



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 Constantine1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة1
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 : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et biotechnologie Fongique.

Intitulé :

Mise en évidence de quelques activités enzymatiques des souches fongiques isolées à partir de la source thermique (Hammam Grouz) d'Oued el Athmania (Mila).

Présenté et soutenu par : GUERRAICHE Khaloua.
AISSANI Sara.

Le : 15 /07/2019.

Devant le Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. LEGHLIMI H. (M.C.A - UFM Constantine1).

Rapporteur : Mme. BELMESSIKH A. (M.A.A - UFM Constantine1).

Examineur : Mme. ABDELAZIZ W. (M.C.B - UFM Constantine1).

Année universitaire
2018 - 2019

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de nous a donné le courage, la force, la santé et la persistance pour achever ce travail

Nous remercions vivement et chaleureusement Melle BELMESSIKH Aicha, Maître assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Des Frères Mentouri Constantine1, pour avoir encadré et dirigé ce mémoire avec une grande rigueur scientifique.

On la remercie particulièrement pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, son soutien ainsi que sa patience, qui ont contribué à la réalisation et l'accomplissement de ce travail.

Nous exprimons également notre vive reconnaissance à Mme LEGHLIMI .H Maître de conférences A à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, l'Université Des Frères Mentouri Constantine1, pour avoir accepté de présider le jury de notre soutenance.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Melle ABDELAZIZ Wided Maître de conférences B à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, l'Université Des Frères Mentouri Constantine1, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire, qu'elle trouve ici nos sincères remerciements.

Enfin, nous remercions toute l'équipe des laboratoires de Microbiologie au (RDC), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Des Frères Mentouri Constantine1, qui nous ont accueilli et mis à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce mémoire tout au long de la période de recherche. Qu'ils trouvent ici notre respect et notre reconnaissance.



« Les batailles de la vie ne sont pas gagnées par les plus forts ni par les plus rapides mais par ceux qui n'abandonnent jamais »

*Ainsi, c'est tout simplement que
Je dédie ce mémoire :
A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux,*

*A ma mère **salima** qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Qui m'a guidé vers le bon chemin, et qui a fait le possible pour me voir réaliser mes rêves*

*A mon cher papa **Rabah** qui a su se montrer patient, encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...

*A mon frère **MOHAMMED** que dieu vous garde et vous protège que votre chemin soit plein succès.*

*À qui m'a laissé des beaux souvenirs, Cher mon grand-père **Ahmed** j'ai toujours senti que vous étiez à mes côtés que dieu vous garde dans son vaste paradis.*

*A toute la famille **Aissani** et **Ghemari**.*

A et tous nos professeurs qui nous ont enseigné un jour.

A tous ceux m'ont aidé de prêt ou de loin.



Sara.



Dédicace

De tout mon cœur je dédie ce modeste travail

A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage

A celle qui endeuillée pour me rendre heureuse

A celle qui attend chaleureusement ce jour : " ma chère Mère "

A celui qui a fait des grands efforts pour mon bonheur

A celui qui m'a orienté et m'a pris les secrets de la vie

" Mon père "

A mes très chères sœurs "Mariya", "Achouk" et "Bissan"

A Mes frères " Abde Imask " et " Louay "

A mon marié "Toumi"

*A mes chère tante **Habiba Loubna** et **Fahima** et tout ma grande famille qui
m'ont beaucoup soutenu moralement.*

De ce côté de la terre, merci infiniment a mes amis

*Asma, **Chayma**, **Aicha** et **Imen** pour leur appui*

*Constant, leur amitié et leur amour. Parce que finalement, le contenu de ce
travail est un reflet de l'amour....*

G. Khaloua

Liste des abréviations
Des figures
Des tableaux

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les moisissures

<u>1. Généralités</u>	3
<u>2. Classification</u>	3
<u>3. Le mode de reproduction</u>	4
<u>4. Conditions de croissance</u>	4
<u>4.1 Facteurs nutritionnels</u>	4
<u>4.1.1 Source de carbone et d'énergie</u>	4
<u>4.1.2 Source d'azote</u>	4
<u>4.1.3 Sels minéraux</u>	5
<u>4.2 Facteurs physicochimiques</u>	5
<u>4.2.1 Température</u>	5
<u>4.2.2 pH</u>	5
<u>4.2.3 Humidité</u>	5
<u>5. Intérêt industriel</u>	6
<u>5.1 Domaine alimentaire</u>	6
<u>5.2 Domaine médical et pharmaceutiques</u>	7
<u>5.3 Autres domaines</u>	7
<u>6. Le monde des extrêmophiles</u>	7
<u>6.1 Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles</u>	7
<u>6.2 Les champignons thermophiles et thermotolérants</u>	8
<u>6.3 Habitats des champignons thermophiles</u>	9

Chapitre 2 : le sol

<u>1. Généralités</u>	10
<u>2. Composition du sol</u>	10
<u>2.1 Phase solide du sol</u>	11
<u>2.2 Phase liquide</u>	11
<u>2.3 Phase gazeuse</u>	11
<u>3. Le Sol et les mycètes</u>	12

Chapitre 3 : les enzymes

<u>1. Généralités</u>	14
<u>2. Les carbohydrases</u>	14
<u>2.1 L'amylase</u>	14
<u>2.1.1 Définition</u>	14
<u>2.1.2 Mécanisme d'action</u>	14
<u>2.1.3 Source microbienne de l'α-amylase</u>	15
<u>2.1.4 Utilisation industrielle de l'α-amylase</u>	15
<u>2.2 La cellulase</u>	15
<u>2.2.1 Définition</u>	15
<u>2.2.2 Mode d'action</u>	16
<u>2.2.3 Source microbienne de cellulase</u>	16
<u>2.2.4 Utilisation industrielle de cellulase</u>	16
<u>3. La Protéase</u>	17
<u>3.1 Définition</u>	17
<u>3.2 Mode d'action</u>	17
<u>3.3 Sources microbienne</u>	18
<u>3.3.1 Protéases bactériennes</u>	18
<u>3.3.2 Protéases fongiques</u>	18
<u>3.4 Utilisation industrielle de protéase</u>	19
<u>4. L'estérase</u>	19
<u>4.1. Définitions</u>	19
<u>4.2. Mode d'action</u>	19

<u>4.3.1 Source microbienne</u>	20
<u>4.3.2 Utilisation industrielle des lipases</u>	20
<u>5. La tyrosinase</u>	21
<u>5.1 Définition</u>	21
<u>5.2 Mode d'actions</u>	21
<u>5.3 Source microbienne</u>	22
<u>5.4 Utilisations industrielles de tyrosinase</u>	23
<u>6. La Pectinase</u>	24
<u>6.1 Définition</u>	24
<u>6.2 Mode d'action</u>	24
<u>6.3 Source microbienne</u>	25
<u>6.4 Utilisation industrielle de la pectinase</u>	25

Matériel et méthodes

<u>1. Etude de site</u>	26
<u>2. Echantillonnage</u>	27
<u>3. Isolement des souches fongiques</u>	28
<u>3.1 Dilutions</u>	28
<u>3.2 Ensemencement</u>	28
<u>4. Purification des souches fongiques</u>	29
<u>5. Identification des souches</u>	29
<u>5.1 Identification macroscopique</u>	29
<u>5.2 Identification Microscopique</u>	30
<u>5.3 Conservation des souches</u>	30
<u>6. Mise en évidence des activités enzymatiques</u>	30
<u>6.1 Recherche des carbohydrases</u>	30
<u>6.1.1 Recherche de la cellulase</u>	30
<u>6.1.2 Recherche de l'amylase</u>	30
<u>6.2 Recherche des protéases</u>	31
<u>6.2.1 Recherche d'une caséinase</u>	31
<u>6.2.2 Recherche d'une gélatinase</u>	31
<u>6.3 Recherche des lipases</u>	

<u>6.3.1 Recherche des estérases</u>	31
<u>6.3.2 Recherche d'une lécithinase (lipases)</u>	32
<u>6.4 Recherche d'une uréase (urée hydrolase)</u>	32
<u>6.5 Recherche de la tyrosinase</u>	32
<u>6.6 Recherche d'une pectinase</u>	32
<u>7. Etude de la production de protéase par fermentation en milieu solide</u>	33
<u>7.1. Microorganisme</u>	33
<u>7.3 Préparation des disques</u>	33
<u>7.4 La fermentation en milieu solide</u>	34
<u>7.4.1 Préparation de milieu de culture</u>	34
<u>7.4.2 Conduite de la fermentation</u>	34
<u>8. Etude de l'activité protéolytique produite</u>	35
<u>8.1 Préparation des extraits enzymatiques</u>	35
<u>8.2 Détermination de l'activité enzymatique</u>	35

Résultats et discussion

<u>1. Caractéristique des échantillons du sol</u>	37
<u>2. Isolement des moisissures du sol</u>	38
<u>3. Identification des souches</u>	38
<u>3.1 Etude macroscopique</u>	39
<u>3.2 Etude macroscopique</u>	44
<u>4. Mise en évidence des activités enzymatiques</u>	53
<u>4.1 Dégradation de l'amidon</u>	53
<u>4.2 Dégradation de cellulose</u>	55
<u>4.3 Dégradation de la caséine</u>	55
<u>4.4 Dégradation de la gélatine</u>	58
<u>4.5 Dégradation l'estérase</u>	58
<u>4.6 Dégradation de lécithine</u>	59
<u>4.7 Dégradation de l'urée indole</u>	61
<u>4.8 Dégradation de la tyrosine</u>	62
<u>4.9 Dégradation de pectine</u>	63
<u>5. Présentation des résultats de fermentations</u>	67
<u>5.1 Résultats du pH</u>	67
<u>5.2 Résultats de l'activité protéolytique</u>	67

Conclusion	69
Références bibliographique	71
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

PDA : Potato Dextrose Agar.

TCA : TriChloroacetic Acide.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

°C : Degré Celsius.

G : Gramme.

µg : Microgramme.

rpm : Rotation par minute.

U : Unité.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

nm : Nanomètre.

L : Litre.

E.C : *Enzyme commission.*

A_w : *Activity of water.*

N : Normalité.

FMS : Fermentation sur milieu solide.

Tris-HCL : Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride.

GN : Gélose Nutritive.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

Liste des figures

Figure 01 : coupe vertical d'un sol	11.
Figure 02 : Acide aminés du site actif de protéase.....	17.
Figure 03 : Mécanisme d'action des protéases.....	18.
Figure 04 : o-hydroxylation du Mono phénol	21.
Figure 05 : oxydations des o-diphénols en o-quinones	21.
Figure 06 : les principales étapes de formation de mélanine.....	22.
Figure 07 : Formations d'Eumelanin et Phéomélanine à partir de la tyrosine avec catalyse de différentes enzymes, y compris l'enzyme tyrosine	22.
Figure 08 : Mode d'action de la pectinase.....	24.
Figure 09 : Localisation de la source thermique étudiée sur la carte.....	26.
Figure 10 : La source thermique des prélèvements (<i>Hammam Grouz, Mila</i>).	27.
Figure 11 : Le premier site	27.
Figure 12 : Le deuxième site	27.
Figure 13 : Etapes de prélèvements du sol	28.
Figure 14 : <i>Aspergillus versicolor</i>	33.
Figure 15 : Préparation des disques.....	34.

Figure 16: Préparation de fermentation sur un milieu solide.....	35.
Figure 17: La Répartitions des genres fongiques isolés du sol Hammam Grouz.....	51.
Figure 18: Principe de révélation de l'activité amylase par le <i>lugol</i>	52.
Figure 19: Zone d'hydrolyse de la souche testée de l'amidon après 7 jours.....	53.
Figure 20: Formation d'un halo claire autour de la colonie	55.
Figure 21 : Représentation de la zone de croissance et de la zone d'hydrolyse chez les Souches retenues	56.
Figure 22: Formation d'un halo opaque autour de la colonie	57.
Figure 23: Représentation de la révélation de l'activité estérase	58.
Figure 24: Représentation de l'activité lécithénase.....	59.
Figure 25: Mettre en évidence la présence d'une uréase	60.
Figure 26: Principe de révélation de l'activité tyrosinolytique.....	61.
Figure 27: Résultat de l'activité tyrosinolytique des 16 souches.....	62.
Figure 28 : Principe de révélation de l'activité pectinolytique par l'acétate de cuivre.....	64.
Figure 29: Zones d'hydrolyse de pectine par les 16 souches testées	63.
Figure 30: Répartition de l'activité enzymatique selon la nature de substrat dégradé	64.
Figure 31 : Résultat de l'activité protéasique sous les quatre températures	67.

Listes des tableaux

Tableau 01 : Prèncipales caractéristiques de classification des moisissures	3.
Tableau 02 : Classification des micro-organismes en fonction de leurs température cardinales	8.
Tableau 03 : Distribution des microorganismes en fonction du sol	13.
Tableau 04 : Exemples de protéases utilisées en industrie	19.
Tableau 05 : Source de tyrosinase	23.
Tableau 06 : Quelques applications industrielles de tyrosinase.	23.
Tableau 07 : Les microorganismes producteurs de la pectinase	25.
Tableau 08 : Caractéristiques des échantillons	37.
Tableau 09 : Isolement des souches fongiques issues d'échantillons des sols.....	38.
Tableau 10 : Étude macroscopique des souches fongique isolé à partir d'échantillon de sol D'arbre (site 1)	39.
Tableau 11 : Étude macroscopique des souches fongique isolée à partir d'échantillons de sol pré de la source thermal	41.
Tableau 12 : Caractères microscopique des souches fongique isolé site 1	45.
Tableau 13 : Caractères macroscopique des souches fongique isolé site 2.....	47.
Tableau 14 : Mise en évidence de l'activité protéolytique sur lait gélosé.....	56.
Tableau 15 : Les microorganismes producteurs de la pectinase	60.

Tableau 16 : Résultat de l'activité enzymatique des 16 souches étudiée **64.**

Tableau 17 : Résultat de pH de culture après fermentation **66.**

Tableau 18: Résultat de l'activité protéolytique après fermentation **67.**

Introduction

Introduction

Au cours des dernières décennies, le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers, modifiés génétiquement ou non et susceptibles d'être utilisés dans des procédés de production de vitamines, d'hormones, de vaccins et d'enzymes (Scriban, 1999).

Actuellement, la compétition est très forte dans le monde des enzymes industrielles et les prix de ces produits d'hautes technologies sont à la baisse entraînant des réductions majeures dans les coûts de production. La capacité de l'industrie de produire des faibles coût est donc essentielle pour maintenir sa compétitivité (Nathalie, 1999).

La première étape principale, pour la production d'une enzyme consiste à sélectionner un micro-organisme adéquat qui soit capable de la produire, le plus rapidement possible, à des concentrations convenables. Pour atteindre ce but, il est nécessaire d'isoler et de sélectionner des micro-organismes possédant la caractéristique souhaitée. De ce fait, la sélection d'un micro-organisme constitue une des étapes importantes en Biotechnologie (Anburye et *al.*, 1995).

Les recherches sur les micro-organismes thermophiles sont en train d'acquérir un intérêt considérable, principalement pour la production d'enzymes thermostables utilisées dans des procédés industriels (Barbier; 1994). Vu la vitesse de croissance très élevée à 50°C de ces microorganismes thermophiles, on pourrait supposer que la biosynthèse de produits issus de leur métabolisme serait particulièrement rapide (Cooney et Erson 1964). Par ailleurs, il y a des nombreuses évidences qui suggèrent l'existence d'une corrélation entre la thermophile des champignons et la thermostabilité de leurs protéines, en particulier de leurs enzymes (Crisan, 1973).

La majorité des enzymes fongiques sont produites principalement par des genres d'*Aspergillus*, *Mucor*, *Entothia*, *Rhizopus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Vishwanatha et *al.*, 2010). Ces espèces fongiques sont caractérisées par leur adaptation aux cultures solides à base des substrats bon marché, facilitant ainsi l'extraction et la récupération des enzymes extracellulaires à partir des milieux de fermentation avec des rendements rentables tout en réduisant les coûts d'exploitation (Sathya et *al.*, 2009).

Pour ces raisons, il nous a paru intéressant d'isoler de nouvelles souches des champignons filamenteux thermophiles afin d'étudier la production de plusieurs types d'enzymes par ces souches.

Dans ce cadre de travail nous sommes intéressées d'isoler et identifier des moisissures à partir d'un écosystème extrême sol proche d'une source thermale. On a procédé à certaines applications pratiques pour réaliser les objectifs suivants :

- Echantillonnage et prélèvement du sol d'une source thermale de *Hammam grouz* d'Oued *el Athmania (Mila)*.
- Isolement des souches fongiques à partir de ce sol.
- Identification macroscopique et microscopique des isolats purifiés.
- Mise en évidence de quelques activités hydrolases de sur milieux gélosés.
- Et enfin, l'étude de l'influence de la température sur la production de la protéase alcaline en milieu de fermentation à base de déchets de tomates.

- *Revue bibliographique*

1. Généralités

Les moisissures sont des champignons microscopique eucaryotes, hétérotrophes non photosynthétique et immobiles (à cause de la rigidité de leur paroi), certains vivent en symbiose avec des végétaux et d'autres sont parasites des végétaux aux animaux, d'autres sont saprophytes, possèdent un appareil végétatif dépourvu de tiges, de racines et de feuilles appelés thalle ou mycélium, ce thalle détectable à l'œil nu est formé par ramifications des *hyphes* (filaments) au cours de leur croissance sur un substrat donné. La paroi de la plupart des moisissures est composée de la chitine; un polymère formé d'unité de N-acétyl glucosamine (Botton *et al.*, 1990).

Elles sont communément observées sur les déchets organiques et le pain rassis, le fromage ou les fruits. Elles constituent avec les levures les deux groupes de champignons microscopiques ou mycètes. Ce sont des champignons pluricellulaires (filamenteux), alors que les levures sont des champignons unicellulaires (Madigan et Martinko, 2007).

Les moisissures sont aérobies, en général, Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc.) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes) (Madigan et Martinko, 2007).

2. Classification

La classification est basée sur la morphologie (structure du mycélium) et le mode de reproduction des moisissures (Davet, 1996). Ces derniers ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles des champignons microscopiques à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes (**Tableau 01**) (Bourgeois, 1989).

Tableau 01 : Principales caractéristiques de classification des moisissures (Bourgeois, 1989).

Phylum	Zygomycotina	Ascomycotyna	Basidiomycotyna
Vitesse de croissance	Rapide	Moyenne	Lente
Type de thalle	Siphonné	Septé	Septé
Spores sexuées	Spongiospores	Ascospores	Basidiospores

3. Mode de reproduction

L'appareil végétatif des moisissures est un thalle composé de filaments (*hyphes*) ramifiés, dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores, qui sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Certains champignons, chez lesquels les deux formes coexistent sont appelés holomorphes (Guiraud, 1998; Dao, 2005).

Les conidies sont des spores asexuées, elles peuvent être noires, bleues, vertes, rouges, jaunes ou brunes; leur présence donne au mycélium un aspect poussiéreux (Madigan et Martinko, 2007).

4. Conditions de croissance

Pour assurer leur croissance et développement, les moisissures comme tout autre microorganisme, utilisent les sources de carbones et d'énergie qu'elles trouvent dans leur environnement et qu'elles dégradent à l'aide d'enzymes selon Boiron (1996), le développement optimal (croissance et reproduction) des moisissures nécessite la connaissance et le contrôle des facteurs nutritionnels et physicochimiques du milieu de culture.

4.1 Facteurs nutritionnels

Les éléments nutritifs de base qu'exigent les moisissures pour se développer sont le carbone, l'azote et les minéraux (Davet, 1997).

4.1.1 Source de carbone et d'énergie

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme sources de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et *al.*, 2000). Certains d'entre elles produisent des lipases extracellulaires capable d'hydrolyser les lipides en glycérol et acide gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996 ; Tabuc, 2007).

4.1.2 Source d'azote

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sel (NH_4^+) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines).

L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (Boiron, 1996), alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt et al., 2002).

4.1.3 Sels minéraux

Certains minéraux, tels que le phosphore (assimilé sous forme H_2PO_4^-), soufre (assimilé sous forme sulfate ou composés réduits), potassium, etc., sont exigés à concentration relativement élevée (environ 10^{-3} M). Cependant, certains minéraux tels que le fer, cuivre, manganèse, zinc et molybdène sont exigés à concentration faible (10^{-6} M ou moins) (Boiron, 1996).

4.2 Facteurs physicochimiques

Les facteurs physicochimiques ont une influence importante sur le développement des moisissures. Parmi ces facteurs les plus importants :

4.2.1 Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). Les moisissures sont classées en quatre catégories selon la gamme de température à laquelle ils se développent (Roquebert, 1997).

Seulement quelques espèces des mycètes sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C). En effet, les mycètes thermophiles ont une température de croissance minimale inférieure à 20°C et maximale supérieure à 50°C (Brock, 1995). *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple (Botton et al., 1999 ; Nichlin et al., 2000).

4.2.2 pH

Les moisissures peuvent se développer dans une large gamme de pH allant de 4.5 à 8 (Larpent-gourgaud et Sanglier, 1992). Toutefois, les variations du pH peuvent influencer la croissance fongique, soit indirectement en agissant sur la disponibilité de certains nutriments, soit directement par action sur la membrane cellulaire, sachant que la plupart des moisissures peuvent ajuster le pH du milieu à leur convenance (Boiron, 1996).

4.2.3 Humidité

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (Bourgeois, 1989). Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au-dessous de - 4 MPa (Méga Pascal). Les moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'à -10 MPa. Cependant, les *Aspergillus* et les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de - 20 MPa (Davet, 1996).

5. Intérêt industriel

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

5.1 Domaine alimentaire

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

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

5.2 Domaine médical et pharmaceutiques

La diversité d'action des moisissures est remarquable dans le domaine de la santé. Elle se manifeste notamment dans la fabrication d'antibiotique (la pénicilline de *penicillium notatum*), de vitamines, d'hormones et de nombreuses substances pharmacologiquement actives (Leveau et Bouix, 1993; Ellaiah et al., 2003).

La production industrielle en vitamines se limite à une partie de la synthèse de la riboflavine produite spécialement par *Eemothecium ashbyii* cultivé en milieu agité et supplémenté en lipides. La vitamine A pourrait faire l'objet d'une production microbiologique par les champignons notamment les espèces de l'ordre des mucorales (Botton et al., 1999).

5.3 Autres domaines

Certaines moisissures luttent contre la pollution. Un rôle anti-mucor du genre *penicillium*, conduisant ainsi à l'élimination de problème appelée couramment accident de « poil du chat » (Samson et al., 1977). Une culture mixte des moisissures et levures (*Mucor hiemalis*, *Aspergillus niger* et *Galactomyces geotrichum*), est utilisée dans la biodégradation d'effluents industriels en éliminant ainsi la pollution causée par la décomposition de la matière carbonée (Djelal et Perrot 2009).

6. Le monde des extrêmophiles

Un environnement est qualifié d'extrême lorsque les paramètres physico-chimiques qu'il renferme sont le plus souvent hostiles à la vie conduisant en une spécialisation et/ou une diminution de la biodiversité existante : pH inférieur à 5 ou supérieur à 9, pression supérieure à 20 MPa, température supérieure à 50°C ou inférieure à 10°C, et des concentrations en sels supérieures à 3-4 % en NaCl jusqu'à saturation (35 % en NaCl) (Deverall, 1965).

6.1 Les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles

La température joue un rôle très important et souvent décisif pour la distribution des organismes sur la surface de la terre. Les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles vivent à des températures optimales de croissance de l'ordre de 60°C et 80°C, respectivement. Ces micro-organismes sont retrouvés dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives. Ces écosystèmes peuvent avoir une origine géothermique terrestre ; la nature de l'eau va dépendre

des roches traversées et elle est généralement associée à une activité volcanique ; la température de l'eau *in situ* sera fonction de la profondeur d'origine pour atteindre des températures inférieures à 100°C et des pH acides ou basiques à la surface de la terre (Deverall, 1965).

Tableau 02 : Classification des micro-organismes en fonction de leurs températures Cardinales (Deverall, 1965).

Microorganisme	Températures cardinales (°C)		
	Minimale	Optimale	Maximale
Psychrophile	≤ 0	15	≤ 20
Psychrotolérant	≤ 0	2-5-30	35
Mésophile	5	25-30	35
Thermotolérant	5	25-30	≥ 40
Thermophile	20	≤ 45	> 50

6.2 Les champignons thermophiles et thermotolérants

Les champignons, comme tous les autres groupes de micro-organismes, ont évolué pour s'adapter aux variations de températures environnementales et occuper un vaste domaine dans les écosystèmes, essentiellement terrestres. À des températures inférieures à 0°C, les cellules fongiques peuvent survivre, mais, elles se développent rarement. Au-dessus de 40°C, la plupart de champignons arrêtent leur croissance et sont détruits (Deverall, 1965). De ce fait, la majorité de moisissures sont des microorganismes mésophiles et se développent normalement à une température comprise entre 5°C et 35°C, avec un optimum situé entre 25° et 30°C.

Exceptionnellement quelques champignons peuvent se développer à des températures supérieures à 50°C et ils sont appelés thermophiles ou thermotolérants. Egalement, quelques autres champignons peuvent montrer une préférence pour les basses températures et sont considérés comme psychrophiles ou psychrotolérants (Dix et Webster, 1995). Le tableau 02 présente les cinq groupes de champignons classés par rapport à la température. Cependant, il faut signaler que ces distinctions sont données seulement à titre indicatif.

Le premier champignon thermophile (*Mucor pusillus*) a été décrit en 1886 par Lindt (1964). Jusqu'aux années 1950, uniquement cinq souches avaient été décrites. En 1964, grâce aux études réalisées par Cooney et Emerson, une quinzaine de souches thermophiles ont été parfaitement bien identifiées. Plus tard, Crisan (1973) a décrit une trentaine de souches thermophiles et thermotolérantes. À nos jours, la découverte de nouveaux champignons thermophiles n'a pas avancé et il existe seulement trente champignons thermophiles décrits (Ingold et Hudson, 1993).

6.3 Habitats des champignons thermophiles

Il est bien connu que les champignons thermophiles se développent à des températures élevées, en habitats naturels ou chauffés par les activités humaines (Ellis, 1980a, 1980b). Néanmoins, contrairement aux possibles suppositions, il n'y pas d'évidences indiquant que les champignons thermophiles soient plus communs sur les sols tropicaux chauds que les mésophiles (Dix et Webster, 1995). De plus, les champignons thermophiles sont distribués sur toutes les latitudes, même sur les sols de l'antarctique où les températures sont inférieures à 0°C pendant presque toute l'année (Ellis, 1980b).

• Généralités

Plusieurs définitions ont été adoptées par des scientifiques parmi lesquelles on a le sol s'élabore à l'interface des trois domaines distincts qui sont :

La lithosphère ou partie rocheuse de l'écorce terrestre.

L'atmosphère.

La biosphère.

Cette origine mixte du sol constitue un caractère original et fondamental qui permet d'expliquer l'essentiel de ses propriétés (Lacoste et Salanon, 2001).

Joffe (1949) en propose la définition suivante :

- Le sol est un corps naturel de constitution minérale et organique, différencié en Horizons d'épaisseur variable qui diffère des matériaux sous-jacent par sa morphologie, ses propriétés physiques et chimiques, sa composition et ses caractéristiques biologiques.

- Le sol est un des compartiments essentiels de l'écosystème agissant comme contrôleur et révélateur de nombreux processus écologiques par ses caractères «physiques, chimiques et biologiques» à court et à long terme: le sol devrait être le meilleur reflet du processus écosystémique (Ingrubb et Whittaker, 1989 *in* Davet, 1996).

2. Composition du sol

Le sol considéré comme un système composé de quatre compartiments; les trois phases, solide, liquides et gazeuse, et les organismes vivants. Ces compartiments sont en interaction permanente par des échanges de matière et d'énergie dus à plusieurs phénomènes physiques, chimiques et biologiques (**Figure01**) (Calvet, 2003).

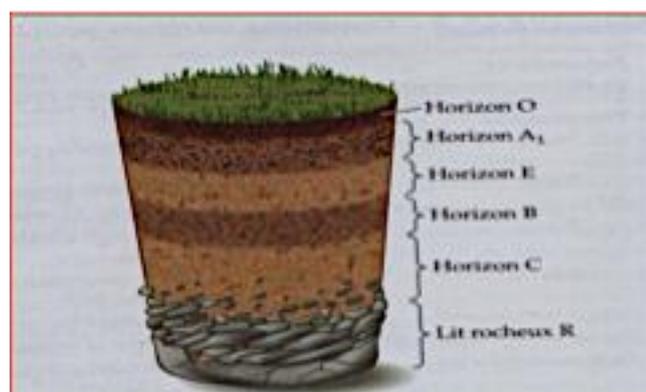


Figure 01: Coupe verticale d'un sol (Lansing et *al.*, 2003).

2.1 Phase solide du sol

Elle est constituée des matières minérales (inorganiques) provenant de l'érosion des roches (Jerome et *al.*, 2004) et des matières organiques en proportion variable. On pourrait considérer les organismes vivants du sol font partie de la phase solide non inerte puisqu'ils sont ni gazeux, ni liquides (Calvet, 2003).

Pour les matières minérales leur nature dépend à la fois des roches sur lesquelles les sols se sont formés et des conditions de cette formation (Calvet, 2003). Concernant l'humus (constituants organiques), celui-ci contient les produits de décomposition partielle des végétaux, ainsi que certaines matières végétales peu dégradables comme la lignine ou les acides humiques (Jerome et *al.*, 2004). On distingue deux fractions dans le sol : fonction minéral et fonction organique.

2.2 Phase liquide

La phase liquide n'est pas l'eau pure mais est une solution dont la composition est complexe et très variable, ou la désigné par l'expression solution du sol .Elle contient de très nombreuses substances dissoutes organiques et inorganiques, ionisés et non ionisés (Calvet, 2003). La teneur global en eau d'un sol est soumis à des changements très rapides, fonction de précipitations, de l'évapotranspiration, et des remontées capillaires (Gobat et *al.*, 2003).

2.3 Phase gazeuse

La phase gazeuse du sol est encore appelé l'atmosphère du sol. L'air du sol contient en général les mêmes substances que l'air atmosphérique mais sa composition peut être différente en raison, en particulier de l'activité biologique (Sposito, 1989 *in* Calvet, 2003).

3. Le Sol et les mycètes

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes (**Tableau03**) et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres (Bugmann, 1996 ; Moallaei et *al.*, 2006; Sun et Liu; 2008 ; Garrido-Jurado et *al.*, 2011 ; Anderson et Martens, 2013). Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark and Zarnoch, 1992; Madigan et *al.*, 1997 ; Subler et

Kirsch, 1998 ; Katterer and Andren , 2001).

L'évaluation de la biomasse des microorganismes a montré que dans la plupart des sols, les mycètes sont le composant principale (Baath et Soderstrom, 1980 ; Schnürer et *al.*, 1985). Certaines espèces fongiques se retrouvent sur la plupart des terrains, comme les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicoecum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Zygorhynchus*, *Chaetomium*, *Gymnoascus*, etc. On y retrouve aussi communément des *Oomycetes* et des *Chytridiomycetes* (Boiron, 1996).

Les mycètes du sol comportent les saprophytes, les symbiotiques (mycorhizes) et les parasites selon la façon dont ils obtiennent leur carbone et énergie (Christensen, 1989 ; Senal et *al.*, 1993 ; Prescott et *al.*, 1995).

Décomposeurs, les mycètes saprophytes, convertissent le matériel organique mort en biomasse fongique, dioxydes de carbone (CO₂), et petites molécules telles que les acides organiques. Ces mycètes emploient généralement les substrats complexes, tels que la cellulose et la lignine, du bois, et sont essentiels en décomposant les structures d'anneau de carbone dans quelques polluants. Quelques mycètes s'appellent les " mycètes de sucre " parce qu'ils emploient les mêmes substrats simples que beaucoup de bactéries.

Comme les bactéries, les mycètes sont importants pour immobiliser, ou maintenir, des aliments dans le sol. En outre, plusieurs des métabolites secondaires des mycètes sont les acides organiques, celles-ci aident à augmenter l'accumulation de la matière organique riche d'acide humique qui est résistante à la dégradation et peut rester dans le sol pour des centaines d'années.

Mutualistes - les mycètes mycorhize - colonisent les racines des plantes. En échange du carbone de la plante, à l'aide de mycètes mycorhize solubilisent le phosphore et apportent des aliments de sol (phosphore, azote, microéléments nutritive, et peut-être eau) à la plante (Ingham, 2000; Tisdall et *al.*, 2012).

Tableau 03 : Distribution des microorganismes en fonction du sol (Quénéa, 2004).

Profondeur (cm)	Bactéries Aérobie	Bactéries Anaérobies	Actinomycète	Champignons	Algue
3- 8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5

35-40	472	98	49	14	0.5
65-75	10	1	5	6	0.1
135-145	1	0.4	-	3	-

1. Généralités

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (de 10 000 jusqu'à 100 000 daltons), qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10^6 fois, par rapport à la réaction en leur absence (Granner, 2008). Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel dans plusieurs procédés métaboliques. Autre fonction importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables (Meunier, 1999). Elles sont à la fois spécifiques du type de réaction catalysée et d'un seul substrat ou d'un petit ensemble de substrats fortement apparentés (Granner, 2008). Plusieurs enzymes sont potentiellement importants car ils sont utilisés en des applications industrielles très intéressantes et très variées. Parmi ces enzymes on distingue :

2. Les carbohydrases

2.1 L'amylase

2.1.1 Définition

L' α -amylase, comme tous les enzymes, est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires, dont le rôle biologique est d'hydrolyser l'amidon (Mercier, 1985).

L' α -amylase [α -(1 \rightarrow 4)-D-glucane glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] est une endoamylase qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques de (1 \rightarrow 4) l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène à l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes (Mercier, 1985 et Keating et *al.*, 1998).

2.1.2 Mécanisme d'action

L' α -amylase d'origine végétale, animale ou microbienne agit sur les polysaccharides (Amidon, glycogène). L' α -amylase appartient à la famille des endo-amylases qui catalysent l'hydrolyse initiale de l'amidon en oligosaccharides plus courts (résidus glucose terminaux), les liaisons α (1,6) ne peuvent être clivées par L' α -amylase. L' α -amylase présente la possibilité d'attaquer les chaînes d'amylopectine de deux façons différentes : soit en se fixant sur une chaîne et y effectuer plusieurs cycles de coupures (attaque multienzymatique), c'est le cas de l'amylase pancréatique ; soit en se fixant sur une chaîne pour y effectuer une coupure puis après libération des produits, se détacher de la chaîne pour attaquer une autre chaîne (attaque

préférentielle), c'est le cas des amylase de *Bacillus subtilis* ou d'*Aspergillus oryzae*.

2.1.3 Source microbienne de l' α -amylase

Les amylases fongiques ont été largement utilisées pour la préparation des aliments orientaux. En dépit de la large distribution des amylases, de source microbienne, à savoir les amylases fongiques et bactériennes ; elles sont utilisées pour la production industrielle en raison du coût-efficacité, la cohérence, moins de temps et d'espace requis pour la production et la facilité de l'optimisation. (Burhan et al., 2008). Parmi les bactéries amylolytiques on trouve, *Bacillus* qui est largement utilisé pour sa production. L' α -amylase thermostable afin de répondre aux besoins industriels. *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* sont connus pour être de bons producteurs d'une amylase et ceux-ci ont été largement utilisés à des fins commerciales.

De même, les champignons filamenteux ont été largement utilisés pour la production des amylases depuis des siècles. Etant donné que ces espèces sont connues pour être des producteurs de protéines extracellulaires, ils sont largement exploités pour la production des enzymes différentes, y compris l' α -amylase (Pandey et al., 2003). Les champignons appartenant au genre *Aspergillus* ont été les plus couramment employés pour la production d' α -amylase et l'utilisation de ces enzymes par fermentation en milieu solide.

2.1.4 Utilisation industrielle de l' α -amylase

Les α -amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels autres qu'alimentaires (industrie pharmaceutique, textile, papeterie et détergents), en raison de leur productivité et thermo stabilité (Burhan et al., 2003).

Il existe de nombreuses applications potentielles largement utilisées de cette enzyme sur le plan industriel telles que : l'hydrolyse de l'amidon dans la production de fructose et les sirops de glucose, dans la boulangerie au processus de cuisson du pain, à l'industrie du papier et le désencollage des textiles aussi au l'industrie de biocarburant.

2.2 La cellulase

2.2.1 Définition

L'enzyme de cellulase, formant un système enzymatique complexe se rapporte à un groupe d'enzymes qui agissant ensemble, hydrolysent la cellulose en sucres simples (Kader et al., 1999; Korish, 2003). Elle est l'une des principaux membres de la famille des glycosides

hydrolases. C'est un système enzymatique complexe, composé de trois types principaux : endo β (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4), exo β (1-4) glucanase ou celloiohydrolase (EC 3.2.1.91), β (1-4)-glucosidase ou cellobiase (EC3.2.1.21) (Xu, 2002).

2.2.2 Mode d'action

Les trois principaux types d'enzymes constituant le complexe cellulosique, peuvent présenter différents modes d'action :

- **Les endo-1,4- β -glucanase** : ces endoglucanases coupent aléatoirement les liaisons oglycosidiques internes donnant ainsi des chaînes glucanes de différentes longueurs.
- **Les exo-1,4- β -D-glucanase** : ces exoglucanases agissent de façon processive sur les extrémités libres des chaînes de cellulose libérant du β -cellobiose comme produit final.
- **Les β -glucosidases**: qui hydrolysent les disaccharides « β -cellobiose » et produisent le glucose (Bayer et *al.*, 1994 ; Singh, 1999).

Les endoglucanases et les cellobiohydrolases agissent directement sur le substrat solide après adsorption sur celui-ci tandis que, les β -glucosidases agissent en milieu homogène sur le substrat soluble (Bayer et *al.*, 1994).

2.2.3 Source microbienne de cellulase

Les cellulases sont des enzymes synthétisées par une grande diversité de microorganisme : *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis*, *Piromonas commmunis*, *Chytridomycètes*, *Trichoderma viridae*, *T. reesei*, *T. koningii*, *Aspergillus aculeatus* *A.nidulans*, *A. oryzae*, *A niger*, *A. terreus*, *Fusarium solani*, *Sporotrichumpulver lentum*, *Chaetomium cellulolyticum* (Béguin et Aubert, 1992).

2.2.4 Utilisation industrielle de cellulase

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson, 1987) et ensuite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Bhat, 2000, Lekchiri et *al.*, 2006). Les performances élevées atteintes leurs ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban, 1993), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes (Gao *et al.*, 2008). L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la

biomasse lignocellulosique.

3. La Protéase

3.1 Définition

Une protéase (également appelée peptidase ou protéinase) est une enzyme qui effectue une protéolyse, c'est-à-dire qu'elle catabolise les protéines par hydrolyse des liaisons peptidiques qui relient les acides aminés ensemble dans une chaîne polypeptidique. Les protéases représentent la plus grande catégorie d'enzymes et constituent un très grand groupe complexe avec des variations importantes des propriétés physico-chimiques et catalytiques (**Figure 02**) (Kumar et *al.*, 2016).

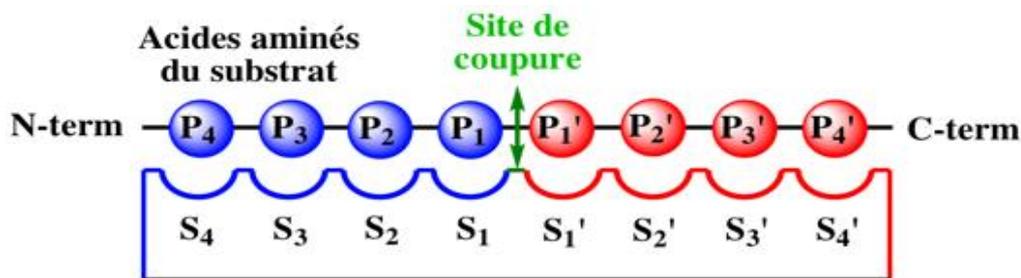


Figure 02 : Acide aminés du site actif de la protéase.

3.2 Mode d'action

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé dans trois étapes ; dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique, dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton de l'H₂O (**Figure 03**) (Pelmont, 1995).

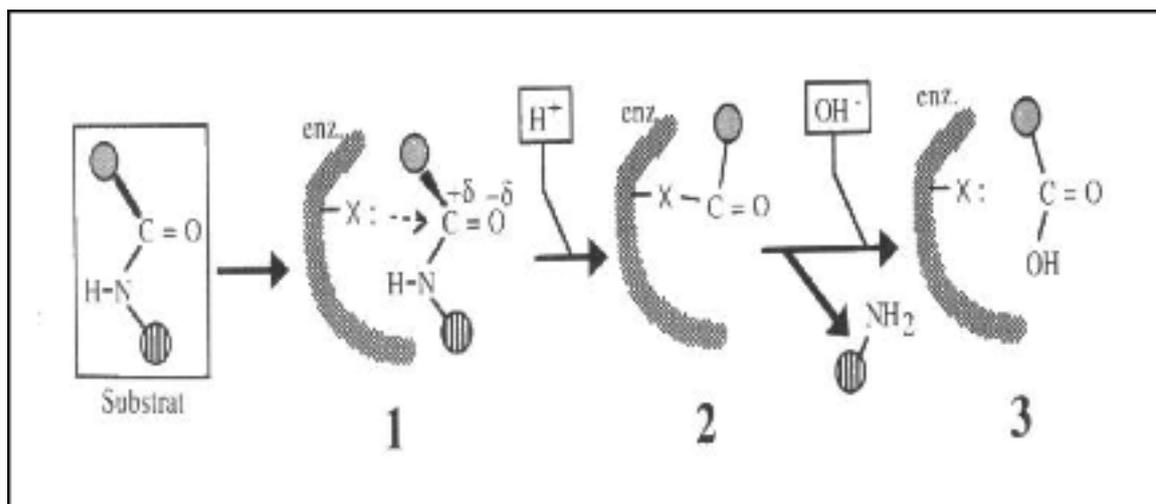


Figure 03 : Mécanisme d'action des protéases (Pelmont, 1995).

3.3 Sources microbienne

Les microorganismes sont les principaux producteurs, en raison de leurs avantages économiques et techniques (Jessika et Harumi, 2018). Ils constituent une part importante des besoins mondiaux en protéases commerciales (Kumar et *al.*, 2016).

La communauté microbienne est préférée pour la production à grande échelle de protéases, en raison de leur croissance rapide, facilité de manipulation et possibilité de production de nouvelles enzymes recombinantes ayant les propriétés désirées. Elles peuvent être extracellulaires ou intracellulaires et leur production est grandement influencée par des facteurs nutritionnels et physicochimiques, tels que la température, le pH, les sources d'azote et de carbone, les sels inorganiques, l'agitation et la concentration d'oxygène dissous (Kasana et *al.*, 2011).

3.3.1 Protéases bactériennes

Les protéases bactériennes ont une plus grande importance commerciale dans les industries de blanchisserie, de l'alimentation, du cuir et de la soie ; en raison de leur capacité de production élevée et de leur activité catalytique. *Alteromonas sp.*, *Brevibacterium linens*, *Lactobacterium helveticus*, sont les principales sources de protéases bactériennes (Kumar et *al.*, 2016).

3.3.2 Protéases fongiques

Les protéases fongiques ont attiré l'intérêt des recherches en raison de la grande diversité, de la large spécificité du substrat et de la stabilité dans des conditions extrêmes. Elles sont actives sur une large gamme de pH (de 4 à 11). Cependant, elles ont une vitesse de réaction et

une thermotolérance inférieure aux protéases bactériennes (Jisha *et al.*, 2013 ; Kumar *et al.*, 2016).

3.4 Utilisation industrielle de protéase

Les protéases constituent l'un des groupes les plus importants d'enzymes industrielles et académiques, représentant environ 65 % du marché annuel des enzymes. Elles ont des applications dans les industries alimentaires et des détergents où les protéases alcalines détiennent la plus grande part du marché mondial des enzymes. En raison de leurs applications répandues, de nombreuses industries ont commencé la production au niveau commercial. Le tableau 04 présente quelques protéases alcalines appliquées en industrie (Sundus *et al.*, 2017).

Tableau 04 : Exemples de protéases utilisées en industrie (Sundus *et al.*, 2017).

Nom de protéase	Industrie	Application
Savinase	Détergents	Enlever la tâche à base de protéines
Alcalase	Textile	Dégommage de soie
SEB Tender 70	Viande	Attendrissage de la viande
Peptidase	Alimentaire	Hydrolysats de protéines amères

4. L'estérase

4.1. Définitions

L'estérase font partie de la famille des hydrolases et peuvent d'hydrolyser plusieurs liens ester, dont les ester carboxylique. Les ester est des classes de composés qui comportent trois liaisons carbone-oxygène. Ces composés sont des dérivés des acides carboxyliques ou l'hydrogène du groupement hydroxyle est remplacé par un groupement carboné.(Brongstrom 1990).

4.2. Mode d'action

Le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice à amphiphile et d'une quinzaine d'acide aminés qui agit comme un volet ; lorsque l'hélice alpha recouvre le site actif d'enzyme, il est donc dans sa forme fermée ou inactive

(Fickers et *al.*, 2008).

Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme, suite au mécanisme d'activation inter faciale, il y'a un déplacement de l'hélice constituant le volet, la face hydrophobe de l'hélice orientée au pare avant vers l'intérieur du site actif s'expose au solvant créé une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface eau corps gras. Le site actif de l'enzyme est dès lors accessible aux substrats (Reis et *al.*, 2008).

4.3 Les lécithinase (lipases)

Les lipases forment une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser le triglycéride à longues chaînes d'acide gras en glycérol et en acide gras correspondants. Les lipases constituent une classe particulière d'estérase.

4.3.1 Source microbienne

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram + telle que celle des genres *Bacillus* et *Staphylococcus*. Elles sont largement répandues chez les levures de genre *Candida* ou *Geotrichum* ainsi que chez les champignons filamenteux tels que *Rhizopus* ou *Thermomyces*. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, d'avoir des procédés de fabrication relativement simples comparés aux lipases d'origine animale. (cygler et *al.*, 1995).

4.3.2 Utilisation industrielle des lipases

Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie, dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Elles interviennent dans la maturation des fromages et de certaines charcuteries (saucissons, salamis). L'hydrolyse de la matière grasse conduit, en fonction de la spécificité de l'enzyme utilisé, à la libération d'acides gras à courte chaîne (C4-C6) ou à plus longue chaîne (C12-C14), ce qui donne des arômes plus ou moins forts au produit. Les lipases sont également utilisées dans l'inter estérification d'huiles et de graisses pour produire des acylglycérols modifiés, impossibles à obtenir par des procédés de synthèse chimique conventionnels (Kim et *al.*, 2002).

5. La tyrosinase

5.1 Définition

La tyrosinase ou monophénol monoxygénase est une oxydoréductase qui catalyse l'oxydation des phénols, comme la tyrosine. Cette enzyme intervient dans deux réactions distinctes de biosynthèse de la mélanine : l'hydroxylation d'un monophénole et la conversion d'un o-diphénol en o-quinone, laquelle conduisant à la mélanine.

5.2 Mode d'actions

La tyrosinase est responsable de la formation de mélanine, laquelle est à son tour responsable de nombreux types de pigmentations. Les deux principales étapes des mécanismes décrits ci-dessus sont l'hydroxylation de mono phénol (**Figure 04**) et l'o-diphénol en o-quinone (**Figure 05**).

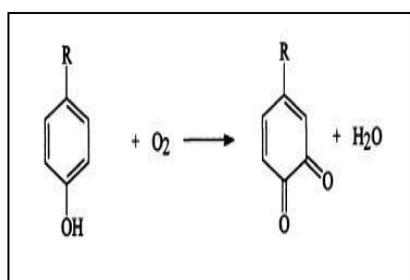


Figure 04 : o-hydroxylation des Monophénols .

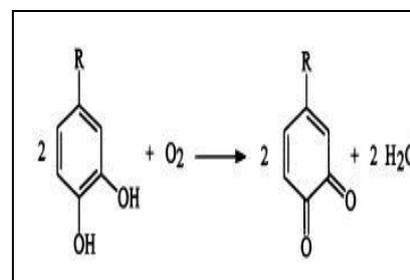


Figure 05 : oxydation des o-diphénols en o-quinones.

En effet, la mélanine se forme lorsque l'acide aminé de l'enzyme tyrosine se transforme en dopa. Le composé de dopa est ensuite converti en dopaquinone en présence de tyrosinase et c'est ici que l'enzyme joue son rôle vital, puis en différents types de mélanine selon plusieurs voies et en plusieurs étapes. Les étapes de ce processus sont décrites à la (**Figure 06**) tandis que la (**Figure 07**) décrit en détail la formation du processus chimique mélanine. (Mouhmod et Abidrahman 2017).

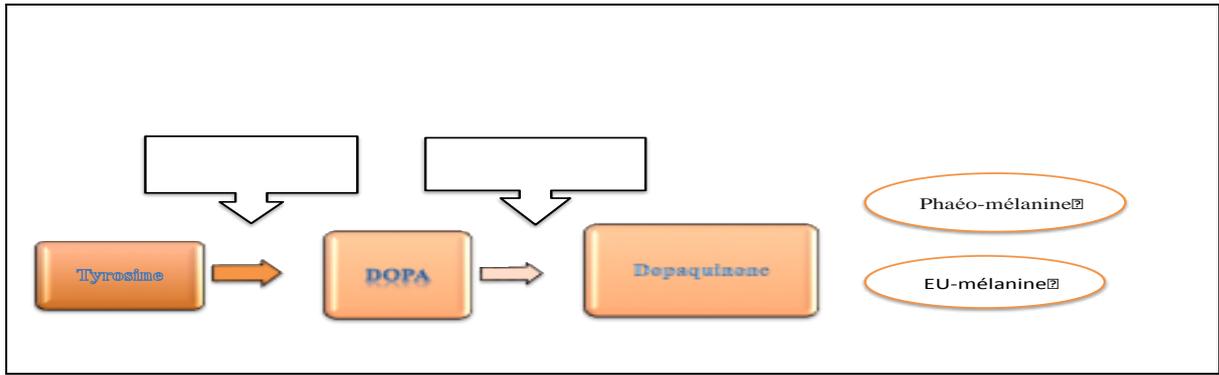


Figure 06 : Les principales étapes de formation de mélanine.

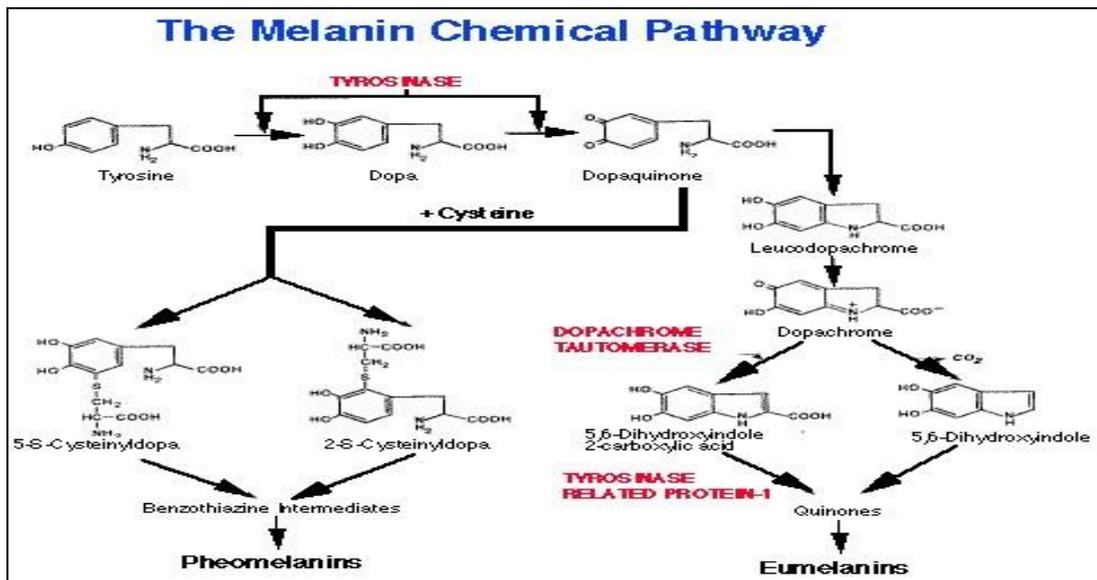


Figure 07 : Formation d'Eumelanin et Phéomélanine à partir de la tyrosine avec catalyse de différentes enzymes, y compris l'enzyme tyrosine.

5.3 Source microbienne

La tyrosinase peut être produite et extraite par le biais de nombreux organismes tels que bactéries, champignons, plantes et mammifères (Tableau05).

Tableau 05 : Source de tyrosinase. (Nakamura et al., 2000)

Champignons	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Amanita muscaria</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Pycnoporussanguineus</i>
--------------------	--

5.4 Utilisations industrielles de tyrosinase

Le tableau 06 ci-dessus représente les différentes applications et les domaines industriels utilisant l'enzyme tyrosinase.

Tableau 06 : Quelques applications industrielles de tyrosinase (Selinheim et al., 2008)

Domaines	Application
Industrie alimentaire	Dans le traitement des céréales pour améliorer la cuisson afin d'améliorer le volume et la structure des pains
Industrie alimentaire	Dans le traitement des produits laitiers pour relier diverses protéines lactières
Domaine médical	Comme pro médicament dans les essais immunologiques et les puces à ADN pour la production de L-DOPA et le traitement de problèmes neurologiques
Industrie textile	Modifier les fibres de laine et la production de différents colorants
Industrie cosmétique	Comme agent autobronzant
	Biocapteurs pour détecter les composés phénoliques toxiques

Importance environnementale	
------------------------------------	--

6. La Pectinase

6.1 Définition

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont des enzymes qui se caractérisent par leurs pouvoir de dégrader la pectine (Martinez-Trujilo et al.,2011). Elles forment un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine.

6.2 Mode d'action

Il est important de mentionner que les pectinases peuvent être classées en se basant sur la nature du substrat (pectine, acide pectique et oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) en deux groupes principaux d'enzymes dont les propriétés et le mode d'action sont les pectines estérases (PE) et dépolymérases (polygalacturonases et lyases) (**Figure 08**), (Favela- Torres et al., 2006).

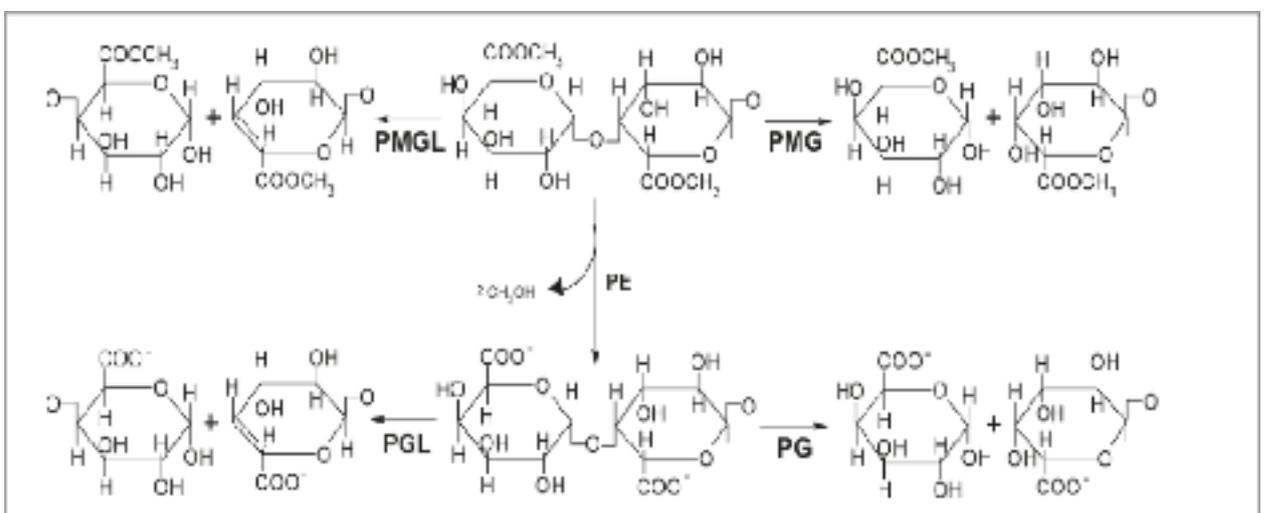


Figure 08 : Mode d'action de la pectinase (Jayani et al.; 2005).

6.3 Source microbienne

Les microorganismes producteurs de la pectinase sont récapitulés dans le tableau 07 (Djouldé Darman et *al.*, 2005 ; Priya et Sashi, 2014).

Tableau 07 : Les microorganismes producteurs de la pectinase.

Microorganismes	Espèces
Moisissures	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> <i>Mucor racemosus</i> <i>Penicillium jenseni</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>trichoderma viride</i>
Levures	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida tropicalis</i>

6.4 Utilisation industrielle de la pectinase

Ces enzymes sont classées parmi les enzymes les plus importantes dans le secteur industriel (Kasyap, et *al.*, 2001), en raison de leurs fréquentes et multiples utilisations. Comme titre d'exemple, on cite les pectinases acides utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruit (Rombouts et Pilink, 1986) et les pectinases alcalines faisant l'objet d'une immense utilisation dans le dégomme des fibres de ramie (Cao et *al.*, 1992), Pourtant en réponse à l'extrême usage biotechnologique de ces enzymes, ces dernières sont produites par plusieurs organismes comme les champignons (Aguilar et Huitron, 1990), les levures (Gainvors et Belarbi, 1995) ainsi que, les bactéries (Horikoshi, 1972 ; Karbassi et Vaughn, 1980).



Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie RDC. Université des Frères *Mentouri. Constantine*. Il consiste la mise en évidence des activités enzymatiques des souches fongiques issues du sol près d'une source thermique. Et de la production et l'extraction de la protéase, par une fermentation sur milieu solide.

1. Etude de site

Les échantillons de sol étudiés ont été prélevés à partir des sites répartis dans une source thermique (*Hammam Grouz*). Les coordonnées géographiques sont ($36^{\circ}14'11.98''N$, $6^{\circ}17'0.10''E$) en DMS (degrés, minutes, secondes) et à 712 d'altitude, situé dans la Wilaya de *Mila* à 1,5 Km de la ville de *Oued l'Athmania* et à 45 Km de l'ouest-sud-ouest de *Constantine* (**Figure 01**). La région de *Mila* a un climat sec et une pluviométrie annuelle de 300mm (sud) et 700mm (nord) (<http://www.algerieinfo.biz/algerie/wilaya/index.htm>). Le site comprend une source d'eaux chaudes (**Figure 02**). Elle est de nature saline, bicarbonatée calcique et chlorurée sodique, avec dégagement d'hydrogène sulfuré (Leghlimi ,2013).



Figure 09 : Localisation de la source thermique étudiée sur la carte (Source : *Google Earth* mis à jour le 03/11/2018).



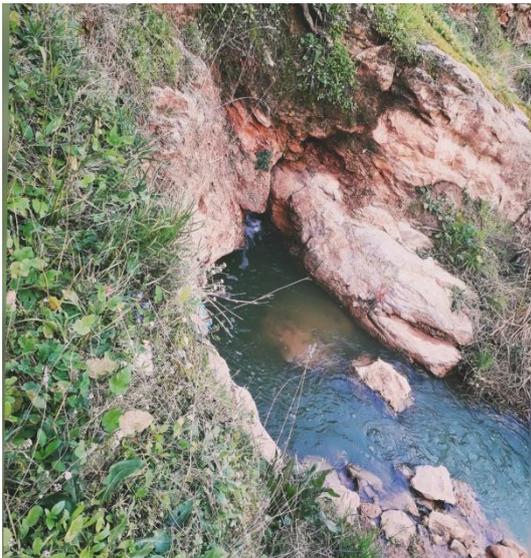
Figure 10. La source thermale des prélèvements (*Hammam Grouz, Mila*).

2. Echantillonnage

Les Prélèvements ont été effectués au niveau de deux sites différents du sol de *Hammam Grouz Mila* ; le premier c'est des sols près de la source à une distance de 3m, de 2m, et de 1.5m

(**Figure11**), tandis que le deuxième est un sol des

arbres
distant
s de
20 m
de la
source



B

Figure 11 : Les sites du prélèvement

B



Figure 13 : Etapes de prélèvements du sol.

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une cuillère stérile pour chaque prélèvement, et pour chaque site la couche des 5 premiers centimètres est écartée (**Figure05**). Cent à cent-cinquante grammes de sol sont prélevés de ces sites à différentes profondeurs: 10, 20, 30, cm, ensuite mélanger et recueilli dans du papier aluminium puis dans des sachets stériles. Les échantillons sont ensuite gardés à (4°C) et l'isolement est effectué dès l'arrivée au laboratoire.

3. Isolement des souches fongiques

3.1 Dilutions

La préparation des dilutions consiste tout d'abord, à préparer la solution mère du sol ; en mettant 10g du sol dans 90ml d'eau physiologique stérile (**Annexe 01**), suivie d'une agitation pendant 15 min, en suite la préparation est laissée se décanter. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1ml de la solution précédente à 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution 10^{-5} (Jérôme et *al.*, 2004).

3.2 Ensemencement

Un volume de 1 ml de chacune des dilutions indiquées est déposé goutte par goutte sur une boîte de Pétri vide et couler avec le milieu PDA en surfusion 45°C (**Annexe 02**), additionné d'un antibiotique la gentamicine (5mg/ml) afin inhiber la croissance des

bactéries. L'homogénéisation a été réalisée en gardant la boîte de Pétri fermée et en la soumettant à des mouvements circulaires, ensuite les boîtes sont incubées à 30°C et observées quotidiennement durant deux semaines.

4. Purification des souches fongiques

Un fragment du mycélium de chaque souche poussée dans les boîtes d'isolement a été repiqué par touche centrale sur milieu PDA (**Annexe 02**). L'incubation des boîtes a été faite à 30°C pendant 7 jours. L'opération a été répétée jusqu'à la purification de la souche.

5. Identification des souches

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

5.1 Identification macroscopique

L'identification macroscopique des moisissures a été réalisée par un examen à l'œil nu des cultures sur milieux gélosés PDA.

Les caractères culturels étudiés sont :

- La vitesse de croissance des colonies.
- La texture et la couleur des colonies et sa variation en fonction du temps.
- La forme et le contour et le relief des colonies.
- La couleur de revers des boîtes, et changement de la couleur du milieu utilisé.
- Incrustation dans la gélose (Ottaviani et *al.*, 1988 ; Botton et *al.* 1999).

5.2 Identification microscopique

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

L'observation microscopique est effectuée au microscope optique aux différents grossissements (GX40), et par immersion à (GX100). Ce type d'identification est basé sur l'étude morphologique du mycélium ; absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation, et les formes des spores, couleur, texture des parois, forme des organes de fructification (Ottaviani et *al.* 1988 ; Botton et *al.*, 1999).

5.3 Conservation des souches

Les souches sont maintenues sur milieu PDA (Incubation à 30°C jusqu'à une bonne sporulation). A l'aide d'une anse de platine, coupez des petits carrés de la culture de la souche à conserver et mettez-les dans un tube contenant l'eau glycérolé à 20% (agent cryoprotecteur) ; ensuite stockées au congélateur, afin de garder leur viabilité et de limiter les possibilités de variation, jusqu'à leur utilisation (Botton et *al.*, 1990).

6. Mise en évidence des activités enzymatiques

6.1 Recherche des carbohydrases

6.1.1 Recherche de la cellulase

Afin de mettre en évidence leurs activités cellulolytiques, les souches obtenues ont été ensemencées sur une gélose additionnée de cellulose (**Annexe03**) par touche centrale ; l'incubation a lieu dans une étuve à 30°C pendant 14 jours, une solution aqueuse de rouge Congo à 1% (**Annexe12**) pendant 15 mn permet de mettre en évidence la dégradation de la cellulose (Pinky et *al.*, 2012).

6.1.2 Recherche de l'amylase

La recherche de l'activité amylolytique est réalisée sur la gélose de *Gause* (**Annexe04**) selon la méthode de *Williams* et *Cross* (1971). L'ensemencement est fait par touche centrale de la souche à tester sur le milieu de culture, après incubation de 10 jours à 30°C

une solution de *lugol* (**Annexe 13**) est versé sur la surface de la boîte pendant quelque minute, Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d'amylases. Le diamètre des zones d'hydrolyse, est pris en considération pour la sélection de la souche amylolytique la plus performante (Tatsinkouet *al.*, 2005 et Benaouida., 2008).

6.2 Recherche des protéases

6.2.1 Recherche d'une caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 20% de lait écrémé (**Annexe 05**), en ensemençant par une touche centrale, quelques spores de la souche à tester au centre de la boîte pétrie et l'incubation a été effectuée à 30°C pendant 7 jours. La dégradation de la caséine du lait s'explique par l'observation directe d'un halo translucide (anneau de protéolyse) autour de la colonie fongique avec un diamètre proportionnel à la quantité des protéases libérées.

En effet, des mesures quotidiennes de l'halo pour chaque souche ont été effectuées afin de bien suivre le développement de l'activité.

6.2.2 Recherche d'une gélatinasse

La recherche de la gélatinasse a été réalisée sur le milieu nutritif gélosé contenant 1% de gélatine (**Annexe 06**) selon la méthode de *Williams et Cross* (1971). Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri puis ensemençant par touche centrale de la souche et incubé à 30°C pendant 14 jours. Pour mettre en évidence la dégradation de gélatine, qui se traduit par la présence d'une auréole claire autour des colonies ; recouvertes les boîtes par une solution de chlorure de mercure (**Annexe14**).

6.3 Recherches des lipases

6.3.1 Recherche des estérases

La recherche de l'estérase a été réalisée sur le milieu *Sierra* additionné de *tween* 80 (**Annexe07**). Couler dans des boîtes de Pétri et ensemençant par touche centrale (fragment de 4 mm). Après l'incubation de 14 jours à 30°C, l'apparition d'un halo opaque autour des colonies traduit la présence d'une estérase (Sierra, 1957).

6.3.2 Recherche d'une lécithinase (lipases)

La recherche d'une lécithinase a été réalisée sur milieu gélosé additionné au jaune d'œuf à 10% (**Annexe 08**). L'ensemencement se fait par touche centrale avec un fragment de 4mm de souche à tester, puis incubé pendant 14 jours à 30°C.

Le jaune d'œuf est un substrat composé de lécithine, de triglycérides et d'une lipoprotéine, il permet donc de rechercher trois enzymes (Nitsch et Kutzner, 1969).

6.4 Recherche d'une uréase (urée hydrolase)

La recherche de l'uréase s'est effectuée sur milieu FERGUSON (milieu *urée-indole*) (**Annex 09**), contenu en tubes, et qui a été richement ensemencé par une culture jeune des champignons à tester à l'aide d'une anse de platine puis agité et incubé à 30°C. La lecture s'est faite après 24h et s'est poursuivie jusqu'aux 21 jours d'incubation. Si la souche possède une uréase, la production de NH₃ fait virer l'indicateur au rouge violacé.

6.5 Recherche de la tyrosinase

Afin de mettre en évidence leurs activités la tyrosinase, les souches à tester ensemencées par touche centrale sur la gélose à la tyrosine (**Annexe10**) et incubé à 30°C. L'examen s'est faite après 02 jours et s'est poursuivie jusqu'aux 21 jours La dégradation de la tyrosine se manifeste par une auréole de coloration marron autour des colonies qui peut se transformer graduellement en noire (Raval et al., 2012 ; Roy et al., 2014).

6.6 Recherche d'une pectinase

Chaque moisissure est ensemencée par une touche centrale sur la gélose MP7 (**Annexe11**). Après incubation à 30°C pendant 7 jours, les boîtes sont inondées par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 10 % (**Annexe15**) pendant 15 minutes. L'acétate de cuivre donne une couleur bleu claire sur la gélose qui contient la pectine non dégradée (Snaikiet al., 2006). L'activité pectinolytique se manifeste par l'apparition d'un halo blanc autour des colonies productrices.

7. Etude de la production de protéase par fermentation en milieu solide

La fermentation a été réalisée dans un milieu solide à base de déchet de tomate dans le cadre de doser l'activité protéolytique développée par la souche choisie (performante) au cours de ce travail.

7.1. Microorganisme

La souche *Aspergillus versicolor* est retenue dans cette partie de notre travail, par ce qu'elle a donné par rapport aux autres souches le meilleur résultat avec les enzymes recherchées, et notamment pour le test de la caséinase (**Figure14**).



Figure 14 : Photo de la culture *Aspergillus versicolor*.

7.3. Préparation des disques

Les disques servant à l'ensemencement du milieu de fermentation, sont obtenus en apposant une pipette Pasteur stérile sur le mycélium de la moisissure cultivé sur gélose de PDA pendant 7 jours (**Figure15**).

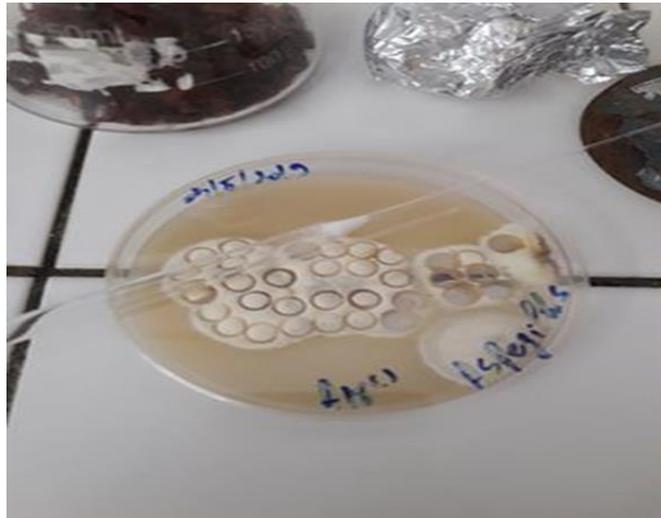


Figure 15: Préparation des disques.

7.4. La fermentation en milieu solide

7.4.1 Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture est préparé à partir de déchets de tomate composé de graines de pulpe adhérente à la peau que sont séchés à l'aire libre (25 -30°C) pendant 3 – 4 jours. Dans notre expérience, deux types de déchets de tomates ont été utilisés, le premier était des déchets ménager, le second était des déchets industriel, ce dernier a été utilisé à la température 30°C comme répétition pour la comparaison.

7.4.2 Conduite de la fermentation

La fermentation en milieu solide est réalisée dans des erlenmeyers de 250ml. Dans chaque erlenmeyer 5 g de de déchet de tomate sont introduits et pré-humidifiés avec l'eau distillée, 10 ml dans chaque erlenmeyer.

Le pH des milieux est ajusté à 8,5 puis les erlenmeyers sont bouchés avec du coton cardé, recouverts avec du papier aluminium et autoclavés à 120°C pendant 20min.

Après refroidissement, enlever le coton et gardé dans la zone stérile ensuite ensemercer avec 4 disque da la culture de la souche sélectionnée dans chaque erlenmeyer et agiter bien le contenu avec une tige en verre stérile. Par la suite l'ensemble de ces erlenmeyers est incubé dans l'étuve pendant 5 jours pour les quatre températures étudiées : 30°C, 37°C, 48°C et 53°C (**Figure 16**). Toutes les expériences sont en double pour chaque température.



Figure 16: Préparation de fermentation sur un milieu solide.

8. Etude de l'activité protéolytique produite

8.1 Préparation des extraits enzymatiques

A la fin de la période d'incubation, le produit fermenté est mixé avec 50 ml d'eau distillée, en assurant une agitation pendant 1 heure dans un incubateur agitateur à 180 rpm. La suspension obtenue est filtrée sur un papier filtre pour éliminer les spores et les particules du substrat. Le filtrat correspond à l'extrait enzymatique brut sur lequel le pH est mesuré est congelé pour le dosage ultérieur.

8.2 Détermination de l'activité enzymatique

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

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage.
- 1,5 ml du tampon Tris-HCl pH 8.5.
- 2,5 ml de la solution de caséine dans le citrate de sodium (0,02 M) à pH 7,0.

La réaction se déroule au bain-marie à 40 °C. Après 30 min, elle est stoppée par addition de

5 ml de TCA (froid) à 4%. Le mélange est laissé reposer 30 min dans un bain de glace ou à 4°C (Beynon et Oliver, 2004; Wu et *al.*, 2006; Devi et *al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya et *al.*, 2005a). Il est ensuite filtré sur papier filtre.

Le dosage de la tyrosine est effectué sur le filtrat par le mélange suivant :

- 0.5 ml filtrat.
- 2.5 ml de solution de carbonate de sodium à 2% (dans NaOH 0.1N).

Après agitation et incubation 10 min à température ambiante, 0.25 ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au ^{1/4}éme sont ajoutés.

Une deuxième incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes est nécessaire pour le développement de la coloration. L'absorbance est mesurée à 750 nm.

L'activité protéolytique est exprimée en μmol de tyrosine libéré par minute, le blanc est préparé de la même manière, sauf que le TCA est rajouté avant le substrat. Chaque dosage est effectué en double.

Résultats et discussion

1. Caractéristique des échantillons du sol

Les échantillons des sols utilisés lors de cette étude issue de deux sites différents. Le premier c'est une région très riche en arbres et en plantes ; en effet, le sol devra être riche en débris de cette végétation et par conséquent en matière organique, tandis que le deuxième site est presque dépourvu de la végétation, donc cette dernière ne contient pas la même quantité de la matière organique par rapport au premier site.

Les caractéristiques des échantillons prélevés sont consignées dans le tableau 08.

Tableau 08 : Caractéristique des échantillons.

Echantillon	Date de prélèvement	Description de site prélèvement	pH
Site 1	18-02-2019	Sol près de l'arbre : zone ombrée peu exposée, couleur marron foncée, présence de végétation.	7.33
Site 2	18-02-2019	Sol près de la source : zone très exposée, en soleillée, couleur gris musclée, végétation moyenne.	7.00

2. Isolement des moisissures du sol

Les cultures réalisées à partir des dilutions décimales des échantillons de sol de *Hammam Grouz* ont abouti à des aspects, de texture et de couleurs différentes sur milieu PDA. En effet 36 souches réparties en fonction des sites d'échantillonnage (**Tableau 09**) ont été isolées ; purifiées ; identifiées puis conservées.

Tableau 09 : Isolement des souches fongiques issues d'échantillons des sols.

Sites	Dilutions	Souches
Site 1	10^{-2}	14 (B1, B2, B3, B4, B5,B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, B13, B14)
	10^{-3}	2(B15, B16)
	10^{-4}	1(B17)
Site 2	10^{-2}	15(A4,A5,A6,A7,A8,A9,A10,A11, A12,A13,A14,A15,A16,A17,A18)
	10^{-3}	3(A1, A2, A3)
	10^{-4}	A 19

3. Identification des souches

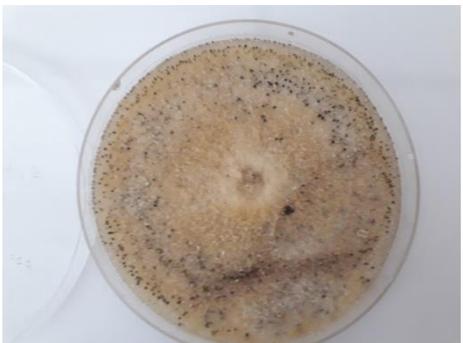
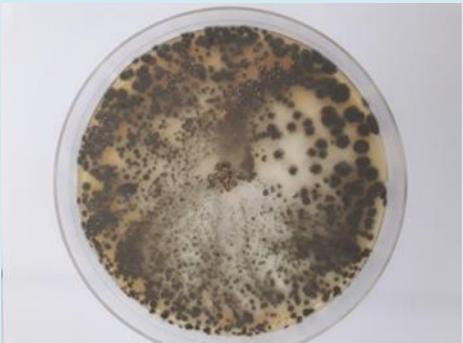
L'identification des isolats obtenus étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 1998).

Après l'isolement et la purification on remarque que les 36 souches obtenues sont similaires au autre, à cause de ce le nombre des souches est diminué jusqu'à 16 souches.

2.1 Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés sur le milieu de culture PDA (Bottonet *al.*, 1990). Les tableaux 10 et 11 résument l'aspect macroscopique des colonies, leur consistance, la couleur du revers ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

Tableau 10 : Etude macroscopique des souches fongiques isolées à partir d'échantillon de sol d'arbre (site1).

Code de la souche	Caractères cultureux sur PDA		
	Surface	Revers de la boîte	Description
B1, B3, B6, B7, B7, B10 B11, B14, B17			Vitesse de croissance : rapide. Couleur : Beige virant au Jaune. Aspect : laineuse. Revers : Incolore (pas de pigment).
B2, B13			Vitesse de croissance : rapide. Couleur : vert olive. Aspect : poudreuse. Revers : jaune.

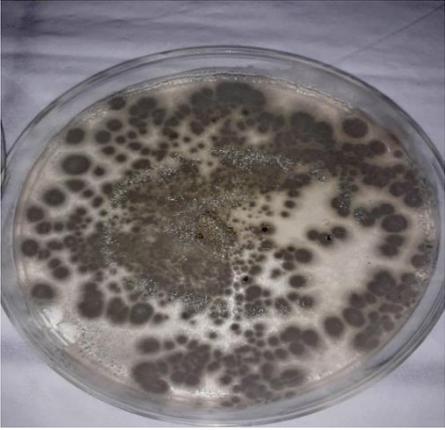
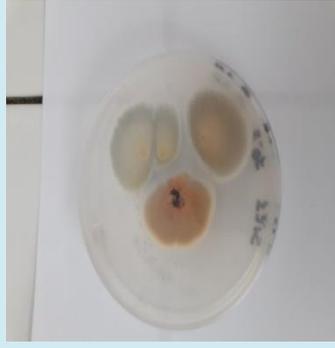
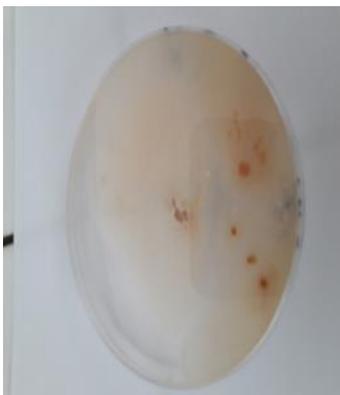
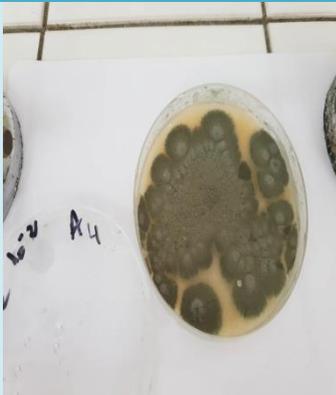
<p>B8, B9</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur : vert foncé.</p> <p>Aspect : poudreuse.</p> <p>Revers : Incolore (pas de pigment).</p>
<p>B15</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur : vert foncé.</p> <p>Aspect : plat poudreuse et sèche.</p> <p>Revers : jaune orangé.</p>
<p>B16</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur : jaune au centre crème aux périphériques.</p> <p>Aspect : granuleuse.</p> <p>Revers : jaune orange.</p>

Tableau 11 : Etude macroscopique des souches fongiques isolées à partir des échantillons de sol près de la source thermale (site2).

Code des souche	Surface	Revers	Description
A2, A11, A12			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>couleur : beige.</p> <p>Aspect : cotonneux.</p> <p>Revers : incolore.</p>
A3			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur : sombre.</p> <p>Aspect : duveteuse à poudreuse.</p> <p>Revers : beige à saumon.</p>
A4			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>couleur : vert.</p> <p>Aspect : poudreuse.</p> <p>Revers : Incolore.</p>

A5	 A petri dish labeled 'A5' showing a dense, greyish-green, powdery growth on a yellowish-orange agar medium.	 The reverse side of the petri dish A5, showing a dark brown, almost black, powdery growth on the agar medium.	<p>Vitesse de croissance : rapide</p> <p>Couleur : vert.</p> <p>Aspect : poudreuse, châtre.</p> <p>Revers : marron foncé.</p>
----	---	--	---

A8	 A petri dish labeled 'A8' showing a dense, greyish-green, powdery growth on a white agar medium.	 The reverse side of the petri dish A8, showing a white, powdery growth on the agar medium.	<p>Vitesse de croissance : rapide</p> <p>couleur : vert.</p> <p>Aspect : poudreuse.</p> <p>Revers : blanc châtre.</p>
----	---	--	---

A9	 A petri dish labeled 'A9' showing a dense, green, powdery growth on a white agar medium.	 The reverse side of the petri dish A9, showing a yellowish-brown, powdery growth on the agar medium.	<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>couleur : vert à jaune a la préfère.</p> <p>Aspect : poudreuse.</p> <p>Revers : jaune à brun- rougeâtre.</p>
----	--	---	--

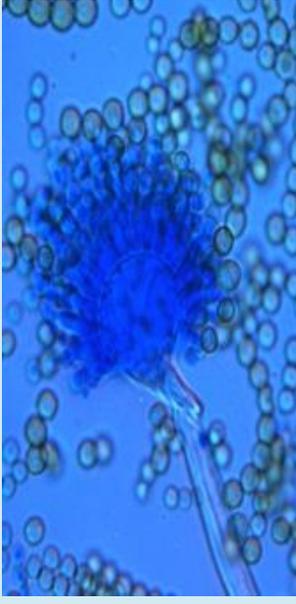
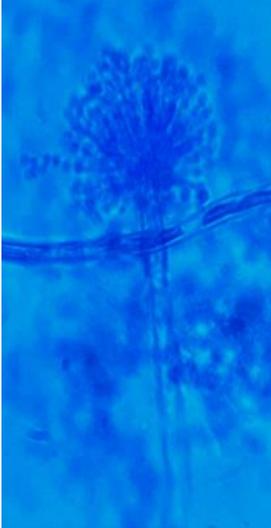
A13	 A petri dish showing a dense, greyish-green mold growth on a yellowish agar surface. The mold is spread across the entire surface.	 The reverse side of the petri dish A13, showing a yellowish agar surface with numerous small, orange-brown spots scattered across it.	<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>couleur : vert.</p> <p>Aspect : châtre.</p> <p>Revers : jaune à brun-rougeâtre.</p>
A17	 A petri dish showing a white, fluffy mold growth on a yellowish agar surface. The mold is concentrated in the center and spreads outwards.	 The reverse side of the petri dish A17, showing a yellowish agar surface with several dark brown, irregular spots.	<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>couleur : blanche puis jaune puis vert-jaune.</p> <p>Aspect : duveteuse à poudreuse.</p> <p>Revers : rouge foncé.</p>
A18	 A petri dish showing a white, fluffy mold growth on a yellowish agar surface. The mold is concentrated in the center and spreads outwards.	 The reverse side of the petri dish A18, showing a yellowish agar surface with several dark brown, irregular spots.	<p>Vitesse de croissance : rapide</p> <p>Couleur : ocre puis de couleur variée (jaune, ocre, vert).</p> <p>Aspect : bombé ; duveteuse.</p> <p>Revers : jaune à brun-rougeâtre.</p>

<p>A18*</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide. Couleur : marron. Aspect : duveteuse, laineuse Revers : blanc châtré.</p>
<p>A19</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide. Surface : blanche. Aspect : duveteuse, poudreuse. Revers : incolore.</p>

2.2. Etude microscopique

Les tableaux 12 et 13 résument l'aspect microscopique des isolats, leur mycélium ; absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation et les formes des spores, couleur, texture des parois, forme des organes de fructification.

Tableau 12 : Caractères microscopiques des souches fongiques isolées (site1).

Code de la souche	Photo microscopique (nos résultats)	Photo microscopique de référence	Aspect microscopique	Genre
B1, B3, B6, B7, B10 B11, B14, B17			<p>Thalle :septé.</p> <p>Conidiophore: lisse, et long.</p> <p>Vésicule : globuleuse.</p> <p>Phialides : portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule.</p> <p>Conidies : globuleuses à légèrement elliptiques.</p> <p>Tête aspergilaire : bisériée, en colonne évasée.</p>	<i>Aspergillus sp.</i>
B2, B13			<p>-Conidiophore : long,</p> <p>-Vésicule : sphérique.</p> <p>-Phialides : portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule.</p> <p>-Conidies : globuleuses et vert pâle.</p> <p>-Tête aspergilaire : bisériée et radiée.</p>	<i>Aspergillus sp.</i>

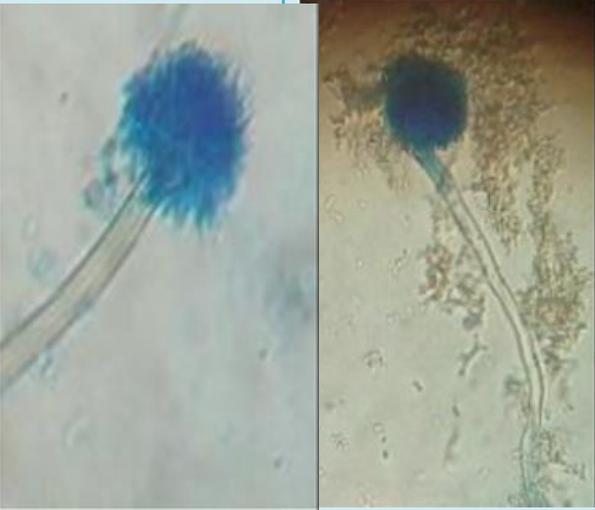
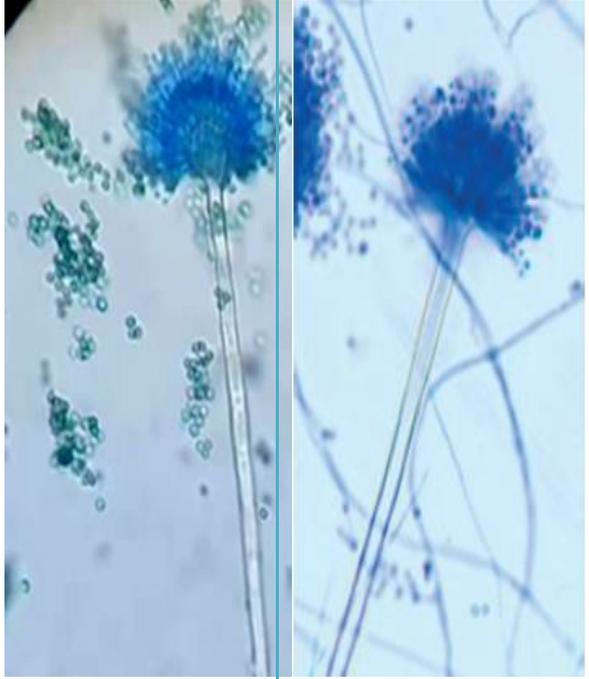
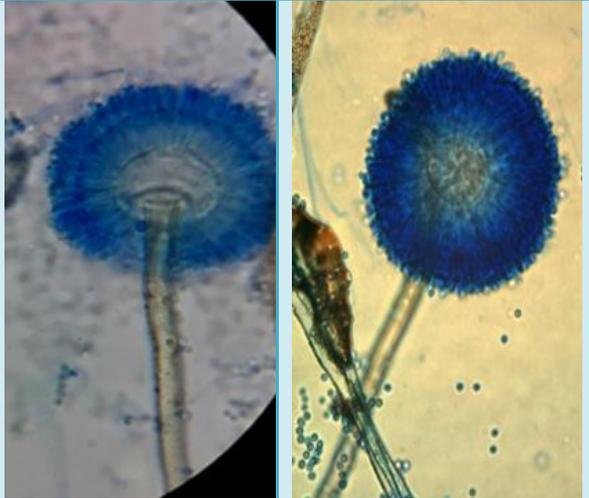
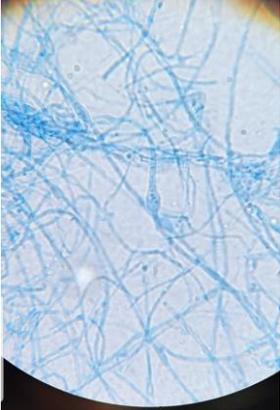
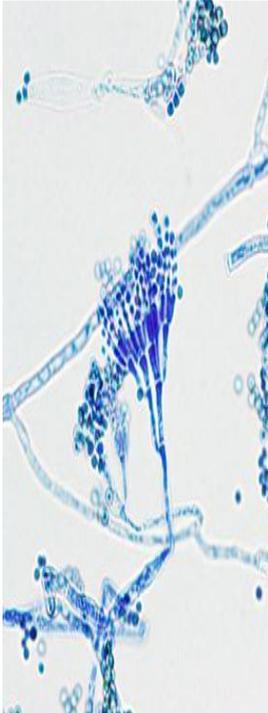
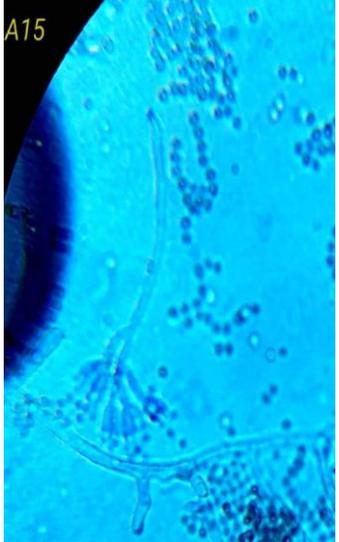
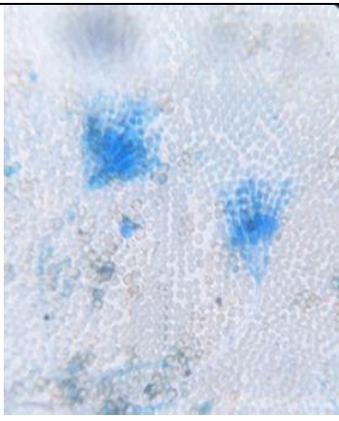
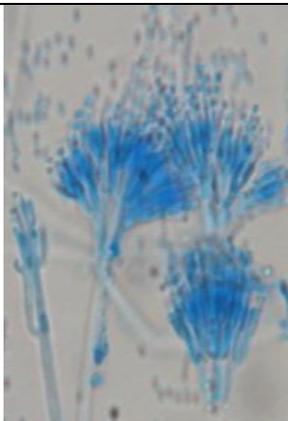
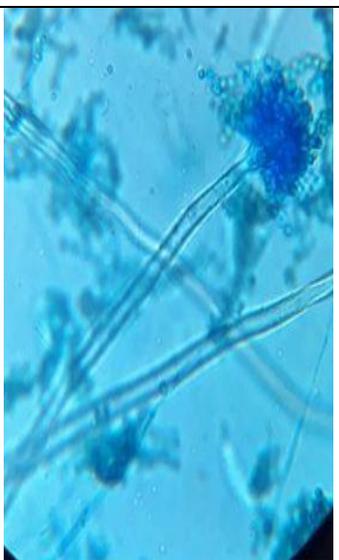
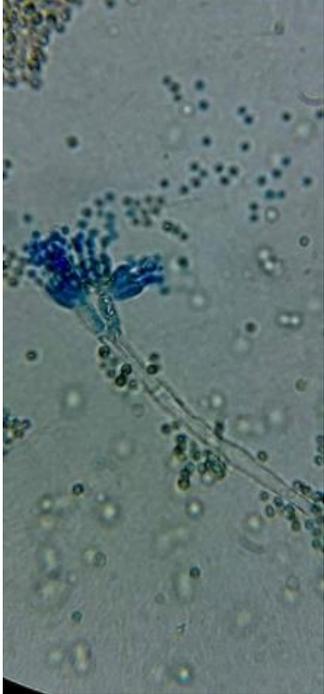
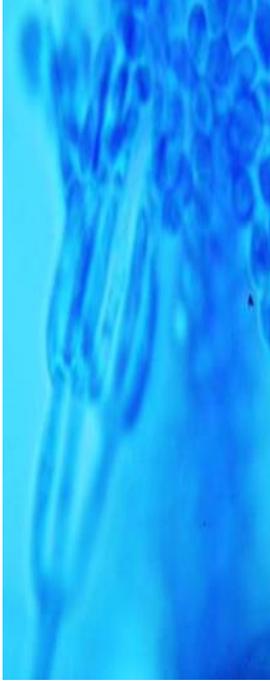
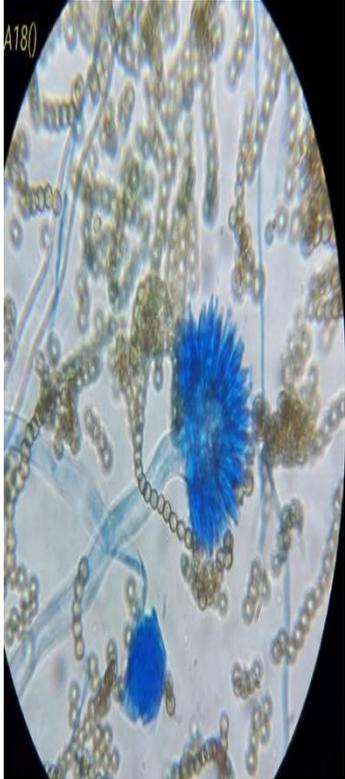
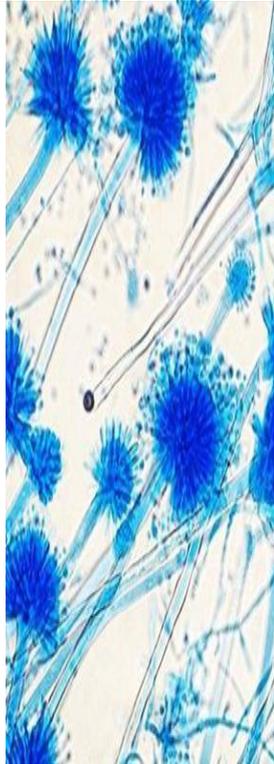
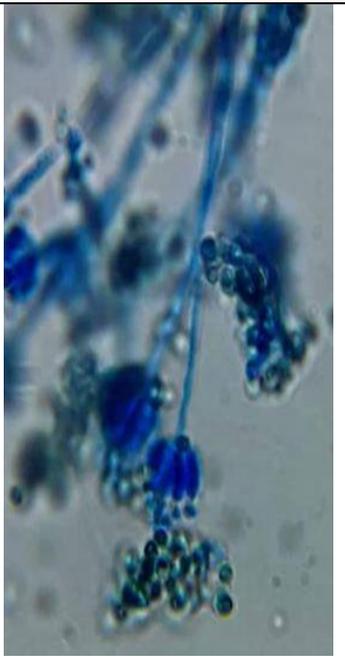
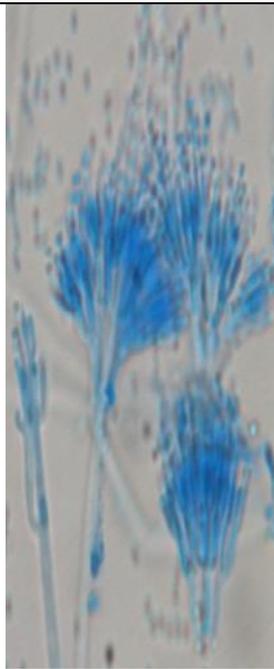
<p>B8, B9</p>		<p>Thalle : septé, Conidiophore : lisse, Vésicule: sphérique Phialides : portées par des métules insérées sur tout le pourtour de la vésicule. Conidies: globuleuses Tête aspergilaire : bisériée</p>	<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>B15</p>		<p>Thalle : septé. Conidiophore : lisse, long. Vésicule : ovale. Phialides : portées par des métules insérées sur tout le pourtour de la vésicule. Conidies : globuleuses, échinulées. Tête aspergilaire : bisériée en colonne, courte et compacte.</p>	<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
<p>B16</p>		<p>Thalle : septé. Conidiophore : long. Vésicule : sphérique. Phialides : portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule. Conidies : globuleuses et vert pâle. Tête aspergilaire : bisériée et radiée.</p>	<p><i>Aspergillus sp.</i></p>

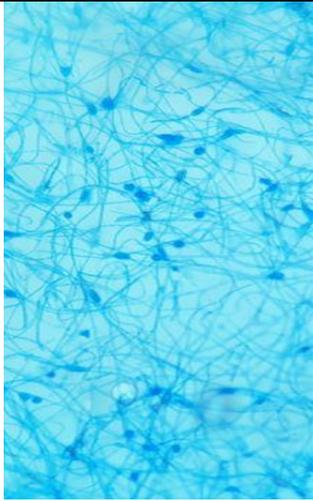
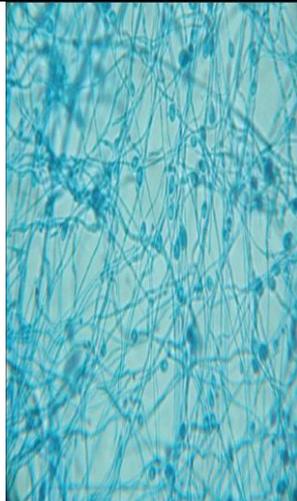
Tableau 13 : Caractères microscopiques des souches fongiques isolées (site2).

Code de la souche	Photo microscopique (nos résultats)	Photo microscopique de référence	Aspect microscopique	Genre
A2			<p>Tête : bisériée.</p> <p>Vésicule : globuleuse.</p> <p>Conidies : petites.</p> <p>Conidiophore : lisse.</p>	<i>Aspergillus terreus</i>
A3			<p>Mycélium : en raquette.</p> <p>chlamydospores intercalaire ou terminale.</p> <p>microconidies : nombreuse pyriforme.</p>	<i>Microsporium sp.</i>
A4			<p>conidiophores : isolé, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille – Pénicilles.</p> <p>Phialides : branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</p> <p>Conidies : disposées en longue chaîne, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou</p>	<i>Penicillium sp.</i>

<p>A5, A6, A14, A15</p>			<p>Conidiophores isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille.</p> <p>phialides : branché directement à l'extrémité du conidiophore.</p> <p>Conidies disposées en longue chaîne, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses.</p>	<p><i>Penicillium</i> <i>sp.</i></p>
<p>A8</p>			<p>Conidiophores : isolés, ramifiés, terminés par un pénicille.</p> <p>phialides branchés à l'extrémité de conidiophore.</p> <p>Conidies disposées en longue chaîne.</p>	<p><i>Penicillium</i> <i>sp.</i></p>
<p>A9</p>			<p>Conidiophore : lisse, long.</p> <p>Vésicule: globuleuse ou subglobuleuse .</p> <p>Phialides : verdâtre.</p> <p>Conidies: subsphérique à ellipsoïdale, échinulées</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>flavus</i></p>

<p>A13</p>			<p>Conidiophores isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille - Pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore</p> <p>Conidies disposées en longue chaîne, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses</p>	<p><i>Penicillium</i> <i>sp.</i></p>
<p>A17</p>			<p>Conidiophore Longue hyaline, verrucose.</p> <p>Vésicule : sphérique.</p> <p>Phialides : portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule</p> <p>Conidies: globuleuses et vert pâle.</p> <p>Tête aspergilaire : bisériée et radiée.</p>	<p><i>Aspergillus</i> <i>sp.</i></p>

<p>A18</p>			<p>Conidiophore : longue et épaisse.</p> <p>Vésicule : allongée supportant deux série de stérigmaes.</p> <p>Phialides : portées par des métules insérées sur la majeure surface.</p> <p>Conidies : Globuleuses et échaninulées.</p> <p>Tête aspergilaire : bisériée.</p>	<p><i>Aspergillus versicolor.</i></p>
<p>A18*</p>			<p>Conidiophores : simples ou ramifiés, parfois regroupés en buisson ou corémie.</p> <p>Phialides : disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores.</p> <p>Conidies : unicellulaire, rondes disposées en chaînes et lisse.</p>	<p><i>Penicillium sp.</i></p>

<p>A19</p>			<p>Des filaments mycéliens septés à angle aigu.</p>	<p><i>Scedosporium sp.</i></p>
-------------------	---	--	---	---------------------------------------

L'étude macroscopique et microscopique effectuée sur les 16 souches isolées, a abouti à la répartition de ces dernières en 4 genres, classés par ordre de prédominance comme suit : *Aspergillus sp.* (5 souches: B1, B2, B8, B15, B16, A2, A9, A17, A18), *Penicillium sp.* (5 souches A4, A8, A13, A15,A18*) *Microsporium sp.* (A3), *Scedosporium sp.* (A19).

Les pourcentages des genres obtenus ont été calculés et présentés dans la figure 17.

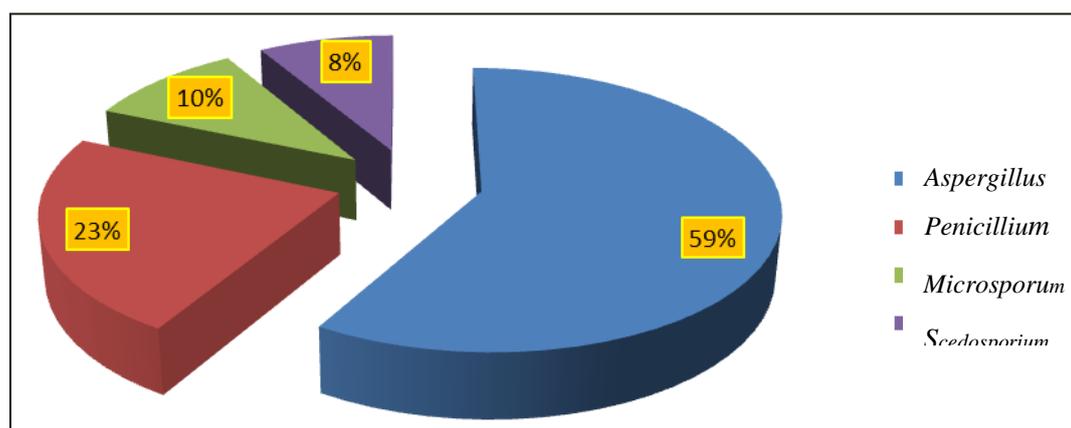


Figure 17 : La répartition des genres fongiques isolés du sol de *Hammam Grouz*.

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

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

3. Mise en évidence des activités enzymatiques

Le choix de milieu de culture est déterminé dans la mise en évidence de l'activité enzymatique recherchée et surtout dans le choix de substrat inducteur. Pour cela, on a utilisé différents milieux tels que le milieu de gélosée au cellulose , pectine agar , le milieu lait gélosé à 20% et milieu jaune d'œuf comme milieux sélectifs pour la détection des activités protéolytique , amylolytique, cellulolytique et pectinolytique , chez les 16 souches fongiques isolées et testées.

3.1 Dégradation de l'amidon

Cette activité est détectée par le *lugol* qui contient de l'iode, ce dernier se combine avec l'amidon et donne un complexe de coloration bleu foncé plus ou moins intense selon sa concentration ; preuve de la dégradation de l'amidon par l' α -amylase. Les souches à halo clair sur le pourtour, sont considérées comme productrices d' α -amylases (**Figure 18**).



Figure 18 : Principe de révélation de l'activité amylase par le *lugol*.

Dans ce test, le diamètre des zones d'hydrolyse est pris en considération afin de sélectionner la souche amylolytique la plus performante. Parmi les 16 souches testées, la souche B1 *Aspergillus sp.* se distingue par une activité amylolytique élevée avec une zone d'hydrolyse de diamètre mesuré plus de 7 mm (**Figure 19**). Par ailleurs, plusieurs espèces du genre *Penicillium sp.*, sont productrices d' α -amylase, comme a été montré par les études de Ertan et Balkan (2007) qui disent que les sources fongiques d' α -amylase se limite aux isolats terrestres, principalement aux espèces d'*Aspergillus* et à seulement quelques espèces de *Penicillium*.

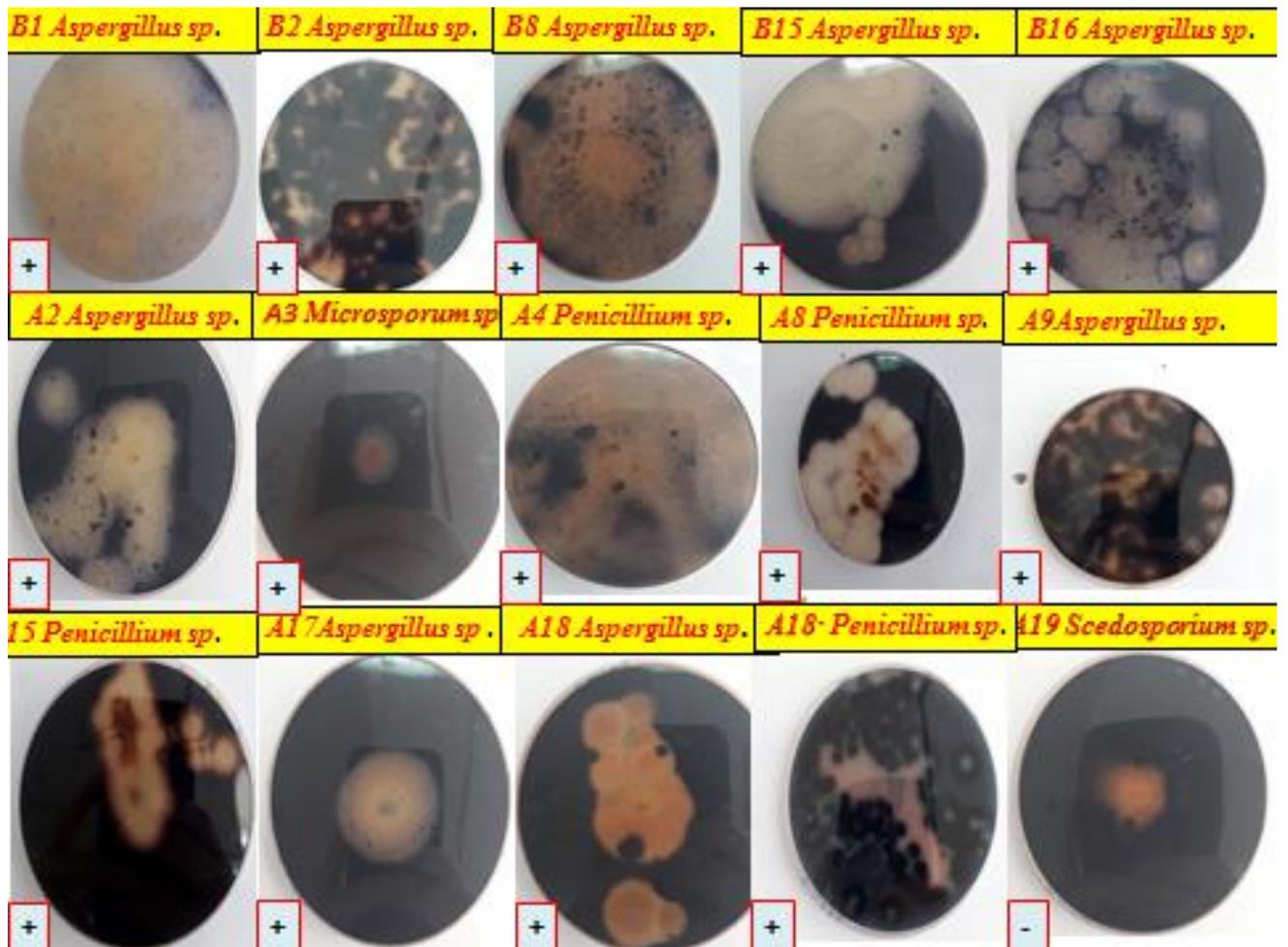


Figure 19 : Zones d'hydrolyses de l'amidon après 7 jours.

3.2 Dégradation de cellulose

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des souches testées, est effectuée sur un milieu gélose à la cellulose. Après croissance, les boîtes sont colorées avec une solution du rouge Congo¹, ce dernier permet la mise en évidence de l'activité cellulolytique par l'apparition de zones claires autour des colonies productrices de cellulase (Oikawa, 1998; Korish, 2003).

Après incubation d'un mois à 30°C, on observe dans nos résultats un développement des souches testées : *Aspergillus* (B15, B13, A9, B9) sur le milieu gélose additionnée de cellulose, après l'ajout du Rouge Congo on n'a pas pu observer l'halo de dégradation chez tous les isolats testés, sachant que les genres *Aspergillus* sont connus par leur capacité cellulolytique (Leghlimi, 2013). Cela pourrait s'expliquer par probablement le fait de la quantité de la cellulose ajoutée dans le milieu est insuffisante pour une bonne croissance et une dégradation importante de la cellulose pour qu'elle soit visible sous forme d'halo clair. En outre, d'autres auteurs Meziani et Mahcen (2017), ont pu voir le halo d'hydrolyse mais en utilisant le CMC comme seule source de carbone au lieu de la cellulose pure utilisée dans notre expérience. Donc, on ne peut pas juger que nos souches ne sont pas productrices de cellulase, pour ceci, on doit faire de préférence ce test sur un milieu liquide contenant une bandelette du papier filtre (Bensmira, 2006).

Par ailleurs, les espèces d'*Aspergillus* (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus Aculeatus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus wentii*) sont capables de produire des cellulases en faible quantité. D'autres espèces d'*Aspergillus* comme *Aspergillus terreus* et *Aspergillus Fumigatus*, sont capables de se développer sur la cellulose microcristalline en produisant des quantités importantes de β -glucosidases (Riccio *et al.*, 1999).

Les cellulases produites par des espèces d'*Aspergillus* sont généralement riches en endo- β -glucanase et β -glucosidase, mais pauvres en exo- β -glucosidases, de ce fait elles ont une action limitée sur la cellulose microcristalline (Riccio *et al.*, 1999).

3.3 Dégradation de la caséine

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999). Dont le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases est indispensable pour la détermination du type de la protéase sécrétée (Clarke et Steel, 1966).

Pour ce faire, on a utilisé le milieu au lait gélosé (la gélose au lait) comme milieu sélectif pour la caséinase. Les résultats obtenus après incubation sur cette gélose caséinée ont permis la sélection des souches ayant une activité caséinolytique, ces dernières sont reconnues par le halo transparent résultant de la dégradation de la caséine par l'exoprotéase produite et qui entoure les colonies (**Figure 20**) ; plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme est importante.

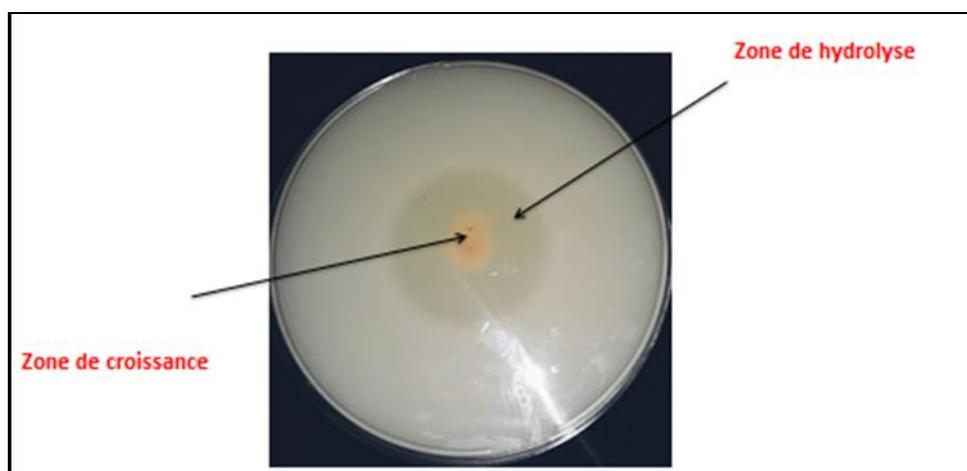


Figure 20: Formation d'un halo clair au tour de la colonie.

Les mesures du diamètre de le halo résultant de chaque souche sont effectuées à partir du troisième jour jusqu'au septième. L'envahissement de ce milieu par la majorité des moisissures étudiées a limité les mesures à une semaine d'incubation.

Ces tests de protéolyse ont permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez 13 moisissures parmi 16 souches différentes. Deux souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse très faibles (< 2 mm) juste autour de leurs mycélium. Alors que les autres souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse peut atteindre jusqu'à 40 mm de diamètre (**Tableau 14**). En effet, ces dernières peuvent être considérées comme des moisissures productrices de protéases exocellulaires, ce qui représente un point très positif pour leur production et leur caractérisation (**Figure 21**).

En effet, nos résultats sont en accord avec ceux présentés par Machehalek et Yekhlef (2015) qui ont trouvé que parmi des moisissures isolées de source thermale de *Hammam Debegh* les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont donné les meilleurs résultats d'activités protéolytiques. Ces résultats sont confirmés par une autre comparaison dans les études de Boucherit.Z (2011), où elle a montré que parmi des souches fongiques isolées de *Sebkha* de *EIN ELZEMOUL (Oum elbouaghi)* une bonne activité protéolytique a été remarqué chez les genres *Aspergillus* et *Penicillium*.

Tableau 14: Mise en évidence de l'activité protéolytique sur le lait gélosé.

Espèces	Jours	Diamètre de la colonie (mm)				
		3	4	5	6	7
B1		0	0	1	1	2
B2		5	7	10	*	*
B8		0	0	0	0	0
B15		10	13	15	*	*
B16		0	0	0	0	0
A2		0	0	2	2	2
A3		15	20	23	40	46
A4		0	2	4	7	7
A8		5	10	15	25	30
A9		5	7	11	15	*
A13		0	0	0	0	0
A15		0	0	2	4	4
A17		5	7	13	17	20
A18		10	15	35	38	40
A18*		0	1	3	7	10
A19		20	25	38	38	*

*: Envahissement de la souche.

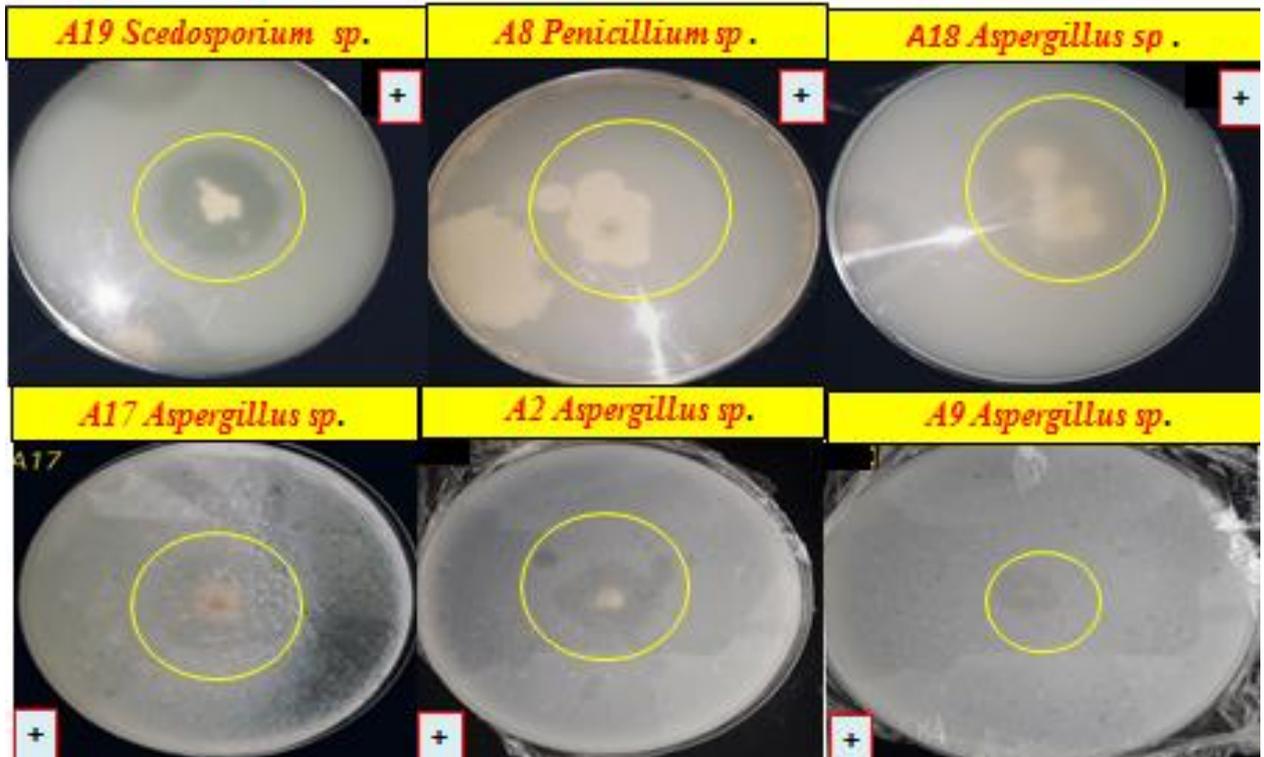


Figure 21: Représentation de la zone de croissance et la zone d'hydrolyse chez les souches retenues.

3.4 Dégradation de la gélatine

L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par l'apparition des zones claires autour des colonies (Williams et Cross, 1971). Et c'est ce que nous n'avons pas trouvé dans nos résultats et nous pouvons dire ici qu'aucune des 16 souches étudiée n'a pu dégrader la gélatine.

3.5 Dégradation l'estérase

Les résultats obtenus après incubation sur le milieu *Sierra* additionné de *tween80* ont permis la sélection des souches ayant une activité estérase. Ces dernières sont reconnues par halo d'opacification autour de la culture (**Figure 22**). Et cela explique la production d'acides gras, par hydrolyse du *tween 80*, qui ont réagi avec le chlorure de calcium pour donner des sels calciques insolubles, et ici on peut dire que la souche est estérase +.

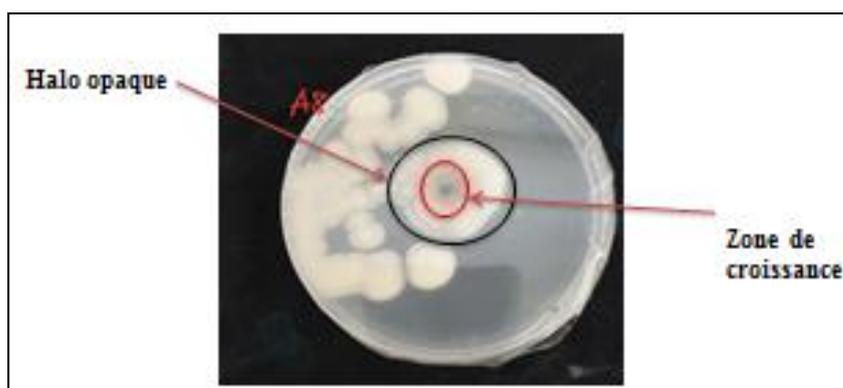


Figure 22 : Formation d'un halo opaque au tour de la colonie.

D'après ce test, nous avons remarqué que parmi les 16 souches fongiques testées 11 souches ont développé des halos opaques de différents diamètres (**Figure 23**). Les souches A8 et A18* genre *Penicillium* sont caractérisées par un diamètre important par rapport aux autres. Cela indique la forte capacité de ces 2 isolats à hydrolyser du *tween 80* contenus dans le milieu, et par comparaison avec les études de Benghrieb et Gerboua (2017), on voit qu'il y a une concordance avec nos résultats car ils ont montré que les moisissures issues d'un environnement extrême possèdent une activité d'estérase importante.

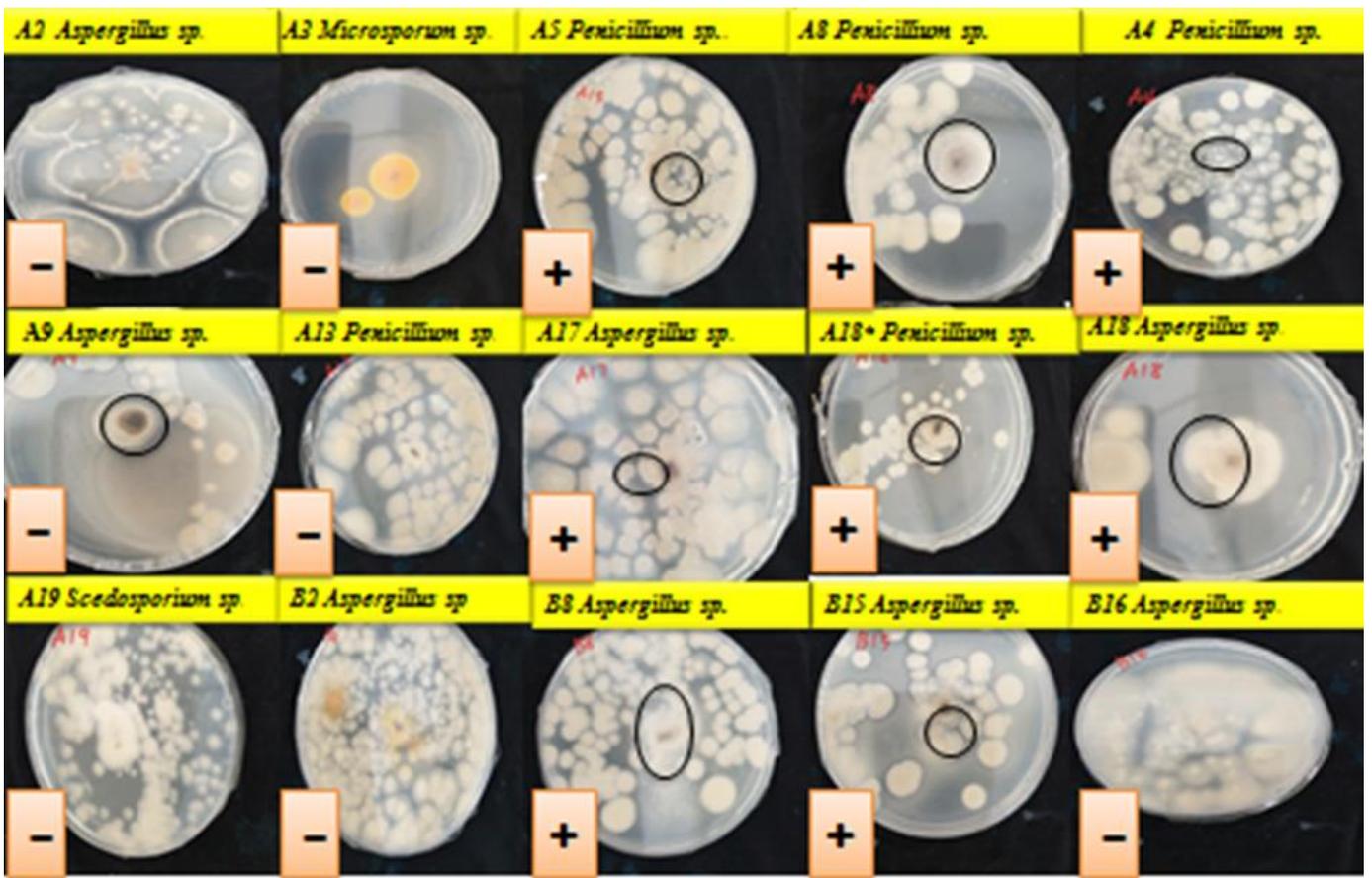


Figure 23 : Représentations de la révélation d'activité estérase.

3.6 Dégradation de lécithine

Le jaune d'œuf est un substrat composé de lécithine, triglycérides et d'une lipoprotéine, il permet donc de rechercher trois enzymes. La lécithine se manifeste par l'apparition d'un halo opaque, blanc jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à la limite, indique la présence d'une lécithinase. Si la lécithinase est absente, toute l'opacité floue à la surface de la colonie indique la présence d'une lipase. La lipoprotéinase est révélée par l'apparition d'un halo claire autour de la colonie (Figure 24), le tableau 15 résume les résultats obtenus.

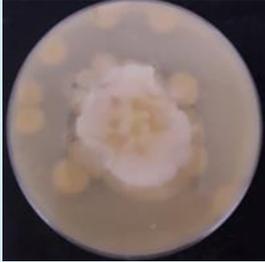
Apparition d'un halo claire autour de la colonie	Apparition d'un halo blanc perlé huileux et brillant	Apparition d'un halo opaque, blanc perlé jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à sa limite.
		
<p>Production de produits hydrosolubles : souche lipoprotéinase + NB : ce halo d'éclaircissement</p>		<p>Production de diacylglycérols insolubles qui précipitent au sein de la gélose : souche</p>

Tableau 15: Mise en évidence la préséance de lécithinase.

<p>est souvent fugace car ensuite, il est masqué par l'opacification due à l'activité des autres enzymes, mais son diamètre est presque toujours supérieur au diamètre des zones d'opacification.</p>	<p>Production d'acides gras insolubles qui remontent en surface : souche lipase +</p>	<p>lécithinase +</p>
---	--	-----------------------------

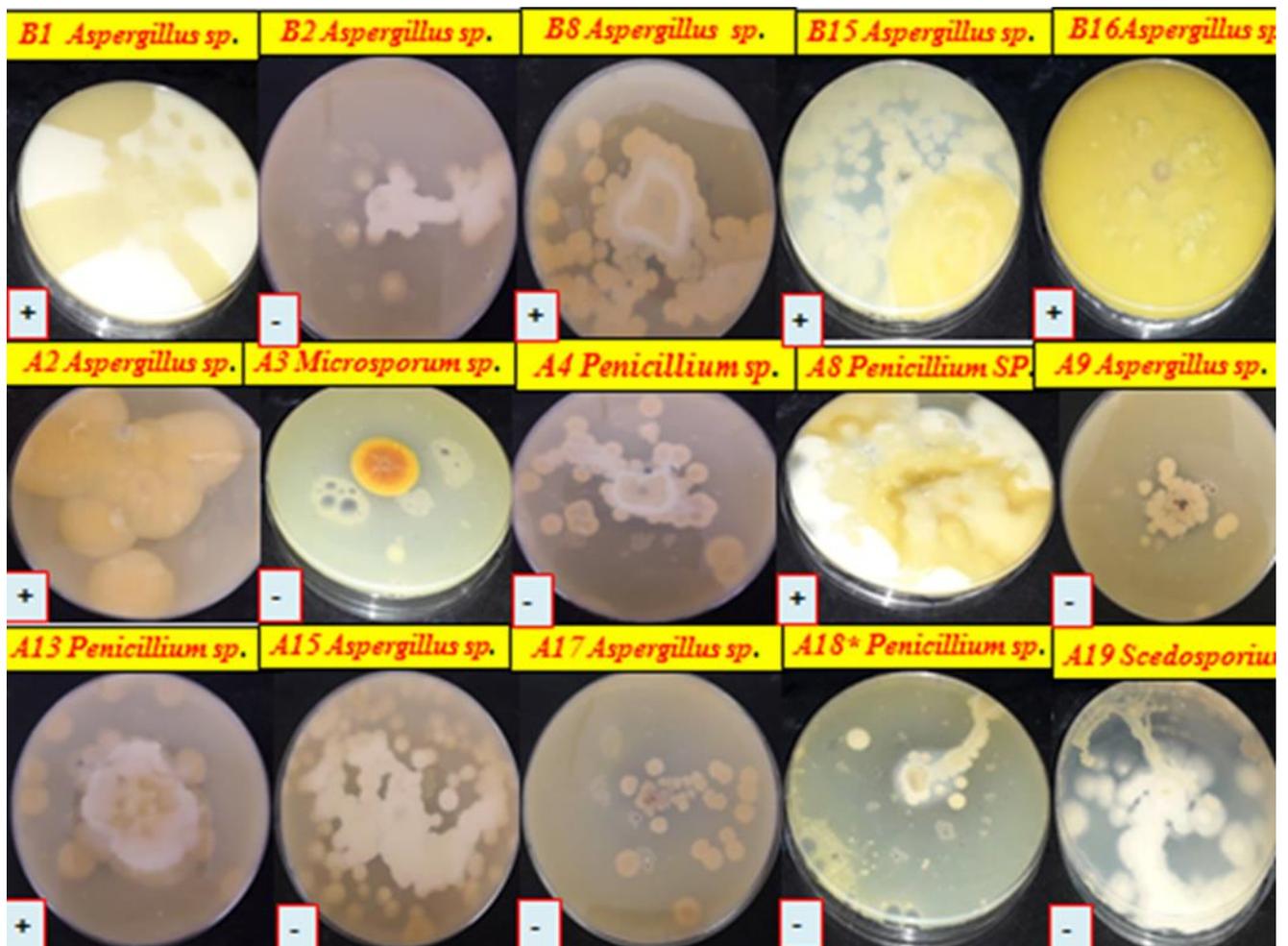


Figure 24: Représentation de l'activité lécithinase.

Nos résultats démontrent que les souches *Aspergillus*, *Penicillium* possèdent l'enzyme lécithinase qui leur ont permis la dégradation de la lécithine, elles sont en accord avec ceux

présentés par Aggoune et al. (2017) pour l'étude de l'optimisation de la production de lipases par *Aspergillus sp.*

Ces lipases (l'estérase et la lécithinase) sont essentiellement extracellulaires, où le plus grand facteur dans l'expression de cette activité a toujours été l'exigence d'une source de carbone appropriée. L'utilisation d'acides gras fournit des esters hydrolysables qui induisent l'activité lipolytique chez la souche. Les lipases sont produites durant la croissance et qui peut varier de quelques heures à plusieurs jours selon les moisissures et les conditions environnementales.

3.7 Dégradation de l'urée indole

Ce milieu permet de mettre en évidence la présence d'une uréase, d'une tryptophane-désaminase (TDA) ainsi que la production d'indole.

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate.



Le carbonate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ va alcaliniser le milieu ensemencé avec une souche uréase +. L'alcalinisation est mise en évidence grâce au rouge de phénol présent. La présence d'une uréase se caractérise par un virage du milieu au rouge violet et aussi par la diminution de la quantité de milieu dans le tube (**Figure 25**).

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que parmi les 16 souches fongiques testées on a trois isolats : A15, A17 et B8 des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, sont capables de dégrader l'urée, sachant que l'uréase est un enzyme qui fait partie des critères biochimiques d'identification et classification des bactéries.

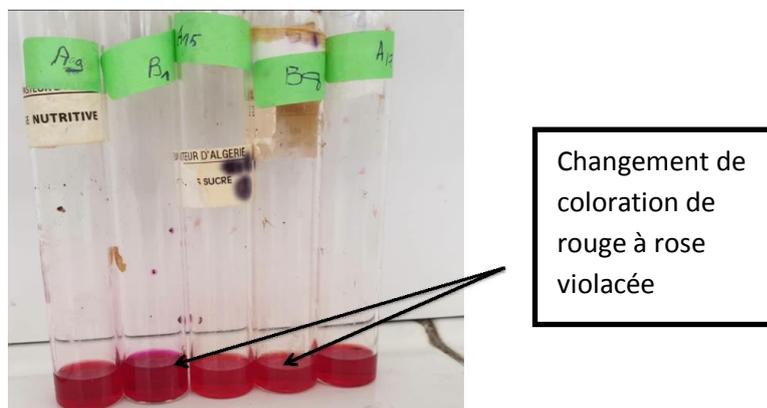


Figure 25 : Mettre en évidence la présence d'une uréase.

L'uréase est une enzyme extracellulaire représente 63% de l'activité enzymatique totale de sol, son rôle réside dans l'hydrolyse de l'urée pour produire le CO₂ et de l'ammoniac (NH₃). Elle est utilisée comme indicateur de la qualité de sol, car sa concentration est fonction du taux de la matière organique (Martinez-Salgado et al., 2010). Le seul cas où il peut être nécessaire d'en ajouter artificiellement est celui du traitement à l'urée effectué en présence de quantités très réduites d'eau et à des températures tempérées, voire fraîches (Williams et al., 1984).

3.8 Dégradation de la tyrosine

Les résultats obtenus après incubation sur la gélose à la tyrosine ont permis la mise en évidence de la présence de la tyrosinase. Ce dernier est reconnu par auréole de coloration marron autour de la colonie ou par changement complet de la coloration de la gélose en marron (**Figure 26**).

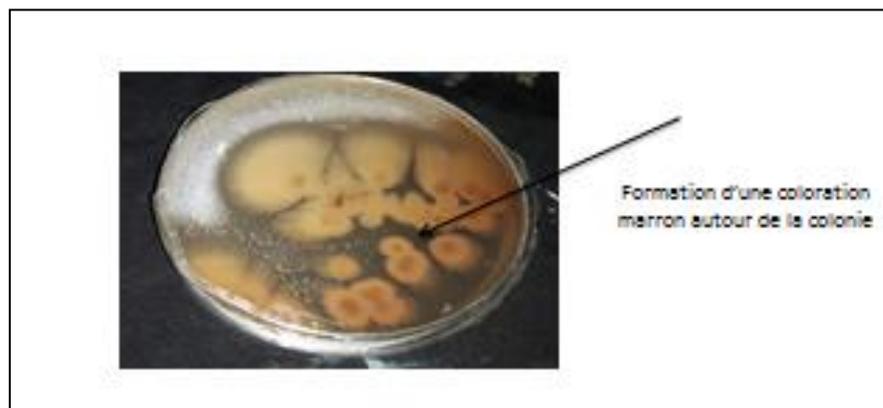


Figure 26 : Principe de révélation de l'activité tyrosinolytique.

D'après les résultats rapportés dans la figure, nous avons remarqué qu'il y a 12 souches parmi les 16 testées possédant l'activité tyrosinolytique (**Figure27**). Nos résultats sont en accord avec ceux présentés par Cheriet et Amari (2016) pour l'étude des activités enzymatiques chez des souches d'actinomycètes.



Figure 27 : Résultats de l'activité tyrosinolytique de 16 souches.

3.9 Dégradation de pectine

La révélation de la sécrétion des pectinases qui dégradent la pectine est faite par l'ajout d'une solution d'acétate de cuivre, ce dernier précipite la pectine non dégradée, un halo translucide clair sur fond bleu clair apparaît autour des colonies productrices de pectinase (Figure 28).

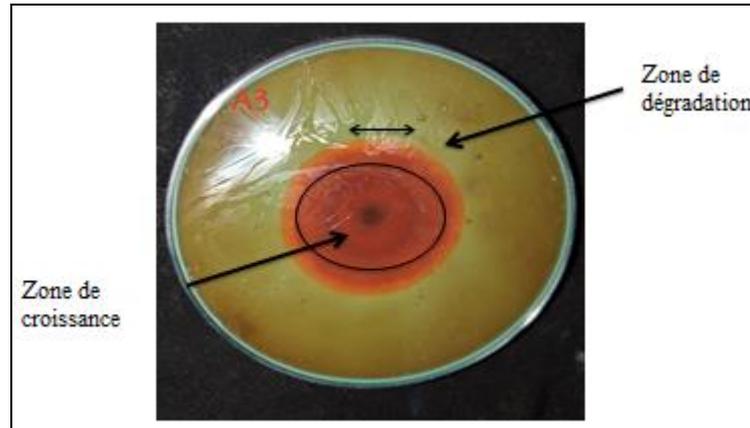


Figure 28: Principe de révélation de l'activité pectinolytique par l'acétate de cuivre.

D'après nos résultats, on a remarqué que parmi les 16 isolats testés on a 09 souches possédant une activité pectinolytique (**Figure29**). Nous observons des zones de dégradation de différents diamètres chez neuf souches. En effet, la souche A3 *Microsporium sp.* Présente une activité importante d'après son diamètre par rapport aux autres souches.

Les résultats obtenus corroborent ceux traités par Meziani et Mahcene (2017), où ils ont montré que divers champignons sont connus par la production d'un mélange des enzymes +hydrolase et les plus connus sont des genres *Penicillium* et *Aspergillus* qui présentent une activité pectinolytique importante.

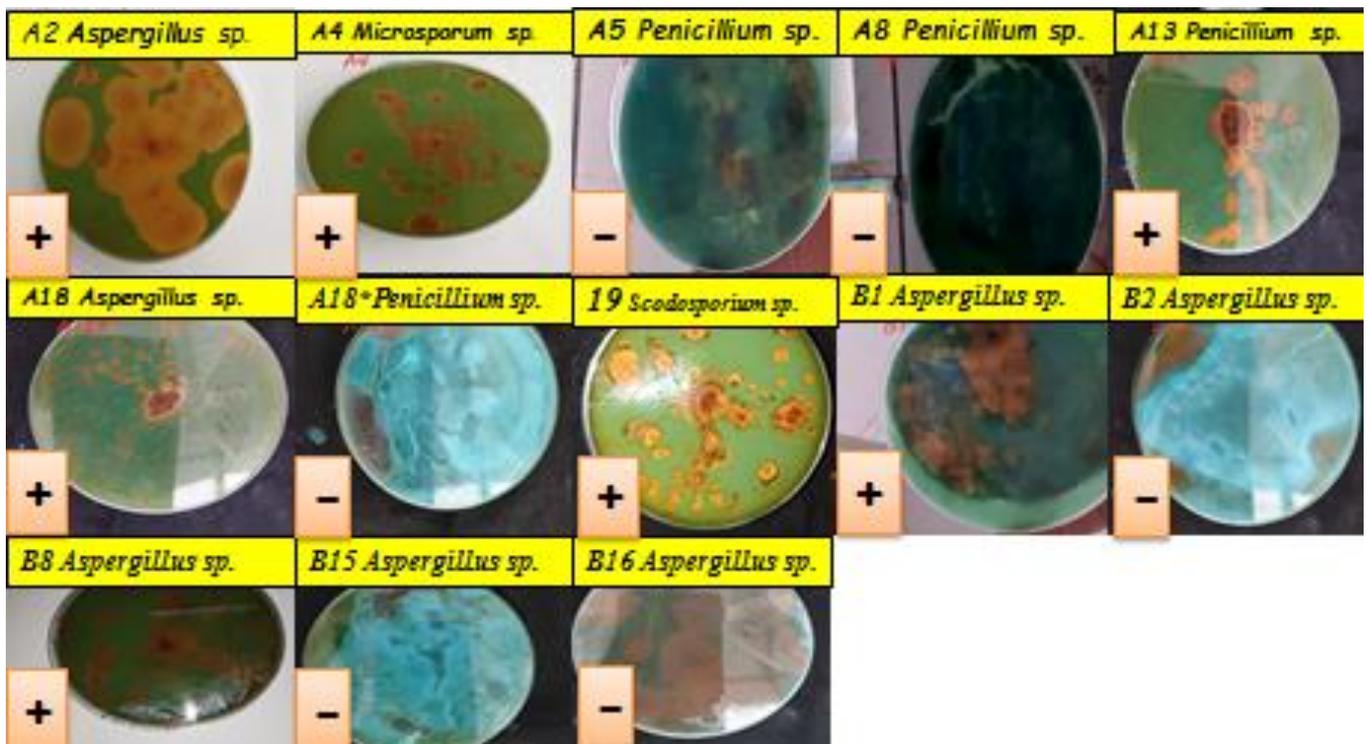


Figure 29 : Zone d'hydrolyse de pectine par les souches testées

N °	substrat dégradé	B1	B2	B8	B15	B16	A2	A3	A4	A8	A9	A13	A15	A17	A18	A18*	A19	%
1	Amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	93%
2	Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
3	Caséine	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	81%
4	Gélatine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
5	Tween80	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	75%
6	Lécithine	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	43%
7	Urée	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	18%

Les résultats des activités enzymatiques des 16 souches étudiées sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

8	L-tyrosine	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	81%
9	Pectine	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	56%

Ces résultats montrés dans la Figure 30 nous permettent de déduire que l'amidon est le substrat le plus dégradé avec un pourcentage de 21% ; suivi par la caséine et la L-tyrosine avec 18% pour chacune ; ensuite tween 80 avec 17%.

En 4^{ème} position, viennent la pectine avec 12, la lécithine avec un pourcentage de 10%.

Enfin ; l'urée est le substrat le moins dégradé par rapport aux autres substrats testés ; avec un pourcentage de 4%.

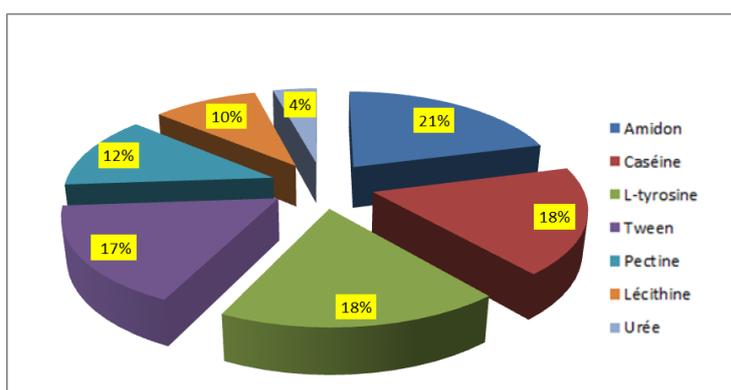


Figure 30 : Répartition des activités enzymatiques selon la nature du substrat dégradé.

Nos résultats sont en accord avec ceux présentés par Cheriet et Amari (2016) pour l'étude de quelques activités enzymatiques chez des souches d'actinomycètes, où ils ont mentionné la prédominance de l'activité amylolytique. Néanmoins, leurs résultats des autres activités étudiées ne sont pas proches à nos résultats.

L'étude enzymatique a montré que le bagage enzymatique des 16 souches testées est très important, elles sont capables d'hydrolyser l'amidon, la caséine, la L-tyrosine, la pectine, la lécithine et le tween80. Pour cela, on peut les considérer comme des producteurs d'enzymes extracellulaires.

4. Présentation des résultats de fermentations

Cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus à partir de fermentation à différentes températures réalisées en erlenmeyers de 250 ml ; et qui ont permis après quelques jours, de récupérer des filtrats, utilisés ultérieurement pour le dosage enzymatique.

4.1 Résultats du pH

Le tableau 15 ci-dessous, montre les variations du pH de la culture après fermentation dans une gamme de température de 30°C à 53°C avec un intervalle de 5°C.

Tableau17: Résultats du pH des cultures après fermentation.

Température	30°C	30°C*	37°C	48°C	53°C
pH	5.25	7.10	7.40	6.45	6.77

D'après ce tableau, on remarque que le pH reste dans l'intervalle allant de 5 jusqu'à 7 sous les quatre températures. Il montre une stabilité du pH proche de la neutralité avec une diminution dans l'essai du déchet ménager incubé à 30°C. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les déchets de tomates possèdent un excellent pouvoir tampon, comme c'est le cas pour la plupart des résidus agroindustriels (Chutmanop et *al.*, 2008).

L'augmentation s'explique par libération de molécules alcalines tels que l'ammoniaque résultant de la dégradation des protéines ; tandis que la diminution, par production d'acides organiques ; cependant dans notre cas à 30°C de déchet ménagère, il y avait pas un développement de la moisissure assez important.

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).

4.2 Résultats de l'activité protéolytique

Par leur richesse en matières carbonées et azotées et en sels minéraux, les déchets de tomates peuvent être aisément utilisés comme milieu de base pour la culture des microorganismes, en

particulier les moisissures. En effet, d'après Knoblich et *al.* (2005), ils sont donc favorables à l'induction de la production des protéases.

Dans cette partie, on a présenté nos résultats de fermentation solide à base de déchets de tomate après incubation 6 jours à différentes températures. Ces résultats seront plus détaillés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Résultats de l'activité protéolytique après fermentation.

Souche	Température	Activité protéolytique (U) /ml
<i>Aspergillus versicolor</i>	30°C	163,85
	30°C (répétition)	1050,06
	37°C	1336
	48°C	537,34
	53°C	787,95

L'activité enzymatique testée dans le milieu de fermentation solide à base de déchets de tomate a montré que la production de protéase diffère d'une température à une autre (Figure 31).

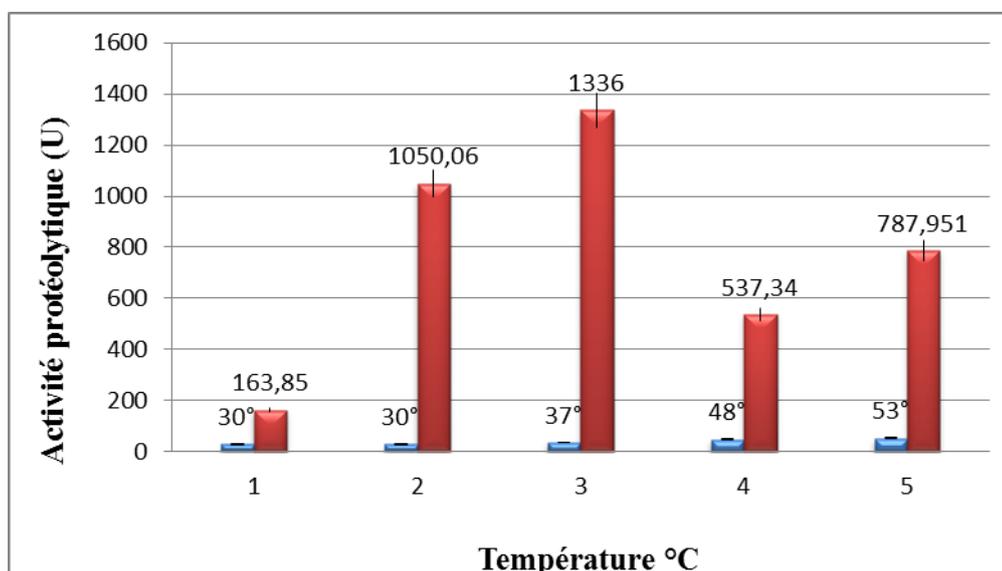


Figure 31: Résultats de l'activité protéasique sous les quatre températures.

Par ailleurs, on remarque que la quantité d'enzyme ciblé produite par la souche *Aspergillus versicolor* diffère d'une température à une autre. La meilleure activité obtenue (1336 U) est sous la température 37°C, suivie par (1050,06 U) sous la température 30°C (répétitions par le déchet industriel), par la suite (787.95 U) sous la température 53°C et une quantité de (537.34 U) sous la température 48°C. Le faible rendement en activité protéasique est remarqué sous la température 30°C.

Ces résultats démontre que la température optimale pour la production d'enzymes s'est révélée être de 37°C, où la production maximale de protéase mesure 1336µg/h/ml qui s'accompagne avec une concentration de tyrosine de 66,80 µg/ml. Ce qui reflète la nature de l'espèce mésophile utilisée (Bousmeil, 2013). D'autre part, une production aussi importante a été observée sous les températures 30°C (déchets industrielle) et 53°C associée à une moindre production des protéines à 48°C.

Par conséquent, la température est un facteur qui joue un rôle très important sur l'activité protéolytique, car elle influence direct sur la sécrétion extracellulaire de l'enzyme par accélération de la vitesse de la réaction enzymatique avec une modification des propriétés physiques de la membrane cellulaire. L'élévation de la température dans certaines limites a pour effet d'augmenter l'activité des enzymes. En effet, elle affecte la production de protéase par induire ou réprimer leur synthèse (Nardello-Rataj et *al.*, 2003).

Conclusion

Conclusion

La conception de ce travail repose sur l'observation que les champignons thermophiles présentent des vitesses de croissance élevées à des températures d'incubation élevées. De ce fait, on pourrait supposer que la biosynthèse des produits issus de leur métabolisme serait particulièrement rapide, en particulier la production de leurs enzymes. Etant donné l'adaptation de ces champignons à des températures élevées, on pourrait également supposer que leurs enzymes produites seraient thermostables.

A partir de ces deux hypothèses, nous avons structuré le présent travail. Tout d'abord, des souches de champignons provenant de sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales) ont été isolées, purifiées et quelques aspects morphologiques de ces isolats ont été étudiés. Ensuite, on a mis en évidence, sur milieux gélosés la production des activités hydrolases, à savoir amylase, cellulase et pectinase avec d'autres activités par ces moisissures. Ainsi que, la production de la protéase par fermentation sur milieu solide à base des déchets tomate sous quatre température différents 30°C, 37°C, 48°C, 53°C.

À la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que :

L'étude macroscopique et microscopique effectuée sur les 16 souches isolées, a abouti à la répartition de ces dernières en 4 genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Microsporium*, *Scedosporium*. Toutes les 16 souches étudiées ont montré au moins une activité enzymatique ce qui démontre leur importance, ainsi que l'enzyme la plus sécrétée par nos souches c'est l'amylase avec un pourcentage de (93%) suivie par la caséinase et la tyrosinase (81%), l'estérase (75%) et la pectinase (45%).

La mise en évidence de l'activité proteolytique sur gélose au lait démontre que la souche *Aspergillus versicolor* est la plus performante selon le diamètre de la zone hydrolyse au tour de sa colonie. L'analyse des résultats du dosage de l'activité protéolytique a prouvé la capacité de cette moisissure de produire une grande quantité de protéase sur milieu solide à base de déchet de tomate. Par conséquent, le meilleur résultat (1336U) a été obtenu à température 37°C, sachant que la production de cette enzyme à la température 30°C (répétition avec déchet industriel) occupe la deuxième position 1050 U d'activité protéasique, suivie par une production de (787,95 U) sous la température 53°C. Par ailleurs, l'activité la plus faible a été indiquée sous la température 48°C par 537,34U.

Cette étude de la mise en évidence et la production des enzymes hydrolases des souches fongiques a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés par les perspectives suivantes :

- Optimiser les conditions de culture de la souche sélectionnée pour une bonne production enzymatique.
- Purification recommandée des enzymes pour une éventuelle utilisation en industrie alimentaire ou pharmaceutique.
- Caractériser l'enzyme purifiée afin de vérifier sa thermostabilité.

Références bibliographiques

Anderson T. H., Martens R. (2013). Soil Biology and Biochemistry, 57 : 487-495.

Bååthe E., Söderström B.E. (1980). Comparaisons of the agar-film and membrane filtermethods for the estimation of the hyphal lengths in soil , with particular reference to the effect of magnification. *Soil Biol. Biochem.* 12 :385-387.

Benghrieb., Gerboua. (2017). Etude de l'activité antibactérienne de moisissures isolées à partir des milieux salins. Mémoire : microbiologie, option : fermentation et production de substance.

Bensmira S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (Sol et Sebkhia de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel. Mémoire de Magistère En Biochimie –Microbiologie Appliquées. Université Mentouri-Constantine, 77 p.

Bhat M. K., Bhat S. (1997). Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances.* 15(3-4) : 583-620.

Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. *Edition Nathan.* P : 13-80. Bordas. Paris. P. 36-153.

Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. *Nathan. Paris.*

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy p., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. *2ème édition. Masson.* Paris. pp. 16-41 : 110-428.

Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1996). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. Lavoisier. Paris. 236-246.

Burhan A., Nisa U., Gokhan C., Omer 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 Biochem.* 38, P : 1397-1403.

Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gülnaz O. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem,* 38 : 1397-1403 .

Calvet R., (2003). Le sol propriétés et fonctions, Tome 1. *Edition France agricole, Paris.* 456.

Calvet R., (2003). Le sol propriétés et fonctions, Tome 1. *Edition France agricole, Paris.* 456.

Cheriet M., Amari S. (2016). Étude de quelques activités enzymatiques d'une collection d'actinomycètes. Mémoire: Microbiologie, option : Écologie microbienne. Constantine : Université des Frères Mentouri, p 48.

Chesson A. (1987). Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In : Hresign W, Cole DJA, editors. Recent Advances in Animal Nutrition. London, Butterworths, p. 71-89.

Christensen M. (1989). A view of fungal ecology. *Mycologia*. 81 :1-19.

Costa R.P., Flevo F. (2005). Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Food Chem.* 89, 85-92 p.

Cyglér M., Schrag J.D. (1995). Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1441, 205-214.

Dao H.P. (2005). Caractérisation de certains gènes polycétones synthases chez *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide pénicillique. Thèse de doctorat d'état ; Option Microbiologie. Institut national polytechnique de Toulouse, 126 p.

Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.

Deverall, B.J. (1965). The Physical Environment for Fungal Growth. En 'The Fungi, an Advanced Treatise'. Ed. G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN. Vol. I. Academic Press. New York. 543-550.

Dix N.J., Webster J. (1995a). Structure of Fungal Communities. En 'Fungal Ecology'. Chapman & Hall. London. 39-84.

Dix N.J., Webster J. (1995b). Fungi of Extreme Environments. En 'Fungal Ecology'. Chapman Hall. London. 322-332.

Djelal H., Perrot M. (2009). Utilisation de champignons spécifiques pour la biodégradation d'effluents industriels. L'eau, l'industrie, les nuisances. *Revue Ain* N° 306. Ecole des Métiers de l'Environnement, Bruz Damien Grizard, Aquaprox, filiale du groupe Protex International, pp.85-90.

Ellaiah P., Adinarayana K., Sunitha M., Devi R.B. (2003). Alpha amylase product by *Penicillium sp.* from some soil in India. Lab: pharmaceutical biotech. *Indian journal of microbiology*. 43 (2), pp.135-137.

Ellis, D.H. (1980a). Thermophilic fungi isolated from a heated aquatic habitat [Hazelwood Power Station cooling pond, Victoria, Australia]. *Mycologia*. 72: (5) 1030-1033.

Ellis, D.H. (1980b). Thermophilous Fungi Isolated from some Antarctic and Sub-Antarctic Soils. *Mycologia*. 72: (5) 1033-1036.

Ertan F., Balkan B. (2007). Production of α -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4), P: 439-442.

Fogarty W.M., Kelly C.T. (1980). Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion. London : Academic Press, Vol. 5, 115-170 p.

Frazier W.C. (1967). Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.

Gao J., Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F., Xi Y. (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solide state cultivation of corn stover. *Bioressour Technol.* 99 : 7623-7629.

Garrido-Jurado I., Ruano F., Campos M., Quesada-Moraga E. (2011). Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. *Biological Control.* 59: 239-244.

Gobat M., Argano M., Mathey W. (2003). Le sol vivant, France, 568 pages.

Granner d.K., Murray r.k., Rodwell V.W. (2008). Biochimie de HARPER. 3^e édition. *De Boeck.* Bruxelles., pp. 49-51, 483.

Guiraud J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.

Hasper A A., Dekkers E., Mil M V., Van de Vondervoort P J I., De Graaff L H. (2002). Egl C, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4) : 1556-1560.

Ingham E. R. (2000). The soil biology primer : soil fungi ,chapter 4, (edn) NRCS. Departement of agriculture. USA. *ISBN. Quebec. Canada.*

Jerome P., Lory S., Staley J. S., (2004). Microbiologie, Paris., 891 pages.

Josefsson P. (2006). Biochemical modification of wood components. KTH, the royal institute of Technology, Department of Fiber and Polymer technology, Stockholm.

Kader A.J., Omar O., and Feng L.S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the bario Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of Biodiversity and Environmental Conservation.

Keating L., Kelly C., Forgraty W. (1998). Mechanism of action and the substrate dependant pH maximum shift of the- amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research.* P : 311-318.

Kim M. (2002). Les domaines associés à Forkhead de l'activateur de transcription NtFHA1 de tabac et du facteur de transcription Fhl1 de levure chez la levure sont conservés fonctionnellement. *J Biol Chem* 277 (41) : 38781-90.

Korish M. (2003). Production, purification, properties and application of the cellulose From a wild type strain of a yeast isolate. Faculty of biology, Johannes gutenberg-University, mainz, germany.

Kosikowski F. V. (1988). Dairy foods research papers. Enzyme behavior utilization in dairy technology. *J. Dairy Sci.* 71, pp.557-573.

Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008a). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.*, 99 ; 2364–2372.

Lacoste A., Salanon R. (2001). *Eléments de biogéographie et d'écologie. Ed, Nathan, 318 pages.*

Lansing P., Harly J., Donald A., (2003). *Microbiologie, 2ème Edition Paris, 1137 pages.*

Leghlimi H. (2013). Cellulases de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de Doctorat en Sciences.

Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. (2006). Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.

Leveau J.Y., Bouix M. (1993). Les moisissures. *In* : Florent J. Ed. *Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel.* Edition Tec et Doc .Lavoisier .Apria, pp.110-170.

Madigan M.T., Martinko J.M. (2007). *Biologie des microorganismes. 11ème édition. Pearson Education. Broek. France. pp. 478-479.*

Madigan M.T., Matinko J.M and Parker J. (1997). *Brok biology of microorganisms, 8 Edition. USA.*

Mahmoud. A., Abdirahman .S .(2017) Literature Review on Tyrosinase Enzyme .

Martinez.S M.M., Gutiérrez.R V., Janssens M. ., Ortega.B (2010). Biological soil quality indicators: a review. *In*: Mendez-Vilas A. (Ed.), *Current Research,Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* Formatex, Spain. p. 319-328

Mercier.C.(1985). Les enzymes amylolytiques. *In* Mauranch A & Costes C. (Ed) : *Hydrolase et polymerases.*Ed. Gauthier Villars.109-142p.

Meunier, N.E. (1999). Valuation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. *M.ScThesis, INRSETE, Univ. Quebec. Canada. Pp. 1-168.*

Meziani.A ., Mahcen.H. (2017). Activités hydrolases des souches fongiques. Production par fermentation de cellulase et d' α -amylase par *Penicillium*. sp sur substrat solide. Mémoire :Microbiologie, Option : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de substances fongiques. Constantine : Université Mentouri, 55 p.

Moallaei H., Zaini F., Pihet M., Mahmoudi M., Hashemi J. (2006). Isolation of keratinophilic fungi from soil samples of forests and farm yards. *Iranian J Publ Health, Vol. 35, No. 4, 2006, pp.62-69.*

- Nardello V., Salager J. L., Aubry J. M. (2003).** Propriétés amphiphiles des tensioactifs de la famille du monolaurate de polyglycérol et application à la préparation de microémulsions à base d'esters gras, *Oléagineux, Corps Gras et Lipides*, 10, 382-386.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000).** L'essentiel en microbiologie Berti. Paris, pp.210-216.
- Ottaviani F., Disegna L., Spolaor D. (1988).** Yeasts and identification in food industry. *Microbiologie- Aliments- Nutrition*. 6 : 221-226.
- Pandey A. (1991).** Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid state fermentation. *Bioresour. Technol.* 37, P: 169-172.
- Patrick .F., (1), Jacqueline .D., (2), Philippe. Thonart B. A ., Soc. (2008)** 12(2), 119-130
Revigorer le concept de situation en psychologie sociale Harry T. Reis Première publication le 10 juin 2008.
- Pelmont J. (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.
- Pinky P. (2012).**In vitro Cellulose Rich Organic Material Degradation by Cellulolytic *Streptomyces albospinus* (MTCC 8768). *Mal. J. Microbiol.* Vol 8(3) 2012, pp. 164-169.
- Prescott., Harly., Klein. (1995).** Microbiologie. 2th Edition. *Debroeck-wesmael. Bruxelles.*
- Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J., Van den Hondel C. (2002).** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20(5): 200-206.
- Raval (2012).** Biotransformation of a single amino acid L tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. *Int JSci Res*, 2: 2250–3153.
- Roy S, Das I., Munjal M., Karthik L., Kumar G., Kumar S ., Rao KVB. (2014).** Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine actinobacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment. *Front. Biol.* 9 (4): 306–316.
- Ruark G. H., Zarnoch S. J. (1992).** Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. *Soil Sc. Soc. Am.J.* 56 :1945-1950.
- Samson R.A., Eckalorolt C.,Orthe R. (1977).** The taxonomy of *Penicillium* spies for fermented cheese Henkel et cie GmbH, dept of microbiology D- 4000 Düsseldorf, pp.341-350.
- Schnürer J.,Clarholm M., Rosswall T. (1985).** Microbial biomass and activity in a agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biol. Biochem.* 17 :611-618.
- Scriban R. (1993).** Biotechnologie. 4ème édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P : 40.
- Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier Paris, pp.149-159.

Sierra.G. (1957). a simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *J. Microbial Seriol.*, 23: 15-22.

Subler S.,Kirsh K.S. (1998).Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthwarm middens in no-tillcornfield. *Bio. Fert. Soils.* 26 :243-249.

Sundus F., Fazal M.A., Masjuki H.H. (2013) Évaluations des énergies renouvelables et durables 70, 399-412, 2017 V. N. Jisha et al. / *Advances in Enzyme Research* 1 39-51.

Tabuc C. (2007). Incidence of *Fusarium* species and of their toxins in the compound feeds for poultry, International Scientific symposium: Performances and competitiveness in animal production, 26-27 avril 2007, Iasi, Roumanie.

Taechowisan T., Peberdy. JF ., Lumyong S. (2003). Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Ann Microbiol*53, 447–461.

Williams.,Cross.(1971).Isolation, purification, cultivation and preservation of actinomycetes. *Methods Microbiol.* 4 : 295-334.

Xu.B.(2002). Endoglucanase and Mannanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis* : Purification, Characterization, Gene and Three Dimensional Structure. Thèse de doctorat. Faculty of Science and Technology, Uppsala University, Sweden.

Annexes

Annexe 01: EAU PHYSIOLOGIQUE

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9 pour 1000 (= solution à 0,9% (masse/volume) de NaCl, soit 9g.l-1).

Annexe 02 : POTATO DEXTROSE AGAR (PDA)

- Pomme de terre200g
- Glucose20g
- Agar15 g
- Eau distillée..... compléter jusqu'à 1000 ml
- Stériliser par autoclavage à 121°C / 20 min

Préparation de l'extrait pomme de terre :

200g de pomme de terre non pelées vieilles sont lavés et coupés en petites dés ensuite mis dans un litre d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1heure , ils sont enfin écrasés filtrés ,compléter à 1L d'eau distillée.

Préparation de milieu de culture :

L'agar et le glucose dissous à chaud dans l'extrait, compléter à 1L d'eau distillée.

Milieux pour tests enzymatiques

Annexe 03: La gélose à la cellulose

- Cellulose 0,5g
- NaNO₃ 0.1 g
- K₂HPO₄ 0.1 g
- MgSO₄ 0.05 g
- Extrait de levure..... 0.05 g
- Agar 15 g
- PH =7

Annexe 04 : La gélose de Gause

- KNO₃ 1.0 g
- K₂HPO 0.5 g
- MgSO₄ 0.5 g
- NaCl 0.5 g
- FeSO₄ 0.01 g
- Amidon 20.0 g
- Agar 30.0 g
- Eau distillée 1000 ml
- PH = 7,4

Annexe 05 : gélose au lait écrémé

- Peptone 10 g
- NaCl 5g
- Extrait de levure3 g
- Agar 20g
- Eau distillé.....1000 ml
- Lait écrémé.....100 g dans 1000 ml d'eau distillé

Annexe 06 : Gélose nutritive à la gélatine

- Peptone5 g
- Extrait de bœuf3 g
- Gélatine 4 g
- Agar 15 g
- Eau distillée..... 1000 ml
- PH = 7

Annexe 07 : Le milieu de Sierra additionné de tween 80

- Peptone 10 g
- NaCl 5g
- $\text{CaC}_{12} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0.1g
- Eau distillée1000 ml
- Agar 18 g
- Tween 80 10 ml
- PH = 7.4

Annexe 08 : La gélose au jaune d'œuf (à 1%)

- Peptone..... 10 g
- Extrait de levure5 g
- NaCl10 g
- Agar 20 g
- Jaune d'œuf 100 ml
- Eau distillée1000 ml
- PH = 7

Annexe 09: Milieu urée indole

- Urée 2 g
- L-tryptophane 0,3 ml
- Chlorure de sodium 0,5 mg

- KH_2PO_4 0,1 mg
- K_2HPO_4 0,1 mg

Annexe 10 : Gélose à la tyrosine

- Peptone 05 g
- Extrait de viande3 g
- L-tyrosine 05 g
- Agar20 g
- Eau distillée1000 ml
- pH = 7

Annexe 11 : la gélose MP7

- Glucose 05g
- Pectine 05g
- KH_2PO_4 04g
- Na_2HPO_4 06g
- Extrait de levure 01g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 02g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001g
- (01mg) MgSO_4 0.2 g
- CaCl_2 0.001g (01mg)
- H_3BO_3 0.00001g (10 g)
- MnSO_4 0.00001g (10 g)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.00007g (70 g)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.00005g (50 g)
- Eau distillée 1000 ml
- Agar 15 g
- pH = 7.2-7.4

Colorants

Annexe 12 : La solution aqueuse de Rouge Congo

- Rouge Congo 1 g
- Eau distillée 100 ml

Annexe 13 : La solution de lugol

- Iodure de potassium..... 2 g
- Iode métalloïde I₂..... 1 g
- Eau distillée.....100 ml

Annexe 14 : La solution de chlorure de mercure

- HgCl₂..... 15 g
- H Cl concentré..... 20 ml
- Eau distillée..... 100 ml

Annexe 15 : La solution d'acétate de cuivre

- Acétate de cuivre..... 10g
- Eau distillée..... 100 ml

Dosage de l'activité protéolytique

Solutions utilisées :

- Caséine 2,5% dans Citrate de Sodium (0,02M).
- Solution mère 100ug /ml de tyrosine.
- TCA 4% .

- Na_2CO_3 15% dans NaOH (0,1 N).
- Folin-Ciocalteux 1/4^{ème}.

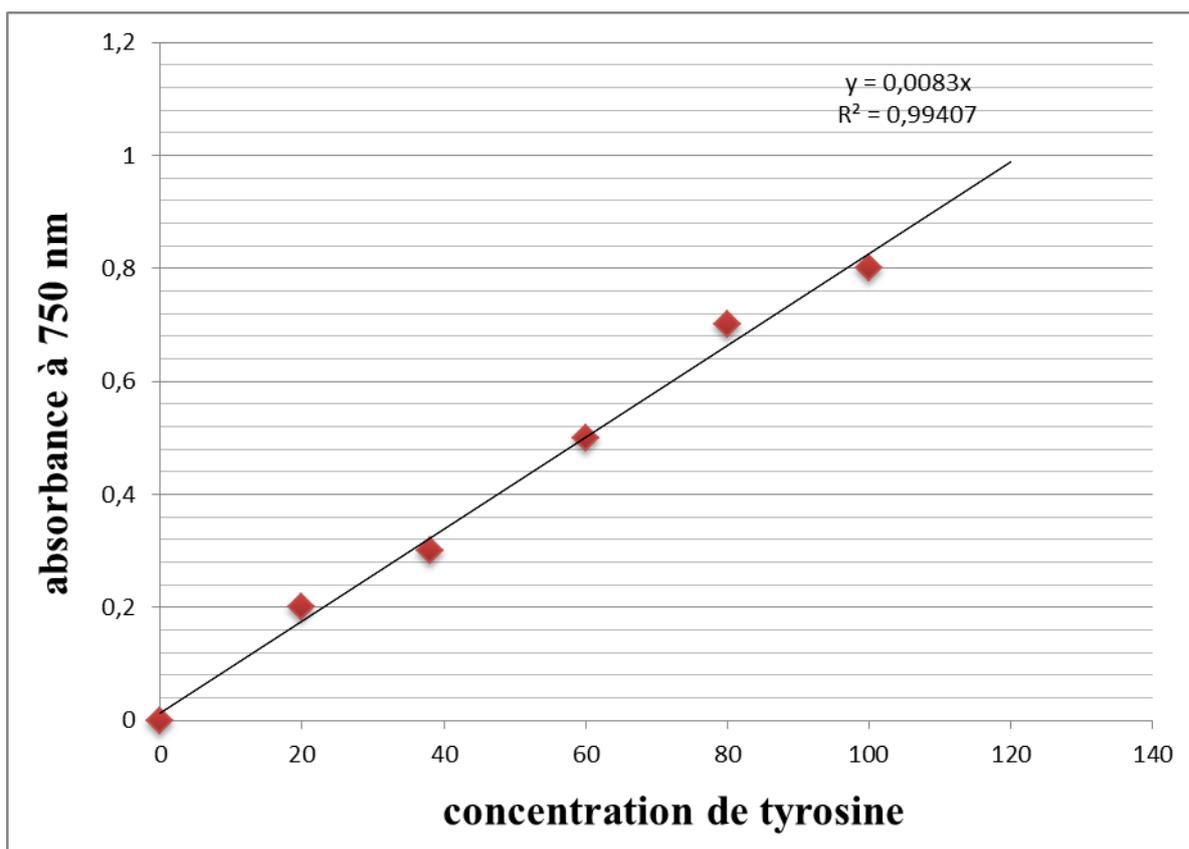
Selon le Protocole suivant :

Dilution	Blanc	1	2	3	4	5
Solution mère de tyrosine (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
TCA (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
NaOH	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Agitation et incubation pendant 10 min à T° ambiante.						
Folin 1/4	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Agitation vigoureuse du mélange, puis incubation 30 min à température ambiante à l'obscurité. En fin, lecture de la densité optique à 750 nm.

Une unité de protéolyse correspond à la libération de 1 μg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans un ml d'échantillon (1 $\mu\text{g/h/ml}$). La concentration déduite de la courbe d'étalonnage correspond à 0,5 ml d'échantillon dilué par les réactifs ajouté au cours de la première étape.

La courbe d'étalonnage de la tyrosine



Abstract

The objective outlined in this study is to isolate fungal strains that produce thermostable enzymes. For this purpose, soil samples were taken from two different sites at a thermal spring in the Hammam Grouz region (Oued Athmania Mila). After the dilutions and seeding on PDA medium have been carried out, 36 mould strains have been isolated, these strains are then purified in order to identify them. The macroscopic and microscopic study carried out on the isolates resulted in the division of the latter into 4 genera : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Microsporum*, *Scedosporium*. Then, on agar media the production of hydrolase activities, namely amylase, cellulase and pectinase with other activities by these moulds All the strains studied showed at least one enzymatic activity, knowing that amylase is the enzyme most produced by our strains with a percentage of 93%. Regarding the detection of the proteolytic activity of the strains tested on milk-based agar medium, the *Aspergillus versicolor* strain was selected for fermentation according to the diameter of the observed proteolysis halo, which is the highest (40 mm). The latter is subsequently grown in a solid fermentation medium based on tomato waste at four different temperatures (30°C, 37°C, 48°C, 53°C). The results obtained revealed that the *Aspergillus versicolor* strain gave an excellent activity reaching 1050.06 U at the end of the seventh day of fermentation at 37°C. Therefore, the enzymatic study of the 16 strains tested showed that the enzymatic background is very important. The interest of these strains lies in the possibility of applying their enzymes in different industrial fields requiring the presence of thermostable enzymes.

Keywords: Isolation, thermal spring, *Aspergillus versicolor*, enzyme, Fermentation.

الملخص

الهدف الذي تم التركيز عليه في هذه الدراسة هو عزل السلالات الفطرية التي تنتج إنزيمًا مقاوما للحرارة. لهذا ، تم أخذ عينات من التربة من موقعين مختلفين في نبع حراري في منطقة حمام جروز (ميلة). بعد إجراء التخفيفات والبذر على وسط PDA، تم عزل 36 سلالة الفطريات المجهرية، ثم يتم تنقية هذه السلالات من أجل تحديدها. أسفرت الدراسة العيانية والمجهرية التي أجريت على العزلات في توزيع هذا الأخير في 4 أجناس: *Aspergillus* ، *Penicillium* ، *Microsporium* ، *Scedosporium* بعد ذلك ، تم اظهار إنتاج أنشطة الهيدرولاز على وسائط الأجار (agar)، وهي الأميليز ، السليلاز والبكتيناز مع أنشطة أخرى بواسطة هذه السلالات، أظهرت جميع السلالات المدروسة نشاطاً إنزيمياً واحداً على الأقل ، مع العلم أن الأميليز هو الإنزيم الأكثر إنتاجاً من سلالاتنا بنسبة 93%. فيما يتعلق بإظهار نشاط التحلل البروتيني للسلالات التي تم اختبارها ، والتي تم إجراؤها على وسط أجار قائم على الحليب ، تم اختيار سلالة *Aspergillus versicolor* للتخمير لأهمية قطر هالة التحلل البروتيني الذي بلغ (40 مم). يزرع الأخير في وقت لاحق في وسط تخمير نفايات الطماطم عند أربع درجات حرارة مختلفة (30 درجة مئوية، 37 درجة مئوية، 48 درجة مئوية، 53 درجة مئوية). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن سلالة *Aspergillus versicolor* أعطت نشاطاً ممتازاً بلغ 1050.06 U في نهاية اليوم السابع من التخمير تحت درجة حرارة 37 درجة مئوية. أظهرت الدراسة الأنزيمية للسلالات الـ 16 التي تم اختبارها أن الأمتعة الأنزيمية مهمة جدا. تكمن مصلحة هذه السلالات في إمكانية تطبيق إنزيماتها في المجالات الصناعية المختلفة التي تتطلب وجود إنزيمات قابلة للحرارة.

الكلمات المفتاحية : عزل ، نبع حراري ، *Aspergillus versicolor* ، انزيم ، تخمير

Thème : Mise en évidence de quelques activités enzymatiques des souches fongiques isolées à partir de la source thermique *Hammam Grouz d'oued el Athmania (Mila)*.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en mycologie et biotechnologie fongique.

Résumé

L'objectif souligné dans cette étude est d'isoler des souches fongiques thermophile et thermotolérante. Pour cela, des échantillons du sol ont été prélevés de deux sites différents à partir d'une source thermique de la région *Hammam Grouz (Oued Athmania Mila)*. Après la réactivation et l'ensemencement sur milieu PDA, 36 souches de moisissures ont été isolées, ces souches ont été purifiées afin de les identifier. L'étude macroscopique et microscopique effectuée sur les isolats a abouti à la répartition de ces dernières en 4 genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Microsporum*, *Scedosporium sp.* Ensuite, on a mis en évidence, sur milieux gélosés, la production des activités hydrolases, à savoir amylase, cellulase et pectinase avec d'autres activités par ces moisissures. Toutes les souches étudiées ont montré au moins une activité enzymatique, sachant que, l'amylase est l'enzyme la plus produite par nos souches avec un pourcentage de 93%. A propos de la mise en évidence de l'activité protéolytique des souches testées qui a été réalisée sur milieu gélosé à base de lait, la souche *Aspergillus versicolor* a été sélectionnée pour la fermentation en fonction du diamètre du halo de protéolyse observé qui est le plus élevé (40 mm). Cette dernière est cultivée ultérieurement dans un milieu solide de fermentation à base de déchets de tomate sous quatre températures différentes (30°C, 37°C, 48°C, 53°C). Les résultats obtenus ont révélé que la souche *Aspergillus versicolor* a donné une excellente activité atteignant 1050,06 U au bout du septième jour de fermentation sous la température 37°C. Par conséquent, l'étude enzymatique des 16 souches testées a montré que le bagage enzymatique est très important. L'intérêt de ces souches réside dans la possibilité d'application de leurs enzymes dans différents domaines industriels exigeant la présence d'enzyme thermotolérante.

Mots clés : Isolement, source thermique, *Aspergillus versicolor*, enzyme, Fermentation. Protéase alcaline

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie (RDC). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président du jury :	<i>Mme. LEGHLIMI H.</i>	(M.C.A - UFM Constantine 1).
Rapporteur :	<i>Mme. BELMESSIKH A</i>	(M.A.A - UFM Constantine 1).
Examineur :	<i>Mme. ABDELAZIZ W.</i>	(M.C.B - UFM Constantine 1).

Date de soutenance : 15/07/2019.