mitiche (2009)** . Apports des infochimiques (mediateurs chimiques) dans l'évaluation du potentiel biotique de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* dans les palmeraies anthropisées. univ Saad Dahleb, faculté des sciences agrovétérinaires, département d'agronomie, Blida, département de zoologie agricole et forestière, Hassan Badi el Harrach, Alger pp. 270.
  - ✓ **Djebblahi A.H et Serraye N (2010)**. Étude du niveau d'infestation par la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller., 1839 (Lepidoptera, Pyralidae) sur trois variétés de datte (Deglet Nour, Mech Degla et Ghars), sa dynamique de population et essai de lutte intégrée dans la région de Biskra. Mémoire. Ing. Inst. Agro. Biskra, 45 p.
  - ✓ **Doumandji , Mitiche S(1985)** .Les parasites des pyrales des dattes dans quelques oasis algériennes et particulièrement ceux de *E.ceratoniae*. Essai de lâcher de *Trichogramma embryophagum* dans les palmeraies de Ouargla. Ann. Ins. Nat. Agr, El Harrache, Alger, Vol 9, no 2. 14 -37.

## Références bibliographiques

- ✓ **Doumandji, S (1981).** Biologie et écologie de la pyrale des caroubes dans de l'Algérie *Ectomyelois ceratonia* Zeller (Lepidoptera, pyralidae). Thèse de doctorat. Univ. Pierre et Marie Curie. Paris VI,138- 145 .
- ✓ **Doumandji.Mitiche, S(1983).** Contribution à l'étude bio-écologique des parasites et prédateurs de la pyrale des caroubes *Ectomyelois ceratoniae* en Algérie en vue d'une éventuelle lutte biologique contre ce ravageur. Thèse de doctorat. Univ. Paris VI.
- ✓ **Ferhat Hamida S ,Laklouka Naziha(2015).** contribution à l'étude de l'alpha amylase levurienne : optimisation des conditions de production. biochimie appliquée. el-oued echahid lakhdar, 3-8.
- ✓ **Ferron,P.** les champignons entomopathogenes : evolution des recherches au cours des dix dernières années. inra. station de recherches de lutte biologique. la miniere 78000 versailles ,169-174.
- ✓ **Haddou, I(2005) .** Etude comparative entre quinze variétés de dattes et leurs taux d'infestation par *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera- Pyralidae) dans la région de Ouargla. Agronomie Saharienne. ouargla kasdi merbah,20-29.
- ✓ **Hadjeb, A (2017).** étude bioécologique et répartition spatio-temporelle de la pyrale des dattes *ectomyelois ceratoniae zeller.*, 1839 (lepidoptera, pyralidae) dans des oasis de la wilaya de biskra. étude du comportement alimentaire et essai de lutte. Sciences Agronomiques. Biskra Mohamed Khider, p17.
- ✓ **Hadjeb, A(2014).** Influence de la qualité nutritive de trois variétés de dattes sur le potentiel biologique de la Pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839). Agriculture et environnement en régions arides. Biskra Mohamed Khider,4-7.
- ✓ **Idder-Ighili, H(2008).** Interactions entre la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera-Pyralidae) et quelques cultivars de dattes dans les palmeraies de Ouargla (Sud-Est algérien). Agronomie Saharienne. ouargla kasdi merbah,44-46.



## Références bibliographiques

- ✓ **Lakhdari, W(2015)**. Bioécologie de *Brachytrupes megacephalus* Lefèbvre, 1827 (Orthoptera, Gryllidae) et lutte biologique par l'utilisation de champignons entomopathogènes. sciences agronomiques. ouargla kasdi merbah,21-23.
- ✓ **Le Berre, M (1978 )**. Mise au point sur le problème du ver de la datte *Myelois ceratoniae* Zeller. Bull. agr. Sahar., Vol.1, n°1, 1- 35.
- ✓ **Mehaoua, M (2014)**.Abondance saisonnière de la pyrale des dattes (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller., 1839), bioécologie, comportement et essai de lutte. Sciences Agronomiques. Biskra Mohamed Khider,18-20.
- ✓ **Milat-bissaad f, Bounaceur f, Halouane f,Outtar f, Doumandji-mitiche b (2011)**. etude de l'effet de deux champignons entomopathogenes beauveria bassiana et metarhizium anisopliae var acridum sur le comportement alimentaire de schistocerca gregaria. Algerian journal of arid environment, vol. 1, n° 2, 40-51.
- ✓ **Royaume,Uni(13 mai 2014)**. Entomopathogens and biological control,université de warwick. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent, académie chinoise des sciences agronomiques.
- ✓ **Sabbahi,R(2008)**. Utilisation du champignon entomopathogène Beauveria bassiana dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs en fraiseraiies. Québec IN RS-Institut Armand-Frappier ,25. San et Environn. Vol 6, N°1: 1-17.
- ✓ **Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A., 2005b**. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Proc. Biochem., 40 ; 2689–2694. Université des science et technologies de lille.33p.
- ✓ **Wertheimer, M(1958 )**. Un des principaux parasites du palmier dattier : Le *Myelois*
- ✓ **Zouiouèche,F (2012)**. Comportement de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, vis-à-vis de trois variétés de palmier dattier dans la région de Biskra . Ecologie

## *Références bibliographiques*

des Communautés Biologiques. alger ecole nationale superleure agronomique el-harrach ,28-37.

# Annexes

## Annexe 1

### Milieux de culture :

#### -Potato Dextrose Agar (PDA) :

pomme de terre .....	250g
D-Glucose .....	20g
Agar.....	25g



# Annexes



Figure 29: préparation du milieu PDA

## Annexe 2 : Préparation de Tampon phosphate pH 6,5

- Ajouté 3 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans 250 ml de l'eau distillée.
- ajoute 4,7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans 250 ml de l'eau distillée.
- Mélange les deux solution (500ml) dans un bécher et régler le pH à 6,5 (Figure 30).



Figure30 : Préparation de Tampon phosphate

# Annexes

## Annexe 3: Préparation DNSA

Dissoudre 1 g de DNSA dans 20 ml de NaOH (0,1N) à 60°C et ajoute 50 ml de l'eau distillée ,on ajoute 30 g de tartrate double sodium potassium, le volume finale ramené à 100 ml par l'eau distillée. La solution est conservé à loin de la lumière.(Figure 31)



Figure 31: technique de préparation de DNSA

## Annexe 4 : Tween 80, Polysorbate 80, Monooléate de sorbitane polyoxyéthylène

Les polysorbates sont des produits synthétiques fabriqués à partir de sorbitol (E420) dans un processus en trois étapes. De l'eau est d'abord retirée du sorbitol pour former un sorbitane, qui est ensuite partiellement estérifié avec un acide gras naturel tel que l'acide laurique (en ce qui concerne E432), oléique (ecqc. E433), palmitique (ecqc. E434) ou stéarique (ecqc. E435, E436). acides gras E570. Enfin, de l'oxyde d'éthylène est ajouté en présence d'un catalyseur pour donner du polysorbate .

## Annexe 5 : La Cellule De Malassez

Cette cellule permet le comptage de différents types de cellules animales ou végétales La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont :

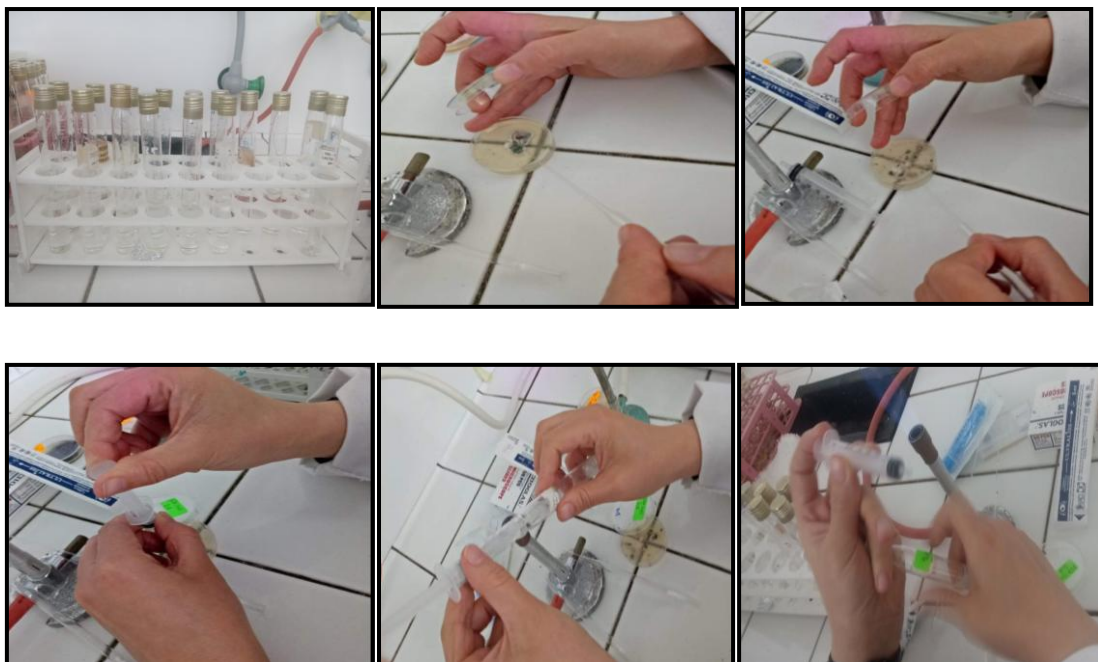
- Longueur = 0,25 mm
- Largeur = 0,20 mm

# Annexes

- Profondeur = 0,20 mm

Le volume total de la cellule est de  $1 \text{ mm}^3$  ( $2,5 \times 2 \times 0,20$ ). Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales de 0,25 mm de large et de 10 bandes horizontales de 0,20 mm de large formant ainsi 100 rectangles, on ne comptera les cellules que dans 10 des 25 rectangles non contigus pris au hasard dans la cellule. On totalise le nombre de cellules présentes dans chaque rectangle, arbitrairement, il est convenu de ne tenir compte que des cellules positionnées sur les côtés droits et inférieurs. On fait ensuite la somme des cellules observées dans chaque rectangle, on divise ce nombre par 10 (nombre de rectangles comptés), on obtient ainsi le nombre de cellules par rectangle, il suffit de multiplier le nombre obtenu par 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaires par  $\text{mm}^3$ .

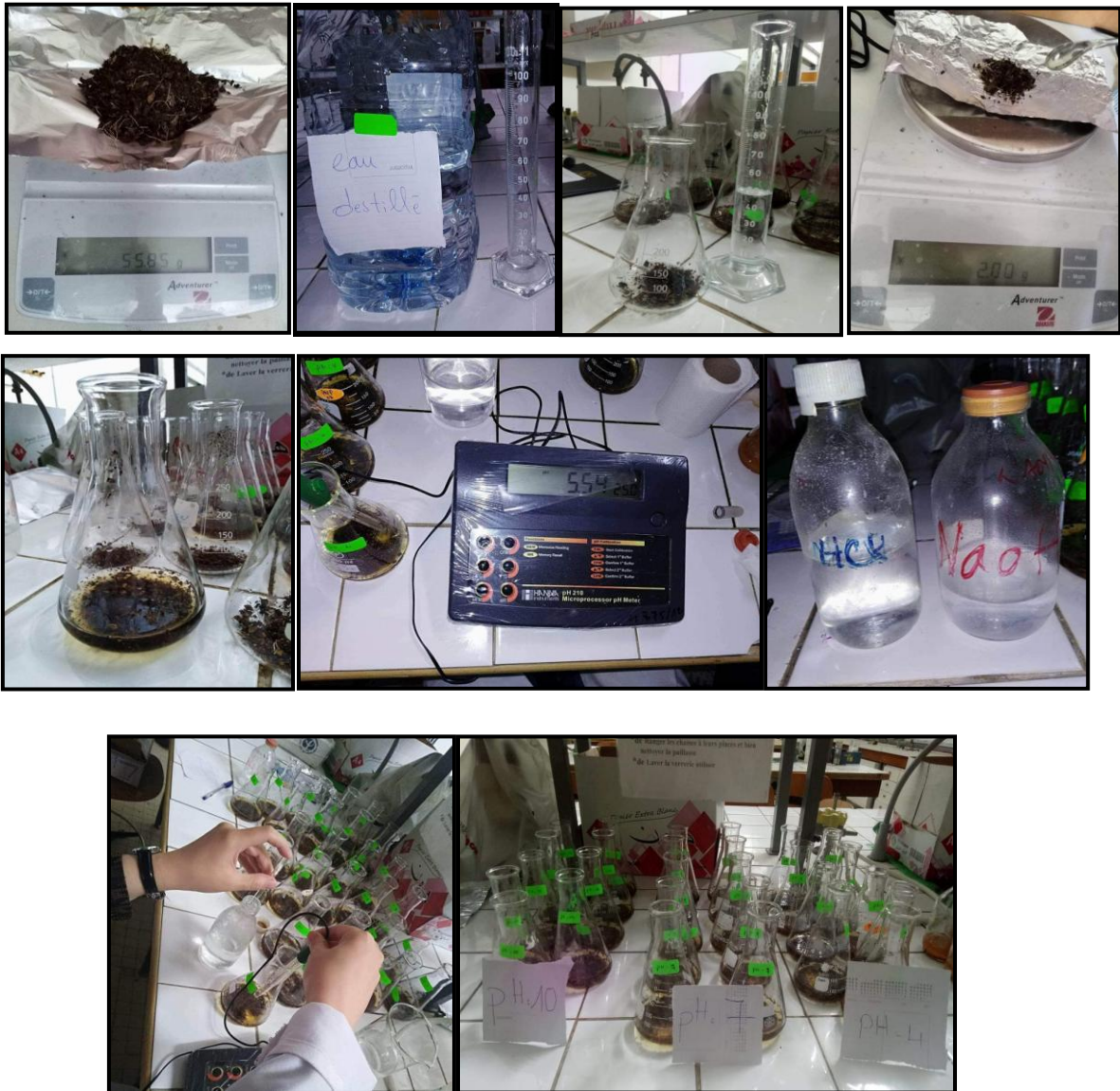
**Annexe 6:** technique de préparation de la suspension sporale des champignons



**Figure 35 :** technique de préparation de la suspension sporale des champignons

# Annexes

## Annexe 7 : Technique du préparation du milieu de fermentation à base de déchets de bananes



**Figure 36:** préparation du milieu de fermentation

à base de déchets de bananes

# Annexes

## Annexe 8 : technique du filtration de la biomasse



Figure 37 : technique du filtration de la biomasse

## Annexe 9: Technique de Préparation la solution mère du glucose

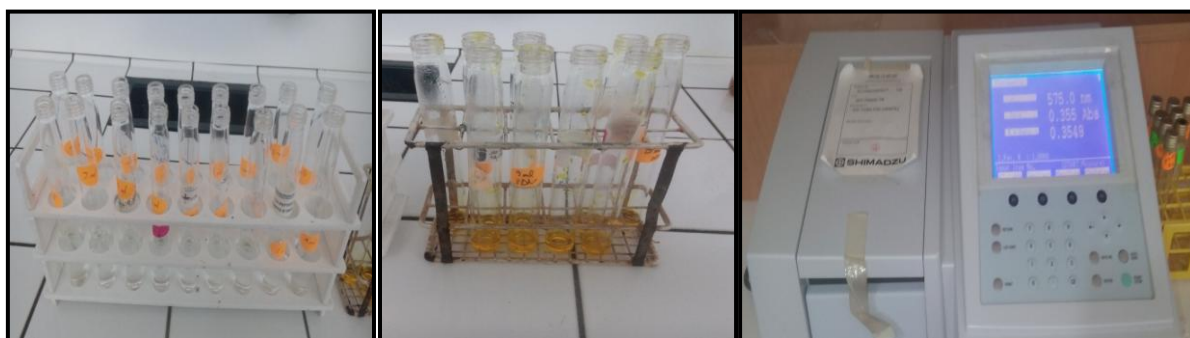


Figure 38 : Technique de Préparation la solution mère du glucose



# Annexes

## Annexe 10 : la courbe d'étalonnage

Tableau 7 : la concentration de la Glucose et leur absorbance

[G]	DO
1	0,164
0,5	0,163
0,33	0,163
0,25	0,161
0,2	0,161
0,16	0,152
0,14	0,152
0,12	0,150
0,11	0,150

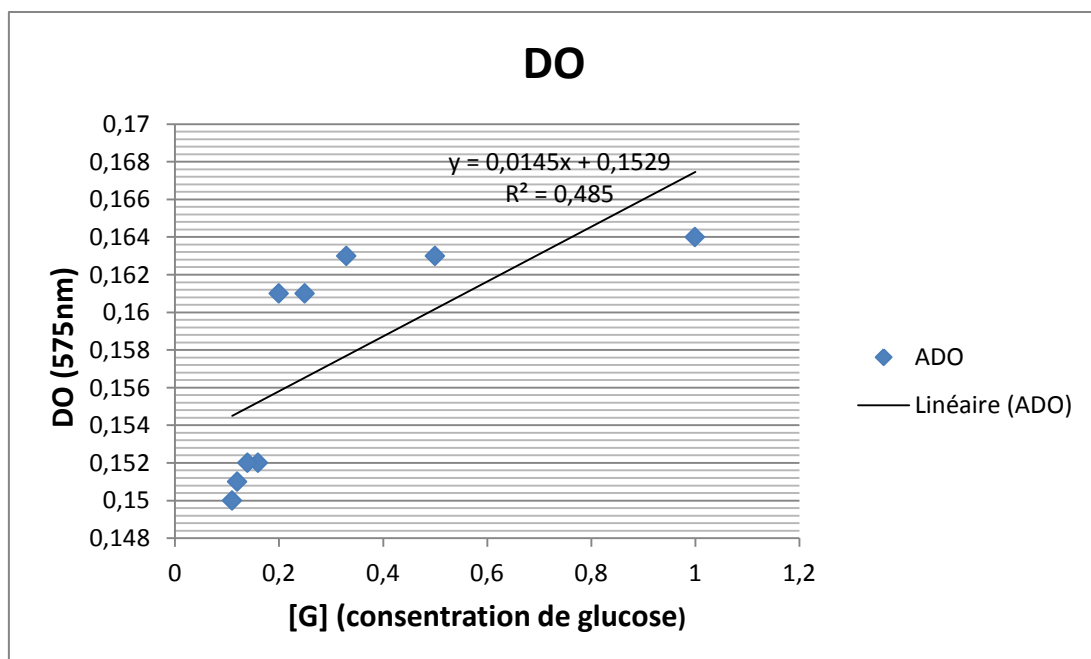
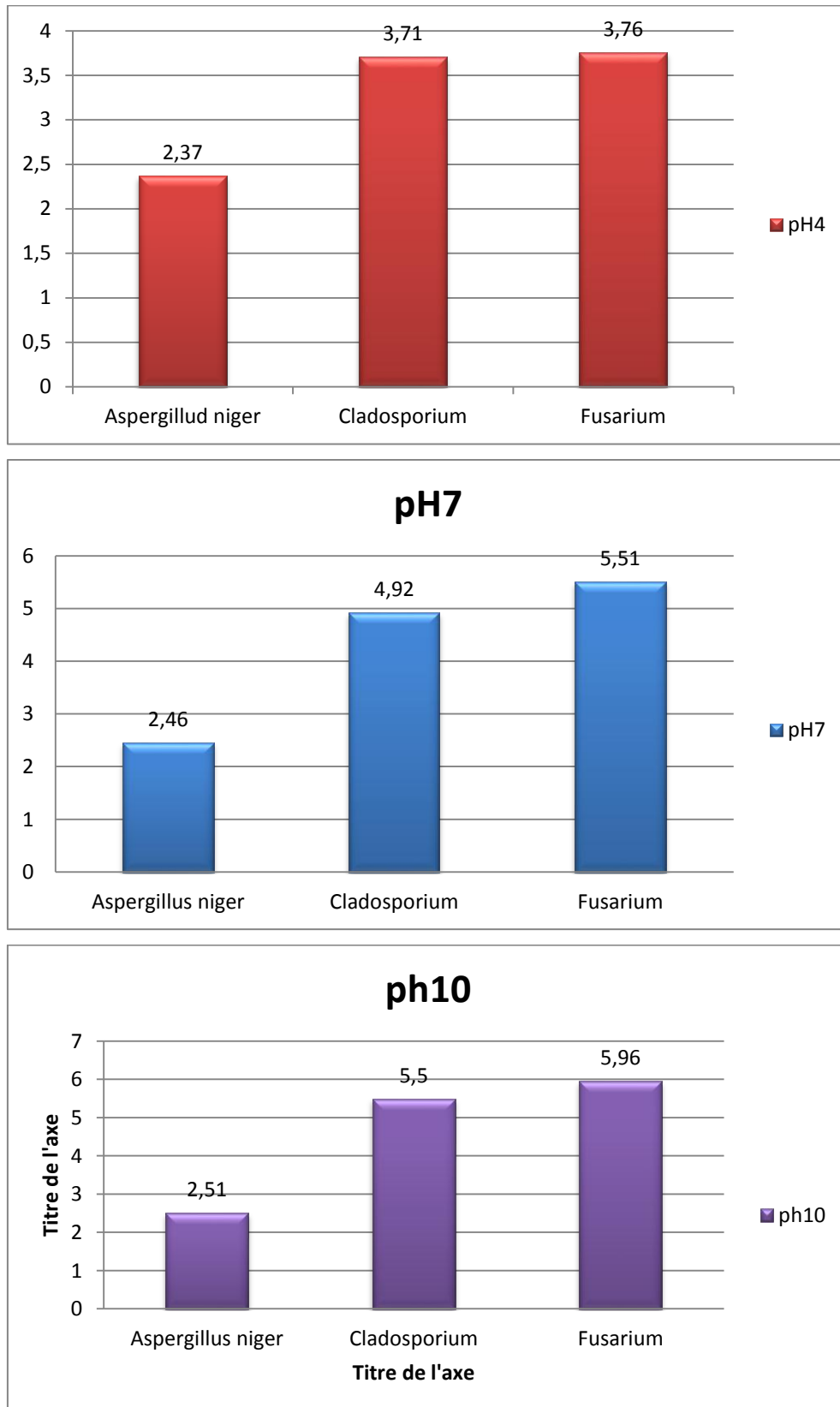


Figure 39: la courbe d'étalonnage

Annexe 11 : Evolution du pH 4, 7 et 10 des souches: *Aspergillus* (S1), *Fusarium* (S4), *Cladosporium* (S17)

# Annexes



**Figure 40:** Evolution du pH 4, 7 et 10 des souches: *Aspergillus* (S1), *Fusarium* (S4), *Cladosporium* (S17)

## **Resumé**

L' $\alpha$ -amylase est l'une des plus importantes hydrolases actives sur l'amidon dont les domaines d'application s'élargissent de plus en plus. La production de cette enzyme a été réussie par certaines bactéries, levure et certains genres de moisissures. L'isolement des souches fongiques, à partir des *Ectomyelois ceratoniae*, a permis de répertorier 14 isolats représentant 3 genres : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*. Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 50% regroupant 7 espèces : *Aspergillus sp<sub>1</sub>*, *Aspergillus sp<sub>2</sub>*, *Aspergillus sp<sub>3</sub>*, *Aspergillus sp<sub>4</sub>*, *Aspergillus sp<sub>5</sub>*, *Aspergillus sp<sub>6</sub>* et *Aspergillus sp<sub>7</sub>*, suivie par le genre *Fusarium* avec un pourcentage de 28,57 % (*Fusarium sp<sub>1</sub>*, *Fusarium sp<sub>2</sub>*, *Fusarium sp<sub>3</sub>*, *fusarium sp<sub>4</sub>*), et enfin le genre *Cladosporium* avec un pourcentage de 21,43% regroupant 3 espèces : *Cladosporium sp<sub>1</sub>*, *Cladosporium sp<sub>2</sub>*, *Cladosporium sp<sub>3</sub>*

L'effet de pH sur cette production a été étudié par réalisation des fermentations en erlenmeyers de 250 ml, contient chacun une quantité de déchets de bananes. Les milieux ont été ajusté à différent pH ( 4, 7 et 10), ces cultures ont été incubées pendant trois jours à 28°C. L'analyse des résultats sa révélé que les meilleures activités amyliques a obtenue par la souche *Fusarium sp* (284,64 U) à pH=10.

Mots clés :,  $\alpha$ -amylase, *Ectomyelois ceratoniae*, champignons entomopathogène

## ***Abstract***

A-Amylase is one of the most important active hydrolases on starch whose application fields are widening more and more. The production of this enzyme has been successful by some bacteria, yeast and certain kinds of mold. Isolation of fungal strains from *Ectomyeloides ceratoniae* identified 14 isolates representing 3 genera: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*. The majority genus is *Aspergillus* with a frequency of 50% comprising 7 species: *Aspergillus* sp1, *Aspergillus* sp2, *Aspergillus* sp 3, *Aspergillus* sp4, *Aspergillus* sp 5, *Aspergillus* sp 6 and *Aspergillus* sp 7, followed by the genus *Fusarium* with a percentage of 28 , 57% (*Fusarium* sp1, *Fusarium* sp2, *Fusarium* sp3, *Fusarium* sp4), and finally the genus *Cladosporium* with a percentage of 21.43% comprising 3 species: *Cladosporium* sp1, *Cladosporium* sp2, *Cladosporium* sp3

The pH effect on this production was studied by carrying out fermentations in 250 ml Erlenmeyer flasks, each containing a quantity of banana waste. The media were adjusted to different pH (4, 7 and 10), these cultures were incubated for three days at 28 ° C. The analysis of the results revealed that the best amylase activity was obtained by the strain *Fusarium* sp. (284.64 U) at pH = 10

**Keywords** : *Ectomyeloides ceratoniae* , *Aspergillus niger*, *Fusarium*, *Cladosporium* ,alpha-amylase .

## ملخص

يركز هذا العمل على عزل السلالات الفطرية من دودة التمر و إختبار أكثر العزلات فعالية لإنتاج ألفا أميلاز التي تنمو على فضلات قشور الموز

:قد أبرزت النتائج العزلة و التنقية و تحديد الهوية وجود 14 سلالة فطرية متمثلة في 3 أجناس

***Aspergillus niger, Fusarium, Cladosporium.***

بعد زراعة السلالات الفطرية الثلاثة في وسط غني بالنفايات قشور الموز , أظهرت النتائج ان إنتاج الإنزيمات بواسطة **Fusarium** أظهر أن هذه السلالة قادرة على إنتاج كميات كبيرة من ألفا أميلاز و التي تصل إلى 284,64 وحدة دولية

, ألفا أميلاز

كلمات البحث: سلالة فطرية

# Production de l'enzyme alpha amylase par des champignons entomopathogènes cultivées sur milieu à base de déchets de bananes

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en **Mycologie et Biotechnologie fongique**

L' $\alpha$ -amylase est l'une des plus importantes hydrolases actives sur l'amidon dont les domaines d'application s'élargissent de plus en plus. La production de cette enzyme a été réussie par certaines bactéries, levure et certains genres de moisissures. L'isolement des souches fongiques, à partir des *Ectomyeloides ceratoniae*, a permis de répertorier 14 isolats représentant 3 genres : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*. Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 50% regroupant 7 espèces : *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2*, *Aspergillus sp3*, *Aspergillus sp4*, *Aspergillus sp5*, *Aspergillus sp6* et *Aspergillus sp7*, suivie par le genre *Fusarium* avec un pourcentage de 28,57 % (*Fusarium sp1*, *Fusarium sp2*, *Fusarium sp3*, *Fusarium sp4*), et enfin le genre *Cladosporium* avec un pourcentage de 21,43% regroupant 3 espèces : *Cladosporium sp1*, *Cladosporium sp2*, *Cladosporium sp3*. L'effet de pH sur cette production a été étudié par réalisation des fermentations en erlenmeyers de 250 ml, contenant chacun une quantité de déchets de bananes. Les milieux ont été ajustés à différents pH (4, 7 et 10), ces cultures ont été incubées pendant trois jours à 28°C. L'analyse des résultats a révélé que les meilleures activités amylasiques ont été obtenues par la souche *Fusarium sp.* (284,64 U) à pH=10.

**Mots clés :** *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Ectomyeloides ceratoniae*, pH

**Laboratoire de recherche :** Microbiologie (RDC)

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr. ALMI .H

Encadreur : Mme ABDALAZIZ O.

Examineur : Mme BENMASIKH A.

M.C.B Université des Frères Mentouri Constantine

M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine.

M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine.

**Date de soutenance :** 27/06/2018