



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 :الميكروبيولوجيا.

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

---

## Production de l'enzyme alpha amylase par des champignons entomopathogènes cultivés sur milieu à base de déchets de carottes.

---

Présenté et soutenu par :*GRIMES Imene*

Le : 27/06/2018

*MOKADDEM Ikram*

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme ALMI H

(M.C.B - UFM Constantine).

Rapporteur : Mme ABDALAZIZ O

(M.A.A - UFM Constantine).

Examineur : Mme BENMASIKH A

(M.A.A - UFM Constantine).

*Année universitaire*  
*2017 - 2018*



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 :الميكروبيولوجيا.

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

---

## Production de l'enzyme alpha amylase par des champignons entomopathogènes cultivés sur milieu à base de déchets de carottes.

---

Présenté et soutenu par :*GRIMES Imene*

Le : 27/06/2018

*MOKADDEM Ikram*

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme ALMI H

(M.C.B - UFM Constantine).

Rapporteur : Mme ABDALAZIZ O

(M.A.A - UFM Constantine).

Examineur : Mme BENMASIKH A

(M.A.A - UFM Constantine).

*Année universitaire*  
*2017 - 2018*

## **Remerciements**

Nous tenons à remercier en premier lieu DIEU, le tout Puissant de nous avoir donné courage, santé et patience pour achever ce travail.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur **Melle ABDELAZIZ .O, M.A.A**, qui a bien voulu, par son aimable bienveillance, diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses orientations, sa compétence, sa gentillesse et ses intérêts portés pour ce sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce travail.

Son encadrement était le plus exemplaire.

. Nos remerciements vont aussi à **Melle ALMI .M.C.B**, d'avoir eu l'aimabilité d'accepter volontairement et aimablement de présider ce Jury.

Nous tenons à remercier également **Melle BENMASIKh .A .M.A.A**, d'avoir acceptée, d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.

Notre reconnaissance et nos grand respect s'adressent à la source de bonheur «nos parents» qui nous soutenue avec patience et prouvé leur confiance.

Nous leur exprime notre éternelle gratitude.

Nous nous permettons d'adresser nos remerciements à nos familles, qui ont contribués Beaucoup d'une manière ou d'une autre, durant toute la période de ce travail.

À tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, auxquels

Nous disons tout simplement merci.

## Table de matière

<b>INTRODUCION.....</b>	<b>1</b>
<b>Revue bibliographique</b>	
1. Les dattes.....	3
1. 1.Généralités.....	3
1.2. Production de dattes.....	3
1.2.1. Dans le monde .....	3
1.2 .2. En Algérie.....	4
1.3. Description.....	5
1.4. Les variétés de dattes .....	5
1.4.1. Deglet-Nour .....	5
1.4.2. Les variétés de datte communes.....	6
1.4.3. Les variétés secondaires .....	6
1.5. Composition biochimique de la datte.....	7
1.5.1. Constituants majeurs de la pulpe .....	7
1.5.1.1. L'eau.....	7
1.5.1.2. Les sucre .....	7
1.5.1.3. Les fibres.....	7
1.5.1.4. Les composés phénoliques.....	7
1.5.2. Constituants mineurs de la pulpe .....	8
1.5.2.1. Protéines.....	8
1.5.2.2. Les lipides .....	8
1.5.2.3. Les éléments minéraux.....	8
1.6. Les dégâts .....	8
1.6.1. Le principal ravageur.....	8
1.6.1.1 . <i>Parlatoria blanchardi</i> .....	8
1.6.1.2. <i>Virachola livia</i> .....	9
1.6.1.3. <i>Oligonychus afrasiaticus</i> .....	9
1.6.1.4. <i>Ectomyelois ceratoniae</i> .....	10
2. <i>L'Ectomyelois ceratoniae</i> Zeller .....	10
2.1. Definition .....	10
2.2. Distribution .....	11
2.3. Position systématique .....	11
2.4. Cycle biologique .....	12

2.5. Dégât .....	13
2.6. Les moyens de lutte.....	14
2.6.1. Lutte génétique (Autocide) .....	14
2.6.2. Lutte microbiologique .....	14
3. Les champignons entomopathogènes.....	14
3.1. Généralité .....	15
3.2. Types des champignons .....	15
3.2.1. Les champignons imparfaits .....	15
3.2.2. Les champignons inférieurs ou Entomophthorales .....	16
3.3. Mode d'action .....	16
3.3.1. Phase d'adition .....	16
3.3.2. Phase de germination .....	17
3.3.3. La phase de pénétration.....	17
3.3.4. Phase de dissémination .....	18
4 .Alpha amylase .....	19
4.1. Définition .....	19
4.2. Structure de l'alpha amylase .....	20
4. 3. Nomenclature de l'α-amylase.....	20
4.4. Mode d'action .....	21
4.5. Les différentes sources et origines de l'alpha-amylase .....	21
4.5.1. L'origine végétale .....	21
4.5.2. L'origine microbienne .....	22
4.5.2. 1. L'amylase fongique .....	22
4.5.2.2. L'amylase bactérienne.....	22
4.6. Applications industrielles et biotechnologiques des amylases .....	23
4.6.1. En bioconversion de l'amidon .....	23
4.6.2. En boulangerie .....	23
4.6.3. En panification et biscuiterie .....	24
4.6.4. En sucrerie .....	24
4.6.5. En industrie des détergents .....	24
4.6.6. Domaine médical et pharmaceutique .....	24
4.6.7. Production d'alcool et du biocarburant.....	24
5.Composition de déchets de carotte.....	25

## **Etude expérimentale**

### **Matériels et méthodes**

1. Isolement des champignons entomopathogènes .....	26
1.1. Les larves <i>Ectomyelois ceratoniae</i> (zeller) .....	26
1.2. Isolement des champignons entomopathogènes .....	26
1.3. Purification .....	27
1.4. Méthodes d'identification.....	27
2. Production et extraction de l'enzyme $\alpha$ -amylase .....	27
2.1. Préparation de l'inoculum .....	28
2.2. Préparation du milieu de fermentation .....	28
2.3. Fermentation sur milieu liquide à base de déchets de carotte .....	28
2.4. Techniques analytiques .....	29
2.4.1. Mesure du pH .....	29
2.4.2. Dosage des activités enzymatiques .....	29

### **Résultats et discussions**

1. Isolement, purification et identification des champignons entomopathogènes.....	31
2. Activité amylasique des souches fongiques .....	35
2.1. Potentiel d'Hydrogène (pH) .....	35
2.2. Résultats de fermentation.....	36
<b>Conclusion .....</b>	<b>39</b>

### **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

## Liste des abreviations

**PDA** : *Potato Dextrose Agar*

**Sp** : *Specie*

**U** : unité

**DNSA** : l'acide 3,5-dinitrosalicylique

**DO** : Densité optique

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Production de dattes par pays, en 2004 (Noui, 2007) .....	4
<b>Tableau 2 :</b> Production des dattes en Algérie de la campagne agricole (2000/2001), en quintaux .....	4
<b>Tableau 3 :</b> Classification des dattes selon leur consistance (Espirad, 2002).....	6
<b>Tableau 4 :</b> Les différentes origines de l' L'alpha -amylase microbienne.....	25
<b>Tableau 5 :</b> Aspect macroscopique et microscopique des souches fongiques .....	33
<b>Tableau 6 :</b> Résultats du pH pour les souches fermentées à différentes températures.....	40



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Palmier dattier (Buelguedj 2001).....	3
<b>Figure 2</b> : Coupe longitudinale d'une datte .....	5
<b>Figure 3</b> : Dégât de <i>Parlatoria blanchardi</i> sur la datte .....	8
<b>Figure 4</b> : Dégâts de <i>Virachola livia</i> sur la datte .....	9
<b>Figure 5</b> : Dégâts d' <i>Oligonychus afrasiaticus</i> sur la datte .....	9
<b>Figure 6</b> : Dégâts d' <i>Ectomyelois ceratoniae</i> sur la datte.....	10
<b>Figure 7</b> : Pyrales de dattes ( <i>L'Ectomyelois ceratoniae</i> ). .....	11
<b>Figure 8</b> : Étapes de développement des pyrales des dattes durant le cycle biologiques . .....	13
<b>Figure 9</b> : Dégâts d' <i>Ectomyelois ceratoniae</i> sur la datte .....	14
<b>Figure 10</b> : Schéma du cycle biologique de <i>Beauveria bassiana</i> .....	18
<b>Figure 11</b> : Pénétration au travers de la cuticule de l'insecte.....	20
<b>Figure 12</b> : Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -amylase fongique.....	23
<b>Figure 13</b> : Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose .....	26
<b>Figure 14</b> : Composition de déchets de carotte.....	29
<b>Figure 15</b> : larves récoltées.....	29
<b>Figure 16</b> : les étapes de purification des souches fongique .....	31
<b>Figure 17</b> : Milieu de fermentation à base de déchets de carotte.....	32
<b>Figure 18</b> : Fermentation sur milieu liquide .....	33
<b>Figure 19</b> : Mesure du pH avec un pH mètre .....	33
<b>Figure 20</b> : Fréquence d'apparition des genres sur milieu PDA .....	35
<b>Figure 21</b> : Activité amyliasique pour les souches fermentées sous les 3 températures, a : 15°C ;b : 30°C ;c : 45°C .....	42



En Algérie, la culture du palmier dattier constitue sans aucun doute une spéculation importante sur le plan socio-économique dans l'agriculture saharienne. Elle représente la principale ressource de vie des populations de ces régions et le pivot du système oasien (Idder, 2011).

On assiste ces dernières années à une diminution sensible de la récolte, voir même la disparition de l'arbre, conséquence de l'apparition et du développement de diverses contraintes biotiques et abiotiques (Idder, 1984) matérialisée par plusieurs facteurs parmi lesquels le climat, le sol, l'âge des palmiers, la qualité de l'eau, la fertilisation, l'irrigation, le drainage, les maladies, les ravageurs, les opérations de conduite culturale et l'entretien (Brun, 1998).

Parmi les bio-agresseurs de *Phoenix dactylifera* (Linne, 1753), il est utile de citer le bouferoua *Oligonychusafrasiaticus* (Mc Gregor, 1939), la pyrale des dattes *Ectomyeloisceratoniae* Zeller, le bostryche *Apatemonachus* et la cochenille blanche du palmier-dattier Parlatoriablanchardi (Targioni- Tozetti, 1892 ; Delassus et al, 1930; Idder, 2006; Idder-ighili et al, 2013).

En cas d'attaques de ces bio-agresseurs, les pertes enregistrées sont importantes. Ces pertes sont essentiellement dues aux attaques d'insectes qui s'introduisent dans le fruit empêchant ainsi sa conservation et sa consommation (Azelmat, 2005). Car il réduit la quantité de la production et altère la qualité des récoltes dont le plus important est la pyrale des dattes (*Ectomyeloisceratoniae* Zeller).

Comme on le sait, la lutte contre les Insectes nuisibles revêt actuellement des aspects très variés, et la méthode biologique, qui comporte l'utilisation des insectes prédateurs ainsi que l'emploi des germes pathogènes, prend une ampleur de plus en plus considérable. L'utilisation des Champignons dits entomopathogènes qui détruisent les Insectes nuisibles, et qui pouvant se rencontrer à l'état libre (dans le sol, les matières végétales en décomposition, etc), manifestent une prédilection pour le corps des divers Insectes. Et la production des enzymes parmi les modes d'action contre les insectes.

Les enzymes appartenant à la famille des hydrolases telles que, les  $\alpha$ -amylases sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Little, 2004).

Toutefois, 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 vue composition en éléments nutritifs nécessaires au développement des microorganismes et la production d' $\alpha$ -amylase, d'autre part.

En effet, nous avons procédé à un Protocole expérimental qui avait pour objectif d'isoler et d'identifier ces champignons. Et cela pour :

- l'isolement, la purification et l'identification des champignons à partir d'*Ectomyeloscera toniae* Zeller).

- Production d'alpha amylase par fermentation en milieu liquide par ces souches, en utilisant les déchets de carotte comme substrat de base à différentes températures (15°C, 30°C et 45°C).

## 1. 1.Généralités

*Phoenix dactylifera* L, provient du mot «phoenix» qui signifie dattier chez les phéniciens, et *dactylifera* dérive du terme grec «dactulos» signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit (Djerbi, 1994). C'est une espèce dioïque, monocotylédone arborescente, appartenant à une grande famille d'arbre à palmes produisant des dattes (Figure 1) (Gilles, 2000 ; Mazoyer, 2002 ; Zohary et al,2012)

Le genre *phoenix* comporte au moins douze espèces, la plus connue est l'espèce *Phoenix dactylifera*, dont les fruits « dattes » font l'objet d'un commerce international important (Espirad, 2002).

L'Algérie est un pays phoenicicole classé au sixième rang mondial et au premier rang dans le Maghreb pour ses grandes étendues de culture avec 160000ha et plus de 2 millions de jardins et sa production annuelle moyenne de dattes de 500000 tonnes.



**Figure 1:** Palmier dattier (Buelguedj 2001).

## 1.2. Production de dattes

### 1.2.1. Dans le monde

Les principaux pays producteurs de dattes sont : Égypte, L'Irak, l'Iran, Arabie-Saoudite, Emirats Arabes Unis, Pakistan, Algérie, Soudan. (Tableau).la production mondiale de dattes réalisée en 2004 est de 6,7 millions de tonnes (Noui, 2007) (Tableau 1)

**Tableau 1 :** Production de dattes par pays, en 2004 (Noui, 2007)

<i>Pays</i>	<i>Production, en quintaux</i>
<b>Égypte</b>	<b>1100000</b>
<b>Irak</b>	<b>910000</b>
<b>Iran</b>	<b>880000</b>
<b>Arabie-Saoudite</b>	<b>830000</b>
<b>Emirats Arabes Unis</b>	<b>760000</b>
<b>Pakistan</b>	<b>650000</b>
<b>Algérie</b>	<b>450000</b>
<b>Soudan</b>	<b>330000</b>

Du point de vue quantitatif, la production algérienne représente 7% de la production mondiale, mais du point de vue qualitatif, elle occupe le premier rang grâce à la variété Déglet-Nour, la plus appréciée mondialement.

### 1.2 .2. En Algérie

La production réalisée dans la campagne agricole (2000/2001) est de 4,18 millions de quintaux (Anonyme ,2002) (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Production des dattes en Algérie de la campagne agricole (2000/2001), en quintaux (Anonyme, 2002).

<i>Wilayas</i>	<i>Déglet--Nour</i>	<i>Ghars et Analogues (Dattes molles)</i>	<i>Dagla_Beida et Analogues (dattes sèches)</i>	<i>Total</i>
<i>El-Oued</i>	<i>895450</i>	<i>234920</i>	<i>105820</i>	<i>1236190</i>
<i>Naama</i>	<i>0</i>	<i>1690</i>	<i>190</i>	<i>1880</i>
<i>Biskra</i>	<i>769620</i>	<i>134760</i>	<i>292280</i>	<i>1196660</i>
<i>Ghardaia</i>	<i>106000</i>	<i>38600</i>	<i>131400</i>	<i>276000</i>

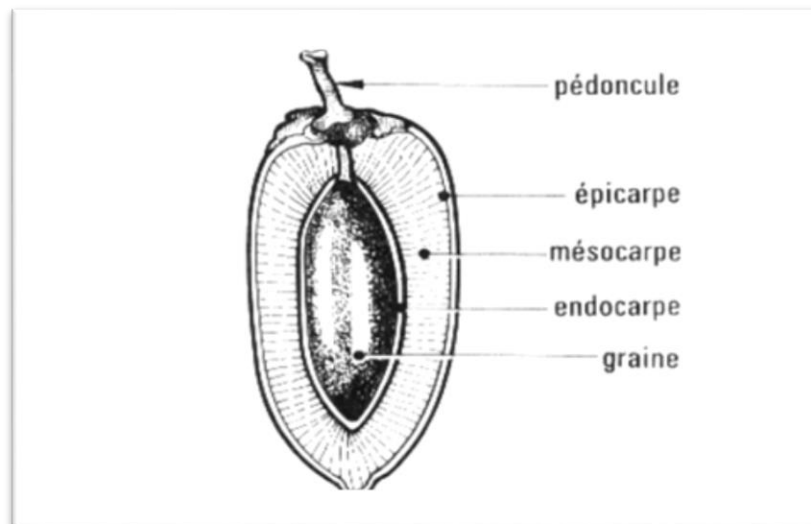
On Algérie près de 58,14% de la production nationale de dattes est réalisée par les deux wilayas, El-Oued (29,54%) et Biskra (28,6%). La variété Deglet –Nour, occupe la première place et représente 52,87% de la production totale des dattes.

### 1.3. Description

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie généralement de forme allongée, contenant une seule graine dite noyau. La partie comestible (dite chair ou pulpe) est constituée d'un :

- Péricarpe ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau;
- Mésocarpe généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucres ;
- Endocarpe de teinte plus claire et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau.

Les dimensions de la datte sont très variables, allant de 1.5 à 7 ou 8cm de longueur et leur poids varie entre 2 et 20 g selon les variétés. La couleur des dattes va du blanc jaunâtre au sombre très foncé, presque noir, en passant par, rouges vers bruns (Figure 2) (Espiard, 2002).



**Figure 2:** Coupe longitudinale d'une datte (Richarde, 1972)

### 1.4. Les variétés de dattes

En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de datte (Hannachi et al.1998). Les principales variétés cultivées sont :

#### 1.4.1. Deglet-Nour

Variété de premier choix, elle représente 47% de la production nationale. C'est une datte demie -molle, considérée comme étant la plus appréciée sur les marchés national et international en raison de son aspect, de son onctuosité et de sa saveur.

#### 1.4.2. Les variétés de datte communes

Les structures variétales de la palmeraie algérienne fait apparaître que les variétés communes de faible valeur marchande sont particulièrement concentrées dans les zones Sud-ouest du pays (Messar, 1996).cette catégorie de dattes comprend les dattes sèches et les dattes molles.

La production de ce type de dattes est estimé à 53% elle comprend trois variétés: Ghars, Degla-Beida et Mech-Degla (Buelguedj, 2001).

#### 1.4.3. Les variétés secondaires

Il en existe plus de 150 sortes, les plus rependues sont : Hamra, Tinnaceur, Tegaza, Tezerzait, et Takerouchet. Cette dernière présente un intérêt particulier pour sa résistance au Bayoudah (Boughnou, 1980).

Selon leur consistance, les dattes sont réparties en trois catégories : molle, demi -molle, et sèche (Tableau 3):

**Tableau 03 :** Classification des dattes selon leur consistance (Espirad, 2002).

Consistance	Caractéristique	Variétés et pays
Molle	Taux d'humidité supérieur ou égal à 30% elles sont riches en sucres invertis (fructose et glucose).	Ghars(Algerie), Ahmar(Mauritanie), Kashram et Miskrani (Egypte, Arabie-Saoudite
Demi-molle	De 20 à30% d'humidité	Deglet-Nour (Algérie), Mehjoul(Mauritanie), et Sifri et Zahidi (Arabie-Saoudite).
Sèche	Moins de 20% d'humidité, elles sont riches en saccharose.	Degla Beida et MechDegla (Tunisie et Algérie) et Amesrie (Mauritanie).



## **1.5. Composition biochimique de la datte**

### **1.5.1. Constituants majeurs de la pulpe**

#### **1.5.1.1. L'eau**

Elle est comprise entre 8 et 30% du poids de la chair fraîche avec une moyenne de l'ordre de 19% (Matallah, 1970).

#### **1.5.1.2. Les sucres**

sont les constituants prédominants de la datte .l'analyse des sucres de la datte a révélé la présence de trois types de sucres essentiels : le saccharose , le glucose et le fructose (Matallah,1970;Estanove,1990;Acourene et Tama,1997).Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que :le galactose , le xylose et le sorbitol (Favier et *al* ,1993;Boudrar et *al* ,1997).

La teneur en sucres totaux est très variable, elle se situe entre 60 et 80 % du poids d la pulpe fraîche (Siboukeur, 1997). De plus Acourene et Tama (1997) ont montré une fluctuation de la teneur en saccharose de quelques variétés de dattes Algériennes entre 0.8 et 52.4% et celle des sucres réducteurs entre 20 et 94% (matière sèche) .cette variation dépend de la variété et du climat.

#### **1.5.1.3. Les fibres**

Les constituants pariétaux de la datte sont: la pectine, la cellulose, l'hémiellulose et la lignine (Benchabane, 1996). Une portion de 25g de dattes (3fruits) fournit 2g de fibres.

La datte riche en fibres, elle en apporte 8 à 12.7% du poids sec (Al-Shahib et Marshall, 2003).

#### **1.5.1.4. Les composés phénoliques**

L'analyse qualitative des composés phénoliques de la datte a révélé la présence des acides cinnamiques, des flavons, des flavanones et des flavonols (Mansouriet al ,2005). Ces premiers contribuent à certaines propriétés organoleptiques majeures comme la couleur et l'arome : aussi, ils jouent un rôle déterminant sur le plan gustatif et tout particulièrement sur les sensations d'astringence et d'amertume et aussi les propriétés antibactériennes et antivirales (Cheynier et Sarni-Manchado ,2006).

## 1.5.2. Constituants mineurs de la pulpe

### 1.5.2.1. Protéines

Les dattes sont caractérisée par une faible teneur en protéines .elle varie entre 0.38 et 2.5% du poids sec (Yahiaoui, 1998;Kendri ,1999).

### 1.5.2.2. Les lipides

La datte renferme une faible quantité de lipides dont le taux varie entre 0.43 et 1.9% du poids frais (Matallah, 1970).

### 1.5.2.3. Les éléments minéraux

La datte est l'un des fruits les plus riches en éléments minéraux essentiellement le potassium, le magnésium, le phosphore et le calcium.

## 1.6. Les dégâts

Les dattes abimées par des insectes ou acariens doivent être éliminées avant le conditionnement.

### 1.6.1. Les principaux ravageurs

#### 1.6.1.1 .*Parlatoriablanchardi*

La présence des encroutements ovales ou allongées de couleur blanchâtre sur les palmes. Les dattes infestées ne se développent plus et se dessèchent sans atteindre leur complète maturité (Figure 3).

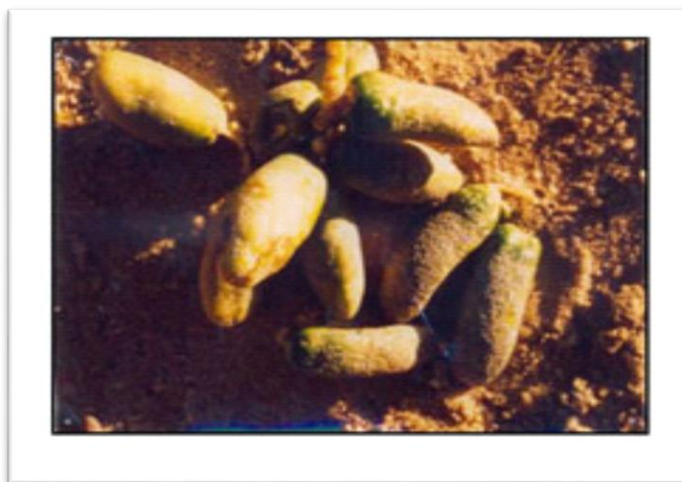


Figure 3 : Dégât de *Parlatoriablanchardi* sur la datte (<http://www.ctd.tn>).

### 1.6.1.2. *Viracholalivia*

A l'intérieur des dattes attaquées (aux stades blah et les fruits mal noués), on trouve des grumeaux d'excréments des larves, Présence des galeries au niveau des fruits infestés

Et des trous d'entrée des larves sur les fruits infestés (Figure 4).



Figure 4 : Dégâts de *Viracholalivia* sur la datte (<http://www.ctd.tn>).

### 1.6.1.3. *Oligonychusafrasiaticus*

Les dattes infestées s'entourent d'une toile de filament soyeux qui retient les grains de sable soulevés par le vent

Les dattes infestées ne complètent pas leur maturation et se durcissent avec la Chute précoce des fruits (Figure 5).



Figure 5 : Dégât d'*Oligonychusafrasiaticus* sur la datte (<http://www.ctd.tn>).

#### 1.6.1.4. *Ectomyeloisceratoniae*

A l'intérieur des dattes attaquées, on trouve des grumeaux d'excréments des larves

Les dattes attaquées se détachent facilement du régime (Figure 6).



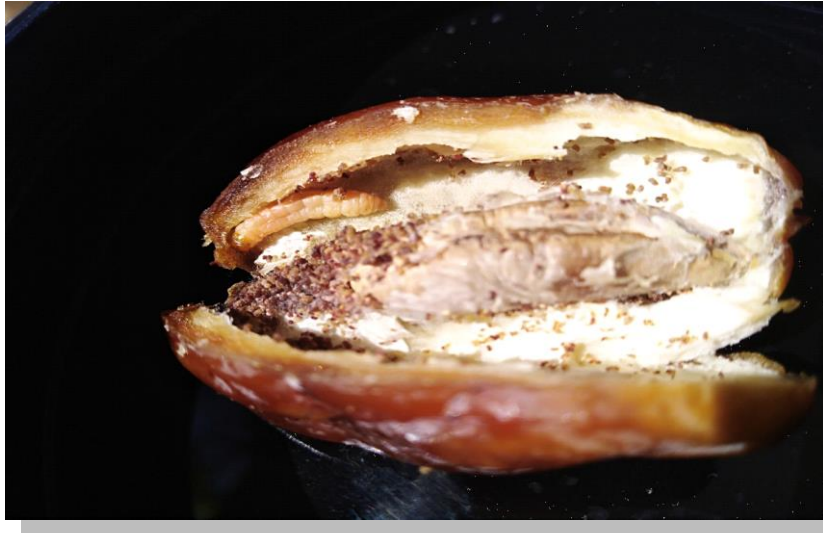
Figure 6 : Dégâts d'*Ectomyeloisceratoniae* sur la datte (<http://www.ctd.tn>).

## 2. L'*Ectomyelois ceratoniae* Zeller

### 2.1. Définition

La pyrale des caroubes et des dattes est un papillon appartenant à un groupe d'insecte considéré comme étant très important sur les plans agronomique et économique. C'est, en effet, un ravageur qui se développe soit dans les fruits sur les arbres (palmier dattier, grenadier et pistachier), soit sur les fruits stockés dans les entrepôts.

C'est un micro-lépidoptère appartenant à la famille des *Pyralidae*, Le papillon adulte mesure environ 0,8-1,0 cm de longueur, gris foncé, les ailes antérieures portent deux bandes transversales blanchâtres. La larve adulte mesure 16-18 mm de long, est rose, à une tête brune et des protubérances segmentaires qui portent de petites soies. Leur développement larvaire se déroule en cinq stades. Particulièrement vorace et polyphage, cet insecte s'attaque aussi bien aux cultures au niveau des champs qu'aux denrées stockées (Figure 7) (Gothilf, 1969).



**Figure 07:** Pyrales de dattes (*L'Ectomyeloisceratoniae*).(<http://www.ctd.tn>).

## 2.2. Distribution

*L'Ectomyeloisceratoniae* est une espèce répandue dans tout le Bassin Méditerranéen. Elle est connue au Maroc, Algérie, Tunisie, Libye et Egypte. Sa présence a aussi été signalée en Espagne, Italie, Grèce et France (Le berre, 1978).

En Algérie, *E. ceratoniae*, se multiplie essentiellement dans deux zones bioclimatiques. La première s'étend sur les bordures littorales, d'une largeur de 40 à 80 kilomètres et s'allonge sur près de 1000 kilomètres. La seconde englobe l'ensemble des oasis du Sud, dont les plus importantes sont celles de l'Oued Righ et les Zibans (Doumandji, 1981 ; Acoureneet al, 2007).

## 2.3. Position systématique

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 :** *Ectomyeloisceratoniae* Zeller, 1839.

#### 2.4. Cycle biologique

La pyrale des caroubes et des dattes hiverne dans les fruits momifiés sous forme de larve âgée. L'adulte de l'insecte apparaît pendant la saison printanière suivante afin de continuer son cycle de développement sur plusieurs plantes hôtes elle est commence par ravager les grenades entre les mois de mai et août, et s'attaque ensuite aux dattes à partir de septembre.

De juillet à septembre, la pyrale maintient son développement sur des débris divers et variés. On peut, en effet, la rencontrer aussi bien sur les déchets végétaux que sur différents fruits estivaux.

La pyrale des caroubes et des dattes est un ravageur qui peut éventuellement se développer en une ou deux générations annuelles(Figure 8).





**Figure 08 :** Étapes de développement des pyrales des dattes durant le cycle biologique. (<http://www.agri.huji>).

## 2.5. Dégât

Elle peut causer des dégâts considérables pouvant atteindre 30% de la production dattier (Le Berre, 1975 ; Idder, 1984 et Abdelmoutaleb, 2008). Le pourcentage d'attaque est de 8 à 10 % en l'Algérie, mais cette proportion peut atteindre jusqu'à 80% dans certains cas, (Wertheimer, 1958 ; Lepigre, 1963 ; Munier, 1973 et Doumandji, 1983).

En Tunisie, le danger de cet insecte, s'amplifie par son attaque aux cultures d'importances agronomique et économique en particulier le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) et le grenadier (*Punicagranatum*) dont les dégâts peuvent atteindre 20 et 90% respectivement (Figure 09) (Dhouibi et *al*, 2016).



**Figure 09** : Dégâts d'*Ectomyeloïsceratoniae* sur la datte.

## **2.6. Les moyens de lutte**

### **2.6 .1. Lutte génétique (Autocide)**

Les pratiques culturales, les interventions phytosanitaires n'ont pas permis d'assurer une bonne protection de la production dattier. Ceci, a suscité les chercheurs à trouver d'autres méthodes de protection efficaces sans porter préjudice à l'écosystème oasisien.

En 1999, l'Institut National de la Protection des végétaux (INPV) a mis en œuvre un Programme de lutte par le biais de la technique des insectes stérile (TIS). Cette méthode consiste à la production en masse des individus mâles de la pyrale des dattes dans des conditions contrôlées et leurs irradiations par les rayons gamma au niveau du centre de recherche nucléaire d'Alger.

Ces individus irradiés ont été ensuite lâchés dans les zones phoénicoles (Biskra, El-Oued et Ouargla) (Dridiet *al*, 2001). D'après ces auteurs les résultats préliminaires sont très encourageants et souhaitent de généraliser cette technique.

### **2.6.2. Lutte microbiologique**

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie qui agit sur les larves de la pyrale par ingestion avant leur pénétration dans les dattes. (Dhouibi ,1991). Le *Bacillus* est certainement le bio pesticide le plus commercialisé dans le monde (Riba et Silvy, 1989). C'est une bactérie du sol formant des spores et les préparations contenant BT sont largement utilisées comme pesticides microbiens dans l'agriculture la foresterie la BT caractérisée par la production d'un cristal protéique durant la sporulation constitue de protéine présentant une activité insecticide spécifique (TiradoMontiel, et *al*,2001).

## **3. les champignons entomopathogènes**

### **3.1. Généralités**

Comme on le sait, la lutte contre les Insectes nuisibles revêt actuellement des aspects très variés, et la méthode biologique, qui comporte l'utilisation des insectes prédateurs ainsi que



l'emploi des germes pathogènes, prend une ampleur de plus en plus considérable. L'utilisation de micro-organismes consiste à se servir des Bactéries, surtout des Bactéries aérobies sporogènes, et aussi des Champignons dits entomopathogènes qui détruisent les Insectes nuisibles. Donc On peut distinguer deux types de la lutte microbiologique, contre les Insectes nuisibles : la lutte bactériologique et la lutte fongique.

Les champignons pathogènes d'insectes occupent une place particulière en pathologie des invertébrés et dans la recherche d'organismes capables de réguler les pullulations d'invertébrés nuisibles, en santé végétale, humaine ou animale. (Ferron et al, 1991 ; Lacey et al, 1996).

Les champignons entomopathogènes représentent plus de 700 espèces de microchampignon ; selon starnes et al (1993). Ils jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes

On les retrouve dans les *Mastigomycetes*, *Zygomycètes*, *Ascomycètes*, *Deutéromycètes*

Les pathogènes les plus nombreux se trouvent dans la classe des *Zygomycetes*. Mais ceux que l'on utilise le plus en lutte biologique font partie de la classe des Deutéromycètes

### 3.2. Types des champignons

De nombreuses espèces de champignons peuvent engendrer des maladies sur divers ravageurs. L'infection est provoquée par la pénétration du mycélium à travers le tégument de l'insecte. On distingue deux types de champignons : les champignons dits 'imparfaits' appartenant à l'embranchement des *Deuteromycotina*, sous classe des Deuteromycètes comprenant les genres *Beauveria*, *Metarhizium*, *Verticilium* etc... et les champignons dits 'inférieurs' ou Entomophtorales appartenant à l'embranchement des *Zygomycotina* classe des Zygomycètes.

#### 3.2.1. Les champignons imparfaits

Génèrent d'innombrables spores qui sont disséminées de manières passives. L'infection se fait à travers le tégument après développement du mycélium. La mort de l'insecte intervient en quelques jours ou quelques semaines selon la taille de l'hôte. Ce dernier se recouvre alors d'un duvet mycélien qui présente une couleur variable selon l'espèce. Chez le genre *Beauveria*, le corps se recouvre d'un mycélium blanc prénommé **Muscardine**. Au sein de ce genre, on trouve des espèces extrêmement fréquentes comme *B. bassiana* infectant de

nombreuses espèces de Lépidoptères (tordeuses et pyrales), de Coléoptères (hannetons, doryphores, otiorhynques) ainsi que de nombreuses espèces de Diptères. D'autres comme *B. brongniartii* sont, au contraire, spécialisés dans les Coléoptères *Melolonthidae* (hannetons). Le genre *Metarhizium* se développe, selon les souches, sur différentes familles de larves d'insectes (hannetons, taupins, *Phoma etc* ). A son complet développement, le mycélium prend une couleur verdâtre, on parle également de 'muscardine verte'. Les genres *Lecanicillium* et *Verticilium* se retrouvent fréquemment sur les populations d'Hémiptères tels que les pucerons et aleurodes. Outre ces genres très connus et commercialisés en tant que biocontrôle, on trouve d'autres genres limitant les populations de ravageurs : *Paecilomyces*, *Isaria*, *Aspergillus*, *Tilachlidium*, *Tolyptocladium*, etc...

### 3.2.2. Les champignons inférieurs ou Entomophtorales

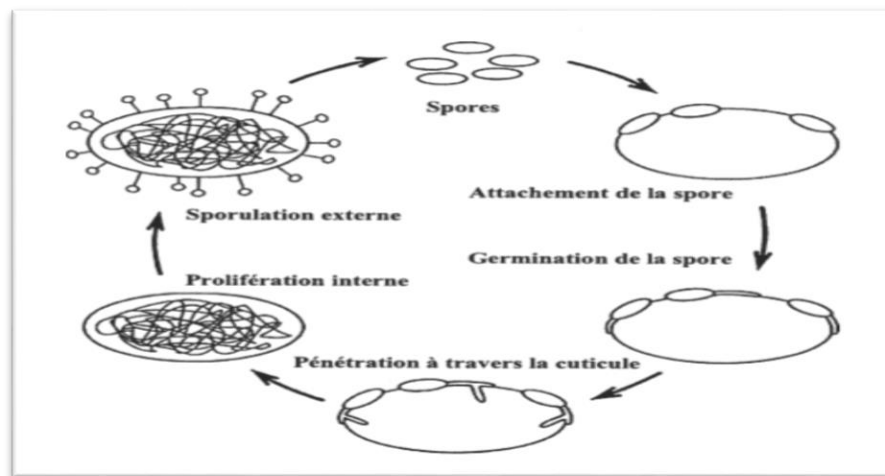
Qui contaminent les insectes ne présentent pratiquement aucun signe de leur présence sur la cuticule de l'hôte. Toutefois, on retrouve régulièrement leurs hôtes la tête en bas à proximité du sommet des plantes ou sur toute la partie exposée. Cette stratégie développée par le champignon lui permet de disséminer plus facilement les pores émis activement par ses conidies. Selon la saison et la taille de l'hôte, le cycle dure de 3 à 7 jours avec de nouvelles sporulations en l'espace de 3 à 12 heures. Grâce à cette rapidité, ces champignons peuvent contribuer à réguler en quelques jours une population de ravageurs. Les champignons hivernent sous forme de spores de conservation ou de fragment d'hyphes dans les insectes contaminés. Les Entomophtorales sont souvent très spécialisées d'un hôte (*Erynia athalia* avec la tenthrède de la rave ; *Erynia neoaphidis* avec le puceron vert du pois, *Zoophtora elateriphaga* avec le taupin adulte et *Entomophthora schizophora* avec la mouche des semis.

### 3.3. Mode d'action

#### 3.3.1. Phase d'adition

l'adhésion est la première étape du processus d'infection les spores entrent en contact passivement avec les insectes avec l'aide d'agents tels que le vent et l'eau l'adhésion est déclenché par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec le tégument de l'insecte l'infection est initiée a travers le tégument de l'insecte-hôte (Tanada et kaya,1993 ;khachatourians,1991 ),mais les spores peuvent aussi entrer par le systèmes

respiratoire (Clark et al,1968),le tube Alimentaire(Miranpuri et khachatourians,1991)et la cavité buccale(Figure 10) (Siebeneicher et al, 1992).



**Figure 10** : Schéma du cycle biologique de *Beauveria bassiana*.

### 3.3.2. Phase de germination

La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend de l'état physiologique de l'hôte et aussi des conditions environnementales notamment les températures et l'humidité (Butt et Becket, 1334 ; Butt et al, 1994). La germination aboutit à la production d'appressoria, structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration. La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. Cependant, des études ont démontré qu'une cuticule nutritive favorise la croissance mycélienne plutôt que la pénétration (Ferron et al, 1993 ; Magelhaes et al, 1981).

### 3.3.3. La phase de pénétration

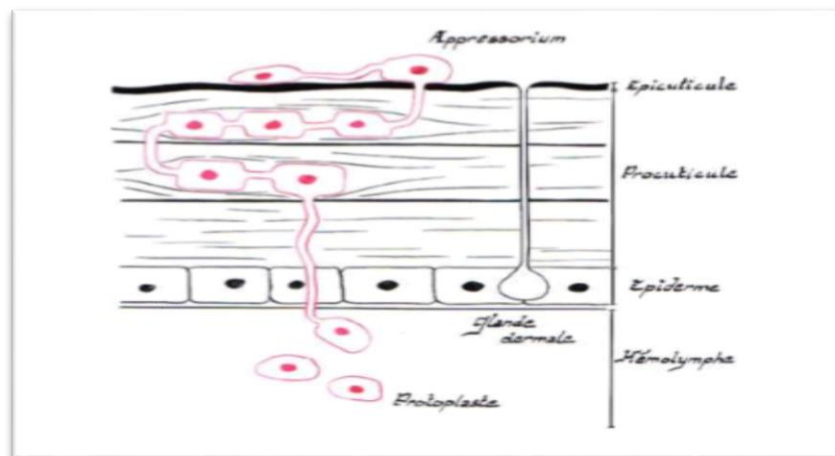
Cette étape consiste en un franchissement de la cuticule par des combinaisons de pressions mécaniques et enzymatiques.

La pénétration peut être facilitée au niveau de certaines zones comme les zones articulaires, les trachées, les blessures.

Afin d'arriver à l'hémolymphe, le tube de germination devra traverser l'épicuticule, la procuticule puis l'épiderme. Cette traversée n'est possible que grâce à la sécrétion par le champignon d'enzymes comme les lipases, les protéases, les chitinases. Certaines souches

produisent des toxines non enzymatiques comme la beauvericine, les beauverolides, les bassianolides, les isarolides, qui vont accentuer le processus d'infection.

L'insecte déclenche une réaction immunitaire face aux actions enzymatiques du mycopathogène. Les réponses mises en œuvre par l'insecte peuvent être la melanisation, la réaction cellulaire (réponse de type inflammatoire à l'infection). Et la production d'inhibiteurs de protéases (protection contre les protéases fongiques, limitation de l'action de la phénoloxydase à proximité immédiate du corps étranger) (Figure 11).



**Figure 11** : Pénétration au travers de la cuticule de l'insecte.

### 3.3.4. Phase de dissémination

Une fois que le champignon a franchi avec succès la cuticule et a percé l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'hémocoèle. Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insecte-hôte et il s'accroît sous forme de blastospores. Ceci peut faciliter la dispersion et la colonisation de l'hémocoèle et optimise l'assimilation rapide des nutriments. Il semble qu'une utilisation efficace des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène. Bien que le glucose joue un rôle central dans le métabolisme de l'insecte, il est généralement présent à très faibles concentrations. Cependant, on trouve le tréhalose à faibles concentrations (4 à 20 mg/ml) (Schopf et Nussbaumer, 1996). L'utilisation du tréhalose par les champignons entomopathogènes dépend de la capacité du champignon à hydrolyser le tréhalose à l'extérieur de la cellule en deux molécules de glucose ou de l'assimiler directement.

L'encapsulation ne protège l'hôte que contre des pathogènes peu virulents. Dans le cas de pathogènes virulents, l'insecte ne parvient pas à former de granulomes typiques, ou bien le pathogène continue de croître malgré son encapsulation qu'il outrepassera (Hou et Chang, 1985).

Le champignon entomopathogène sécrète des métabolites toxiques non enzymatiques qui ont des activités antibactériennes, antifongiques et insecticides. Ces métabolites incluent la beauvericine, la bassianolide, la cyclosporine, la beauverolide, l'isarolide et l'oosporeine, compétition des bactéries lesquelles peuvent accélérer le processus infectieux du champignon et affaiblir le système immunitaire de l'hôte (Hajeck et St-leger, 1994).

De plus, elles permettent aussi au pathogène de surmonter les défenses intestinales (Boucias et Pendland, 1998). L'insecte infecté est tué par asphyxie ou inanition suite à une combinaison d'action telle que la déplétion des nutriments, l'invasion des organes et la toxicose (Boucias et Pendland, 1998). Le mycélium se forme par la suite dans l'intestin et les tubes de Malpighi en absorbant tous l'élément nutritif, déshydratant l'insecte et le momifiant (Cloutier et Cloutier, 1992). Suite à la multiplication du champignon, la cavité entière du corps de l'insecte est remplie d'une masse fongique. Quand les conditions sont favorables, le mycélium sort de l'insecte par les parties plus molles du corps de l'hôte. Il produit un feutrage mycélien blanc cotonneux appelé la muscardine blanche (Weizer, 1972). Les hyphes externes produisent les conidies qui vont être libérées dans l'environnement permettant la reprise du cycle vital du champignon.

## 4 .alpha amylase

### 4.1. Définition

L' $\alpha$ -amylase est la principale enzyme impliquée dans la dégradation de l'amidon. Selon la commission des enzymes (EC), l' $\alpha$ -amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie (Janecek 1994, 1997)  $\alpha$ -amylase appartient à la troisième classe, celle des hydrolases [ $\alpha$ -(1,4)-D- glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)]

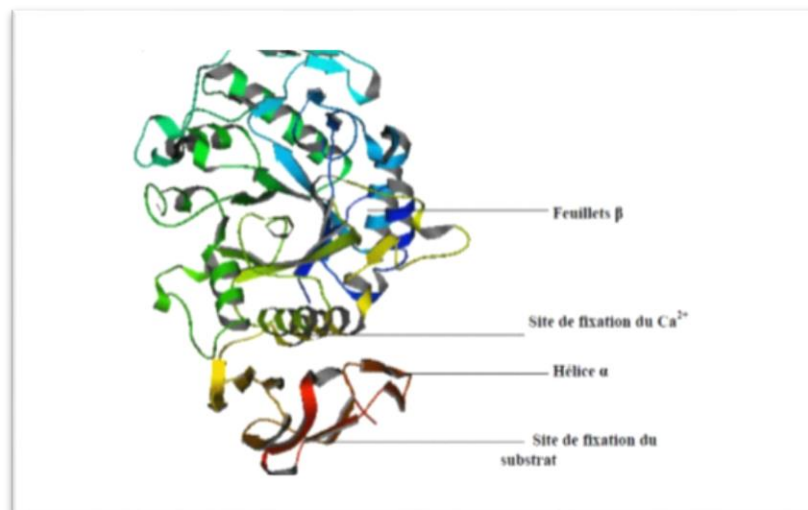
Elle hydrolyse, les liaisons osidiques de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon, du glycogène et d'autres polysaccharides contenant plus de trois liaisons  $\alpha$  (1,4) D-Glucose (Keating et al, 1998 ; Dauter et al, 1999 ; Franco et al, 2000). En effet, elle attaque les chaînes

de l'amylose en coupant les liaisons  $\alpha$  (1,4) tous les 6 glucoses, maltose et surtout d' $\alpha$ -dextrines (Franco et *al*, 2000) .

#### 4.2. Structure de l' $\alpha$ amylase

Les  $\alpha$ -amylases sont des métallo-enzymes à calcium (un ion calcium par molécule d'enzyme). Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés d'enzyme qui varient d'une souche à une autre (Fogarty et *al*, 1980).

On prend comme exemple la teneur en acides aminés de l' $\alpha$ -amylase de *B. amyloliquefaciens* et *A. oryzae*. 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) (Figure 12).



**Figure 12 :** Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -amylase fongique (Priestle, 1988).

#### 4.3. Nomenclature de l' $\alpha$ -amylase

- **non systématique:** (1-4) D-glucanoglucanohydrolase.
- **non codifié:** E.C.3.2.1.1

- **non recommandé** :alpha- amylase
- **synonymes**: glycogenase ,endoamylase ,maxilase,taka-amylase A,takatherm, thermolase,amylothem,clarase,amylopsin, spitase,CP1,G995,keistase L 1,THC 250, maxamy,ptyalin(Graber,1989).

#### 4.4. Mode d'action

le mecanisme d'action de l'amylase néssicite la participation de 3fonctions du site actif impliquant un attaquant nucléophile , un stabilateur de la charge positif de l'atome attaqué et un donneur de proton au groupe déplace ; Ceci signifie que la rupture de la liaison osidique fait intervenir une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidu de l'enzyme et du substrat les groupes impliqués dans la réaction du site actif sont deux acide carboxylique et un noyau amidazole(Park et *al*,1997)

Ce mécanisme est une caractéristique de l'enzyme dans les conditions expérimentales tel que la température pH taille et d'action des alpha amylase :

- Attaque aléatoire l'amylase hydrolyse aléatoirement 1 les Liaisons glycosidique libérant 2 fragments qui seront séparément attaqué
- Attaque préférée l'amylase montre une préférence pour certains liaison dans le substrat
- Attaque répétitif ou multiple elle aime plus le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat pour hydrolyser les Liaisons glycosidique sans se dissocier du substrat( Berry & Paterson ,1990) .

#### 4.5. Les différentes sources et origines de l'alpha-amylase

Les alpha-amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes (Haq et *al* , 2003 et Srinivasa Rao et *al*, 2004) .

##### 4.5.1. L'origine végétale

Les L'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 incapable d'hydrolyser le maltose (Octávio et *al*, 2000). Ces enzymes végétales sont synthétisées par un mécanisme cellulaire compliqué, au cours de la germination des graines qui requiert une

activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Brawn *et al.*, 1993).

#### 4.5.2. L'origine microbienne

##### 4.5.2.1. L'amylase fongique

La production industrielle d'enzymes à partir des microorganismes fongiques, parmi les 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 al.*, 1994).

##### 4.5.2.2. L'amylase bactérienne

Ce type d'enzyme est obtenu principalement par des fermentations de Bacillacées (Milner *et al.*, 1997). *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* sont caractérisées comme souches productrices d'enzymes d' $\alpha$ -amylase (Bousseboua, 2002). De nombreuses amylases de propriétés industrielles ont été découvertes chez des bactéries acidophiles, alcalinophiles et thermophiles. Ces enzymes interviennent dans la transformation de l'amidon par fragmentation rapide en clivant les liaisons  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (Nadirman *et al.*, 2006) (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Les différentes origines de l'  $\alpha$ -amylase microbienne.

Enzymes microbiennes	Références
<b>Bactéries</b>	
<i>Bacillus licheniformis</i>	(Kandra <i>et al.</i> , 2002).
<i>Bacillus steorothermophilus</i>	(Dauter <i>et al.</i> , 1999).
<i>Bacillus circulans</i>	(Dey <i>et al.</i> , 2002).
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Uiger et $\text{çurakoglu}$ , 2001).
<i>Bacillus coagulans</i>	(Babu et Satyanaray, 1993).
<i>Thermomonospora fusca</i>	(Bush et Stutzenberger, 1997).
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	(Feller <i>et al.</i> , 1992).
<i>Thermus filiformis</i>	(Egas <i>et al.</i> , 1998).
<i>Streptomyces rimosus</i>	(Vukelić <i>et al.</i> , 1992).
<b>Moisissure</b>	
<i>Aspergillus oryzae</i>	(Agger <i>et al.</i> , 1998).
<i>Aspergillus niger</i>	(Botton <i>et al.</i> , 1990).
<i>Aspergillus flavus</i>	(Aidoo <i>et al.</i> , 1981 ; Khoo, 1994 ; Abou Zeid, 1997).
<i>Aspergillus sojae</i>	
<i>Rhizopus oryzae</i>	(Lucio <i>et al.</i> , 1996 ; Cuveillier, 1999).
<i>Rhizopus sp.</i>	(Soccol <i>et al.</i> , 1994 ; Cuveillier, 1991).
<i>Penicillium griseoroseum</i>	(Ray, 2001).

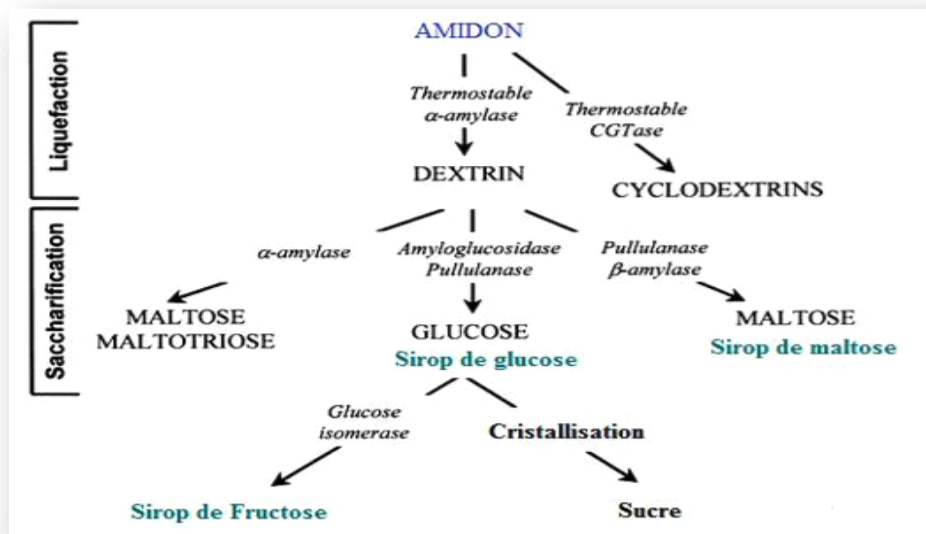


#### 4.6. Applications industrielles et biotechnologiques des amylases

En raison de leur productivité et leur thermostabilité, les amylases sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent (Behal et *al*, 2006). Avec l'arrivée de nouvelles frontières en biotechnologie, le spectre d'application des amylases s'est élargi vers d'autres domaines, comme la chimie clinique, médicale et analytique (Pandey et *al*, 2000).

##### 4.6.1. En bioconversion de l'amidon

Les  $\alpha$ -amylases sont largement utilisées dans l'industrie boulangère, qui interviennent dans l'hydrolyse de cette macromolécule en sirops de glucose et fructose dans les procédés de liquéfaction (Figure 13) (Nielsen, 2007).



**Figure 13 :** Transformation enzymatique de l'amidon en sirop de glucose de maltose et de fructose (Maktouf, 2013).

##### 4.6.2. En boulangerie

Les amylases sont considérées comme des additifs alimentaires dans l'industrie boulangère. L'ajout d'une petite quantité d'amylase dans la farine, permet de fournir des sucres simple et bien assimilables pour les levures, ce qui augmente la production du gaz carbonique après

fermentation et conduit à l'obtention d'un pain aéré (Pandey et *al*, 2000).

#### **4.6.3. En panification et biscuiterie**

L'usage de l'alpha amylase « améliorant de panification » est devenue une pratique de fabrication machinale dans l'industrie panaière, non seulement pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus de fabrication. Cette industrie utilise les  $\alpha$ -amylases pour la régulation des activités diastasiques des farines par hydrolyse de l'amidon en maltose. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie et améliore la texture des gâteaux pâtisseries et des biscuits (Malhotra et *al*, 2002).

#### **4.6.4. En sucrerie**

L' $\alpha$ -amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon gênant la purification. Néanmoins, des  $\alpha$ -amylases fongiques et bactériennes sont très utilisées pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (Martin et *al*, 2003).

#### **4.6.5. En industrie des détergents**

L'industrie des détergents est la première consommatrice des enzymes. Les amylases viennent en second position dans la formulation de détergent enzymatique, et elles sont représentées dans 90% de tous les détergents liquides (Gupta, 2003 ; Hmidet, 2009 et Mitidieri, 2006).

#### **4.6.6. Domaine médical et pharmaceutique**

Dans le domaine pharmaceutique, les amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et aussi comme aide digestif pour éviter les dyspepsies et les fermentations intestinales (Sanofi, 1996). Dans le domaine médical, le taux de l' $\alpha$ -amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (Pandey et *al*, 2000).

#### **4.6.7. Production d'alcool et du biocarburant**

La commercialisation d'amylases est fortement stimulée par le développement des biocarburants de première génération, en particulier pour la production de bioéthanol. L'amidon est le substrat souvent utilisé en raison de son faible prix et de sa disponibilité (Chi

et al., 2009). Lors du processus de fabrication, l'amidon doit être solubilisé et soumis à deux étapes enzymatique afin d'obtenir des sucres fermentescibles par l'application des microorganismes amylolytiques suivi par une fermentation ou les sucres sont converti en éthanol en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Öner, 2006).

### 5. Composition de déchets de carotte

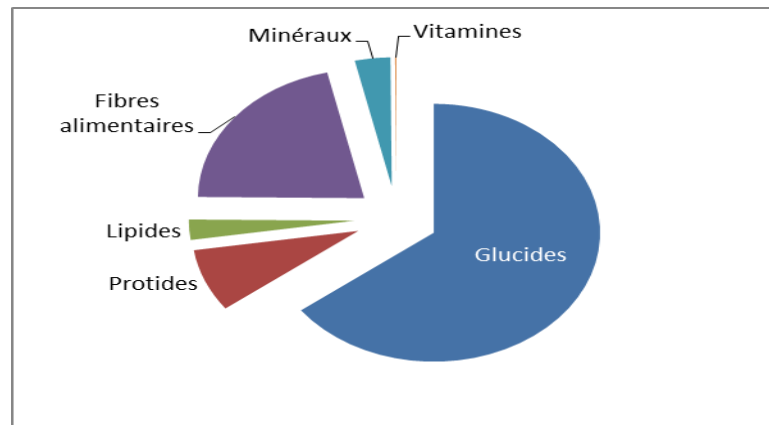


Figure 14: Composition de déchets de carotte.

Le présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie (RDC). Faculté des Sciences de la nature et de la vie. Il porte sur la production et l'extraction des alpha-amylase par les moisissures entomopathogènes et la mise en évidence de l'effet de la température sur l'activité amylasique.

## **1. Isolement des champignons entomopathogènes**

### **1.1. Les larves *Ectomyelois ceratoniae* (zeller)**

Les échantillons des larves *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) sont prélevés à partir des dattes stockées au niveau d'usine (Sonatiba ,Zouaghi).

Les dattes récoltées sont ouvertes à l'aide d'un scalpel pour vérifier la présence de larves ou de nymphes de la pyrale. C'est une observation directe à l'œil nu. Les larves sont recueillies dans des boîtes de Pétri pour isoler les champignons entomopathogènes. (Figure15).



**Figure 15** : larves récoltées.

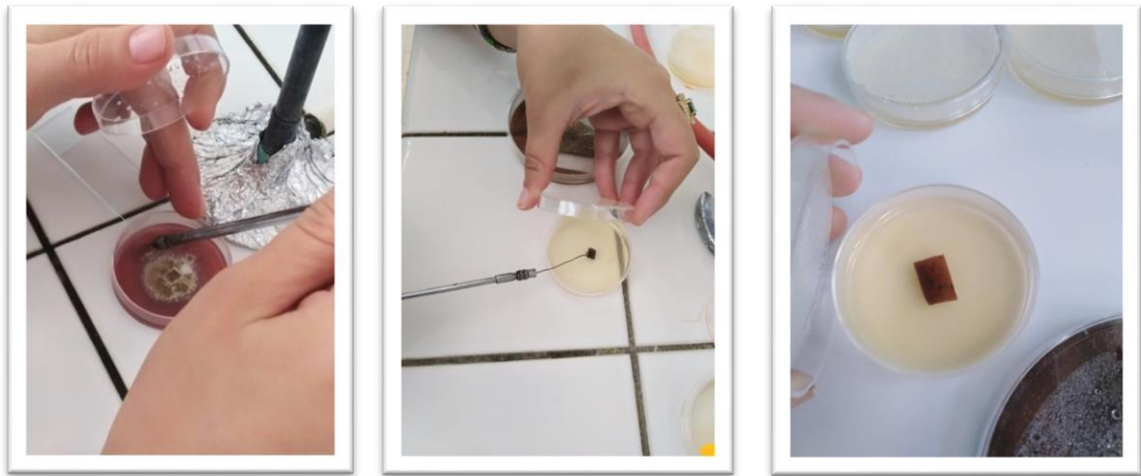
### **1.2. Isolement des champignons entomopathogènes**

Les larves ont été désinfectées dans 1% d'eau javel stérile pendant 5 minutes, puis rincés dans l'éthanol, et en fin dans l'eau distillé stérile pendant 5 minutes, puis séché sur papier

absorbant stérile ; puis déposées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA ( Peptone Glucose Agar) (voir annexe 1 ) + Gentamycine (0.1mg /l) , Les boîtes ont été incubées à 28°C à l'obscurité et observées quotidiennement pendant trois semaines (Zimmermann,1986).

### **1.3. Purification**

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, en réalisant les repiquages successifs nécessaires jusqu'à obtention d'une souche pure (Figure 16).



**Figure 16:** Les étapes de purification des souches fongique.

### **1.4. Méthodes d'identification**

L'identification des isolats est basée sur les observations du mycélium fongique :

- **Observation macroscopique** : qui permet de déterminer la couleur de la colonie /pendant le développement et à mesurer son diamètre.
- **Observation microscopique** : qui détecte la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, la nature de la production et les caractéristiques des fructifications et des spores (Samson et Haesks, 1988 ; Hawkswarth, 1995 ; Hoog and Guarro, 1995 ; Gams et *al*, 1998).

Le mycélium est fixé en utilisant une solution de lactophénol bleu coton (voir annexe 2) (Packer et Thomas, 1990). En outre, l'utilisation d'un microscope à fluorescence a permis la prise en photo du mycélium.

## **2. Production et extraction de l'enzyme $\alpha$ -amylase**

### **2.1. Préparation de l'inoculum**

L'inoculum correspond à la suspension sporale de la souche fongique sélectionnée. Cette dernière, est préparée par addition de 10 ml d'eau twennée aux souches cultivées pendant sept jours sur milieu PDA en boîte de Pétri. Les spores sont récupérées superficiellement en utilisant une anse de platine sous des conditions aseptiques. Ensuite, la détermination de la concentration de la suspension sporale est effectuée par dénombrement des spores sur cellule de Malassez.

### **2.2. Préparation du milieu de fermentation a base de déchets de carotte**

Le milieu de culture est préparé à partir de farine de déchets de Carotte (*Daucus carota*) Les déchets sont séchés à l'air libre (25 – 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 par l'addition de l'eau distillé (Figure17)(Murthy et Naidu, 2010).



**Figure17:** Milieu de fermentation à base de déchets de carotte.

### **2.3. Fermentation sur milieu liquide a base de déchets de carotte**

Chaque souche de moisissure sélectionnée a été inoculée avec 1 ml de sa suspension sporale ( $3 \times 10^7$  spore /ml) dans un flacon contenant le bouillon de production (Farine des déchets de carotte). Ces flacons ont été incubés pendant 3 jours aux températures suivantes : 15, 30 et 45°C .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 amylolytiques. A la fin des fermentations, les paramètres (pH,

et activité amylolytique) sont estimés. (Figure 18).



**Figure 18** : Fermentation sur milieu liquide : a: inoculation b: filtration.

## 2.4 Techniques analytiques

### 2.4.1 .Mesure du pH

Pour chaque prélèvement réalisé lors des fermentations (flacons) une mesure de pH de l'extrait enzymatique est réalisée à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné (Figure 19).



**Figure 19**: Mesure du pH avec un pH mètre.

### 2.4.2. 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 ml à pH 6,5 (mélange réactionnel)

(Annexe 3), 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) 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. La quantité des sucres réducteurs est déterminée sur une droite d'étalonnage préparée avec des solutions de glucose de différentes concentrations (Annexe 4).



Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus à partir de l'isolement des champignons entomopathogènes à partir d'*Ectomyeloisceratoniae*(zeller) des dattes et des fermentations à différentes températures réalisées en flacons de 250ml ; et qui ont permis après quelques jours.

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

Quatre isolats fongiques ont été obtenus des échantillons des larves récoltées représentant 4 genres : *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Metarhizium* et *Penicillium*

Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 70% regroupant 3 espèces : *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2*, *Aspergillus sp3* ..., suivie par le genre *Penicillium*, *Cladosporium* et *Metarhizium* avec un pourcentage de 10% (Figure 20 et Tableau5)

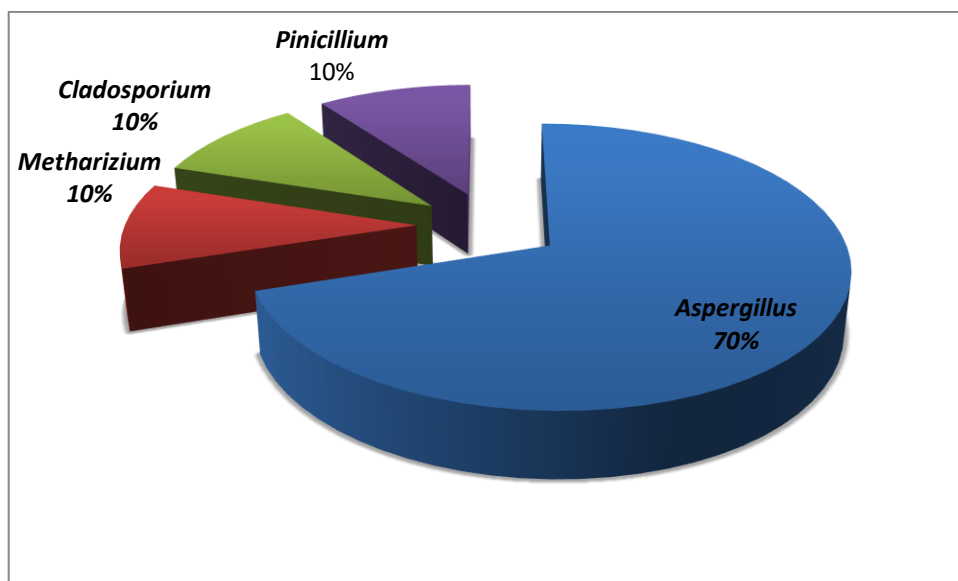
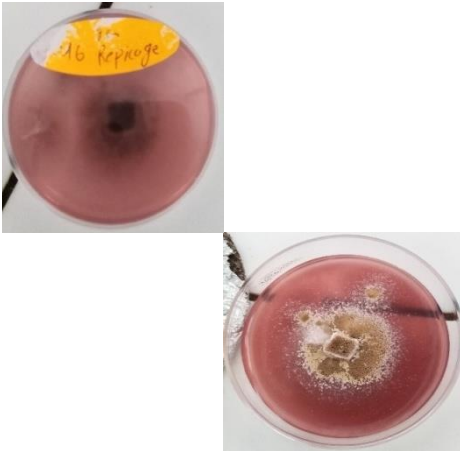
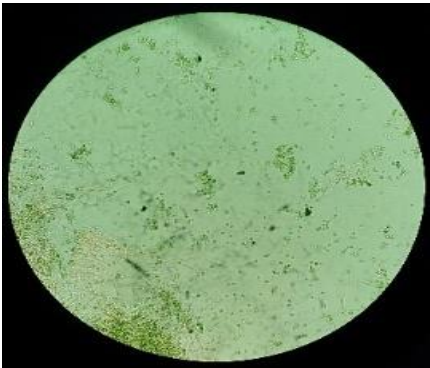

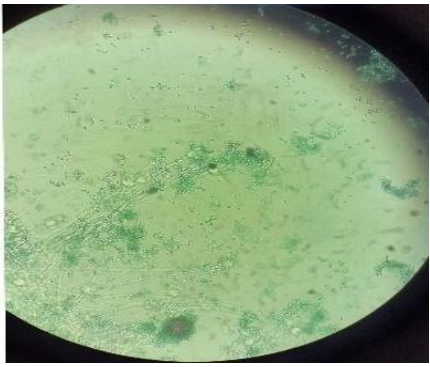
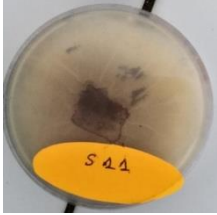
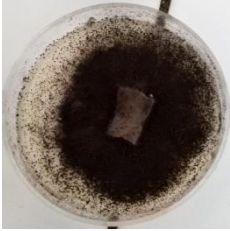
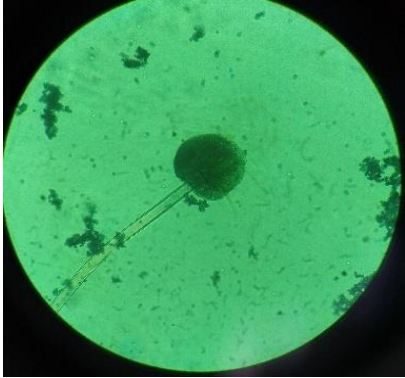


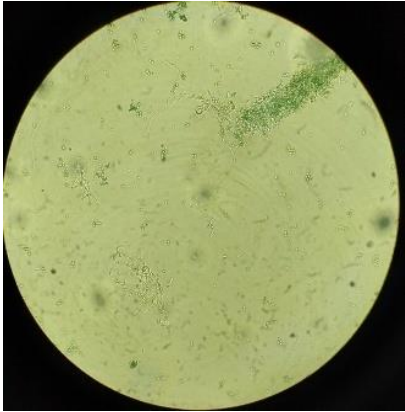


Figure 20:Fréquence d'apparition des genres sur milieu PDA.

Tableau 5: Aspect macroscopique et microscopique des souches fongiques

Observation macroscopique	Observation microscopique ×40	caracteristiques
		<p>En masse, les colonies présentent une couleur olive. Les conidies sont de forme plus ou moins cylindrique. La fructification est constituée de phialides donnant naissance à des chaînes de conidies ou phialospores. Les phialides sont uniques, en paire ou en groupes de deux, et se terminent par une chaîne basale. Elles sont supportées par des colonnes longues ovoïdes voire coniques.</p>
		<p>Sur le milieu de culture P.D., la souche <i>Penicillium</i> sp. est colorée en vert. La croissance mycélienne est plus ou moins rapide. L'observation microscopique a permis de visualiser un mycélium cloisonné avec des ramifications lisses ramifiés sur lesquels sont présentes des chaînes de spores. Ces dernières présentent à leur extrémité des phialides hyalines ou de couleur vive. Elles sont de forme sphérique et se terminent par des chaînettes.</p>

 		<p>Les têtes conidiennes, bisériées, sont disposées en plusieurs colonnes. Les conidiophores sont longs brunâtres à leur moitié supérieure globose et entièrement fertiles. habituellement globuleuses, aplaties. Les phialides, plus présentent plusieurs sites de bourgeonnement.</p>
 		<p>Thalle velouté, poudreux par endroits (conidies), vert-olive à brun-olive. Revers noir à reflets verts. Conidiophores : naissent en quelquefois terminale sur l'hyphes ou brun. Paroi lisse présentant parfois des</p>

L'Algérie compte environ 17 millions de palmiers produit en moyenne 600,000 tonnes de dattes par an (source D.S.A , 2013). La variété DegletNour est l'une des cultivars les plus appréciés au monde. L'exportation de la datte constitue un enjeu économique incontournable et dans sa durabilité constitue un investissement dans la stabilité sociale dans les régions Arides. La commercialisation de la datte à l'échelle internationale est confrontée à la contrainte majeure due à la présence du ver (pyrale) de la datte. Ce dernier est classé sur la liste A des organismes nuisibles dont la lutte est obligatoire (décret exécutif N° 95-387 du 28 novembre 1995). Chaque année, le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural prend en charge le traitement de près de 3900000 palmiers contre le Boufaroua pour tous les cultivars et le Myelois uniquement pour la DegletNour dans toutes les zones phoenicicoles des différentes entités écologiques. Un montant de 85,7 millions de dinars algériens a été consenti par le ministère pour la surveillance et la lutte contre le Boufaroua et le Myelois, dans les wilayas productrices de dattes du pays (source I.N.P.V, 2014). Seule la lutte chimique est le seul moyen de lutte utilisé contre la pyrale des dattes, qui malheureusement reste limitée en plus de son effet destructif de la biodiversité. L'infestation des dattes au champ et dans les aires de stockage déprécie énormément la qualité commerçante des dattes et risque de compromettre les exportations notamment celles de la variété DegletNour(Bensalah et Ouakid, 2015).

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. *A. ceratoniae*(Synonyme : *Ectomyeloisceratoniae*) 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 (Idderet 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 (Saiahet *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 amyliasique des souches fongiques**

La méthode de DNS consiste l'appréciation de la quantité des amylases produites dans un milieu de culture liquide chez les souches isolée à partir de la pyrale des dattes.

### **2.1. Potentiel d'Hydrogène ( pH )**

Chaque enzyme possède un pH optimum auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des légères variations du pH autour de cette valeur entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (Hams et *al*, 2006).

Le Tableau 6 montre les variations du pH de la culture après fermentation dans une gamme de température de 15°C à 45°C avec un intervalle de 15°C. D'après ce tableau, on remarque que le pH reste dans l'intervalle allant de 3 Jusqu' à 5 sous les trois températures. En parlant sur les températures 15 °C, 30°C et à 45°C, une diminution significative du pH a été observée après 3 jours de fermentation pour l'ensemble de toutes les souches. Au contraire, une légère diminution à une stabilité du pH à la neutralité a été détectée à 40°C et à 45°C. L'augmentation s'explique par production d'acides organiques. Cela indique que les souches ont certainement utilisé mais différemment les déchets de carotte 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 (Sandhy et al,2005).

**Tableau 06:** Résultats du pH pour les souches fermentées à différentes température

Températures Souches	ph initial	15°C	30°C	45°C
<i>Aspergillus niger</i>	5.67	3.70	3.98	3.87
<i>Cladosporiumsp.</i>	5.86	4.36	4.66	4.49
<i>Methariziumsp</i>	5.54	4.90	4.69	4.36
<i>Penicillium sp</i>	5.83	5.30	4.67	4.58

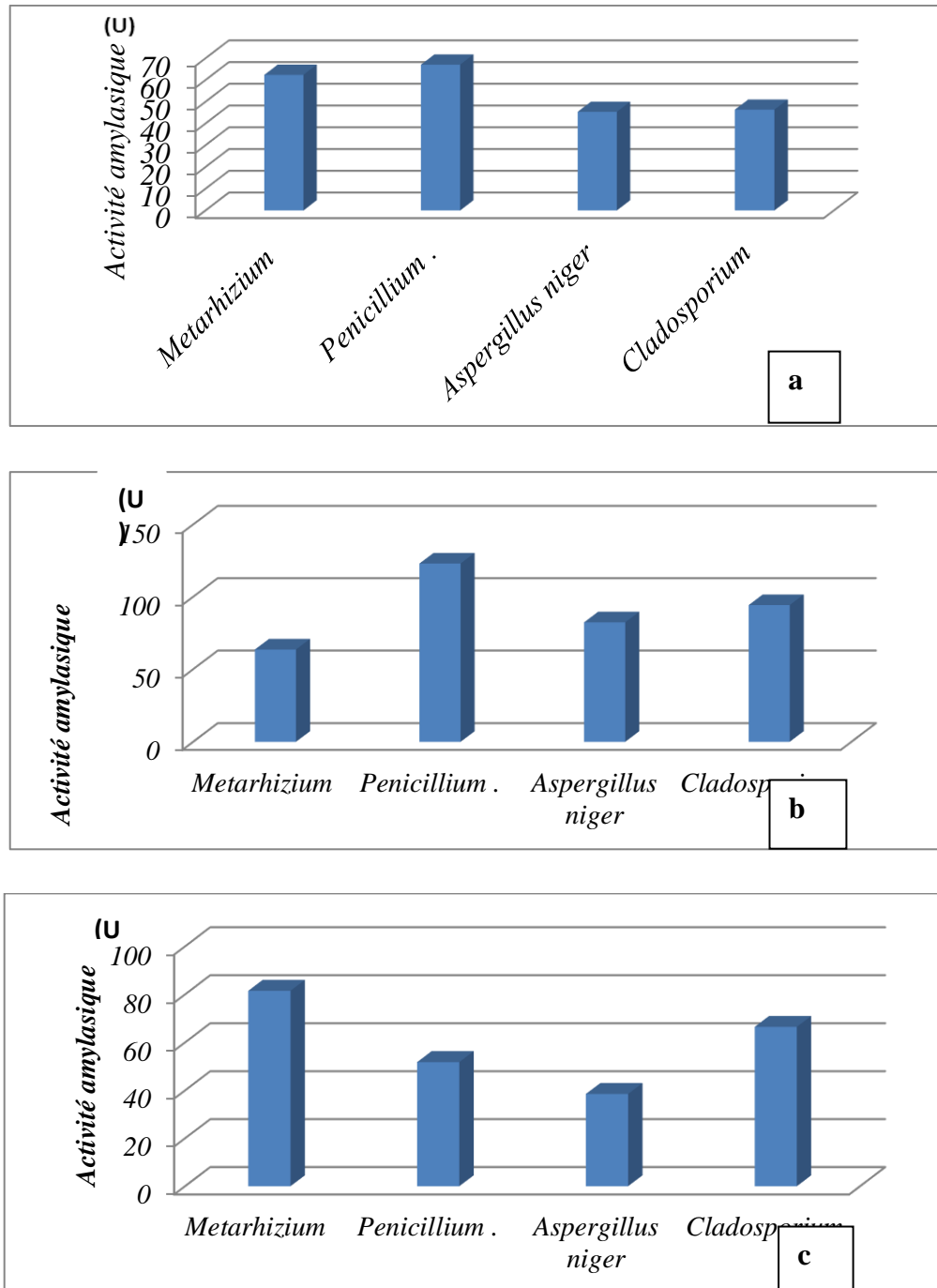
## 2.2. Résultats de fermentation

Résultats de l'activité amylasique testée dans le milieu de fermentation liquide à base de déchets de carotte a montré que la production de  $\alpha$ - amylase diffère d'une température à une autre chez les différentes souches fongiques

En commençant par la température 15°C, la meilleure activité est remarquée chez la souche *Penicillium sp.*(66.66U), suivie par la souche *Methariziumsp.*(62 U). Les autres, présentent au contraire de très faibles activités.

Par ailleurs, les rendements maximaux en  $\alpha$ - amylase sous la température 30°C sont constatés successivement chez les souches : *Penicilliumsp.* (122,25 U), *Cladosporiumsp.*(93,68 U) , *Aspergillus niger* (81,82U) et *Metharizium*(63,16U). Et chez les souches : *Methariziumsp* (81,04U), *Cladosporium* (66,08U), *Penicillium sp.*(51.80U)et*Aspergillus niger*(38.51U) sous la température 45°C.

En effet, la comparaison des résultats de toutes les souches révèle que la meilleure activité amylasique observée est celle obtenue par la souche *Penicillium sp.*(122,25 U) à la température 30°C (Figure 21).



**Figure 21 :** Activité amylasique pour les souches fermentées sous les 3 températures, a : 15°C ;b : 30°C ;c : 45°C.

L'analyse des graphes ci-dessus permet de discerner éventuellement la température optimale de la production de la  $\alpha$ - amylase pour chaque souche utilisée. Les souches *Aspergillus niger* et *Penicillium* spp présentent un maximum de production à la température 30°C où elle est d'environ (81,82 U),(122,25U) , respectivement, tandis que les souches *Cladosporium* sp et

*Methriziumsp.* L'activité la plus élevée est observée sous la température 45°C ; (66,08U) et (81,04U) successivement,

Par ailleurs, la souche *Penicillium sp.* donne de bons rendements équitablement sous les deux températures 15°C (66,66U) et 30°C (122,25U), au-delà de cette température, l'activité amylasique diminue considérablement. Par contre, la souche *Methariziumsp.* donne son meilleur résultat (81,04U) sous la température 45°C. Toutes ces différences de production entre ces souches affirment que la température influence la sécrétion extracellulaire des enzymes, éventuellement en modifiant les propriétés physiques de la membrane cellulaire. En effet, la température affecte fortement la synthèse d'une protéase, soit de manière non spécifique en influençant les taux de réactions biochimiques ou spécifiquement par induire ou réprimer leur production (Nardello- Ratajet *al*, 2003).



Dans cette étude, une caractérisation des champignons entomopathogènes isolées à partir de la pyrale de dattes a été effectuée sur milieux PDA, dans le but de sélectionner des souches ayant la capacité de produire l'alpha amylase, par la méthode de DNS.

Pour l'isolement et la sélection des souches fongiques, l'examen microscopique et macroscopique, nous ont permis d'identifier quatre souches sont : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Metharizium*, *Cladosporium*. dont la souche *Aspergillus* a le facteur d'apparition élevé par rapport aux autres souches.

Les amylases suscitent un intérêt majeur grâce à leur utilisation potentielle dans de nombreux secteurs industriels. Ces enzymes ont d'une grande importance en biotechnologie et trouvent des applications dans de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, médicale, détergeant, textile etc. Grâce à leur diversité d'exploitation, cette classe d'enzyme contribue avec un apport de 30% du marché mondial de la commercialisation des enzymes industrielles.

Dans un second, l'étude de l'influence de la température sur l'activité amylolytique, Pour cela, les quatre souches fongiques isolées ont étéensemencées dans un milieu ou en utilisant les déchets de carotte comme un substrat de base, puis incubées à différentes températures : à 15°C, à 30°C, et 45°C. avec la mesure du PH avant et après l'incubation .L'analyse des résultats du pH et de l'activité amylolytique a révélé que les quatre souches sont productrices des quantités importantes d'alpha amylase sous la température 30°C avec une différence significative pour les trois températures mais le meilleur rendement enregistré chez la souche *Penicillium*(122.25U) ,(66.66U) dans les deux température successivement 30°C et 15°C suivi par *Mehtarizium* par une taux de production élevé de (81.04 U) dans la température 45°C.

Bien que les résultats obtenus:

Confirme la possibilité d'utiliser les déchets de carotte comme substrat de base pour la production d'alpha-amylase.

Produire l'alpha-amylase par les champignons entomopathogènes bien que le genre *Penicillium*, parmi les genres fongiques les plus importants en termes de production d'alpha amylase, par fermentation.

- Aberlenc-Bertossi, F. (2017). *Biotechnologies du palmier dattier*. IRD Éditions.
- Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C., & Leather, S. R. (1998). Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection*, 17(8), 675-679.
- Arif, Y. (2011). Etude de l'interaction entre la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) et certains cultivars de palmier dattier (Doctoral dissertation, Université El Hadj Lakhdar de Batna 1).
- Bateman, R. P., Price, R. E., Müller, E. J., & Brown, H. D. (1994). Controlling brown locust hopper bands in South Africa with a myco-insecticide spray. In *BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE PESTS AND DISEASES* (Vol. 2, pp. 609-609). BRIT CROP PROTECTION COUNCIL.
- BENSALAH, K. (2016). Evaluation des caractéristiques biologiques d'*Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839)(Lepidoptera, pyralidae) dans les conditions naturelles et contrôlées. Stockage, conservation et lutte (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).
- Boucias, D. G., & Pendland, J. C. (1998). Baculoviruses. In *Principles of Insect Pathology* (pp. 111-146). Springer, Boston, MA.
- Boughanou , N., 1988. Essai de production de vinaigre à partir de déchets de dattes .Thèse magister , INA.El Harrach, Alger, 82p
- Buelguedj,M ,2001.caractéristiques des cultivars de datte dans les palmeraies du sud-est algérien,N<sup>O</sup>11,INRAA.El-Harrach,Alger,289p.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10), 1397-1403.
- Butt, T. M., & Beckett, A. (1994). Structural studies on the infection processes of entomogenous fungi. *proceedings of Invertebr. Pathol. & Microb. Control*, 1, 311-313.
- Chi, Z., Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., & Zhang, T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. *Biotechnology advances*, 27(4), 423-431.
- Cloutier, C., & Cloutier, C. (1992). Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. *La lutte biologique*, Gaëtan Morin (Boucherville, Québec) et Lavoisier Tech Doc (Paris), 19-88.

- Dhouibi, M. H. (1982). Etude bioécologique d'*Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) dans les zones présahariennes de la Tunisie.
- Dhouibi, M. H. (1991). Les principaux ravageurs du palmier dattier et de la datte en Tunisie. Institut National Agronomie de Tunisie, Labo. Entomologie-Ecologie. pp27-40.
- ESPIRA DE. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tec et Doc – Lavoisier, 147 – 155.
- Feng, M. G., Poprawski, T. J., & Khachatourians, G. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol science and technology*, 4(1), 3-34.
- Ferron, P., Fargues, J., & Riba, G. (1991). Fungi as microbial insecticides against pests. *Handbook of applied mycology*, 2, 665-706.
- Ferron, P., Fargues, J., & Riba, G. (1991). Les champignons agents de lutte microbiologiques contre les ravageurs. *Dost. Cell. Env*, 5, 55-76.
- Fogarty, W. M. (1980). Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. *Microbial enzymes and bioconversions*, 115-170.
- Fujita, T. (2002). Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2(5), 346.
- GILLES P. (2000). Cultiver le palmier dattier. Ed. Ciras.
- Gillespie, J. P., Bailey, A. M., Cobb, B., & Vilcinskis, A. (2000). Fungi as elicitors of insect immune responses. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 44(2), 49-68.
- Goettel M.S., Inglis G.D et Wraight S.O.(2000). Fungi. In: *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Lacey LA, Kaya HK (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 255-282.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, 38(11), 1599-1616.
- HADJEB, A. (2012). Influence de la qualité nutritive de trois variétés de dattes sur le potentiel biologique de la Pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1839) (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).
- 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 (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-

Biskra).

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 (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).

Hajek, A. E., & St. Leger, R. J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual review of entomology*, 39(1), 293-322.

Hams B. D., HOOPER N. M. ; HOUGHTON J. D. 2006.L'essentiel en biochimie. Ed BERTI Editions, Paris, P.413.

Hmidet, N., Ali, N. E. H., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S. K., & Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 71-79.

Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature immunology*, 3(2), 121.

Hou, R. F., & CHANG, J. K. (1985). Cellular defense response to *Beauveria bassiana* in the silkworm, *Bombyx mori*. *Applied Entomology and Zoology*, 20(2), 118-125.

Ibrahim, L., Butt, T. M., Beckett, A., & Clark, S. J. (1999). The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 103(7), 901-907.

Idder, M. A., Idder-Ighili, H., Saggou, H., & Pintureau, B. (2009). Taux d'infestation et morphologie de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) sur différentes variétés du palmier dattier *Phoenix dactylifera* (L.). *Cahiers Agricultures*, 18(1), 63-71.

Magalhaes, B. P., Lord, J. C., Wraight, S. P., Daoust, R. A., & Roberts, D. W. (1988). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Eriopis connexa*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(3), 471-473.

Maktouf, S. (2013). Activités amylase et lichenase d'une nouvelle souche de *Bacillus*. Production sur milieu solide et caractérisation (Doctoral dissertation, Toulouse, INSA).

Malhotra, R., Noorwez, S. M., & Satyanarayana, T. (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent  $\alpha$ -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31(5), 378-384.

Martin, M. T., Plou, F. J., Alcalde, M., & Ballesteros, A. (2003). Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21(4-6), 299-308.

Mazoyer, M. (2002). *Larousse agricole, le monde agricole au XXIème siècle*. Mathilde.

MEHAOUA, M. S. (2014). Abondance saisonnière de la pyrale des dattes (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller., 1839), bioécologie, comportement et essai de lutte (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).

Mitidieri, S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource technology*, 97(10), 1217-1224.

Nardello-Rataj, V., Tai, L. H. T., & Aubry, J. M. (2003). Les lessives en poudre. *l'actualité chimique*, 3.

Nielsen, J. E., & Borchert, T. V. (2000). Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 253-274.

Nouadri, T., Meraihi, Z., Shahrazed, D. D., & Leila, B. (2010). Purification and characterization of the amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6), 155-162.

Noui, y. 2007. caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. thèse de magister spécialité génie alimentaire, université de Boumerdès. 62p.

Pandey ; P Nigam ; C R Soccol ; VT Soccol ; D. Singer Mohan. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 31, 135–152.

Sabrina, B. (2012). Synthèse des travaux réalisés sur la pyrale de dattes *Ectomyelois ceratoniae* à Ouargla (Doctoral dissertation).

Saci, A. (2012). Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. ecologie, biologie végétale et écologie

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*, 40(8), 2689-2694.

Schopf, A., Nussbaumer, C., Rembold, H., & Hammock, B. D. (1996). Influence of the braconid

Glyptapanteles liparidis on the juvenile hormone titer of its larval host, the gypsy moth, Lymantria dispar. Archives of insect biochemistry and physiology, 31(3), 337-351.

Siebeneicher, S. R., Bradleigh, S., & Kenerley, C. M. (1992). Infection of the red imported fire ant by Beauveria bassiana through various routes of exposure. Journal of Invertebrate Pathology, 59(3), 280-285.

Tanada, Y., & Kaya, H. K. (2012). Insect pathology. Academic press.

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

TIFRIT, A. (2016). Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algériennes (Doctoral dissertation, ABBOUNI Bouziane).

Toksoy Öner, E. (2006). Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite Saccharomyces cerevisiae strain. Yeast, 23(12), 849-856.

Weiser J ,1972. Beauveria Vuill .Ein : Nemoci hmyzu . Naklad . Českoslo . Academie ,Prague , Republique tcheque , pp.361-377.

Wraight S.P., Jackson M.A et de Kock S.L. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) Fungi As Biocontrol Agents, Progress, Problems and Potential.253–288. CABI Publishing, New York.

Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin. Oxford University Press on Demand.

ZOUIOUECHE, F. Z. (2011). Comportement de la pyrale des dattes Ectomyelois ceratoniae Zeller, vis-à-vis de trois variétés de palmier dattier dans la région de Biskra (Doctoral dissertation).

### **Les sites d'internet**

[http://www.agri.huji.ac.il/mepests/pest/Ectomyelois\\_ceratoniae/](http://www.agri.huji.ac.il/mepests/pest/Ectomyelois_ceratoniae/))

<http://www.ctd.tn/fr/le-controle-phytosanitaire-du-palmier-dattier-211.html>

[HYPERLINK "http://www.cheminora.fr/sites"](http://www.cheminora.fr/sites)

[www.univ-brest.fr](http://www.univ-brest.fr)

journal of new sciences ,agri and biotech .[www.insciences.org](http://www.insciences.org).



### 1 . Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Pomme de terre .....	200 g
Glucose .....	20 g
Agar .....	15 g
Eau distillée.....	compléter jusqu'à 1000 ml

Laver la pomme de terre pelée.

Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.

Porter à ébullition pendant 1 heure.

D'autre part, faire fondre l'agar-agar dans 500 ml d'eau distillée chaude.

Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.

Ajouter le glucose.

Ajuster le volume à 1000 ml.

Stériliser par autoclavage à 121°C/20 min.

### 2 .Lactophénol bleu coton

(= BCL) : ce colorant est le meilleur bleu d'aniline utilisable en mycologie générale. Il est spécifique de la chitine, de la callose et du collagène. Il colore principalement la chitine présente dans les parois des hyphes. Chez de nombreux Ascomycètes il met également en évidence l'ornementation sporale (qualifiée alors de cyanophile) souvent caractéristique des espèces. L'acide lactique préserve les structures

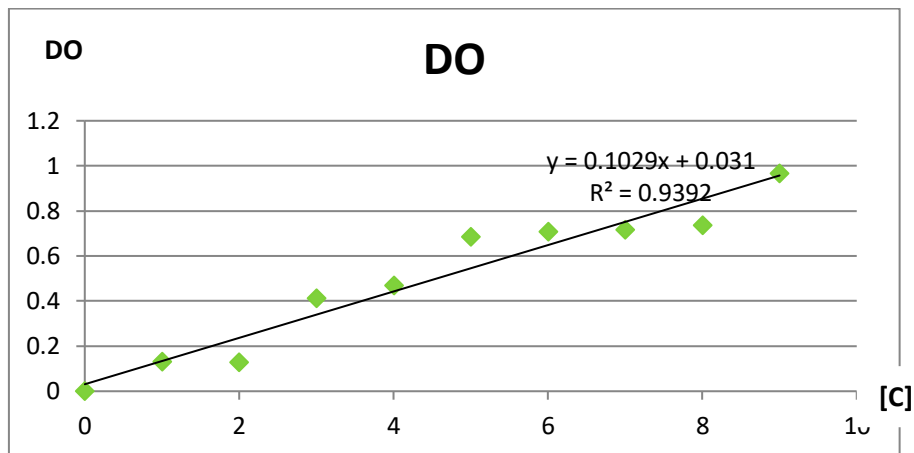
### 3. Tompon phosphate

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3g/250ml d'eau distilé
NaHPO <sub>4</sub> .....	4.7g/250ml d'eau distilé
Eau distillée.....	500ml

Le pH ajusté est 6.5.



#### 4 .La courbe d'étalonnage du glucose



L'absorbance de ces concentrations est mesurée à 575 nm avec le spectrophotomètre, la relation linéaire entre l'absorbance et la quantité de sucres des solutions étalons permet d'établir une relation mathématique liant ces deux valeurs.

Cette méthode permet de déterminer la concentration en sucre réducteur présente dans les échantillons.

## Résumé

Le présent travail n'est qu'une initiation dans la recherche des champignons capables de freiner le développement de cette pyrale, il consiste à isoler des champignons entomopathogènes à partir de *Ectomyelois ceratoniae* (zeller), les résultats de l'isolement, purification et de l'identification ont mise en évidence la présence des souches fongiques représentant 4 genres : *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Metarhizium* et *Penicillium* . L'effet de la température sur la production de l' $\alpha$ -amylase sur milieu à base de farine des déchets de carotte, par des souches fongiques isolées à partir de *Ectomyelois ceratoniae* (zeller) , Pour cela, des fermentations de trois jours à différentes températures (15, 30 et 45°C) ont été réalisées dans des flacons ; quatre moisissures ont été utilisées pour inoculer ces derniers. Les meilleurs résultats d'activité amylolytique sont été observés à 30°C et à 45°C, notamment sous la première. De ce fait, les Souches qui ont donné les bons rendements sont : *Penicillium sp.* (122,257 U) et, *Aspergillus niger* ( 81,82 U) à 30°C, *Metharizium sp.* (81,04 U) à 45°C et *Cladosporium sp.* (66,08 U) à 45°C.

**Mots clés** : Champignons entomopathogènes, *Ectomyelois ceratoniae*, alpha amylase, déchets de carotte, températures

---

## Summary

The present work is only an initiation in the research of mushrooms able to slow down the development of this borer, it consists in isolating entomopathogenic fungi from *Ectomyelois ceratoniae* (zeller), the results of the isolation, purification and of the identification showed the presence of fungals trains representing 4 genera : *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Metarhizium* and *Penicillium*. The effect of temperature on the production of  $\alpha$ -amylase on a flour-based medium of carrotwaste, by fungals trains *isolated from Ectomyelois ceratoniae* (zeller), for this, fermentations of threedays to different temperatures (15, 30 and 45 ° C) were performed in flasks ; four molds were used to inoculate these. The best results of amyolytic activity were observed at 30 ° C and 45 ° C, especially under the first. As a result, the strains that gave the good yields are : *Penicillium* sp. (122,257 U) and *Aspergillus niger* (81,82 U) at 30 ° C, *Metharizium* sp. (81.04 U) at 45 ° C and *Cladosporium* sp. (66.08 U) at 45 ° C.

**Key words** : Entomopathogenic fungi, *Ectomyelois ceratoniae*,, alpha amylase, carrot waste, temperatures.

## ملخص

العمل الحالي هو مجرد بدء البحث على الفطريات القادرة على إيقاف نمو الحفار بالارتكاز على عزل الفطريات الممرضة ونتائج العزل و التنقية و التحديد وجود سلالات فطرية *ceratoniae Ectomyelois* للحشرات انطلقا من منعزل *Cladosporium ;Metarhizium ;Aspergillus ;Penicillium*. ممثلة في اربعة اجناس

ان تأثير الحرارة على انتاج في وسط على اساس طحين الجزر بواسطة السلالات الفطرية المعزولة من المنعزل و لهذا تم تنفيذ تخمير ثلاثة ايام في درجات حرارة مختلفة 51 درجة مئوية.03 درجة *ceratoniae Ectomyelois* مئوية 54. درجة مئوية

اربعة فطريات استخدمت لتلقيح الخير افضل نتيجة للنشاط اليضي لوحظت في 03 درجة مئوية و 51 درجة مئوية *Aspergillus و Penicillium* (sp)257U.122 :خاصة الولى و بالتالي الساللة التي اعطت اداء جيد هي *niger*(81.82U) مئوية درجة 03 في *Metharizium sp*(81.04U) و مئوية درجة 54 في *Cladosporium* (sp)(66.08U) مئوية درجة 54 في .

الكلمات المفتاحية: الفا اميالز. بقايا الجزر. الحرارة. *ceratoniae Ectomyelois*. الفطريات الممرضة للحشرات

**Production de l'enzyme alpha amylase par des champignons entomopathogènes cultivés sur milieu à base de déchets de carottes.****Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie fongique**

Le présent travail n'est qu'une initiation dans la recherche des champignons capables de freiner le développement de cette pyrale, il consiste à isoler des champignons entomopathogènes à partir de *Ectomyelois ceratoniae* (zeller), les résultats de l'isolement, purification et de l'identification ont mis en évidence la présence de ..... souches fongiques représentant 4 genres : *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Metarhizium* et *Penicillium*. L'effet de la température sur la production de l' $\alpha$ -amylase sur milieu à base de farine des déchets de carotte, par des souches fongiques isolées à partir de *Ectomyelois ceratoniae* (zeller), Pour cela, des fermentations de trois jours à différentes températures (15, 30 et 45°C) ont été réalisées en erlenmeyers ; quatre moisissures ont été utilisées pour inoculer ces derniers. Les meilleurs résultats d'activité protéolytique ont été observés à 30°C et à 45°C, notamment sous la première. De ce fait, les souches qui ont donné les bons rendements sont : *Penicillium sp.* (122,257 U) et *Aspergillus niger* ( 81,82 U) à 30°C, *Metharizium sp.* ( 81,04 U) à 45°C et *Cladosporium sp.* (66,08 U) à 45°C.

**Mots clés :** Mots clés : Champignons entomopathogènes, *Ectomyelois ceratoniae*, alpha amylase, déchets de carotte, températures.

**Laboratoire de recherche :** Microbiologie de la faculté S.N.V (RDC)

Jury d'évaluation :

<b>Président du jury :</b>	<b>Mme ALMI H</b>	<b>(M.C.B- UFM Constantine).</b>
<b>Rapporteur :</b>	<b>Mme ABDALAZIZ O</b>	<b>(M.A.A - UFM Constantine).</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>Mme BENMASIKH A</b>	<b>(M.A.A - UFM Constantine).</b>

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