

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire

Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de *Master*

En Microbiologie

Option : **Biotechnologie des Mycètes, Fermentation et Production de
Substances Fongiques**

Thème

**Identification des souches fongiques productrices des
protéases, isolées à partir de source chaude**

Préparé par : **AMOURA Amina**
BAZ Siham

Soutenu le : 25/06/2014

Devant le jury d'évaluation:

Présidente :	Mme. MOSBAH F.	M.A. Univ. Constantine 1
Rapporteur :	Melle. BELMESSIKH A.	M.A. Univ. Constantine 1
Examinatrice :	Melle. LAHLAH F.Z.	M.A. Univ. Constantine 1

Année universitaire : 2013 /2014

Remerciements

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

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie et Environnement au biopôle de Chaab-Ersass, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1

Nous remercions notre promotrice Melle. BELMESSIKH Aïcha, Maître Assistante à l'université Constantine 1, pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous vifs remerciements vont à Mme. MOSBAH F., Maître Assistante à l'université Constantine 1, qui nous à fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ce mémoire.

Nous adressons également nos remerciements les plus sincères à Melle. LAHLAH F.Z., Maître Assistante à l'université Constantine 1, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

On tient également à remercier tout le personnel du laboratoire de biologie et environnement en particulier Wissam, pour ses conseils et sa disponibilité.

Enfin, nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Grace Allah ...

Je dédie ce modeste travail :

** A mes chers parents: pour l'affection et l'amour qui m'ont donné le courage et la force dans les moments les plus difficiles.*

**A mes chères sœurs et A mon chère frère,
Et bien sur à ma copine de mon chemin, ma sœur 'SIHAM' qui est toujours à coté de moi.*

A tous la famille AMOURA et AMIMMOUR.

A tous mes amis et particulièrement à (Chahira, Hajer, Ibtissam, Fatima, hakima, Ilham, Bouchra, Khawla, Najet, Sara, je suis très heureuse de ces années passées avec vous des liens créés et de nouvelles amitiés, ainsi que pour tous les moments passés ensemble et ceux encore à venir.

A toutes la promotion Master Biotechnologie des mycètes.

AMINA

Table des matières

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Partie I. Revu bibliographique

1- Les moisissures	3
1-1- Généralités.....	3
1-2- Structure cellulaire.....	3
1-3- Condition de croissance	4
1-3-1- Macroéléments.....	4
1-3-2- Sources minérales.....	4
1-3-3- Facteurs physicochimiques.....	4
❖ Température.....	5
❖ Humidité.....	5
❖ pH.....	5
❖ Aération.....	7
❖ Lumière	7
1-4- Tolérance des mycètes aux milieux extrêmes.....	7
2-Le sol	9
2-1- Généralités.....	9
2-2- Les mycètes et le sol	9
3-Enzymes protéolytiques.....	10
3-1- Classification des protéases.....	10
3-1-2- Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	10
3-1-3- Selon leurs d'origines.....	11
3-1-3-1- Protéases d'origine végétale.....	11
3-1-3-2- Protéases d'origine animale.....	11
3-1-3-3- Protéases d'origine microbienne.....	11
• Protéases des bactéries.....	11

1- Les moisissures	3
1-1- Généralités.....	3
1-2- Structure cellulaire.....	3
1-3- Condition de croissance	4
1-3-1- Macroéléments.....	4
1-3-2- Sources minérales.....	4
1-3-3- Facteurs physicochimiques.....	4
❖ Température.....	5
❖ Humidité.....	5
❖ pH.....	5
❖ Aération.....	7
❖ Lumière	7
1-4- Tolérance des mycètes aux milieux extrêmes.....	7
 2- Le sol	 9
2-1- Généralités.....	9
2-2- Les mycètes et le sol	9
 3- Enzymes protéolytiques.....	 10
3-1- Classification des protéases.....	10
3-1-2- Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	10
3-1-3- Selon leurs d'origines.....	11
3-1-3-1- Protéases d'origine végétale.....	11
3-1-3-2- Protéases d'origine animale.....	11
3-1-3-3- Protéases d'origine microbienne.....	11
• Protéases des bactéries.....	11
• Protéases des levures.....	12
• Protéases des moisissures.....	12
3-1-4- Selon le pH d'activité	12
3-1-5- Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif.....	12
3-2- Applications industrielles des protéases.....	12

3-2-1-	Applications alimentaires.....	13
3-2-2-	Applications chimiques.....	13
3-2-3-	Applications pharmaceutiques.....	13
3-2-4-	Autres applications.....	13

Partie II. Matériel et méthodes

1-	Echantillonna.....	15
2-	Etude mycologique	15
2-1-	Isolement et purification des moisissures.....	15
2-2-	Conservation.....	16
2-3-	Sélection des souches protéolytiques.....	16
2-4-	Identification des souches sélectionnées.....	16
2-4-1-	Identification macroscopique.....	16
2-4-2-	Identification microscopique.....	17
3-	Etude analytique.....	17
3-1-	Détermination du pH des échantillons.....	17
3-2-	Mesure de la matière sèche du sol.....	17
3-3-	Détermination des cendres.....	18
3-4-	Détermination des protéines totales.....	18
3-5-	Détermination des sucres totaux.....	18

Partie III. Résultats et discussions

1- Etude analytique.....	20
1-1-Composition des échantillons du sol.....	20
1-2-Caractéristiques des échantillons du sol.....	22
2-Etude mycologique	23
2-1-Isolement.....	23
2-2- Sélection des isolats protéolytiques	25
2-3- Identification des souches sélectionnées	27
Conclusion.....	36
Références bibliographiques.....	38

Annexes

Résumés

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 01 : Structure de l'hyphe chez les moisissures ; (a) thalle siphonnée, (b) thalle septé.....	2
Figure 02 : La cascade de Hammam DEBAGH.....	14
Figure 03 : Pourcentage d'humidité des deux sites.....	21
Figure 04 : Pourcentage de la matière sèche.....	21
Figure 05 : Pourcentage de la matière minérale.....	21
Figure 06 : Pourcentage de la matière organique.....	21
Figure 07 : Concentrations des sucres.....	21
Figure 08 : Concentrations des protéines.....	21
Figure 09 : Exemples représentatifs de la zone de croissance avec la zone d'hydrolyse de quelques souches protéolytiques apparues.....	24

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau 01 : Aperçu de degré de résistance des spores fongiques selon (CARLILE et al., 2001).....	6
Tableau 02 : Nombre de microorganismes par gramme de terre du jardin, en fonction de la profondeur selon (ALEXANDER, 1991).....	8
Tableau 03 : Composition des sols du site 1.....	19
Tableau 04 : composition des sols du site 2.....	19
Tableau 05 : Caractéristiques des échantillons.....	22
Tableau 06 : Nombre des colonies fongiques du 1er site et du 2ème site.....	23
Tableau 07 : Sélection des souches protéolytiques pour les deux sites.....	25
Tableau 08 : Les caractères culturaux et ainsi l'aspect microscopique des souches fongiques sélectionnée.....	27

Introduction

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 utilisés 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.*, 199).

Les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et spécificités divers. Cependant, l'industrie exige l'emploi d'enzymes thermostables qui ont la capacité de supporter des températures élevées. Pour répondre à cette exigence, l'isolement des moisissures de régions chaudes peut constituer une alternative intéressante permettant d'obtenir des souches productrices de ce type d'enzymes (BOUCHET *et al.*, 1999).

Par la diversité de leurs applications, les protéases 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 (GARCIA-GOMEZ *et al.*, 2009).

Dans ce cadre nous somme intéressés à l'isolement et l'identification des moisissures productrices des protéases à partir d'un écosystème extrême (sol proche de source thermale). Pour réaliser notre objectif, on a procédé à certaines applications pratiques :

- ✓ Echantillonnage et prélèvement du sol d'une source thermale de Hammam DEBAGH (Guelma).
- ✓ Isolement des souches fongiques à partir du ce sol.
- ✓ Mise en évidence de l'activité protéolytique chez les moisissures purifiées à l'aide d'un milieu gélosé au lait (lait gélosé).
- ✓ Identification macro et microscopique des souches sélectionnées.



Figure 01 : Structure de l'hyphe chez les moisissures ; (a) thalle siphonné, (b) thalle septé
(BOTTON *et al.*, 1990).

2- Les moisissures

1-1- Généralités

Le terme '' moisissure'' désigne tous les champignons microscopiques eucaryotes, filamenteux et pluricellulaires du règne des mycètes appelés les «vrais» champignons ou Eumycètes (REGNAULT, 1990 ; CHASSEUR et NOLARD, 2003). Ce sont des thallophytes hétérotrophes (depourvus de chlorophylle) et immobiles. Certaines vivent en symbiose avec les végétaux, et d'autres sont des parasites des végétaux ; en provoquant certaines maladies notamment des récoltes (pourriture grise de la vigne, ergot du seigle, rouille du blé, etc.) ou des animaux causant des mycoses chez l'homme (champignons infectieux), d'autres encore sont des saprophytes en se développant sur des déchets organiques ou de produits alimentaires (LECLERC et *al.*, 1995 ; BENKAKOUZ, 2002 ; CHASSEUR et NOLARD, 2003).

Les moisissures sont dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques et lipolytiques), qui en font des alliés utiles en industries laitières (affinage des fromages), production des molécules à activité pharmaceutique (antibiotiques) et production d'enzymes industrielles (LECLERC et *al.*, 1995 ; BOUIX et LEVEAU, 1999 ; BENKAKOUZ, 2002).

1-2- Structure cellulaire

L'*hyphe* ou filament, en est l'élément structural des moisissures, divisé ou non par des parois transversales. Plusieurs hyphes constituent un réseau visible à l'œil nu : le *mycélium* ou partie végétative du champignon (CHASSEUR et NOLARD, 2003).

Chez les **Phycomycètes**, les cellules ne sont pas séparées par des cloisons transversales : le thalle est dit **coenocytique** ou « siphonné » : **Mucorales** (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*...). Par contre, chez les **Septomycètes**, l'hyphe est **cloisonné** : le thalle est dit « **septé** » ; dans ce cas, des perforations assurent la communication entre les cellules : *Penicillium*, *Aspergillus*... (Figure 01) (BOTTON et *al.*, 1990).

1-3- Condition de croissance

1-3-1- Macroéléments

Le carbone constitue l'élément le plus abondant dans la cellule fongique. Il représente environ 50 % de la cellule, tandis que la teneur en azote varie entre 10 et 15% (RIVIERE, 1975 ; SCRIBAN, 1993). Ainsi, le rapport carbone/azote influe considérablement la croissance et il est pour les mycètes de l'ordre de 20/1 ; un rapport proche de 20 permet une bonne croissance mycélienne (BARKER et WORGAN, 1981 ; BOTTON et *al.*, 1990). Grâce à la glycolyse et au métabolisme aérobie, les mycètes assimilent les sucres facilement métabolisables comme le glucose, le maltose, le saccharose et les polymères tels que l'amidon (NICKLIN et *al.*, 1999).

Par ailleurs, tous les champignons filamenteux peuvent métaboliser les acides aminés et l'urée. La plus part d'entre eux utilisent l'ammonium. Aucun ne peut fixer l'azote atmosphérique. Les sources complexes d'azote comme les peptides et les protéines ne sont utilisables par les hyphes qu'après leur destruction par les protéases en acides aminés (NICKLIN et *al.*, 1990).

1-3-2- Sources minérales

La présence des ions minéraux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchicoba et *al.*, 2001). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques... (BOIRON, 1996).

1-3-3- Facteurs physicochimiques

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

❖ **Température**

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (BOURGEOIS, 1989). La plupart des

moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (BOTTON et *al.*, 1999 ; JULIEN, 2002). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environ de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple (BOTTON et *al.*, 1999 ; NICKLIN et *al.*, 2000). D'autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (DAVET, 1996 ; BOTTON et *al.*, 1999).

❖ **Humidité**

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (DAVET, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (BOURGEOIS, 1989). Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation (DAVET, 1996).

❖ **pH**

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 (BOTTON et *al.*, 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH. *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae*, ont une tendance à croître dans des milieux légèrement acide (URBANEK et *al.*, 1984 ; DELGADO et *al.*, 2002).

Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs (à pH acide, le fer reste sous forme d'ions ferreux assimilable), soit directement par action sur la membrane cellulaire. Par ailleurs, les champignons modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, par production de CO₂ ou de NH₃ ou d'acides (BOIRON, 1996).

Tableau 01 : Aperçu de degré de résistance des spores fongiques selon CARLILE et *al.*, (2001).

Conditions Environnementales	Seuil de résistance	Durée de la viabilité	Exemples d'espèces concernées
Chaleurs très élevées	90C° (feux de forêts)	Quelques mois	Ascospores de <i>Byssochlamyces</i>
Froid intense	Congélation	un hiver	Plusieurs espèces du Nord
Sécheresse de l'air ambiant	±0% d'humidité Relative	Semaine à année	La majorité des genres de l'environnement intérieur : <i>Eurotium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i>
Présence de l'humidité dans le milieu sur lequel se déposent les spores	De 0 à 50% de l'humidité + de 50% d'humidité	Jusqu'à des années À ces taux, les spores devraient germer dans le cas contraire	<i>Eurotium sp.</i> Toutes les espèces

❖ **Aération**

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (BOURGEOIS, 1989 ; BOTTON et *al.*, 1999).

❖ **Lumière**

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (BOTTON et *al.*, 1999).

1-4- Tolérance des mycètes aux milieux extrêmes

Les spores permettent aux moisissures de résister à des conditions extrêmes de l'environnement comme le gel, le processus de digestion et les grandes sécheresses (Tableau 01). Cette résistance aux conditions environnementales peut varier considérablement d'une espèce à l'autre mais on trouve des espèces adaptées presque à tous les climats et les conditions extrêmes (HALEWYN et *al.*, 2002).

En parlant sur la tolérance à haute température, seulement quelques espèces des mycètes peuvent se développer à des températures situées entre 45°C et 5°C (COONEY et EMERSON, 1964). En effet, les mycètes thermophiles ont une température de croissance minimale inférieure à 20°C et maximale supérieure à 50°C (BROCK, 1995 ; BLOCHL et *al.*, 1997 ; MAHESHWARI et *al.*, 2000). Par ailleurs, TANSEY et BROCK (1978) ont répertorié 30 espèces fongiques croît à des températures élevées modérément (60°C à 62°C). En outre, selon TENSEY et BROCK (1978) et MOUCHACCA (1999), la majorité des mycètes thermophiles appartiennent aux :

- Zygomycètes (*Rhizomucor miehi*, *R.pussillus*),
- Ascomycètes (*Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Dactylomyces thermophilus*, *Melanocarpus albomyces*, *Talaromyces thermophilus*, *T. emersonii*, *Thielavia terresteris*)

Tableau 02 : Nombre de microorganismes par gramme de terre du jardin, en fonction de la profondeur selon (ALEXANDER, 1991).

Profondeur (cm)	Bactéries	Actinomycètes	Mycètes	Algues
3 à 8	9 750 000	2 080 000	119 000	25 000
20 à 25	2 179 000	545 000	50 000	5 000
35 à 40	570 000	49 000	400 000	500
65 à 75	11 000	5 000	6 000	100
135 à 145	1 400		3 000	

•

Basidiomycètes (*Phanerochaete chrysosporium*).

- Hyphomycètes (*Acremonium almbamensis*, *A. thermophilum*, *Myceliophthora thermophila*, *Thermomyces laginosus*, *Seytalidium thermophilum*, *Malbranchea cinnamomea*).

2- Le sol

2-1- Généralités

Le sol est le résultat d'une interaction dynamique entre milieu physique (lithosphère) et milieu biologique (biosphère) (CAMUZARD, 2004). Il fait partie intégrante des écosystèmes terrestres et constitue l'interface entre la surface de la terre et le socle rocheux. Le sol est un milieu minéral poreux, gaz et liquide peuvent y circuler. Mais le sol n'est pas seulement un substrat physico-chimique, c'est aussi un support de vie, créatrice de matière organique (DAVET, 1996).

2-2- Les mycètes et le sol

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (PEUK, 2000).

L'évaluation de la biomasse des microorganismes a montré que dans la plupart des sols, les mycètes sont très abondants (Tableau 02) (BÅÅTH et SÖDERSTRÖM, 1980 ; SCHNÜRER et al., 1985). Certaines espèces fongiques se retrouvent sur la plupart des terrains, comme les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Zygorhynchus*, *Chaetomium*, *Gymnoascus*, etc. On y retrouve aussi communément des *Oomycetes* et des *Chytridiomycetes* (BOIRON, 1996).

Les mycètes du sol comportent les saprophytes, les symbiotiques (mycorhizes) et les parasites selon la façon dont ils obtiennent leur carbone et énergie (SENAL et al., 1993).

3- Enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, 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 hydrolysate de protéines ou d'un mélange d'acides aminés (PELMONT, 1995 ; SCRIBAN, 1999).

3-1- Classification des protéases

La classification est basée sur plusieurs critères :

3-1-1- Selon la longueur de la chaîne polypeptidique

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il y'a 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).

3-1-2- 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 NH_2 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.

L'activation de ces différentes enzymes conduit à la libération de di et tripeptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés (SCRIBAN, 1999 ; TRAP et *al.*, 2000 ; WALSH, 2006).

3-1-3- Selon leurs d'origines

3-2-4-1- 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 Merr*), la ficine issue du figuier (*Ficus glabrata*) (SCRIBAN, 1993 ; MOODIE, 2001). Ces deux enzymes sont proches de la papaine ; extraite du latex d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*), qui, à elle seule, peut rompre des liaisons peptidiques que la trypsine et la pepsine rompent séparément. Il en est probablement de même pour les préparations enzymatiques provenant de chardons, d'artichauts, de gaillets, de courges, etc (ALAIS, 1975). La kératinase, une autre protéase qui dégrade les cheveux et les laines est produite par quelques groupes de plantes (RAO et *al.*, 1998).

3-2-4-2- Protéases d'origine animale

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).

3-2-4-3- Protéases d'origine microbienne

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

- **Protéases des bactéries**

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés, elle est la protéase bactérienne la plus connue. Elle 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).

- **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 une métalloprotéase (KRESZE, 1991 ; BOIRON, 1996).

- **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 que : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc (FRAZIER, 1967 ; UL-HAQ et al., 2003).

3-1-4- 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* et *Penicillium roqueforti*. Certaines protéases fongiques ont des optima de pH très acides de 2.5 à 5.0 (AUBERGER et al., 1985 ; BOTTON et al., 1999 ; MECHAKRA et al., 1999).

3-1-5- 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 sérilylprotéases, les cystéylprotéases, les aspartylprotéases et les métalloprotéases (HARTLEY, 1960).

3-3- Applications industrielles des protéases

Les protéases constituent le groupe le plus important d'enzymes industrielles. Elles représentent une part importante du marché des enzymes mondiales (société d'éditions scientifiques, 1988 ; ARORA et al., 2004).

3-2-1- Applications alimentaires

Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont la fromagerie, boulangerie, la synthèse de l'aspartam, la préparation de produits à base de soja (RAO, M. B et al., 1998).

3-2-2- Applications chimiques

Elles jouent un très grand rôle dans l'amélioration du pouvoir détergent d'une lessive ; elles sont capables de dissoudre les taches protéiques à basse température contrairement aux produits chimiques qui ne possèdent pas des propriétés équivalentes même à haute température (GARICIA-CONESA et *al.*, 1999).

3-3-3- Applications pharmaceutiques

Les enzymes protéolytiques d'*A. oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion pour compenser certaines carences pathologiques (HAUSSNER et *al.*, 1996 ; RAO et *al.*, 1998) ; des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des plaies, des brûlures et des ulcères dermiques (RAO et *al.*, 1998) ; la « Brinase » (une protéase acide *plasmin-like*) permet l'hydrolyse de la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse (SUMANTHA et *al.*, 2006) ; une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (KUDRYA et SIMENENKO, 1994) ; etc.

3-3-4- Autres applications

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (DALEV, 1994; ICHIDA et *al.*, 2001). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (AVIRON-VIOLET et *al.*, 1982). Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine (SUMANTHA et *al.*, 2006).

Partie 02: Matériel et méthodes



Figure 02 : La cascade de Hammam DEBAGH

4-Echantillonnage

Les prélèvements sont effectués au niveau de 2 sites différents du sol de Hammam DEBAGH (Figure 02) :

- Du sol avoisinant la source à une distance de 3m.
- Du sol des arbres distants de 30 m de la source.

Ces prélèvements sont réalisés à l'aide d'une tarière stérile, et pour chaque site la couche des 3 premiers centimètres est écartée (BUHOT, 1973 ; MIHAIL etALCOREN, 1987 ; SAADOUNE et MOMANI, 1997).

Cent à cent-cinquante (100-150) g de sol sont prélevés de ces sites en tenant compte de la végétation, à différentes profondeurs de sol : 10, 20, 30, 40 et 50 cm. Le sol est ensuite, recueilli dans des sacs en papier stériles soigneusement fermés. Les échantillons sont ensuite gardés au frais (4°C). L'analyse mycologique est effectuée dès l'arrivée au laboratoire (RODRIGUEZ-ZARAGOZA *et al.*, 2005).

5- Etude mycologique

2-1- Isolement et purification des moisissures

Un gramme de sol de chaque profondeur, prélevé à partir de chaque site est suspendu dans 9 ml d'eau physiologique stérile (Annexe 01) et homogénéisé pendant 10min l'aide d'un agitateurVortex (ULACIO *et al.*, 1997). Cette solution a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1 ml de la solution à 9 ml d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-5} . Ensuite, un volume de 1ml de chaque suspension est déposé dans deux boites de Pétri et homogénéisé avec le milieu PDA (Annexe 02), additionné d'un antibiotique, la gentamicine (5mg/ml) afin inhiber la croissance des bactéries(BOTTON *et al.*, 1990 ;HAMMER *et al.*, 1998 ; TSUYOSHI *et al.*, 2004).

Les boites sont incubées à 25°C et observées quotidiennement durant deux semaines (BOTTON*et al.*, 1990). Les moisissures développées sont repiquées au centre sur le même milieu dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures.

2-2- Conservation

La méthode de conservation des souches la plus utilisée et la plus simple consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée PDA. Les cultures sont incubées pendant 5 à 7 jours, pour permettre une croissance maximale. Par la suite, elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (UI-HAQ et *al.*, 2002).

2-3- Sélection des souches protéolytiques

Les souches protéolytiques sont sélectionnées sur le milieu sélectif (lait à 20% d'agar) (Annexe 03) par touche centrale, et incubées à 25°C pendant 7 jours.

L'utilisation de la gélose en lait à 20% d'agar permet la mise en évidence de l'activité protéolytique par l'apparence d'une zone claire au tour de la colonie (HARRIGAN et MCCANCE, 1976).

À partir du 2^{ème} jour et jusqu'au septième, les diamètres des colonies et des zones d'hydrolyses sont mesurés (RONALD et HAROLD, 1970). L'activité est significative si le diamètre de la zone claire est ≥ 3 .

2-4- Identification des souches sélectionnées

Les souches protéolytiques les plus performantes sont soumises à une identification macroscopique (caractères cultureux) et microscopique (caractères morphologiques) selon PITT et HOECKING (2009).

2-4-1- Identification macroscopique

L'examen à l'œil nu permet la détermination des caractères suivants :

Sur la surface

- ❖ La vitesse de croissance.
- ❖ La couleur et la texture du thalle.
- ❖ La forme, le contour et le relief des colonies.
- ❖ Formation de gouttelettes ou pas.

Sur le revers

- ❖ Couleur et pigmentation.
- ❖ Incrustation dans la gélose(BOTTON et *al.*, 1990).

2-4-2- Identification microscopique

L'observation microscopique détecte la couleur ou pas de l'hyphe ainsi que son diamètre approximatif, la présence ou l'absence de septum et les caractéristiques des fructifications et des spores (SAMSON et HAESKS, 1988 ; HAWKSWARTH, 1995 ; HOOG et GUARRO, 1995 ; GAMS *et al.*, 1998).

A cet effet, l'examen microscopique est effectué par un prélèvement soigneux d'un petit fragment mycélien à la marge d'une culture jeune, à l'aide d'une anse de platine stérile. Ce fragment est ensuite transféré sur une lame contenant quelques gouttes du bleu coton au lactophénol (Annexe 04), l'observation microscopique (microscope optique *Leica*) est réalisée au grossissement x10 et x40(HARRIGAN et MCCANCE, 1976 ; OTENG-GYANG, 1984 ; GUIRAUD, 1998).

6- Etude analytique

3-1- Détermination du pH des échantillons

Cette mesure est réalisée dès l'arrivée des prélèvements au laboratoire. Pour cela, 5 g du sol sont rajoutés à 12,5 ml d'eau distillée stérile ; après agitation vigoureuse, le pH de cette suspension est mesuré à l'aide d'un pH-mètre(POCHON et TRADIEUX, 1962).

3-2- Mesure de la matière sèche du sol

Les échantillons de sol sont séchés à l'étuve à $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ jusqu'à obtention d'une masse constante, soit en moyenne après 15 heures. La différence entre le poids avant et après séchage exprime la teneur en eau de l'échantillon initial. Le poids après séchage représente la matière sèche (CIRAD, 2004)(Annexe 05).

3-3- Détermination des cendres

La prise d'essai ayant servi à la détermination de la matière sèche est incinérée au four à moufle à 550°C pendant 5 heures, le taux de la matière organique est la différence entre le poids sec et le poids des cendres (AUDIGIE et *al.*, 1984)(Annexe 06).

3-4- Détermination des protéines totales

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY et *al.* (1951). Le sulfate de cuivre en milieu alcalin et le réactif de Folin-Ciocalteu (acide phosphomolybdo-tungstique) en présence d'une protéine donne une coloration bleue, qu'est le résultat de deux réactions :

- Réaction de Biuret : qui en présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin, permet le dosage des liaisons peptidiques des protéines.
- Réaction du réactif de Folin sur la tyrosine et le tryptophane, qui sont réduits en un complexe bleu.

Le protocole est décrit en Annexe 07. Le taux de protéines est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de BSA 500 µg/ml (voir Figure dans Annexe07). Chaque dosage est effectué en double.

3-5- Détermination des sucres totaux (DUBOIS et *al.*, 1956)

Les sucres totaux sont déterminés par la méthode « *phenol-sulfuric-acid* ». Cette méthode est utilisée largement à cause de sa sensibilité et sa simplicité. Les sucres sont dégradés à chaud en présence d'acide sulfurique concentré, ce qui provoque le départ de plusieurs molécules d'eau. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxyméthylfurfural dans le cas d'un hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner le complexe jaune-orangé. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses en cause.

Après dosage, le taux de sucre est calculé par référence à une courbe d'étalonnage préalablement établie avec une solution mère de glucose à 100 µg/ml (voir Figure dans Annexe 08). Chaque dosage est effectué en double.

Partie 03: Résultats et discussions

Tableau 03 : Composition des sols du site 1.

Paramètres	Pourcentage dans chaque profondeur				
	10cm	20cm	30cm	40cm	50cm
Matière sèche	78%	74%	74%	84%	82%
Humidité	22%	26%	26%	16%	18%
Matière organique	5.12%	2.7%	5.12%	0.1%	5.12%
Matière minérale	94.88%	97.3%	94.88%	99.9%	94.88%
Sucres solubles µg/ml	8.19	23.44	22.35	12.10	10.92
Protéines µg/ml	43	73.5	64	89	92

Tableau 04 : composition des sols du site 2.

Paramètres	Pourcentage dans chaque profondeur				
	10cm	20cm	30cm	40cm	50cm
Matière sèche	82%	84%	84%	84%	88%
Humidité	18%	16%	16%	16%	12%
Matière organique	9.75%	9.75%	9.75%	7.14%	7.14%
Matière minérale	90.25%	90.25%	90.25%	92.86%	92.86%
Sucres solubles µg/ml	47.05	51.00	30.84	9.66	17.56
Protéines µg/ml	182.5	169.5	89.5	65.5	198

1-Etude analytique

1-1-Composition des échantillons du sol

Les propriétés physicochimiques des échantillons des sols prélevés de la région **Hammam DEBAGH** sont rapportées dans les tableaux 3 et 4.

La 1^{ère} observation des tableaux montre que l'ensemble des sols prélevés présente un taux d'humidité relativement important, cela peut être s'expliquer par un climat humide et subhumide, une température moyenne annuelle de 17°C et une pluviométrie annuelle de 450mm-600mm (http://fr.wikipedia.org/wiki/hammam_challala), qui caractérise la région de Guelma. En effet, les moisissures ont besoin de l'eau pour absorber des nutriments. En outre, les échantillons des sols ne sont pas très secs, ce qui favorise la croissance des moisissures car ces dernières préfèrent le développement sur des substrats humide-solide (BATTAGLINO et *al.*, 1991).

Les échantillons des sols utilisés lors de cette étude contiennent des quantités faibles en matières organiques (inférieurs à 10%), du fait que le sol est un environnement minéral résultant de la biodégradation des matières organiques du sol (minéralisation). En comparant les sols des deux sites, le sol du site 2 présente une quantité en matière organique plus supérieur (9.75%) à celle du sol du site 1 (5.12%). Ceci est du impérativement à la présence des arbres et des plantes dans le site 2; en effet, le sol devra être riche en débris de cette végétation et par conséquent en matières organiques.

De même, le sol du site 2 se constitue avec des teneurs en protéines et ainsi en sucres plus élevées que celles du sol du site 1. Cela pourrait s'expliquer par la richesse du sol du site 2 en matières organiques qui sont constituées en sucres, en protéines et en lipides.

Pour une bonne comparaison nous avons présenté les histogrammes suivants : (Figure 03 – 08).

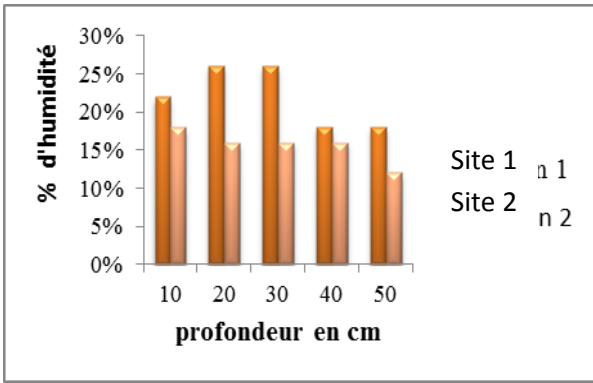


Figure 03: Pourcentage d'humidité.

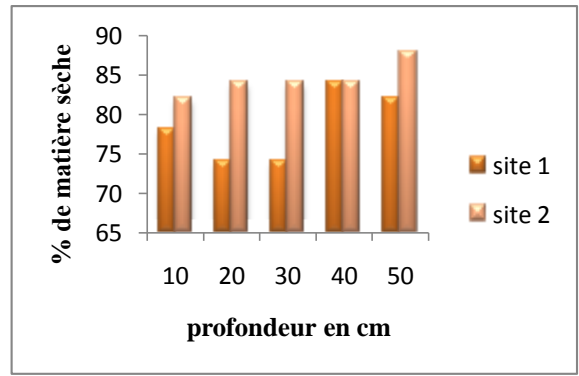


Figure 04: Pourcentage de la matière sèche.

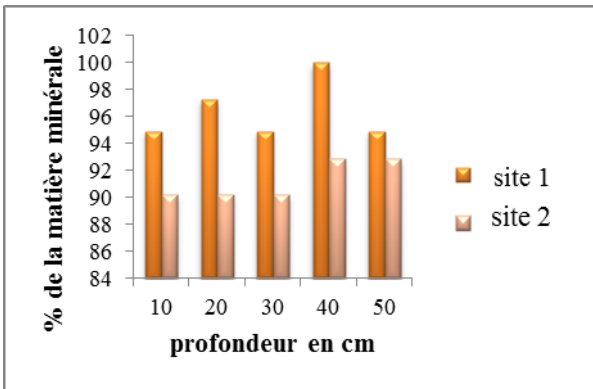


Figure 05: Pourcentage de la matière minérale.

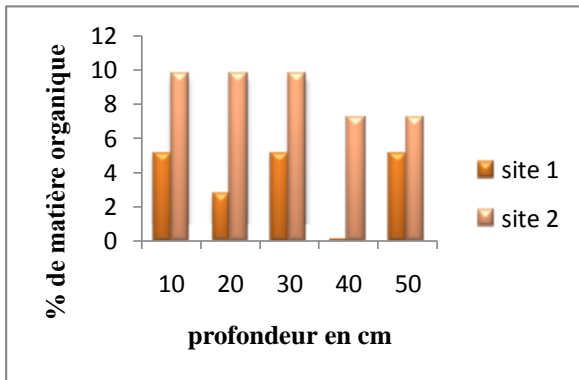


Figure 06: Pourcentage de la matière organique.

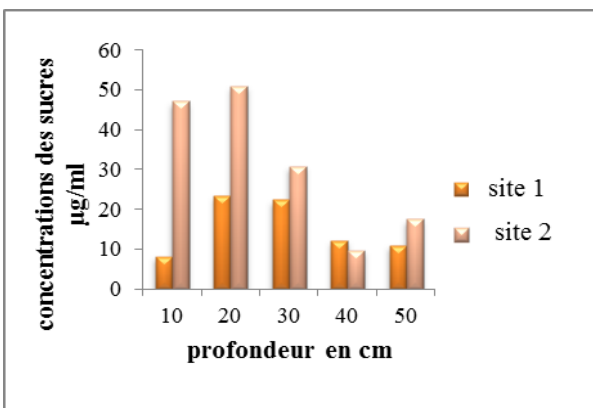


Figure 07: Concentrations des sucres.

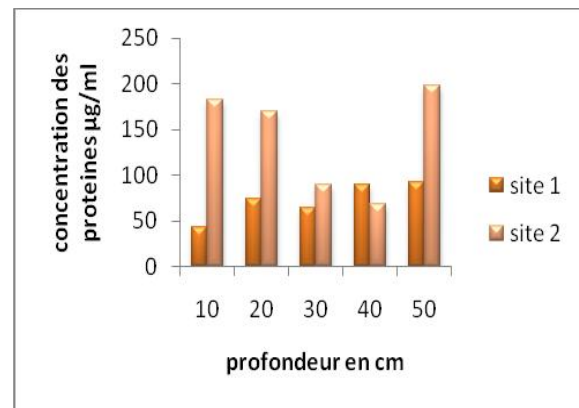


Figure 08: Concentrations des protéines.

1-2- Caractéristiques des échantillons du sol

Les caractéristiques des échantillons prélevés sont consignées dans le Tableau 05.

Tableau 05: Caractéristiques des échantillons.

Echantillons	Date de prélèvement	Description de site de prélèvement	pH
Site 1	17-03-2014	Sol avoisinant la source ; zone très exposée, ensoleillée, couleur blanche (riche en calcaire), végétation moyenne, taux de salinité élevé.	10cm=7.78
			20cm=7.43
			30cm=7.33
			40cm=6.98
			50cm=6.86
Site 2	17-03-2014	Sol des arbres ; zone peu exposée, ombrée, présence de végétation, couleur noir; riche en matière organique, taux de salinité élevé	10cm=7.20
			20cm=7.12
			30cm=7.00
			40cm=6.90
			50cm=6.70

Les échantillons prélevés possèdent un pH neutre à légèrement basique qui varie entre 6.86 à 7.78 pour le sol du site 1, et entre 6.70 à 7.20 pour le sol du site 2. Ces valeurs favorisent plutôt le développement des populations bactériennes par rapport aux populations fongiques qui sont plutôt acidophiles (pH optimum 4-6) (NICKLIN *et al.*, 2000). Cependant, BOTTON *et al.* (1990) mettent en évidence une croissance dans une large gamme de pH de 4.5-8.0 pour les moisissures.

Par ailleurs, le pH des deux sites du sol présente une diminution tout en approfondissant dans le sol. Cela peut être expliqué par la nature et la composition du sol ; en effet, les couches supérieures sont plus riches en composés chargés positivement que les couches inférieures.

2-Etude mycologique

2-1-Isolement

Les souches fongiques se trouvent dans la nature sous forme d'un mélange avec d'autres germes. De ce fait, l'isolement des moisissures doit passer par l'élimination des autres microorganismes. Pour cela, des méthodes sélectives sont adoptées dans notre travail :

- * Réaliser des dilutions de décimales permettant d'éviter la condensation des microorganismes et de diminuer leur nombre.
- * Choisir des milieux spécifiques à pH acide favorisant le développement des moisissures (BOTTON *et al.*, 1990).
- * Ajouter des antibiotiques tels que la gentamycine (antibiotique à large spectre d'action parmi les plus utilisés dans l'isolement des moisissures (BOTTON *et al.*, 1990)).

Les cultures des prélèvements sur milieu PDA ont permis l'isolement de deux cent trois souches différentes. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous; ils font apparaître la répartition du nombre de colonies appartenant aux champignons filamenteux apparus dans chaque échantillon.

Tableau 06: Nombre des colonies fongiques du 1^{er} site et du 2^{ème} site.

Profondeur en cm	10 cm	20 cm	30 cm	40 cm	50 cm
Nombre de colonies Site 1	13	27	16	8	15
Nombre de colonies Site 2	43	15	22	25	19

L'analyse des résultats montre que la profondeur 10 cm dans le sol du deuxième site est la plus peuplée par les souches fongiques.

Il est intéressant de noter que, l'ensemble des échantillons examinés appartient à un écosystème extrême, où les températures de l'eau s'échelonnent de 97°C (Hammam Guelma) (http://fr.wikipedia.org/wiki/hammam_challala). Ce milieu naturel de température élevée va certainement influencer la flore de proximité, en particulier, la biodiversité des champignons

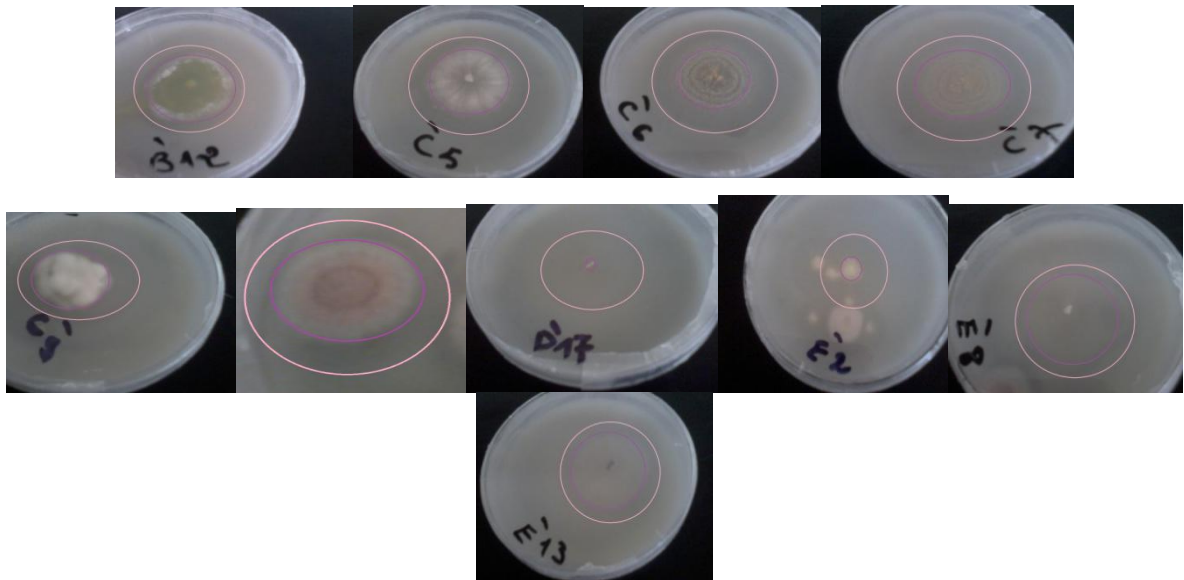
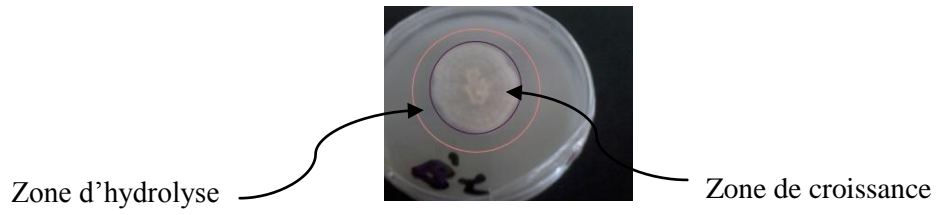


Figure 09: Exemples représentatifs de la zone de croissance avec la zone d'hydrolyse de quelques souches protéolytiques apparues.

microscopiques qui, en général, sont des organismes mésophiles avec des optima de croissance situés entre 25-30°C (BOTTON *et al.*, 1990 ; LEVEAU et BOUIX, 1993). D'autres champignons sont thermotolérants ou thermophiles et peuvent croître et survivre dans des milieux où la température dépasse 50°C (NICKLIN *et al.*, 2000).

Par ailleurs, BARKER et WORGAN (1981) ; BOTTON *et al.* (1990) préconisent un rapport C/N de 20/1 pour la croissance fongique. En effet, la croissance de cette flore fongique isolée est expliquée par un rapport C/N favorable à la prolifération des moisissures dans les sols prélevés.

2-2- Sélection des isolats protéolytiques

Les résultats obtenus après ensemencement des isolats sur le milieu sélectif (lait à 20% d'agar) ont permis la sélection de 43 souches ayant une activité protéolytique parmi les cent trois souches testées.

Les souches protéolytiques sont reconnues par l'halo transparent résultant de la dégradation du milieu par l'exo-protéase produite et qui entoure les colonies; plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme est importante.

Pour cela, 15 souches présentant une activité faible (\emptyset halo < 3mm), et 10 souches présentant une activité forte (\emptyset halo \geq 7mm).

Les diamètres des zones de croissance et d'hydrolyse de chaque souche après 7 jours d'incubation sont représentés dans la Figure 09 et le Tableau 07.

Tableau 07: Sélection des souches protéolytiques pour les deux sites.

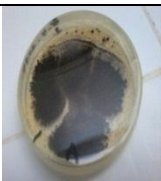



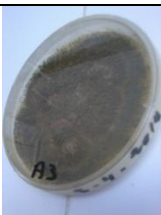
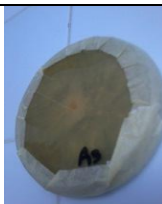
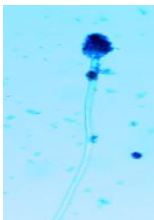

Code des souches du site 1	Diamètre des colonies (mm) 7 ^{ème} jour	Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) 7 ^{ème} jour	Code des souches du site 2	Diamètre des colonies (mm) 7 ^{ème} jour	Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) 7 ^{ème} jour
A	30	2	A`4	65	5
A 3	55	6	A`8	4	5
A 4	24	3	A`13	3	6
A*4	21	2	A`16	8	2
A5	6	6	A`18	3	6
A12	65	1	A`20	6	5



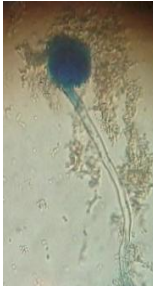



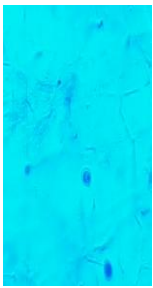



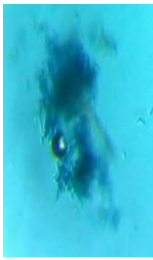



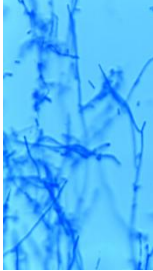

Code des souches du site 1	Diamètre des colonies (mm) 7 ^{ème} jour	Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) 7 ^{ème} jour	Code des souches du site 2	Diamètre des colonies (mm) 7 ^{ème} jour	Diamètre de la zone d'hydrolyse (mm) 7 ^{ème} jour
B8	14	9	A`25	2	2
B11	33	2	A`35	21	7
B16	57	3	A`36	2	9
B19	35	6	B`2	35	6
/	/	/	B`3	4	11
C5	1	1	B`10	15	5
C10	45	4	B`11	18	1
C15	7	9	B`12	35	4
D	10	6	C`2	2	2
D*	13	5	C`4	13	8
D3	30	3	C`5	5	1
D5	20	8	C`6	41	4
D10	10	1	C`7	45	4
E	43	14	C`9	2	7
E*	42	1	C`14	2	2
E4	30	3	C`15	19	2
E7	20	3	C`16	27	6
/	/	/	C`*1	33	3
/	/	/	D`9	11	8
/	/	/	D`10	3	3
/	/	/	D`17	23	3
/	/	/	E`2	11	1
/	/	/	E`8	32	4
/	/	/	E`13	35	4







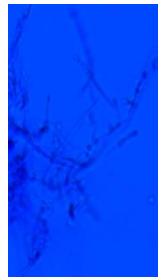
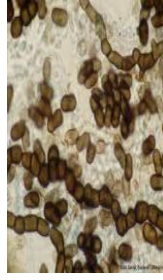


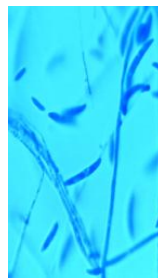





2-3- Identification des souches sélectionnées







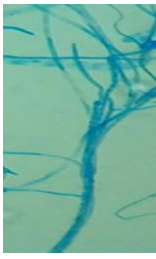
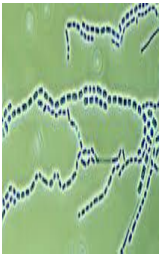


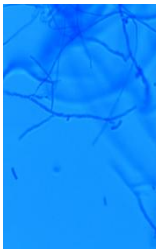



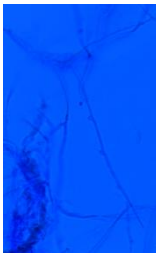
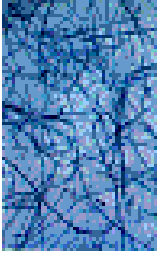

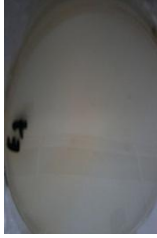
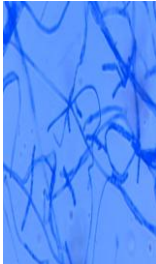

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de BOTTON et *al.* (1990). Sur cette base, nous avons défini les isolats fongiques protéolytiques qui sont représentants de 15 genres différents: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Scedosporium* et *Onychocola*. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous.






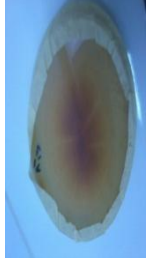

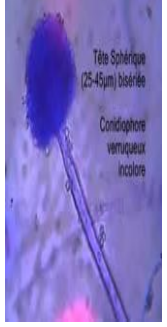
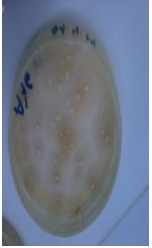





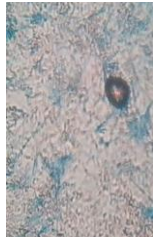
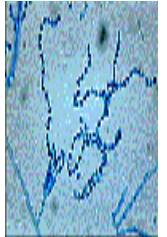
Tableau 08 : Les caractères cultureux et ainsi l'aspect microscopique des souches fongiques sélectionnées.



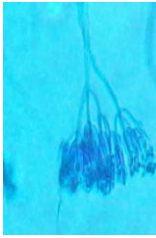





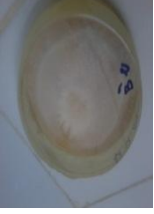

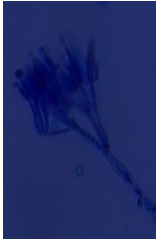




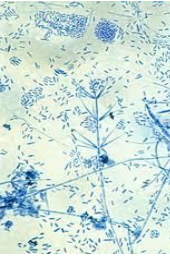
Code de la souche	Caractères cultureux sur PDA			Aspect microscopique			Genre identifié
	Face	Revers	Description	Aspect microscopique obtenu (nos résultats)	Photo microscopique de référence	Description	
A, B11			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : noire.</p> <p>Colonie simple à mycélium aérien, granuleuse et sèche.</p> <p>Revers : jaune-vert.</p>			<p>Thalle non septé,</p> <p>conidies unicellulaires globuleuse et noire</p>	<i>Mucor sp.</i>
A 3, C*1			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : jaune à vert-olive.</p> <p>Colonie simple à mycélium aérien et poudreuse.</p> <p>Revers : beige-jaune.</p>			<p>Thalle septé.</p> <p>Conidiophore terminé par une tête globuleuse.</p>	<i>Aspergillus sp.1</i>

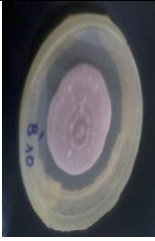





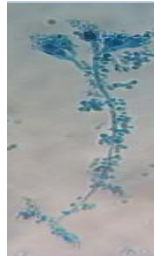





<p>A 4, A*4, E, E*</p>			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : marron claire, bordé du blanc.</p> <p>Colonie simple poudreuse et pigmentée.</p> <p>Revers : marron.</p>			<p>Thalle septé, conidiophore lisse non ramifié, porté par une tête conidienne. Conidies unicellulaires globuleuses.</p>	<p><i>Aspergillus sp.2</i></p>
<p>A 5</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche.</p> <p>Colonie plateaérienne, forme simple, laineuse et sèche.</p> <p>Revers : beige, blanc au centre.</p>			<p>Les filaments mycéliens sont septés et ramifiés à angle aigu. Spores ovoïdes.</p>	<p><i>Scedosporium sp.</i></p>
<p>B 8</p>			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : verte foncée.</p> <p>Colonie plate, poudreuse et plissé.</p> <p>Revers : noir et incrusté.</p>			<p>Thalle septé.</p> <p>Conidiophore terminé par une tête globuleuse.</p>	<p><i>Aspergillus sp.3</i></p>
<p>B 16</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanchâtre.</p> <p>Colonie étoile, aérienne et laineuse.</p> <p>Revers : blanc.</p>			<p>Un thalle blanc et lisse. Des arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités formées au niveau des doubles cloisons.</p>	<p><i>Geotrichum sp.1</i></p>







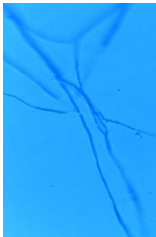



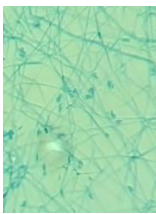

B 19			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanchâtre.</p> <p>Colonie étoile, aérienne et laineuse.</p> <p>Revers : blanc.</p>			<p>Des petites spores en forme de tonnelets (ou rondes) et des filaments fins, irréguliers et tortueux.</p>	<i>Onychocola sp.1</i>
C3			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche crème.</p> <p>Colonie plate duveteuse et plissée.</p> <p>Revers : marron et incrusté.</p>			<p>Thalle lisse, recouvert d'une masse visqueuse de spores.</p> <p>Conidies lisses, elliptiques.</p>	<i>Aureobasidium sp.1</i>
C 10			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : grise à vio-rose.</p> <p>Colonie simple, aérienne, laineuse, gouttelettée et pigmentée.</p> <p>Revers : marron foncé.</p>			<p>Thalle septé fin.</p> <p>Macroconidies fusiformes, pluri septées.</p>	<i>Fusarium sp.1.</i>
C15			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : verte-olive.</p> <p>Colonie cratériforme plate et poudreuse.</p> <p>Revers : vert foncé.</p>			<p>Des conidiophores ramifiés et allongés. Des conidies en chaîne acropétale , septées avec plusieurs sites conidiogènes.</p>	<i>Cladosporium sp.</i>

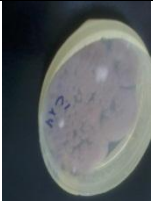


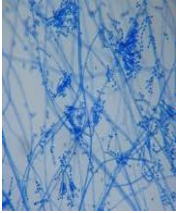


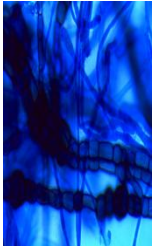



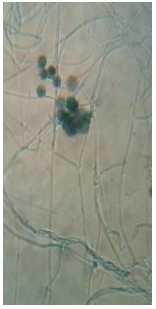
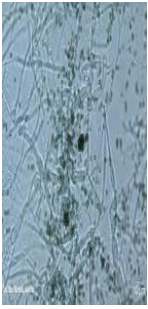
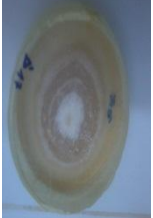


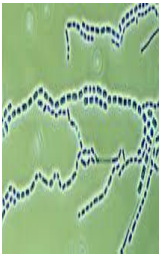
D, D*			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : verte-grise.</p> <p>Colonie plissée en dôme et duveteuse. Revers : beige-orange.</p>			<p>Thalle lisse, recouvert d'une masse visqueuse de spores.</p> <p>Conidies lisses, elliptiques.</p>	<i>Aureobasidium sp.2</i>
D3			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : blanchâtre.</p> <p>Colonie simple aérienne et cotonneuse.</p> <p>Revers : jaune.</p>			<p>Des petites spores en forme de tonnelets (ou rondes) et des filaments fins, irréguliers et tortueux.</p>	<i>Onychocola sp.2</i>
D5			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche.</p> <p>Colonie simple, aérienne et cotonneuse.</p> <p>Revers : blanc.</p>			<p>Un thalle lisse.</p> <p>Des arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités formées au niveau des doubles cloisons.</p>	<i>Geotrichum sp.2</i>
E4			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche.</p> <p>Colonie simple, aérienne et laineuse. Revers : blanc.</p>			<p>Les filaments suivent un trajet très anguleux, et des ramifications courtes. Les macroconidies sont absentes.</p>	<i>Trichophyton sp.</i>
E7			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche.</p> <p>Colonie simple, aérienne et laineuse.</p> <p>Revers : beige.</p>			<p>Un thalle blanc et lisse. Des arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités formées au niveau des doubles cloisons.</p>	<i>Geotrichum sp.3</i>


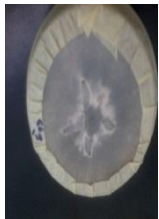


A'4			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche au périphérique, rose au centre.</p> <p>Colonie plissée, aérienne, cotonneuse et gouttelettée.</p> <p>Revers : jaune marron.</p>			<p>Conidies réunies en masse mucilagineuses au-dessus des appareils sporifères, non disposées en chaîne.</p>	<i>Gliocladium sp.1</i>
A'13			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : jaune au centre, crème au périphérique. Colonie plissée, centre déprimé et plat, poudreuse et gouttelettée.</p> <p>Revers : pigmenté marron.</p>			<p>Thalle septé, hyalin, fin. Conidiophores lisse. Vésicules sphériques. Petites têtes conidiennes moins nombreuses. Conidies globuleuses.</p>	<i>Aspergillus sp.4</i>
A'16			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : jaune au centre, crème au périphérique. Colonie simple, aérienne, granuleuse et gouttelettée.</p> <p>Revers : jaune.</p>			<p>Thalle coenocytique. Présence de rhizoïdes. Présence de stolon. Sporocyste globuleux.</p>	<i>Rhizopus sp.</i>
A'20			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium: vio-rose.</p> <p>Colonie simple, centre bombé, aérienne, poudreuse et sèche.</p> <p>Revers : beige.</p>			<p>Thalle septé. Conidiophores ramifiés en verticilles. Conidie subglobuleuses disposées en longue chaînes divergentes.</p>	<i>Paecilomyces sp.1</i>

A'25			<p>Vitesse de croissance : moyenne.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche.</p> <p>Colonie simple, aérienne, cotonneuse et sèche.</p> <p>Revers : jaune.</p>			<p>Des conidiophores isolés</p> <p>Des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</p>	<i>Penicillium sp.1</i>
A'35 A'36			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : verte foncée.</p> <p>Colonie simple, plate, poudreuse et sèche.</p> <p>Revers : jaune.</p>			<p>Des conidiophores isolés.</p> <p>Des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</p>	<i>Penicillium sp.2</i>
B'2			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanchâtre.</p> <p>Colonie simple, aérienne, cotonneuse et sèche.</p> <p>Revers : jaune.</p>			<p>Conidies réunies en masse mucilagineuses au-dessus des appareils sporifères, non disposées en chaîne.</p>	<i>Gliocladium sp.2</i>
B'3			<p>Vitesse de croissance : moyenne.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche jaunâtre.</p> <p>Colonie simple, aérienne, cotonneuse et sèche.</p> <p>Revers : jaune-marron.</p>			<p>Conidiophores dressés, avec plusieurs étages de verticilles de phialides divergentes, étroites et unicellulaires.</p>	<i>Verticillium sp.</i>

B'10			<p>Vitesse de croissance : moyenne.</p> <p>Couleur du mycélium: vio-rose.</p> <p>Colonie simple, aérienne, poudreuse et sèche.</p> <p>Revers : beige, grenat au centre et incrustée.</p>			<p>Thalle septé.</p> <p>Conidiophores ramifiés en verticilles.</p> <p>Conidies subglobuleuses disposées en longues chaînes divergentes.</p>	<i>Paecilomyces sp. 2</i>
B'11			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : verte.</p> <p>Colonie simple, plate, poudreuse et goutteletée.</p> <p>Revers : jaune noir au centre et incrustée.</p>			<p>Des conidiophores isolés.</p> <p>Des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du Conidiophore.</p>	<i>Penicillium sp. 3</i>
C'2			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium: vio-rose, blanche au périphérique.</p> <p>Colonie simple, aérienne, poudreuse, et sèche</p> <p>Revers : beige à marronnet incrusté.</p>			<p>Des conidiophores isolés.</p> <p>Des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du Conidiophore et riverticillé.</p>	<i>Penicillium sp. 4</i>

<p>C'4</p> <p>D'10</p> <p>E'2</p>			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche salée.</p> <p>Colonie simple, plate, plâtreuse et sèche</p> <p>Revers : marron et incrustée.</p>			<p>Thalle septé.</p> <p>Conidiophore lisse se termine par une tête conidienne bisériée.</p> <p>Conidies unicellulaires globuleuses.</p>	<p><i>Aspergillus sp.5</i></p>
<p>C'5</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche.</p> <p>Colonie soleil, plate, laineuse et sèche.</p> <p>Revers : blanc.</p>			<p>Un thalle blanc et lisse. Des arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités formées au niveau des doubles cloisons. sont terminales ou intercalaires à apex arrondi et à base aplatie, de forme ovoïde.</p>	<p><i>Geotrichum sp.3</i></p>
<p>C'9</p>			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche neige.</p> <p>Colonie simple, aérienne, cotonneuse et sèche.</p> <p>Revers : jaune.</p>			<p>Hyphe septée.</p> <p>Macroconidies fusiformes, pluri-septées.</p>	<p><i>Fusarium sp.2</i></p>

C'14			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : vio-rose.</p> <p>Colonie simple, aérienne, poudreuse et sèche.</p> <p>Revers : beige et incrusté.</p>			<p>Thalle septé.</p> <p>Conidiophores ramifiés en verticilles.</p> <p>Conidies subglobuleuses disposées en longue chaînes divergentes.</p>	<i>Paecilomyces sp.3</i>
C'16			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : verte-grise.</p> <p>Colonie simple, aérienne, cotonneuse et sèche.</p> <p>Revers : vert-noir.</p>			<p>Thalle lisse, recouvert d'une masse visqueuse de spores.</p> <p>Conidies hyalines, lisses, elliptiques.</p>	<i>Aureobasidium sp.2</i>
D'9			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : verte.</p> <p>Colonie simple, plate, granuleuse et sèche.</p> <p>Revers : vert.</p>			<p>Un conidiophore en touffe compacte, très ramifié, irrégulièrement verticillé avec des ramifications à angle droit.</p> <p>Des conidies réunies glomérules au sommet des phialides.</p>	<i>Trichoderma sp.</i>
D'17			<p>Vitesse de croissance : lente.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche.</p> <p>Colonie simple, aérienne, cotonneuse et sèche.</p> <p>Revers : orange-jaune.</p>			<p>Des petites spores en forme de tonnelets (ou rondes) et des filaments fins, irréguliers et tortueux.</p>	<i>Onychocola sp.3</i>

E'13			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Couleur du mycélium : blanche.</p> <p>Colonie simple, aérienne, laineuse et gouttelettée.</p> <p>Revers : blanc.</p>			<p>Un thalle blanc et lisse. Des arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités formées au niveau des doubles cloisons.</p>	<p><i>Geotrichum sp.4</i></p>
------	---	---	--	---	--	---	-------------------------------

Le peuplement relativement plus faible en moisissures dans les sols du site 1 par rapport aux sols du site 2 est lié certainement à la structure du sol, qui exerce un effet sur leurs distributions (PHAFF et STARMER, 1987). En effet, le sol du site 1 présente une structure plus compacte empêchant l'envahissement du milieu par les moisissures.

En plus de l'adaptation du microorganisme à son biotope, la croissance ou la présence de certaines souches peuvent être expliquées par la richesse des sols étudiés, en particulier le sol du 2^{ème} site (couleur sombre), en matières organiques et également en protéines et en sucres apportées par des résidus des végétaux (les fruits et les feuilles des arbres et ainsi d'autres plantes) et d'animaux.

Vu autre facteur, expliquant cette différence de peuplement, est la température élevée du Site 1 (à côté de la source) contre le site 2. En effet, certaines souches uniquement (par leur forme sporulée) peuvent résister à des températures élevées.

En outre, le sol du 2^{ème} site est aussi plus riche en protéines (198µg/ml) que le sol du site 1 (92µg/ml). C'est la raison pour laquelle, la majorité des isolats testés pour l'activité protéolytique font partie du site 2.

Conclusion

Conclusion

Vu l'intérêt industriel des protéases microbiennes, la recherche de nouvelles substitues est avérée nécessaire. A cet effet, notre sujet est une contribution à l'étude de l'isolement et l'identification des souches fongiques productrices des protéases, à partir du sol d'un écosystème extrême (Hammam DEBAGH - Guelma).

Pour cela, deux sites ont été choisis pour le prélèvement d'échantillons du sol à différentes profondeurs : un à partir du sol proche de la source et l'autre à partir du sol plus ou moins proche de la source, mais dans une zone environnant des arbres.

L'analyse physico-chimique de la composition des sols prélevés a montré un taux d'humidité relativement important, notamment pour le sol du site 1. Par ailleurs, le sol du site 2 a montré une richesse en matière organique et donc en sucres et en protéines, ce qui présente des substrats inductibles pour différentes enzymes.

La culture des prélèvements sur milieu PDA supplémenté par la gentamycine a permis une bonne inhibition de la croissance des bactéries et en fait, l'isolement de deux cent trois souches de moisissures.

L'utilisation du lait gélosé à 20% d'agar pour la mise en évidence de l'activité protéolytique a permis la sélection de quarante trois souches de moisissures, dont dix souches présentant une activité forte (diamètre de l'halo au tour de la colonie ≥ 7 mm), et quinze souches présentant une activité faible (diamètre de l'halo au tour de la colonie < 3 mm).

Afin d'identifier ces souches fongiques protéolytiques, un examen macroscopique des moisissures sur boîtes de Pétri a été effectué pour déterminer leurs caractères culturels. Cet examen est lui-même suivi par un examen microscopique en utilisant le bleu coton au lactophénol comme liquide de montage, dans le but de mettre en évidence les principales caractéristiques de la morphologie des isolats protéolytiques sélectionnés. Ces examens ont mis en évidence quarante trois souches réparties sur quinze genres différents : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Scedosporium* et *Onychocola*.

Vu l'endroit d'où les échantillons du deuxième site ont été prélevés, qui présentent une richesse en matière organique et en particulier en protéines, ce site là a montré une dominance relativement importante des moisissures protéolytiques dans le site 2 par rapport au site 1.

Dans le cadre de poursuivre ce travail, ces résultats exigent d'autres études et ouvrent de nouvelles perspectives :

- Tester le pouvoir protéolytique des isolats fongiques à des températures plus élevées.
- Réaliser des fermentations dans des erlens-meyers, afin de doser l'activité protéasique dans les extraits enzymatiques des différents isolats.
- Etude de la thermostabilité enzymatique.

Références bibliographiques

- ABDELAZIZ, W. 2006.** *Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens.* Mémoire de Magister En Microbiologie et Biochimie Appliquées. Université Mentouri. Constantine.
- ALAIS, C. 1975.** Sciences du lait. Principes et techniques laitières. Masson. Paris. P: 108-645.
- ALEXANDER, M. 1991.** Introduction to soil microbiology, (edn) Willy. New York.
- AUBERGER, B; LENOIR, J; BERGERE, J.L. 1995.** Caractérisation de l'activité carboxypeptidasique de *Penicillium camembertii*. *Sci. Aliments.* **15** : 273-28.
- AUDIGIE, C.L; FAGERELLA, J; ZONZAIN, F. 1984.** Manipulation d'analyse biochimique. Edition Tec & Doc, Lavoisier. Paris. P: 270.
- AVIRON-VIOLET, P; BARET, J.L; BERTRAND, C; BLAZY, B; BOUVIER, F. 1982.** Les enzymes: Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. P: 23; 123; 140-153.
- BAATHE, E; SODERSTROM, B.E. 1980.** Comparaisons of the agar-film and membrane filtermethods for the estimation of the hyphal lengths in soil, with particular reference to the effect of magnification *.Soil Biol. Biochem.* **12**: 385-387.
- BARKER, T.W; WORGAN J.T. 1981.** The application of air. Lift fermenters to the cultivation of filamentous fungi. *Europeen J. App. Microbiol. Biotechnol.* **13** P: 77-83-148.
- BATTAGLINO, R.A; HUERGO, M; PILOSO, A.M.R; BARTHOLOMAI, G.B. 1991.** Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 292-296.
- BENKAKOUZ, M. 2002.** production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'orange. Optimisation du milieu de culture, purification partielle et étude des propriétés physico-chimique de l'enzyme. Thème de magistère.
- BLOCHL, E; RACHEL, R; BURGRAFF, S; HAFEND BRADL; JANNASCH, H.W & STETTA, O.1997.** *Pyrolobus fumarii* gen and sp. Nov presents a novel group of and archea. Extending the upper temperature limite for life to 113°C *.Extremophiles* .**1** : 14-22.
- BOIRON, P. 1996.** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P: 13-19-69-79.
- BOTTON, B; BRETTON, A; FEVER, M; GAUTIER, S; GUY, PH; LARPENT, J.P; REYMOND, P; SANGLIER, J-J; VAYSSIER, Y & VEAU, P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.

BOTTON, B; BRETON, A; FEVRE, M; GAUTHIER, S ; GUY, P; LARPENT, J.P; REYMOND, P; SANGLIER, J.J; VAYSSIER, Y & VEAU, P. 1999. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.

BOUCHERIT, Z. 2011. *Production et étude des propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de sebkha.* Mémoire de Magister en Biotechnologie microbienne. Université Mentouri. Constantine.

BOUCHET, P.H; GIRAUD, J.L & VIHARD, J.1999. Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. Masson (ed). p: 5-10.

BOUIX, M; LEVEAU, JY. 1999. production des enzymes. In Scriban R (Ed Biotechnologie).Edition Lavoisier. P: 344-400.

BOURGEOIS, C.M; MESCLE, J.F; ZUCCA, J. 1989. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P: 216-244.

BUHOT, D. 1973. Echantillonnage de sols .Conservation et préparation des échantillons. Problème statistique. *Ann. Phytopathol.* **5**: 296- 298.

CALK, P; TAKAÇ, S; CALK, G & OZDAMAR, T. H. 2000. Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enz. Microbiol. Technol.* **26** (1): 45-60.

CAMUZARD; J.P. 2004. Le sol, un milieu complexe au pouvoir épurateur limité *sol*. ENGREF Paris. P: 1-13.

CHASSEUR, C ; NOLARD, N. 2003. Les champignons de l'habitat 1ère partie : introduction a la mycologie, risques pour la sante, EXPERTISES.P:3.4.7.8.

CIRAD. 2004. Cité par **BOUCHERIT, Z. 2011.**

COLWELL, R.R; GRIGOROVA, R. 1989. Methods in microbiology. (Ed) St E dimundsburt press limited. Great Britain. P: 133-138.

- COONEY, D.G & EMERSON, R. 1964.** Thermophilic fungi . An account of their biology activities and classification W.H Freeman & Co –San Francisco – Clife.
- Brock, T.D. 1995. The road to yellow stone and beyond . *Annu. Rev. Microbiol.* **49** : 1-28.
- DALEV, P.G. 1994.** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, **48**; 265–267.
- DAVET, P. 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P: 52-57.
- DELGADO-JARANA, J; RINCON, A. M & BENITEZ, T. 2002.** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology.* **148**: 1305-1315.
- DUBOIS, M; GILLES, K.A; HAMILTON, J.K; REBERS, P.A; SMITH, F. 1956.**Colorimetric method for determination of sugar and related substances.*Anal. chem.* **28** (3): 350-356.
- FRAZIER, W.C. 1967.** Food microbiology. Academic presse. London. P: 3-429.
- GARCIA-CONESA, M.T; KROON, P.A; RALPH, J; MELLON, F.A; COLQUHOUN, I.J; SAULNIER, L; THIBAUT, J.F & WILLIAMSON, G. 1999.** Acinamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of three diferulic acids. *Eur. J. Biochem.* **266**: 644-652.
- GAMS, W; HAEKSTRA, E.S. & APTROOT, A. 1998.**CBS.Course of mycology. Centralbureau voor. Schimmelcultures Baarns. The Netherlabnd.
- GARCIA-GOMEZ, M.J; HUERTA-OCHOA, S; LOERA-CORRAL, O; PRADO-BARRAGAN, L.A. 2009.** Adventages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food chem.***112**: 604-608.
- GUIRAUD, J. P. 1998.** Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P : 7-330.
- HAMMER, E; KROWAS, D; SCHAFER, A; SPECHT, M; FRANCHE,W & SCHAUER, F. 1998.**Isolation and characterisation of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, P: 2215-2219.
- HAUSSNER, K; HILGENDOR, P; HOFBAUER, C; DEMEESTER, J & LAUWERS, A. 1996.** New international F.I.P. method for the determination of the activity of *Asprgillus oryzae* proteases. *Pharmazie.* **51** (12): 946-50.

- HALEWYN et al. 2002.** Cités par **ABDELAZIZ, W.2006.**
- HARRIGAN, W.F; MCCANCE, M.E. 1976.** Laboratory methods in food and dairy microbiology .academic press. London. P: 21-277.
- HARTLEY, B.S. 1960.** Proteolytic enzymes. Ann.Rev. Biochem. P: 29-45.
- HAWKSWORTH, D.L; KIRK, P.M; SUTTON, B. &PEGLER, D.N. 1995.** Dictionnaire of the fungi, 8th ed. CAB.International Walling Ford.UnitedKingdom.
- HOOG ; GUARRO. 1995.** Cite par **ABDELAZIZ,W. 2006.**
- ICHIDA, J.M; KRIZOVA, L; LEFEBVRE, C.A; KEENER, H.M; ELWELL, D.L; BURT, JR E.H. 2001.** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol. Methods.*, **47**; 199–208.
- JULIEN, R. 2002.** Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention.* **25 (4)**: 7-8.
- KUDRYA, V.A; SIMONENKO, I.A. 1994.** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**; 505–509.
- KRESZE, G.B. 1991.** Proteases during purification. *Bioprocess-technol.* **12** : 85-120.
- LEVEAU, J.Y; BOUIX, M. 1993.** Les moisissures. p : 112-163. In : Florent J.(ed), Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Edition Tec et Doc-Lavoisier Apria.
- LCLERC, H; MEYER, A & DEIANU, J. 1955.** Cours de microbiologie générale (nouveau programme). Ed Doin. P: 77.
- LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J; FARR, A.L & RANDALL, R.J. 1965.**Protein measurement with the folin phenol reagent.*J. Biol. Chem.* **193** (1): 265-275.
- MAHESHWARI, R; BRADWA, J.G & BHAT, M.K. 2000.** Thermophilic fungi their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviws.* **64(3)**: 461- 488.
- MARTINELLI, S.D; KINGHORN, J.R. 1994.** Aspergillus: 50 years on. Elsevier. Amsterdam. P. 586-649.

- MCKENZIE, H.A. 1971.** Milk proteins chemistry and molecular biology. (Ed) Berkeley square. London. P: 246-249.
- 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*. *Sci. Aliments*. **19** (6) : 663-675.
- MIHAIL, J.D; ALCOREN, S.M. 1987.** *Marcophomina phaseolma* spatial patterns in cultivated and sampling strategies .*Phytopathology* .**77**: 1126-1131.
- MOODIE, P. 2001.** Traditional baking enzymes-proteases. *Enzyme Development Corporation*.**212** :736-1580.
- MOUCHACCA, J. 1999.** Thermophilic fungi: present taxonomic concepts in thermophilic moulds in biotechnology, (edn) Johri. S.N. Satyanarayana and Oren J. Kluwer. Dordrecht.
- NICKLIN, J; GREAME-COOK, K; PAGET, T & KILLINGTON, R.1999.** *Essentiel en microbiologie*, (edn) BERTI. Paris.
- NICKLIN, J; GRAEME-COOK, K; PAGET, T & KILLINGTON, R. 2000.** L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P : 210-216.
- OTENG-GYANG, K. 1984.** Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud. Lavoisier. Paris. P : 26-42.
- PELMONT, J. 1995.** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P : 619-655.
- PEUK, A.D. 2000.**The chemical composition of xylen sapin *Vitis vinifera* L.cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and asinfluenced by nitrogen fertilizer.*Am.Enol.Viticult*.**51**: 329-339.
- PHAFF, H.J; STARMER, W. T. 1987.** Yeast associated with plants, insects and soil *in*: rose, A.H; Harrison, J.S. (eds).the yeast V1,biology of yeast. 2nd edition Academic Press. London. P: 123-174.
- PITT, J.I; HOCKING, A.D. 2009.** Fungi and food spoilage. Springer. New York.
- POCHON, J; TARDIEUX, P. 1962.** Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition la tourelle. St. Mandé. 110 - 111.

- RAO, M.B; TANKSALE, A.M; GHATGE, M.S & DESHPANDE, V.V. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biology Rev.* **62** (3): 597-635.
- REGNAULT, J.P. 1990.** *Microbiologie générale*, (edn) Decarie. Paris.
- RIVIERER, J. 1970.** *Microbiologie industrielle et génie biochimique*, (edn) Masson et Cie.
- RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S; MAYSLISH, E & STEINBERGER, Y. 2005.** Vertical Distribution the free living Amoeba Population in soil under desert Shrubs in the Ngev. *Applied and Environmental Microbiology* . **71(4)**: 2053-2060.
- RONALD, K.S; HAROLD, S.L. 1970.** Methods for the isolation of proteolytic marine bacteria. *Appl. Microbiol.* **20**: 991–992. In: Shivanand P., Jayaraman G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium *Bacillus aquimaris VITP4* isolated from Kumta coast. *Process Biochem.***44**: 1088–1094.
- SAADOUN, I; EL MOMANI, I. 1997.** Stryptoyces from Jordan soil active against *Agrobacterium tumefasciens*. *Actinomycetes* . **8(12)**: 29-36.
- SAMSON, R.A; HOEKSTRA, E.S. 1988.** Introduction to food –born fungi, 3 rdedn Centra Albureau Voor .Schimelcultures. Baane. The Netherlands.
- SCHNURER, J; CLARHOLM, M; ROSSWALL, T. 1985.** Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biol. Biochem.* **17** :611-618.
- SCRIBAN, R. 1993.** Biotechnologie. 4eme edition. Technique et documentation. lavoisier. Paris. P. 30-695.
- SCRIBAN, R. 1999.** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.
- SENAL, J; FRASELLE, J; IMPENS, R; KUMMERT, J; LEPOIVRE, PH ;MEULMANSM ; SEILLEUR, P ;VANDEVEKEN, J & VISEUR, J. 1993.** *Traité de pathologie végétale*. Gembloux. Belgique.
- Societe d’editions scientifiques. 1988.** La recherche. Paris.

- SUMANTHA, A; LARROCHE, C; PANDEY, A. 2006.** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, **244**; 211–220.
- TENSEY, M.R; BROCK, T.D. 1978.** Microbial life at high temperature, aerobological aspect, (edn) Kushner. Life in extreme environments. Academic press.Ltd. London .United Kingdom
- Mouchacca, J. 1997. Thermophilic fungi . Biodiversity and Taxonomic Status. *Cryptogamies . Mycol.***18**:19-69.
- TRAP, C ; BOIREAU, P. 2000.** Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.* **31** : 461-471.
- TSUYOSHI, N; FUDOU, R; YAMANAKA, S; KOZAKI, M; TAMANG, N; THAPA, S & TAMANG, J.P. 2004.** Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation. *International Journal of Food Microbiology.* **99**. P: 135-146.
- UCHIKOBA, T; MASE, T; ARIMA, K; YONEZAWA, H & KANEDA, M. 2001.** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* **382**: 1509-1513. Masson. Paris. P. 12-426.
- UI-HAQ, I; MUKHTAR, H; DAUDI, S; SIKANDER, A & QUADEER, M. A. 2003.** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions.*Biotechnology* **2** (1): 30- 36.
- ULACIO, D; PEREZ, C; PINEDA, Y.J. 1997.** Mycoflora in tobacco plant roots (Nicotianatabacum) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.*, **9**(1), p: 3-11.
- URBANEK, H; YIRDAW, G. 1984.** Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* **33** (2): 131.
- WALSH, C. 2006.** posttranslational modification of proteins.P.490.

Annexes

ANNEXES

Annexe 01 : EAU PHYSIOLOGIQUE

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

Annexe 02 : POTATO DEXTROSE AGAR (PDA)

Pomme de terre200 g
Glucose20 g
Agar15 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 1 heure
- D'autre part, faire fondre l'agar-agar dans 500 ml d'eau distillée chaude.
- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
- Ajouter le glucose.
- Ajuster le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121°C / 20 min.

Annexe 03 : LAIT GÉLOSÉ À 20% D'AGAR

Lait écrémé100 g
Agar-Agar20 g
Eau distillée.....1000 ml

- Dissoudre l'agar-agar dans de l'eau distillée chaude
- Agiter jusqu'à homogénéisation pour obtenir l'eau gélosée
- Faire l'autoclavage à 121°C pendant 20min,
- et juste avant l'utilisation du milieu, ajouter le lait écrémé stérile.

Annexe 04 : BLEU COTON AU LACTOPHENOL

- Phénol en cristaux..... 20 g
- Acide lactique (commercial concentré)..... 20 g
- Glycérine..... 40 g
- Eau bidistillée..... 20 g
- Bleu de méthyle..... 0,5 g

Annexe 05 : DETERMINATION DE LA MATIERE SECHE (MS)

Le taux de matière sèche exprimé en pourcent de l'échantillon est donné par la formule suivante :

$$(P_0 - P) \times 100 / P_0$$

Dont P_0 : poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

P : poids en gramme, de la prise d'essai séchée ;

$MS (\%) = 100 - H (\%)$ d'où H : humidité

Annexe 06 : DETERMINATION DES CENDRES

Le taux de la matière organique (MO) exprimé en pourcent de l'échantillon est donné par la formule suivante :

$$(P_0 - P) \times 100 / P_0$$

Dont P_0 : poids initial en gramme de la prise d'essai ;

P : poids en gramme du résidu gris résultant de l'incinération ;

$C (\%) = 100 - MO (\%)$ d'où C : cendres

Annexe 07: DOSAGE DES PROTÉINES TOTALES

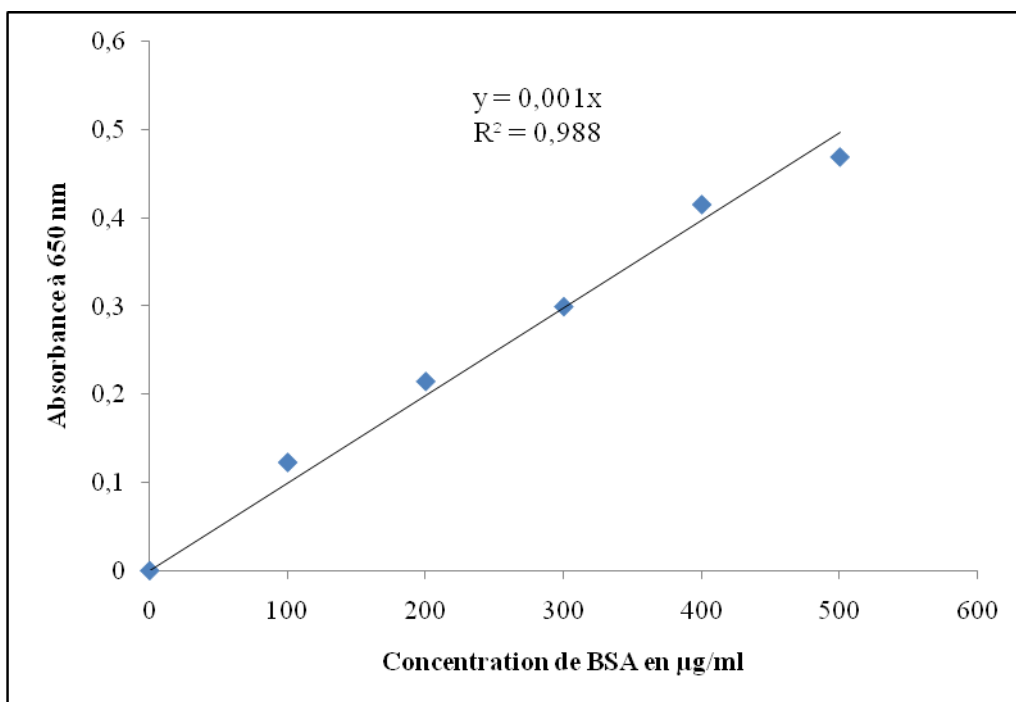
****Réactifs :***

- Solution A : Na_2CO_3 2 % dans NaOH 0,1 N
- Solution B : Tartrate double de Na et K 2 % dans de l'eau distillée
- Solution C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 % dans de l'eau distillée
- Solution D: 0,5 ml de la solution C + 0,5 ml de la solution B + 50 ml de la solution A
- Réactif du Folin-Ciocalteu dilué au 1/3ème

****Protocole :***

Ajouter à 1ml d'échantillon, 5ml de la solution D. Agiter et laisser reposer 10min à température ambiante. Ajouter 0,5 ml de réactif du Folin et agiter. Laisser la réaction colorée se développer 30 min à l'obscurité. Lire l'absorbance à 650nm.

N.B : La courbe d'étalonnage est établie avec une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) dont les concentrations varient de 0-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Courbe d'étalonnage des protéines

Annexe 08 : DOSAGE DES SUCRES

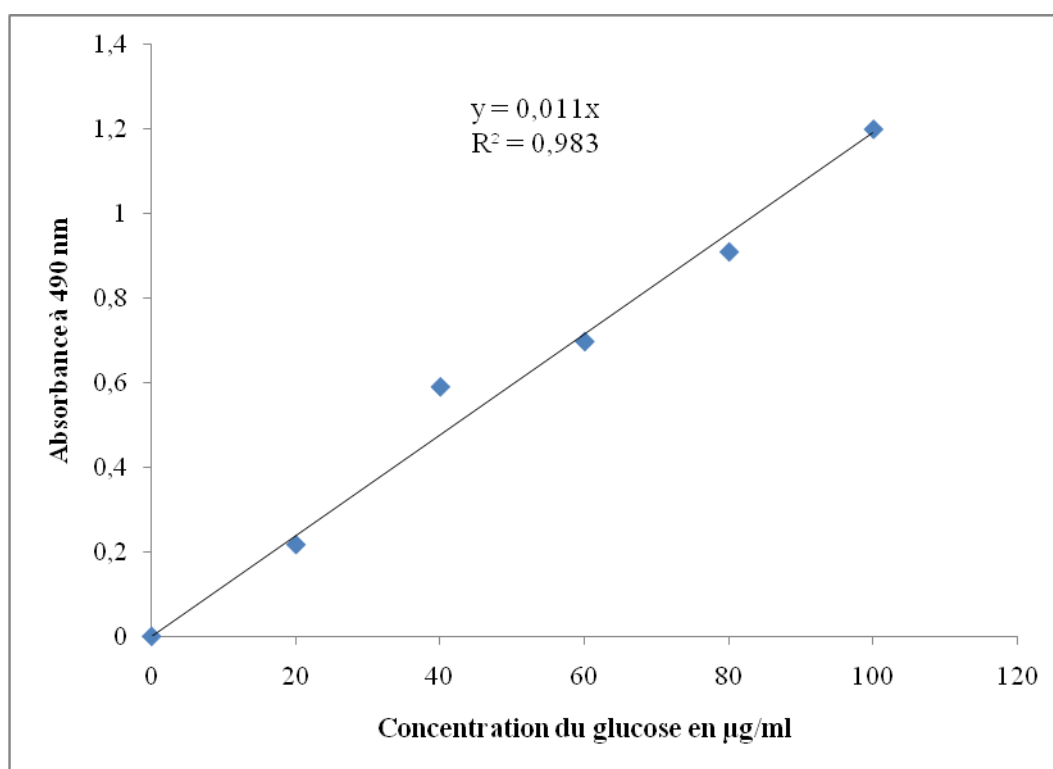
****Réactifs :***

- Solution phénol à 5% dans l'eau distillée
- Acide sulfurique (H₂SO₄) à 95% pureté et de densité 1.83

****Protocole :***

Ajouter à 1ml d'échantillon, 1ml de solution phénol puis 5ml de l'acide sulfurique. Agiter vigoureusement au vortex. Le mélange réactionnel est laissé reposer 10min à température ambiante. Ensuite, il est incubé au Bain Marie à 30°C pendant 30min. Lire l'absorbance à 490 nm.

N.B : La courbe d'étalonnage est établie avec une solution mère de glucose dont les concentrations varient de 0-100 µg/ml.



Courbe d'étalonnage des sucres

Résumés

ملخص

الهدف المبين من هذه الدراسة هو تحديد السلالات الفطرية المنتجة للانزيمات المحللة للبروتينات (البروتياز)، والمعزولة من التربة المحيطة بمنطقة الينابيع الحارة من حمام دباغ (قالمة). للقيام بذلك، تم أخذ عينات من التربة من موقعين مختلفين في المنطقة؛ الموقع الأول هو التربة المحيطة بالينبوع، في حين أن الثاني هو تربة الأشجار الموجودة بمنطقة الينبوع. بعد القيام بالتحقيقات اللازمة والزرع في الوسط المعيشي PDA تم عزل ثلاث ومانتان سلالة من العفنات. أجري اختبار نشاط الأنزيم البروتيني للسلالات المعزولة على أطباق بتري تحتوي على الحليب و الأجار (agar) بتركيز 20% من الأجار. يتم التعرف على السلالات البروتينية بوجود هالة شفافة حول المستعمرة. وبالتالي، أظهرت النتائج إنتاج البروتياز عند ثلاث و اربعون سلالة من الثلاث و المائة المختبرة، عشرة سلالات مع نشاط بروتيني هام، قطر هالاتها أكبر من أو يساوي 7 مم، وخمسة عشر مع وجود نشاط بروتيني منخفض، قطر هالاتها أقل من 3 مم. هاته السلالات قد اختيرت في وقت لاحق لتحديد هويتها. لهذا السبب، أجريت فحوصات عيانية و مجهرية معمقة لوصف الثلاث و الاربعون سلالة بروتينية الى خمسة عشر جنسا مختلفا : الرشاشيات *Aspergillus* ، فيوزاريوم *Fusarium* ، البنسليوم *Penicillium* ، الرازبة *Rhizopus* ، العفنة *Mucor* ، الترايكوديرما *Trichoderma* ، الشعيرية *Trichophyton* ، المبعثرة *Cladosporium* ، الدخناء *Gliocladium* ، الكبوكبية *Verticillium* ، المتبدلة *Paecilomyces* ، ذهبية الدعامات *Aureobasidium* ، التيربية *Geotrichum* ، البوغانة *Scedosporium* و *Onychocola* . بمقارنة الموقعين من التربة، أظهرت النتائج تموطن العفنات و بخاصة السلالات البروتينية بصفة اكبر نسبيا في الموقع الثاني بالمقارنة مع الموقع الأول. ويرجع ذلك إلى مسألة غنى تربة الأشجار بالمادة العضوية ومن ثم بالبروتينات، وهو ما أكدته الدراسة الفيزيوكيميائية للتربة المنزوعة. فائدة هاته السلالات تتمركز في إمكانية تطبيقها في مختلف المجالات الصناعية التي تتطلب وجود الانزيمات المقاومة للحرارة.

الكلمات المفتاحية : العزلة، تحديد الهوية، العفنات، الينابيع الحارة، الأنزيم البروتيني.

Abstract

The objective outlined in this approach is to identify fungal strains producing proteases, isolated from soil surrounding a hot spring region of Hammam DEBAGH (Guelma). For this, samples of soil are taken from two different sites of the region; the first site is a soil surrounding the source, while the second is a soil trees located more or less near to the source. After completion of the dilutions and plating on PDA, two hundred three mold strains were isolated. The test of protease activity of the isolates was conducted on Petri dishes containing milk agar at a concentration of 20% of agar. Proteolytic strains are recognized by the presence of a transparent halo around the colony. Thus, the results showed the production of proteases in forty three strains. Ten strains with significant proteolytic activity, whose diameter of their halos is greater than or equal to 7 mm and fifteen having a low activity, whose diameter of their halos is less than 3 mm. These strains are selected subsequently to identify them. Indeed, depth macroscopic and microscopic examinations were performed to characterize the forty three proteolytic strains in fifteen different genera: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Scedosporium* and *Onychocola*. By comparing the two sites of soil, the results shown a populating of mold including proteolytic strains more greater in the second site to the first site. This is due to the wealth of soil trees in organic matter and then in protein, which was confirmed by a physicochemical study of soils collected. The interest in these strains resides in the possibility of their application in various industrial fields which require the presence of of thermostable enzymes.

Key- words : Isolation, identification, molds, hot springs, protease.

**AMOURA Amina
BAZ Siham**

Date de soutenance : 25/06/2014

Thème :

Identification des souches fongiques productrices des protéases, isolées à partir de source chaude

Résumé :

L'objectif souligné dans cette approche, consiste à identifier des souches fongiques productrices des protéases, isolées à partir des sols environnant d'une source thermale de la région de Hammam DEBAGH (Guelma). Pour cela, des échantillons du sol sont prélevés de deux sites différents de cette région ; le premier site est un sol environnant de la source, tandis que le deuxième est un sol des arbres situant plus ou moins proche de la source. Après réalisation des dilutions et ensemencement sur PDA, deux cent trois souches de moisissures ont été isolées. Le test d'activité protéasique des isolats a été effectué sur des boîtes de Pétri contenant du lait gélosé à concentration de 20% d'agar. Les souches protéolytiques sont reconnues par la présence d'un halo transparent au tour de la colonie. De ce fait, les résultats ont révélé la production des protéases chez quarante trois souches parmi cent trois testées. Dix souches possédant une activité protéolytique importante, dont le diamètre de leurs halos est supérieur ou égale à 7 mm, et quinze présentant une activité faible, dont le diamètre de leurs halos est inférieur à 3 mm. Ces souches sont ensuite sélectionnées afin de les identifier. En effet, des examens macro et microscopiques approfondis ont été réalisés permettant ainsi de caractériser les quarante trois souches protéolytiques en quinze genres différents : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Geotrichum*, *Scedosporium* et *Onychocola*. En comparant les deux sites du sol, les résultats ont montré un peuplement en moisissures et notamment en souches protéolytiques plus important dans le deuxième site par rapport au premier site. Ceci est du à la richesse du sol des arbres en matières organiques et alors en protéines, ce qui a été confirmé par une étude physicochimique des sols prélevés. L'intérêt de ces souches réside dans la possibilité d'application de leurs enzymes dans différents domaines industriels exigeant la présence d'enzyme thermostables.

Mots-clés :

Isolement, identification, moisissures, sources thermales, protéase.

Laboratoire de recherche :

Laboratoire de Biologie et Environnement
Université Constantine 1

Jury d'évaluation :

Présidente :	Mme. MOSBAH F.	M.A. Univ. Constantine 1
Rapporteur :	Melle. BELMESSIKH A.	M.A. Univ. Constantine 1
Examinatrice :	Melle. LAHLAH F.Z.	M.A. Univ. Constantine 1