

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1



Département de Microbiologie

N ° de série :

MEMOIRE

Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master domaine :

Science de la nature et de la vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

THEME

Production de l'enzyme chitinase par des champignons entomopathogènes cultivés sur deux milieux à base des déchets alimentaires (écorce de la citrouille et d'escargot).

Présenté et soutenu par : DJEBBARI CHAIMA

Soutenu le : 09/07/2019

GUEMAS ASMA

Jury d'évaluation :

Président de jury : Mme ALMI.H. (M.C.B UFM Constantine 1)

Encadreur : Mme ABDELAZIZ.O. (M.C.B UFM Constantine 1)

Examinatrice : Mme BELMESIKH .A. (M.A.A UFM Constantine 1)

Année Universitaire :

2018-2019

Remerciements

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

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre honorable encadreur Melle ABDELAZIZ OUIDAD.M.C.B., qui a bien voulu, par son aimable bienveillance,

diriger cette étude, qui a fait preuve d'une grande patience. Ses conseils, ses Orientations, sa compétence, sa gentillesse et ses intérêts portés pour ce sujet de recherche nous ont permis de mener à terme ce travail.

Son encadrement était le plus exemplaire.

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

Nous tenons à remercier également Melle BENMASIKH AICHA .M.A.A, d'avoir acceptée d'examiner ce travail.

Qu'elle trouve ici nos sincères sentiments de gratitude et de respect.

Merci affinement le corps technique de laboratoire de microbiologie (RDC)

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

Nous leur exprime notre éternelle gratitude.

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

À tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, aux quels Nous disons tout simplement.

Merci.

Dédicace

*Grace à Allah et avec sa faveur, j'ai pu réaliser ce travail et
je dédie ce mémoire à :*

*Ma chère mère **Salima** qui s'est tant battue pour mon bien être,
Pour sa bienveillance et sa force qu'elle me transmet pour traverser les plus
difficiles épreuves.*

*Mon cher père **Abderrazak** pour tout le soutien et l'encouragement que vous me
portez depuis mon enfance.
J'espère que leurs bénédictions m'accompagnent toujours.*

*Mes très chères frères **Haythem** et **Yahia** et ma princesse petite sœur **Douaa**.*

*Ainsi qu'à mon fiancé **Laib Abderraouf** que m'a donné la motivation
d'encouragement, la confiance et la patience.*

*Mes oncles et tantes avec leurs enfants sur tout tante **Sonia**
Et aussi toutes ma famille maternelle et paternelle.*

*Tous mes amis que j'ai rencontrés à la longe de parcours d'étude, parmi les
quelles : **Faten** et **Selma**.*

*Je remercie ma collègue au travail **Chaima** qui patientent avec moi pendant
toutes les moments de ce travaille sans oublier **Anwar**, **Aicha**, **Imen**, **Hadjer** et
les belles jumelles **Rayen** et **Racha**.*

Asma♥

Dédicace

A mon cher Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Rien au monde ne vaut ton dévouement et tes efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A ma chère mère

Aucune dédicace n'est assez éloquente pour exprimer ma gratitude pour tes sacrifices et tes encouragements à mon égard tout au long de mon parcours.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

*A mes frères **Naim, Chouaib** et ses femmes **Yakout, Ikram***

*Ainsi à ma sœur **Nedjwa** et son mari **Samir***

Pour leurs encouragements permanents, et leurs soutiens moral,

*A ma sœur adoré **Fulla***

Pour tout son amour, encouragements permanents, et son soutien moral. Que Dieu te garde et te protège.

*A mon fiancé **Mourad***

Pour tout son soutien moral et son motivation tout au long de mon travail,

Que Dieu te garde et te protège.

*A tout la famille paternelle et toute la famille maternelle **Saib***

A ma binôme Asma et tout sa famille.

Sans oublier Anouare, Aicha et Imen

Chaima

Table des matières

	page
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Partie bibliographique	3
Chapitre 1 : Champignons entomopathogènes	3
1.1. Généralités sur les champignons	3
1.2. Généralités sur les champignons entomopathogènes	4
1.3. Mode d'action	4
1.3.1. Phase d'adition	5
1.3.2. Phase de germination	5
1.3.3. Phase de pénétration	5
1.3.4. Phase de dissémination	6
1.4. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes	7
1.4.1. Facteurs liés aux pathogènes	8
1.4.2. Facteurs dépendant de l'hôte	8
1.4.3. Facteurs de l'environnement	8
1.4.3.1. Rayonnement solaire	8
1.4.3.2. Température	9
1.4.3.3. Humidité	9
Chapitre 2 : Chitinase	10
2.1. Généralités sur le chitinase	10
2.2. Classification de chitinase	10
2.2.1. Selon le mode d'action	10
2.2.2. Selon la structure	11
2.3. Le rôle de chitinase	15
2.3.1. Chitinases et microorganismes	15
2.3.2. Chitinases fongique	16
2.3.3. Chitinases animales	17
2.3.4. Chitinases végétales	17

2.3.5. Chitinase et insectes	18
2.4. Les propriétés physico-chimiques des chitinases	19
2.4.1. Le poids moléculaire	19
2.4.2. Le point isoélectrique (pI)	19
2.4.3. Activité enzymatique	19
2.4.4. La stabilité	19
2.4.5. Inhibiteur et activateur des chitinases	19
2.5. Application de chitinase	21
2.5.1 Gestion des déchets	21
2.5.2 Agents de bio contrôle	22
2.5.3. Application médicale	22
2.5.4. Applications diverses	23
2.6. La chitine, substrat de la chitinase	23
Chapitre 3 : Déchets alimentaires	25
3.1. Source végétale (grains de citrouille)	25
3.1.1. Description des graines de citrouille	25
3.1.2. Composition chimique et propriétés physicochimiques des graines de citrouille	25
3.2. Source animal (escargot <i>Helix aspersa</i>)	26
3.2.1. Généralités sur <i>Helix aspersa</i>	26
3.2.2. Classification	26
3.2.3. Morphologie	26
3.2.3.1. La coquille	26
3.2.3.2. Le corps	27
3.2.4. Biochimie de l'escargot <i>H.aspersa</i>	27
Matériel et méthodes	28
1. Collectes des insectes	29
2. Etude mycologique	30
2.1. Désinfection des insectes	30
2.2. Isolement des champignons entomopathogènes	30
2.3. Purification	30

2.4. Identification	31
2.4.1. Observation macroscopique	31
2.4.2. Observation microscopique	31
3. Production de chitinase	32
3.1. Préparation de la chitine colloïdale	32
3.2. La mise en évidence de l'activité chitino lytique	32
3.3. Fermentation sur milieu liquide à base des déchets alimentaires	32
3.3.1. Milieu liquide à base des écorces des grains de la citrouille	32
3.3.1.1. Préparation de milieu de culture à base des écorces des grains de la citrouille	32
3.3.1.2. Conduite de fermentation	33
A. Effet du pH	34
B. Effet de la température	34
3.3.2. Milieu liquide à base des déchets d'escargot (<i>H.aspersa</i>)	35
3.3.2.1. Préparation de milieu de culture à base d'escargot (<i>H.aspersa</i>)	35
3.3.2.2. Conduite de fermentation	35
4. Technique analytique	36
4.1. Mesure du pH	36
4.2. Dosage de l'activité chitino lytique	36
Résultats et discussion	37
1. Etude mycologique	37
1.1. Isolement, purification et identifications des champignons entomopathogènes	37
2. Chitinase	40
2.1. La mise en évidence de l'activité chitino lytique	40
2.2. Activité enzymatique	42
2.2.1. Déchets des grains de la citrouille	42
2.2.1.1. Effet du pH	42
A. Mesure du pH	42
B. Activité chitino lytique	43
2.2.1.2. Effet de la température	44

A. Mesure du pH	44
B. Activité chitinolytique	45
2.2.2. Déchets d'escargot	45
2.2.2.1. Effet du pH	45
A. Mesure du pH	45
B. Activité chitinolytique	46
2.2.2.2. Effet de la température	47
A. Mesure d pH	47
B. Activité chitinolytique	47
Conclusion générale	52
Références	54
Annexes	60
Abstract	61
ملخص	62

Liste des figures

Numéro	Titre	page
Figure 1	Schéma du cycle biologique de <i>Beauveria bassiana</i> (R .sabbahi, 2008)	5
Figure 2	Pénétration au travers de la cuticule de l'insecte. (R .sabbahi, 2008)	6
Figure 3	Représentation des 5 classes de chitinases (modifié d'après Singh et al., 2007, (Graham et Sticklen 1994; Kolosova et al. 2014).	12
Figure 4	Structure tridimensionnelle des chitinases de la famille 18 (exemple d'une chitinase de classe III) (modifié d'après Neuhaus, 1999).	13
Figure 5	Motif spécifique de type DXDXE de la famille 18 des glycosides hydrolases.	13
Figure 6	Structure tridimensionnelle des chitinases de la famille 19 des glycosides hydrolases (exemple d'une chitinase de classe II) (modifié d'après Neuhaus, 1999).	14
Figure 7	Signature spécifique de la famille 19 des glycosides hydrolases (Robertus et Monzingo 1999).	15
Figure 8	Structures de l'allosamidine. (F.Azouze, 2001)	20
Figure 9	Application industrielles des enzymes chitinolytiques (S.Rathore et R.Guptha, 2015).	21
Figure 10	Structure de la chitine (Julien Saguez, 2007).	24
Figure 11	La structure de la coquille d' <i>Helix aspersa</i> .	27
Figure 12	Méthode de purification des souches fongiques.	31
Figure 13	Technique de préparation des lames pour l'observation microscopique.	31
Figure 14	Les grains de la citrouille.	33
Figure 15	La conduite de fermentation.	33
Figure 16	L'incubation des pH testée à température 30C°.	34
Figure 17	L'incubation des erlens aux différentes températures.	34
Figure 18	L'escargot <i>H.aspersa</i> .	35
Figure 19	Les pourcentages (%) des différents genres fongiques isolés.	37
Figure 20	L'activité chitinolytique des souches cultivée sur milieu MCC.	41
Figure 21	Les zones d'hydrolyses de deux souches (S4 : <i>Aspergillus tubingensis</i> ,pyrale : <i>Fusarium sp.</i>).	42
Figure 22	La variation du pH avant et après la fermentation à base des écorces des grains de la citrouille chez <i>Aspergillus tubingensis</i> .	43
Figure 23	Effet de pH sur l'activité chitinolytique d' <i>Aspergillus tubingensis</i> (des écorces des grains de la citrouille).	44
Figure 24	La variation du pH dans une gamme de température différent avant et après la fermentation à base des écorces des grains de la citrouille.	44
Figure 25	Effet de température sur l'activité chitinolytique d' <i>Aspergillus tubingensis</i> (des écorces des grains de la citrouille).	45

Figure 26	La variation du pH avant et après la fermentation à base d'escargot (<i>H.aspersa</i>) chez <i>Aspergillus tubingensis</i> .	46
Figure 27	Effet de pH sur l'activité chitinolytique d' <i>Aspergillus tubingensis</i> (d'escargot <i>H.aspersa</i>).	46
Figure 28	La variation du pH dans une gamme de température différent avant et après la fermentation à base d'escargots (<i>H.aspersa</i>).	47
Figure 29	Effet de température sur l'activité chitinolytique d' <i>Aspergillus tubingensis</i> (d'escargot <i>H.aspersa</i>).	48

Liste des tableaux

Numéro	Titre	page
Tableau 1	Données sur la composition d'escargots <i>Helix aspersa</i> (Gomot, 1998).	28
Tableau 2	Les insectes collectés.	29
Tableau 3	Identification des souches fongiques.	38
Tableau 4	La mise en évidence de chitinase pendant 7 jours.	40

Liste des abréviations

DNSA : Acide 3,5-dinitrosalicylique
E.C : Enzyme Commission numbers
Sp : Specie
CBD : Chitin Binding Domain
DO : Densité optique
GlcNAc : N-acetylglucosamine
MCC : Milieu chitine colloïdale
Rpm : Rotation par minute

Introduction

La biotechnologie est une science multidisciplinaire qui englobe différentes techniques et procédés. Il s'agit peut-être actuellement de la technologie émergente la plus au point et la plus susceptible d'avoir un avenir. En outre, cette situation s'est accélérée en raison des grands progrès de la biologie moléculaire ces dernières années, qui ont permis d'obtenir de nouveaux organismes et protéines de synthèse. Face à la pollution croissante de la planète, la biotechnologie est considérée comme une solution dans bon nombre de domaines de la prévention de la pollution, dans le traitement des déchets et dans les nouvelles technologies moins polluantes. Les microorganismes sont largement exploités en biotechnologies pour la production de molécules bioactives ayant des activités biologiques très importantes. Parmi ces derniers les champignons entomopathogènes qui méritent une attention particulière et pourraient être utilisés comme lutte biologique (Lacey et Undeen, 1986). Ils jouent un rôle considérable dans la régulation des populations d'insectes (Roberts, 1973; Ferron, 1975). Le plus grand nombre de ces champignons pathogènes se trouve dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisés en lutte biologique proviennent des deutéromycètes (Fungi imperfecti). Les enzymes sont des catalyseurs naturels ; comme c'est le cas pour tous les processus naturels, elles sont très spécifiques et font preuve d'une efficacité thermodynamique. Utilisées depuis des siècles, en particulier dans le secteur de la production d'aliments, elles sont l'une des formes les plus anciennes de la biotechnologie. L'utilisation d'enzymes est d'une grande importance non seulement dans l'industrie alimentaire mais également dans la production de substances chimiques, dans les systèmes analytiques et de diagnostic, dans le traitement des maladies et enfin, dans l'industrie émergente des technologies plus propres. L'utilisation des enzymes dans tous ces domaines a été rendue possible grâce aux meilleures connaissances de leur structure, de leur fonction dans les systèmes métaboliques des êtres vivants et par-dessus tout grâce à la possibilité d'obtenir des enzymes de synthèse via la manipulation génétique et chimique des microorganismes. Les enzymes chitinolytiques ou chitinases sont les enzymes qui hydrolysent la chitine. Elles sont présentes dans de nombreux organismes, virus, bactéries, champignons, insectes, plantes supérieures et mammifères. Elles ont fait l'objet d'études biologiques, et sont regroupées en familles, sur la base de leur similarité de séquence d'acides aminés. Les chitinases ont suscité un intérêt dans différentes applications biotechnologiques en raison de leur capacité à dégrader la chitine dans la paroi cellulaire des champignons et des

insectes, ce qui a conduit à les utiliser en tant qu'agents antimicrobiens ou insecticides. Elles sont impliquées dans la résistance des plantes contre les pathogènes fongiques en raison de leur nature inductible et activités antifongiques *in vitro*. Une autre application intéressante de la chitinase est la bioconversion respectivement de la chitine et du chitosane en N-acétylglucosamines et chito-oligosaccharides qui ont des propriétés pharmacologiques (Taira *et al.*, 2002).

Dans ce cadre, les objectifs de notre étude sont :

- Isolement, purification et identification des moisissures à partir d'insectes (*Blattella asahinai*, *Ectomyelois ceratoniae*, *Zorosis spinimana*, larve de *Hennton* et *Persplaneta americana*) prélevés aux différents lieux.
- Production de chitinase à base de déchets alimentaires (végétales, animales).

Chapitre 1 : champignons entomopathogènes

1.1. Généralités sur les champignons

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

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

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

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

1.2. Généralités sur les champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes sont des eucaryotes avec des noyaux, des organites bien définis et une paroi cellulaire chitineuse, ils se présentent parfois sous forme de cellules individuelle, mais le plus souvent sous forme de filaments constituant le mycélium et dans les quels sont rangées les cellules. Leur reproduction se fait par formation de spores sexuées ou asexuées. la sous-division des deutéromycètes regroupe les ascomycètes et les basidiomycètes qui sont des champignons filamenteux à hyphes septes, se reproduisant de façon végétative dont on ne connaît pas leur forme de reproduction sexuée (champignons imparfaits) (R.Sabbahi,2008).

1.3. Mode d'action

Généralement, les champignons entomopathogènes tuent ou réduisent la vigueur des hôtes qu'ils infectent. Ces ennemis naturels sont plus efficaces lorsque l'insecte ciblé est préalablement affaibli par un autre facteur comme un stress nutritif. Compte tenu de leur mode de transmission et de leurs besoins abiotiques, ils sont généralement très efficaces lorsque la densité des populations d'insectes ciblés est très élevée, quoi qu'il en soit, le système immunitaire des insectes peut fortement influencer la pathogénicité de ces ennemis naturels. La cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon (Clarkson et Charnley, 1996). Les champignons peuvent infecter les insectes par pénétration directe à travers la cuticule (Clarkson et Charnley, 1996), au contact de la cuticule de l'insecte, la spore, l'unité infectieuse du champignon, germe et pénètre au travers du tégument en combinant des pressions mécanique et enzymatiques (St Leger, 1993). Le champignon croit rapidement dans l'hémocoel. Les insectes susceptibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte. Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les champignons entomopathogènes le processus de pénétration est l'étape la plus importante de la pathogène (Ferron *et al.*, 1993). Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination.

1.3.1. Phase d'adition

L'adhésion est la première étape du processus d'infection. Les spores entrent en contact passivement avec les insectes et à l'aide des agents tels que le vent et l'eau l'adhésion est déclenché par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec le tégument de l'insecte. L'infection est initiée à travers le tégument de l'insecte-hôte (Tanada et Kaya,1993 ;khachatourians,1991) mais les spores peuvent aussi entrer par le systèmes respiratoire (Clark et *al*,1968) ,le tube Alimentaire (Miranpuri et khachatourians,1991) et la cavité buccale (Figure 1) (Siebeneicher et *al*, 1992).

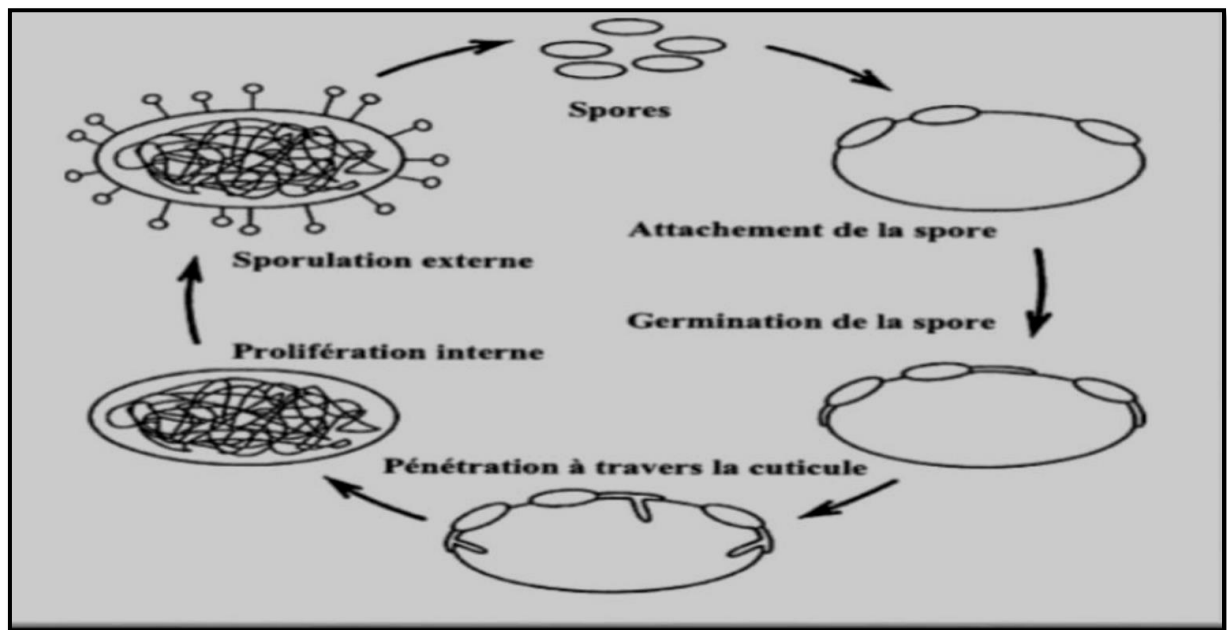


Figure 1 : Schéma du cycle biologique de *Beauveria bassiana* (R.sabbahi,2008).

1.3.2. Phase de germination

La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend de l'état physiologique de l'hôte et aussi des conditions environnementales notamment les températures et l'humidité (Butt et Becket, 1934 ; Butt et *al*, 1994). La germination aboutit à la production d'appressoria, structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration. La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. Cependant, des études ont démontré qu'une cuticule nutritive favorise la croissance mycélienne plutôt que la pénétration (Ferron et *al*,1993 ; Magelhaes et *al*,1981).

1.3.3. Phase de pénétration

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

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

Afin d'arriver à l'hymolyphe, le tube de germination devra traverser l'épicuticule, la procuticule puis l'épiderme. Cette traversée n'est possible que grâce à la sécrétion par le champignon d'enzymes comme les lipases, les protéases, les chitinases. Certaines souches produisent des toxines non enzymatiques comme la beauvericine, les beauverolides, les bassianolides, les isarolides, qui vont accentuer le processus d'infection.

L'insecte déclenche une réaction immunitaire face aux actions enzymatiques du mycopathogène. Les réponses mises en œuvre par l'insecte peuvent être la mélanisation, la réaction cellulaire (réponse de type inflammatoire à l'infection). Et la production d'inhibiteurs de protéases (protection contre les protéases fongiques, limitation de l'action de prophénol oxydase à proximité immédiate du corps étranger) (figure 2).

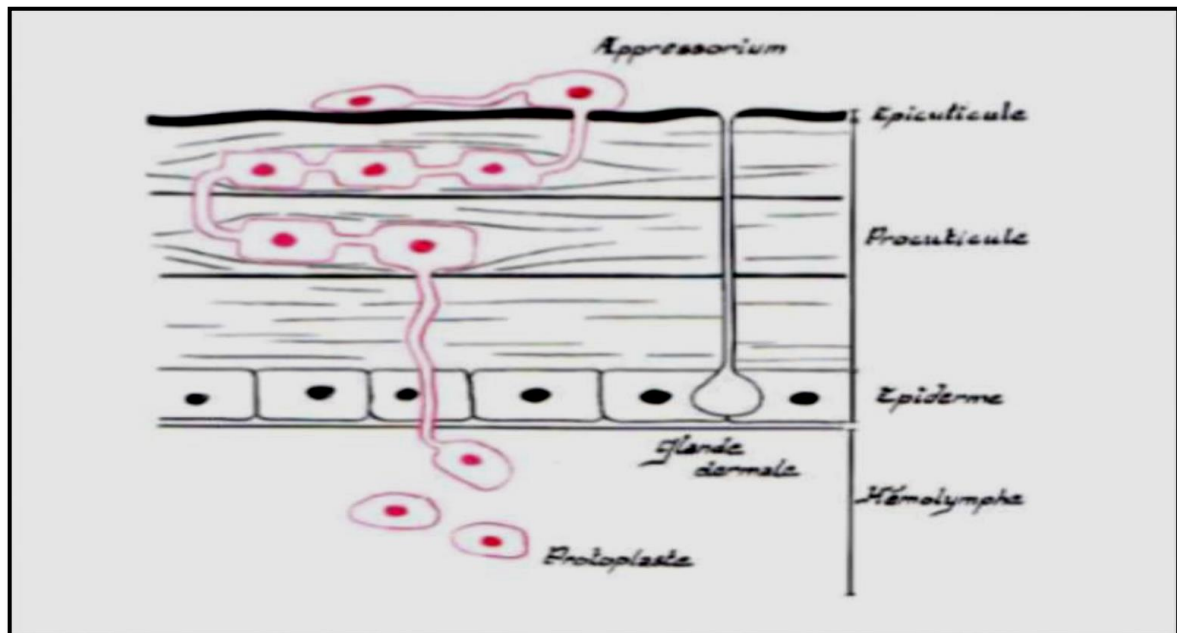


Figure 2 : Pénétration au travers de la cuticule de l'insecte (R.sabbahi, 2008).

1.3.4. Phase de dissémination

Une fois que le champignon a franchi avec succès la cuticule et a percé l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'émocoèle. Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insecte-hôte et il s'accroît sous forme de blastopores. Ceci peut faciliter la dispersion et la colonisation de l'hémocoèle et optimise l'assimilation rapide des nutriments. Il semble qu'une utilisation efficace des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène. Bien

que le glucose joue un rôle central dans le métabolisme de l'insecte, il est généralement présent à très faible concentrations. Cependant, on trouve le tréhalose à faible concentrations (4 à 20 mg/ml), (Schopf et Nussbaumer, 1996). L'utilisation du tréhalose par les champignons entomopathogènes dépend de la capacité du champignon à hydrolyser le tréhalose à l'extérieur de la cellule en deux molécules de glucose ou de l'assimiler directement. L'encapsulation ne protège l'hôte que contre des pathogènes peu virulents. Dans le cas de pathogènes virulents, l'insecte ne parvient pas à former de granulomes typiques, ou bien le pathogène continue de croître malgré son encapsulation qu'il outrepassera (Hou et Chang, 1985).

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

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

1. 4. Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes

Le potentiel infectieux des champignons entomopathogènes comme agent de lutte biologique dépend de leurs propriétés physiologiques de la population de l'hôte et des conditions du milieu (Ferron et *al.*, 1991).

1.4.1. Facteurs liés aux pathogènes

La virulence et la spécificité de l'hôte sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte biologique. Il a été démontré que les insectes d'une même population révèlent une sensibilité qui diffère selon les isolats de *M.anisopliae* (Todorova *et al.*, 1994). À une échelle industrielle, les épreuves biologiques standardisées de laboratoire sont essentielles afin de vérifier le potentiel insecticide des préparations produites et de suivre leur stabilité de conservation (Ferron *et al.*, 1991).

1.4.2. Facteurs dépendant de l'hôte

Il est maintenant reconnu que tous les stades de développement de l'insecte, de l'œuf jusqu'à l'adulte, peuvent être sensibles à l'infection fongique. Par exemple *P. fumosoroseus* est trouvé à l'état naturel sur une large gamme d'hôtes (plus de 40 espèces d'insectes appartenant à 8 ordres) dont les Homoptères et parmi eux les aleurodes.

L'épizootie fongique survient généralement à de fortes densités de la population hôte favorisant ainsi la probabilité de contact entre le pathogène et l'hôte, de même qu'entre les insectes infectés et non infectés (Ferron *et al.*, 1991).

1.4.3. Facteurs de l'environnement

L'efficacité des champignons entomopathogènes contre les insectes est souvent influencée par des conditions environnementales.

1.4.3.1. Rayonnement solaire

L'effet des radiations solaires est l'un des paramètres environnementaux les plus importants pour la persistance des spores fongiques entomopathogènes. L'exposition à la lumière du soleil même pour quelques heures en particulier la partie ultraviolet B du spectre (285-315nm) peut complètement inactiver les conidies de *Metarhizium anisopliae* (Braga *et al.*, 2001) Il ya des différences significatives dans la sensibilité aux radiations, les micro habitats jouent un rôle important en augmentant la persistance des conidies fongiques en fournissant l'ombre des arbres (Inglis *et al.*, 2001).

Malgré son effet nocif sur la persistance des conidies, la lumière peut stimuler certaines étapes du cycle évolutif des champignons entomopathogènes cultivés *in vitro* ou *in vivo* (Silvy et Riba, 1989). De plus, afin d'assurer une protection contre ces rayons, les coelomycètes, tels que le genre *Aschersonia*, produisent des cellules conidiogènes dans des pycnides fortement pigmentés (McCoy *et al.*, 1990).

1.4.3.2. Température

La température est un autre facteur important qui peut affecter le taux de germination, la croissance, la sporulation et la survie des champignons entomopathogènes. Hastuti et ses collaborateurs (1999) ont démontré que 100 % des larves de *Paropsis charybdis* (Coleoptera: Chrysomelidae) sont tuées par *B.bassiana* après une incubation de 21 jours à 35°C, alors que 93 % des larves sont mortes à une température d'incubation de 15°C. La température optimale qui assure la survie d'un champignon diffère selon les taxa. Ainsi, les spores des entomophthorales semblent être plus sensibles que les spores de la plupart des entomopathogènes. Généralement, les températures au-dessus de 35°C empêchent la croissance et le développement des champignons entomopathogènes.

Les variations de températures (élevées et basses) affectent la vitesse de l'infection des insectes par l'inhibition de la germination des spores, ce qui affecte à son tour la formation du tube germinatif et la pénétration à travers la cuticule de l'insecte. (Ekesi *et al.*, 1999 ; Fargueset Luz., 2000 ; Soza-Gomez et Alves, 2000 ; Mitsuaki, 2004). Les conidies de *B. bassiana* et de *M.anisopliae* ne peuvent pas survivre plus que 15 minutes à 40°C (McCoy *et al.*, 1990).

1.4.3.3. Humidité

L'humidité environnementale est un paramètre très important pour la germination des conidies dans la nature. Elle affecte aussi la persistance et la survie des champignons entomopathogènes. La plupart de ces champignons exigent au moins 95 % de l'humidité relative à la surface de l'insecte afin de germer (Hallsworth et Magan, 1999).

Un certain nombre d'études a indiqué que les conditions sèches justes après l'application des champignons entomopathogènes sont moins pathogènes car les souches de *Metarhizium et Beauveria* peuvent germer et infecter efficacement les insectes à une basse humidité à condition qu'il y ait suffisamment d'humidité dans les microhabitats (Inglis *et al.*, 2001).

L'humidité relativement élevée dans les endroits abrités fournit un micro-environnement favorable pour le développement des spores (Liu *et al.*, 2003).

Les effets de la température et de l'humidité sont intimement reliés d'où la tolérance de quelques champignons à des températures extrêmes lorsqu'il y a plus d'humidité ou lorsque la condensation se produit aisément et la perte d'eau est réduite au minimum. Le vent peut aussi modifier de manière significative l'humidité microclimatique et considérablement influencer le comportement fongique (McCoy *et al.*, 1990).

Chapitre 2 : chitinase

2.1. Généralités sur le chitinase

Les enzymes chitinolytiques impliquées dans les processus de dégradation de la chitine sont nombreuses. Parmi elles, les chitinases sont des glycosides hydrolases, qui assurent la rupture des liaisons β -1,4 glycosidiques qui lient les carbones C1 et C4 de deux résidus *N*-acétylglucosamine consécutifs. On distingue généralement deux catégories de chitinases : les endo et les exochitinases. Les premières, également nommées poly [1,4-(*N*-acétyl- β -D-glucosaminide)] glycanohydrolases (E.C.3.2.1.14) hydrolysent les liaisons internes des microfibrilles de chitine pour libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités *N*-acétylglucosamine.

Les secondes, nommées exochitinases ou β -*N*-acétylhexosaminidases (E.C.3.2.1.52), participent à la dégradation complète des fragments de chitine. Parmi ces exochitinases, les chitobiosidases libèrent des di-acétylchitobioses à partir des extrémités non-réductrices de la chitine (Jeuniaux, 1963) et les β -D-acétylglucosaminidases hydrolysent ces en monomères de *N*-acétylglucosamine (Cohen-Kupiec et Chet, 1998). Si la production de chitine est une propriété de certaines cellules animales et fongiques, les chitinases sont des enzymes que l'on retrouve chez l'ensemble des organismes vivants qu'ils soient procaryotes, eucaryotes ou de type viral. Les chitinases ont été regroupées en cinq classes qui constituent deux familles distinctes de glycosides hydrolases, en fonction de différents facteurs, parmi lesquels leur séquence *N*-terminale, leur localisation et leurs propriétés biochimiques (Henrissat et Davies, 2000 ; Patil et *al.*,2000). Les chitinases appartenant à la famille 18 rassemblent plus de 180 enzymes présentes chez les eucaryotes, les procaryotes et les virus, et réparties au sein des classes III et V. La famille 19 regroupe plus de 130 composés essentiellement d'origine végétale et formant les classes I, II et IV (Henrissat, 1999).

2.2. Classification de chitinase

2.2.1. Selon le mode d'action

Les chitinases sont classées selon leur mode d'action enzymatique en endo et exo-chitinases. Les premières, également nommés polys [1,4-(*N*-acétyl- β -D-glucosaminide)] glycanohydrolases (E.C . 3.2.1.14) hydrolysent les liaisons internes des microfibrilles de chitine pour libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités *N*-acétylglucosamine. Les secondes, nommées exochitinases ou β -*N*-acétylhexosaminidases (EC 3.2.1.52), participent à la dégradation complète des fragments de chitine. Parmi ces exochitinases, les chitobiosidases libèrent des

di-acétylchitobioses à partir des extrémités non-réductrices de la chitine (Jeuniaux 1963) et les β -D-acétylglucosaminidases hydrolysent ces diacétylchitobioses en monomères de *N*-acétylglucosamine (Cohen-Kupiec et Chet 1998).

2.2.2. Selon la structure

La classification des chitinases a été faite en 2 étapes, s'attardant tout d'abord sur les chitinases végétales. Elles ont été réparties en cinq classes en fonction de leurs séquences en acides aminés. Ces 5 classes possèdent un peptide signal. Celui-ci n'est pas nécessaire pour l'activité des chitinases mais peut altérer les propriétés de l'enzyme.

❖ Classe I

Ces chitinases ont un poids moléculaire d'environ 32 kDa, les protéines matures sont constituées d'environ 300 acides aminés. Elles possèdent un domaine catalytique, un domaine Chitin-Binding (CBD) riche de 8 résidus cystéines et présentent une structure très conservée d'environ 40 acides aminés. Les domaines CBD riches en cystéines semblent être importants dans l'action antifongique mais non indispensables à l'activité catalytique (Ubhayasekera et *al.*, 2009). Le domaine N-terminal est séparé du domaine catalytique par une région charnière variable riche en glycine ou proline. Les chitinases de classe I se divisent en 2 groupes. La classe Ia de nature basique, qui possède en plus d'un domaine N-terminal un domaine C-terminal riche en leucine ou valine lui permettant une localisation vacuolaire (Robert et *al.*, 2002; Kasprzewska 2003; Ohnuma et *al.*, 2011) et la classe Ib de nature acide est extracellulaire. Les chitinases de la classe I sont présentes aussi bien chez les plantes monocotylédones que chez les dicotylédones (Welburn et *al.*, 1994; Keyhani et Roseman 1996).

❖ Classe II

chitinases ayant une masse moléculaire comprise entre 27 et 28 kDa. Elles ont une grande identité de séquence en acides aminés (environ 60%) (Shinshi et *al.*, 1990; Masuda et *al.*, 2015; Younas et *al.*, 2016) avec les chitinases de classe I. Le domaine CBD est absent ainsi que l'extension en C-terminal (Kuranda et Robbins 1991; Masuda et *al.*, 2015) (figure 3). Les chitinases de la classe II sont acides et sécrétées dans l'espace extracellulaire (Li, 2005). Elles sont principalement trouvées chez les plantes dicotylédones (Keyhani et Roseman 1996).

❖ Classe III

De masse moléculaire comprise entre 28 et 30 kDa, les chitinases de classe III n'ont aucune similarité de séquence avec les chitinases de classes I et II (figure 3) et présentent une activité lysozyme élevée (Van Loon et *al.*, 1994; Neuhaus et *al.*, 1996). Les chitinases de la classe III

ont été identifiées chez plusieurs plantes dicotylédones et monocotylédones (Keyhani and Roseman 1996 ; Masuda *et al.*, 2015).

❖ Classe IV

Les chitinases de classe IV conservent une grande similarité de séquence avec les chitinases de classe I (entre 41 et 47%) mais sont plus courtes en raison de 4 délétions (une dans le domaine de fixation à la chitine et trois dans le domaine catalytique) pour une protéine mature de 241 à 255 acides aminés (figure 3). Elles sont extracellulaires et hydrolysent plus efficacement les oligomères que les polymères de chitine. Les chitinases de la classe IV sont principalement connues chez les plantes dicotylédones (Keyhani et Roseman 1996).

❖ Classe V

Les chitinases de classe V (figure 3), présentent une faible similarité de séquence avec les chitinases de classe III mais une similarité significative avec des exo-chitinases de bactéries, de nématodes et de champignons (Taira *et al.*, 2009; Ohnuma *et al.*, 2011). Elles ont d'abord été isolées du tabac (plante dicotylédone) (Kuranda et Robbins 1991 ; Keyhani et Roseman 1996).

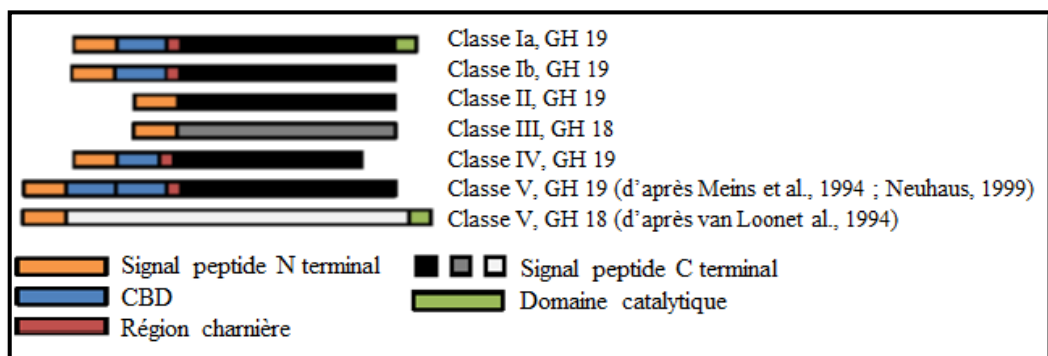


Figure 3 : Représentation des 5 classes de chitinases (modifié d'après Singh *et al.*, 2007, (Graham et Sticklen 1994; Kolosova *et al.* 2014). CBD : Chitin Binding Domain.

L'étude a ensuite été étendue à l'ensemble des chitinases mettant en évidence des différences de structures tridimensionnelles et de mécanismes catalytiques permettant ainsi de les regrouper en 4 familles de glycosyl hydrolases (GH), la famille 18, la famille 19, la famille 23 et la famille 48.

❖ Les chitinases de la famille 18

Les chitinases de la famille 18 rassemblent plus de 460 enzymes caractérisés, identifiés principalement chez les bactéries (Lecleir *et al.*, 2004), les virus, les archaeas (Tanaka *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2003), les champignons et chez un grand nombre de plantes (Karlsson and Stenlid 2009). La structure primaire de ces chitinases possède plusieurs motifs d'acides

aminés conservés (Robertus et Monzingo 1999). Ces chitinases ne possèdent qu'un seul site catalytique, ont une structure tridimensionnelle commune composée de 8 unités α/β (figure 4) (Wierenga 2001; Malecki et Rypniewski 2013) et possèdent 2 acides aminés conservés au niveau du site actif de type DXDXE (figure 5), un aspartate (D) et un glutamate (E) nécessaires au mécanisme catalytique (Tsuji et *al.*, 2010).



Figure 4 : Structure tridimensionnelle des chitinases de la famille 18 (exemple d'une chitinase de classe III) (modifié d'après Neuhaus, 1999), le site catalytique est représenté par une flèche bleue.

<i>Halobacterium sp.</i> (Uniprot : Q9HR84)	FDGLDIDWEYPPG
<i>Homo sapiens</i> (Uniprot : Q13231)	FDGLDLDWEYPPG
<i>Drosophila melanogaster</i> (Uniprot : D0IQG7)	FDGLDLDWEYPTQ
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Uniprot: O81862)	FHGLDLDWEYPPS
<i>Nicotiana tabacum</i> (Uniprot: Q43576)	FHGLDLDWEYPLS
<i>Nicotiana tabacum</i> (Uniprot: P29060.1)	LDGIDFDIEGGTT
<i>Vitis vinifera</i> (Uniprot : P51614)	LDGIDFDIELGST
<i>Cucumis sativus</i> (Uniprot P17541)	LDGVDFDIESGSG

Figure 5 : Motif spécifique de type DXDXE de la famille 18 des glycosides hydrolases, Résidu aspartate (D) et résidu glutamate (E) nécessaires au mécanisme catalytique.

❖ Les chitinases de la famille 19

Celles-ci hydrolysent les liaisons glycosidiques en inversant la configuration anomérique par un mécanisme catalytique acido-basique (Neuhaus 1999 ; Watanabe et *al.*, 1999; Kawase et *al.*, 2004). Les chitinases de cette famille diffèrent de celles de GH18 par leur séquence en acides aminés, leur structure tridimensionnelle et par le mécanisme d'action de leur site catalytique (Kawase et *al.*, 2004). Elles possèdent une structure tridimensionnelle

principalement composée d'hélices α , un site catalytique composé de 2 régions distinctes incluant deux résidus glutamate (figure 6) et ont 3 résidus conservés dans toutes les séquences (figure 7) (Neuhaus,1999).

Jusqu'à la découverte de la chitinase C-1 chez *Streptomyces griseus* HUT 6037 (Ohno et al., 1996), les chitinases de cette famille étaient assignés aux plantes supérieures seulement (Graham et Sticklen,1994). Depuis lors, elles ont été découvertes chez d'autres bactéries, y compris, *Burkholderia gladioli*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenza* et *Pseudomonas aeruginosa* (Itoh et al., 2002), des virus (Yamada et al., 2010) et d'autres organismes, tels que les nématodes (*Caenorhabditis elegans*). Les chitinases de la famille GH19 restent encore mal connues (Ubhayasekera,2011). Dans la littérature, 12 structures cristallines existent, dont 2 seulement sont des chitinases bactériennes : *Streptomyces coelicolor* A3 (2) et *Streptomyces griseus* HUT 6037 (Kezuka et al., 2006; Hoell et al., 2006).

Récemment, la séquence complète du génome de *Nosema bombycis* a été rapportée par (Han et al.,2015), à partir duquel le gène *NBO_41 g0043* d'une endochitinase a été identifié et classé comme membre de la famille GH19 (Han et al., 2016).

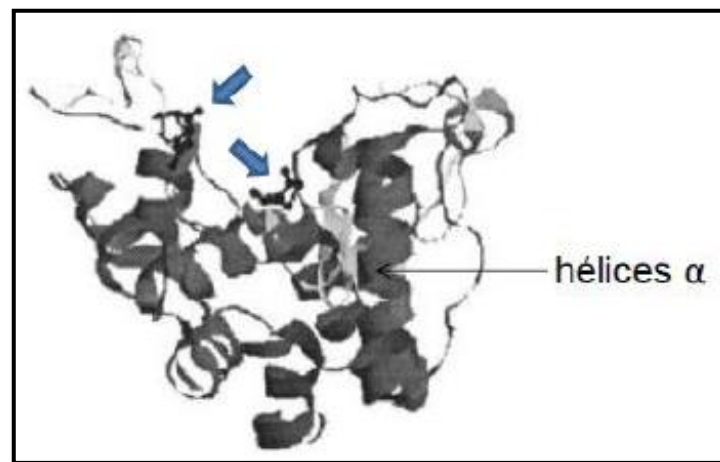


Figure 6 : Structure tridimensionnelle des chitinases de la famille 19 des glycosides hydrolases (exemple d'une chitinase de classe II) (modifié d'après Neuhaus, 1999), Le site catalytique est composé de deux régions représentées par les flèches bleues.

<i>Streptomyces griseus</i> (Uniprot : O50152)	VKKREAAAF LANVSHETGGLFYIKEVNE
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Uniprot : O23248)	DSRREIAAFFAHVTHE TGRNFCYIEEID
<i>Vitis vinifera</i> CHI4D (AF532966)	ANKREIAAFFAHVTHE TGHFCYIEEING
<i>Nicotiana tabacum</i> (Uniprot: A1U67)	DSKREIAAFFAHVTHE TGHMCFINEING

Figure 7 : Signature spécifique de la famille 19 des glycosides hydrolases. Les séquences conservées qui jouent un rôle clé dans le mécanisme catalytique sont représentées en rouge (Robertus et Monzingo 1999).

❖ Les chitinases de la famille 23

Ces chitinases possèdent une structure tridimensionnelle similaire à celle de la famille 19 (composée principalement d'hélices α). À ce jour, une seule chitinase GH23 a été identifiée chez les bactéries (Ueda et *al.*, 2009). Cette enzyme a été isolée à partir de *Ralstonia* sp. A-471 et comprend un domaine de liaison N-terminal Chitin-Binding lié à un domaine catalytique C-terminal qui présente une homologie au lysozyme type-oie (goose-type). Le gène codant pour cette enzyme semble être acquis par transfert horizontal de gènes (Ueda et *al.*, 2009).

❖ Les chitinases de la famille 48

Les enzymes de la famille GH48 possèdent une structure en tonneau (α/α)₆ caractérisée par six hélices centrales entourées de 6 autres hélices externes (Yennamalli et *al.*, 2011). Une seule chitinase GH48 a été mise en évidence chez le scarabée *Gastrophysa atrocyanea* (Adrangi et Faramarzi, 2013).

2.3. Le rôle de chitinase

Le rôle des chitinases varie en fonction des organismes qui les produisent. Elles peuvent participer aux processus de nutrition, de croissance ou bien de défense.

2.3.1. Chitinases et microorganismes

Les chitinases sont présentes chez de nombreux microorganismes eux-mêmes dépourvus de chitine, mais pour lesquels la chitine constitue une source de nutriments. Ainsi, les bactéries chitinolytiques marines, d'eau douce ou du sol produisent des chitinases qui participent à la biodégradation et au recyclage des chitines produites annuellement dans leur écosystème respectif. Les chitinases bactériennes sont également impliquées dans des processus digestifs (Cohen-Kupiec et Chet, 1998 ; Patil et *al.*, 2000). En effet, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent des enzymes chitinolytiques qui, en modifiant la composition des structures chitineuses, favorisent leur adhésion au substrat et la pénétration de leur hôte

(Charpentier et Percheron, 1983 ; Schrempf, 2001) au niveau des lésions formées sur l'exosquelette des Arthropodes. Certaines chitinases bactériennes facilitent également la dégradation de la chitine du puparium de certains insectes, favorisant ainsi l'émergence des adultes (Iverson et *al.*, 1984). Les chitinases produites par les bactéries de la microflore intestinale de nombreux animaux (poissons, oiseaux, ...) facilitent les processus de digestion des aliments composés de chitine.

Des gènes de chitinase ont également été identifiés dans le génome du baculovirus *Autographa californica*, inféodé aux arthropodes (Hawtin et *al.*, 1995). Chez ce baculovirus, Les chitinases jouent un rôle crucial dans les processus d'infection virale, plus particulièrement lors des phases de pénétration du virus dans l'organisme attaqué (Thomas et *al.*, 2000; Saville et *al.*, 2002).

Cette chitinase virale entraîne même une liquéfaction des tissus du lépidoptère *Trichoplusia ni* infecté (Hawtin et *al.*, 1997).

De nombreux protozoaires et métazoaires parasites des tractus digestifs présentent la capacité de synthétiser des chitinases. Parmi ces parasites, on trouve des filaires, des amibes, des trypanosomes, des plasmodiums (Huber et *al.*, 1991). Chacun de ces microorganismes utilise la chitine et les chitinases différemment et spécifiquement selon le stade de son développement (Shahabuddin et Vinetz, 1999). Les chitinases produites par les procaryotes facilitent les processus de colonisation de leurs insectes hôtes qui leur servent de vecteurs.

2.3.2. Chitinases fongiques

Les chitinases fongiques possèdent de multiples fonctions. Comme les chitinases bactériennes, elles participent largement au métabolisme trophique et sont également impliquées dans le développement, la morphogénèse et lors d'interactions symbiotiques et d'infestations parasitaires (Cohen-Kupiec et Chet, 1998). La chitine est un composé des parois cellulaires des champignons filamenteux. Les chitinases sont donc produites à différents stades de leur croissance. Ainsi, les chitinases sont impliquées dans la séparation et la germination des spores. Chez les levures, les chitinases sont impliquées dans le bourgeonnement des cellules filles et leur séparation avec les cellules mères (Passonneau et Williams, 1953; Elango et *al.*, 1982; Kuranda et Robbins, 1991). Les hyphes mycéliens possédant une structure rigide, les chitinases permettent de remodeler la chitine des parois fongiques lors de la croissance et du développement, mais aussi lors de stress hydriques (Gooday et *al.*, 1992). Les champignons pathogènes utilisent leurs chitinases pour faciliter leur pénétration

dans l'hôte ou pour en exploiter les sucres et acides aminés issus de la dégradation des cuticules. C'est notamment le cas de champignons pathogènes des oeufs de nématodes (Dackman et *al.*, 1989), mais aussi des champignons entomopathogènes des genres *Beauveria*, *Metarhizium* et *Verticillium* (El-Sayed et *al.*, 1989; St. Léger et *al.*, 1991).

2.3.3. Chitinases animales

Les chitinases ont été mises en évidence chez de nombreux animaux invertébrés et vertébrés, y compris chez les mammifères. De nombreuses chitinases sont impliquées dans des processus digestifs (Suzuki et *al.*, 2002). Les chitinases salivaires de poule mais aussi les chitinases d'hyménoptères parasitoïdes et d'araignées facilitent la pénétration des cuticules de leurs hôtes ou proies (Mommsen, 1980; Krishnan et *al.*, 1994; Jones et *al.*, 1996). Dans le tractus alimentaire des poissons (Flach et *al.*, 1992) des oiseaux (Jackson et *al.*, 1992) et des mammifères insectivores, les chitinases dégradent la cuticule des proies ingérées. Les chitinases sont également impliquées dans des processus de défenses comme chez le turbot, où elles joueraient un rôle contre certains parasites tels que les microsporidies (Manson et *al.*, 1992). Citons encore le cas de chitinases sériques et leucocytaires chez l'homme, sécrétées en grande quantité par les monocytes lors de leur différenciation en macrophages (Escott et Adams, 1995) chez des patients atteints de la maladie de Gaucher (Boot et *al.*, 1995). Enfin, chez les animaux, les chitinases pourraient également jouer un rôle défensif contre certains champignons pathogènes (Leah et *al.*, 1991; Boot et *al.*, 1995; Gooday, 1999; Carlini et Grossi-de-Sa, 2002).

2.3.4. Les chitinases végétales

Les chitinases végétales sont généralement endochitinases et de poids moléculaire inférieur à celui aux insectes chitinases. De nombreuses plantes expriment en permanence chitinases dans le tubercule, la tige et la racine. Dans les plantes, ils agissent comme protéines liées à la pathogénèse, c'est-à-dire synthétisées en réponse à l'autodéfense contre l'attaque phytopathogène aussi au moment ces chitinases ont été rapportés pour participer à vital processus physiologiques des plantes comme l'embryogenèse et formation d'éthylène. La chitinase est connue pour jouer un rôle majeur rôle dans la défense contre la chitine contenant des agents pathogènes comme les champignons et les insectes. Des recherches intensives sont en cours pour développer plantes transgéniques sur exprimant diverses combinaisons de les chitinases ainsi que d'autres protéines liées à la pathogénèse.

On sait également que les chitinases sont exprimées au cours de conditions de stress environnemental telles que le froid et la sécheresse. Certaines chitinases de plantes montrent une structuration de la glace tendance, ce qui signifie qu'ils se lient aux cristaux de glace réduisant leur croissance aidant ainsi la condition de stress froid.

Certains des chitinases de classe III joueraient un rôle important dans le stockage du calcium sans avoir un effet plus significatif sur leur activité catalytique. Les structures et les fonctions catalytiques chitinases de plantes et leur rôle dans la physiologie des plantes ont remarquablement examiné par Sahai et Manocha et Grover F. (Shahidi et *al.*, 2005).

2.3.5. Chitinase et insectes

Toutes les chitinases d'insectes appartiennent à la famille GH18. Sur les bases des chitinases d'insectes à similarité de séquence sont divisées en huit groupes, qui varient en poids moléculaire compris entre 40 kDa et 85 kDa et leur pH optimal, La structure générale comprend trois domaines: le région catalytique, une région enrichie en acides aminés proline, glutamate, sérine et thréonine et une région riche en cystéine.

Cependant, les deux derniers domaines ne sont pas nécessaires pour la chitinase activité. Domaine de liaison à la chitine C-terminale riche en cystéine de des chitinases d'insectes ancrent le substrat (L.Hartl, S.Zach et Seidl-Seiboth, 2012).

Les chitinases d'insectes sont impliquées dans la dégradation de la cuticule couche à oligosaccharides plus petits en hydrolysant et de manière aléatoire cuticule cassante utilisée pour la synthèse de nouvelles cuticule. De cette manière, ces chitinases sont nécessaires pour la dégradation de la vieille cuticule et synthèse de la nouvelle.

L'expression de ces enzymes doit être rigoureuse contrôle afin d'éviter toute exposition prématurée pouvant entraîner inhibition de la croissance (H. Zhang et M. Liu ,2011) .Pour atteindre cet objectif, l'insecte produit chitinases spécifiques qui sont exprimés différenciellement sur la cours du temps à différents stades de métamorphose (Q. Zhu et *al.*, 2008).

Des chitinases seraient également présentes dans le venin et la salive glande de certains insectes. Dans ces cas, le rôle des chitinases peut être une dégradation de la cuticule de l'hôte.

2.4. Les propriétés physico-chimiques des chitinases

2.4.1. Le poids moléculaire

Les chitinases trouvées chez de nombreuses plantes et algues possèdent une masse moléculaire d'environ 30 kDa. Des chitinases de 40 à 90 kDa et même d'environ 120 kDa ont été identifiées chez les mollusques, les arthropodes et chez quelques vertébrés comme les poissons, les amphibiens et les mammifères. La masse moléculaire des chitinases isolées chez les bactéries et les champignons varient de 30 à 120 kDa (Q. Zhu et *al.*, 2008), quelques chitinases de plantes supérieures (carotte) (R. Shen et *al.*, 2013), d'insectes (H. Renkema et *al.*, 1995) et de ver à soie (H. Oshima et *al.*, 2008) sont des glycoprotéines.

2.4.2. Le point isoélectrique (pI)

Les chitinases possèdent un pI de 3.0 à 10.0 chez les plantes supérieures et les algues. Chez les insectes, les crustacés, les mollusques et les poissons le pI est de 4.7 à 9.3. Chez les microorganismes, de 3.5 à 8.8. Toutefois, les chitinases acides et basiques sont présentes souvent dans le même organisme.

2.4.3. Activité enzymatique

Les pH optimaux des chitinases sont de 4 à 9 chez les plantes supérieures et les algues. De 4.8 à 7.5 chez les animaux et de 3.5 à 8.0 chez les micro-organismes. Le pH optimal dépend du substrat utilisé (exemple de deux substrats différents : chitine glycol et N acétyl chito-oligosaccharides) (M. Suzuki et *al.*, 2001) Ceci démontre que les chitinases de différents organismes sont actives dans les milieux acides et basiques.

2.4.4. La stabilité

Les chitinases de plantes classe III et ceux de *Bacillus licheniformis* résistent à une température élevée de 80° C (L. Shuhui et *al.*, 2009). D'autres chitinases identifiées chez des insectes et des vers de soie ne sont pas très stables au-dessus de 40°C car le développement de ces insectes s'effectue à 25°C. En général, les chitinases d'insectes ne sont pas stables à de très hautes températures, car ces espèces utilisent généralement leurs chitinases pour hydrolyser leur propre chitine cuticulaire pendant la phase de mue, alors que les chitinases de plantes sont utilisées principalement pour dégrader des organismes pathogènes (H. Oshima et *al.*, 2002).

2.4.5. Inhibiteur et activateur des chitinases

Un inhibiteur compétitif a une structure similaire au substrat ou à l'état de transition. Les allosamidines et leurs dérivés inhibent les chitinases de ver de soie (A. Nagpure et *al.*, 2014).

de crevette rose, de microorganismes tels que *Piromyces communis*, *Streptomyces sp* et *S.olivaceovridis*, Ils sont considérés comme les principaux inhibiteurs des chitinases d'insectes et leur structure est similaire l'état de transition de l'hydrolyse de la chitine (Figure 8)

Récemment, des allosamidines cristallisées ont été liés à des chitinases de plantes telles que la hevamine (A.Oranusi, 1985), Toutefois, les allosamidines et leurs dérivés inhibent seulement les chitinases appartenant à la famille 18 et n'inhibent pas celles de la famille 19. Les chitinases sont de manière générale inhibées par Hg^{2+} et Ag^+ . En ce qui concerne le Cu^{2+} : il existe deux possibilité, un premier groupe de chitinase est inhibé par Cu^{2+} , alors que dans un deuxième groupe, l'activité chitinolytique est plus élevée en présence de Cu^{2+} . Ce dernier groupe a été trouvé chez les poissons et les microorganismes tels que *Pseudomonas aeruginosa* (Z. Zhu et al., 2004).

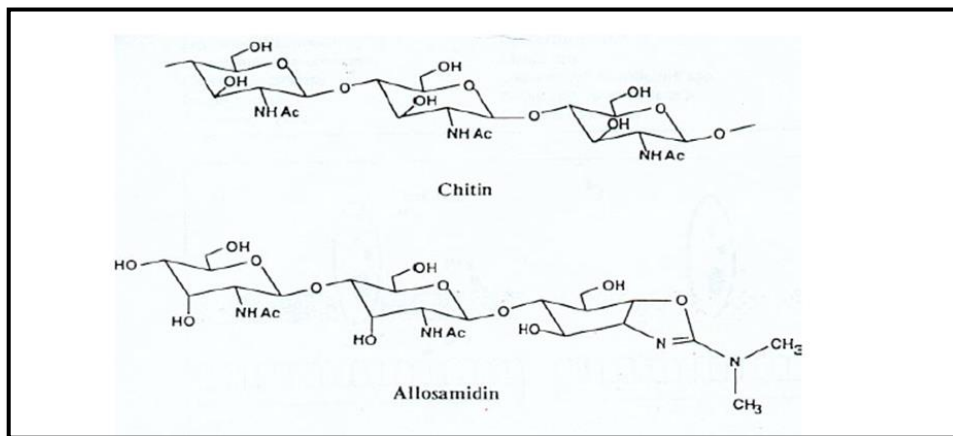


Figure 8 : Structures de l'allosamidine, c'est un dimère de β -N-acetylallosamine lié avec un dimethylaminocyclitole (F.Azouze, 2001).

2.5. Application de chitinase

Les chitinases ont plusieurs applications sur le terrain, Les chitinases gagnent en importance dans le domaine de la biotechnologie appliquée à la gestion des déchets, à la lutte antiparasitaire en agriculture et aux soins de santé, qui ont été récapitulés à la figure 9 et discutés en détail ci-dessous.

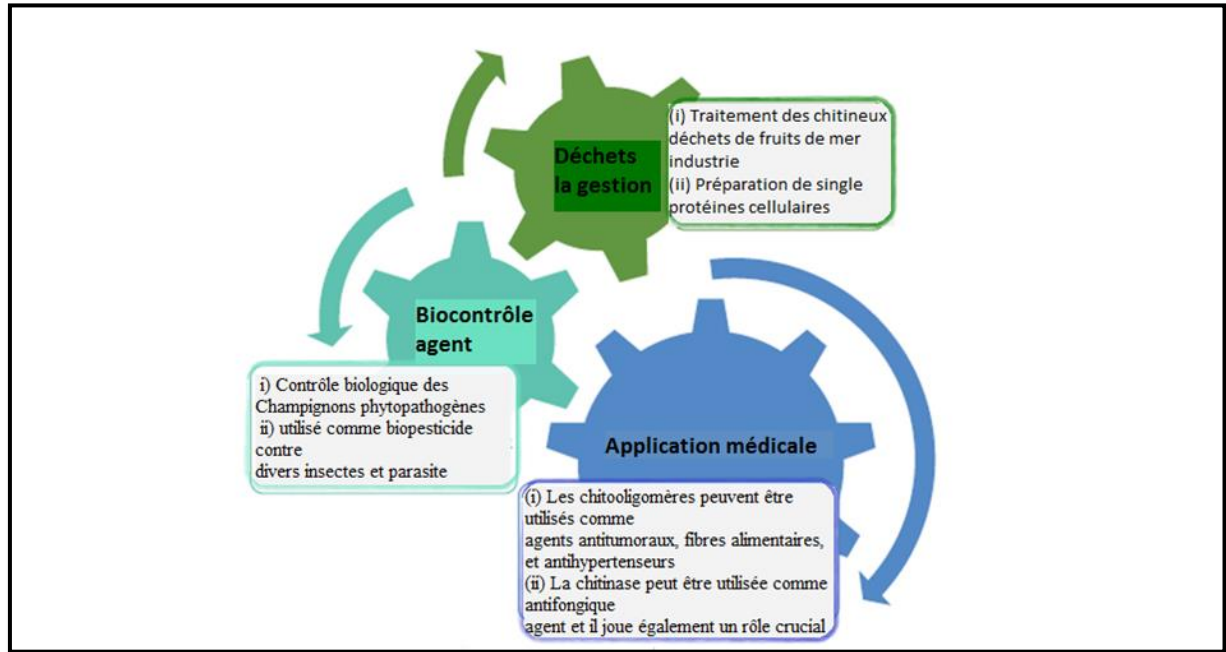


Figure 9 : Application industrielles des enzymes chitinolytiques (S.Rathore et R.Guptha, 2015).

2.5.1. Gestion des déchets

Les chitinases recombinantes peuvent être utilisées convertir la biomasse chitineuse, c'est-à-dire les déchets chitineux de organismes marins en composants dépolymérisés utiles plus simples, donc réduire la pollution de l'eau.

Chito oligomères obtenus par l'action des chitinases ont un large éventail de biotechnologies applications en biochimie, alimentaire et divers industries chimiques. La chitinase peut également être utilisée en conversion des déchets chitineux en biofertilisants (K .Ahmadi, ,2008).

Une autre approche pour utiliser efficacement les déchets chitineux est la production de protéine unicellulaire (SCP) (S. Revahet *al.*, 1981). Dans cette approche utilise des déchets chitineux dégradés par la chitinase comme source de carbone ou de nutrition pour la production de biomasse.

Bactéries et levures productrices de chitinase (par exemple, *S. marcescens* et *Pichia kudriavzevii*) peuvent être utilisés dans des cultures aquatiques pour la SCP production.

2.5.2. Agents de biocontrôle

Les chitinases sont présentes dans les plantes aux côtés diverses protéines liées à la pathogénèse dans le cadre de plantes mécanisme de défense. Donc surexpression d'une combinaison de diverses chitinases dans une plante transgénique peut aider contre champignons pathogènes, La chitinase peut également être utilisée directement comme biopesticides contre divers champignons et insectes pouvant être une alternative aux pesticides chimiques.

Autre qu'être directement utilisée comme agent de biocontrôle, la chitinase peut agir comme cible pour biopesticide comme la chitine a un rôle majeur dans l'insecte métamorphose ainsi que dans les intestins des insectes. Un pseudo-trisaccharide l'allosamidine est un inhibiteur de l'enzyme chitinase et peut être potentiellement utilisé comme biopesticide (S. Sakuda et *al.*, 1996).

2.5.3. Application médicale

La chitinase est utilisée comme antifongique en association avec des antifongiques dans le traitement de diverses infections fongiques, Human AMCase se trouve à augmentation de l'inflammation Th2 et est considéré comme jouant un rôle dans l'asthme et les réactions allergiques. Il est également impliqué dans voie effectrice de l'IL-13 (Z. Zhu .,2004).

La chitinase est également suggéré à utiliser pour détecter une infection fongique invasive chez les humains. Les chitooligosaccharides ont aussi un énorme potentiel pharmaceutique à utiliser dans les médicaments à usage humain en raison de son activité antitumorale (montré par chitohexaose et chitoheptaose), propriété cicatrisante et antihypertenseur activité, N-Acétyl glucosamine, qui est un unité monomère du polymère de chitine, serait également anti-inflammatoire agent (P. A. Aloise et *al.*, 1996).

Plasmodium Falciparumis aurait également produit de la chitinase enzyme dans le cycle sporogonique. La chitinase est produite par l'agent pathogène dans l'intestin du vecteur anophèle pour perturber la membrane péritrophique et laisser le parasite se rendre à la salivaire glande.

L'inhibition de la chitinase peut arrêter le sporogonic cycle, de sorte qu'il peut être considéré comme une bonne cible. *Plasmodium falciparum* forme un sac membranaire autour du sang ingéré repas, c'est-à-dire la matrice péritrophique contenant de la chitine, et donc l'ajout de chitinases exogènes au repas de sang empêche la formation de matrice péritrophique (A. Giansanti et *al.* , 2007).

2.5.4. Applications diverses

Les chitinases ont été exploités pour isoler les protoplastes fongiques utilisés à titre expérimental moyens d'étudier la synthèse de la paroi cellulaire, synthèse et la sécrétion d'enzymes et l'amélioration de la souche pour la biotechnologie applications (N.Dahiya et al., 2005).

Le niveau de chitinases peut également être utilisé pour le traitement indirect. Détermination de la biomasse fongique présente dans le sol. Un enzyme de tannase à usage alimentaire est produite par *Aspergillus niger* mais la tannase se lie à la paroi cellulaire, réduisant ainsi le rendement. La chitinase est utilisée pour la dégradation de la paroi cellulaire fongique qui libère la tannase de la paroi cellulaire et augmente le rendement (C. Barthomeuf, 1994).

2.6. La chitine, substrat de la chitinase

Avec au moins 10 gigatonnes synthétisées et dégradées chaque année dans la biosphère (Muzzarelli, 1999), la chitine est le second polysaccharide le plus représenté dans la nature après la cellulose. Elle fut isolée et décrite pour la première fois en 1823 par Odier à partir de cuticules d'insecte (Desbrières, 2002)., elle est une structure de soutien chez les champignons et les animaux. Chez les champignons où elle constitue 22 à 44% des parois cellulaires des hyphes mycéliens, la chitine est associée à des glycoprotéines (Muzzarelli, 1977 ; Ruiz-Herrera et Martinez-Espinoza, 1999). La synthèse de chitine est un processus ancestral de la cellule animale (Jeuniaux, 1963), c'est pourquoi le règne animal est le principal producteur de chitine.

On la trouve chez les cnidaires, les brachiopodes, les pogonophores, les annélides. Elle est aussi présente à des teneurs variables (de quelques traces à 75%) dans les téguments de nombreux invertébrés tels les mollusques ou les nématodes. Ce polymère occupe une place majeure chez les arthropodes. Son association avec des protéines et des minéraux lui confère des propriétés de résistance et de flexibilité. Par sclérotisation ou minéralisation, ces complexes chitino-protéiques sont à l'origine de la mise en place des éléments exosquelettiques (cuticule, proctodeum, stomodeum, trachées) et de la membrane péritrophique des arthropodes. La coloration des cuticules provient en partie de la conjugaison de chitine avec des caroténoïdes (Muzzarelli, 1977).

La chitine est un homopolysaccharide composé d'unités *N*-acétyl- β -D-glucosamine liées entre elles par des liaisons glycosidiques (1 \rightarrow 4). Sa structure est similaire à celle de la cellulose, mais diffère par la présence des groupements *N*-acétylés sur les carbones 2 des glucoses (Figure 10). La synthèse de la chitine implique de nombreuses enzymes. La

phosphorylation et l'action d'isomérases permettent de transformer le D-glucose en D-fructose-6-phosphate qui, sous l'effet de transaminase, conduit à l'obtention de glucosamine.

Cette molécule est ensuite transacétylée pour donner des unités *N*-acétyl-glucosamine phosphatées, dont l'association est réalisée par des chitine synthases à partir de l'uridinediphosphate-*N*-acétylglucosamine.

Contrairement à la cellulose, dont une seule forme cristalline est décrite en conditions naturelles, la chitine est une substance polymorphe présentant trois formes cristallines.

L' α chitine constituée de chaînes antiparallèles est la forme la plus stable et la plus abondante (Minke et Blackwell, 1978). On la trouve chez les arthropodes et les champignons. La β chitine, constituée de chaînes parallèles (Blackwell, 1969), a été décrite chez certains céphalopodes, des annélides polychètes, des pogonophores et quelques protozoaires. Enfin la γ chitine, mal connue, qui serait constituée de l'assemblage de deux macromolécules parallèles et d'une antiparallèle, n'est rapportée que dans les téguments des nymphes d'un coléoptère (*Ptinus*) (Rudall et Kenchington, 1973) et dans l'estomac d'un calmar (*Loligo*) (Ruiz-Herrera et Martinez-Espinoza, 1999).

Les polymères de chitine forment des microfibrilles qui sont stabilisées par des liaisons hydrogènes formées entre les groupes amines et carboxyles. L'arrangement des microfibrilles d' α chitine confère des propriétés de rigidité et de résistance mécanique alors que les microfibrilles de chitine de type β confèrent des propriétés de flexibilité. Ces propriétés influencent la répartition des différentes formes de chitine dans les structures cuticulaires.

Ainsi, la forme α est principalement présente au niveau des cuticules, alors que la forme β est davantage localisée au niveau des membranes péritrophiques des arthropodes (Kenchington, 1976; Peters, 1992). Enfin, des formes non cristallines et transitoires de la chitine ont été mises en évidence chez les champignons (Vermeulen et Wessels, 1986).

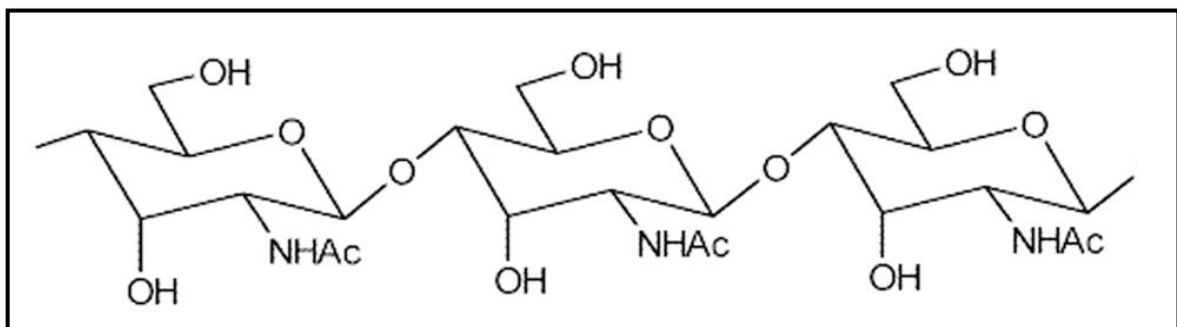


Figure 10 : Structure de la chitine (Julien Saguez, 2007).

Chapitre 3 : déchets alimentaires

3.1. Source végétale (grains de citrouille)

3.1.1. Description des graines de citrouille

Les graines de citrouille, également connues sous le nom de pepitas, sont des graines plates et vert foncé enfermées dans une enveloppe de couleur blanche. Ces graines ont une texture malléable et caoutchouteuse et une saveur de noisette subtilement douce. Ils peuvent être savourés toute l'année. Des graines de citrouille sont disponibles dans les magasins d'alimentation de formes variées telles que crues et décortiquées, crues et non décortiquées, grillées et décortiquées, grillées et sans coque. Comme les graines de melon d'eau, de concombre et de courge, les graines de citrouille font partie de la Famille des cucurbitacées. *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* et *Cucurbita mixta* sont les variétés courantes de citrouille.

3.1.2. Composition chimique et propriétés physicochimiques des graines de citrouille

Composition chimique et propriétés physico-chimiques des graines de citrouille et des acides gras de leur huile ont été déterminés. On a constaté que les graines contenaient 41,59% d'huile et 25,4% protéine ainsi que les vitamines tel que : la vitamine E, la vitamine A, les vitamines de groupe B (B1, B2, B6), la vitamine C et la vitamine D (Deimel, 2007). . Les teneurs en humidité, en fibres brutes, en cendres totales et en glucides étaient de 5,2%, 5,34%, 2,49% et 25,19%, respectivement. La densité, la viscosité dynamique et réfractive L'indice de l'huile de pépin de courge extraite était de 0,915, 93,659 cP et 1,4662, respectivement. Indice d'acide (mg KOH / g d'huile), indice de peroxyde (meq O₂ / kg d'huile), indice d'iode (g I₂ / 100 g d'huile), indice de saponification (mg KOH / g d'huile) et teneur en insaponifiable (%) du les huiles extraites des graines de citrouille étaient 0,78, 0,39, 10,85, 104,36, 190,69 et 5,73 ; respectivement. Les composés phénoliques totaux (mg d'acide gallique / kg d'huile), les tocophérols totaux (mg d' α -tocophérol / kg d'huile), les stérols totaux (%) et les cires (%) étaient 66,27, 882,65, 1,86 et 1,58. respectivement. Extinctions spécifiques à deux longueurs d'onde de 232 nm (K232) et 270 nm (K270) et la valeur R (K232 / K270) étaient respectivement de 3,80, 3,52 et 0,74. Chromatographie en phase gazeuse L'analyse de l'huile de graine de citrouille a montré que l'acide linoléique (39,84%), l'oléique (38,42%), Les acides gras principaux sont les acides palmitique (10,68%) et stéarique (8,67%). Comparé à La présente étude a révélé que l'huile de pépin de courge peut être un précieux atout source d'huile comestible.

3.2. Source animal (escargot *Helix aspersa*)

3.2.1. Généralités sur *Helix aspersa*

Helix aspersa est une espèce bien connue d'un escargot, dont la propagation peut être due à son utilisation comme produit alimentaire. C'est une espèce dominante développée dans des fermes d'escargot dans toute l'Europe. Est indigène dans la région méditerranéenne comprenant l'Afrique du Nord probablement dans les régions côtières atlantiques du Portugal aux îles néerlandaises britanniques (K. meriem et M. Ouarda ,2017).

3.2.2. Classification

Selon Muller, 1774

Règne : Animalia

Sous règne : Metazoa

Embranchement : Mollusca

Classe : Gasteropoda

Sous classe : Pulmone

Sous ordre : stylommatophores

Super famille : Helicacea

Famille : Helicidé

Genre : *Helix*

Genre et espèce : *Helix aspersa*

3.2.3. Morphologie

L'escargot *Helix aspersa* possède une coquille spiralée pouvant contenir tout son corps. Lorsqu'il est en extension, seul le pied apparaît, la masse viscérale étant retenue dans la coquille par le muscle columellaire (K. meriem et M. Ouarda ,2017).

3.2.3.1. La coquille

Elle s'enroule autour d'un axe central appelé columelle, dans le sens des aiguilles d'une montre : enroulement dextre. Elle est composée :

D'une partie organique : trame protéique, représentant 1 à 2% de la coquille.

D'une partie minérale : carbonate de calcium sous forme de calcite et d'aragonite, représentant 98% de la coquille.

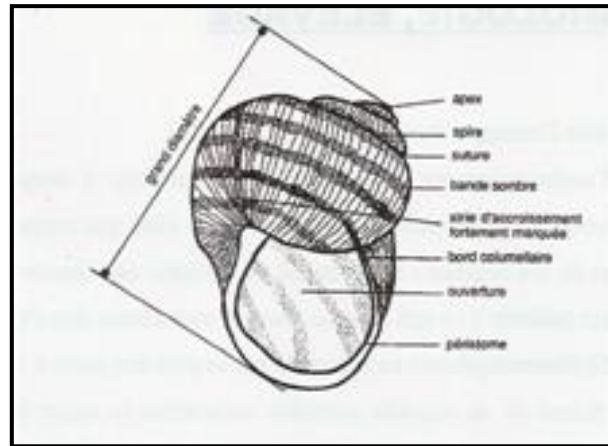


Figure11 : La structure de la coquille d'*Helix aspersa*.

La coquille est sécrétée par le bord du manteau. A la fin de la croissance, le bord de la coquille se retourne et se durcit, l'escargot est dit *bordé*.

3.2.3.2. Le corps

Il comprend une partie renfermée dans la coquille et une partie visible chez l'animal en extension. Cette dernière est une masse musculaire dont la fonction est essentiellement locomotrice : le pied. La partie antérieure du pied, appelée tête comprend une bouche, deux tentacules oculaires (postérieures, les plus grandes), deux tentacules tactiles (antérieures, les plus petites), un orifice génital sur le côté droit. La bouche est entourée de quatre lèvres et est pourvue d'une « mâchoire » supérieure cornée.

La partie contenue dans la coquille s'appelle le tortillon. Il s'agit d'une masse viscérale. En région antérieure se trouve le manteau, fin et transparent, il constitue la cavité palléale, dont le plafond richement vascularisé correspond au poumon.

La partie du manteau en contact avec le péristome forme un renflement : le bourrelet palléal. Sur le bord inférieur droit de ce bourrelet, s'ouvrent l'anus, l'orifice excréteur et le pneumostome (orifice respiratoire). En arrière se trouve un rein jaunâtre (organe de *Bojanus*) et un coeur. Sur la partie postérieure du tortillon se trouve un organe plus sombre brun verdâtre ayant un rôle comparable à celui du foie des vertébrés : l'*hépatopancréas*. Sur ce dernier, se trouve une zone blanchâtre : la *glande de l'albumen*.

3.2.4. Biochimie de l'escargot *H.aspersa*

La composition en protéines, lipides, carbohydrates et minéraux de l'espèce *H. aspersa* a été établie par Cadart (1975). Qui a remarqué la richesse de espèce en sels minéraux Depuis cette date quelques informations sont apparues selon différents traitements de la chaire (Tableau 1) (K. meriem et M. Ouarda ,2017).

Tableau 1 : Données sur la composition d'escargots *Helix aspersa* (Gomot, 1998).

espèce	(%) eau	Protéines (g par100g de matière fraiche)	Lipides (g par100g de matière fraiche)	Carbohydrates (g par100g de matière fraiche)	Matières organiques	Auteurs
<i>H.aspersa</i> petit escargot de 2,5g	83,3	12	0,7	0,5	2,7	(Claeys & Demeyer, 1986)
<i>H.aspersa</i> grand escargot de 3,5g	87,6	9,9	0,5	0 ,4	1,2	(Claeys & Demeyer, 1986)




La partie pratique de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie (RDC), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine1.



Il porte sur la production de chitinase par des champignons entomopathogènes et l'étude de l'effet de la température et du pH sur l'activité chitinolytique dans un milieu à base des déchets alimentaires (les grains de citrouille comme source végétale et escargot comme source animale).

1. Collectes des insectes

Les insectes (*Blattella asahinai*, *Ectomyelois ceratoniae*, *Zorotsis spinimana*, larve de *Hennton et Persplaneta americana*) sont prélevés aux différents lieux (Tableau 2).

Tableau 2 : Les insectes collectés.

Les insectes	Les photos	Références	Lieu
A : <i>Blattella asahinai</i>		(Frontera, 2008)	La maison
B : <i>Ectomyelois ceratoniae</i>		(Nourani, 2007)	Les dattes
C : <i>Zorotsis spinimana</i>		(Sanjay ,2013)	Jardin

D : <i>Larve de Hennton</i>		(Isabelle, 2007)	Jardin
E : <i>Persplaneta americana</i>		(Salvador, 2016)	Jardin

2. Etude mycologique

2.1. Désinfection des insectes

Les insectes collectés sont désinfectés à l'éthanol (95%) pendant trois minutes, puis rincés plusieurs fois à l'eau distillée stérile et séchés à l'aide d'un papier absorbant stérile.

2.2. Isolement des champignons entomopathogènes

Les insectes sont déposés dans une boîte de Pétri contenant le milieu Potato-Dextrose-Agar (PDA) (Annexe1) additionnés d'un antibiotique, Gentamicine, à raison de 10mg/L.

Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 6 à 15 jours (Zimmermann, 1986).

2.3. Purification

La purification concerne principalement les colonies dont les caractères cultureux sont différents. Il s'agit donc de prélever une petite bouture mycélienne et de l'ensemencer de manière aseptique dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte (Figure 12) (Botton *et al.*, 1990).



Figure 12 : Méthode de purification des souches fongiques.

2.4. Identification

L'identification des isolats est basée sur les observations du mycélium avec les spores fongiques :

2.4.1. Observation macroscopique

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

2.4.2. Observation microscopique

L'observation microscopique s'effectue sur un petit fragment mycélien soigneusement prélevé à l'aide d'une Anse de Platine stérile. Le fragment prélevé est ensuite coloré au Lactophénol ou Bleu de Cotton (Annexe 1) (Packer et Thomas, 1990), ce qui permet ainsi de détecter la présence et la nature du mycélium, la présence ou l'absence du septum, les caractéristiques des fructifications et les spores (figure 13).

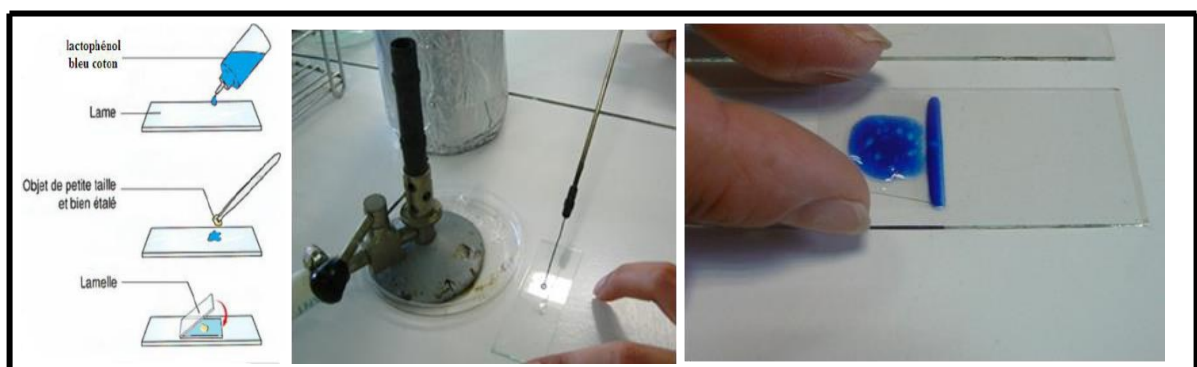


Figure 13 : Technique de préparation des lames pour l'observation microscopique.

3. Production de chitinase

3.1. Préparation de la chitine colloïdale

La chitine étant insoluble dans l'eau et les solvants organiques, elle doit être transformée en chitine colloïdale pour permettre une dispersion homogène en suspension ou sur milieu gélosé. Un protocole modifié de Murthy et Bleakley (2012) est utilisé pour la préparation de la chitine colloïdale. Dans un bécher de 1000 ml, vingt grammes de poudre de chitine sont traités avec 300 ml d'HCl concentré ~ 12M. Ce dernier est ajouté lentement sous agitation continue pendant 60 min sous une hotte chimique à température ambiante (25°C). La suspension est ensuite traitée avec 2 litres d'eau distillée refroidie, puis incubée pendant une nuit à 4 °C pour précipiter la chitine colloïdale. La suspension est alors passée à travers huit couches de papier filtre, logés dans un entonnoir de Büchner (130 mm). Trois litres d'eau distillé (pH 8,0 ~) sont ensuite passées à travers la chitine colloïdale retenue dans le papier filtre, jusqu'à atteindre un pH neutre. La chitine colloïdale obtenue est pressée entre Les papiers filtres (pour éliminer l'humidité supplémentaire) stérilisée, puis conservée à 4 °C (Murthy et Bleakley ,2012).

3.2. La mise en évidence de l'activité chitino lytique

Les souches fongiques isolées ont été ensemencées sur agar blanc additionné de chitine colloïdale 20% (MCC) (Annexe 1). Par touche centrale puis les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C et sont observées après 7 jours d'incubation, puis mesurer le diamètre des zones hydrolyses en millimètre de chaque souche testées et la comparaison entre elle, nous a permis de sélectionner la plus chitino lytique ,et l'apparition de zone d'hydrolyse se traduit par halo claire autour de colonie.

3.3. Fermentation sur milieu liquide à base des déchets alimentaire

3.3.1. Milieu liquide à base des écorces des grains de la citrouille

3.3.1.1. Préparation de milieu de culture à base des écorces des grains de la citrouille

Le milieu de culture est préparé à partir des écorces grains de la citrouille (Figure 14), qui nous ont été gracieusement fournis par le marché de Chalghoum-El Aid de Mila.

Les écorces des grains sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant 3 - 4 jours puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager (Katapodis et *al.*, 2006) de manière à obtenir une farine avec des particules équivalent à 5 à 6 mm de diamètre pour une culture liquide (Murthy et Naidu, 2010).



Figure 14 : Les écorces des grains de la citrouille.

Les écorces des grains broyés sont diluées dans de l'eau distillée avec une concentration de 4%. Les milieux sont répartis en Erlenmeyer de 250 ml à raison de 50 ml par Erlen puis autoclaves à 121°C pendant 20 min.

3.3.1.2. Conduite de fermentation

La souche de moisissure sélectionnée *Aspergillus tubingensis* a été inoculée avec 3 disques dans un Erlen meyer contenant le bouillon de production (Farine de citrouille), le pH du milieu est ajusté à 4, 7 et 10. Les Erlenmeyers sont incubés aux différentes températures (10°C, 30°C et 50°C) sans agitation pendant 7 jours. Les expérimentations sont réalisées en trois répétitions. Après fermentation, les bouillons de culture ont été filtrés à travers le papier Whatman n°1 préalablement séché et pesé. Le filtrat clair ainsi obtenu représente l'extrait enzymatique brut. Il a été congelé pour les dosages chitinolytiques. A la fin des fermentations, les paramètres (pH et activité chitinolytique) sont estimés (figure 15).

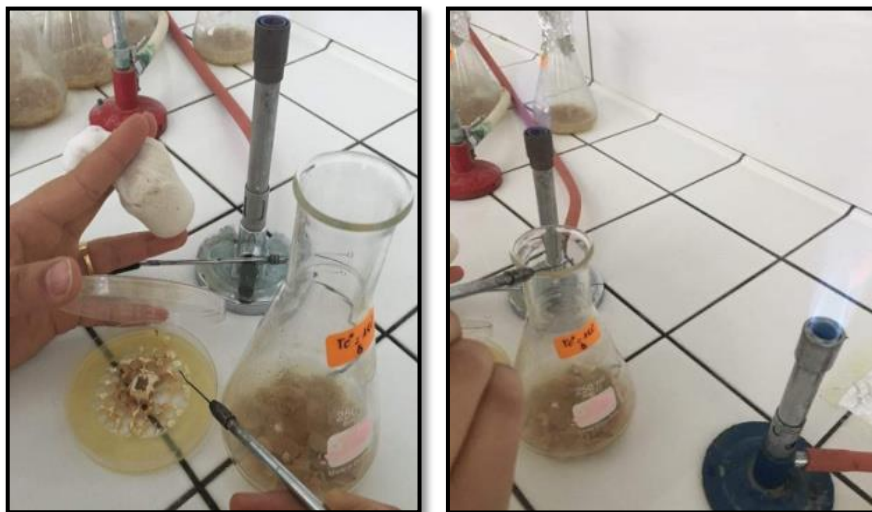


Figure 15 : La conduite de fermentation.

A. Effet du pH

Les erlens sont incubés à température 30C° pendant 7 jours et la gamme du pH testée est comprise entre 4 et 10 avec un intervalle de 3 .Les expérimentations sont réalisées en trois répétitions (Figure 16).



Figure 16 : L'incubation des pH testés à température 30 C°.

B. Effet de la température

Les erlens sont incubés aux différentes températures (10, 30,50 °C) pendant 7 jours. Les expérimentations sont réalisées en trois répétitions (Figure 17).

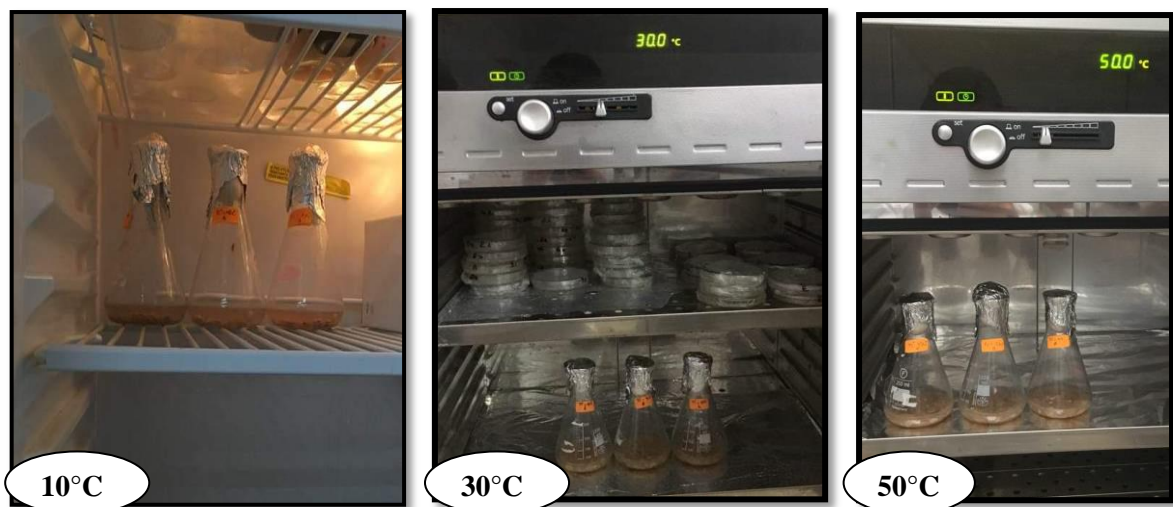


Figure 17 : L'incubation des erlens aux différentes températures.

3.3.2. Milieu liquide à base d'escargot (*H.aspersa*)

3.3.2.1. Préparation de milieu de culture à base d'escargot (*H.aspersa*)

Le milieu de culture est préparé à partir des marceaux des escargots, qui nous ont été gracieusement fournis par le marché d'Oran (Figure 18). Les escargots sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant 3 - 4 jours puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager (Katapodis et *al.*, 2006) de manière à obtenir une farine avec des particules équivalentes à 0,5 mm de diamètre pour une culture liquide (Murthy et Naidu, 2010).



Figure 18 : L'escargot *H.aspersa*.

La farine est diluée dans de l'eau distillée avec une concentration de 4%. Les milieux sont répartis en Erlenmeyer de 250 ml à raison de 50 ml par Erlen puis autoclavés à 121°C pendant 20 min.

3.3.2.2. Conduite de fermentation

La méthode de fermentation est identique à celle mentionnée précédemment (3.3.1.2)

4. Technique analytique

4.1. Mesure du pH

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

4.2. Dosage de l'activité chitinolytique

L'activité chitinolytique est déterminée en utilisant la méthode de dosage des sucres réducteurs par le DNS (acide 3,5-DiNitroSalicylique) (Miller ,1959). Le mélange réactionnel est composé de 1 ml d'extrait enzymatique brut auquel on ajoute 1 ml de chitine dans un tampon de phosphate de sodium (50 mM, pH 5,0) (Annexe2) (0,2 g de chitine dans 2 ml de tampon). Le mélange est incubé dans un bain marie agitateur pendant 30 min à 50 °C. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min, prélever 1 ml du surnageant et rajouter 3 ml du réactif DNS (Annexe 2) afin de stopper la réaction. Le tout est porté au bain marie à 100 °C pendant 5 min puis refroidis dans un bain de glace. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm. La quantité de sucres réducteurs libérés est calculée en fonction du courbe étalon du N- Acétyl-Glucosamine (GlcNAc) utilisé comme référence (Annexe 3) (Toharisman *et al.*, 2005). Une unité de l'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la libération de 1 μ mol de N-acétylglucosamine par ml en 1 min, dans ces conditions. (Annexe 3).

Résultats

Ce travail porte sur la production de chitinase sécrétée par des champignons entomopathogènes. En effet, le chitinase de cet objectif est étudiée sur milieu à base de déchet alimentaire (écorces grains de la citrouille et escargot), et étudie l'effet de la température et du pH sur la production de la chitinase.

1. Etude Mycologique

1.1. Isolement, purification et identification des champignons entomopathogènes

L'isolement des souches fongiques, permis de répertorier 9 isolats représentant 4 genres : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*. Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 70% regroupant 6 espèces : *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus sp.1*, *Aspergillus sp.2*, *Aspergillus sp.3*, *Aspergillus sp.4*, suivie par le genre *Fusarium*, *Cladosporium* et *Aletrnaria* avec un pourcentage de 10% (Figure 19 et Tableau 3).

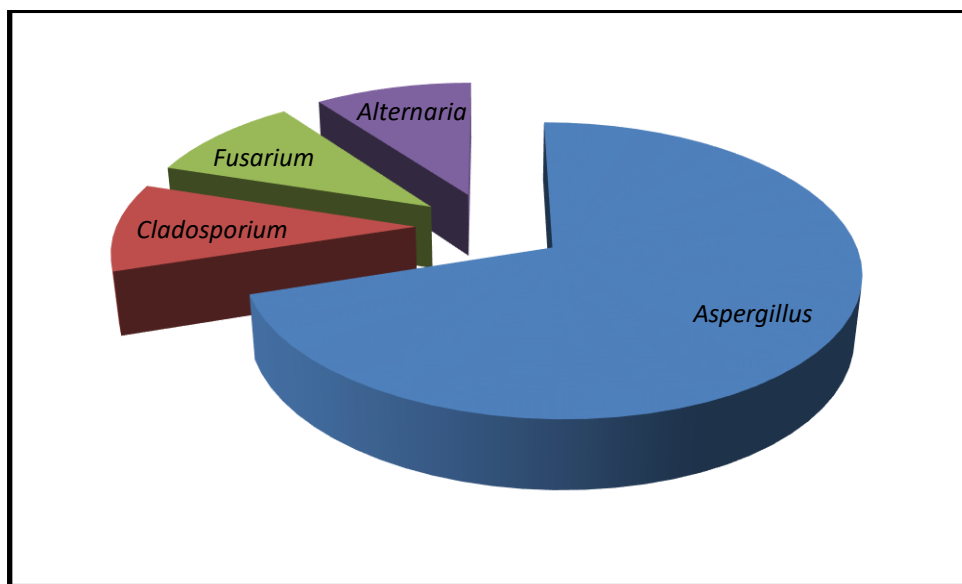

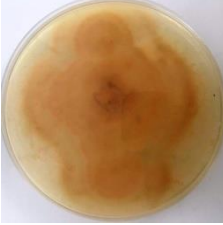
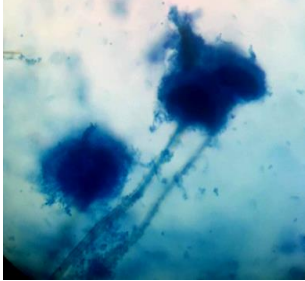
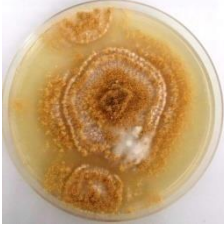
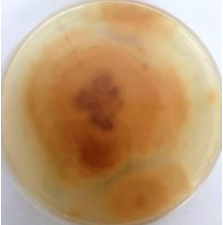
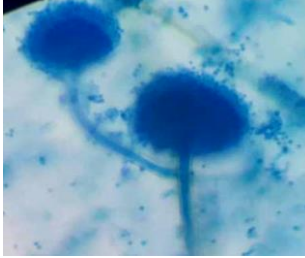

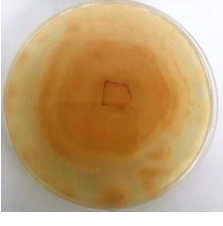
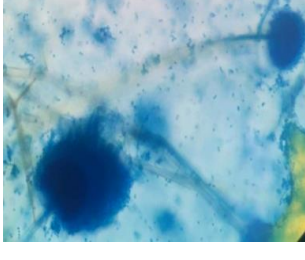


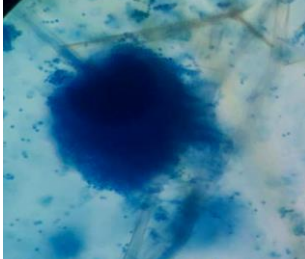
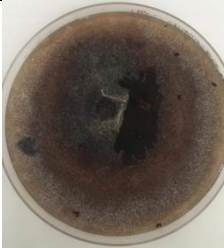
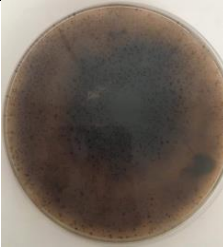
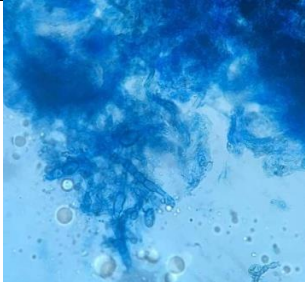
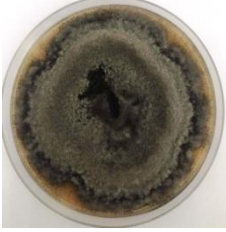
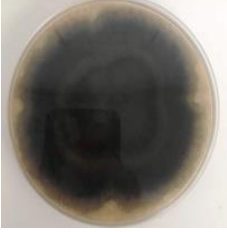



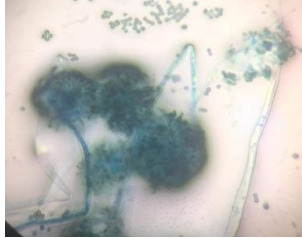
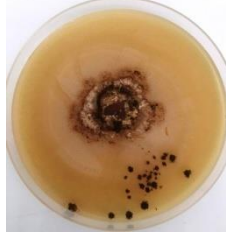

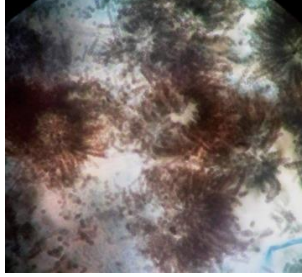


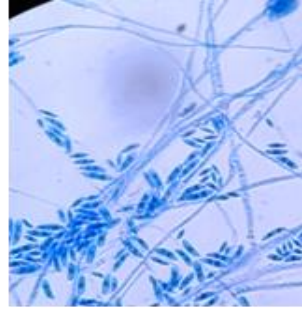


Figure 19 : Les pourcentages (%) des différents genres fongiques isolés.

Tableau 03 : Identification des souches fongiques.

Les souches (insectes)	Aspect macroscopique		Aspect microscopique	Les caractères	L'espèce
	Surface	revers			
S1 (<i>Persplaneta americana</i>)				colonie blanc, plate, basse, dense et veloutée les filaments septés portant des têtes aspergillaires (spécifiques du genre <i>Aspergillus</i>) qui sont des vésicules à l'extrémité de conidiophores qui donnent naissance à des spores externes allongées (stérigmates ou phialides) qui à leur tour donnent des conidies.	<i>Aspergillus sp.1</i>
S2a (<i>Larve de Hennton</i>)				colonie blanc, plate, basse, dense et veloutée les filaments septés portant des têtes aspergillaires (spécifiques du genre <i>Aspergillus</i>) qui sont des vésicules à l'extrémité de conidiophores qui donnent naissance à des spores externes allongées (stérigmates ou phialides) qui à leur tour donnent des conidies.	<i>Aspergillus sp.2</i>
S2b (<i>Larve de Hennton</i>)				colonie blanc, plate, basse, dense et veloutée les filaments septés portant des têtes aspergillaires (spécifiques du genre <i>Aspergillus</i>) qui sont des vésicules à l'extrémité de conidiophores qui donnent naissance à des spores externes allongées (stérigmates ou phialides) qui à leur tour donnent des conidies.	<i>Aspergillus sp.3</i>
S2d (<i>Larve de Hennton</i>)				colonie blanc, plate, basse, dense et veloutée les filaments septés portant des têtes aspergillaires (spécifiques du genre <i>Aspergillus</i>) qui sont des vésicules à l'extrémité de conidiophores qui donnent naissance à des spores externes allongées (stérigmates ou phialides) qui à leur tour donnent des conidies.	<i>Aspergillus Sp.4</i>
S2c (<i>Larve de Hennton</i>)				Colonies veloutées ou poudreuses, de couleur foncée, les conidiophores sont plus simples ou ramifiés et les conidies sont unicellulaire ou multicellulaire	<i>Cladosporium sp.</i>

<p>S3 (<i>Zorotsis spinimana</i>)</p>				<p>Culture noire ou grise, laineuse. Les conidiophores bruns sont formés de plusieurs cellules les conidies, de forme murale (dictyospores), prennent naissance à partir du conidiophore.</p>	<p><i>Alternaria alternata</i></p>
<p>S4 (<i>Blattella asahinai</i>)</p>				<p>Couleur blanc à la crème avec un aspect cotonneuse et les têtes des conidies sont bisérées, rarement unierées, radiées</p>	<p><i>Aspergillus tubingensis</i></p>
<p>S5 (<i>Blattella asahinai</i>)</p>				<p>Couleur vert foncé avec un aspect cotonneuse et leurs conidiophores sont courts et des conidies de forme sphérique</p>	<p><i>Aspergillus parasiticus</i></p>
<p>Pyrale <i>Ectomyelois ceratoniae</i></p>				<p>Couleur blanche ou crème avec un aspect gras et leurs conidiophores sont courts et souvent ramifiés avec des macroconidies fusiformes et cloisonnées</p>	<p><i>Fusarium sp.</i></p>

2. Chitinase

2.1. La mise en évidence de l'activité chitinolytique

Les tests de chitinase réalisés sur le Milieu MCC (Milieu chitine colloïdal) ont permis la mise en évidence de l'activité chitinolytique chez les neuf champignons entomopathogènes étudiés.

Les neuf souches ont des diamètres variés de 0.5 mm à 20mm (tableau 4, figure 20, figure 21).

Tableau 4 : La mise en évidence de chitinase pendant 7 jours.

Les jours		1 ^{er} jour	2 ^{em} jour	3 ^{em} jour	4 ^{em} jour	5 ^{em} jour	6 ^{em} jour	7 ^{em} jour
Les souches								
S1	R 1	-	*	*	*	*	*	*
	R 2	-	*	*	*	*	*	*
S2a	R 1	-	*	*	*	*	*	*
	R 2	-	*	*	*	*	*	*
S2b	R 1	-	*	*	*	*	*	*
	R 2	-	-	*	*	*	*	*
S2c	R 1	*	*	*	*	*	*	*
	R 2	*	*	*	*	*	*	*
S2d	R 1	*	*	*	*	*	*	*
	R 2	*	*	*	*	*	*	*
S3	R 1	*	*	*	*	*	*	*
	R 2	*	*	*	*	*	*	*
S4	R 1	5mm	7mm	8mm	10mm	11mm	15mm	20mm
	R 2	-	2mm	7mm	9mm	10mm	13mm	16mm
S5	R 1	*	*	*	*	*	*	*
	R 2	*	*	*	*	*	*	*
Pyrale	R1	*	*	*	*	*	7mm	12mm
	R 2	*	*	*	*	*	8mm	14mm

() : Absence de zone de lyse (*) : La croissance fongique

R : Répétition

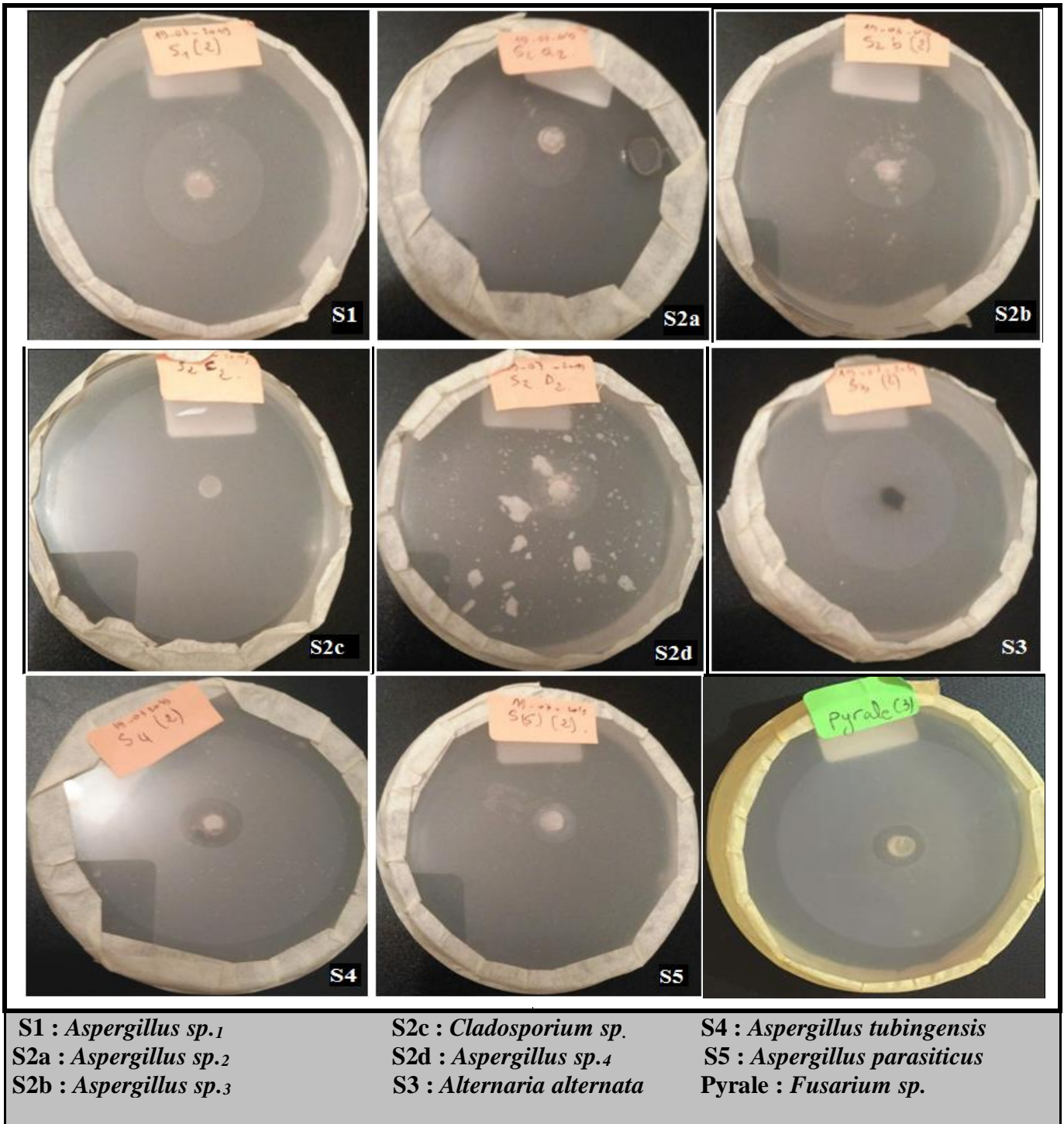


Figure 20 : L'activité chitinolytique des souches cultivée sur milieu MCC.

La dégradation de la chitine a été principalement remarquée chez les genres *Aspergillus tubingensis* et *Fusarium sp.* (figure 21).

Pour étudier l'activité de chitinase, nous avons choisis *Aspergillus tubingensis* comme souche productrice de chitinase .

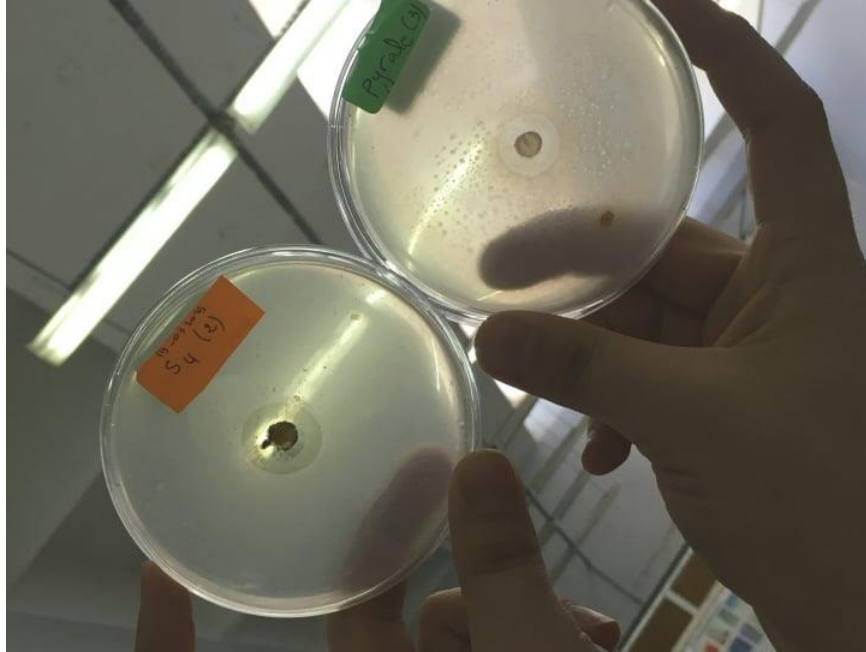


Figure 21 : Les zones d'hydrolyses de deux souches (S4 : *Aspergillus tubingensis* et, Pyrale : *Fusarium sp.*).

2.2. Activité Enzymatique

2.2.1. Ecorces des grains de la citrouille

2.2.1.1. Effet du pH

A. Mesure du pH

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

La figure 22 représente les variations du pH de la culture avant et après la fermentation dans une gamme de pH=4 à 10 avec un intervalle de 3. D'après cette figure, on remarque que le pH reste dans l'intervalle allant de 4 jusqu' à 5 pour les trois pH= (4, 7 et 10).

La valeur du pH=4 montre une augmentation après 7 jours de fermentation à base de déchet des grains de la citrouille, et les deux valeurs du pH =7et 10, une diminution significative a été observée, La diminution s'explique par production d'acides organiques dans le milieu.

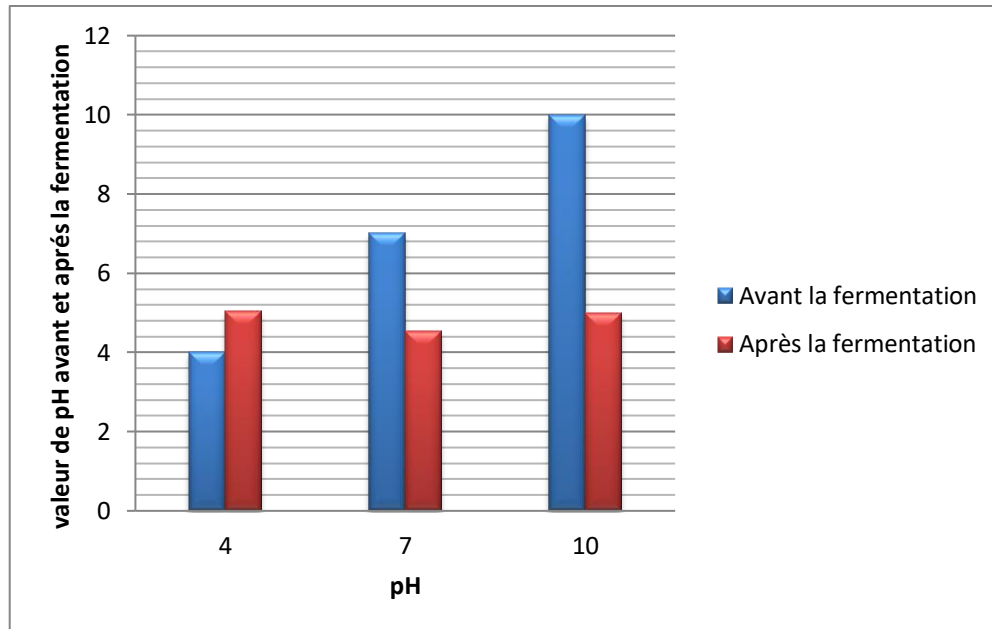


Figure 22 : La variation du pH avant et après la fermentation à base des écorces des grains de la citrouille chez *Aspergillus tubingensis*.

B. Activité chitinolytique

La comparaison des quantités d'enzymes produites par la souche sélectionnée : *Aspergillus tubingensis*, est effectuée par fermentation sur milieu à base des grains de la citrouille. Aussi La production enzymatique enregistrée chez *Aspergillus tubingensis* est assez élevée avec ($6,8 \times 10^7$ U) à pH=7 suivie par celle cultivée à pH=10 avec ($6,1 \times 10^7$ U), puis pH=4 (5×10^7 U) (Figure 23).

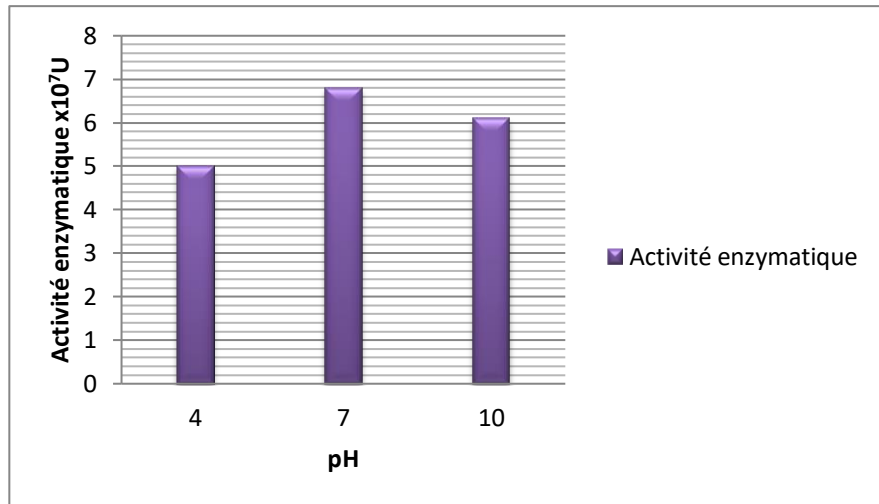


Figure 23 : Effet de pH sur l'activité chitinolytique d'*Aspergillus tubingensis* (des écorces grains de la citrouille).

2.2.1.2. Effet de la température

A. Mesure de pH

La figure 24 montre que les variations du pH de la culture avant et après fermentation dans une gamme de température de 10°C à 50°C avec un intervalle de 20°C. Et cette figure indique qu'une augmentation significative du pH pendant 7 jours de fermentation avec un intervalle de 4.77 à 5.29.

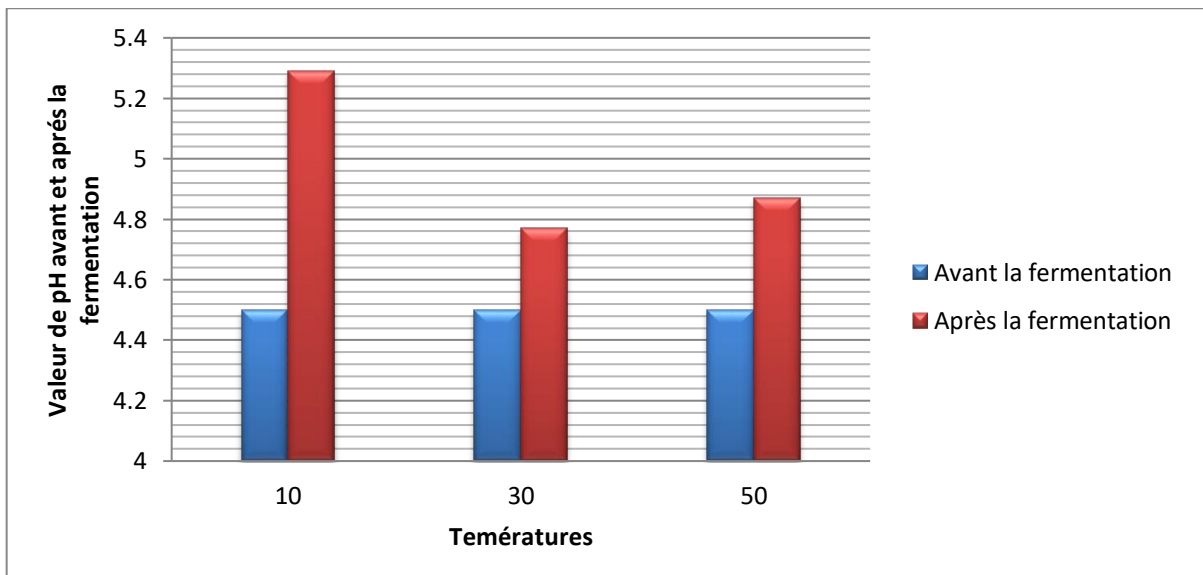


Figure 24 : La variation du pH dans une gamme de température différent avant et après la fermentation à base des écorces des grains de la citrouille.

B. Activité chitinolytique

Résultats de l'activité chitinolytique testée dans le milieu de fermentation liquide à base de déchets des grains de la citrouille a montré que la production de chitinase diffère d'une température à une autre chez *Aspergillus tubingensis*.

Par ailleurs, la meilleure activité a été observée à température 50 °C (19×10^7 U), suivi par la température 10 °C (18×10^7 U) et enfin la température 30°C° avec une activité enzymatique (6×10^7 U) (figure 25).

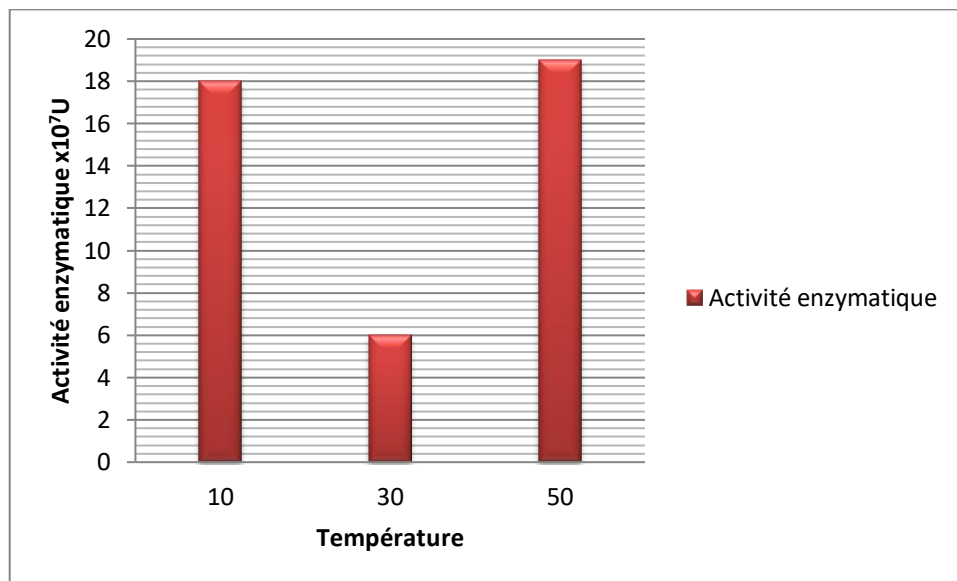


Figure 25 : Effet de température sur l'activité chitinolytique d'*Aspergillus tubingensis* (des écorces des grains de la citrouille).

2.2.2. Escargot

2.2.2.1. Effet du pH

A. Mesure du pH

Les résultats de pH des 3 essais sont mentionnés dans la figure 26, ils montrent une augmentation importante de pH dans les cultures liquides. Le pH augmente jusqu'à atteindre la valeur de 7.72 en fin de culture pour le pH 4 et 7.77 pour le pH=7.

Par contre, le pH égale à 10 montre une diminution significative de 7.9 dans la culture à base des déchets d'escargot.

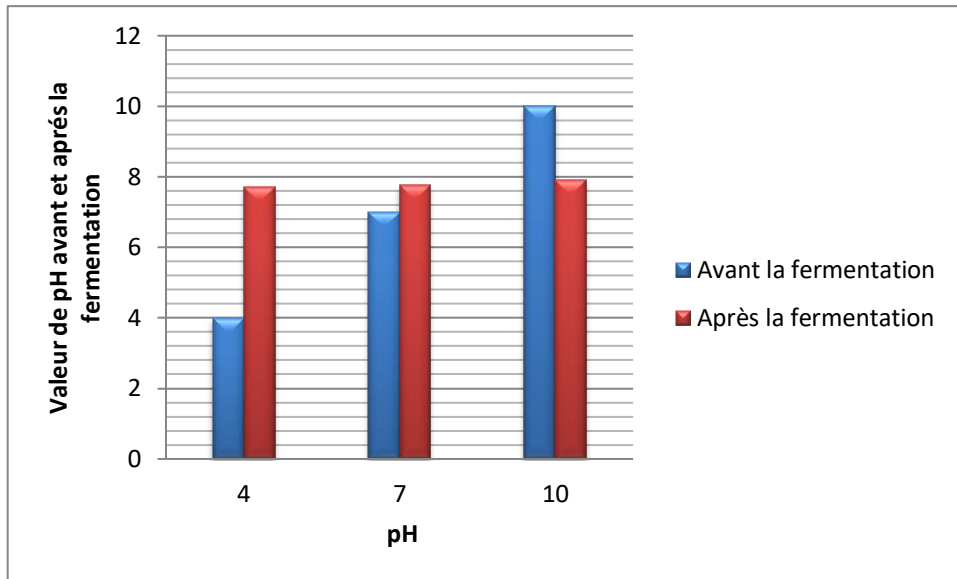


Figure 26 : La variation du pH avant et après la fermentation à base d'escargot (*H.aspersa*) chez *Aspergillus tubingensis*.

B. Activité chitinolytique

La figure 27 montre que la meilleure activité enzymatique a été observée chez *Aspergillus tubingensis* à pH=7 avec une activité de $(2,3 \times 10^7 \text{ U})$, suivie par le pH=4 de $(1,8 \times 10^7 \text{ U})$ et enfin le pH=10 de $(1,5 \times 10^7 \text{ U})$.

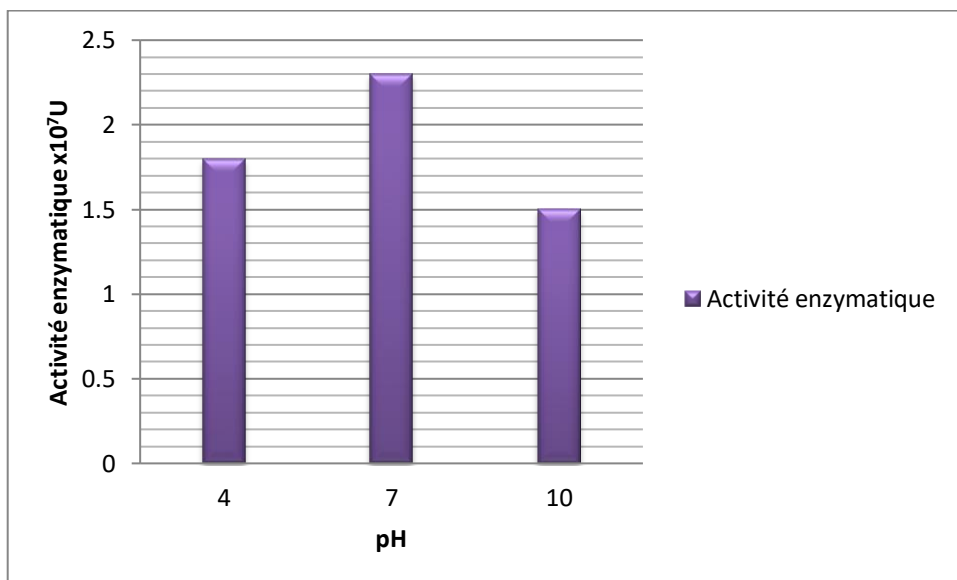


Figure 27 : Effet de pH sur l'activité chitinolytique d'*Aspergillus tubingensis* (d'escargot *H.aspersa*).

2.2.2.2. Effet de la température

A. Mesure du pH

Les résultats du pH des 3 essais sont mentionnés dans la figure 28. Ils montrent une augmentation importante du pH dans les cultures liquides. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les morceaux d'escargot possèdent un excellent pouvoir tampon. C'est le cas pour la plupart des résidus agro industriels.

Par ailleurs, le pH le plus élevé a été observé chez *Aspergillus tubingensis* pH= 7.96 à température 30°C, suivie par la température 10°C pH=7.78, puis la température 50 °C pH=7.68.

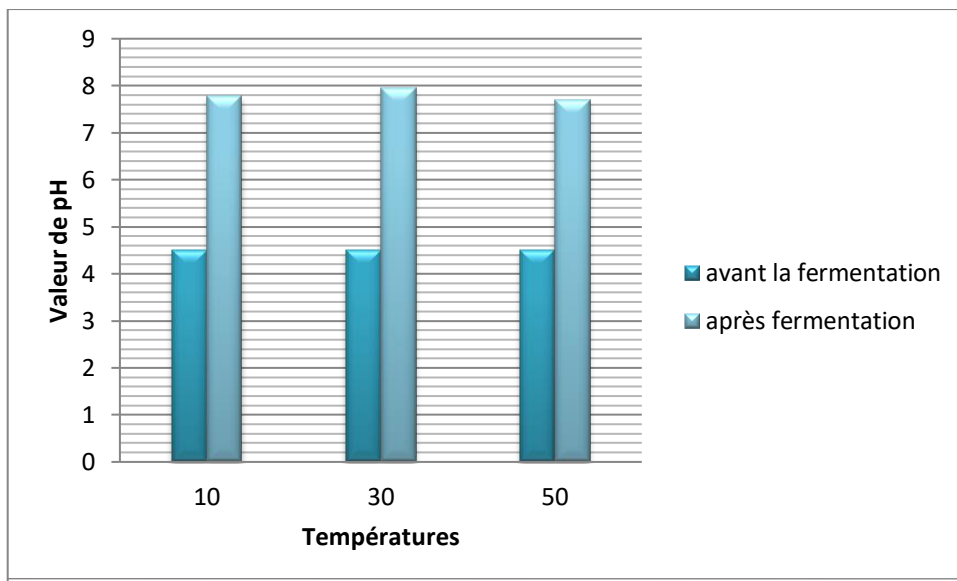


Figure 28 : La variation du pH dans une gamme de température différent avant et après la fermentation à base d'escargots (*H.aspersa*).

B. Activité chitinolytique

Au vu des résultats obtenus la comparaison des activités chitinolytique chez *Aspergillus tubingensis* indiquent que la production de chitinase obtenue par la souche sur le milieu liquide à base d'escargot (*Helix espersa*) incubée à 10 °C, 30°C et 50°C, est importante (Figure 29). Par ailleurs, la souche ne produite pas la même quantité de l'enzyme ciblée ; la meilleure activité obtenue (2×10^7 U) est produite par la souche *Aspergillus tubingensis* à 50°C, suivie par la température 30° C ($1,90 \times 10^7$ U), puis la température 10° C ($1,80 \times 10^7$ U).

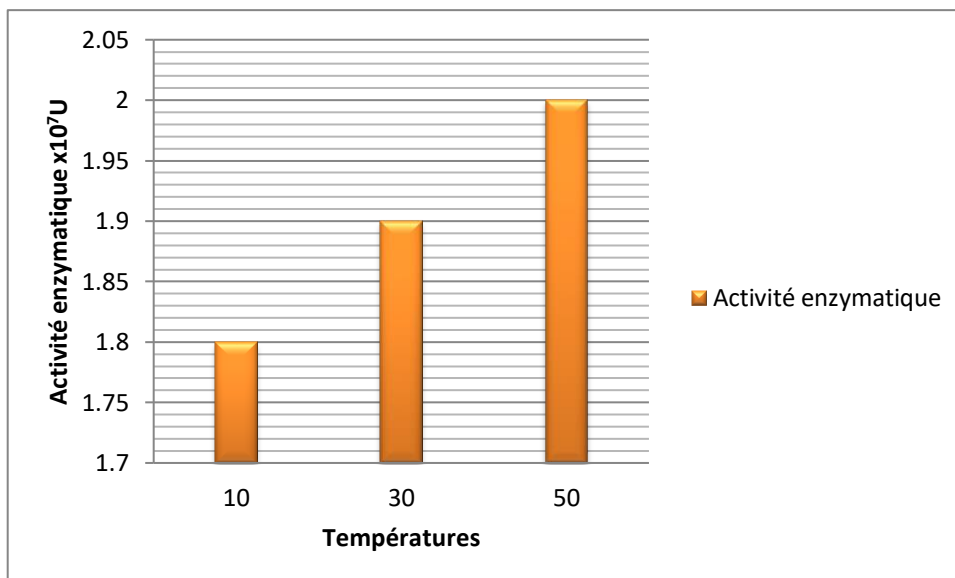


Figure 29 : Effet de température sur l'activité chitinolytique d'*Aspergillus tubingensis* (d'escargot *H.aspersa*).

Discussion

La majorité des insectes sont sensibles aux microorganismes dont les champignons, les bactéries et les virus (Scholte et al., 2004). Approximativement, 750 espèces de champignons décrites sont des pathogènes obligatoires ou facultatifs sur un ou plusieurs stades de développement des insectes dans des habitats aquatiques, terrestres et souterrains (McCoy et al., 1988). En effet, en conditions naturelles, le développement des colonies de pucerons est fréquemment menacé par l'infection des champignons entomopathogènes qui sont leur première cause de mortalité (Remaudière et al., 1981).

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

Les espèces fongiques les plus étudiées dans la lutte biologique contre les pucerons sont les ascomycètes appartenant à l'ordre des Hypocreales (*Beauveria*, *Metarhizium*, *Nomura*, *Verticillium* et *Peacilomyces*). *Beauveria bassianan* et *Metarhizium anisopliae* ont été considérés comme les plus efficaces en ce qui concerne le taux de mortalité élevé enregistré contre les insectes (épizooties) (Burges, 1981) (Carruthers et Soper, 1987) (McCoy et al., 1988).

L'isolement des souches fongiques, permis de répertorier 9 isolats représentant 4 genres : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*. Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 70% regroupant 6 espèces : *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus sp.1*, *Aspergillus sp.2*, *Aspergillus sp.3*, *Aspergillus sp.4*, suivie par le genre *Fusarium*, *Cladosporium* et *Aletrnaria* avec un pourcentage de 10%.

Les résultats décrivant l'effet d'*Aspergillus* sur les insectes (70%) ce qui est conforme aux résultats obtenus et rapportés par avec celui décrit par Won et al. (2015). Les espèces d'*Aspergillus* présentaient une grande diversité de modes de vie, y compris environnementale, industriels et agricoles ; certains d'entre eux peuvent être des agents pathogènes opportunistes d'un large éventail d'organismes, y compris les ravageurs agricoles (Gibbons et Rokas, 2012). Il a été rapporté par le biais d'essais de toxicité, que les espèces d'*Aspergillus* pourraient être utiles dans la lutte contre les pucerons en tant qu'agents de lutte antiparasitaire. Cependant, ces champignons saprophytes ne ciblent pas uniquement les insectes, mais peuvent également affecter les cellules immunitaires déprimées humaines, des mammifères et des oiseaux (Tell, 2005).

Des Souches d'*A.flavus* non productrices d'aflatoxines et non toxigènes sont actuellement étudiés en lutte biologique (Ehrlich, 2014).

À propos de *Fusarium*, le taux de mortalité enregistré dans notre étude (10%) était différent avec celui obtenu par Guesmi-Jouani *et al.* (2010) qui ont signalé un taux de mortalité supérieur à 90%. L'efficacité de *Fusarium* était élevée particulièrement signalée chez les pucerons *Glover gossypii* (Ganassi *et al.*, 2001).

La sélection des champignons entomopathogènes pour le contrôle biologique des insectes reste difficile, cela dépend cependant des différentes espèces, de leur susceptibilité, de leur vulnérabilité etc.. vis-à-vis des champignons (Glare *et al.*, 2012).

Par ailleurs *Cladosporium* a exercé un effet significatif à côté de *Fusarium* avec 10% après le septième jour. (Saranya *et al.*,2008) ont montré que la suspension de conidies de *C. oxysporum* serait cause de mortalité de l'ordre de 77,5% chez les individus d'*Aphis craccivora* (Koch), lorsque la suspension sporale est utilisée à une concentration de 10^8 conidies / ml incorporée dans une solution de Teepol. Bensaci *et al.* (2015) ont estimé la mortalité maximale de *C. oxysporum* contre *A. fabea* à 67,96%. /ml.

La dégradation de la chitine a été principalement remarquée chez le genre *Aspergillus tubingensis*. En fait ; les chitinases ont été décelées chez *Lecanicillium lecanii* (Nguyen *et al.*, 2015) *Peacilomyces variotii* (Nguyen *et al.*, 2009) , *Beauveria bassiana*(Dhawan et Joshi , 2017 ; Fang *et al.*, 2009 ; Suresh et Chandrasekaran, 1998), et *Beauveria felina* (Patidar *et al.*, 2005).

La comparaison des quantités d'enzymes produites par la souche sélectionnée : *Aspergillus tubingensis*, est effectuée par fermentation sur milieu à base des grains de la citrouille et les morceaux d'escargot dans des Erlenmeyer avec un taux d'inoculum (3 disques/50ml).

Aussi la production enzymatique de milieu à base des écorces des grains de citrouille enregistrée à pH=7 élevé avec une activité de $(6,8 \times 10^7$ U) et la meilleure activité obtenue est (19×10^7 U) produite par la souche *Aspergillus tubingensis* à 50°C.

La meilleure activité de milieu à base d'escargot enregistré à pH=7 avec une activité de $(2,3 \times 10^7$ U) et à température 50°C avec $(2 \times 10^7$ U).

Ces résultats permettent de considérer la farine des grains de la citrouille et les morceaux d'escargot comme un substrat favorable pour la production de chitinase vu sa richesse en chitine. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux indiqués par (Kaya *et al.*, 2015) La teneur en chitine représente 5,3%-8,9% chez les sauterelles. Les chitinases sont principalement étudiées pour leur potentiel en tant qu'agents de bio-contrôle contre les insectes, elle sont considérées parmi les enzymes importantes de dégradation de la chitine

polymères des cuticule des insectes (Stoykov *et al.*, 2015 ; Dhawan et Joshi , 2017). Les résultats obtenus se rapprochent de ceux indiqués par, Suresh et Chandrasekaran, (2005) pour la production de la chitinase par *Beauveria bassiana* sur milieu de déchets de crevettes avec un ration 5 /1 (déchets de crevettes / eau de mer pendant 96h.),par contre , Dhawane et Joshi (2017) rapportent une activité moyenne de chitinase (0.51U/ml par *B.bassiana* MTCC 4495, suivie par *B.bassiana* MTCC 2028 (0.49 U/ml).

Nos résultats sont en accord avec ceux indiqués par Lee *et al.*, (2009) ont également montré que l'activité de chitinase la plus élevée du *Penicillium* sp. LYG 0704 a été observée le troisième jour de la culture. Par ailleurs Binod *et al.*, (2005) ont noté que le temps d'incubation pour une meilleure production de chitinase est de 72h .

De ce fait, le pH du milieu est affecté par les processus métaboliques, notamment enzymatiques , C'est pour cette raison que les variations du pH sont des indicateurs des changement dans les activité métaboliques (Sandhya *et al.*, 2005).

Le pH augmente jusqu'à atteindre la valeur de 7,97 en fin de culture, cette augmentation du pH s'explique par la libération des acides aminés et des ions ammonium (NH₄⁺) dans le milieu, suite à une protéolyse intense (Botton *et al.*, 1990), aussi à l'épuisement du milieu en substrats nutritifs et au début de l'autolyse mycélienne.

Les pH optimum observés sont de 4 à 6 pour la plupart des chitinases fongiques telles que celles des espèces , *Lecanicillum* (Tikhonov *et al.*, 2002 ; Barghini *et al.*, 2013),*Talaromyces flavus* (Duo-Chuan *et al.*, 2005), *Gliocladium catenulatum* (Ma *et al.*, 2012),*M. anisopliae* (Kang *et al.*, 1999), et *Aspergillus fumigatus* (Xia *et al.*, 2009).

Des travaux antérieurs ont rapporté des valeurs optimales de pH pour les chitinases fongiques entre 4 et 8 (Li, 1998 ; Sahai et Manocha ,1993).

Le chitinase suscite un intérêt majeur grâce à leur utilisation potentielle dans de nombreux secteurs industriels. Cette enzyme a une grande importance en biotechnologie et trouvent des applications dans de nombreux domaines tels que le domaine agroalimentaire, médical.

La production de cette enzyme a été réussie par certaines bactéries, insectes, plantes supérieures, mammifères et champignons.

Notre étude comporte deux axes de recherche. Le premier axe est l'isolement et identification Des champignons entomopathogènes et le seconde est la production de chitinase par fermentation dans un milieu à base de déchets alimentaire (écorce des grains de la citrouille et l'escargot).

Pour l'isolement et la sélection des souches fongique ; l'examen macroscopique et microscopique nous ont permis d'identifier quatre souches *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* et *Alternaria* représentant 9 espèces : *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sp.1*, *Aspergillus sp.2*, *Aspergillus sp.3*, et *Aspergillus sp.4*.

Le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 70% regroupant 6 espèces : *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sp.1*, *Aspergillus sp.2*, *Aspergillus sp.3*, *Aspergillus sp.4*, suivie par le genre *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* avec un pourcentage de 10%.

Les tests de chitinase réalisés sur le milieu MCC (milieu chitine colloïdale) ont permis la mise en évidence de l'activité chitinolytique chez les champignons entomopathogènes isolés (*Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sp.1*, *Aspergillus sp.2*, *Aspergillus sp.3*, *Aspergillus sp.4*, *Fusarium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria alternata*).

Les résultats de screening montrent qu'*Aspergillus tubingensis* donne une grande zone de lyse avec un diamètre de 20mm, suivie par *Fusarium sp.* avec 14 mm par contre chez les souches (*Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus sp.1*, *Aspergillus sp.2*, *Aspergillus sp.3*, *Aspergillus sp.4*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria alternata*) ont une croissance mycélienne (envahissement).

Pour l'étude de pH sur l'activité chitinolytique, la souche *Aspergillus tubingensis* a été ensemencées dans un milieu à base des écorces des grains de citrouille, puis incubées à 30°C, la gamme du pH testée est comprise entre 4 et 10 avec un intervalle de 3 (4, 7 et 10).

Par ailleurs la production enzymatique enregistrée chez *Aspergillus tubingensis* assez élevée avec (6.8x10⁷U) à pH=7 suivie par (6.1 x10⁷U) à pH=10, puis (5x10⁷U) à pH=4.

L'activité enzymatique recherchée dans le milieu de fermentation liquide à base des grains de la citrouille a montré que la production de chitinase diffère d'une température à une autre.

Les résultats obtenus révèlent que la souche fongique utilisée dispose des grandes variations au niveau de rendement en activité chitinolytique.

La simple observation après fermentation à 50°C montre que la souche produit une quantité élevée de chitinase (19×10^7 U). Et aussi à la température 10°C de (18×10^7 U) produite par *A.tubingensis* par contre quant à la température 30°C, on remarque qu'il y a une activité faible de (6×10^7 U).

Pour étudier l'effet de température et de pH sur l'activité de chitinase, la réalisation des fermentations, un 2 gramme de déchet d'escargot est introduit dans un erlenmeyer de 250 ml, puis 50 ml d'eau distillée sont additionnés à ce substrat.

La meilleure activité enzymatique a été observée chez *Aspergillus tubingensis* à pH=7 avec une activité de ($2,3 \times 10^7$ U), suivie par le pH=4 de ($1,8 \times 10^7$ U) et enfin le pH=10 de ($1,5 \times 10^7$ U). Au vu des résultats obtenus la comparaison des activités chitinolytiques chez *Aspergillus tubingensis* indiquent que la production de chitinase obtenue par la souche sur le milieu liquide à base d'escargot (*Helix espersa*) incubée à 10 °C, 30°C et 50°C, est importante. Cependant, la souche ne produit pas la même quantité de l'enzyme ciblée ;

La meilleure activité obtenue (2×10^7 U) est produite par la souche *Aspergillus tubingensis* à 50°C, suivie par la température 30°C de ($1,90 \times 10^7$ U), puis la température 10° C de ($1,80 \times 10^7$ U).

Cela pourrait s'expliquer par le fait que les écorces des grains de la citrouille et d'escargot possèdent un excellent pouvoir tampon, comme c'est le cas pour la plupart des résidus agroindustriels.

Par ailleurs, la meilleure activité obtenue dans le milieu à base des écorces des grains de la citrouille (source végétal), dans ce cas-là, on peut posséder les écorces des grains de la citrouille un excellent des déchets agro-alimentaire pour la production de chitinase.

Perspective

Aspergillus n'est plus considéré uniquement comme une souche pathogène et pourraient être utilisés dans la lutte biologique (entomopathogène), Utiliser les déchets alimentaire (animal, végétale) comme substrat de base pour la production des enzymes

- Al-Ahmadi, K. J., Yazdi, M. T., Najafi, M. F., Shahverdi, A. R., Faramarzi, M. A., Zarrini, G., & Behravan, J. (2008). Optimization of medium and cultivation conditions for chitinase production by the newly isolated: *Aeromonas* sp. *Biotechnology*, 7(2), 266-272.
- Azzouz, F. (2001). Identification moléculaire d'une chitinase CHT-1, sa localisation et son rôle chez le nématode '*Caenorhabditis elegans*' (Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel).
- Barthomeuf, C., Régerat, F., & Pourrat, H. (1994). Improvement in tannase recovery using enzymatic disruption of mycelium in combination with reverse micellar enzyme extraction. *Biotechnology techniques*, 8(2), 137-142.
- Bensaci, O. A., Daoud, H., Lombarkia, N., & Rouabah, K. (2015). Formulation of the endophytic fungus *Cladosporium oxysporum* Berk. & MA Curtis, isolated from *Euphorbia bupleuroides* subsp. *luteola*, as a new biocontrol tool against the black bean aphid (*Aphis fabae* Scop.). *Journal of plant protection research*, 55(1), 80-87.
- Benserradj, O. (2014). Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques.
- Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakács, G., Pócsi, I., & Pandey, A. (2005). Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 880-887.
- Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.
- Burges, H. D. (1981). Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. In: Burges HD, editor. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London: Academic Press, pp. 737-767.
- Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R. P., & Hoondal, G. S. (2005). Chitinase production in solid-state fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 using statistical experimental design. *Current Microbiology*, 51(4), 222-228.
- Duo-Chuan LI, Chen S, Jing LU. (2005). Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia*, 159, 223–9.
- Ehrlich, K. C. (2014). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops: advantages and limitations. *Front Microbiol.*, 5, 50.

- Gasmi, M., & Kitouni, M. (2017). Isolement, identification et criblage d'actinomycètes à activité chitinolytique à partir du sol de la région de Laghouat (Doctoral dissertation, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة).
- Glare, T., J. Caradus, W. Gelernter, T. Jackson, N. Keyhani, J. Köhl, P. Marrone, L. Morin and A. Stewart (2012). Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.*, 30, 250–258.
- Guesmi-Jouini, J., Boughalleb-M, N., & Halima-Kamel, M. B. (2011). Etudes préliminaires sur les champignons entomopathogènes des pucerons de l'artichaut en Tunisie. *Entomologie Faunistique-Faunistic Entomology*.
- Guesmi-Jouini, J., N. Boughalleb-M'hamdi and M. Ben Halima-Kamel.2010. Etudes préliminaires sur les champignons entomopathogènes des pucerons de l'artichaut en Tunisie. *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology*. 63 (3), 171-181.
- Hartl, L., Zach, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(2), 533-543.
- Kang, S. C., Park, S., & Lee, D. G. (1998). Isolation and characterization of a chitinase cDNA from
- Kang, S. C., Park, S., & Lee, D. G. (1999). Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of invertebrate pathology*, 73(3), 276-281.
- Kaya, M., & Baran, T. (2015). Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*). *International journal of biological macromolecules*, 75, 7-12.
- Kolosova, N., Breuil, C., & Bohlmann, J. (2014). Cloning and characterization of chitinases from interior spruce and lodgepole pine. *Phytochemistry*, 101, 32-39.
- Lacey, L. A., & Undeen, A. H. (1986). Microbial control of black flies and mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 31(1), 265-296.
- Lee, C. G., Hartl, D., Lee, G. R., Koller, B., Matsuura, H., Da Silva, C. A., ... & Humbles, A. (2009). Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13–

- induced tissue responses and apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 206(5), 1149-1166.
- Lee, W. W., Shin, T. Y., Bae, S. M., & Woo, S. D. (2015). Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the green peach aphid, *Myzus persicae*, using multiple tools. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(3), 607-615.
- Louze, H., Hadjaissa, F., & Aouar, L. (2018). Isolement et identification des moisissures de stockage du blé tendre (*Triticum aestivum* L) et blé dur (*Triticum durum* L).
- Ma, G. Z., Gao, H. L., Zhang, Y. H., Li, S. D., Xie, B. Y., & Wu, S. J. (2012). Purification and characterization of chitinase from *Gliocladium catenulatum* strain HL-1-1. *African Journal of Microbiology Research*, 6(20), 4377-4383.
- McCoy, C.W., R. A. Samson and D.G. Boucias .1988. Entomogenous Fungi. In: *Handbook of Natural Pesticides: Microorganisms*. (Eds.: Ignoffo et.al.). CRC Press, pp. 260.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Murthy, N., & Bleakley, B. (2012). Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *Internet J Microbiol*, 10(2), e2bc3.
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2010). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Applied Sciences Journal*, 8(2), 199-205.
- Nacos, M. K., Katapodis, P., Pappas, C., Daferera, D., Tarantilis, P. A., Christakopoulos, P., & Polissiou, M. (2006). Kenaf xylan—a source of biologically active acidic oligosaccharides. *Carbohydrate polymers*, 66(1), 126-134.
- Nagpure, A., Choudhary, B., & Gupta, R. K. (2014). Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical reviews in biotechnology*, 34(3), 215-232.
- Nguyen, H. Q., Quyen, D. T., Nguyen, S. L. T., & Van Hanh, V. U. (2015). An extracellular antifungal chitinase from *Lecanicillium lecanii*: purification, properties, and application in biocontrol against plant pathogenic fungi. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 6-14.

- Nguyen, V. N., Oh, I. J., Kim, Y. J., Kim, K. Y., Kim, Y. C., & Park, R. D. (2009). Purification and characterization of chitinases from *Paecilomyces variotii* DG-3 parasitizing on *Meloidogyne incognita* eggs. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(2), 195.
- Oranusi, N. A., & Trinci, A. P. (1985). Growth of bacteria on chitin, fungal cell walls and fungal biomass, and the effect of extracellular enzymes produced by these cultures on the antifungal activity of amphotericin B. *Microbios*, 43(172), 17-30.
- Oshima, H., Miyazaki, R., Ohe, Y., Hayashi, H., Kawamura, K., & Kikuyama, S. (2002). Molecular cloning of a putative gastric chitinase in the toad *Bufo japonicus*. *Zoological science*, 19(3), 293-298.
- Packer, H. L., & Thomas, C. R. (1990). Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnology and bioengineering*, 35(9), 870-881.
- Patidar, P., Agrawal, D., Banerjee, T., & Patil, S. (2005). Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 40(9), 2962-2967.
- Remaudière, G., Latgé, J. P., & Michel, M. F. (1981). Écologie comparée des entomophthoracées pathogènes de pucerons en France littorale et continentale. *Entomophaga*, 26(2), 157-178.
- Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E., & Aerts, J. M. (1995). Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 2198-2202.
- Revah-Moiseev, S., & Carroad, P. A. (1981). Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(5), 1067-1078.
- Roberts, D. W., & Hajek, A. E. (1992). Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. In *Frontiers in industrial Mycology* (pp. 144-159). Springer, Boston, MA.
- Robertus, J. D., & Monzingo, A. F. (1999). The structure and action of chitinases. *Exs*, 87, 125-135.

- Sabbahi, R. (2008). Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs en fraiseraies (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- Saguez, J. (2007). Dérégulation des activités chitinasés: vers de nouvelles perspectives de lutte contre les aphides (Doctoral dissertation, Université de Picardie Jules Verne). vol. 105, no. 18, pp. 6650–6655, 2008.
- Sakuda, S. (1996). Studies on the chitinase inhibitors, allosamidins. *Chitin enzymology*, 2, 203-212.
- Sandhya, C., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2005). Microbial proteases. In *Microbial enzymes and biotransformations* (pp. 165-179). Humana Press.
- Saranya, S., R. Ushakumari, S. Jacob, Babu M. Philip (2008). Efficacy of different entomopathogenic fungi against cowpea aphid, *Aphis craccivora* (Koch). *J. Biopest.*, 3 (1 Special Issue) 138 - 142.
- Scholte, E. J., Knols, B. G., Samson, R. A., & Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*, 4(1).
- Serap, D. U. R. U., YÜCEEĞE, M., & ARDIÇ, S. (2013). Chitinases and lung diseases. *Tuberk Toraks*, 61(1), 71-75.
- Shen, C. R., Liu, C. L., Lee, H. P., & Chen, J. K. (2013). The identification and characterization of chitotriosidase activity in pancreatin from porcine pancreas. *molecules*, 18(3), 2978-2987.
- Stoykov, Y. M., Pavlov, A. I., & Krastanov, A. I. (2015). Chitinase biotechnology: production, purification, and application. *Engineering in Life Sciences*, 15(1), 30-38.
- Suresh, P. V., & Chandrasekaran, M. (1998). Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 655-660.
- Tell, L. A. (2005). Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*, 43(Supplement_1), S71-S73.

- Toharisman, A., Suhartono, M. T., Spindler-Barth, M., Hwang, J. K., & Pyun, Y. R. (2005). Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* Mb-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 733-738.
- Vega, K., & Kalkum, M. (2011). Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *International journal of microbiology*, 2012.
- Xia, J. L., Xiong, J., Xu, T., Zhang, C. G., Zhang, R. Y., Zhang, Q., ... & Qiu, G. Z. (2009). Purification and characterization of extracellular chitinase from a novel strain *Aspergillus fumigatus* CS-01. *Journal of Central South University of Technology*, 16(4), 552-557.
- Zhang, H., Liu, M., Tian, Y., & Hu, X. (2011). Comparative characterization of chitinases from silkworm (*Bombyx mori*) and bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Cell biochemistry and biophysics*, 61(2), 267-275.
- Zhang, J., Zhang, X., Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Ma, E., & Zhu, K. Y. (2011). Comparative genomic analysis of chitinase and chitinase-like genes in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *PloS one*, 6(5), e19899.
- Zhu, Q., Arakane, Y., Beeman, R. W., Kramer, K. J., & Muthukrishnan, S. (2008). Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6650-6655.
- Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R. J., Kim, Y. K., Chen, N. Y., Cohn, L., ... & Elias, J. A. (2004). Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*, 304(5677), 1678-1682.
- Zimmermann, G. (1986). The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of applied Entomology*, 102(1-5), 213-215.

Annexe 1

Milieux des cultures :

Milieu MCC (g/L) :

K_2HPO_4 0,4 g
 Na_2HPO_4 0,4 g
 $Mg SO_4$0,2 g
 F_2SO_4 0,004 g
 Chitine colloïdale..... .. 2 g
 Agar..... 8 g

dans 400ml d'eau distillé

Potato Dextrose Agar (PDA) :

pomme de terre..... 250 g
 D-Glucose 20g
 Agar..... 25g
 Eau distillé100 ml

Annexe 2

Tampons et réactifs utilisés :

Tampon phosphate pH :

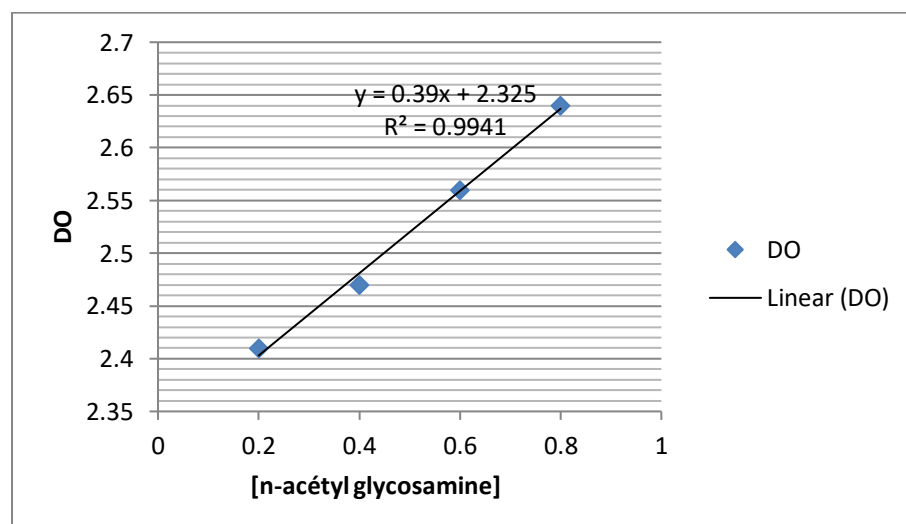
$NaH^2 PO_4$3g
 de l'eau distillée...250 ml.
 Na^2HPO_44,7 g
 Eau distillée.....250 ml
 Mélange les deux solutions
 (500ml) dans un bécher
 régler le pH à 6,5

Réactif DNS (miller *et al*)

NaOH1g
 Potassium sodium Tartare.....18,2g
 Phénol.....0.2g
 Soduim sulfit0.05g
 Eau distillé.....100ml

Annexe 3 :

Courbe d'étalonnage



The present work is only an initiation into the research of fungi able to slow the development of insects and to produce chitinase, it consists in isolating entomopathogenic fungi from different insects, the results of isolation, purification and Identification revealed the presence of nine fungal strains representing four genera: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*. The effect of temperature and pH on chitinase production of the *Aspergillus tubingensis* strain, on medium based on pumpkin and squid waste at different temperatures (10, 30 and 50 ° C) and at pH (4, 7 and 10) shows that the best chitinolytic activity in *Aspergillus tubingensis* was observed at 50 C ° and at pH 7 for the 2 fermentation media used, the results of this work confirm the high biotechnological potential of these entomopathogenic strains for the production of chitinase in liquid culture.

Key words: Entomopathogenic Champignons, *Aspergillus tubingensis*, Chitinase, Pumpkin seeds, Snail, pH, Temperature.

العمل المقدم هو بداية بحث عن الفطريات القادرة على ابطاء تطور الحشرات وإنتاج الكيتيناز ويتعلق أيضا بعزل الفطريات المسببة الامراض من الحشرات المختلفة ونتائج هذا العزل والتنقية والكشف تبين وجود 9 سلالات فطرية و4 أجناس:

Aspergillus, Fusarium, Cladosporium, alternaria

تأثير درجة الحرارة ودرجة الحموضة على إنتاج الكيتيناز في الوسط المعيشي المكون من قشور بذور اليقطين والحلزون في مختلف درجة الحرارة (10-30-50) ومختلف درجة الحموضة (4-7-10) تدل على أن النشاط الأنزيمي عند *Aspergillus tubingensis*

يظهر في درجة الحرارة 50 ودرجة الحموضة 7 بالنسبة للوسطين التخمر المستعملين ونتيجة هذا العمل تؤكد أن الإمكانيات التكنولوجية الحية عالية من أجل هاته السلالات الفطرية المسببة الامراض من أجل إنتاج الكيتيناز في الوسط السائل.

الكلمات المفتاحية: الفطريات المسببة الامراض، الكيتيناز، قشور بذور اليقطين، الحلزون، الرقم الهيدروجيني درجة الحرارة، *Aspergillus tubingensis*.

Production de l'enzyme chitinase par des champignons entomopathogènes cultivés sur deux milieux à base de déchets alimentaires (écorce de grains de la citrouille et d'escargot).

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

Le présent travail n'est qu'une initiation dans la recherche des champignons capables de freiner le développement des insectes et de produire de chitinase, il consiste à isoler des champignons entomopathogènes à partir des différentes insectes, les résultats de l'isolement, purification et de l'identification ont mise en évidence la présence de neuf souches fongiques représentant quatre genres : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*. L'effet de la température et de pH sur la production de chitinase de la souche d'*Aspergillus tubingensis*, sur milieu à base des écorces de citrouille et d'escargot, à différentes températures (10, 30 et 50°C) et au pH (4, 7 et 10) montre que la meilleure activité chitinolytique chez *Aspergillus tubingensis* a été observée à température 50 C° et à pH=7 pour les 2 milieux de fermentation utilisés. Les résultats de ce travail confirment le potentiel biotechnologique élevé de ces souches entomopathogènes pour la production de la chitinase dans la culture liquide.

Mots clés : champignons entomopathogènes, *Aspergillus tubingensis*, chitinase, grains de la citrouille, escargot, pH, température.

Laboratoire de recherche : Microbiologie (RDC).

Jury d'évaluation :

Président de jury : Mme ALMI.H. (M.C.B- UFM Constantine1),

Encadreur : Mme ABDELAZIZ.O. (M.C.B - UFM Constantine1),

Examinatrice : Mme BENMASIKH.A. (M.A.A - UFM Constantine1).

Date de soutenance : 09/07/2019.

