



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de  
la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :

**Lamia BEN KHERARA et Nacira BEN BOUZID**

Le : mercredi 30 septembre 2020

### Thème

## Activités hydrolases des moisissures isolées du sol des sources thermales

---

### Jury :

M.	Redouan REBAI	MCB	Université de Biskra	Président
Mme.	Fatiha BENGUERAICHI	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Widade BOUGUENOUN	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 /2020

## Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah tout puissant, qui nous a donné le courage, la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

De sincères remerciements se doivent d'être adressés à notre honorable encadreur Mme. Fatiha BENGUERAICHI pour ses orientations et ses aides offertes lors des différentes étapes de la réalisation de ce travail. Et pour la confiance qu'elle nous a accordée tout au long de cette étude.

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect au jury pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce mémoire.

Mes vifs remerciements vont à notre présidente de jury ....., d'avoir bien voulu présider le jury de soutenance de ce mémoire.

Un merci particulier à l'examineur..... pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Nous remercions toute l'équipe de laboratoire de Microbiologie appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Khider de Biskra, surtout Mme. Moufida, qui nous à accueillis et mis à notre disposition le matériel et les réactifs nécessaires pour mettre en œuvre de la partie expérimentale de ce mémoire.

Nous remercions très sincèrement les propriétaires de :

Hamam El-Hadjeb willaya de Biskra, hamam Soltan et hamam les frères Mnacer, Willaya de Mila. qui nous a permis de faire l'échantillonnage facilement.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mon très cher père Mouloud, qui m'a supporté, aidé, encouragé et m'a donné la force et la volonté de faire du bien pour mes études et de continuer ce travail. Merci papa pour vos efforts fournis jours et nuits.

A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoirs, à la source d'amour qui m'a béni par ces prières, ma mère Houria.

A mes chères sœurs et frères : Assia, Imen, Hichem et le petit Yahia.

A mes tantes, mes oncles, et toutes les personnes de ma grande famille et une spéciale dédicace à ma tante Warda qui m'a toujours conseillé et encouragé à faire le mieux.

A mes chères et meilleures amies : Dhaouia, Hanen, Imene, Nedjla, et surtout à ma binôme Nacira. Je suis très heureuse et fière de ces années que j'ai passées avec vous, des liens créés et des nouvelles amitiés, ainsi que pour les moments que nous avons passés ensemble et ceux encore à venir.

A toutes la promotion Master microbiologie appliquée et mes amis de l'autre promotion.

Tous nos professeurs qui nous ont enseigné et tous ceux qui nous sont chers.

**LAMIA**

## Dédicace

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui m'ont poussé et qui m'ont accompagné tout au long de ces 5 ans

A la personne la plus chère de mon cœur, ma mère, Abida, qui m'a encouragé à aller de l'avant et m'a donné tout son amour pour reprendre mes études

Je prie à mon père avec miséricorde et pardon

A mes chers frères Mohamed et Djamai, et ma chère Sœur Donia

A mon fiancé (BADI)

A mes tantes Razika et Kanza, et ma spécial grand-mère, Yamina

A mes oncles Barkat, Messaude, Laid, kamel et Bachir

A tout la famille « BENBOUZID » et « OUALHA »

A mes chères amies : Hanene, Imene, Nedjla, Dhauia, Chaima et une dédicace spéciale à « Lamia », une source de courage tout au long des moments de travail et toujours à coté de moi, merci.

**NACIRA**

---

**Table des matières****Liste des tableaux****Liste des figures****Liste des abréviations****Introduction** ..... 1**Première partie. PARTIE BIBLIOGRAPHIE****Chapitre 1. Moisissures**.....2

1.1. Généralité ..... 2

1.2. Moisissures thermophiles ..... 2

1.3. Structure cellulaire ..... 3

1.4. Classification ..... 3

1.4.1 Zygomycètes ..... 4

1.4.2. Ascomycètes.....4

1.4.3. Basidiomycètes ..... 4

1.4.4. Deutéromycètes ..... 4

1.5. Conditions de croissance des moisissures ..... 5

1.5.1. Carbone.....5

1.5.2. Azote.....5

1.5.3. Elément minéraux ..... 5

1.5.4. pH.....5

1.5.5. Température.....6

1.7. Intérêt des moisissures ..... 6

1.7.1. Intérêt alimentaire.....6

1.7.2. Intérêt pharmaceutique.....6

1.7.3. Intérêt chimique.....7

**Chapitre 2. Enzymes**.....8

2.1. Généralité.....8

2.2. Classification des enzymes.....8

2.3. Enzyme hydrolases.....9

2.3.1. Pectinase.....9

---

2.3.2. Cellulase.....	9
2.3.3. Amylase.....	9
2.3.4. Lipases.....	10
2.3.6. Lactase.....	10
2.4. Application des enzymes.....	11

## **Deuxième partie. PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>Chapitre. 3 Matériel et Méthodes .....</b>	<b>13</b>
3.1. Description des zones d'échantillonnage .....	13
3.2. Echantillonnage.....	13
3.3. Préparation des dilutions.....	14
3.4. Enrichissement.....	14
3.5. Isolement.....	15
3.6. Conservation de souches obtenues.....	15
3.7. Identification.....	15
3.7.1. Identification macroscopique.....	15
3.7.2. Identification microscopique.....	15
3.8. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés.....	16
3.8.1. Activité cellulolytique.....	17
3.8.2. Activité pectinolytique.....	18
3.8.3. Activité lipolytique.....	18
3.8.4. Activité protéolytique.....	18
3.8.5. Activité lactosique.....	18
3.8.6. Activité amylolytique.....	18
<b>Chapitre. 4. Résultats et Discussion.....</b>	<b>19</b>
4.1. Isolement .....	19
4.2. Identification.....	19
4.2.1. Identification macroscopique.....	19
4.2.2. Identification microscopique.....	19

4.3. Mise en évidence des activités hydrolases sue milieux gélosés.....	32
4.3.1. Activité cellulolytique.....	32
4.3.2. Activité pectinolytique.....	32
4.3.3. Activité lipolytique.....	32
4.3.4. Activité protéolytique.....	33
1) Lait gélosé.....	33
2) Gélatine.....	33
4.3.5. Activité lactosique.....	33
4.3.6. Activité amylolytique.....	33
<b>Conclusion.....</b>	<b>35</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>37</b>
<b>Annexes</b>	

---

**Liste des tableaux**

Tableau 1. Principales classes d'enzymes selon Sine (2010).....	8
Tableau 2. Utilisation des enzymes hydrolase dans différents domaines. ....	11
Tableau 3. Nombre de souche fongiques isolés à partir d'échantillons de sol.....	19
Tableau 4. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 01. ....	20
Tableau 5. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 02. ....	21
Tableau 6 . Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 03. ....	22
Tableau 7. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 04. ....	23
Tableau 8. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 05. ....	24
Tableau 9. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 06. ....	25
Tableau 10. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 07. ....	26
Tableau 11. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 08. ....	27
Tableau 12. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 09. ....	28
Tableau 13. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 10. ....	29
Tableau 14. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech11. ....	30
Tableau 15. Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech12. ....	31



**Liste des figures**

Figure 1. Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium. .... 3

Figure 2. Présentation géographique des zones de prélèvement d'échantillons ..... 13

Figure 3. Préparation des dilutions..... 14

Figure 4. Technique de scotche..... 16

Figure 5. Illustration de la technique de l'activité enzymatique ..... 17

Figure 6. Pourcentage d'enzymes produites par les souches testées ..... 34

**Liste des abréviations**

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**CMC** : CarboxyMéthylCellulose

**CYA**: Czapek Yeast Agar

**EC**: Enzyme Commission

**Ech**: Echantillon

**MEA**: Malt Extrat Agar

**PDA**: Potato Dextrose Agar

**pH** : Potentille d'hydrogène

**ppm** : Partie Par Millions

# **Introduction**

L'utilisation industrielle de produits chimiques est toujours un sujet d'actualité. Les alternatives biologiques, compatibles avec l'environnement, sont de plus en plus privilégiées. Parmi ces alternatives, l'emploi d'enzymes dans industrie est très rentable à la fois sur le plan énergétique et l'aspect environnemental.

Les enzymes présentent des propriétés et des spécificités diverses. Sont capables de dégrader et de transformer différents composés se trouvant dans l'environnement du vivant. Un avantage pouvant être utilisé par certaines industries dans différents domaines. L'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et ouvre des perspectives nouvelles. En effet, certaines industries n'ont vu le jour que grâce à la mise sur le marché d'enzymes purifiés.

La plus grande partie du marché des enzymes est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les lipases, les cellulases et les pectinases qui sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (Botton et *al.*, 1990), grâce à une dissémination efficace, une croissance rapide et un arsenal enzymatique très développé.

Les champignons thermophiles, vue la vitesse de croissance élevée à 50°C. Ils ont développés des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimique auxquelles ils font face (température, pression, salinité et pH). Les enzymes qui participent à ces stratégies seront thermostables et d'un grand intérêt pour intervenir dans les procédés industriels qui exigent l'emploi d'enzymes spécifiques et non dénaturés en conditions de haute température (Gregoire et *al.*, 2009).

De ce fait, les principaux objectifs du présent travail sont :

- L'isolement et l'identification macroscopique et microscopique des souches des moisissures issues du sol des sources thermales (Biskra et Mila) ;
- Mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires de souches isolées (protéase, amylase, cellulase, lipase, lactose et pectinases) sur milieux gélosés appropriés.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **Chapitre 1.**

# **Moisissures**

## 1.1 . Généralité

Les moisissures sont des champignons microscopiques eucaryotes pluricellulaires de règne des mycètes appelés les -vrais- champignons ou Eumycètes (Regnault, 1990 ; Chasseur et Nolard, 2003). Il désigne tous les champignons d'aspects filamenteux ou poudreux (Chantal et Huguette, 2006).

Ce sont des thallophytes hétérotrophes (non photosynthétiques) et immobiles. Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993).

Les mycètes sont principalement des organismes terrestres, bien que certains soient marins ou d'eau douce (Prescott et *al.*, 2013). Ils peuvent contaminer les milieux où elles trouvent une source de carbone et d'azote comme les céréales, les produits laitier, les matières organique en décomposition et les papiers aussi. Beaucoup d'espèces vivent dans les habitats froids, chauds, hyper-salés ou autres habitats inhospitaliers (Isaac et *al.*, 1993).

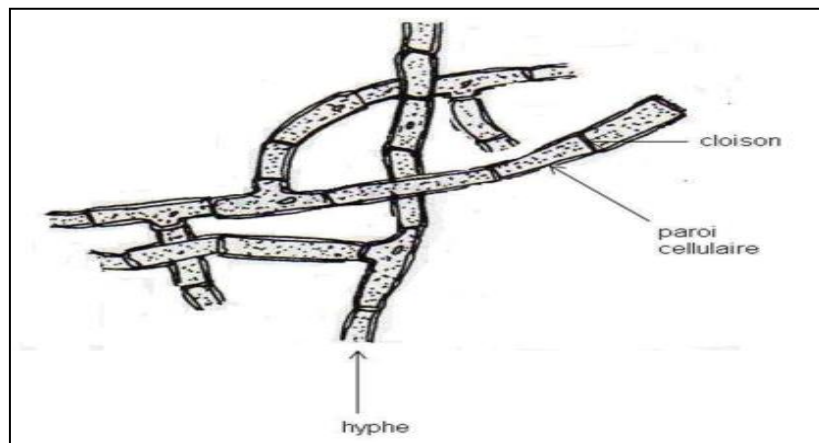
Ils sont souvent dotés de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique ...) qui en font des agents de utiles, affinage des fromages, production d'enzymes (Meyer et *al.*, 2004).

## 1.2. Moisissures thermophiles

Parmi les organismes eucaryotes, seulement quelques espèces de mycètes peuvent se développer à des températures situées entre 45 °C et 55 °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). Il existe des champignons dits thermorésistants pouvant se développer jusqu'à 80°C comme *Aspergillus fischeri* (Conner et Beuchat, 1987). Par ailleurs, Tansey et Brock (1978) ont répertorié 30 espèces fongiques croît à des températures élevées modérément (60°C à 62°C). Zygomycètes (*Rhizomucor miehi*), Ascomycètes (*Chaetomium thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Dactylomyces thermophilus*), Basidiomycètes (*Phanerochaet chrysosporium*). De plus, les champignons thermophiles sont distribués sur toutes les latitudes, même sur les sols de « Antarctique » où les températures sont inférieures à 0°C pendant presque toute l'année (Ellis, 1980).

### 1.3. Structure cellulaire

Les moisissures possèdent un appareil végétatif dépourvu de tiges, de racines et de feuilles appelé thalle (Botton *et al.*, 1990), il sont constitués de longs filament fins et ramifiés, à structure cellulaire appelé hyphes qui forme un mycélium (Prescott *et al.*, 2013). Ces hyphes peuvent être cloisonnés (septés ou segmentés) ou non cloisonnés (siphonnés), qui se termineront par un sporange (cellule mère qui produit et qui contient des spores). Dans la majorité des cas, la cellule végétative d'un hyphe contient plus d'un noyau, parfois de centaines. La paroi de la plupart des moisissures est chitineuse (Madigan et Martinko, 2007).



**Figure 1.** Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium (Chabasse *et al.* 2002).

### 1.4. Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène mais se situent en divers familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Mais il est justifié du fait que l'œil ne peut malheureusement pas identifier les champignons jusqu'à l'espèce pour un grand nombre d'entre eux (Dugat, 2014).

Depuis un certain temps, les systématiciens remanient la classification à l'aide des caractères moléculaires, ce qui prouve si besoin est que ces séquences de gènes contiennent bien de l'information, et que les séquençages d'ADN, une multitude de nouveaux caractères potentiels est disponible pour ceux qui veulent classer des taxons (Selosse et Durrieu, 2004). La biologie moléculaire qui était le plus proche de la clinique et des aspects mycologiques (Dugat, 2014), et complète les méthodes traditionnelles de classification basées sur l'observation des caractères morphologiques (macroscopiques et microscopiques).



### 1.4.1 Zygomycètes

Ce sont des champignons possédant un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexués (Guiraud, 1998); la plupart sont des saprophytes vivant surtout dans les sols mais certains sont parasites (Bousseboua, 2005). La famille la plus importante dans cette classe est celle des mucorales (Leveau et Bouix, 1993; Boiron, 1996). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (Guiraud, 1998).

### 1.4.2. Ascomycètes

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux et des moisissures (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dont les ordres les plus connus sont *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1989). Certaines espèces sont des parasites de végétaux, de l'homme et d'autres altèrent les aliments par la production des toxines (Tabuc, 2007). Elles ont une grande importance économique car certaines espèces sont capables de dégrader des substrats celluloseux.

### 1.4.3. Basidiomycètes

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles ont un thalle cloisonné (Salimi, 2011) et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores) formé par bourgeonnement à l'apex de cellules allongées appelées basides, c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (Botton et al., 1990).

### 1.4.4. Deutéromycètes

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Ils sont hétérotrophes et exigent une matière organique préformée morte ou vivante (Kiffer et Morelet, 1997). Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (Frazier, 1967; Punt et al., 2002).

## **1.5. Conditions de croissance des moisissures**

Le développement des moisissures est dépendant de facteurs nutritifs et environnementaux. Elles sont des hétérotrophes exigent donc la présence des éléments nutritifs de base tels que :

### **1.5.1. Carbone**

Qui 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 % (Rivière, 1975 ; Scriban, 1993).

Pratiquement, tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart de ces dernières peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000).

### **1.5.2. Azote**

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniac sous forme de sels ( $\text{NH}_4^+$ ). Alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate. D'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt *et al.*, 2000).

### **1.5.3. Eléments minéraux**

La présence des ions minéraux et métaux 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 ou moins différentes selon l'espèce (Uchicoba *et al.*, 2001).

Le développement des moisissures est dépendant de l'environnement. Le facteur le plus important est l'humidité, elle influence sur la croissance mycélienne, la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation (Davet, 1996).

### **1.5.4. pH**

Peut avoir une influence sur la croissance et le développement des moisissures. Elles peuvent se développer avec un pH compris entre 4,5 et 8, bien que le pH optimum soit compris entre 5,5 et 7,5 (Lecellier, 2013).

### 1.5.5. Température

Joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). Les exigences thermiques pour le développement des moisissures diffèrent d'une moisissure à l'autre. Les majorités sont mésophiles, se développent à la température de 20-35°C (Botton et *al.*, 1990 ; Julien, 2002). Il existe certaines dites thermo tolérantes ou thermophiles (au dessus de 50°C) *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple. 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* (Davet, 1996; Botton et *al.*, 1990; Nicklin et *al.*, 2000).

## 1.7. Intérêt des moisissures

### 1.7.1. Intérêt alimentaire

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (Botton et *al.*, 1990).

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, amylolytiques,...etc) qui en font des agents de dégradation dangereux mais parfois des agents technologiques utilisés dans l'affinage des fromages et dans la production d'enzymes (Guiraud, 1998 ; Guiraud et Rosec, 2004).

Selon Webster et Weber (2009), Les *Aspergillus* et les *Penicillium* jouent un rôle primordial en biotechnologie grâce à leur aptitude à produire de grandes quantités d'enzymes extracellulaires tels que les protéases, amylases, lipases et pectinases utilisés dans de nombreux processus industriels y compris la fabrication de produits de boulangerie, les produits laitiers, les jus et dans l'industrie de l'amidon. Ainsi, des souches sélectionnées de moisissures sont utilisées dans la fabrication du Roquefort *Penicillium roquefortii* (Delarras, 2007).

### 1.7.2. Intérêt pharmaceutique

La pénicilline produite par le genre *Penicillium notatum* est le premier antibiotique qui a été découvert en 1928 par Alexander Fleming (Lévêque, 2008) et la céphalosporine produite par *Cephalosporium* (Larpend- Gourgaud et Sanglier, 1992; Botton et *al.*, 1990). Leurs

utilisations dans le traitement des maladies infectieuses ont entraîné une véritable révolution médicale au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle (Hagop, 2006).

des vitamines comme exemple Riboflavine B2 d'*Ashbya gossypii* et de nombreuses substances pharmacologiquement actives (Leveau et Bouix, 1993 ; Ellaiah et *al.*, 2003).

La vitamine A pourrait faire l'objet d'une production microbiologique par les champignons notamment les espèces de l'ordre des mucorales (Botton et *al.*, 1990).

Cependant les acides organiques d'origine fongique n'ont pas une application pharmaceutique importante (Divies, 1984).

### **1.7.3. Intérêt chimique**

Il s'agit essentiellement de l'utilisation des protéases alcalines d'*Aspergillus oryzae* et de *Stachybotrys chartarum* dans les détergents (Miller, 2002). La production de cellulase par *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum* présente une diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et le genre *Penicillium* est utilisée pour l'industrialisation des papiers et les textiles (Delgado et *al.*, 2002).

# **Chapitre 2.**

## **Enzymes**

## 2.1. Généralité

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (de 10000 jusqu'à 100000 daltons), qui catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 10<sup>6</sup> fois, par rapport à la réaction en leur absence (Granner *et al.*, 2008). Elles sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants ou elles jouent un rôle essentiel dans plusieurs procédés métaboliques. Autre fonction importante, les enzymes sont responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables (Meunier, 1999). Elles sont à la fois spécifiques du type de réaction catalysée et d'un seul substrat ou d'un petit ensemble de substrats fortement apparentés (Granner *et al.*, 2008).

## 2.2. Classification des enzymes

Les classes en nombre de six, sont réparties en fonction des réactions qu'elles catalysent par la commission chargée de la classification des enzymes de l'IUB (International Union of Biochemistry) publiées dans un catalogue contenant environ 4000 enzymes (Hennen 2006; Henry Weil, 2006; Quentin *et al.*, 2015; McAuliffe, 2012).

**Tableau 1.** Principales classes d'enzymes selon Sine (2010).

Classes	Code chiffré	Réaction catalytiques
<b>Oxydoréduction</b>	(EC 1.x.x.x)	Réaction de transfert d'électrons (au d'atomes d'hydrogène).
<b>Transférases</b>	(EC 2.x.x.x)	Transfert de radicaux (groupements phosphates, amines, méthyle,...etc).
<b>Hydrolases</b>	(EC 3.x.x.x)	Réaction d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par l'addition d'une molécule d'eau).
<b>Lyases</b>	(EC 4.x.x.x)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
<b>Isomérase</b>	(EC 5.x.x.x)	Réaction d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères).
<b>Ligases</b>	(EC 6.x.x.x)	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP.

### 2.3. Enzymes hydrolases

Les enzymes hydrolases ce sont des enzymes de dégradation. Elles provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O des peroxydes, C-N des amides. Leur action sur quelques groupes de molécules a été étudiée. Les hydrolases produites par les champignons peuvent être endocellulaires (catalase, lactase et invertase) ou exocellulaires (amylases, cellulases, pectinases et protéases) (Bornscheuer, 2002).

#### 2.3.1. Pectinase

Les enzymes pectinolytiques constituent un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques (Fogarty et Kelly, 1980 ; Tatiana da costa et Flevo, 2005).

les pectinases peuvent être classées en se basant sur la nature du substrat (pectine, acide pectique et oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (Favela-Torres et *al.*, 2006).

#### 2.3.2. Cellulase

La cellulase se rapporte à un groupe d'enzymes qui, agissant ensemble. Elle est produite principalement par les moisissures, les bactéries et autres organismes cellulolytiques. L'enzyme de cellulase qui peut hydrolyser la cellulose en sucres simples (Kader, 1999; Korish, 2003).

#### 2.3.3. Amylase

Les amylases sont des enzymes appartenant à la troisième classe, celle des hydrolases, de type endoglycanases. Elles agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. En effet, les amylases catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrans et différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables (Gupta et *al.*, 2003). L'avantage majeur de l'utilisation des microorganismes pour la production des amylases est la capacité de produire à grande échelle ainsi que, la facilité de manipulation pour obtenir des enzymes avec des caractéristiques souhaitées (Lonsane et *al.*, 1990).

#### 2.3.4. Lipases

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases) hydrolysent les tri-, di- et monoglycérides à une interface huile-eau où les activités des lipases sont fortement augmentées par un mécanisme d'activation interfaciale. Les lipases microbiennes ont déjà établi leur vaste potentiel en ce qui concerne leur utilisation dans différentes industries (Braz, 2006). Ces lipases possèdent des procédés de fabrication simples avec une grande stabilité vis-à-vis la température, les détergents et les enzymes protéolytiques (Jaeger et *al.*, 1994).

#### 2.3.5. Protéases

Les protéases sont un groupe d'enzymes très complexe. Elles appartiennent à la classe des hydrolases, formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (Kumar et *al.*, 2008). Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique (Frazier, 1967; Scriban, 1999).

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (Sandhya et *al.*, 2005).

Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries, (Devi et *al.*, 2008).

#### 2.3.6. Lactase

Les lactases ( $\beta$ -galactosidases) (sont des enzymes relativement communes chez les êtres vivants, particulièrement chez les micro-organismes dont des moisissures (*Aspergillus niger*), qui font partie importante dans l'hydrolyse de lactose pour donner du galactose et du glucose (Baret J. L. 1982).



## 2.4. Application des enzymes

L'utilisation des enzymes représentés dans le tableau suivantes :

**Tableau 2.** Utilisation des enzymes hydrolase dans différents domaines.

Industries	Enzyme	Utilisation
<b>Alimentaires</b>	Protéases	-Utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte (Rao et <i>al.</i> , 1998).
	Cellulases	-Faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1993).
<b>Détergents</b>	Amylases	-Dégradation des taches à base d'amidon, ce qui facilite le découpage physique de la tache (Nielson et <i>al.</i> , 2001).
	Lipases	- Utilisé pour amélioré les conditions de lavage, telle que les valeurs de pH, température (Najjar, 2010).
	Cellulases	- Utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov et <i>al.</i> , 2007).
<b>Pharmaceutique</b>	Protéases	-Utilisé comme aide à la digestion, cas des protéases d' <i>Aspergillus oryzae</i> (Rao et <i>al.</i> , 1998). -l'hydrolyse de la fibrine et la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse en utilisant la « Brinase » (une protéase acide plasmin-like) (Sumantha et <i>al.</i> , 2006).
	Amylases	-Utilisé comme aide digestif pour éviter les dyspepsies (indigestions) et les fermentations intestinales et dans le traitement de diabète et de l'obésité (Nielson et <i>al.</i> , 2001).
<b>Industries des jus de fruits</b>	Pectinases	-Utilisé pour amélioré la production, réduire la viscosité et clarifier le jus (Lara-Márquez et <i>al.</i> , 2011).

<b>Textile</b>	Amylases	-Désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage (Hendriksen et <i>al.</i> , 1999).
<b>Papeterie</b>	Cellulases	-Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993).
	Amylases	- Liquéfaction de l'amidon, servant à l'encollage et au couchage du papier qui permet d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille (Tolan, 1996).
	Lipases	-Facilité de contrôle de la poix et donc pour améliorer la qualité du papier (Najjar, 2010).
	Pectinases	-Blanchiment écologique de la pate à papier (Berger et <i>al.</i> , 2007).

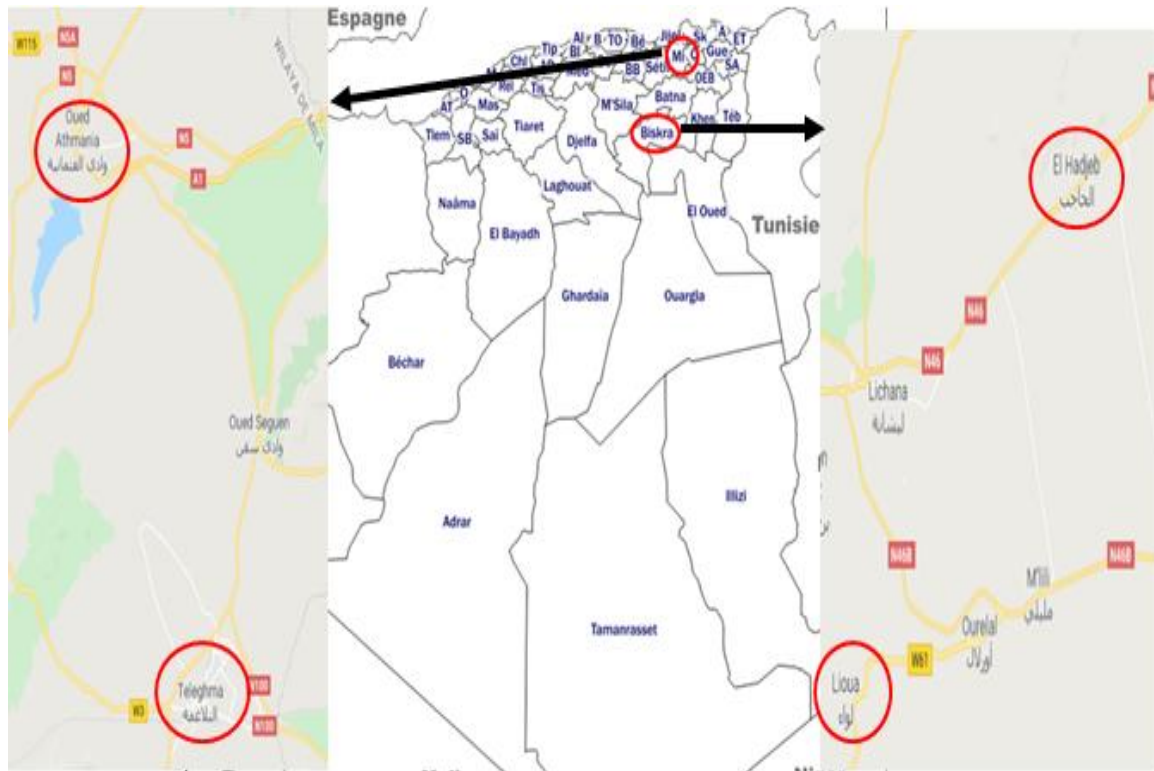
**PARTIE**  
**EXPERIMENTALE**

# **Chapitre 3.**

## **Matériel et Méthodes**

Cette étude se concentre sur l'isolement et l'identification des moisissures isolées du sol des sources thermales et la mise en évidence des activités hydrolases de ces souches. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire du département des sciences de la nature et de la vie à EL Hadjeb, université de Mohammed Khider, Biskra.

### 3.1. Description des zones d'échantillonnage



**Figure 2.** Présentation géographique des zones de prélèvement d'échantillons (Source : google earth).

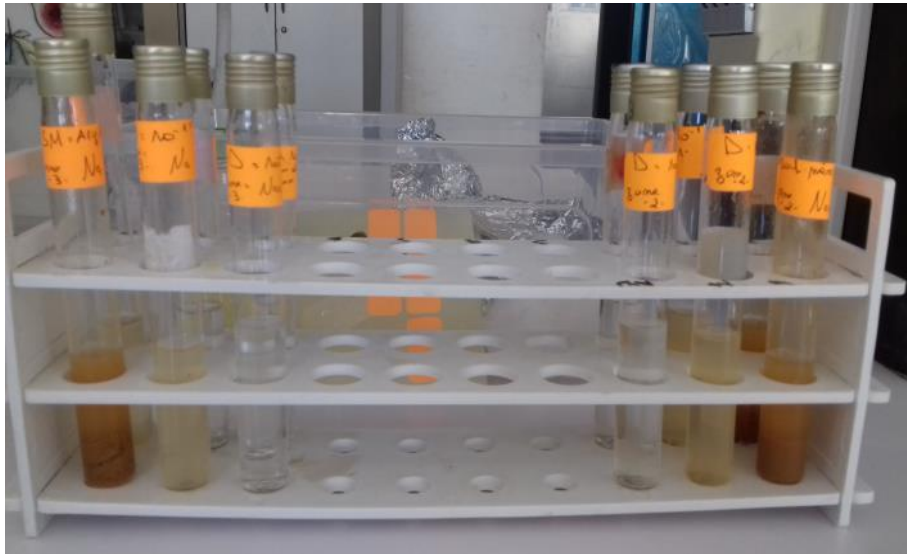
### 3.2. Echantillonnage

Les échantillons de sol ont été prélevés de quatre stations de sources thermales de deux régions différentes climatiquement, deux dans la wilaya de Biskra, Hammam EL Hadjeb et Hammam Lioua, et l'autre dans la wilaya de Mila, Hammam Oued Athmania et Hammam Tleghma. Le prélèvement a eu lieu en février 2020.

Au site d'échantillonnage, le sol a été débarrassé de tout débris, puis une quantité suffisante (10-15g) de sol a été prélevée à l'aide d'une spatule stérile. On a utilisé des flacons stériles en verre, munis de bouchons hermétiques à visser. L'éthanol est l'antiseptique de choix car il s'évapore rapidement. Afin de réduire le risque de contamination, on a rebouché le flacon le plus rapidement possible après le prélèvement puis transporté au laboratoire.

### 3.3. Préparation des dilutions

Une suspension a été préparée pour chaque échantillon en ajoutant 1 g de sol à 9 ml d'eau physiologique stérile (**Annexe 04**) (Clark *et al.*, 1985; Ulacio *et al.*, 1997), puis agitée pendant 2 minutes avec le vortex qui permet l'homogénéisation des milieux. Cette suspension est la solution mère. Une série de dilutions décimales ont été préparées à partir de la solution mère jusqu'à  $10^{-2}$  dans des tubes contenant 9 ml d'eau physiologique stérile.



**Figure 3.** Préparation des dilutions.

### 3.4. Enrichissement

Le milieu de culture de pomme de terre glucosée (PDA) (**Annexe1**) est coulé dans des boîtes de Pétri dans des conditions aseptiques strictes. Le développement bactérien est inhibé par l'ajout d'antibiotiques tel que la gentamycine à une concentration de 50 p.p.m. Un volume de 0.1ml de chacune de dilution est réparti avec une micropipette et étaler sur le milieu à l'aide d'un râteau sur toute la surface de la boîte de Pétri coulée (le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation). Chaque dilution estensemencée dans deux boîtes de Pétri. Sur ces boîtes, on a écrit le numéro de l'échantillon, la dilution et la date d'ensemencement. Après l'ensemencement, les boîtes de Pétri (PDA) sont incubées à 28° C. Des observations quotidiennes sont effectuées pendant 7 jours.

### 3.5. Isolement

Après 7 jours d'incubation, plusieurs colonies de différents aspects s'apparaissent dans la même boîte de Pétri, ce qui exige une série de repiquages successifs jusqu'à l'obtention d'une souche pure dans chaque boîte de pétri. Le repiquage se fait par le prélèvement d'un fragment de la colonie avec une anse stérile, est déposé au centre d'une nouvelle boîte. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant sept jours.

### 3.6. Conservation des souches obtenues

Les moisissures sont conservées par la méthode la plus simple et la plus communément utilisée au laboratoire qui consiste à repiquer ces souches à la fin de leur croissance en tubes sur gélose inclinée (Botton et *al.*, 1990), en utilisant comme milieu de conservation le CYA (**Annexe1**) (Parks, 1997). Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C (Botton et *al.*, 1990).

### 3.7. Identification

L'identification des champignons basée principalement sur des critères morphologiques (Marjolaine et *al.*, 2002). L'identification morphologique d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères culturels et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques et microscopiques (Cahagnier et Richard-Molard, 1998). Les isolats fongiques sont soumis à une identification macroscopique par examen de la culture sur le milieu PDA, Czapek Yeast Agar (CYA) (**Annexe1**) et le milieu extrait de malt (MEA) (**Annexe1**).

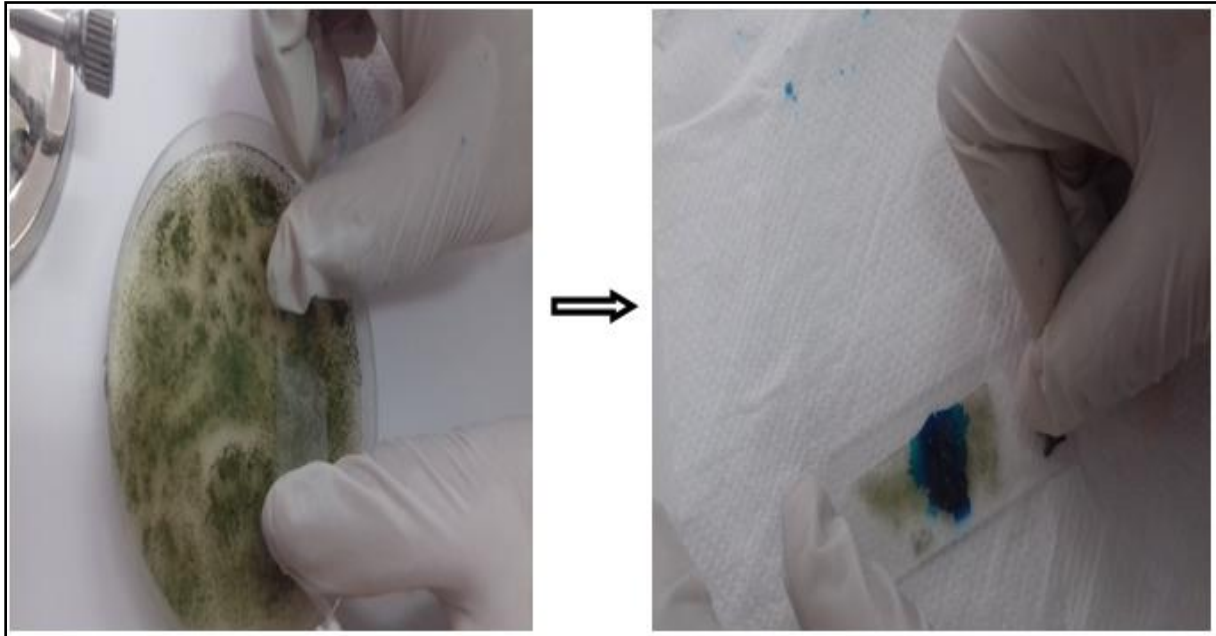
#### 3.7.1. Identification macroscopique

Examen macroscopique se fait à l'œil nu, elle se base essentiellement sur l'observation de plusieurs critères essentiellement morphologique tels que l'aspect, le relief, la taille, la couleur, la présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que la vitesse de la pousse des colonies (Dufresne, 2014).

#### 3.7.2. Identification microscopique

L'identification réalisée par une étude microscopique. Cette dernière est effectuée par la technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (**Annexe 03**) (Chabasse et *al.*, 2002).

Les caractéristiques prises en considération dans cette technique sont la nature du filament, la fructification et la morphologie des spores asexuées. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart et des éléments importants (Chabass *et al.*, 2002).

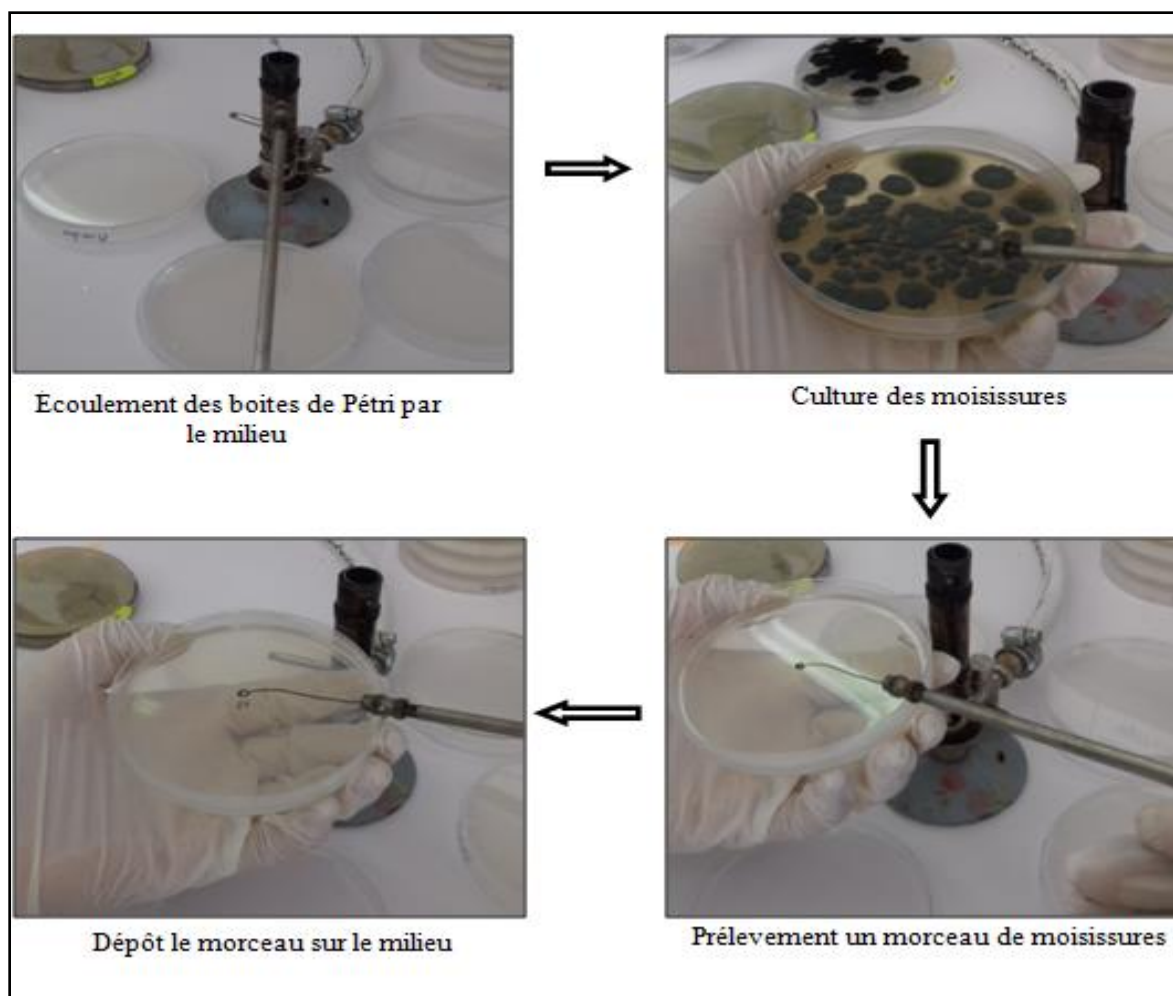


**Figure 4.** Technique de scotch.

### **3.8. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés**

Notre souches sont repiquées à l'aide d'une anse de platine sur différents milieux pour tester la production des enzymes hydrolases extracellulaires puis les boîtes Pétri sont incubées pendant 7 jours à 30°C. Après l'incubation et la croissance, l'apparition d'une zone claire autour des colonies témoigne de l'hydrolyse du substrat testé, le diamètre de cette zone est lié à la quantité des enzymes produites par les moisissures. Les mesures sont effectuées à partir du deuxième qu'au septième jour.





**Figure 5.** Illustration de la technique de l'activité enzymatique.

### 3.8.1 Activité cellulolytique

La mise en évidence de l'activité cellulolytique des souches testées est évaluée sur milieu contenant 3% de CMC (**Annexe 2**). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

Après la croissance, les boîtes sont colorées avec une solution de rouge Congo de 0.1% (**Annexe 3**) pendant 30 min à température ambiante puis sont lavées avec une solution de NaCl (1M) pendant 1heure (**Annexe 4**). L'apparition de zones claires autour des colonies indique la présence de cellulases extracellulaires. Après le test, les diamètres des zones d'hydrolyse pour chaque souche sont mesurés, ce qui permet de sélectionner la meilleure souche cellulolytique.

### 3.8.2. Activité pectinolytique

Chaque souche est ensemencée par une touche centrale sur le milieu pectine agar (**Annexe 2**) et incubé à 30°C pendant 7 jours. Après l'incubation, les boîtes sont inondées par une solution aqueuse d'acétate de cuivre à 7.5% (**Annexe 3**) pendant 10 minutes. L'acétate de cuivre donne une couleur bleu claire sur la gélose qui contient la pectine non dégradée (Snaiki *et al.*, 2006). L'hydrolyse enzymatique des substances pectique est caractérisée par l'halo clair autour des colonies productrices.

### 3.8.3. Activité lipolytique

L'activité lipase a été déterminée par l'ensemencement par une touche centrale sur milieu de culture spécifique contenant du tween 80 comme substrat lipidique (**Annexe 2**). Le Tween 80 a été stérilisé séparément puis ajouté au milieu stérile. Après incubation, les cultures ont été mises à 4°C pendant 12 h pour mieux visualiser l'apparence d'un opaque précipitations autour du thalle (Chamekh *et al.*, 2019). En cas de réaction positive, il se forme un halo opaque autour de la strie hydrolysant le Tween 80, dû à la précipitation des acides gras.

### 3.8.4. Activité protéolytique

L'étude de cette activité est réalisée sur deux milieux de différentes protéines lait gélosé (**Annexe 2**) et gélatine à 5 % (**Annexe 2**), l'observation d'une zone claire autour des colonies prouve la production des protéases extracellulaires.

### 3.8.5. Activité lactosique

Cette activité est examinée sur milieu contenant 1% de lactose (**Annexe 2**). L'apparition d'halo clair autour des colonies indique la présence des  $\beta$ - galactosidases.

### 3.8.6. Activité amylolytique

L'activité amylolytique est effectuée sur milieu de culture à base d'amidon 1% (**Annexe 2**). Après incubation, le milieu gélosé est recouvert d'une solution de lugol (**Annexe 3**), pendant 30 secondes suivie d'un rinçage avec de l'eau distillée. L'eau iodée contenant l'iode se complexe avec l'amidon présent dans le milieu et donne un précipité bleu sombre. L'hydrolyse de l'amidon est indiquée par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie productrice d'amylase (Tatsinko *et al.*, 2005).

# **Chapitre 4.**

## **Résultats et Discussion**

#### 4.1. Isolement

Les résultats concernant l'isolement des souches sont représentés dans le tableau 3 ci-dessous. On a noté la présence de 12 souches différentes de moisissures et 3 souches de levures.

**Tableau 3.** Nombre de souche fongiques isolés à partir d'échantillons de sol.

Echantillon		Moisissures	Levures
Echantillon 1 (BISKRA)	Hammam EL Hadjeb	6 souches	1 souche
	Lioua	1 souche	/
Echantillon 2 (MILA)	Hammam Athmania	2 souches	1 souche
	Hammam Tleghma	3 souches	1 souche

#### 4.2. Identification

L'identification de ces genres étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (Botton et *al.*, 1990 ; Guiraud, 1998), en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (effectué après une incubation de 7 jour sur 3 milieux de culture différentes (CYA, PDA et MEA) à température 30°C) et sur les caractères microscopiques.

##### 4.2.1. Identification macroscopique

L'identification macroscopique basé sur l'aspect macroscopique des mycéliums, la vitesse de croissance, la texture, la couleur du mycélium et la couleur du revers des boites de Pétri.



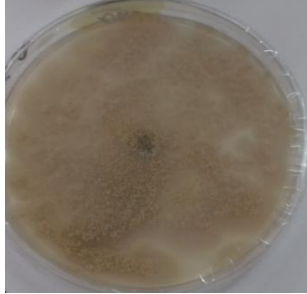
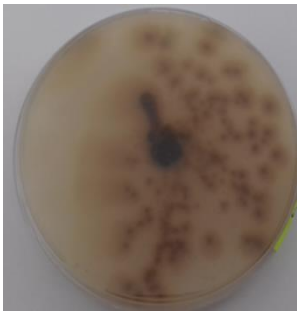

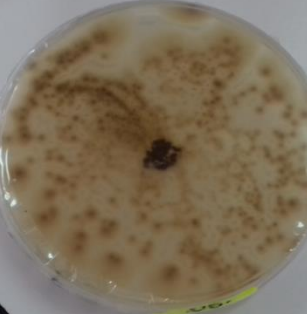

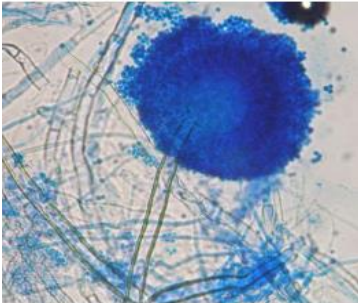
##### 4.2.2. Identification microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des douze souches des moisissures sélectionnées (Conidiophores, conidies, mycélium etc) .

Les résultats de l'observation macro et microscopique sont comparé à ceux décrits dans la littérature (Biourge, 1923; Chabasse et *al.*, 2002 ; Pitt et Hocking, 2009) et présenté dans les tableaux suivants.

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 01 est présentée dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 01.

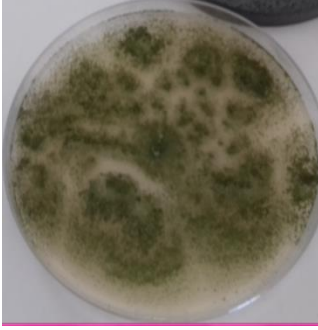
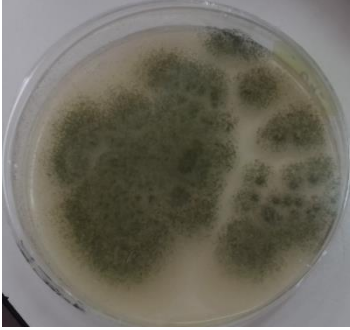
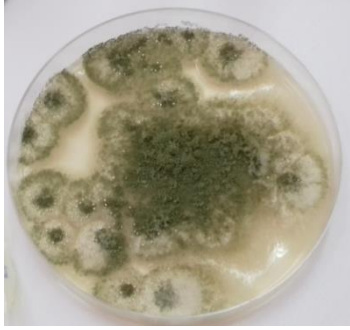
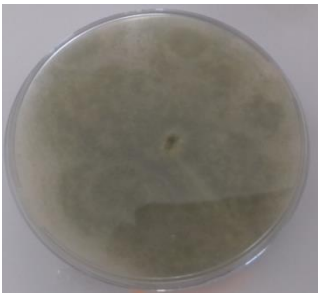
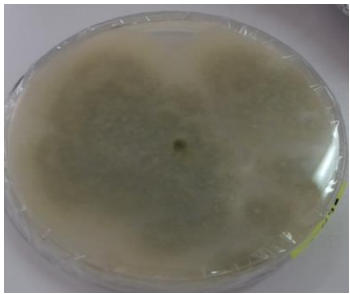

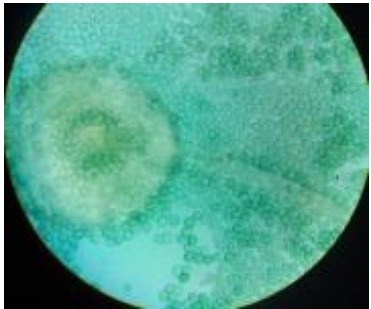
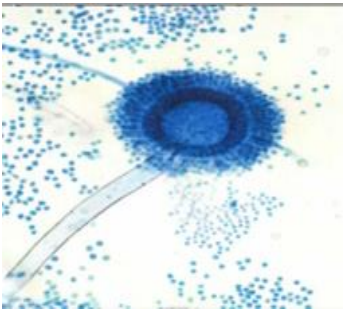
	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 01	<b>Face</b>			<p><b>-Vitesse</b> : modérément rapide.</p> <p><b>-Aspect</b> : poudreuse.</p> <p><b>-Recto</b> : brun pâle à brun jaune.</p> <p><b>-Verso</b> : brune.</p> <p><b>-Pigment</b> : jaune à brune.</p>
				
	<b>Revers</b>			
				
<b>Aspect microscopique (X400)</b>	<b>Photo reference. (Pitt et Hocking, 2009)</b>		<b>Caractères microscopique</b>	
			<p><b>-Hyphe</b> : non cloisonnée.</p> <p><b>-Vésicules</b> : globuleuse.</p> <p><b>-Métules et phialides</b> : sur toute la surface.</p> <p><b>-Conidies</b> : hyalines et globuleuses.</p> <p><b>-Têtes conidiales</b> : jaune ochracé et globuleuse.</p>	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 1 appartient au genre *Aspergillus*.

**Ech 01. *Aspergillus ochraceus*.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 02 est présentée dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 02.



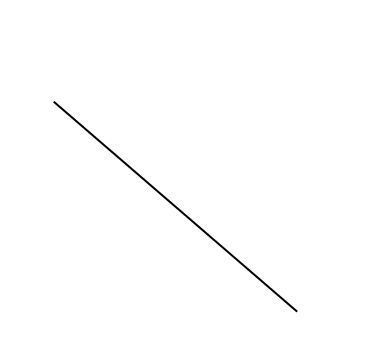


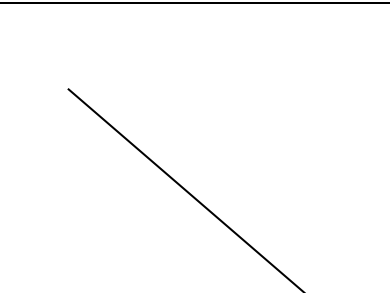
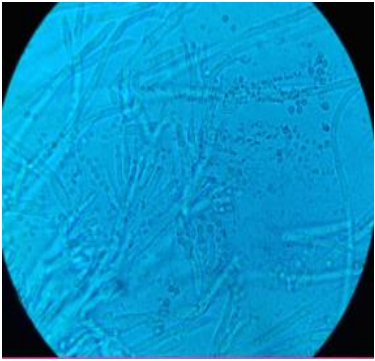
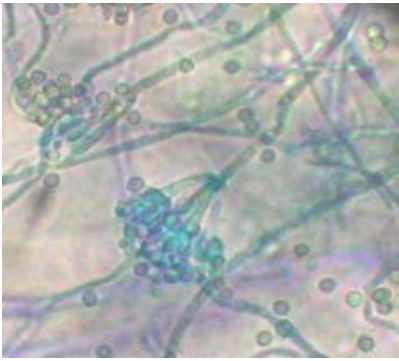
	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 02	<b>Face</b>			<p>-Vitesse : rapide.</p> <p>-Aspect : duveteuse à poudreuse.</p> <p>-Recto : vert-jaune.</p> <p>-Pigment : incolore, pas de pigment.</p>
				
	<b>Revers</b>			
				
<b>Aspect microscopique (X1000)</b>	<b>Photo référence. (Chabasse et al., 2002)</b>		<b>Caractères microscopique</b>	
			<p>-Hyphe : non cloisonnée.</p> <p>-Conidiophores : hyalins.</p> <p>-Vésicules : sphérique.</p> <p>- Phialides : directement insérées sur la vésicule ou portées par des métules.</p> <p>-Conidies : globuleuses et sub- globuleuse.</p> <p>-Têtes aspergillaire : unisériées ou bisériées.</p>	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 2 appartient au genre *Aspergillus*.

**ECH 2. *Aspergillus flavus*.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 03 est présentée dans le tableau 6.

**Tableau 6 .** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 03.



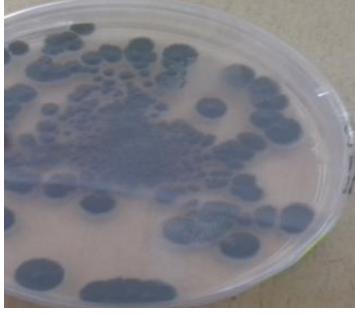
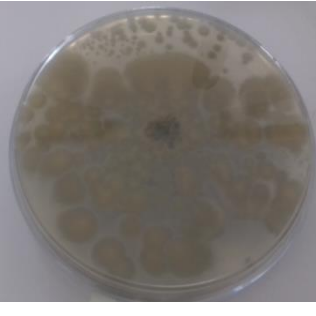
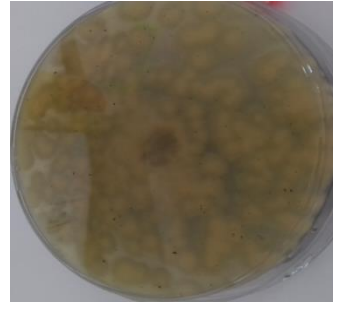

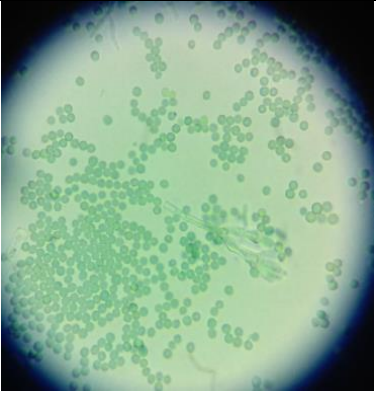
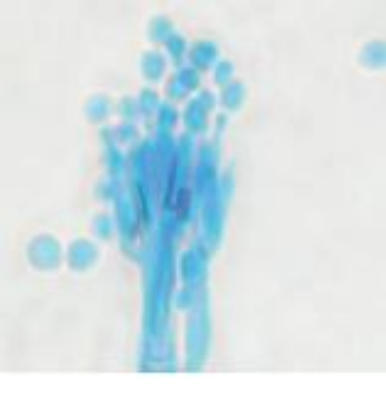
	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 03	<b>Face</b>			<p>-<b>Vitesse</b> : rapide.</p> <p>-<b>Aspect</b> : poudreuse et duveteuse.</p> <p>-<b>Recto</b> : blanche ou début, vert.</p> <p>-<b>Verso</b> : Pale virant au jaune.</p>
				
	<b>Revers</b>			<p>-<b>Vitesse</b> : rapide.</p> <p>-<b>Aspect</b> : poudreuse et duveteuse.</p> <p>-<b>Recto</b> : blanche ou début, vert.</p> <p>-<b>Verso</b> : Pale virant au jaune.</p>
				
<b>Aspect microscopique (X1000)</b>		<b>Photo référence. (Biourge, 1923)</b>	<b>Caractères microscopique</b>	
			<p>-<b>Hyphe</b>: septé.</p> <p>-<b>Conidiophores</b> : isolés, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille.</p> <p>-<b>Pénicilles</b> : constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</p> <p>-<b>Conidies</b> : disposées en chaîne, globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses.</p>	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 3 appartient au genre *Penicillium*.

**ECH 3. *Penicillium spp1.***

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 04 est présentée dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 04.

	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 04	<b>Face</b>			- <b>Vitesse</b> : modérément rapide. - <b>Aspect</b> : poudreuse.
				
	<b>Revers</b>			- <b>Recto</b> : vert foncé. - <b>Verso</b> : jaunâtre.
				
<b>Aspect microscopique (X1000)</b>	<b>Photo référence (Chabasse et al., 2002)</b>		<b>Caractères microscopique</b>	
			- <b>Hyphe</b> : septé. - <b>Conidiophores</b> : isolés, ramifiés, terminés par un pénicille. - <b>Pénicille</b> : constitué de phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophore.	

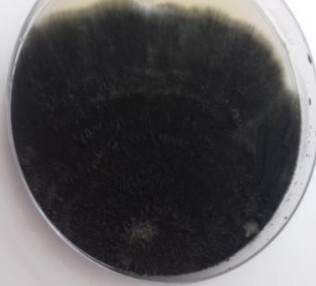
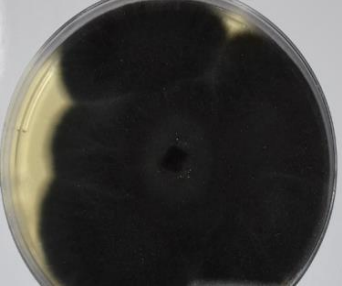

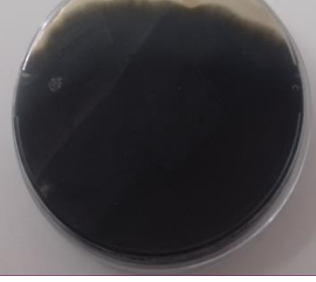
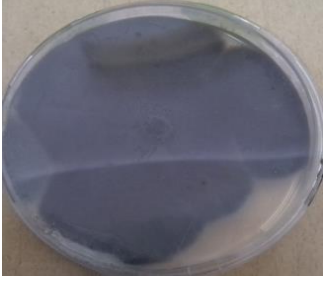
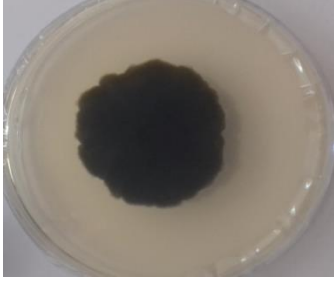
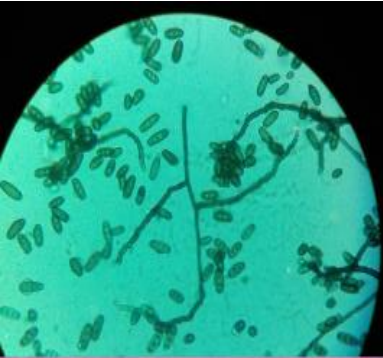
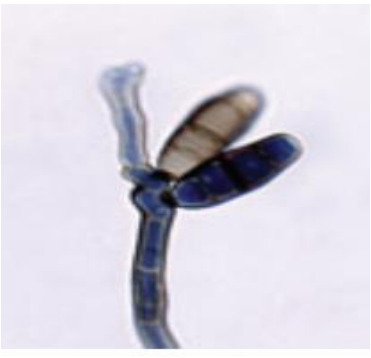
L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 4 appartient au genre *Penicillium*.

**Ech 4. *Penicillium spp2*.**



L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 05 est présentée dans le tableau 8.

**Tableau 8.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 05.





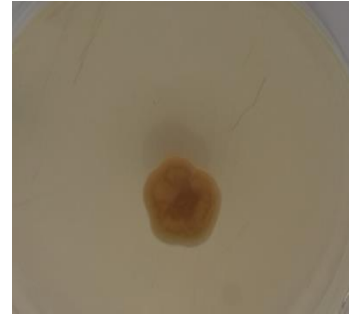
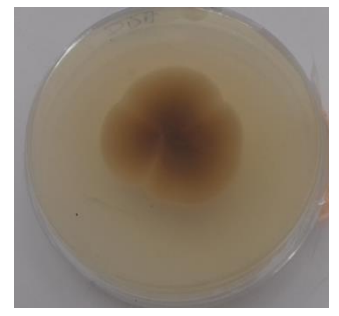

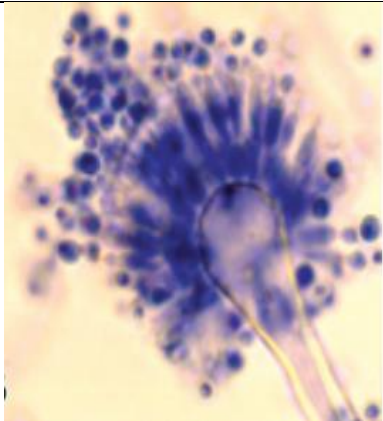
	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 05	<b>Face</b>			-Vitesse : rapide. -Aspect : laineuse. -Recto : blanche au départ puis brune olive.
				
	<b>Revers</b>			-Verso : brun olive foncé.
				
<b>Aspect microscopique (X400)</b>	<b>Photo référence (Chabasse et al., 2002)</b>		<b>Caractères microscopique</b>	
			- <b>Hyphe</b> : septé et foncé. - <b>Conidiophores</b> : brunes, simples ou ramifiés. - <b>Conidies</b> : brunes, pluricellulaires et cloisonnées transversalement, comprennent plusieurs cellules dont une centrale plus grosse.	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 5 appartient au genre *Curvularia*.

**Ech 5. *Curvularia lunata*.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 06 est présentée dans le tableau 9.

**Tableau 9.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 06.

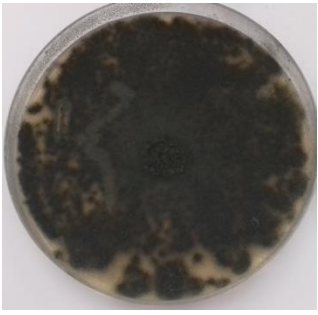
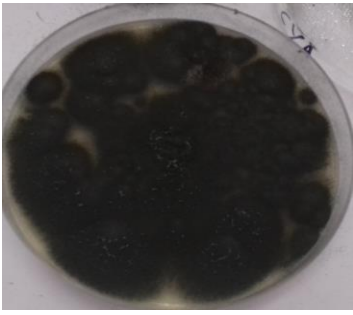

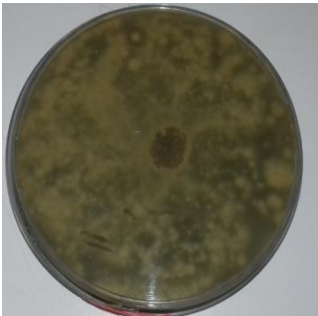


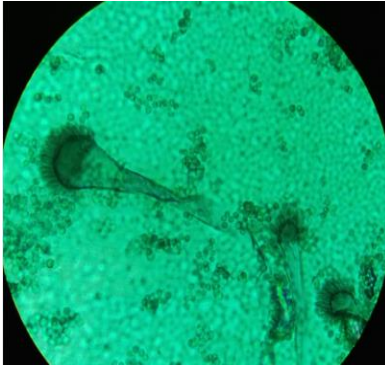
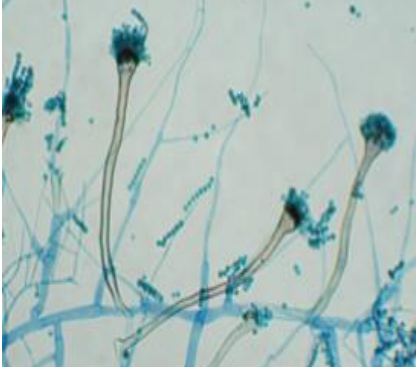
	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 06	<b>Face</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Vitesse : lente.</li> <li>-Aspect : cotonneuse.</li> <li>-Recto : blanche à crème.</li> <li>-Verso : jaune à brune.</li> </ul>
				
	<b>Revers</b>			
				
<b>Aspect microscopique (X400)</b>	<b>Photo référence (Chabasse et al., 2002).</b>		<b>Caractères microscopique</b>	
			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphe : non cloisonnée.</li> <li>-Conidiophore : lisse et incolore.</li> <li>-Vésicules : globuleuse.</li> <li>-Phialides : insérées sur la vésicule.</li> <li>-Conidies : lisse et globuleuses.</li> <li>-Têtes aspergillaire : bisériée.</li> </ul>	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 6 appartient au genre *Aspergillus*.

**Ech 6. *Aspergillus candidus*.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 07 est présentée dans le tableau 10.

**Tableau 10.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 07.

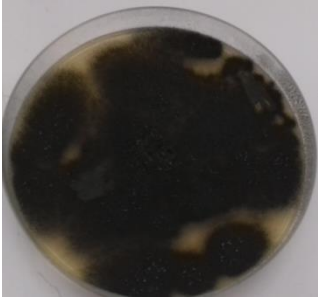
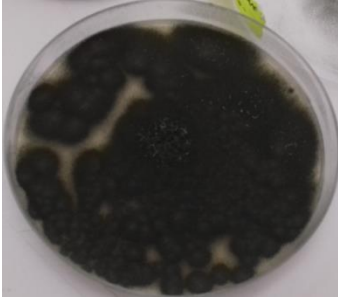
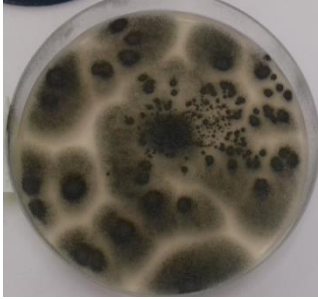




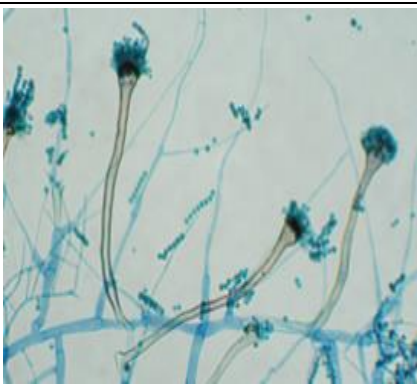
	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 07	<b>Face</b>			<p>-<b>Vitesse</b> : rapide.</p> <p>-<b>Aspect</b> : duveteuse à poudreuse.</p> <p>-<b>Recto</b> : vert foncé.</p> <p>-<b>Verso</b> : jaunâtre.</p>
				
	<b>Revers</b>			
				
<b>Aspect microscopique (X400)</b>	<b>Photo référence.</b> (Chabasse et al., 2002).		<b>Caractères microscopique</b>	
			<p>-<b>Hyphe</b> : non cloisonnée.</p> <p>-<b>Vésicules</b> : globuleuse.</p> <p>- <b>Phialides</b> : portés par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule.</p> <p>-<b>Conidies</b> : rondes, vert.</p> <p>-<b>Têtes conidiales</b> : bisériée.</p>	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 7 appartient au genre *Aspergillus*.

**Ech 7. *Aspergillus nidulans*.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 08 est présentée dans le tableau 11.

**Tableau 11.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 08.

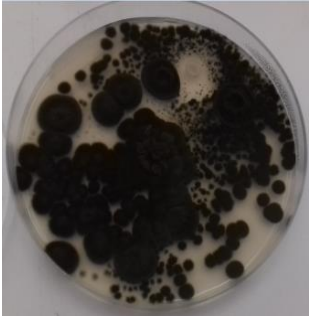


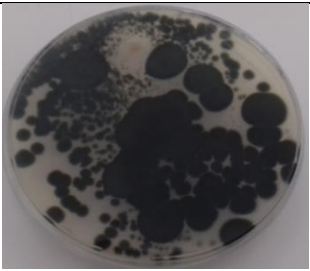
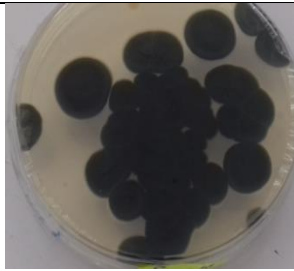
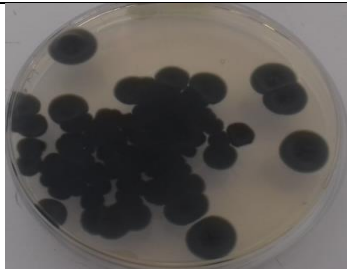
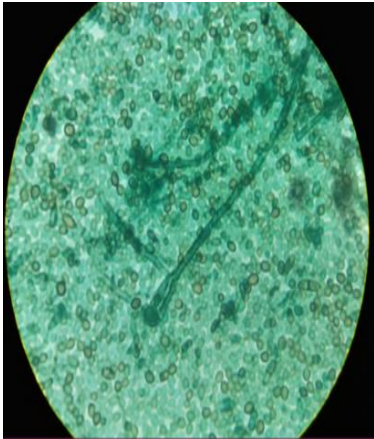
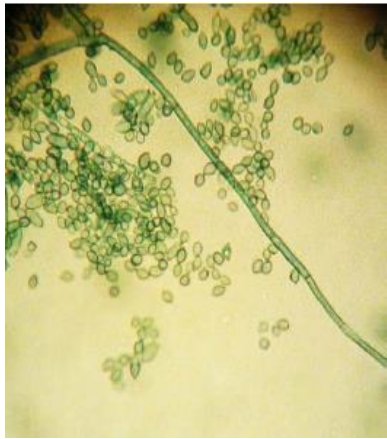
	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 08	<b>Face</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>Vitesse</b> : rapide.</li> <li>-<b>Aspect</b> : duveteuse à poudreuse.</li> <li>-<b>Recto</b> : vert foncé.</li> <li>-<b>Verso</b> : jaunâtre.</li> </ul>
				
	<b>Revers</b>			
				
<b>Aspect microscopique (X400)</b>	<b>Photo référence. (Chabasse et al., 2002)</b>		<b>Caractères microscopique</b>	
			<ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>Hyphe</b> : non cloisonnée</li> <li>-<b>Vésicules</b> : globuleuse.</li> <li>- <b>Phialides</b> : portés par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule.</li> <li>-<b>Conidies</b> : rondes, vert.</li> <li>-<b>Têtes conidiales</b> : bisériée.</li> </ul>	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 8 appartient au genre *Aspergillus*.

**Ech 8. *Aspergillus nidulans*.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 09 est présentée dans le tableau 12.

**Tableau 12.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 09.




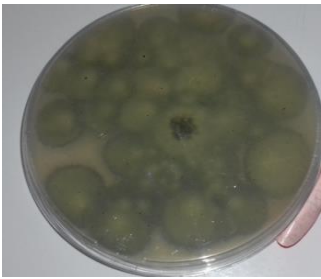
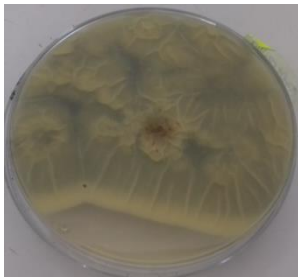

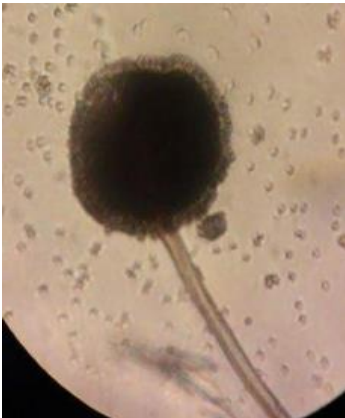
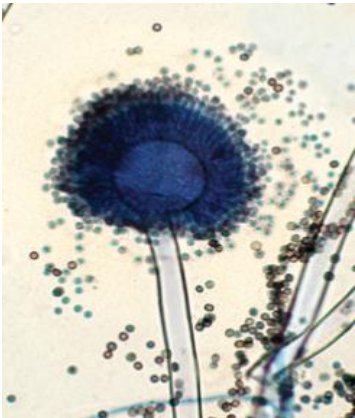
	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 09	<b>Face</b>			<p><b>-Vitesse :</b> lente modérément rapide.</p> <p><b>-Texture :</b> veloutée ou floconneuse, parfois poudreuse.</p> <p><b>-Recto :</b> vert olive au brun noir très foncé.</p> <p><b>-Verso :</b> brun noir.</p>
				
	<b>Revers</b>			
				
	<b>Aspect microscopique (X400)</b>	<b>Photo référence (Chabasse et al., 2002)</b>	<b>Caractères microscopique</b>	
			<p><b>-Hyphe :</b> septé.</p> <p><b>-Conidiophore :</b> longue et cloisonné et variable.</p> <p><b>- Les conidies :</b> formées à l'extrémité des conidiophores sont de grande taille, uni ou pluricellulaires ; les suivantes sont plus petites et unicellulaires.</p> <p><b>- Conidies :</b> cylindrique,est lisse.</p>	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 9 appartient au genre

**Ech 9. *Cladosporium* sp.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 10 est présentée dans le tableau 13.

**Tableau 13.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech 10.

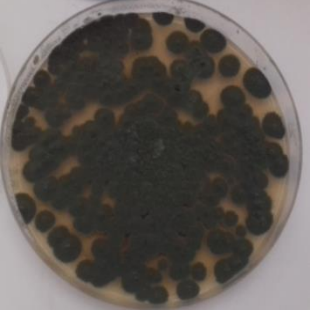





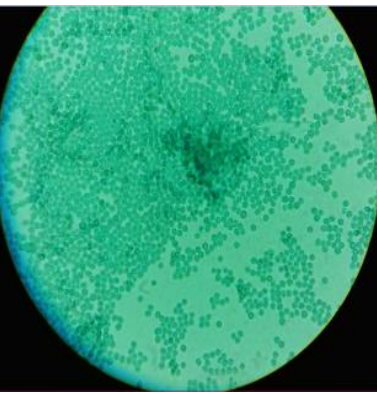

	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 10	<b>Face</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Vitesse : rapide</li> <li>-Aspect : granuleuse</li> </ul>
				
	<b>Revers</b>			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Recto : noir</li> <li>-Pigment : pas de pigment</li> </ul>
				
<b>Aspect microscopique (X400)</b>	<b>Photo référence.</b> (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).		<b>Caractères microscopique</b>	
			<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hyphe : non cloisonnée.</li> <li>-Conidiophore : lisse et hyalin.</li> <li>-Vésicules : globuleuse.</li> <li>- Phialides : insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule.</li> <li>-Conidies : hyalines et globuleuses.</li> <li>-Têtes aspergillaire : bisériées, radiées, noire à maturité.</li> </ul>	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 10 appartient au genre *Aspergillus*.

**Ech 10. *Aspergillus niger*.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 11 est présentée dans le tableau 14.

**Tableau 14.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech11.


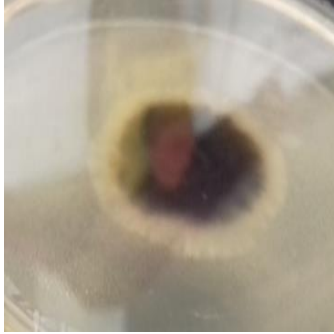
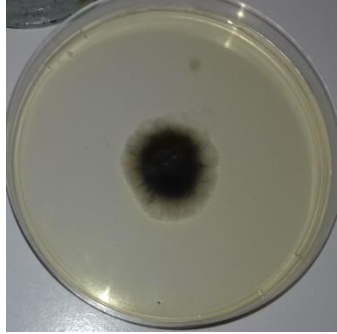
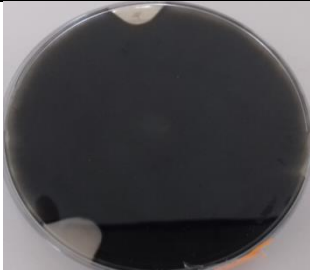
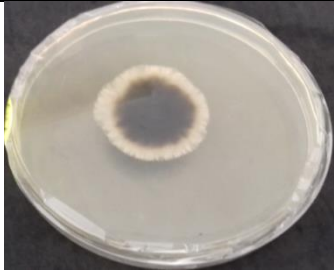

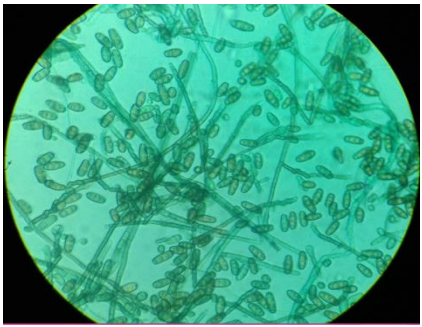

	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
Ech 11	<b>Face</b>			<b>-Vitesse :</b> modérément rapide.  <b>-Aspect :</b> poudreuse.  <b>-Recto :</b> vert foncé.  <b>-Verso :</b> jaunâtre.
				
	<b>Revers</b>			
				
<b>Aspect microscopique (X1000)</b>	<b>Photo référence (Chabasse et al., 2002)</b>		<b>Caractères microscopique</b>	
			<b>-Hyphes :</b> septé.  <b>-Conidiophores :</b> dressés, ramifiés, terminés des phialides.  <b>-Phialides :</b> sont disposées en verticilles.  <b>-Conidies :</b> restent en chaîne et contribuent à donner à la tête conidienne un aspect en pinneau.	

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 11 appartient au genre *Penicillium*.

**Ech 11. *Penicillium* spp3.**

L'étude macroscopique et microscopique de la souche Ech 12 est présentée dans le tableau 15.

**Tableau 15.** Aspect macroscopique et microscopique de la souche Ech12.

	PDA	CYA	MEA	Caractères macroscopique
	<b>Face</b>			
				<p>-<b>Vitesse</b> : rapide.</p> <p>-<b>Aspect</b> : laineuse.</p> <p>-<b>Recto</b> : blanche au départ puis brune olive.</p> <p>-<b>Verso</b> : brun olive foncé.</p>
	<b>Revers</b>			
				
Ech 12	<b>Aspect microscopique (X400)</b>	<b>Photo référence.</b> (Chabasse et <i>al.</i> , 2002)		<b>Caractères microscopique</b>
				<p>-<b>Hyphe</b> : septé et foncé.</p> <p>-<b>Conidiophores</b> : brunes, simples ou ramifiés.</p> <p>-<b>Conidies</b> : brunes, pluricellulaires et cloisonnées transversalement, comprennent plusieurs cellules dont une centrale plus grosse.</p>

L'analyse de ces résultats a révélé que la souche Ech 12 appartient au genre *Curvularia*.

**Ech 12. *Curvularia lunata*.**



### 4.3. Mise en évidence des activités hydrolases sur milieux gélosés

Pour cette partie, nous avons préparé des milieux de culture adaptés de chaque activité enzymatique et ensemencé nos souches, mais nous n'avons pas pu prendre les diamètres des zones d'hydrolyse pour les différentes activités enzymatiques que nous voulions étudier à cause des conditions indépendantes à notre volonté (propagation de l'épidémie du coronavirus). Pour cette raison, les résultats présentés ci-dessous sont ceux de chercheurs ayant travaillé sur les mêmes souches ou souches proches des nôtres.

Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader le substrat disponible.

La détermination de cette activité est basée sur la mesure du diamètre de l'anneau clair qui se forme autour de la colonie fongique. Le diamètre de cette zone est lié à la quantité des enzymes extracellulaires produites par les moisissures. Les mesures sont effectuées à partir du deuxième jusqu'au septième jour

#### 4.3.1. Activité cellulolytique

Les résultats obtenus après l'ensemencement des milieux gélosés à base de cellulose, donnent des zones d'hydrolyse de diamètres différents suivant la capacité de chaque souche à dégrader ce substrat.

Parmi les souches testées, l'activité cellulolytique maximale a été enregistrée pour *Aspergillus niger* et *Curvularia lunata* (Gopinath *et al.*, 2005). Bien que la souche *Aspergillus ochraceus* présente une activité élevée (Adjimi et Kabkoub, 2019).

La souche *Penicillium.sp* présente l'activité cellulolytique la plus élevée avec un diamètre mesuré à 10 mm selon Meziani et Mahcene (2017).

#### 4.3.2. Activité pectinolytique

la souche présentant l'activité pectinolytique la plus élevée est celle de la souche *Penicillium.sp* avec un diamètre mesuré à 7.6 mm (Meziani et Mahcene, 2017). Boulefkhad et Talhi (2018) présentent une activité faible chez *Aspergillus niger* de diamètre mesuré à 3mm.

#### 4.3.3. Activité lipolytique

Un nouveau champignon identifié génétiquement comme *Curvularia sp* présente une bonne activité lipolytique avec *Aspergillus nidulans* (Gopinath *et al.*, 2005).

#### 4.3.4. Activité protéolytique

L'étude de cette activité est réalisée sur deux milieux de différentes protéines, lait gélosé et gélatine à 5 %.

##### 1) Lait gélosé

Les résultats de Chandrasekaran et *al.* (2015) ont montré que *Aspergillus flavus*, *A.ochraceus* et *A.niger* présentent une activité protéolytique élevée, Adjimi et Kebkoub (2019) trouvent les mêmes résultats pour *Aspergillus niger* et *A.ochraceus* et disent que *Penicillium* à une activité faible. Par ailleurs, Sunitha et *al.* (2013) trouvent que ces deux dernières souches (*Aspergillus niger* et *A.ochraceus*) ne présentent aucune activité protéolytique, et une activité très élevée chez *Cladosporium sp.*

Ces différences de résultats peuvent être liées à la capacité de chaque souche à produire l'enzyme, les sources d'échantillonnages, le climat et les nutriments environnementaux.

##### 2) Gélatine

Selon Adjimi et Kabkoub (2019), *Aspergillus niger* présente la plus faible activité, et *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium.sp* donnent une activité gélatineuse élevée. Cordova (1998) a obtenu 44 souches de moisissures gélatinolytiques prélevées à partir du sol entourant des usines au Mexique.

#### 4.3.5. Activité lactosique

Adjimi et Kebkoub (2019) n'ont trouvé aucune souche présentant une activité lactosique, les résultats ressemblent à celui présenté par Beghoul et Hammoudi (2016) qui ont montré que parmi les 22 souches testées pour la production de la  $\beta$ -galactosidase, aucune n'est révélée positive pour ce test.

#### 4.3.6. Activité amylolytique

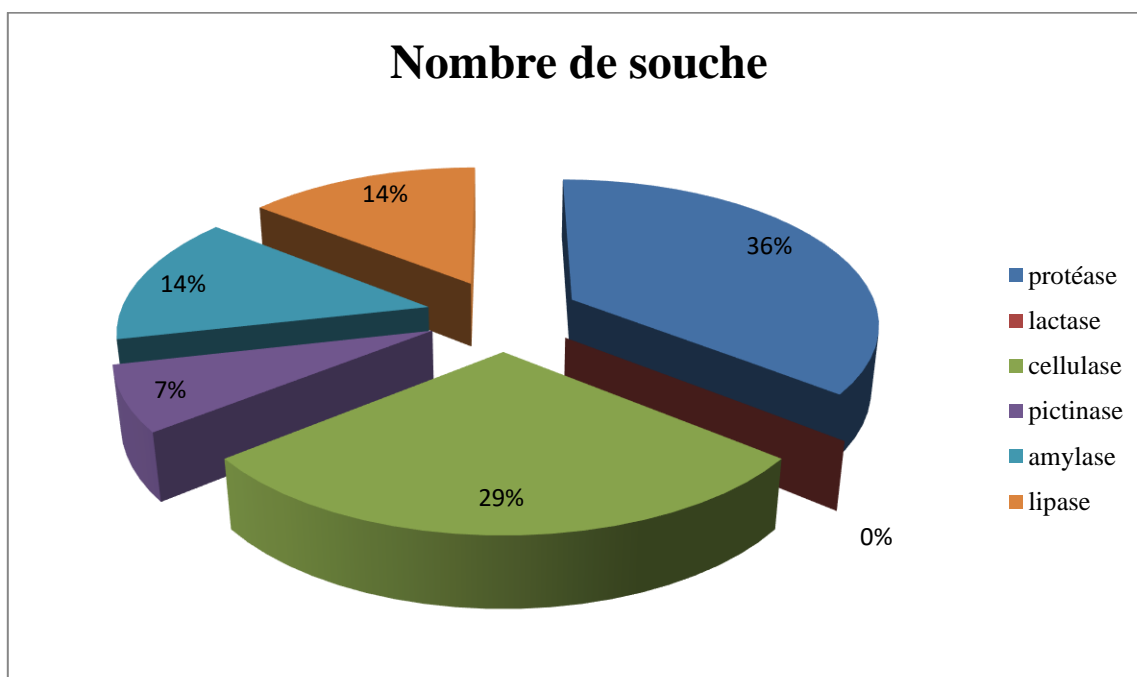
Pour tester la production de l'amylase, l'amidon a été utilisé comme seule source d'énergie.

Parmi les souches testées, Meziani et Mahcene (2017) trouvent que la souche *Penicillium.sp* se distingue par une activité amylolytique élevée avec une zone d'hydrolyse de diamètre mesuré à 10 mm. Par ailleurs, plusieurs espèces du genre *Penicillium* telles que *P. citrinum*, *P.fellutanumet*, *P. notatum* sont productrices d' $\alpha$ -amylase, (Gopinath *et al.*, 2005;

Kathiresan et Mannivanan, 2006; Ertan et Balkan, 2007 ). D'autre côté la souche *Aspergillus niger* présente une faible activité (Boulefkhad et Talhi, 2018).

Certains isolats d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ont montré une croissance en milieu amidon. Ces champignons producteurs d'amylase peuvent également mieux servir dans les industries enzymatiques. Nous considérons que ces nouveaux isolats peuvent avoir plus de potentiel pour des utilisations industrielles. Des efforts sont toujours en cours pour trouver de nouvelles sources d'enzymes.

En raison de la propagation de l'épidémie de virus corona et de la fermeture de l'université, nous n'avons pas obtenu tous les résultats. Pour cela, nous avons rassemblé les résultats des chercheurs et les avons représentés dans le graphique ci-dessous.



**Figure 6.** Pourcentage d'enzymes produites par les souche testées.

Le graphique montre que les souches testées ont présenté 5 activités sur les 6 activités recherchées dont la plus remarquable est l'activité protéolytique avec 5 souches (38%) et l'activité de cellulase (31%) avec 4 souches, l'activité lipolytique et amylolytique (14%) chaque activité avec 2 souches, 7% pour l'activité pectinolytique avec une souche et absence totale de l'activité lactosique.

# **Conclusion**

Le travail effectué consiste à l'isoler et l'identifier et mettre en évidence de l'activité hydrolase de souches de moisissures isolées de sol de sources thermales. Les échantillons de sol ont été prélevés de quatre stations de deux régions différentes climatiquement, deux dans la wilaya de Biskra, Hammam EL Hadjeb et Hammam Lioua, et l'autre dans la wilaya de Mila, Hammam Oued Athmania et Hammam Tleghma.

Les cultures sur milieu PDA ont permis d'isoler de sept souches différentes de moisissures et une souche de levure du sol de la région de Biskra, tandis que cinq souches de moisissures et deux souches de levures ont été obtenues à partir du sol de la région de Mila. Le pouvoir inhibiteur de la gentamicine réduit l'apparition de souches bactériennes.

Les résultats de l'examen macroscopique et microscopique ont montré la présence de 12 souches de moisissures réparties en 4 genres différents, *Aspergillus* est dominant par 6 souches, suivi de *Penicillium* avec 3 souches, suivie de *curvularia* avec 2 souches et enfin *cladosporuim* une seule souche.

Dans cette étude, la recherche des activités enzymatiques hydrolytiques extracellulaires a été effectuée sur 12 souches de moisissures ; Dans ce but, six différents substrats sont utilisés: pectine, cellulose, amidon, tween 80, protéine (lait gélosé et gélatine) et lactose, pour la détermination des activités pectinolytiques, cellulolytiques, amylolytiques, lipolytiques, protéolytiques, lactosiques respectivement.

Les souches fongiques ont clairement montré la capacité de chaque souche isolée et testée à produire au moins une enzyme. En effet, cinq activités sur les 6 recherchées dont la plus remarquable est l'activité protéolytique avec 5 souches (38%) et une activité de cellulase (31%) avec 4 souches. L'activité lipolytique et amylolytique (14%) par activité avec 2 souches. 7% pour l'activité pectinolytique avec une souche et absence totale de l'activité lactosique.

Cette contribution à l'étude des souches fongiques thermophiles peut être complétée par :

- l'identification moléculaire de ces souches (combinaison de l'approche phénotypique avec l'approche génotypique).
- la purification des enzymes hydrolases produites par ces souches et l'étude de leurs propriétés pour déterminer leurs domaines d'exploitation.

- L'extraction et le séquençage des gènes codant pour ces enzymes. Ils pourraient être envisagés d'améliorer et de créer des versions des séquences codantes. Pour obtenir des nouvelles expressions d'enzyme d'intérêt.

- l'optimisation des paramètres de production de ces enzymes pour une bonne rentabilité.

# **Références Bibliographiques**

1. Adjimi M. et Kebkoub A. 2019. Activités hydrolases de moisissures isolées du sol des sources thermales. Mémoire de master, université Mohamed Khider de Biskra, Algérie, pp.29-33.
2. Baret J. L. 1982. Les enzymes: production et utilisation industrielles. Bordas. Paris 23(123), 140-153.
3. Beghoul B. et Hammoudi I. 2016. Mesure de l'activité protéolytique, polysaccharidique et lipidique des souches mycéliennes isolées d'un sol sale. Mémoire de master, Université des frères Mentouri Constantine, algérie.
4. Berger E., Zhang D., Zverlov VV., Schwarz WH. 2007. Two non cellulosomal cellulases of *Clostridium thermocellum*, Cel 9 I and Cel 48 Y, hydrolyse crystalline cellulose synergistically. FEMS Microbiol Lett 268:194–201.
5. Biourge P.1923. Les moisissures du groupe *Penicillium link.* vol. 33, de la cellule. Recueil de cytologie et d'histologie générale. A.Uystpruyst. 330p.
6. Blochl E., Rachel R., Burgraff S., Hafendbradl D., Jannasch H.W., Stetter K. 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(1): 14-12.
7. Boiron P. 1996. Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P19-79.
8. Bornscheuer T. 2002. Microbial carboxyl esterases classification, properties, and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews, P: 73-81.
9. Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Vayssier Y., Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2ème édition. Masson. Paris. 512p.
10. Boulefkhad N. et Talhi A. 2018. La mise en évidence de la production de quatre enzymes (protéase, amylase, cellulase et pectinase) par des micro-organismes isolés à partir d'eau thermale et sol proche des sources thermales. Mémoire de master, Université des frères Mentouri Constantine 1, Algérie.
11. 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.



12. Bousseboua H. 2005. Eléments de Microbiologie Générale. Programmes de graduation. Edition de l'Université Mentouri. Constantine Algérie.
13. Brock T. D. 1995. The road to yellow stone and beyond. Annu. Rev. Microbiol.49 : 1-28.
14. Braz J. 2006. Caractérisation de la lipase alcaline de *Fusarium oxysporum* et effet de différents tensioactifs et détergents sur l'activité enzymatique. Microbiologie industrielle. São Paulo, vol.37 n ° 4.
15. Cahagnier B. et Richard-Molard D. 1998. Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158.
16. Chabasse D., Bouchara J. P., De Gentile L., Brun S., Cimen B., Penn P. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Edition Bioforma. Paris.
17. Chandrasekaran S., Kumaresan S. S. P., Manavalan M. 2015. Production and Optimization of Protease by Filamentous Fungus Isolated from Paddy Soil in Thiruvarur District Tamilnadu. Journal of Applied Biology and Biotechnology 3(6): 66-69.
18. Chasseur C. et Nolard N. 2003. Les champignons de l'habitat 1ère partie : introduction a la mycologie, risque pour la sante, expertises. p: 3.4.7.8.
19. Clark H. E., Geldriche E. F. B., Kabler P. W., Huff C. B. 1985. Identification of Industrial microorganismes. Appl. Microbiol. Process Biochem. 30: 723-727.
20. Conner D.E. et Beuchat L. R. 1987. Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. International Journal of Food Microbiology (4): 303-312.
21. Cooney D. G. et Emerson R. 1964. Thermophilic fungi. An account of their biologie activities and classification. San Francisco & London, W. H. Freeman Clife & Co. 188p.
22. Cordova L. J. A. 1998. Isolement, identification et physiologie des champignons thermophiles en vue de la production de lipases par fermentation en milieu solide. Thèse de doctorat, univercity de Montpellier II sciences et techniques du Langiedoc, Mexique, 267p.

23. Dugat M. 2014. Apport de la spectrométrie de masse et de la biologie moléculaire à l'identification des champignons filamenteux au laboratoire de mycologie médicale. Thèse de doctorat, université de Limoges, 122 p.
24. Davet P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P : 52-57.
25. Delarras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc ; éditions médicales internationales. P: 776
26. Delgado-Jarana J., Rincon A. M., Benitez T. 2002. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology* 148: 1305- 1315.
27. Devi M. K., Banu A. R., Gnanaprabhal G. R., Pradeep B.V., Palaniswamy M. 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolates *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian. Sci. Technol* 1 (7): 1-6.
28. Divies K., Jost R., Mahadevan J., Monti J. C. 1984. Utilisation de la méthodologie expérimentale pour la production des acides organiques par les bactéries acétiques. *J. Milk Dairy*. 35 : 292-297.
29. Dufresne P. 2014. Identification des champignons d'importance médicale. Stage de laboratoire. Institut National de Santé Publique, Québec (Canada). 64p.
30. Ellaiah P., Adinarayana K., Bhavani Y., Padmaja P., Srinivasulu B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus species*, *Process Biochem* 38: 615 -620.
31. Ellis D. H. 1980. Thermophilous Fungi Isolated from some Antarctic and Sub-Antarctic Soils. *Mycologia* 72(5): 1033-1036.
32. Ertan F. et Balkan B. 2007. Production of  $\alpha$ -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol. Biotechnol* 45: 439-442.
33. Favela-Torres E., Volke- Sepúlveda T., Vniegra-Gonzalez G. 2006. Production of hydrolytic de polymerizing pectinases. *Food Technol. Biotechnol* 44(2): 221-227.
34. Fogarty W. M. and Kelly C. T. 1980. Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion*. London: Academic Press, 5: 115-170.

35. Frazier W.C. 1967. Miscellaneous foods. Food microbiology. p 350.
36. Gopinath S., Periasamy A., Hilda A. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience* 46(2):119-126.
37. Granner D. K., Murray R. K., Rodwell V. W. 2008. *Biochimie de Harper*. 3e édition. De Boeck. Bruxelles, pp. 49-51
38. Gregoire P., Fardeau M. L., Guaso S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Dubourg K., Cambar J., Ollivier B. 2009. Les micro-organismes de l'extrême. *Press therm climat* 146: 49-61.
39. Guiraud J. P. et Rosec J. P. 2004. *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. Afnor, p300.
40. Guiraud J. P. 1998. *Microbiologie alimentaire*. Dunod. Paris, pp.7-330.
41. Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., GoswamiK V., Chauhan B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 38 :1599-1616.
42. Gusakov A., Sinitsyn A., Berlin A; Markov A., Ankudimova N. 2007. Desing of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose *Biotechnol. Bioeng* 97: 1028–1038.
43. Hendriksen H. V., Pedersen S., Bisgard-F. H. 1999. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches cultivate on state fermentation system. *European Journal of Applied Microbiology and Biochemistry*, 33: 6284-6294.
44. Hennen G. 2006. *Biochimie Approche bioénergétique et médicale*; France: Dunod, p167.
45. Henry W. J. 2006. *Biochimie générale*. France: Dunod. pp75-79.
46. Issac S., Frankland J. C., Watling R., Whalley A. J. S. 1993. *Airworth and Bishys Dictionary of the Fungi*. 8 Th editions, CAB International, Wallingford, United Kingdom. P.616.
47. Jeager K. E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Heubel N. V., Misset O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 15(1):29-63.
48. Julien R. 2002. Les moisissures parlons-en. *Objectif prevention* 25 (4): 7-8.

49. Kader A J., Omar O., Feng L S. 1999. Isolation of cellulolytic fungi from the barrio Highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of Biodiversity and Environmental Conservation.
50. Kathiresan K. et Manivannan S. 2006. - Amylase production by *Penicillium*. African journal of biotechnology 5(10).
51. Kiffer E. et Morelet M. 1997. Les deutéromycètes: Classification et clés d'identification génétique. Editions Quae, p19.
52. Korish M. 2003. Production, Purification, Properties and application of the cellulase from a wild type strain of a yeast isolate. These de doctorat. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg- University, Mainz, Germany.p140.
53. Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T. C. 2008. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. Res. J. of Microbiol 3(12): 661–672.
54. Lara-marquez A., Zavalo-paramo M., López-romero E., Camacho H. C. 2011. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. Biotechnol 33:859-868.
55. Larpent-Gourgaud M. et Sanglier J. J. 1992. Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris, pp. 574-587.
56. Lecellier A. 2013. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. université de Reims Champagne- Ardenne, France, pp. 9-27.
57. Leveau S. B. Bouix M. 1993. Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier. Paris, pp. 216-244.
58. Lévêque C. 2008. La biodiversité au quotidien: le développement durable à l'épreuve des faits. Editions Quae, p.144.
59. Lonsane B. K. et Ramesh M. V. 1990. Production of bacterial thermo stable  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. Advances in applied microbiology 35: 1-56.
60. Madigan T. M. et Martinko M. J. 2007. Brock biologie des micro-organismes. Pearson. France. p.1047.
61. Maheshwari R., Bradwa J. G., Bhat M. K. 2000. Thermophilic fungi their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Revs 64(3): 461- 488.

62. Mcauliffe. 2012. Industrial enzymes and biocatalysis. Handbook of industrial chemistry and biotechnology, pp.1183-1227.
63. Meunier N. E. 1999. Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Thèses de doctorat, univercity Quebec, Canada, pp.1-168.
64. Meyer A., Deiana J., Bernard A. 2004. Cours de microbiologie générale : avec Problèmes et exercices corrigés. 2ème édition, Doin, France, p. 430.
65. Meziani A. et Mahcene H. 2017. Activités hydrolases des souches fongiques. Production par fermentation de cellulase et d' $\alpha$ -amylase par *Penicillium sp* sur substrat solide. Mémoire de master, université des frères Mentouri Constantine, Algérie.
66. Miller J. D. 2002. Enzyme hydrolysis of protein by various enzyme preparations. J. Ferment. Technol 54: 872-884.
67. Marjolaine V., Georges L., Michel M. 2002. Les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. Biotechnol 6(3) :131-142.
68. Najjar A. 2010. Etude quantitative de la sécrétion de lipase. De la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse de doctorat: Microbiologie et biotechnologies, université de la méditerranée Aix Marseille II, p. 132.
69. Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris, pp. 210-216.
70. Nielson J. E., Borchert T., Vriend G. 2001. Protein Engineering: the determinant of  $\alpha$ -amylase pH-activity profiles. Oxford University Press 14(7): 505-512.
71. Parks C. L. 1997. Hand book of microbiological media. 2 edition, CRC, pp. 339-400.
72. Pitt J. I. and Hocking A. D. 2009. Fungi and Food Spoilage. 3<sup>ème</sup> edition, Springer, 520p.
73. Prescott. Woolverton J. Sherwood L. M., Willey J. M. 2013. Microbiologie.4eme edition, pp. 600-606.
74. Punt J. P., Biezen V. N., Canesa A., Albers A., Mangnus J., Hondel D. V. C. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. Trends in biotechnology 20 (5): 200-206.

75. Quentin F., Gallet P. F., Guillonton M., Quintard B. 2015. Maxi fiches biochimie. 2eme édition, Dunod., France, pp. 124-125.
76. Chamekh R., Deniel F., Donot C., Jany J. J., Nodet P., Belabid L. 2019. Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebkhia of Oran in Northwestern of Algeria. *Microbiology* 47(2): 230-241.
77. Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 597-635.
78. Regnault J. P. 1990. *Microbiologie générale*, Decarie. Paris.859p.
79. Rivière J. 1975. *Les applications industrielles de la microbiologie*. Paris, Masson, pp.31-195.
80. Salimi O. 2011. *Impact sanitaire des moisissures de l'environnement domestique dans la wilaya de Rabat-Salé-Zemmour-Zaër (Doctoral dissertation)*, p.14.
81. Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Proc. Biochem.*40: 2689–2694.
82. Scriban R. 1993. *Biotechnologie*. 4ème édition. Technique et Documentation Lavoisier, Paris. 904p.
83. Selosse A. M. et Durrieu G. 2004. Une classification mycologique phylogénétique francophone (en 2003), *Acta Botanica Gallica* 151(1):73-102.
84. Sine J. P. 2010. *Enzymologie et applications*. Ellipses, Paris. 464p.
85. Snaiki J., Nadif A., Ouhssine M. 2006. Détection biochimique d'*Erwinia carotovora* sub *sp.* *carotovora* de tubercules de betterave sucrière atteints de pourriture molle. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 145:53-60.
86. Sumantha A., Larroche C., Pandey A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology* 244:211-220.
87. Sunitha V. H., Nirmala D. D., Srinivas C. 2013. Extracellular Enzymatic Activity of *Endophytic* Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. *World Journal of Agricultural Sciences* 9(1): 01-09.

88. Tabuc C. 2007. Flore fongique de différents substrats et condition optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Pathologie et Génétique. université de Bucarest, Roumanie, pp.16-57.
89. Tatiana da Costa R. P. et Flevo F. F. 2005. Extraction and assay of pectic enzymes from Peruvian carrot (*Arracacia xanthorriza* Bancroft). Food Chemistry 89(1): 85-92.
90. Tatsinkou F. B., Taveai F., Ndjouenkeui R. 2005. Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. African Journal of biotechnology 4 (1):14-18.
91. Tensey M. R. et Brock T. D. 1978. Microbial life at high temperature, aerological aspect, Kushner. Life in extreme environments. Academic press. Ltd. London. United Kingdom.
92. Tolan J. S. 1996. Pulp and paper; in: «Industrial enzymology » Godfrey T and West S. (eds.). 2eme edition, Stockton Press, New York.
93. Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H., Kaneda M. 2001. Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. Biol. Chemistry 382: 1509-1513
94. Ulacio D., Perez C., Pineda Y. J. 1997. Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in Portuguesa state, Venezuela. Bioagro 9 (1): 3-11.
95. Weber R.W.S. and Webster J. 2006. Teaching techniques for mycology: 24. Patterns of basidiospore germination in *Auricularia* (Hétérobasidiomycètes). Mycologist 20(3) :105-108

# **Annexes**



---

## **Annexe 1 : Milieux de repiquage et de conservation des souches**

### **Milieu Potato-Dextrose-Agar (P.D.A)**

Agar-agar 20g.

Pomme de terre 200g.

Dextrose 20g.

Eau distillée 1000ml.

Laver, couper en morceaux les pommes de terre, les faire cuire, filtrer, ajouter l'agar, dextrose le puis ajuster la quantité d'eau. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

### **Czapek Yeast Extract Agar (CYA)**

$K_2HPO_4$  1g.

Czapek concentré 10ml.

Solution métallique 1ml.

Extrait de levures, en poudre 5g.

Saccharose 30g Agar 15g.

Eau distillée 1000ml.

Stériliser à l'autoclave à 121°C pour 15 min, le pH final est 6,7.

### **Czapek concentré**

$NaNO_3$  30g  $KCl$  5 g.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  5 g

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g.

Eau distillée 100 ml.

### **Solution de métallique**

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,5g.

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  01 g.

Eau, distillée 100 ml.

Maintenir indéfiniment sans stérilisation.

**Malt Extract Agar (MEA)**

Extrait de Malt 20g.

Peptone 1g.

Glucose 20g.

Agar 20g.

Eau distillée 1000 ml.

Autoclavage à 120 °C pendant 15 min.

## **Annexe 2. Milieux de la mise en évidence des activités enzymatiques**

### **Lait gélosés**

Lait écrèmes 100g.

Agar 20g.

Eau distillé 1000 ml.

Stériliser à l'autoclave.

### **Milieu de culture à base de gélatine 5%**

Gélatine 50g.

Agar 20g.

Eau distillé 1000 ml.

### **Milieu de culture à base de lactose 5%**

Lactose 1g.

Agar 20g.

Eau distillé 1000 ml.

### **Milieu de culture à base d'amidon 1%**

Amidon 1g.

Agar 20g.

Eau distillé 1000 ml.

### **Milieu de culture à base de Tween 80 (Chamekh *et al.*, 2019).**

Peptone 10g.

Chlorure de sodium 05g.

Chlorure de calcium 0.1g.

Agar 17g.

Eau distillée 1000ml.

Tween 80 10ml.

**Milieu de culture à base de pectine**

Pectine 5 g.

Extrait de levure 5 g.

Agar 20 g.

Eau distillée 1000 ml.

**Milieu de culture à base de cellulose 3%**

Cellulose 3g.

Agar 20g.

Eau distillé 1000 ml.

### **Annexe 3. Les indicateurs colorés**

#### **Rouge Congo à 0.1%**

Rouge Congo 0.1g.

Eau distillé 100 ml.

Dissoudre 0.1g de Rouge Congo dans un petit volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 100 ml.

#### **Acétate de cuivre à 0,7%**

Acétate de cuivre 7,5g.

Eau distillée 1000ml.

Dissoudre 7,5g de l'acétate de cuivre dans un petite volume d'eau distillée puis compléter le volume jusqu'à 1000ml.

#### **Eau iodée (Lugol)**

Iode 1g.

Iodure de potassium 2g.

Eau distillé 100 ml.

Dissoudre 2g d'iodure de potassium dans un peu d'eau distillée puis ajouter 1g d'iode, ensuite compléter à 100 ml d'eau distillée (ajouter éventuellement un peu d'iode pour permettre la dissolution totale de l'iode).

#### **Lactophénol (Guiraud, 1998)**

Acide lactique 100 ml.

Phénol 100 g.

Glycérol 100 ml.

Eau distillée 100 ml.

#### **Annexe 04. Solutions**

##### **Solution de chlorure de sodium (NaCl) 1M**

Chlorure de sodium 58,44g.

Eau distillée 1000ml.

##### **Eau physiologique**

Chlorure de sodium 9g.

Eau distillée 1000ml

## ملخص

تتمثل أهداف عملنا في تحديد وإثبات النشاط التحليلي للإنزيمات الخارج الخلوية لسلاسل عفن عزلت من بيئة قاسية (الينابيع الحارة) ، هذه السلالات هي مصدر محتمل للإنزيمات التي يمكن أن تكون مقاومة للحرارة وبالتالي مثيرة للاهتمام لتطبيقاتنا الصناعية. قمنا بتتبع وتحديد 12 سلالة فطرية ثم اختبرنا نشاطها التحليلي. بعد زرع العينات في وسط PDA تم عزل 4 أصناف مختلفة: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia et Cladosporium*. و الأصناف الأكثر انتشارًا هي *Aspergillus* و *Penicillium*. أظهرت السلالات التي تم اختبارها خمسة أنشطة من أصل 6 تم فحصها: أظهرت 5 سلالات نشاطًا تحليليًا للبروتين ، وأظهرت 4 سلالات نشاطًا سيليلوزيًا، أما نشاط الاميلاز و الليباز فتم إيجاد سلالتين في كل نشاط وسلالة واحدة أظهرت نشاطًا للبيكتين.

**الكلمات المفتاحية:** عفن , مصدر حراري , نشاط تحليلي , إنزيم خارج خلوي, تعريف.

## Résumé

Les objectifs de notre travail sont d'identifier et de démontrer l'activité hydrolytique des enzymes extracellulaire des moisissures isolées de milieu extrême, source thermique. Ces souches sont une source potentielle d'enzymes qui pourraient être thermorésistantes et donc très intéressantes pour leurs applications industrielles. Nous avons purifié et identifié 12 souches de moisissures puis testées leur activité catalytique à l'aide de milieux de cultures solides préparées à base de substrats appropriés. Les cultures des prélèvements sur milieu PDA ont permis d'isoler 4 genres différents: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* et *Cladosporium*. Les genres les plus dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Les souches testées ont présenté cinq activités sur les 6 recherchées : 5 souches ont présenté une activité protéolytique, 4 souches ont montré une activité cellulosique, l'activité amylolytique et lipolytique à été montré par 2 souches pour chaque activité et une souche a présenté l'activité pectinolytique.

**Mots clés :** moisissures, source thermique, activité hydrolase, enzyme extracellulaire, identification.

## Abstract

The objectives of our work are to identify and demonstrate the hydrolytic activity of the extracellular enzymes of isolated moulds of extreme medium, thermal source. These strains are a potential source of enzymes that could be heat resistant and therefore very interesting for their industrial applications. We purified and identified 12 mould strains and tested their catalytic activity using solid culture media prepared with appropriate substrates. The cultures of the PDA samples allowed isolating 4 different genera: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia* and *Cladosporium*. The most dominant genera are *Aspergillus* and *Penicillium*. The strains tested presented five activities out of the 6 searched: 5 strains showed proteolytic activity, 4 strains showed cellulosic activity, amylolytic and lipolytic activity to be shown by 2 strains for each activity and one strain exhibited pectinolytic activity.

**Key words:** moulds, thermal source, hydrolase activity, extracellular enzyme, identification.