



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie.

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie des Mycètes / Fermentation et production de substances
Fongiques.

Intitulé :

Production de la protéase acide par des champignons entomopathogènes

Présenté et soutenu par : *CHABANI rawnak*

Le : 27/06/2018

ZAHRI anissa

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Melle ALMIH.* (M.C.B- UFM Constantine).

Rapporteur : *Melle. ABDELAZIZ W.* (M. A.A- Constantine - UFM Constantine).

Examinatrice : *Melle. BELMESSIKH A.* (M. A.A - UFM Constantine).

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciement

Au terme de ce travail, nous tenon à exprimer toute nos reconnaissances et notre profond respect à notre Directrice de mémoire, Mme.Abdelaziz Ouided

Maître assistant à l'université des Frères,, pour sa patience,

Ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont on a pu bénéficier.

Nous tenons à exprimer notre grande considération et nos sentiments de reconnaissance à Mme.Almi Hiba Maître de conférences à l'université

Mentouri Constantine, qui nous fait l'honneur de présider ce jury.

C'est avec un très grand plaisir que nous remercions infiniment

Mme.Belmassikh Aicha Maître assistant à l'université Mentouri

Constantine, d'avoir bien voulu juger ce modeste travail, qu'elle trouve

icinotre profonde gratitude.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin à la

réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents mon père Abdelhadi et ma mère Samia

Quoi que je fasse je ne pourrais pas leur rendre ce qu'ils ont fait

pour moi, si je suis arrivée là c'est bien grâce a eux

Que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

A mes grands-parents Salah et Zakia

A ma tante Leila et Asma

A ma sœurs Marwa

A mes frères Mohamed Amine et Zineddine

A toutes mes amies Rayenne, Sara, Rawnak et Asma

A tous ceux que j'aime.

Anissa

Dédicace

*Avant toute personne, je remercie ALLAH de m'avoir donné le
courage, la*

Patiente, et la volonté pour réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à :

Mon père Fouzi.

Ma chère mère Souhayla.

A ma soeur Ghofrane.

A mes frères Mohamed et Younas.

A mon adorable encadreur : Mme Abdelaziz ouided.

A tous mes amies.

A toute promotion.

A tous ceux que j'aime.

Rawnak

Table des matières

Introduction	01
Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Les enzymes protéolytiques	
1. Généralités sur les enzymes	02
2. Les enzymes protéolytique	02
3. Définition de protéase	03
3.1.Source de protéase	04
3.2.1. Protéases d'origine animale	04
3.2.2. Protéases d'origine microbienne	05
3.2.3. Protéases d'origine végétale	06
3.2. Classification de protéase	06
3.2.1. Selon longueur de la chaîne polypeptidique	06
3.2.2. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique	06
3.3.3. Selon le pH d'activité	06
3.2.4. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif	07
3.3. Mode d'action	07
4. Application des protéases	08
4.1 Alimentaire	08
4.2. Médicale et pharmaceutique	08
4.3. Détergents	08
4.4. Industrie photographique	09
4.5. Autres applications	09
Chapitre 2 : Les moisissures	10

Table des matières

1. Généralités sur les moisissures	10
2. Habitat	10
3. Classification	10
4. Mode de reproduction	12
5. Condition de croissance de moisissures	12
6. Les champignons entomopathogènes	13
7. <i>Beuaveria bassiana</i>	13
7.1 Classification	14
7.2 Avantage de l'utilisation de <i>B. bassiana</i>	15
7.3 Mode d'action	15
8. <i>Cladosporium cladospoides</i>	18
8.1 Taxonomie	18
8.2 Morphologie macroscopique	19
8.3 Morphologie microscopique	19
Chapitre 3 : Les criquets	21
1. Description de l'espèce	21
2. Classification d' <i>Ocneridia volxemii</i>	22
3. Régime alimentaire	22
Chapitre 4 : Matériel et méthode	23
1. Origine des souches fongiques	23
2. Réactivation des souches fongiques	23
3. La confirmation identification des souches	23

Table des matières

3.1. Identification macroscopique	23
3.2. Identification microscopique	24
4. Test d'entomopathogénicité	24
4.1. Préparation des suspensions sporales	24
4.2. Dénombrement des spores	24
4.3. Essai biologique	24
4.4. Analyse statistique.	25
5. Mise en évidence des activités protéolytiques	25
6. Préparation de l'inoculum	26
6.1. Préparation de la suspension des spores	26
6.2. Dénombrements des spores	26
7. Méthode de fermentation	26
7.1. Substrat de fermentation	26
7.2. Préparation de milieu de culture	27
7.3. Effet de température	27
7.4. Effet de pH	28
8. Conduite de la fermentation	28
9. Méthode de dosage enzymatique	28
Chapitre 5 : Résultats et discussion	30
1. Identification des souches	30
1.1 Etude macroscopique	30
1.2. Etude microscopique	30

Table des matières

2. Test d'entomopathogénicité	35
3. Mise en évidence de l'activité enzymatique	35
4. Fermentation des souches sélectionnées	36
4.1. Effet du pH	37
4.2. Résultats des températures	39
Conclusion	41
Références bibliographique	42
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

rpm: Rotation par minute.

PDA: Potato Dextrose Agar.

TCA: *TriChloroacetic Acid*.

pH: Potentiel d'Hydrogène.

U: Unité.

I.U.B: International Union Biochemistry.

Tris-HCl: Tris (hydroxymethyl) aminomethanehydrochloride.

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Liste des figures

Figure 01 : Distribution des ventes des enzymes.....	03
Figure 02 : Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont Hydrolysées par les protéases	03
Figure 03 : Mécanisme d'action des protéases	08
Figure 04 : Principales classes des moisissures	11
Figure 05 : Morphologie de <i>Beauveria bassiana</i> . A -Hyphes et mycélium de <i>Beauveria Bassiana</i> Spores de <i>B. bassiana</i> : Unités infectieuses.....	14
Figure 06: Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogènes	17
Figure 07 : Culture de <i>Cladosporium cladosporoides</i>	19
Figure 08 : Espèces de <i>Cladosporium cladosporoides</i>	20
Figure 09: <i>Ocneridia volxemii</i>	21
Figure 10: a. La région de Sebkhâ Aïn M'lila, Oum el Bouaghi , b. <i>Ocneridia volxemii</i> ,c.La farine des criquetés (<i>Ocneridia volxemii</i>).....	27
Figure 11 : Le pourcentage de mortalité des pucerons larve par les souches cultivées.....	35
Figure 12: Mise en évidence de l'activité protéolytique sur le lait gélosé à des différentes Concentrations.....	26
Figure 13: Réalisation des fermentations dans des erlenmeyers de 250 ml.....	37
Figure 14 : Résultats de l'activité protéolytique pour les souches cultivées sous les trois températures ; a : T=15°C, b : T=30°C , c :T=45°C.....	14

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification des protéases.....	07
Tableau 02 : Classification de <i>Beauveria bassiana</i>	14
Tableau 03 : Classification de <i>Cladosporium cladosporoides</i>	18
Tableau 04 : Classification d' <i>Ocneridia volxemii</i>	22
Tableau 05 : Etude macroscopique des souches fongiques.....	31
Tableau 06 : Etude microscopique des souches fongiques.....	33
Tableau 07 : Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 28°C.....	38

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

Les champignons pathogènes d'insectes occupent une place particulière en pathologie des invertébrés et dans la recherche d'organismes capables de réguler les pullulations d'invertébrés nuisibles, en santé végétale, humaine ou animale. Néanmoins, ces champignons bien qu'efficaces ont souvent une activité très dépendante des conditions environnementales notamment climatiques (Ferron *et al.*, 1991 ; Lacey *et al.*, 1996).

Les champignons entomopathogènes sont des agents de lutte très intéressants du fait de leur aptitude à infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact pendant tous les stades, œufs, larve, adulte sensibles ainsi que les succeurs-piqueurs. Ils peuvent être producteurs de toxines et des enzymes protéolytiques.

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines. Par la diversité de leurs applications, elles représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles. De plus, les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les microorganismes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pourcent des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes parmi lesquels, des souches fongiques (García-Gómez *et al.*, 2009). Celles-ci possèdent plusieurs avantages comme leur qualité GRAS (*Generally Regarded As Safe*) et leur aptitude à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires.

L'objectif de notre travail est la production des protéases acides par des champignons entomopathogènes à base de farine de criquets comme substrat de fermentation. Pour atteindre cet objectif, notre travail porte sur les points suivants :

- Réactivation des souches fongiques sur milieu PDA.
- La mise en évidence de l'activité protéolytique des isolats fongiques sur milieu gélosé à base de lait
- Test de pathogénicité des souches fongiques contre les pucerons *Aphis fabae*
- Production et extraction des protéases par fermentation
- Effet de pH et de la température sur l'activité protéolytique.

1. Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kda) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Bergmeyer et *al.*, 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005).

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (Patel et *al.*, 2005) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (Leisola et *al.*, 2001).

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (Sandhya et *al.*, 2005).

Les enzymes sont des polymères biologiques qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10⁶ par rapport à la réaction en leur absence (Granner, 2008).

Selon l'I.U.B., les enzymes sont répertoriées en six classes.

- Classe 1 : Oxydoréductases.
- Classe 2 : Transférases.
- Classe 3 : Hydrolases.
- Classe 4 : Lyases.
- Classe 5 : Isomérases.
- Classe 6 : Ligases.

2. Les enzymes protéolytiques

Les enzymes sont des catalyseurs qui augmentent fortement les vitesses des réactions chimiques ; celles-ci sont multipliées par un facteur de 10¹² à 10²⁰ comparativement à une réaction non catalysée. Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. Les enzymes se caractérisent par une spécificité d'action permettant aux technologues d'agir sélectivement sur un constituant d'un produit alimentaire sans en modifier les autres (Cerning et *al.*, 1984). Les protéases possèdent un grand intérêt pour les différentes industries ; actuellement, elles constituent le groupe le plus important d'enzymes industrielles (Figure 01). En effet, elles représentent 60% du total des ventes des enzymes (García-Gómez et *al.*, 2009), elles sont utilisées essentiellement dans les détergents (Gupta et *al.*, 2002) et les industries alimentaires (Sullivan et Calkins, 2010).

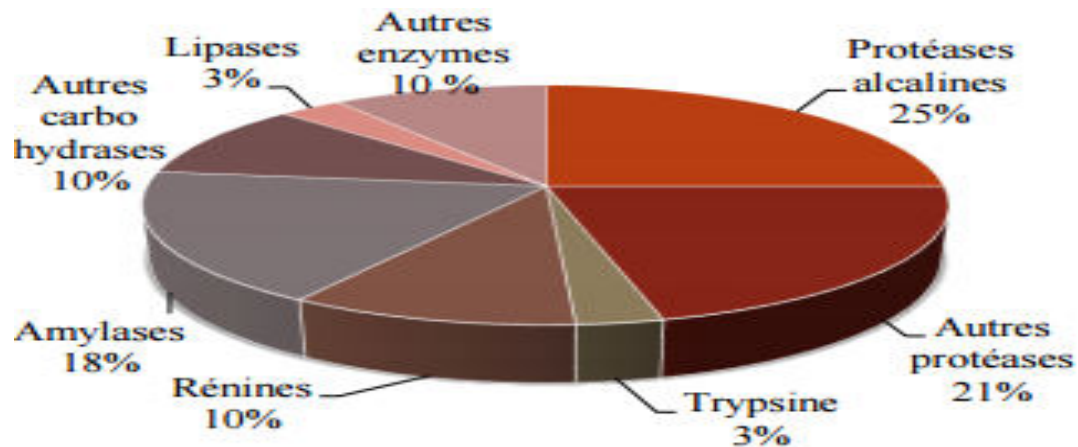


Figure 01 : Distribution des ventes des enzymes (Rao *et al.*, 1998).

3. Définition de protéase

Les protéases sont un groupe d'enzymes très complexe. Elles appartiennent à la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x), formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (Kumar *et al.*, 2008). Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique (Figure 02). Elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Frazier, 1967; Scriban, 1999). La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysât de protéines ou d'un mélange d'acides aminés.

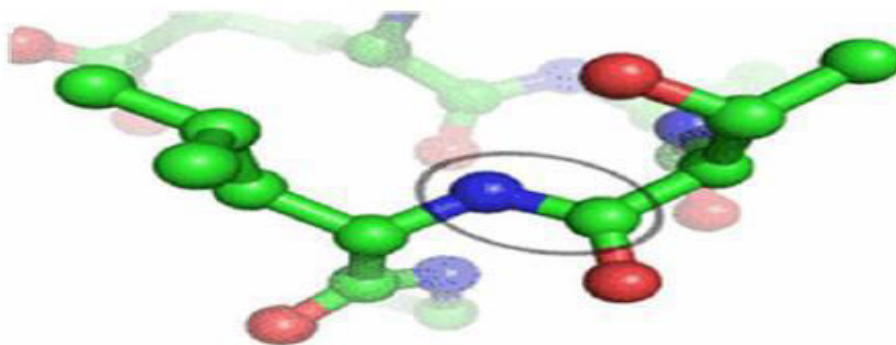


Figure 02: Les liaisons peptidiques (entre un azote en bleu et un carbone en vert) sont hydrolysées par les protéases (<http://www.Futura-sciences.com>).

Elles représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicale et dans les domaines de recherche (Coral *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005). Elles ont été utilisées pour la première fois dans l'industrie alimentaire comme des agents de coagulation pour la production de fromage (Sandhya *et al.*, 2004). Les enzymes protéolytiques sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vu leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (Gupta *et al.*, 2002; Sandhya *et al.*, 2005). Cependant, les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques :

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

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

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

3.1. Source de protéase:

La vaste distribution des protéases chez les plantes, les animaux, et les microorganismes démontre que ces enzymes sont nécessaires à la survie des organismes ; les protéases jouent des rôles physiologiques importants dans les différents processus biologiques (Rao *et al.*, 1998) .

3.2.1. Protéases d'origine animale

Les protéases d'origine animale sont utilisées dans le domaine alimentaire comme la présure ou dans le domaine médical tel que la trypsine et la chymotrypsine. Ces dernières sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs (Rao *et al.*, 1998).

Seules les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants présentent un intérêt industriel ;

La présure préparée à partir du quatrième estomac des veaux est la plus répandue et

La plus ancienne ainsi que les pepsines bovines et porcines. L'activité non spécifique des

Enzymes pancréatiques, trypsine et chymotrypsine, les rendent moins importantes que les enzymes gastriques (Mckenzie, 1971 ; Alais, 1975 ; Scriban, 1999). Des études récentes Permettent aussi l'identification des protéases chez les helminthes : *Schistosomasp* ; *Fasciola Sp*; *Taeniasp* et *Haemonchussp*, où elles apparaissent comme cibles potentielles majeures en Thérapie et vaccination antiparasitaire (Trap et Boireau, 2000).

3.2.2. Protéases d'origine microbienne

Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries.

a. Protéases des moisissures

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par Plusieurs genres fongiques tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Ce groupe d'enzymes dispose de Possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement elles sont de plus en Plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les Détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Frazier,1967 ; Ul-haq et al., 2003).

b. Protéases des levures

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

c. Protéases des bactéries

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

3.2.3. Protéases d'origine végétale

Les protéases sont présentes chez toutes les espèces vivantes. Les végétaux ont, avant Les microorganismes, été l'objet de recherche en vue d'isoler des enzymes protéolytiques, C'est le cas de la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*ananas comosus*) (Rao et al, 1998), la papaine en provenance du latex de fruit la papaye (*caricapapaya*). (Scriban, 1993 ; Pelmont, 1995 ; Pao et al., 1998) et la facine (*ficus glabrata*) (Scriban., 1993).

3.2. Classification de protéase

Les peptidases peuvent être classées selon la nature chimique du site actif, le type de réaction catalysée et la structure et l'homologie moléculaire (Polaina et maccabe,2007).

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

3.2.1. Selon longueur de la chaîne polypeptidique

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il existe deux Catégories; les protéases, qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques et Les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres (frazier, 1967 ; colwell et grigorova, 1989).

3.2.2. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les Endopeptidases et les exopeptidases (Scriban, 1999 ; Moodie, 2001). Ces dernières sont elles –mêmes subdivisées en deux sous-classes les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Les Aminopeptidases commencent leur action par l'extrémité NH₂ libre du polypeptide et leur Activité dépend souvent de la présence d'ion métallique ; les carboxypeptidases commencent Leur attaque par l'extrémité COOH libre du polypeptide (Scriban, 1999 ; Trap et Boireau, 2000). L'activation de ces différentes enzymes conduit à la libération de Di et Tripeptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés (Scriban, 1999).

3.2.3. Selon le pH d'activité

Selon ce paramètre, les enzymes protéolytiques de différentes origines sont classées en trois groupes : des protéases acides ; neutres et alcalines (Hartely, 1960 ; Martinelli et Kinghorn, 1994). Dans ce contexte, les moisissures représentent un groupe de Microorganismes physiologiquement différents des autres groupes, elles possèdent une Gamme d'enzymes actives à des pH différents, c'est le cas des protéases produites par *Aspergillus oryzae*,

Penicillium camembertii *Penicillium roqueforti*. Certaines protéases Fongiques ont des optima de pH très acides de 2.5 à 5.0 (Botton et al., 1999 ; Auberger et al., 1985 Mechakra et al., 1999).

3.2.4. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif

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

Tableau 01: Classification des protéases (Rao et al., 1998) .

Type de protéase	Classes et sous-classes
Exopeptidases	Aminopeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Peptidyle peptidases • Dipeptidyle peptidases • Tripeptidyle peptidases Carboxypeptidases <ul style="list-style-type: none"> • Sérine carboxypeptidases • Metallocoarboxypeptidases • Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métalloprotéases

3.3. Mode d'action

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site Actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est Résumé dans trois étapes :

Dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce-la Polarité du carbonyle, qui facilite son attaque nucléophile conduisant à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et L'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par unProton cédé d'un résidu enzymatique.

Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH d'une Molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de L'enzyme se trouve régénérer par un proton de l'H₂O (Pelmont, 1995). (Figure 03).

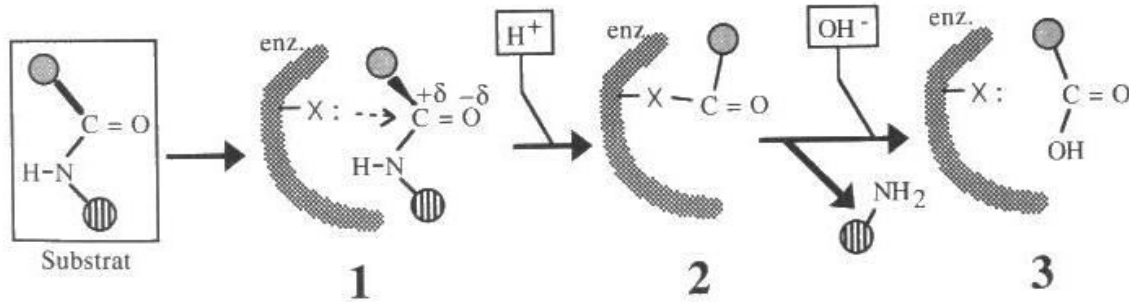


Figure 03 : Mécanisme d'action des protéases (Pelmont, 1995).

4. Applications des protéases

4.1. Alimentaire

Les protéases alcalines, neutres et acides d'*Aspergillus* jouent aujourd'hui un rôle très important dans l'hydrolyse des protéines en peptides simples et en acides aminés, en particulier en acide glutamique qui caractérise la saveur des fermentations orientales (Loffler, 1986). Les protéines industrielles jouent un rôle essentiel entre autre la maturation du fromage par le développement des propriétés organoleptiques (Loffler, 1986). L'addition des protéases exogènes permet de raccourcir le temps d'affinage des fromages (Cerning et al. 1984).

Les protéines fongiques sont quelque fois utilisées lorsque le gluten de la farine manque d'élasticité et s'oppose au développement du pain au cours de la fermentation panair.

Les protéases fongiques ont une action beaucoup plus douce que les protéases bactériennes. En effet, ces dernières conduisent à une attaque trop importante du réseau gluténique, celui-ci ne serait plus alors en mesure de retenir le gaz carbonique produit par la fermentation panair (Durcrou, 1982).

4.2. Médicale et pharmaceutique

Les protéases sont impliquées dans de nombreuses fonctions des cellules eucaryotes.

De plus, elles jouent un rôle critique dans la virulence des agents pathogènes (Colwell et Grigorova, 1989), et plus particulièrement des parasites. L'ensemble des rôles clés

protéolytiques dans la virulence parasitaires en font des cibles potentielles en thérapie et vaccination antiparasitaire. Les protéases trouvent des utilisations illimitées dans les laboratoires de recherche. Elles englobent l'hydrolyse des protéines pour isoler le matériel cellulaire, les analyses peptidiques et les peptides synthétisés (Germino et Bastia, 1984 ; Neuet al., 1984).

4.3. Détergents

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à favoriser l'élimination des taches protéiques vue leur avantage unique qui ne peut autrement

être obtenue avec la technologie des détergents classiques (Gupta *et al.*,2002). Maintenant, elles sont ajoutées comme ingrédients clés, ce qui représente environ 25% des ventes totales dans le monde entier des enzymes.

Parmi les principales conditions préalables pour l'utilisation des protéases dans la production des détergents sont : l'action sur une large gamme des substrats, l'activité et la stabilité à des pH et à des températures élevés et en présence des agents oxydants additionnés.

Le premier détergent contenant l'enzyme bactérienne a été introduit sur le marché en 1956 sous le nom commercial Bio-40 (Mukherjee *et al.*,2008). Aujourd'hui, toutes les protéases des détergents actuellement commercialisés sont des protéases sérines (subtilisines et/ou des protéases alcalines) produites par *Bacillus sp.* (Chellappan *et al.*,2006; Guo et Ma, 2008). Récemment, les protéases produites par un petit nombre de sources fongiques telles que *Penicillium sp*, *Aspergillus parasiticus*, *Condiobolus coronatus* et *Engyodontium album* ont été étudiées pour une telle application (Rashbehari *et al.*,2003; Sandro *et al.* , 2003; Chellappan *et al.*, 2006).

4.4. Industrie photographique

Les protéases alcalines et neutres jouent un rôle crucial dans le bio-traitement des films photographiques pour la récupération d'argent (Sumantha *et al.*,2006). Ce type de films contient entre 1,5 et 2% d'argent dans leur couche de gélatine, qui peut être utilisé comme une bonne source d'argent pour des fins variés. Traditionnellement, cet argent est récupéré par la combustion, ce qui provoque une pollution environnementale indésirable. En plus, la base du film en polyester ne peut pas être recouverte par cette méthode. De fait que l'argent est lié à la gélatine, il est possible de procéder à une extraction de la couche protéique par des traitements protéolytiques. L'hydrolyse enzymatique de la gélatine permet non seulement l'extraction d'argent, mais aussi le recyclage de la base du film (Gupta *et al.*,2002).

4.5. Autres applications

Les protéases fongiques sont utilisées également en tannerie pour le confitage des Peaux. Cette opération consiste à hydrolyser spécifiquement l'élastine, fibre protéique présente dans le derme dont l'hydrolyse conduit à des peaux plus souples ayant du prêtant (Ducroo,1982).

Les protéases peuvent servir en alimentation animale soit pour améliorer directement la digestibilité des aliments, soit pour favoriser les fermentations anaérobies qui contribuent à augmenter la valeur alimentaire des ensilages (Durand et Monson,1982).

1. Généralités sur les moisissures

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin *et al.* 2000). Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993). Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux, le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).

2. Habitat

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

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

3. Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois, 1989), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (Figure 04).

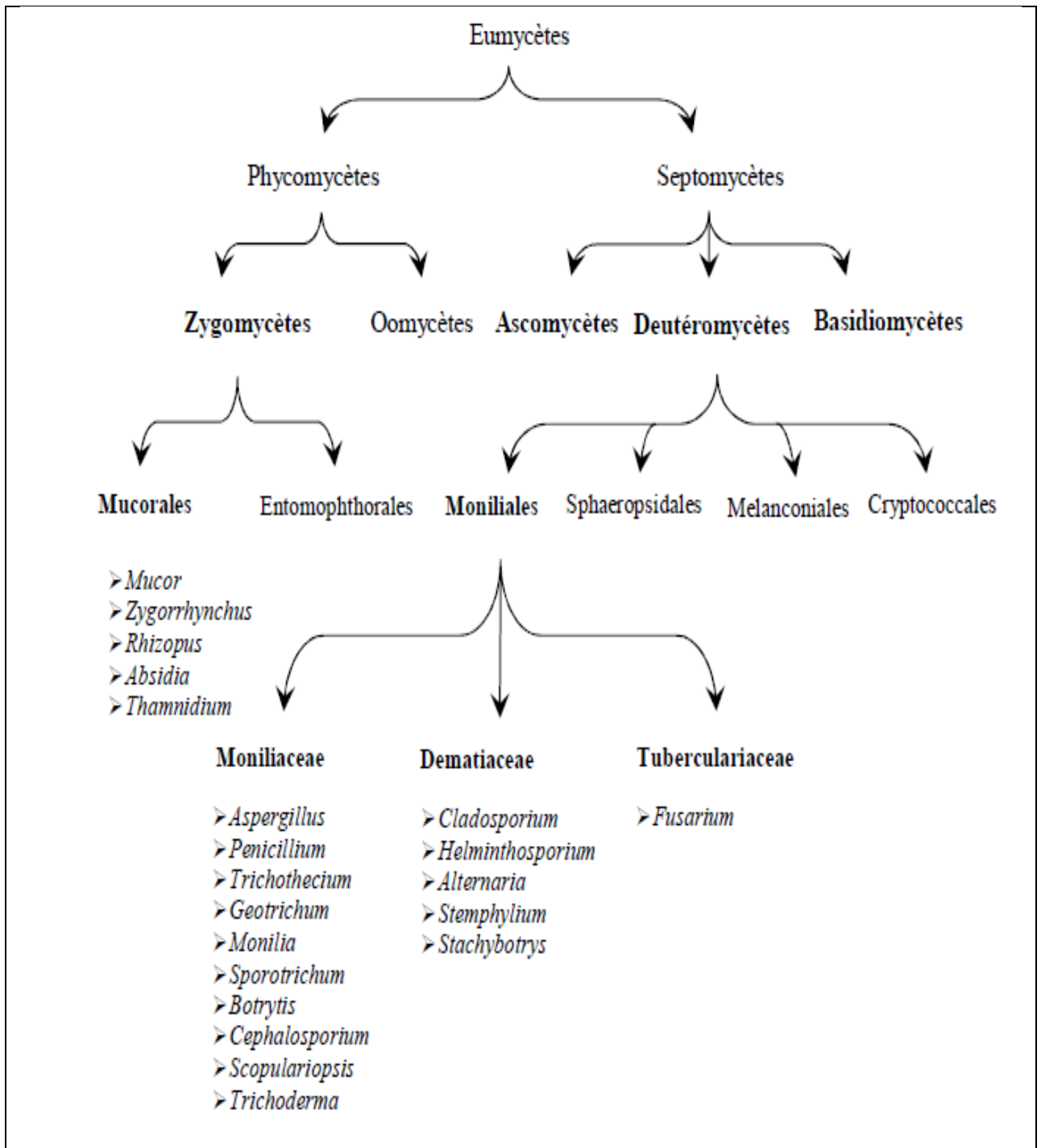


Figure 04: Principales classes des moisissures (Frazier, 1967).

4. Mode de reproduction

Les moisissures produisent des organes de reproduction que l'on appelle de façon générale spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les espèces de formes imparfaites, mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent au côté des formes de reproduction sexuée et leur type varie selon les moisissures

- Les thallospores sont formées aux dépens du thalle par transformation d'éléments préexistants.
- Les sporangiospores sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.
- Les conidiospores sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore (metulae, phialide, etc....) (Guiraud, 1998).

5. Conditions de croissance des moisissures

Ces microorganismes sont chimio-organotrophes, se caractérisant par des besoins nutritionnels élémentaires (Madigan et Martinko, 2007). Leur tolérance à l'égard du pH est souvent étendue mais avec généralement une préférence pour les pH légèrement acides (Botton *et al.*, 1990); beaucoup d'espèces supportent des pH très acides (Delarras, 2007). Elles se développent dans une gamme de température allant de 0 à 40°C ou plus; la plupart se développe bien aux températures comprises entre 20 et 25°C. La température optimale pour la croissance de *Metarhiziumanisopliae* est de 35°C, mais la production optimale de protéases se situe à 30°C (Botton *et al.*, 1990). La plupart des moisissures sont aérobies strictes et se développent bien en l'absence de lumière. Elles tolèrent des teneurs en eaux très faibles. De surcroît, elles ont un métabolisme très actif, lié à leur production enzymatique variée et intense (Delarras, 2007).

De nombreuses moisissures sont utilisées par l'homme depuis fort longtemps dans la fabrication de certains produits alimentaires. Certaines synthèses sont effectuées à l'échelle industrielle et sont de premières importances telles celles d'enzymes et d'antibiotiques (Scriban, 1993).

6. Les champignons entomopathogènes

Les champignons entomopathogènes sont des eucaryotes avec des noyaux, des organites bien définis et une paroi cellulaire chitineuse. Ils se présentent parfois sous forme de cellules individuelles, mais le plus souvent sous forme de filaments (hyphes) constituant le mycélium et dans lesquels sont rangées les cellules. Leur reproduction se fait par formation de spores sexuées. Ou a sexuées. la sous division des deutéromycètes regroupe les ascomycètes et les basidiomycètes qui sont des champignons filamenteux, à hyphe septés, se reproduisant de façon végétative dont on ne connaît pas leur forme de reproduction sexuée (champignons imparfait) *(Humber, 1997 ; Tzeanet al.1997).

Chez les champignons hyphomycètes, environ 500 espèces (Starneset al.1993) parmi lesquels, les genres *Beauvaria*, *Metarhizium*, *Tolypocladium*, *Verticillium* et *Paecilomyces* sont les plus utilisés en lutte biologique (Kamp et Bidochka, 2002). chacun de ces genres est défini par ces caractéristiques de conidiogènèse. la couleur des spores est une première indication sur l'identité du champignons. sur milieu gélosé, les genres *Metarhizium*, *Nomuraea* et *Pinicillium* produise des spores vertes. Les spores d'*Aspergillus* sont normalement jaunes brunâtre, celles de *Beauveria* sont blanches. la détermination de l'espèce se fait en examinant la forme des spores et Conidiophores (Campos et al.,2005).

7. *Beauveria bassiana*

Le champignon *B. bassiana* est une espèce fréquemment retrouvée dans les sols du monde entier. Ce champignon forme des hyphes transparents et septaux de 3,5 µm de diamètre (figure 05 A). Cette espèce produit des colonies cotonneuses de couleur blanchâtre à jaunâtre. Le genre est caractérisé par un conidiophore à base renflée et à extrémité terminale en zigzag formant de façon sympodiale de petites spores unicellulaires (figure 05 B). Le conidiophore continue de croître après avoir donné naissance aux spores et chaque spore laisse une cicatrice en relief (aspect denticulé). Les bouquets de conidiospores donnent un aspect en "fausse tête". On distingue deux types de spores selon la présence ou l'absence d'oxygène: les conidiospores formées en présence d'air et les blastospores en condition d'anaérobie. Les conidiospores prennent une forme sphérique ou ovale tandis que les blastospores sont uniquement ovales. Les deux types de spores peuvent avoir le même effet pathogène sur les insectes infectés (Weiser, 1972 ;Lipa, 1975).

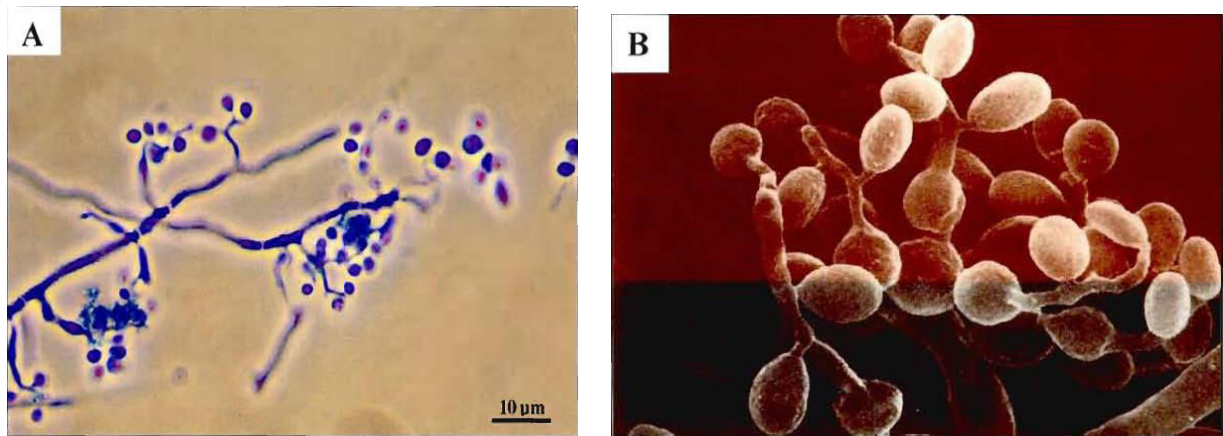


Figure 05 : Morphologie de *Beuveria bassiana*. A -Hyphes et mycélium de *Beuveria bassiana* (Par David Ellis, source: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/..](http://www.mycology.adelaide.edu.au/) A-Beauveria l.gif); B -Spores de *B. bassiana*: Unités infectieuses (Par John Bisselt Source : http://www.vertigo.uqam.ca/.. /beauveria_bassiana_l.jpg.).

7.1. Classification

D'après Taylor (1995) *Beuveria bassiana* est classée comme suit (Tableau 02).

Tableau 02 : Classification de *Beuveria bassiana*.(Taylor,1995).

Règne	Fungi.
Phylum	Ascomycota.
Classe	Sordariomycetes.
Ordre	Hypocreales.
Famille	Clavicipitaceae.
Genre	<i>Beuveria</i> .
Espèce	<i>B.bassiana</i> (Bals.-Criv.) (Vuil. ,1912).

7.2. Avantages de l'utilisation de *B. bassiana*

L'exploitation directe d'organismes vivants afin d'éliminer les ravageurs nécessite une compréhension des mécanismes d'interaction entre l'agent entomopathogène et l'insecte nuisible visé. En effet, la pathogénicité de l'inoculum sporale et la spécificité de l'hôte sont deux paramètres importants dans le choix de l'isolat fongique. Le microchampignon *B. bassiana* s'avère être un agent de lutte intéressant puisqu'il possède l'avantage, par rapport aux autres microorganismes pathogènes, d'infecter l'hôte sans être ingéré. Ce qui peut rendre les différents stades de développement de l'hôte sensibles à ce biopesticide. Cette caractéristique fait aussi en sorte que ce mycète peut être efficace contre les insectes piqueurs-suceurs qui sont relativement peu exposés à l'infection par des spores déposées sur le feuillage des plantes (Wraight et Roberts, 1987). Les espèces de champignon du genre *Beauveria* ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et font donc l'objet d'études de plus en plus poussées. En outre, la persistance des conidies dans le sol peut assurer un contrôle à long terme en provoquant la mycose sur les générations suivantes de l'hôte (Gaugler et Lashomb, 1989). Au niveau de la biosécurité, plusieurs études ont prouvé que ce mycète n'est pas dangereux pour les vertébrés (Faria et Wraight, 2001).

Le champignon *B. bassiana*, comme la plupart des microchampignons entomopathogènes, peut être produit en masse et peut être appliqué avec les méthodes conventionnelles (Faria et Wraight, 2001).

7.3. Mode d'action

Le champignon *B. bassiana* infecte l'insecte par contact et n'a pas besoin d'être ingéré par son hôte pour causer l'infection. En général, le processus d'infection de *B. bassiana* est divisé en quatre phases distinctes soit les phases d'adhésion, de germination, de différenciation et de pénétration.

La phase d'adhésion constitue la première étape du processus d'infection. Elle se déclenche par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des conidies avec le tégument de l'insecte. Ce phénomène peut être déclenché par des polysaccharides fongiques extracellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires (Boucias et Pendland, 1991).

La phase de germination dépend des conditions environnementales et également de la physiologie de l'hôte (composition biochimique de la cuticule) qui peut favoriser ou inhiber la

germination (Ferron, *et al.*, 1991). Il a été démontré que la germination des spores était affectée par des lipides épicuticulaires et les acides gras (Boucias et Pendland, 1991).

La phase de différenciation est une phase importante dans le processus d'infection. Au cours de cette phase, la spore germée produit une structure appressoriale, qui sert de point d'ancrage et de ramollissement de la cuticule ce qui a pour effet de favoriser la pénétration de la spore. La production des appressorias est dépendante de la valeur nutritive de la cuticule de l'hôte (Magalhaes *et al.*, 1989).

Finalement, la phase de pénétration consiste à la pénétration du microchampignon dans l'hôte à travers les orifices naturels, la cuticule ou par ingestion. En général, la cuticule de l'insecte est une barrière structurellement et chimiquement complexe pour la pénétration du champignon. L'épi cuticule contient une protéine stable au phénol et est couverte d'une couche cireuse contenant des acides gras, des lipides et des stérols (Andersen, 1979). La pro cuticule contient de nombreuses fibrilles de chitine enfouies dans une matrice protéinique. Celle-ci peut représenter jusqu'à 70% du poids sec de la cuticule. Il n'est pas surprenant, vu la complexité de la cuticule, que les champignons entomopathogènes aient besoin d'une série d'enzymes hydrolytiques pour assurer la pénétration cuticulaire et fournir la nourriture nécessaire à la croissance. On connaît surtout la protéase. Cette enzyme a une forte activité sur la cuticule des insectes et est la protéine prédominante produite pendant la formation de l'appressorium (Figure 06) (St Léger *et al.*, 1993).

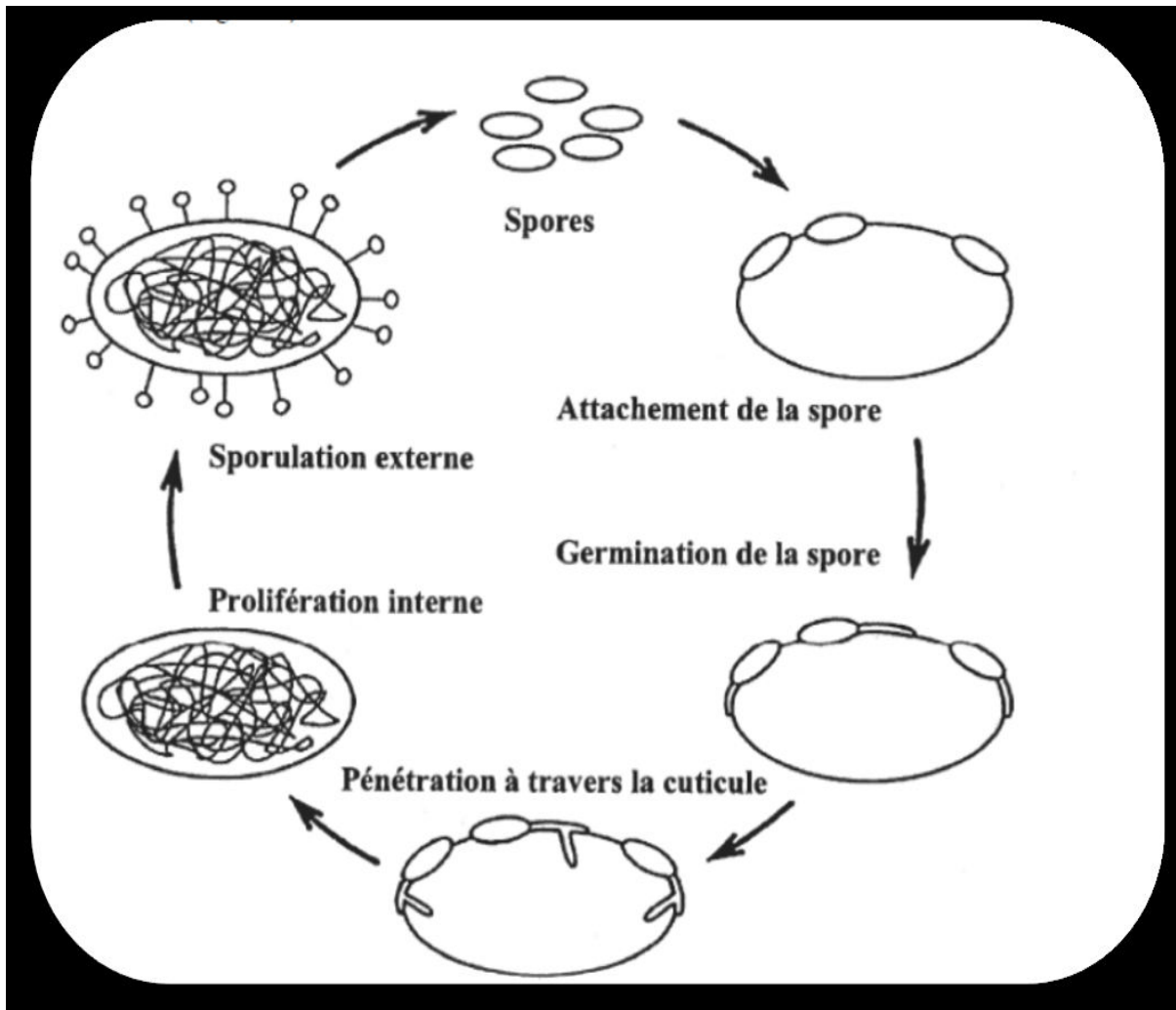


Figure 06: Schéma du cycle biologique des champignons entomopathogènes (Ferronet *al.*, 1993).

8. *Cladosporium cladosporoides*

Le genre *Cladosporium* est l'un des mycètes environnementaux les plus communs trouvés dans le monde entier. Il est considéré comme une moisissure xérophile, xérotolérante, mais également psychrophile, comme le démontre sa capacité à se développer à des températures permettant la congélation; cette moisissure peut se développer à un rythme plus lent à des températures situées entre -10 et -3 °C. Le *C. herbarum* a également la capacité de se développer sur des substrats congelés; il est également xérophile et xérotolérant.(Ellis,1971 ;1976) ;(Domsch *et al*, 1980) ;McGinnis,(1980) ;Sandoval-Denis *et al.*, 2015).

8.1. Taxonomie

D'après (Ellis,1971 ;1976) ;(Domsch *et al*, 1980) *Cladosporium cladosporoides* est classée comme suit (Tableau 03).

Tableau 03 : Classification de *Cladosporium cladosporoides*.(Ellis 1971 ;1976 ;Domsch *et al.*, 1980)

Règne	Fungi
Phylum	Ascomycota
Classe	Dothideomycetes
Ordre	Capnodiales
Famille	Davidiellaceae
Genre	<i>Cladosporium</i>
Espèce	<i>cladosporioides</i>

8.2. Morphologie macroscopique

Le taux de croissance dépend de l'espèce particulière de *Cladosporium* et peut varier de lent à modérément rapide. L'isolat discuté dans ce post a augmenté de taille plutôt lentement, bien qu'il ait mûri pour produire des quantités copieuses de conidies plutôt rapidement (~ 7 jours). La colonie était veloutée à la texture de suède. D'autres sources décrivent la texture de *Cladosporium* allant de poudreuse à laineuse. La colonie peut être légèrement entassée et développer de doux plis à mesure qu'elle vieillit. La couleur varie du vert grisâtre à l'olivacé-vert au brun-noir. Le revers est de couleur brun foncé à noir (Figure 07). (Ellis, 1971 ; 1976 ; Domsch *et al.*, (1980) ; McGinnis (1980) ; Sandoval-Denis *et al.*, (2015).

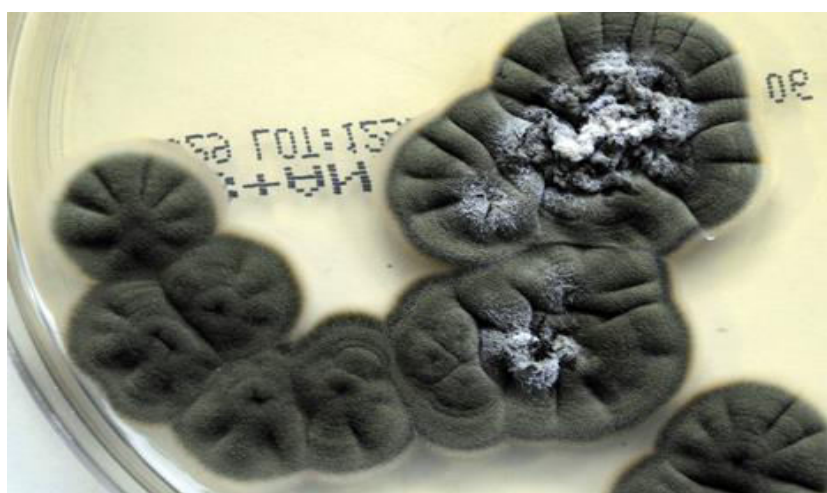


Figure 07 : Culture de *Cladosporium cladosporoides*. (Ellis, 1971 ; 1976) ; (Domsch *et al.*, 1980) ; McGinnis, (1980) ; Sandoval-Denis *et al.*, 2015).

8.3. Morphologie microscopique

Cladosporium produit des hyphes cloisonnés érigés et foncés. Les conidiophores sont également pigmentés de façon sombre, peuvent être cloisonnés et présenter une ramification arborescente. Des chaînes fragiles de blastoconidies dématées sont produites et présentent une hila ou une cicatrice foncée au point de fixation au conidiophore ou à d'autres conidies. Les conidies 1-4 cellules sont rondes à ovales (3 - 6 μm X 4 - 12 μm) et peuvent être à paroi lisse pour verrucose dans la texture de la surface. Les cellules sur les conidiophores qui portent les chaînes de conidies sont parfois cloisonnées et apparaissent sous la forme d'un «bouclier». Ces cellules sont également des conidies mais sont appelées cellules de bouclier. Les chaînes de conidies se désarticulent facilement (se brisent) et sont difficiles (Figure 08). Ellis (1971, 1976), Domsch *et al.* (1980), McGinnis (1980), Sandoval-Denis *et al.*, (2015).



Figure08 : Espèces de *Cladosporium cladosporoides*.(Ellis,(1971 ;1976) ;Domsch *et al.*, (1980) ; McGinnis,(1980),Sandoval-Denis *et al.*, (2015)).

1. Description de l'espèce

Ocneridia volxemii est une espèce qui appartient à la famille Pamphagidae. Elle est de

De couleur brune ou verdâtre tachetée de blanchâtre. C'est antennes sont filiformes se composent 16 articles. Elle a un pronotum un peu rugueux. Son abdomen est presque lisse. Ses fémurs postérieurs sont larges, les tibias postérieurs ont une face interne bleu foncé. Les élytres sont entièrement cachés sous le pronotum chez les mâles, ou nuls chez les femelles (Figure 09). (Benkenana ,2013).



Figure 09:*Ocneridia volxemii* (Bolivar, 1878).

2. Classification d'*Ocneridia volxemii*

La classification d'*Ocneridia volxemii* se représente dans le (Tableau 04) :

Tableau 04:Classification d'*Ocneridia volxemii*(Bolívar, 1878).

Domaine	<i>eucaryotes</i>
Royaume	<i>Animalia</i>
Classe	<i>Insecta</i>
Ordre	<i>Orthoptera</i>
Famille	<i>Pamphagidae</i>
Genre	<i>Ocneridia</i>
Espèce	<i>Ocneridia volxemii</i>

3. Régime alimentaire

Le régime alimentaire de cette espèce est basé sur l'analyse microscopique des fèces des mantes femelles. Cette analyse est basée sur la structure et la taille des cellules et la présence des cristaux.

Les résultats du régime alimentaire montrent qu'*Ocneridia volxemii* consomme sept espèces végétales par rapport à la végétation qui existe dans son biotope. L'espèce végétale *Hordium.sp* qui appartient à la famille des poaceae est la plus consommée avec une fréquence d'occurrence de plus de 50%. On constate que cette espèce est omnivore mais surtout graminivore. (Benkenana, 2013).

Notre partie pratique de ce travail a été réalisée pendant le moi d'Avril et Juin au niveau du laboratoire 14 de Microbiologie et aussi au laboratoire de Microbiologie (RDC), au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine.

Les étapes sur trois (03) étapes successives, à savoir :

- **Première étape** : Réactivation des souches fongiques *Beauveria bassiana* et *Cladosporium cladosporioides* et *Verticilium alfalfaes* sur milieu PDA.
- **Deuxième étape** : Test d'entomopathogénicité des *Beauveria bassiana* et *Cladosporium cladosporioides* et *Verticilium alfalfae* contre les pucerons *Aphis fabae*.
- **Troisième étape** : Etude de l'effet de la température et le pH sur la production de protéase acide à base de la farine des criquets d'*Ocneridia volxemii*.

1. Origine des souches fongiques

Dans ce travail, nous avons utilisés trois souches de moisissures : *Beauveria bassiana* et *Cladosporium cladosporioides* et *Verticilium alfalfae*. Les souches ont été isolées au niveau du laboratoire de Microbiologie (RDC). Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri Constantine à partir des échantillons de sol collecté de l'institut National de Protection des Végétaux ; Constantine ; (INPV). Les souches ont été identifiées au niveau de laboratoire de Microbiologie (RDC).

2. Réactivation des souches fongiques

La réactivation de ces moisissures est effectuée par ensemencement par touche centrale sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (Annexe 01). L'ensemencement de ce milieu gélosé, coulés en boîte de Pétri, se fait par dépôt de spores au centre de la gélose à l'aide d'un anse de platine. Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 6 jours

3. La confirmation de l'identification des souches

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

3.1. Identification macroscopique

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

3.2. Identification microscopique

L'identification microscopique des moisissures repose sur plusieurs méthodes, la méthode utilisée est celle de coloration par le lactophénol bleu de coton (Chabasse *et al.*, 2002).

Coloration par le lactophénol bleu coton : un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant, recouvert d'une lamelle couvre-objet servant à écraser la préparation (Chabasse *et al.*, 2002).

L'observation microscopique est effectuée au microscope optique aux grossissements (x40). Les caractéristiques prises en considération dans cette technique sont la nature du filament, la fructification, la morphologie des spores asexuées et la présence de structures particulières comme les sclérotés.

4. Test d'entomopathogénicité

4.1. Préparation des suspensions sporales

La suspension de spores est préparée par addition de 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,1% de Tween 80 à la souche cultivée sept jours sur PDA en boîte de Pétri. Les spores sont déboîtées superficiellement en utilisant une anse de platine sous des conditions aseptiques (Sandhya *et al.*, 2005b).

4.2. Dénombrement des spores

A 1 ml de suspension de spores préalablement agitée, on ajoute 9 ml d'eau tweenée ; le nombre de spores est déterminé par la technique de dénombrement en utilisant la cellule de Thomas (Guiraud, 1998). L'examen s'effectue au microscope au grossissement (x40).

4.3. Essai biologique

Afin de déterminer les propriétés insecticides des différents isolats, nous avons adopté la méthode d'inoculation directe par trempage (Butt et Goettel, 2000) technique recommandée par la FAO comme méthode standard de la détection et de mesure de la résistance des pucerons aux insecticides (FAO, 1979; Stribley *et al.*, 1983; Furk et Roberts, 1985) et particulièrement pour mesurer la toxicité des champignons par contact (Butt et Goettel, 2000). Pour chaque isolat et pour *Aphis fabae*, les pucerons sont trempés pendant 10 secondes dans la suspension du champignon préparée à une concentration de l'ordre de 10^7 spores/ml (Gannasi *et al.*, 2006). Par la suite, sur des sections rectangulaires de feuilles de fève, désinfectées au préalable avec l'eau de Javel, puis rincées plusieurs fois à l'eau distillée, les pucerons traités sont répartis, à raison de 10 individus par boîte de Pétri avec six répétitions par traitement. Quant aux témoins, ils ont été trempés dans de l'eau distillée stérile contenant

0,05% de Tween 80 avant d'être répartis de la même manière. Ainsi, l'évaluation du pouvoir pathogène est réalisée sur la base de 60 pucerons larve (L5) pour chaque espèce fongique.

Les insectes traités ont été maintenus à une température de 25°C et l'humidité 60%.

La mortalité des individus traités est contrôlée en 1^{er}, 3^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} jours à partir du jour du traitement jusqu'à la mort de tous les individus notant que les sections foliaires sont remplacées chaque deux jours par de nouvelles désinfectées et rincées. À chaque contrôle, les insectes morts sont éliminés avant la sporulation du pathogène pour éviter la transmission horizontale de l'infection dans une même boîte.

4.4. Analyse statistique

Les propriétés insecticides des onze isolats ont été estimées par le pourcentage de mortalité. Le pourcentage de mortalité a calculé et corrigé par la formule d'Abbott (1925).

$$\text{La mortalité \%} = \frac{\text{(mortalité au contrôle - mortalité au traitement)} \times 100}{\text{mortalité au contrôle}}$$

5. La mise en évidence de l'activité protéolytique

Les souches revivifiées ont étéensemencées sur milieu de culture sélectif ; lait gélosé à 20%(Annexe 02) par une touche centrale (de quelques spores), puis incubées à 28°C pendant 3 jours (Larsen *et al.*, 1998) . Le diamètre des zones hydrolyse de chaque colonie des trois souches testées et la comparaison entre elles, nous a permis de sélectionner la plus protéolytique.

Ce test d'activité protéolytique est basé sur la diffusion des protéases secrétées par ces souches fongiques dans le milieu de culture, et la dégradation de la caséine du lait autour de la colonie. Ce fait s'explique par l'observation directe d'un halo translucide (anneau de protéolyse) autour de la colonie fongique avec un diamètre proportionnel à la quantité des protéases libérées. L'activité est significative si le diamètre de l'halo est supérieur ou égal à 3 Cm. Chaque opération (repiquage et mesure) a été réalisée en deux répétitions (Harrigan et McCance, 1976) .

6. Préparation de l'inoculum

6.1. Préparation de la suspension de spores

La suspension de spores est préparée par addition de 10 ml d'eau distillée stérile contenant 0,1% de Tween 80 à la souche cultivée sept jours sur PDA en boîte de Pétri. La suite de la méthode est identique à celle mentionnée précédemment (4.1).

6.2. Dénombrements des spores

A 1 ml de suspension de spores préalablement agitée, on ajoute 9 ml d'eau tweenée ; la solution mère ainsi obtenue permet de préparer la gamme étalon. La suite de la méthode est identique à celle mentionnée précédemment (4.2).

7. Méthode de fermentation

La fermentation a été réalisée dans un milieu liquide agité à base de la farine des criquets (*O.volxemii*) dans le but de doser l'activité protéolytique développée par les souches fongiques testées.

7.1. Substrat de fermentation

Ce travail est une contribution sur l'étude du potentiel de production de protéases acides sur un milieu liquide agité des 03 souches fongiques sélectionnées. Pour cela, un milieu à base de farine des criquets a été choisi comme substrat de fermentation.

Les criquets sont capturés à la main (*Ocneridia volxemii*) non ailés dans la région de Sebkh Aïn M'lila, Oum el Bouaghi (Figure 10). Les criquets sont séchés à l'air libre (25 – 30°C) pendant 3 - 4 jours puis broyés à l'aide d'un moulin électrique ménager (Katapodis et *al.*, 2006) de manière à obtenir une farine avec des particules de Φ : 0,5 mm pour la culture liquide (Figure 12) (Murthy et Naidu, 2010).

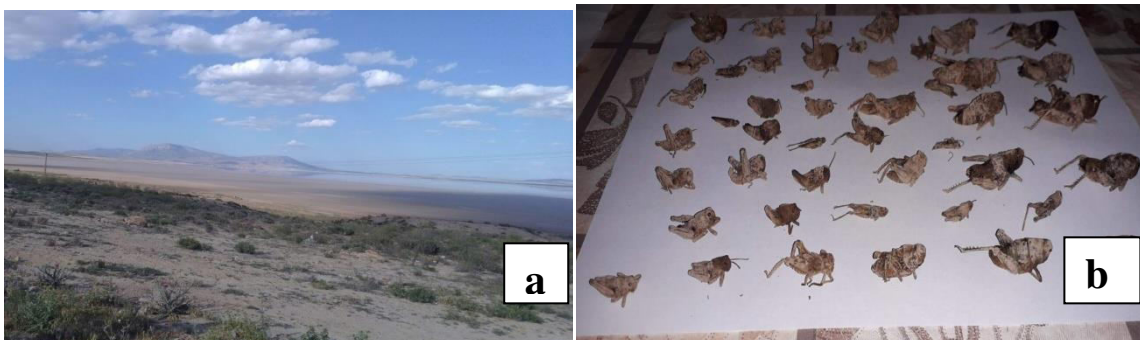




Figure 10: a.La région de SebkhA Aïn M'lila, Oum el Bouaghi , b.*Ocneridia volxemii* ,c.La farine des criquetés (*Ocneridia volxemii*).

7.2. Préparation du milieu de culture

Pour la réalisation des fermentations, 02 g de farine des criquets est introduit dans un erlenmeyer de 250 ml, puis 50 ml d'eau distillée sont additionnés à ce substrat.

7.3. Effet de température

Après refroidissement, chaque deux erlenmeyers ont été inoculé par 1 ml d'une suspension sporale (10^7 spore/ml) des mêmes souches fongiques. Ensuite, ces erlenmeyers ont été incubés dans un incubateur agitateur à 120 rpm pendant trois jours aux températures suivantes : 15 °C, 30 °C et 45 °C. Les expérimentations sont réalisées en triple.

7.4. Effet de pH

Chaque souche de moisissure sélectionnée a été inoculée avec 1 ml de sa suspension sporale (10^7 spore /ml) dans un erlenmeyer contenant le bouillon de production (Farine de criquets *O.voleximii*). Ces erlenmeyers ont été incubés à 28°C pendant 3 jours. La gamme du pH testée est comprise entre 4 et 10 avec un intervalle de 3 (4, 7 et 10) .Les expérimentations sont réalisées en triple.

8. Conduite de la fermentation

Après refroidissement des erlenmeyers, les milieux de culture sont inoculés par 1 ml de la suspension sporale (approximativement de l'ordre de 1×10^7 spore/ml). Le contenu de chaque erlenmeyer doit être bien mélangé. Les erlenmeyers sont par la suite incubés dans l'incubateur agitée 120 rpm pendant 03 jours pour les trois (03) températures étudiées (20°C, 30°C et 45°C) et pour les trois pH (pH4, pH7 et pH10). Toutes les expériences sont réalisées en triple pour chaque souche fongique. Après la fermentation les bouillons de culture ont été filtré à travers un tissu, le filtrat est lui-même clarifié par une autre filtration sur papier filtre (Whatman n°1). Le filtrat clair obtenu constitue l'extrait enzymatique brut ; il est conservé au congélateur pour les dosages ultérieurs.

A la fin des fermentations, les paramètres du pH et activité protéolytique ont été estimés.

10. Méthode de dosage enzymatique

L'activité de la protéase acide dans l'extrait enzymatique brut a été dosée par la méthode décrite par Lenoir et Auberger (1977) (Belmessikh, 2011) et modifiée par Mechakra et *al.*, (1999).

- **Principe**

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines en libérant des peptides simples et des acides aminés libres qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA, ce qui permet de récupérer les fragments solubles dans le filtrat. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, sa présence dans le filtrat est traduite en activité protéasique par un dosage colorimétrique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu.

Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

- **Réaction enzymatique**

Le mélange réactionnel a été préparé par addition de :

- Extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage..... 1 ml
- Tampon Tris-HCl (0,2M / 0,1 M), pH 5.5.....1,5 ml
- Substrat (solution de caséine 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02 M) 2,5 ml

Après agitation, l'incubation de ce mélange se fait à 40°C pendant 30 min, puis la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%). Par la suite, il a été laissé reposer 30 min dans un bain de glace (Beynon et Oliver, 2004 ; Wu et *al.*, 2006 ; Devi et *al.*, 2008); ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées (Sandhya et *al.*, 2005). Le mélange a été après filtré sur papier Whatman n°1.

Par ailleurs, les témoins ont été parallèlement préparés dans les mêmes conditions en dénaturant l'enzyme ; c'est-à-dire en ajoutant le TCA avant le substrat.

- **Protocole de dosage**

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode

d'Anson (1938). A cet effet, 0.5 ml du filtrat ont été mélangés avec 2.5 ml de Na₂CO₃ à 2%

dans le NaOH (0.1N). Après agitation et incubation 10 min à température ambiante, 0.25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/4^{ème} ont été ajoutés. Les mélanges ont été bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min (Paranthaman et *al.*, 2009).

L'absorbance de la coloration bleue développée a été lue à 750 nm dans un spectrophotomètre (Shimadzu uv-1280); l'activité a été calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml . Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme. Chaque dosage a été effectué en deux (02) répétitions. (Annexe 04).

Ce travail porte sur la production de protéase acide secrétée par des champignons entomopathogènes. En effet, la protéase acide de cet objectif est étudiée sur milieu à base de la farine *Ocniridia voleximii* et étudie l'effet de la température et du pH sur la production de la protéase.

1. Identification des souches

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

1.1. Etude macroscopique

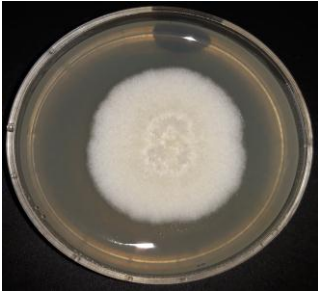


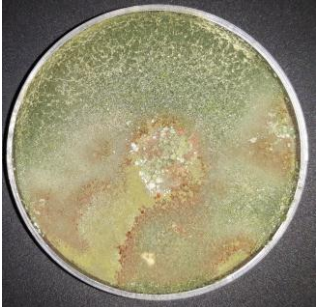


Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés sur le milieu de culture PDA (Botton, 1990).

Le Tableau (05) résume l'aspect macroscopique des colonies, leur consistance, la couleur du revers ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques (Tableau 05).

1.2. Etude microscopique

Les caractères microscopiques des souches obtenus ont été résumés dans le (Tableau 06).

Tableau 05 : Etude macroscopique des souches fongiques.

Souche obtenus	Description	Aspect macroscopique		Photos référencées
		Surface	Revers	
S1 <i>Beauveria bassiana</i>	<p>Couleur : blanchâtre jaunâtre</p> <p>Aspect : cotonneuse</p> <p>Revers : pas de pigment</p>			 https://m.indiamart.com
S2 <i>Cladosporium cladosporioides</i>	<p>Couleur : vert au départ puis devenant rouge à pourpres</p> <p>Aspect : duveteuse à floconneuse</p> <p>Revers : beige et au centre rouge à pourpre</p>			 Bensch <i>et al.</i> (2010 et 2012), Sandoval-Denis <i>et al.</i> (2015).





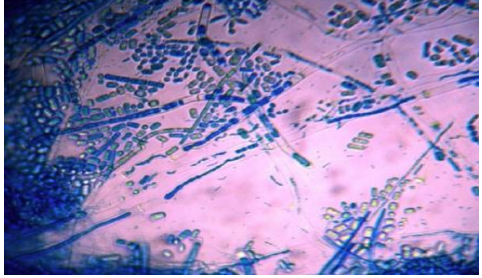

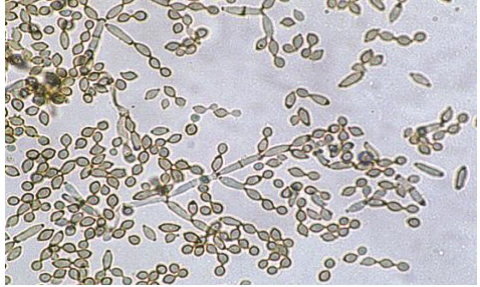
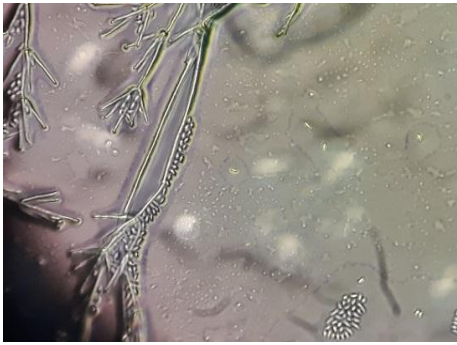

<p>S3</p> <p><i>Verticillium</i></p> <p><i>m</i></p> <p><i>alfalfa</i></p>	<p>Couleur : blanc</p> <p>Aspect : cotonneuse</p> <p>Revers : pas de Pigment.</p>			 <p>Harold W. Platt, Krishna V. Subbarao : 2011</p>
--	---	---	--	--

Tableau 06 : Etude microscopique des souches fongiques.

Souches identifié	Description	Aspect microscopique	Photos référenciées
S1	<p>-Des hyphes transparents et septaux.</p> <p>-Le genre est caractérisé par un conidiophore à base renflée et à extrémité terminale en zigzag formant de petites spores unicellulaires.</p>		 <p>https://www.researchgate.net</p>
S2	<p>- Les hyphes cloisonnés.</p> <p>-Les conidiophores sont également pigmentés de façon sombre.</p>		 <p>Bensch <i>et al.</i> (2010 et 2012), Sandoval-Denis <i>et al.</i> (2015).</p>

<p>S3</p>	<p>-Le mycélium cloisonné.</p> <p>-Des fragiles conidiophores verticillées forment des conidies ovoïdes.</p> <p>-Des microsclérotos bruns.</p>		 <p>Harold W. Platt, Krishna V. Subbarao : 2011</p>
------------------	--	--	--

2. Teste d'entomopathogenicite

Les résultats obtenus montrent que *Verticillium alfafa* à un fort effet sur *Aphis fabea* avec un pourcentage de mortalité 98.15%, suivie par *Beauveria bassiana* 97.62% et La dernière souche *Cladosporium cladosporoides* présente un pourcentage de 92.92% (figure 11) (Annexe 03).

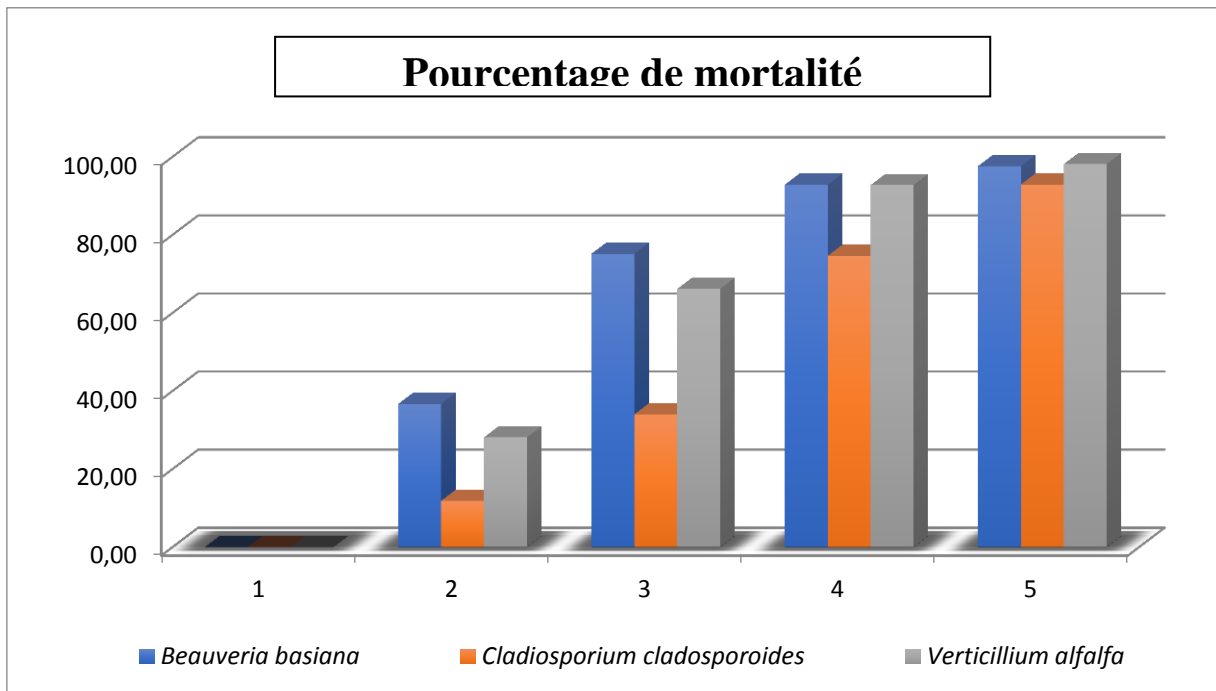


Figure 11 : Le pourcentage de mortalité des pucerons larve par les souches cultivées.

3. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Les protéases sont des enzymes essentielles dans les différentes applications industrielles, biotechnologique, médicinale et dans les domaines de recherche (Coral *et al.*, 2003; Sandhya *et al.*, 2005). Elles sont omniprésentes dans tous les organismes vivants vue leur rôle essentiel dans la croissance cellulaire et dans la différenciation (Gupta *et al.*, 2002; Sandhya *et al.*, 2005). Cependant, les protéases microbiennes sont plus intéressantes que celles provenant des sources végétales ou animales depuis qu'elles présentent les caractéristiques les plus recherchées dans les applications biotechnologiques.

Pour cet objectif les 03 souches ont subi un test de l'activité protéolytique sur un milieu gélosé à base de lait écrémé comme milieu sélectif. Les résultats obtenus après l'ensemencement des laits gélosés donnent des zones d'hydrolyses permettant la mise en évidence de l'activité protéolytique chez trois champignons entomopathogènes : *Verticillium alfalfae* (a) ,*Beauveria bassiana* (b) et *Cladosporium cladosporoides* (c) .Les trois souches sont

caractérisées par des zones d'hydrolyse dont le diamètre variant de 13mm à 51 mm Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (12).

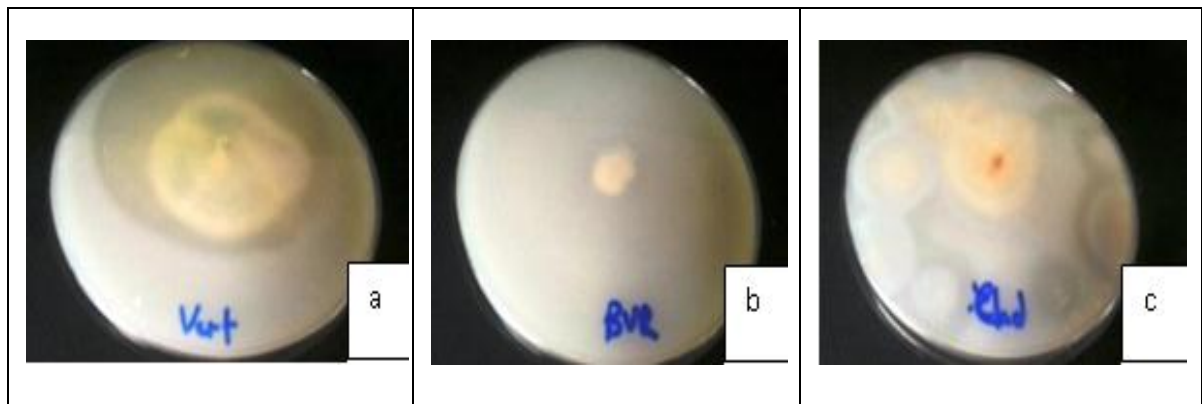


Figure 12: La Mise en évidence de l'activité protéolytique sur le lait gélosé

Les tests de protéolyse réalisés sur le lait gélosé ; ont permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez les trois souches. Une souche est caractérisée par des zones d'hydrolyse très faibles; juste autour du leurs mycélium : c'est celle du genre *Cladosporium*. Alors que les autres souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse dont le diamètre varie de 13 à 51mm. Ces résultats permettent de considérer ces souches comme des moisissures productrices de protéases extracellulaire (Smith *et al.*, 1952 ;Duce et Thomas, 1959). Parmi ces souches, une a un diamètre de 51 mm, c'est la souche du genre *Verticillium*.

4. Fermentation des souches sélectionnées

Les fermentations réalisées en erlenmeyers de 250 ml ont permis après trois jours, de récupérer les filtrats pour chaque souche fermentée afin d'extraire les protéases et réaliser le dosage enzymatique.

Dans cette fermentation, nous avons observé la production d'un trouble important dans le milieu de culture, ainsi que la formation d'un anneau mycélien en haut de l'erlen et une diminution du goût de fermentation avec une production du corps hyphaux.



Figure 13: Réalisation des fermentations dans des erlenmeyers de 250 ml.

Les résultats de chaque fermentation réalisée au niveau des Erlen-meyers de 250 ml dans différentes pH. Le filtrat qui en résulte de chaque opération a été exploité pour la mesure du pH et le dosage enzymatique.

4.1. Effet de pH

La plupart des champignons se développent à des pH plus ou moins acides (Berthier et Valla, 1998).Outre la croissance, le pH joue un rôle primordial dans la production de métabolites (Larpent, 1991).

Les résultats du pH sont mentionnés dans le tableau (07).Ils montrent une stabilité du pH proche de l'alcalinité dans les cultures liquide.Cela pourrait s'expliquer par le fait que la farine des criquets possèdent un excellent pouvoir tampon, comme c'est le cas pour la plupart des résidus agroindustriels (Chutmanop et *al.*, 2008). La diminution du pH peut être due à une libération d'acides organiques dans le milieu (Botton et *al.*, 1990).

Tableau 07: Résultats du pH et de l'activité protéolytique à 28°C.

Les souches	pH avant fermentation	Activité enzymatique (U)	pH après fermentation
S1	pH=4	13.59	8.34
	pH=7	13.39	8.49
	pH=10	14.57	8.24
S2	pH=4	09.04	8.22
	pH=7	14.96	8.60
	pH=10	16.38	8.55
S3	pH=4	18.23	8.97
	pH=7	13.15	8.71
	pH=10	14.08	09

On observe une augmentation importante du pH dans les cultures liquides ; ce qui indique une production d'ammoniac résultant du métabolisme de protéines après l'action des protéases puis de l'oxydation des acides aminés au cours de leur utilisation comme source d'énergie (García-Gómez et al., 2009). L'oxydation s'effectue selon la réaction suivante :



La production d'ammoniaque (NH_3^+) par moyen de la désamination des peptides et d'acides aminés provenant de la dégradation des protéines du milieu (Wilkesman et Kurz, 2009). En fait, les souches inoculées ont certes utilisé les protéines de criquets comme source de carbone et d'énergie après l'action des protéases extracellulaires.

Pour cette raison, les microorganismes avec une forte capacité protéolytique rendent le milieu de culture plus alcalin que ceux qui étaient moins protéolytiques (Wilkesman et Kurz, 2009).

Ces résultats indiquent que le pH du milieu est affecté par les processus enzymatiques et le transport des divers composants à travers la membrane. En effet, les variations du pH sont

des indicateurs des changements dans les activités métaboliques. Mais ces variations dépendent du type de fermentation (Sandhya et *al.*, 2005b).

4.2 Résultats des températures

L'activité enzymatique recherchée dans le milieu de fermentation liquide à base de farine des criquets a montré que la production de protéase acide diffère d'une température à une autre chez les différentes souches. Les résultats synthétisés dans la (Figure 16) révèlent que les souches fongiques utilisées disposent de grandes variations entre elles au niveau de rendement en activité protéolytique.

L'observation du graphe obtenu après fermentation à 30°C montre que la souche produite des quantités importantes de protéase acide; *Cladosporium cladosporoides* (17.16U). Les autres souches présentent de moyennes activités protéolytiques ; *Beauveria bassiana* (13.64U). *Verticillium alfafa* (12.51U). Concernant la température 30°C, les souches cultivé donnent un moyen rendement protéolytique les résultats ne sont pas assez grands.

Par contre, quant à la température 45°C, on constate qu'il y a des activités importantes de l'ordre (13.54 U) produites par *Verticillium alfafa* Suivi par *Beauveria bassiana* (12.22U) et de l'ordre (11.83U) produite par *Cladosporium cladosporoides*.

Par conséquent, la température joue un rôle très important sur l'activité protéolytique, car elle a une influence directe sur la sécrétion extracellulaire des enzymes, éventuellement en modifiant les propriétés physiques de la membrane cellulaire. En effet, la température affecte fortement la synthèse d'une protéase, soit de manière non spécifique en influençant les taux de réactions biochimiques ou spécifiquement par induire ou réprimer leur production (Nardello-Rataj et *al.*, 2003).

La comparaison de tous les résultats révèle que les souches *Beauveria bassiana* et *Verticillium alfafa* ont donné les activités protéolytiques les plus élevé.

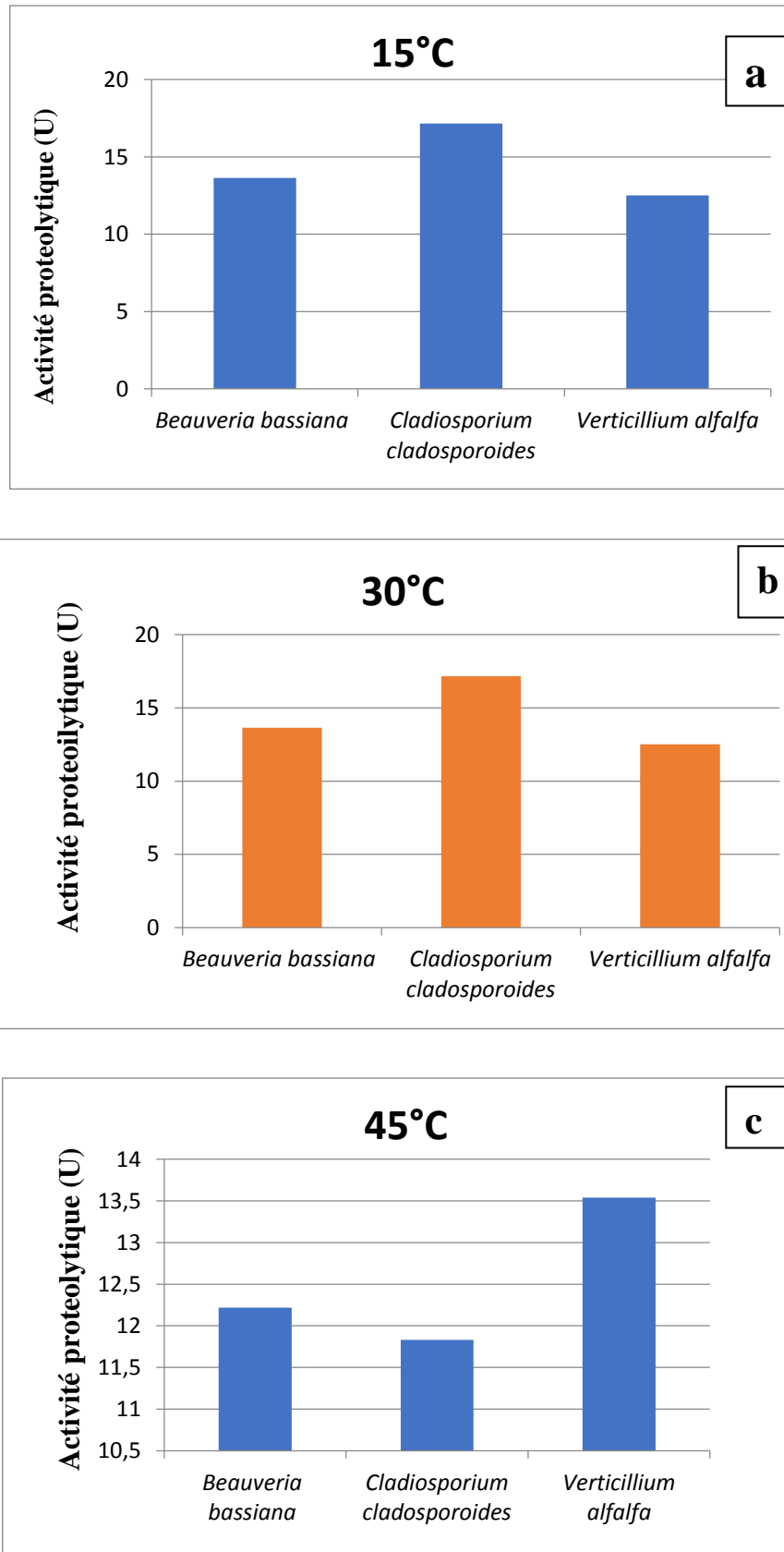


Figure 14 : Résultats de l'activité protéolytique pour les souches cultivées sous les trois températures ; a : T=15°C, b : T=30°C, c : T=45°C.

Le but de cette étude est la production de la protéase par des champignons entomopathogènes : *Beauveria bassiana*, *Cladosporium Cladosporoides* et *Verticillium alfalfa* sur milieu à base de la farine des criquets (*O. volxemii*).

L'identification du genre a été effectuée selon les caractères morphologiques, macroscopiques et microscopiques au laboratoire 14 de Microbiologie, au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri Constantine.

La production de l'enzyme par *Beauveria bassiana*, *Cladosporium Cladosporoides* et *Verticillium alfalfa* a commencé par un test sur la capacité de la souche à produire des protéases. La mise en évidence de l'activité est réalisée sur le milieu gélose au lait où une zone d'hydrolyse considérable a été notée avec une croissance de la moisissure jugée rapide.

Le traitement *Aphis febea* par *Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporoides* et *Verticillium alfalfa* a entraîné la mortalité plus de 90% après 7ème jours.

Les trois souches ont été cultivées dans un milieu de fermentation à base de farine des criquets (*O. volxmii*) pour la production et des protéases extracellulaires. L'effet de la température et du pH sur cette activité protéolytique a été étudié.

Le dosage de l'activité protéolytique a montré que la farine des criquets est un milieu favorable à la production des protéases par les genres *Beauveria bassiana*, *Cladosporium Cladosporoides* et *Verticillium alfalfa*. Il montre également que *Verticillium alfalfa* est la souche la plus performante par rapport à sa production en protéase exocellulaire, en effet elle produit une activité très élevée en protéase acide. Nous avons observé après fermentation que la souche *Verticillium alfafa* produite des quantités importantes de protéase acide (18.23 U) à pH 4 suivi par la souche *Clodosporium cladosporoides* (16.38 U) à pH 10 et la dernière souche *Beauveria bassiana* (14.57 U) à pH 10.

De ce fait, la farine des criquetés représentent un substrat très favorable pour la production des protéases acides vu sa richesse en protéines.

1. Abou-El-Fittouh, H. A. Abelson. PH (1957). Some aspects of paleobiochemistry. Ann. New York Acad. Sci. 69. 276-285. Abou-El-Fittouh, HA, JO Rawlings, and PA Miller (1969). Classification of environments to control genotype by environment interactions with an application to cotton. Crop Sci., 9. 135-140. Ackermann, A.(1967). Quantitative Untersuchungen an Körnerfressenden Singvögeln. J. Ornithol.
2. Aguilar, C. N. (2008). Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 4, 354-366.
3. Andersen, S. O. (1979). Biochemistry of insect cuticle. *Annual review of entomology*, 24(1), 29-59.
4. Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of general physiology*, 22(1), 79.
5. *Aspergillus oryzae* sur déchets d'oranges .optimisation du milieu de culture, purification
6. Auberger, B., Lamberet, G., & Lenoir, J. (1985). Les activités enzymatiques de *Penicillium camemberti*. *Sciences des aliments*, 5, 239-243.
7. Bedjaoui, N. (2016). *Composition biochimique et caractérisation physicochimique et microbiologique du lait cru de chamelle et de vache* (Doctoral dissertation).
8. Belmessikh, A. Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide.
9. Benchiheb, M. Etude des protéases de quelques plantes endémiques.
10. Benkahoul, M., & Mechakra-Maza, A. *Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, Galactitomentosa et Onopordum acanthium* (Doctoral dissertation, Université des frères mentouri constantine).
11. Benkenana, N., Harrat, A., & Petit, D. (2013). Analysis of the number of sensilla on the labrum and the diet of grasshoppers belonging to the family Pamphagidae (Orthoptera). *European Journal of Entomology*, 110(2), 355.
12. Bensmira, S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel.
13. Bensmira, S. (2006). Isolement et caractérisation de souches fongiques de milieux extrêmes (sol et sebkha de la région de Biskra) productrices de cellulase thermostable à intérêt industriel.

14. biochimies et microbiologie appliquées. Constantine :Université Mentouri Constantine,80p
15. Boiron, P., & Périlleux, E. (1996). *Organisation et biologie des champignons*. Nathan.
16. Bolivar, I. (1878). *Analectaorthopterologica*.
17. Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.
18. Boucias, D. G., &Pendland, J. C. (1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. In *The fungal spore and disease initiation in plants and animals* (pp. 101-127). Springer, Boston, MA.
19. Çalık, P., Takaç, S., Çalık, G., &Özdamar, T. H. (2000). Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme and microbialtechnology*, 26(1), 45-60.
20. Campos RA, arruda W, Boldo JT da silvaMV, deBarossNM, deAzevedo JL, SchrankA, Vainstein MH, 2005. boophilusmicroplus infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana* :SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Cur .Genet .50*, 257-261.
21. Cerning J., GRIPON J.P. et DESMAZEAND M. (1984). Utilisation des enzymes dans
22. Chabasse , D , Bouchra , J-P ; Degentdl , L., Brun ,S ; Cimon B ; Penn P ; (Mars 2002). Les moisissures d'intérêt médical. Paris : bioforma Ed. Paris. Cahier de formation N°25 biologie médical
23. Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S. M., Elyas, K. K., Bhat, S. G., &Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(4), 956-961.
24. Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., &Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(7), 1012-1018.
25. Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y., &Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(7), 1012-1018.
26. Coral, G., Arikan, B., Unaldi, M. N., &Güvenmez, H. (2003). Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of microbiology*, 53(4), 491-498.
27. Davet, P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. Editions Quae.

28. Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
29. Dendouga, W. Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite.
30. Devi, M. K., Banu, A. R., Gnanaprabha, G. R., Pradeep, B. V., & Palaniswamy, M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of science and technology*, 1(7), 1-6.
31. Drouin, M. (2005). *Étude de production de protéases alcalines par Bacillus licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
32. Ducroo, P. (1982). Utilisation industrielle des enzymes. *Ind. Aliment. Agric*, 99, 401-412.
33. Durand G. et Monson P. (1982). Production de la protéase neutre par *Aspergilluseoryzae*
34. Faria, M., & Wraight, S. P. (2001). Biological control of Bemisiatabaci with fungi. *Crop protection*, 20(9), 767-778.
35. Ferron, P., Fargues, J., & Riba, G. (1991). Les champignons agents de lutte microbiologiques contre les ravageurs. *Dost. Cell. Env*, 5, 55-76.
36. García-Gómez, M. J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O., & Prado-Barragán, L. A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food chemistry*, 112(3), 604-608.
37. Gaugler, R., Costa, S. D., & Lashomb, J. (1989). Stability and efficacy of *Beauveria bassiana* soil inoculations. *Environmental Entomology*, 18(3), 412-417.
38. Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., & Soccol, C. R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 32(2), 246-251.
39. Germino J. et Bastia D. (1984) .Production de la protéase neutre par *Aspergilluseoryzae*
40. Guendouz, F., & Belibel, S. Etude du potentiel de production des protéases par des souches mycéliennes isolées des zones arides.
41. Guiraud, J. P. (1998). Microbiologie Alimentaire. Dunod. Paris. France.
42. Guo, J. P., & Ma, Y. (2008). High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 58(2), 301-308.

43. Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32.
44. Harrigan, W. F. (1976). Laboratory methods. *Food and Dairy Microbiology*.
45. <https://m.indiamart.com>
46. <https://www.researchgate.net>
47. Humber, R. A. (1997). Fungi: identification. In *Manual of techniques in insect pathology* (pp. 153-185).
48. Ikram-ul-Haq, M. H., Daudi, S., Ali, S., & Qadeer, M. A. (2003). Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology*, 2(1), 30-36.
49. Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PloS one*, 6(12), e28341.
50. Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PloS one*, 6(12), e28341.
51. industrie laitiere. la technique laitière, 992 :9-24.
52. Kamp, A. M., & Bidochka, M. J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied microbiology*, 35(1), 74-77.
53. Katapodis, P., Christakopoulou, V., & Christakopoulos, P. (2006). Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), 501-506.
54. Kouassi, M. D. (2001). Les possibilités de la lutte microbiologique. Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*. *Vertigo-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2(2).
55. Kresze G. B., 1991. Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* 12 : 85-120.
56. Kole M., Draper I., Donald F.G., 1988. Protsease production by *Bacillus subtilis*
56. Kumar, A. G., Nagesh, N., Prabhakar, T. G., & Sekaran, G. (2008). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresourcetchnology*, 99(7), 2364-2372.

57. Lee, S. K., Hwang, J. Y., Choi, S. H., & Kim, S. M. (2010). Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. *Food Science and Biotechnology*, 19(2), 327-334.
58. Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., & Brinch-Pedersen, H. (2007). Phytase: source, structure and application. In *Industrial enzymes* (pp. 505-529). Springer Netherlands.
59. Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O., & Schoemaker, H. (2001). *Industrial use of enzymes*. Eolss Publishers, Oxford.
60. Lenoir, J., & Auberger, B. (1977). Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. II. Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, 57(568), 471-491.
61. Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993). Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel.
62. Lipa, J. J. (1975). White muscardines (*Beauveria* sp.). *An outline of Insect Pathology. Foreign Sci. Publ. Dept NCSTEL, Warsaw, Poland*, 139-142.
63. Loffler, A. (1986). Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food technology (USA)*.
64. López, G., & Alejandra, D. (2015). Taxonomic study of clinical and environmental isolates of arthroconidial, acremonium-like and ochroconis-like fungi.
65. Madigan M.T., Martinko J.M., 2007. Biologie des microorganismes. 11^{ème} édition. *Pearson Education*. Broek. France. pp. 478; 479.
66. Magalhães, B. P., Butt, T. M., Humber, R. A., Shields, E. J., & Roberts, D. W. (1990). Formation of appressoria in vitro by the entomopathogenic fungus *Zoophthoradicans* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Journal of Invertebrate pathology*, 55(2), 284-288.
67. Martinelli, S. D., & Kinghorn, J. R. (Eds.). (1994). *Aspergillus: 50 years on* (p. 851). Amsterdam: Elsevier.
68. Mechakra, A., Auberger, B., Remeuf, F., & Lenoir, J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences des aliments*, 19(6), 663-675.
69. Moodie, P. (2001). Traditional Baking Enzymes-Proteases. *American Institute of Baking, Manhattan, Kansas*.
70. Mukherjee, A. K., Adhikari, H., & Rai, S. K. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: characterization

- and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 353-361.
71. 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.
72. Nardello-Rataj, V., Tai, L. H. T., & Aubry, J. M. (2003). Les lessives en poudre. *l'actualité chimique*, 3.
73. Neu J. CrimW. N. et Sadowski J.A. (1984) .Production de la protéase neutre par
74. Paranthaman, R., Alagusundaram, K., & Indhumathi, J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(3), 308-312.
75. partielle et étude des propriétés physico-chimique de l'enzyme. thèse de magister .
76. Patel, R., Dodia, M., & Singh, S. P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry*, 40(11), 3569-3575.
77. Pelmont, J. (1995). *Enzymes: catalyseurs du monde vivant* (No. 577.15 PEL).
78. Pelmont, J. (1995). *Enzymes: catalyseurs du monde vivant* (No. 577.15 PEL).
79. Presa, J. J., & García, M. D. (1984). Inventariopreliminar de los>(Orthoptera) de la regiónpaleártica. *Anales de la Universidad de Murcia (Ciencias)*, 3-42.
80. propriétés physico-chimique de l'enzyme. thèse de magister :biochimies et microbiologie
81. propriétés physico-chimique de l'enzyme. thèse de magister :biochimies et microbiologie
82. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.
83. Rekik, C., & Haddadi, H. (2017). *Isolement des souches bactériennes à partir du sol productrices d'enzyme coagulant le lait (caractérisation et purification de la protéase)* (Doctoral dissertation).
84. Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*, 40(8), 2689-2694.
85. Sandoval-Denis, M., Gené, J., Sutton, D. A., Wiederhold, N. P., Cano-Lira, J. F., & Guarro, J. (2016). New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 36, 281.

86. St Leger, R. J. (1993). Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens. *Parasites and pathogens of insects*, 2, 211-229.
87. Starnes, R. L., Liu, C. L., & Marrone, P. G. (1993). History, use, and future of microbial insecticides. *American Entomologist*, 39(2), 83-91.
88. Steele, M., & Odumeru, J. (2004). Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of food protection*, 67(12), 2839-2849.
89. Sullivan, G. A., & Calkins, C. R. (2010). Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat science*, 85(4), 730-734.
90. Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211.
91. Suresh, P. V., Sachindra, N. M., & Bhaskar, N. (2011). Solid state fermentation production of chitin deacetylase by *Colletotrichum lindemuthianum* ATCC 56676 using different substrates. *Journal of food science and technology*, 48(3), 349-356.
92. Swann, E. C., Frieders, E. M., & McLaughlin, D. J. (1999). Microbotryum, Kriegeria and the changing paradigm in basidiomycete classification. *Mycologia*, 51-66.
93. Tunga, R., Shrivastava, B., & Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, 38(11), 1553-1558.
94. Tzean, S. S., Hsieh, L. S., & Wu, W. J. (1997). Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan Council of Agriculture. *Taiwan, ROC. p*, 214.
95. Uvarov, B. P. (1935). The Malcolm Burr collection of Palaearctic Orthoptera. *Eos. Revista española de Entomología*, 11, 71-96.
96. Vishwanatha, K. S., Rao, A. A., & Singh, S. A. (2009). Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114(2), 402-407.
97. Wilkesman, J., & Kurz, L. (2009). Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent patents on biotechnology*, 3(3), 175-184.
98. Władyka, B., & Pustelny, K. (2008). Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & molecular biology letters*, 13(2), 212.
99. Wraight, S. P., & Roberts, D. W. (1987). Insect control efforts with fungi. *Dev. Ind. Microbiol*, 28, 77.
100. Ziani, J. (2008). Application de *Beauveria bassiana* contre la punaise terne *lyguslineolaris* (palisot de beauvois)(hémiptères: miridés) dans les vignobles.

Annexe 01: Potato Dextrose Agar (PDA)

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

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

Annexe 02 : Lait gélosé à 20% d'agar

Lait écrémé.....	100 ml
Agar-agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

- Dissoudre l'agar-agar dans de l'eau distillée chaude.
- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée.
- Stérilisation par autoclavage à 121°C/20 min.
- Ajouter le lait écrémé stérile juste avant l'utilisation du milieu.

Annexe 03 : Teste d'entomopathogenicite

Faktoirrank	Factors	Rep.	Before					Before				
			App.	1DAA	3DAA	5DAA	7DAA	App.	1DAA	3DAA	5DAA	7DAA
1	<i>Beauveria basiana</i>	R1	10	6	3	0	0	0,00	40,00	70,00	100,00	100,00
		R2	10	8	6	3	1	0,00	20,00	14,29	57,14	85,71
		R3	10	9	2	0	0	0,00	0,00	77,78	100,00	100,00
		R4	10	5	0	0	0	0,00	50,00	100,00	100,00	100,00
		R5	10	4	0	0	0	0,00	60,00	100,00	100,00	100,00
		R6	10	5	1	0	0	0,00	50,00	88,89	100,00	100,00
Total			60,0	37,0	12,0	3,0	1,0	0,00	36,67	75,16	92,86	97,62
2	<i>Cladosporium cladosporoides</i>	R1	10	9	6	2	1	0,00	10,00	40,00	80,00	90,00
		R2	10	10	5	2	0	0,00	0,00	28,57	71,43	100,00
		R3	10	8	5	1	0	0,00	11,11	44,44	88,89	100,00
		R4	10	7	6	3	2	0,00	30,00	40,00	70,00	80,00
		R5	10	8	6	0	0	0,00	20,00	40,00	100,00	100,00
		R6	10	10	8	5	1	0,00	0,00	11,11	37,50	87,50
Total			60,0	52,0	36,0	13,0	4,0	0,00	11,85	34,02	74,64	92,92
3	<i>Verticillium alfalfa</i>	R1	10	7	4	1	0	0,00	30,00	60,00	90,00	100,00
		R2	10	5	3	0	0	0,00	50,00	57,14	100,00	100,00
		R3	10	10	7	3	1	0,00	11,11	22,22	66,67	88,89
		R4	10	5	1	0	0	0,00	50,00	90,00	100,00	100,00
		R5	10	7	1	0	0	0,00	30,00	90,00	100,00	100,00
		R6	10	8	2	0	0	0,00	20,00	77,78	100,00	100,00
Total			60,0	42,0	18,0	4,0	1,0	0,00	28,15	66,19	92,78	98,15
4	Control (Tween80)	R1	10	10	10	10	10					
		R2	10	10	7	7	7					
		R3	10	9	9	9	9					
		R4	10	10	10	10	10					
		R5	10	10	10	10	10					
		R6	10	10	9	8	8					
Total			60,0	59,0	55,0	54,0	54,0					

Annexe 04 : Dosage de l'activité protéolytique

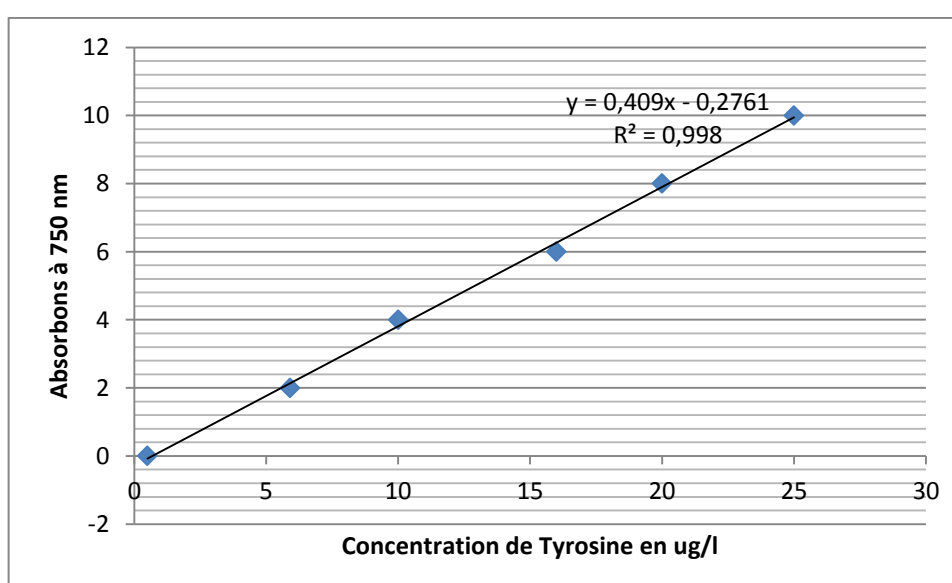
- Solutions utilisées
- Caséine 2,5% dans Citrate de Sodium (0,02 M).
- Solution mère 100 µg/ml de Tyrosine.
- TCA 4%.
- Na₂CO₃ 15% dans NaOH (0,1 N).
- Folin-Ciocalteux 1/4ème.

Concentration en tyrosine (µg/ml)	00	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
TCA (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Na₂CO₃ (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Folin-Ciocalteu (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

La solution est mélangée et laissée à l'obscurité pendant 30 min

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

Annexe 05 : La courbe d'étalonnage de la tyrosine



Abstract

The objective of this study, targets the ability of entomopathogenic champions to degrade the locust flour. For this, three strains were highlighted the proteolytic activity on milk agar. This test revealed that all strains gave a zone of proteolysis with various diameters in ta (13 and 51 mm). This test shows that the performing strain is *Verticillium alfafa* with a diameter of 51 mm. thereafter a liquid fermentation of the three strains on flour-based medium of locusts, was carried out. Analysis of the pH results of the fermentation filtrates showed that there was an increase in pH (pH 4 to pH 6) in all the showers. The results obtained revealed that the strain *Verticillium alfalfa* gave an excellent activity up to 18.23u at pH 4 of fermentation for the medium based on locust flour. On the other hand *Clostridium cladosporoides* gives an excellent activity reaching (17.16u). The results of this work confirm the high biotechnological potential of these strains in topo pathogens for the production of the acidic protease in the agitated liquid culture.

Key words: Pathogenic fungi, acid protease, *ocniridiavoleximii*, *Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporoides*, *Verticillium alfafa*.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة قدرة ابطال الفطر الممرض على تحليل دقيق للجراد لذلك تم تسليط الضوء على ثلاث سلالات للكشف على نشاطا البروتين على اجار الحليب. وكشف هذا الاختبار أن جميع سلالات أعطت منطقة التحلل البروتيني مع اقطار مختلفة تتراوح ما بين (13-51مم). هذا الاختبار وضح ان السلالة المفضلة ذات القطر 51 ملم هي *Verticillium alfalfa*. بالإضافة الى تخمير سائل للسلالات الثلاث على وسط بالاستناد على فريضة الجراد قد أظهر تحليل النتائج من درجة الحموضة في ترشيح التخمر أن هناك زيادة في الرقم الهيدروجيني (درجة الحموضة 4 ودرجة الحموضة 8) عند جميع السلالات. وكشفت النتائج أن السلالة المفضلة *Verticillium alfalfa* أعطى نشاط ممتاز يصل إلى (18.23U) في درجة الحموضة 4 بالنسبة الى وسط التخمر على اساس دقيق الجراد لي عكس *Cladosporium cladosporoides* تعطي نشاط ممتاز يصل الى (17.16U).

نتائج هذا العمل تؤكد الإمكانيات العالية لتكنولوجيا الحيوية لهذه السلالات الممرضة للحشرات لإنتاج انزيم البروتياز الحامض في العينة السائلة الممزوجة.

الكلمات المفتاحية : الفطريات الممرضة, حمض البروتياز

Cladosporium cladosporoides, Verticillium alfalfa, Beauveria bassiana, Ocnleridia volxemii

Thème : Production de la protéase acide par des champignons entomopathogènes

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie Fongique

/ Fermentation et production de substances fongiques

Résumé

L'objectif visé lors de cette étude, cible la capacité de champignons entomopathogènes à dégrader la farine des criquets. Pour cela, trois souches ont subi une mise en évidence de l'activité protéolytique sur le lait gélosé. Ce test a révélé que toutes les souches ont donné une zone de protéolyse avec des diamètres variés entre (13 et 51 mm). Ce teste montre que la souche performant est *Verticillium alfafa* avec a un diamètre de 51 mm .Par la suite, une fermentation liquide des trois souches sur milieu à base de farine des criquets, a été réalisée. L'analyse des résultats du pH des filtrats de fermentation a montré qu'il y a augmentation du pH (PH 4 à pH 8) chez toutes les souches. Les résultats obtenus ont révélé que la souche *Verticillium alfafa* a donné une excellente activité atteignant (18.23 U) à pH 4 de fermentation pour le milieu à base de farine des criquets. Par contre *Cladosporium cladosporoides* donne une excellente activité atteignant (17.16 U).Les résultats de ce travail confirment le potentiel biotechnologique élevé de ces souches entomopathogènes pour la production de la protéase acide dans la culture liquide agitée.

Mots clés : Champignon entomopathogènes, Protéase acide, *Ocneridia volxemii*, *Beauveria bassiana*, *Cladosporium Cladosporoides*, *Verticillium alfalfa*.**Laboratoire de recherche** : Au niveau du laboratoire 14 de Microbiologie, et laboratoire de Microbiologie (RDC) au sein de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Melle ALMIH. (M..C.B - UFM Constantine),
Rapporteur : Melle. ABDELAZIZ W. (M.A.A - UFM Constantine),
Examinatrice : Melle. BELMESSIKH A. (M.A.A - UFM Constantine).

Date de soutenance : 27/06/2018