



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

Référence / 2021

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Rahal Maria Imene

Le: jeudi 1er juillet 2021

Activités hydrolases des moisissures isolées d'un milieu extrême

Jury:

M.	Hakim Habel	MAA	Université de Biskra	Président
Mme.	Fatiha Bengueraichi	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Sara Boulmaiz	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020/2021

Remerciement

Pour commencer je remercie ALLAH pour tout ce qu'il m'a donné comme santé patience et volonté tout au long de ma vie et que par sa grâce et sa miséricorde ce travail a pu être réalisé.

Ensuite je remercie mon encadreur Mme. Fatiha BENGUERAICHI, qui m'a prodigué les orientations et les conseils nécessaires qui m'ont permis d'effectuer ce travail. Je la remercie également pour sa gentillesse sa bienveillance et sa patience.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du jury pour avoir acceptés de superviser mon mémoire.

Un grand merci à

La source d'amour, à celle qui attend chaleureusement ce jour ma chère Mère
Et mon très cher père qui m'a supporté, aidé, encouragé.

Enfin mes remerciements à toute ma famille pour leur aide leur soutien et leur présence à mes côtés.

Sommaire

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III

Introduction : Etude Bibliographique

Chapitre 1 : Hydrolases3

1. Hydrolases.....	2
1.1 Glycosidases.....	2
1.2 Lipases	2
1.3 Protéases	2
1.4 Application industriel des hydrolases	3

Chapitre 2 : Moisissures

2. Moisissures.....	5
2.1 Classification	5
2.1.1 Zygomycètes	5
2.1.2 Basidiomycètes.....	5
2.1.3 Ascomycètes	5
2.1.4 Deutéromycètes.....	6
2.2 Méthodes d'identification	6
2.2.1 Identification morphologique	6
2.2.1.1 Identification macroscopique	6
2.2.1.2 Identification microscopique	6
2.2.2 Identification moléculaire.....	6
2.2.2.1. Spectrométrie de masse type Maldi-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of Flight).....	7
2.2.2.2 DNA barcoding (Le code-barres ADN)	7
2.3 Liste des moisissures productrices des hydrolases	8

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1. Echantillonnage	9
3.2. Analyses physicochimiques d'échantillons de sol	10
3.3. Isolement.....	10

3.4. Identification des souches isolées	10
3.4.1. Identification morphologique	10
3.4.1.1. Identification macroscopiques	10
3.4.1.2. Identification microscopiques	10
3.4.2. Identification moléculaire	11
3.4.2.1. Extraction d'ADN	11
3.4.2.2. Amplification par PCR	11
3.4.2.3. Le séquençage	13
3.4.2.4 Analyse phylogénétique	13
3.5. Activités hydrolases sur milieux gélosés	14
3.5.1. Activité lipolytique	15
3.5.2. Activité protéolytique	15
3.5.2.1. Milieu gélatiné	15
3.5.2.2. Milieu caséine	15
3.5.3. Activité cellulolytique	16
3.5.4. Activité amylolytique	16
Résultats et discussion	
4.1. Isolement	17
4.2. Analyses physicochimiques d'échantillons de sol	17
4.3. Identification des souches isolées	18
3.4.3.1. Identification morphologique	18
3.4.3.2. Identification moléculaire	25
4.4. Activités hydrolases sur milieux gélosés	27
4.4.1 Activité lipolytique	27
4.4.2. Activité protéolytique	28
4.4.3 Activité cellulolytique	28
4.4.4. Activité amylolytique	29
Conclusion	30
Bibliographie	31
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1. Application industriel des hydrolases	3
Tableau 2. Moisissures productrices des hydrolases.....	8
Tableau 3. Mélange réactionnel de PCR.	12
Tableau 4. Programme de PCR.....	12
Tableau 5. Moisissures isolées à partir d'échantillons de sol	17
Tableau 6. Analyse physicochimique d'échantillon de sol.	17
Tableau 7. Identification morphologique de la souche 1.....	18
Tableau 8. Identification morphologique de la souche 2.....	20
Tableau 9. Identification morphologique de la souche 3.....	21
Tableau 10. Identification morphologique de la souche 4.....	23
Tableau 11. Identification morphologique de la souche 5.....	24
Tableau 12. Activité enzymatique des isolats fongique.	27

Liste des figures

Figure 1. Schéma simplifié de la technique Maldi TOF.....	7
Figure 2. Carte de la Grande Sebka Oran	9
Figure 3. Sites d'échantillonnages	9
Figure 4. Les étapes de la technique DNA barcoding	14
Figure 5. Arbre phylogénétique des souches fongiques montrant les plus proches voisins.....	26

Liste des abréviations

CMC: CarboxyMéthylCellulose

CYA: Czapek Yeast Agar

EC : Enzyme Commission

EI : indice enzymatique

MEA: Malt Extrat Agar

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDA: Potato Dextrose Agar

pH: Potentille d'hydrogène

ITS: internal transcribed spacer

Introduction

Introduction

Les enzymes représentent le plus grand groupe de protéines, elles sont présentes dans toutes les cellules et indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes. Les enzymes sont très spécifiques et présentent des propriétés diverses ce qui les a rendus de plus en plus utiles dans de nombreux domaines tel que l'industrie (alimentaire, pharmaceutique et l'industrie des détergents), leur utilisation dans les domaines industriels connaît un succès remarquable et ouvre des nouvelles perspectives (Porto de Souza Vandenberghe *et al.*, 2020).

Les hydrolases dominent le marché des enzymes, représentant plus de 70 % de toutes les ventes d'enzymes, elles sont ubiquitaire et obtenues à partir plusieurs sources animales, végétales ou et les micro-organismes (Li *et al.*, 2012).

Les micro-organismes et plus précisément les moisissures présentent une source principale pour la production des enzymes à cause de leurs faibles couts et leur manipulation génétique facile (Grégoire *et al.*, 2009). Les enzymes d'intérêt industrielle doivent être s'adapter à tous les conditions de vie comme la haute température, salinité, pH acide, donc il est nécessaire d'utilisé des moisissures extrêmophiles qui sont capables de résistés et s'adaptés à tous les paramètres physico-chimiques (Grégoire *et al.*, 2009).

De ce fait, les objectifs de ce travaille sont :

- ❖ L'isolement et l'identification morphologique et moléculaires des souches des moisissures issues du sol de milieu extrême « Sebka ».
- ❖ Mise en évidence des activités hydrolase des moisissures extrêmophiles sur milieux gélosés.

Etude Bibliographique

Chapitre 1

Hydrolases

1. Hydrolases

Les hydrolases constituent un ensemble d'enzymes très complexe qui catalysent les clivages de liaisons chimiques par réaction avec l'eau. Selon l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire les hydrolases appartiennent à la classe EC3, et leurs principales sous-classes comprennent : Glycosidases, lipases, protéases (Vandenberghé *et al.*, 2020).

Les hydrolases ne nécessitent pas de cofacteurs et sont généralement des enzymes extracellulaires de sorte qu'elles peuvent être facilement purifiées. Ces enzymes présentent une grande spécificité pour le substrat par exemple les glycosidases qui agissent sur les liaisons glycosidiques entre deux glucides ou plus, et les protéases qui catalysent l'hydrolyse des protéines (Vandenberghé *et al.*, 2020).

1.1 Glycosidases

Les glycosidases sont des enzymes de classe 3 (EC 3.2.1) produites par les plantes, les animaux et les micro-organismes. Ils peuvent être classés selon le type de substrat, la similitude évolutive et le mécanisme d'action. Les glycosidases catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques de polysaccharides complexes, ces enzymes comprennent (cellulase, amylase, lactase, xylanase, pectinase) (A Linares-Pasten *et al.*, 2014).

1.2 Lipases

Les lipases (EC 3.1.1.3) sont des enzymes ubiquitaires qui jouent un grand rôle dans tous les aspects du métabolisme des graisses. Ces enzymes hydrolysent les triglycérides en acides gras et en glycérol, elles sont capables aussi de catalyser la synthèse d'esters formés à partir de glycérol et acides gras (estérification) (Sarmah *et al.*, 2018).

1.3 Protéases

Les protéases sont des enzymes qui hydrolysent la liaison peptidique dans une molécule de protéine, elles appartiennent au groupe 3 des hydrolases et au sous-groupe 4, et peuvent également être catégorisées selon la source d'isolement (animale, végétale ou microbienne), l'action catalytique (endo ou exopeptidase), le site actif (les protéases à sérine, à carboxysérine...), le pH

(acide, neutre, alcaline). La protéase est l'une des enzymes commerciales les plus importantes, elles sont produites à partir des plantes et des animaux, mais à cause de la faible production de protéases à partir de ces 2 sources les protéases commerciales sont produites exclusivement à partir de micro-organismes (dos Santos Aguilar et Sato, 2018).

1.4 Application industrielle des hydrolases

Tableau 1. Application industrielle des hydrolases

Industrie	Enzyme	Application
Alimentaire	Lipase	Élimination des graisses de viande et de poisson (Fickers <i>et al.</i> , 2008). Utilisées pour le développement de la saveur dans les produits laitiers (Chandra <i>et al.</i> , 2020).
	Protéase	Utiliser dans l'industrie laitière pour coaguler les protéines du lait (caséine) et former le caillé pour enfin produire le fromage (Razzaq <i>et al.</i> , 2019).
	Glycosidase	Dans la boulangerie ils améliorent le volume et la texture de la pâte (Shrivastava, 2020).
Papeterie	Lipase	Augmenter la blancheur du papier (Chandra <i>et al.</i> , 2020).
	Glycosidase	Hydrolyse de l'amidon pour réduire la viscosité pour rendre la surface du papier suffisamment lisse et résistante (Shrivastava, 2020).
Textile	Protéase	Améliorer la qualité du cuir, aider à réduire les déchets et, économiser du temps et de l'énergie (Singh <i>et al.</i> , 2016).
	Glycosidase	Utiliser comme agent de désencollage pour l'hydrolyse de l'amidon sans effets néfastes sur le tissu (Shrivastava, 2020). Élimination des courtes fibres pour donner une apparence lisse et brillante au tissu (A Linares-Pasten <i>et al.</i> , 2014).
Industrie de	Lipase	Les lipases sont ajoutées aux détergents pour éliminer les taches

détergent		d'huile sur les tissus (Chandra <i>et al.</i> , 2020).
	Protéase	Utiliser comme ingrédients les détergents pour améliorer le nettoyage et éliminer rapidement les taches de sang (Razzaq <i>et al.</i> , 2019).
	Glycosidase	Pour améliorer la capacité des détergents à éliminer les taches tenaces et dégrader les résidus de féculents (Shrivastava, 2020).
pharmaceutique	Protéase	Elles participent au développement d'agents thérapeutiques efficaces, tels que les anticancéreux, les antimicrobiens, les anti-inflammatoires (Singh <i>et al.</i> , 2016).

Chapitre 2

Moisissures

2. Moisissures

Les moisissures sont des champignons ubiquistes filamenteux qui se développent sur les matières organiques (végétaux, feuilles, herbes, bois), le terme moisissures est dû à leur aspect leur texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse. Elles se reproduisent de façon sexuelle ou végétative par la production des spores, leur rôle est de dégrader la matière organique morte ou quelque fois vivante (Salimi, 2011).

2.1 Classification

La classification des moisissures est basée sur les modalités de reproduction et leurs aspects morphologiques les zygomycètes, les basidiomycètes, les deutéromycètes et les ascomycètes (Dendouga, 2006).

2.1.1 Zygomycètes

Sont des moisissures filamenteux non flagellés saprophyte du sol et de nombreux substrats alimentaires, elles possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (Guarro *et al.*, 1999). Les zygomycètes se reproduisent par les zygospores (reproduction sexuée), ou par les sporanges reproduction asexuée (Spatafora *et al.*, 2016).

Certains des zygomycètes peuvent être utiles pour l'homme par la production de composés tels que les acides gras et le biodiesel mais aussi elles peuvent causer des maladies rares et mortelles telles que la zygomycose (Spatafora *et al.*, 2016).

2.1.2 Basidiomycètes

Sont des moisissures parasites qui se caractérisent par un thalle cloisonné avec présence de « boucles » au niveau des cloisons, elles produisent de spores sexuées par bourgeonnement nommés basidiospores (Salimi, 2011).

2.1.3 Ascomycètes

Sont des champignons à thalle mycélien cloisonné, la production des spores sexuée est endogène (asque) ces asques sont généralement octosporés, ils peuvent être soit libres comme chez les Hémiascomycètes, ou bien se trouver protégés à l'intérieur d'un ascocarpe comme chez

les Ascomycètes (Dugat, 2014). Il comprend près de 50 % de toutes les espèces fongiques connues et environ 80 % des espèces pathogènes et opportunistes (Guarro *et al.*, 1999).

2.1.4 Deutéromycètes

Les deuteromycètes ou champignons anamorphes, champignons imparfaits sont des champignons filamenteux à thalle septé et mycélium cloisonné se reproduisant par le mode asexué, cette classe contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires. Les Deuteromycotina sont divisés en trois classes : Les Blastomycètes, les Hyphomycètes et les Coelomycètes (Dendouga, 2006).

2.2 Méthodes d'identification

2.2.1 Identification morphologique

Identification morphologique est basée sur les critères morphologiques étudiée par les examens macro-microscopiques

2.2.1.1 Identification macroscopique

Repose sur l'observation des critères morphologiques à l'oeil nu tel que la couleur de la colonie, la forme et la texture (poudreuse, cotonneuse...), la taille, l'odeur et la croissance en fonction du milieu de culture et de la température d'incubation (Blaize, 2021).

2.2.1.2 Identification microscopique

L'identification microscopique des moisissures repose sur plusieurs méthodes, elle permet de déterminer l'aspect des filaments (ou hyphes), hyphes septés (cloisonnés) ou siphonné, la couleur des hyphes (foncées ou claires), les spores : endogènes ou exogènes. Cette analyse est réalisée sous microscope à l'objectif $\times 40$ ou $\times 100$ (Quero, 2018).

2.2.2 Identification moléculaire

Dans certaines cas, l'identification basée sur le phénotype (analyse macro-microscopique) n'est pas précise et peuvent amener à de mauvaises identifications car elle nécessite une expertise donc de nouvelles méthodes moléculaire qui donnent des résultats plus fiables et plus précises

sont apparus parmi ces méthodes: la spectrométrie de masse MALDI-TOF, DNA barcoding (Blaize, 2021).

2.2.2.1. Spectrométrie de masse type Maldi-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation Time of Flight)

Cette méthode représente le premier outil permettant une identification rapide, précise et standardisée des moisissures, en comparant un spectre de masses protéiques à une banque de références de spectres obtenus à partir de souches à l'identification connue. Le principe de cette technique est de déposer sur une cible (une surface métallique) un extrait protéique, puis le dépôt est recouvert d'une matrice le plus souvent l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) cette matrice protège contre l'effet du laser avec formation d'ions. Ces ions migrent selon leur masse dans le tube de vol sous vide, chaque molécule entraîne un impact sur le détecteur ces signaux sont retranscrits sous forme de spectre avec différents pics de chaque échantillon (Blaize, 2021).

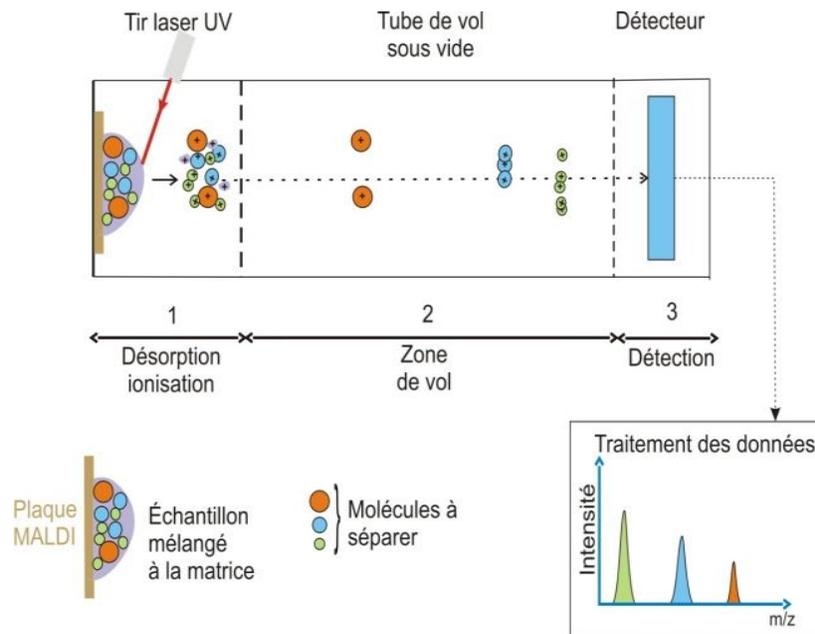


Figure 1. Schéma simplifié de la technique Maldi TOF (Quero, 2018).

2.2.2.2 DNA barcoding (Le code-barres ADN)

Le code-barres ADN, est une nouvelle méthode rapides et précises d'identifications d'espèces en utilisant des régions génétiques courtes(500-800 paires de bases) et standardisé qui

sont encadrées par de régions conservées pour attribuer des amorces universelles DNA barcode (la région ITS, Cox1), puis les séquences obtenues sont comparé aux bases de données de référence pour trouver l'espèce correspondante. Malgré que cette méthode n'ait pas besoin d'experts, rapide, rentable et également accessible à tous mais le pouvoir discriminant de cette est insuffisant car les résultats sont limiter juste pour les espèces déjà trouver dans la banque de référence (Xu, 2016).

2.3 Liste des moisissures productrices des hydrolases

Les hydrolases peuvent être dérivées de plusieurs sources telles que les plantes, les animaux et les micro-organismes, malgré les différentes sources des hydrolases les micro-organismes (bactérie, fungi, champignons, moisissures) sont considérés comme une importante source pour leur production par rapport aux sources animales et végétales. Parmi les moisissures productrices des hydrolases:

Tableau 2. Moisissures productrices des hydrolases

Moisissures	Enzyme	Référence
<i>Aspergillus</i>	Amylase, cellulase, lipase, protéase	(Tiwari <i>et al.</i> , 2015) ;(Orji <i>et al.</i> , 2016) (Chandrasekaran <i>et al.</i> , 2015) ;(Geoffry et Achur, 2018)
<i>Penicillium</i>	Amylase, cellulase, lipase	(Tiwari <i>et al.</i> , 2015) ;(Vaishnav <i>et al.</i> , 2018) (Melani <i>et al.</i> , 2019)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipase	(Geoffry et Achur, 2018)
<i>Alternaria</i>	Cellulase	(Ijez <i>et al.</i> , 2011)
<i>Fusarium</i>	Protéase	(Ja'afaru <i>et al.</i> , 2020)
<i>Rhizomucor</i>	Protéase	(Sun <i>et al.</i> , 2018)
<i>Trichoderma</i>	Lipase, cellulase	(Marques <i>et al.</i> , 2012) ;(Orji <i>et al.</i> , 2016)
<i>Wallemia sebi</i>	Lipase	(Jančić <i>et al.</i> , 2016).
<i>Chaetomium</i>	Protéase, cellulase	(Darwich et Abdel-Azeem, 2019)

Partie expérimentale

Chapitre 3

Matériel et méthodes

3.1. Echantillonnage

Les échantillons ont été prélevés du sol à partir de 2 zones de la Grande Sebka d'Oran entre Boutlelis et El Amria, après les avoir nettoyés de tous les dépôts superficiels (pierre, herbe, litière) à une profondeur de 5-15 cm ils ont été mis dans un flacon stérile et transportés au laboratoire pour isolement (Chamekh *et al.*, 2019).



Figure 2. Carte de la Grande Sebka Oran (google map)



Figure 3. Sites d'échantillonnages (Chamekh *et al.*, 2019)

3.2. Analyses physicochimiques d'échantillons de sol

Préparation des suspensions (10 g de sol dans 50 ml d'eau distillée), puis mesuré la conductivité électrique, salinité et pH des suspensions à l'aide d'une conductivité mètre et un pH-mètre (Chamekh *et al.*, 2019).

3.3. Isolement

Pour réaliser l'isolement en commence par la préparation d'une suspension avec 1,5 g de chaque échantillon de sol dans 100 ml d'eau distillée stérile (Mohammadian *et al.*, 2017).

Après l'agitation pendant 20 minutes les suspensions on été diluée (1/10; 1/100; 1/1000; 1/1000) et ensemencé sur les milieux (PDA, MEA) répéter cette étape 3 fois (3 boites de pétries) pour chaque échantillon (Mohammadian *et al.*, 2017).

Incuber les boites à 25 °C pendant 72 h (Mohammadian *et al.*, 2017).

3.4. Identification des souches isolées

3.4.1. Identification morphologique

L'identification morphologique des moisissures repose sur l'observation des différents critères macroscopiques et microscopiques pour :

3.4.1.1. Identification macroscopiques

Elle est basée sur tous les critères observés à l'oeil nu comme la taille des colonies, la forme, leur textures (duveteuses, lisses, cotonneuses, poudreuses), leur reliefs, et leur couleurs (surface, pigment diffusible) la vitesse de croissance (Dufresne et Germain, 2018).

3.4.1.2. Identification microscopiques

Cette identification concerne toute les caractéristiques microscopiques telles que l'extrémité du mycélium, la ramification, la structure de l'hyphe et la présence ou l'absence des spores et leurs formes, la présence et la composition des organes de fructification (Blaize *et al.*, 2021).

3.4.2. Identification moléculaire

3.4.2.1. Extraction d'ADN

Préparer suspension contenant 20 mg de culot mycélien 700 μ l de tampon de lyse, 100 μ g ml⁻¹ de protéinase K et incubé à 60°C pendant 2 h. Après incubation ajouter 210 μ l d'acétate de potassium (pH 4.8) puis vortexer et centrifuger les tubes (1 min, 12 000 x g). Transférer le surnageant (phase contenant l'ADN) dans un nouveau tube et lui ajouter le même volume de phénol-chloroforme puis centrifugés les tubes (5 min, 4°C, 12000 \times g), pour précipité l'ADN ajouter un volume égal d'alcool isopropylique froid puis mettre les tubes à

(-20°C) pendant une nuit. Ensuite, le culot d'ADN séché à été dissoute dans 50 μ l de TE (10 mM de Tris, 1 mM EDTA) et incubation à 4°C (Gnat *et al.*, 2017).

En fin pour contrôlée la qualité d'ADN un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a été utiliser ont mesurent l'absorbance à A260nm, si le rapport 260/280 est environ 1,8 indique que l'ADN est pure. Les échantillons d'ADN peuvent être mesurés aussi par spectrophotométrie à l'aide de divers dosages tels que la diphenylamine ou par fluorescence (Samuel *et al.*, 2003).

3.4.2.2. Amplification par PCR

Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne (PCR), est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques a partir un fragment d'ADN (Miao *et al.*, 2015).

Les amplifications ont été réalisées en utilisant le protocole standard suggéré par le fabricant en dans un thermocycleur Gene Amp® (PCR System 9700) et les séquences utilisés pour amplification Internal transcribed spacer ITS (Moubasher *et al.*, 2018).

-La première étape pour réalisée la réaction du PCR est de préparer le mélange réactionnel.

Tableau 3. Mélange réactionnel de PCR (Moubasher *et al.*, 2018).

Mix PCR	Quantité (µl)
Mix de dNTPs 2mM	0.5
Taq polymérase	0.25
Taq tompon	2.5
Amorce ITS1	1
Amorce ITS4	1
ADN	1

-Placer les tubes contenant le mélange d'amplification dans le thermocycleur et suivi le programme indiqué dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4. Programme de PCR (Moubasher *et al.*, 2018).

Nombre de cycles	Etape	Durée	Température
1	Dénaturation initiale	15 minutes	95°C
30 cycles	Dénaturation	20 secondes	95°C
	Hybridation	40 secondes	50°C
	Elongation	1 minute	72°C
1	Elongation finale	5 minutes	72°C

L'amplification des régions ITS (espacement transcrits internes) a été réalisée à l'aide de la paire d'amorces :

ITS1 5-TCC GTA GGTGAA TGC GG-3 (Moubasher *et al.*, 2018)

ITS4 5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3 (Moubasher *et al.*, 2018).

3.4.2.3. Le séquençage

Le séquençage est un procédé chimique utilisé pour déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T, il repose sur la synthèse d'un fragment ADN par une ADN-polymérase (Lacoste *et al.*, 2017).

Après l'amplification les séquences amplifiées ont été soumises à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% pour la purification, puis les produits purifiés ITS1/ITS4 ont été séquencées à l'aide d'un analyseur génétique 3130xl Applied Biosystems (Al-Musallam *et al.*, 2011).

3.4.2.4 Analyse phylogénétique

En fin pour réaliser l'analyse phylogénétique, la séquence obtenue a été comparée aux séquences ITS disponibles dans la base de données GenBank National Center for Biotechnology Information NCBI en utilisant analyse Fasta, puis elles ont été alignées par le programme BioEdit qui est un programme d'alignement multiple de séquences. L'arbre phylogénétique est ensuite été construit dans le programme MEGA5.

- Tous les étapes utilisées pour identification moléculaire sont résumés dans la figure 3 suivante :

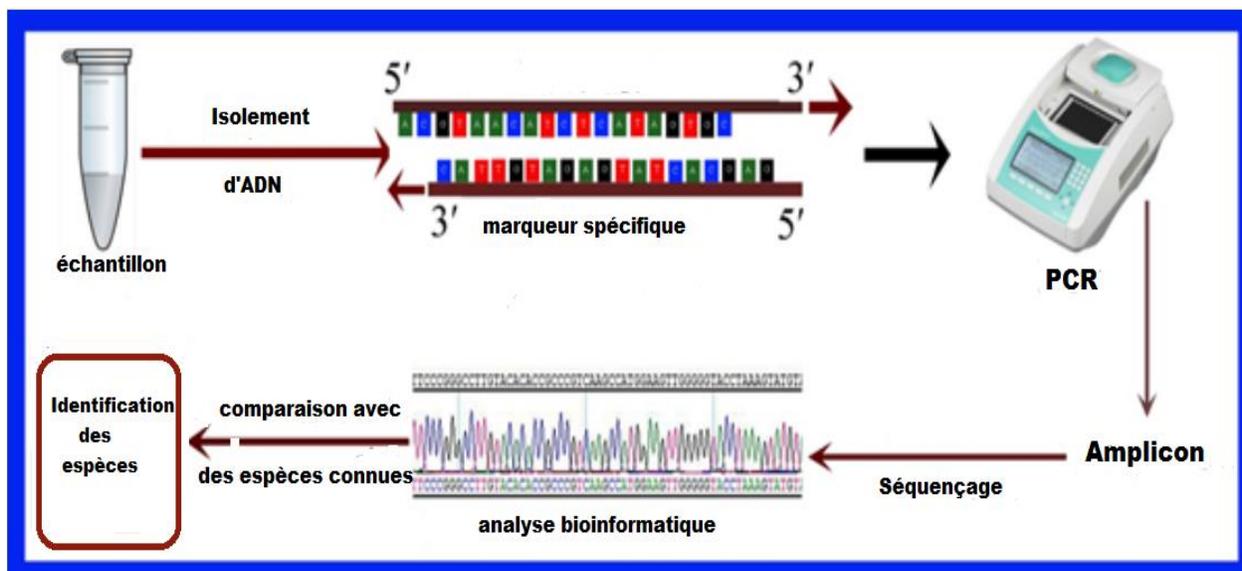


Figure 4. Les étapes de la technique DNA barcoding (Chaudhary et Dahal, 2017)

3.5. Activités hydrolases sur milieux gélosés

Pour déterminer la production des hydrolases un substrat spécifique de chaque enzyme a été ajouté au milieu de culture comme source de carbone. Les souches ont été inoculées et incubées pendant 2 à 5 jours, l'apparition d'un halo ou des précipitations autour du thalle indiquent fabrication d'enzymes (Chamekh *et al.*, 2019).

Pour chaque enzyme, l'activité a été évaluée par un indice enzymatique (EI) où $EI = R/r$ (R étant le diamètre du halo et r le diamètre du thalle). Les souches avec un IE égal ou supérieur à 2 sont considérées comme de bons producteurs de l'enzyme étudiée (Jaouani *et al.*, 2014).

3.5.1. Activité lipolytique

L'activité lipolytique a été évaluée en utilisant un milieu de culture contenant (1 %) peptone, (0,5 %) chlorure de sodium, (0,01 %) chlorure de calcium et (2 %) gélose. Après 1 % Tween-80 à été ajouté. L'activité lipolytique a été indiquée par l'apparence de halos opaques autour des colonies (Onofre *et al.*, 2017).

Le milieu deuxième a été préparé en ajoutant 0,5% tributyrine (Sigma), puis il à été homogénéiser pendant 5 min. La solution était autoclavé et distribué dans des boîtes de Pétri stériles (Gopinath *et al.*, 2005).

La production de lipase peut être aussi déterminée par l'utilisation des colorants comme Victoria blue B, night blue. Le virage de couleur dû à l'abaissement du pH du milieu indique la présence de lipase (Hasan *et al.*, 2009)

3.5.2. Activité protéolytique

L'activité protéolytique est réalisée sur deux milieux qui contiennent différentes protéines (gélatine, caséine)

3.5.2.1. Milieu gélatiné

Les isolats fongiques ont été ensemencés dans des boîtes de pétri avec un milieu gélosé nutritif additionné de 1% de gélatine (Peptone, 5g ; Extrait de boeuf, 3g ; NaCl, 5g ; Agar, 15g ; Eau distillée, 1 litre, pH 6). Après les boîtes de Pétri ont été incubées à 28 °C pendant 3 jours (Chandrasekaran *et al.*, 2015).

3.5.2.2. Milieu caséine

Ensemencé les isolats par une touche centrale dans le milieu de culture lait gélosé à 20% (Annex) puis incubées à 28°C pendant 3 jours. Réaction positive s'accompagne avec l'apparition d'une zone claire dans le milieu autour de la colonie (Maitig *et al.*, 2018).

3.5.3. Activité cellulolytique

L'activité cellulolytique a été effectuée dans un milieu Czapek-Dox (Annex) contenant 1 % de carboxyméthylcellulose (CMC) et incubée à 50 °C pendant 7 jours. Après incubation ajouter aux boîtes de culture rouge Congo qui se fixe sélectivement sur les polymères de cellulose et laissées pendant 30 min puis décolorées deux fois avec du NaCl 1 M, l'activité se traduit par l'apparition de zones claires autour des colonies (Saroj et Narasimhulu, 2018).

3.5.4. Activité amylolytique

L'étude de cette activité a été réalisée sur 2 milieux MSM (Minimal synthetic medium) plus 0,2 % d'amidon soluble, et dans le milieu PDA contenant de l'amidon soluble à 1% est), les boîtes sont incubées à 30°C et 45°C pendant 5 à 7 jours (Farouk *et al.*, 2020).

Après incubation les boîtes sont recouvertes d'une solution d'iode de lugol pendant 30 secondes. Lorsque l'iode entre en contact avec un milieu contenant de l'amidon, il se transforme bleu. Rincer avec l'eau distillée, la formation d'une zone claire entourant la colonie la production d'amylase (Farouk *et al.*, 2020).

Chapitre 4.

Résultats et discussion

4.1. Isolement

Après l'isolement des échantillons sur le milieu PDA et incubation a été obtenu 136 isolats des deux zones, quatre vingt trois isolats appartenant à la zone 1 qui est caractérisé par une végétation halophile, et cinquante trois isolats à partir la zone 2 (caractérisé par une absence totale de végétation) (Chamekh *et al.*, 2019). Les résultats des isolements sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Moisissures isolées à partir d'échantillons de sol

Site d'échantillonnage	Nombre des isolats
Zone1	83
Zone 2	53

4.2. Analyses physicochimiques d'échantillons de sol

Tableau 6. Analyse physicochimique d'échantillon de sol (Chamekh *et al.*, 2019).

Site d'échantillonnage	Souche	code	Date de prélèvement	pH	Conductivité électrique ms/cm	Salinité g/L
Zone1	Plantes halophiles	B, C, D, R	Decembre 2012	8.0	57.5	37
	Les cultures de céréales	G, S	Janvier 2015	7.2	6	3.8
Zone2	Absence totale de végétation	A, E	Decembre 2012	7.7	43	28
		H	Juillet 2015	8.2	71.5	46

Les résultats des paramètres physicochimiques de sol montrent que les deux zones la zone 1 (caractérisé par une végétation halophile) et la zone 2 (caractérisé par une absence totale de végétation) ont un taux de salinité élevé, sauf les sites qui sont caractérisé par la présence de céréales cultures le sol été neutre et moins salin. En plus le taux de conductivité électrique de sol des 2 zones est supérieure à 4 ce qui indique qu'il est un sol extrêmement salin (Chamekh *et al.*, 2019).

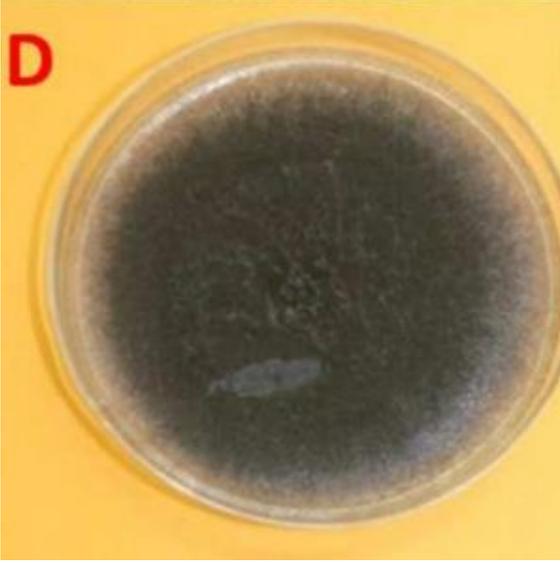
4.3. Identification des souches isolées

4.3.1. Identification morphologique

Après incubation les champignons ont été déterminés visuellement à l'aide des différents critères macroscopiques et microscopiques qui sont la bases de l'identification morphologique.

Les résultats de l'observation macro et microscopique sont présentés dans les tableaux suivants.

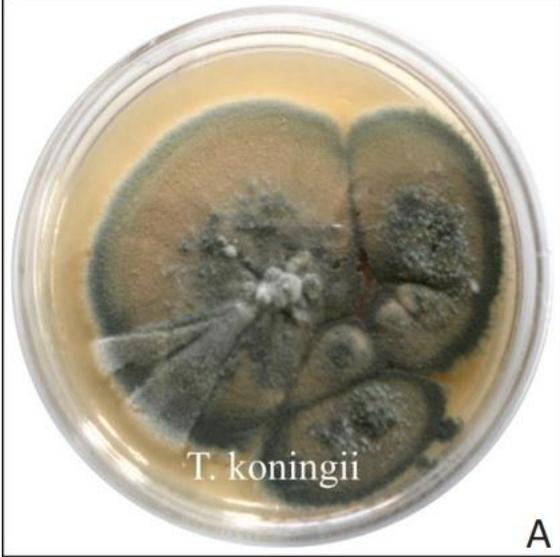
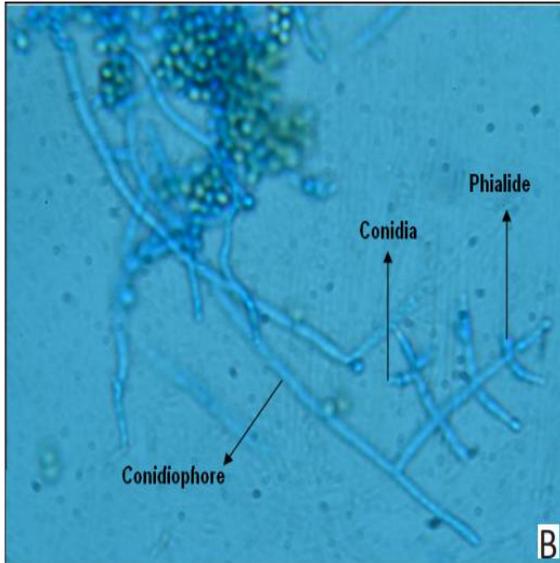
Tableau 7. Identification morphologique de la souche 1

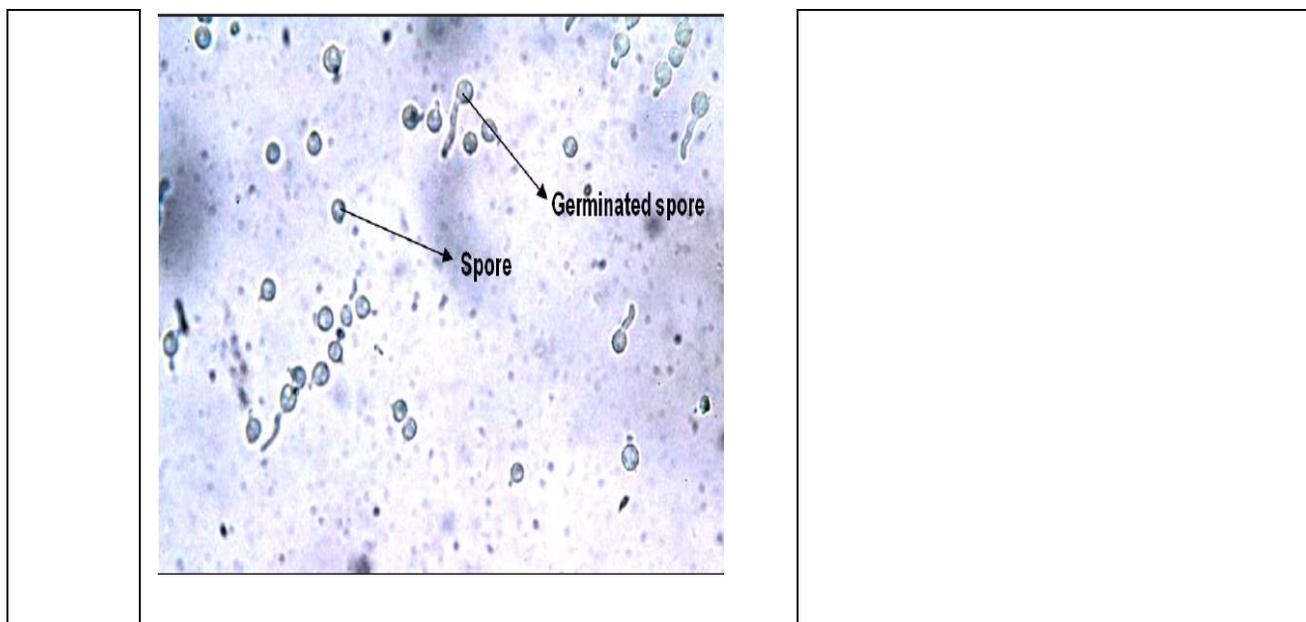
Souche	Aspect macroscopique	
1		<ul style="list-style-type: none"> -Couleur de mycélium blanc-grisâtre et à la fin du développement devient vert -Texture de la colonie: laineux -Diamètre de colonies plus de 70 mm. -Marge blanche (2-5mm). -Vitesse de croissance rapide. <p>(Basim <i>et al.</i>, 2018) (Kgatle <i>et al.</i>, 2017)</p>

Aspect microscopique	
	<ul style="list-style-type: none">-Hyphe : sépté- Forme de conidie : ovale-Conidies brunes avec conidiophores en chaînes. <p>(Lagogianni <i>et al.</i>, 2017)</p>

-D'après la comparaison des résultats obtenues à ceux citer par Pitt et Hocking, (2009) la souche 1 appartient au genre *Alternaria* (*Alternaria alternata*).

Tableau 8. Identification morphologique de la souche 2

Souche	Aspect macroscopique	
2		<ul style="list-style-type: none"> -Couleur des colonies : vert bleuâtre -Verso : incolore à jaune pâle -Couleur de mycélium : blanche -Forme de mycélium : arachnoïde <p>(Kumar <i>et al.</i>, 2020), (Sekhar <i>et al.</i>, 2017)</p>
Aspect microscopique		
		<ul style="list-style-type: none"> -Couleur de conidie : Vert grisâtre -Forme de conidie : ovoïde -Forme de phialide : lagéniforme, divergent, allongé <p>(Kumar <i>et al.</i>, 2020), (Sekhar <i>et al.</i>, 2017)</p>



-D'après la comparaison des résultats obtenues à ceux citer par Watanabe, (2010) la souche 2 appartient au genre *Trichoderma* (*Trichoderma koningii*).

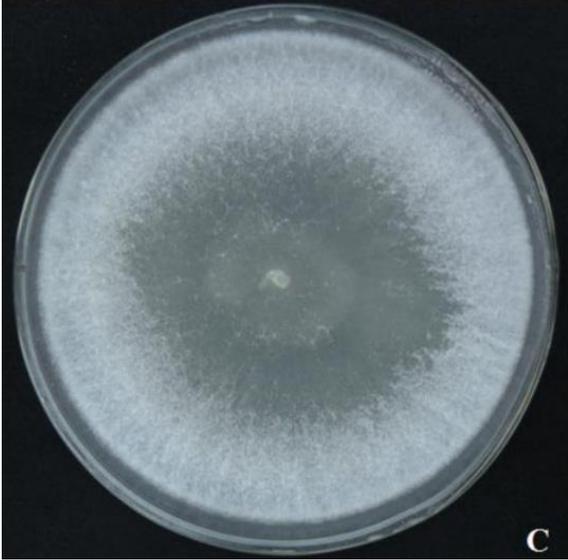
Tableau 9. Identification morphologique de la souche 3

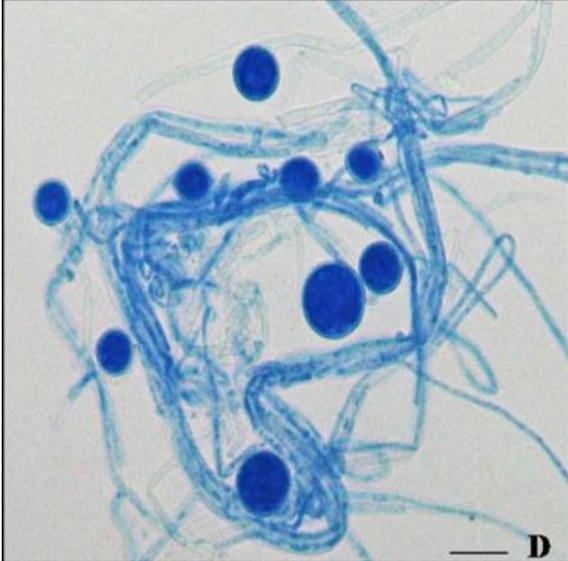
Souche	Aspect macroscopique	
3	<p>A photograph of a petri dish containing a green agar medium. Several colonies of a fungus are visible, appearing as small, irregular, light brown to tan clusters of spores. The colonies are scattered across the surface of the agar.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Couleur de colonie : brun pâle ou presque blanc. -Diamètre de colonie : 4–6 mm - Marge : brun pâle, irrégulier -Verso : marron <p>(Jančič <i>et al.</i>, 2015)</p>

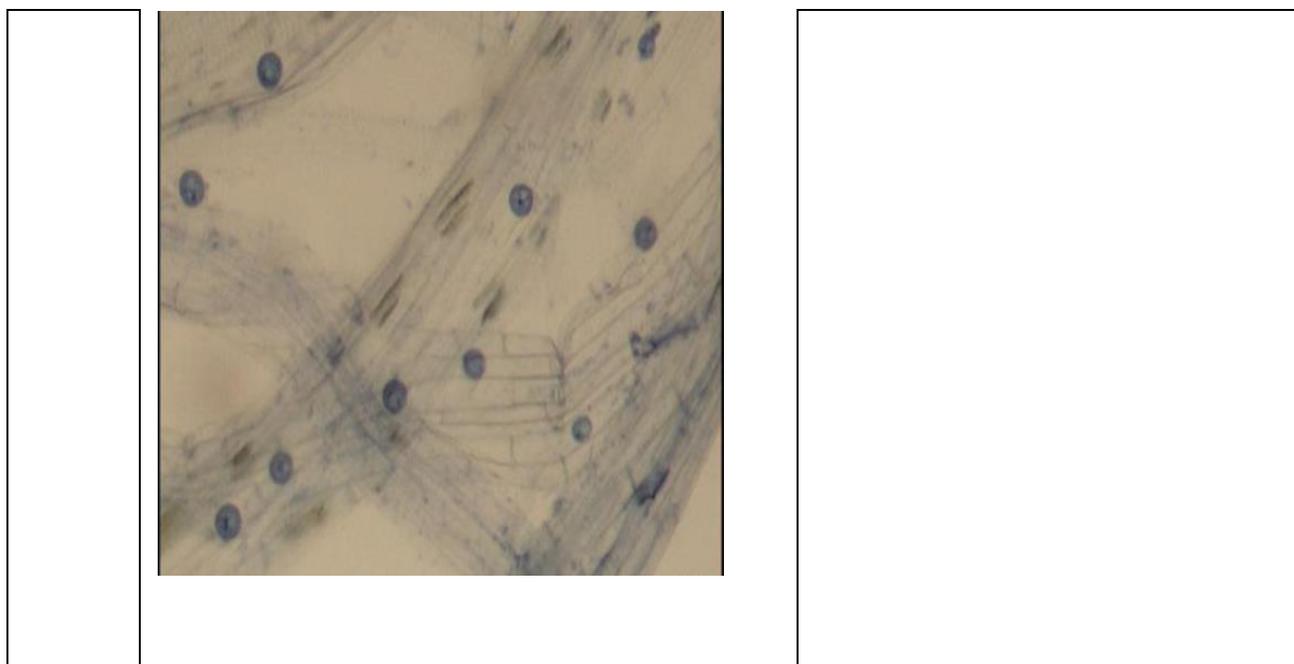
Aspect microscopique	
	<ul style="list-style-type: none">-Forme des conidies : cylindrique, verruqueuses, à parois épaisses-Couleur brun pâle-Taille de conidie : 1,5 à 2,5 μm- hyphes hyaline, lisse <p>(Jančič <i>et al.</i>, 2015)</p>

-D'après la comparaison des résultats obtenues à ceux citer par Botton, (1990) la souche 3 appartient au genre *Wallemia* (*Wallemia sebi*).

Tableau 10. Identification morphologique de la souche 4

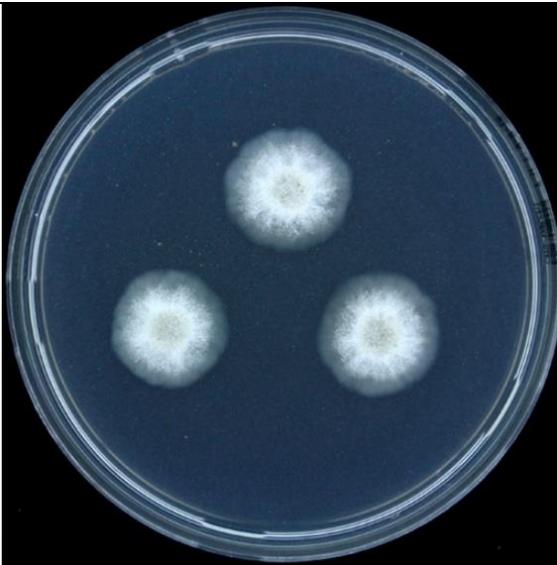
Souche	Aspect macroscopique	
4		<ul style="list-style-type: none"> -Couleur de colonie : blanc -Verso : incolore-plus tard devient pâle au brun -Diamètre : 5–6 cm -Croissance rapide <p>(Rinu <i>et al.</i>, 2014)</p>

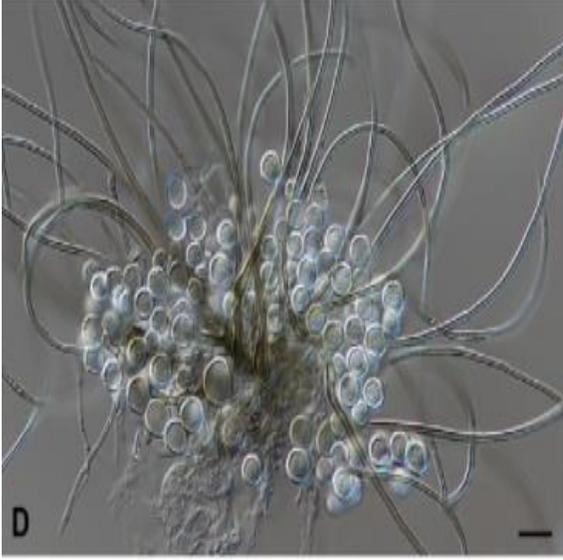
Aspect microscopique	
	



-D’après la comparaison des résultats obtenues à ceux citer par Botton, (1990) la souche 4 appartient au genre *Trichoderma* (*Trichoderma gamsii*)

Tableau 11. Identification morphologique de la souche 5

Souche	Aspect macroscopique	
5		<ul style="list-style-type: none"> -Colonies : cotonneuses et blanches -bord légèrement ondulé -Diamètre : 18–24 mm -Verso : incolore <p>(Wang <i>et al.</i>, 2016)</p>

Aspect microscopique	
	<ul style="list-style-type: none"> -Hyphe : hyaline, brunes, ramifiées - Phialides : hyaline - Conidies: globuleuses à subglobuleuses -Hyalines -Ombrées - Cylindrique -Lisses à légèrement rugueuses <p>(Wang <i>et al.</i>, 2016)</p>

-D'après la comparaison des résultats obtenues à ceux cités par Botton *et al.* (1990) la souche 5 appartient au genre *Chaetomium* (*Chaetomium piluliferum*).

4.3.2. Identification moléculaire

Nous avons utilisé 27 séquences d'ITS de l'ADNr téléchargé à partir de la base de données NCBI pour construire l'arbre phylogénétique. Les trois séquences de l'*Aspergillus niger* est utilisées comme out-groupes.

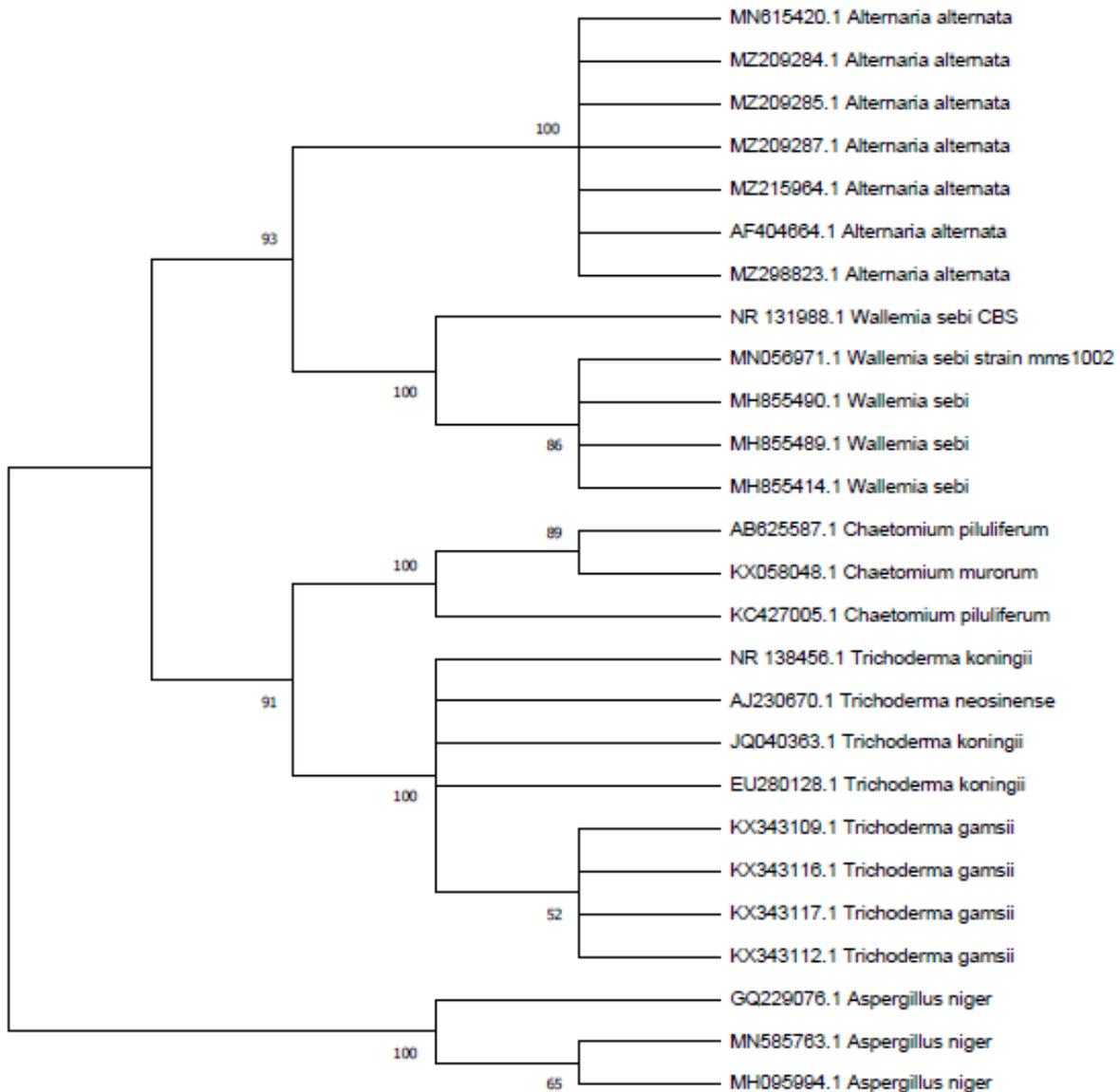


Figure 5. Arbre phylogénétique des souches fongiques montrant les plus proches voisins. Les isolats ont été identifiés sur la base de la région « internal transcribed spacer » de l'ADN génomique. L'histoire de l'évolution a été déduite en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*).

Les isolats ont été identifiés par amplification et analyse des séquences d'ADN de la région ITS. L'identité des champignons basés sur les caractéristiques morphologiques était en bon accord avec celle de la caractérisation moléculaire (figure 5).

4.4. Activités hydrolases sur milieux gélosés

L'activité enzymatique de chaque souche testée a été détectée sur un milieu solide contenant le substrat spécifique de chaque enzyme (lipase, protéase, cellulase, amylase), la présence d'une zone claire (halo) autour la souche indique la production de l'enzyme et le diamètre de cette zone indique la quantité des enzymes extracellulaires produites.

L'activité enzymatique a été évaluée par un indice enzymatique (EI) où $EI=R/r$ (R étant le diamètre du halo et r le diamètre du thalle), les résultats sont présentés dans le tableau 12 ci-dessous

Tableau 12. Activité enzymatique des isolats fongique (Chamekh *et al.*, 2019).

Souches	Indice enzymatique (IE)			
	Lipase	Protéase	Cellulase	Amylase
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	1	2
<i>Trichoderma koningii</i>	0.5	-	-	-
<i>Wallemia sebi</i>	5	-	-	-
<i>Trichoderma gamsii</i>	-	-	0.75	-
<i>Chaetomium piluliferum</i>	-	2	4	-

IE (= ou >) à 2 activité enzymatique élevée / (-) aucune activité

4.4.1 Activité lipolytique

Les résultats obtenus montrent que seulement les souches *Wallemia sebi* et *Trichoderma koningii* ont une activité lipolytique Chamekh *et al.* (2019), ce résultat à également été confirmé par Jančić *et al.* 2016 qui ont montrés que l'activité lipolytique la plus élevée a été observée chez *Wallemia sebi* à cause de sa grande capacité à dégrader substrat tween-20 et l'utiliser comme une source de carbone, par rapport au *Trichoderma koningii* qui présente une activité très faible (Jaouani *et al.*, 2014).

Selon Chamekh *et al.* (2019) les résultats est négatifs pour les trois souches (*Alternaria alternata*, *Trichoderma gamsii*, *Chaetomium piluliferum*) concernant la production de lipase, ces résultats sont en accord avec ceux présentés par (Jaouani *et al.*, 2014).

4.4.2. Activité protéolytique

Parmi les cinq souches étudiées *Chaetomium piluliferum* est la seule qui présente une activité protéolytique (EI 2) (Chamekh *et al.*, 2019). Les résultats obtenus par Maitig *et al.* (2018) indique que *Chaetomium piluliferum* forme un halo transparent autour des colonies ce qui confirme la présence de l'activité protéolytique.

Alors que aucune activité observé par les autres souches (*Alternaria alternata*, *Trichoderma gamsii*, *Wallemia sebi*, *Trichoderma koningii*), ces résultats ressemblent à celui présenté par Jaouani *et al.* (2014) qui ont montrés la faible activité protéolytique des souches. Par ailleurs, les résultats obtenus par Rajput *et al.* (2016) trouvent que *Alternaria alternata* présente une activité protéolytique élevé.

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

4.4.3 Activité cellulolytique

L'activité la plus élevée à été détecté par la souche *Chaetomium piluliferum* avec EI= 4 ce qui indique la dégradation des substrats cellulose et carboxyméthylcellulose Chamekh *et al.* (2019), ces résultats se rassemble accord avec ceux présentés par (AL-Kharous *et al.*, 2015).

Selon Jaouani *et al.* (2014) les 2 souches *Alternaria alternata*, *Trichoderma gamsii* ne présentent aucune activité cellulolytique, tandis que Chamekh *et al.* (2019) montre que *Alternaria alternata* et *Trichoderma gamsii* ont une activité cellulolytique mais faible (1- 0.75).

Pour les souches *Wallemia sebi* et *Trichoderma koningii* aucune activité cellulolytique est présenter au moins pas extracellulaire (Jančić *et al.*, 2016).

4.4.4. Activité amylolytique

Parmi les cinq souches testés seulement *Alternaria alternata* qui à montrer une activité amylolytique avec un taux EI égal à 2 (Chamekh *et al.*, 2019). Rajput *et al.* (2016) aussi indique la présence de l'activité enzymatique avec un taux supérieur a ceux citer par (Chamekh *et al.*, 2019).

Conclusion

Conclusion

Le travail effectué consiste à isolement, identification (morphologique et moléculaire) et de mettre en évidence l'activité hydrolase de souches de moisissures isolées à partir un milieu extrême « Sebkha ». Les échantillons ont été prélevés à partir de deux régions différentes, la première région est caractérisée par végétation halophile et cultures céréalières et la deuxième par une absence totale de végétation.

D'après les résultats de l'isolement, 136 isolats ont été obtenus. Les résultats de l'identification morphologique et moléculaire des souches étudiées montrent la présence de 5 espèces appartenant à 4 genres : *Trichoderma gamsii*, *Alternaria alternata*, *Wallemia sebi*, *Chaetomium piluliferum*, *Trichoderma koningii*

Pour la mise en évidence de l'activité hydrolase des moisissures, chaque souche isolée et testée montre clairement la capacité de produire au moins une enzyme (lipase, protéase, amylase, cellulase). Presque toutes les souches testées présentent une seule activité enzymatique sauf *Chaetomium piluliferum* qui à montrer une activité protéolytique et cellulolytique.

Liste bibliographique

Bibliographie

A Linares-Pasten, J. A. 2014. Thermostable glycoside hydrolases in biorefinery technologies. *Current Biotechnology* , 3, 26-44.

Al-Kharousi M. M., Sivakumar N., Elshafie A. 2015. Characterization of cellulase enzyme produced by *Chaetomium sp.* isolated from books and archives. *EurAsian Journal of BioSciences* , 9.

Al-Musallam A.A., Al-Sammar H. F., Al-Sané N. A. 2011. Diversity and dominance of fungi inhabiting the sabkha area in Kuwait.

Abdel-Azeem, A. M. (Ed.) . 2019. Recent developments on genus *Chaetomium*. Springer Nature.

Basım H., Basım E., Baki D., Abdulai M., Öztürk N., Balkic R. 2018. Identification and characterization of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing Ceratonia Blight disease of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 151(1), 73-86.

Blaize M. N., Normand A. C., Fekkar A., Piarroux, R. 2021. Identification des moisissures au laboratoire de routine hospitalière. *Revue Francophone des Laboratoires* , 58-65.

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Vayssier Y., Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. 2ème édition. Masson. Paris. 512p.

Chamekh R., Deniel F., Donot C., Jany J. L., Nodet P., Belabid, L. 2019. Isolation, identification and enzymatic activity of halotolerant and halophilic fungi from the Great Sebkhha of Oran in Northwestern of Algeria. *Mycobiology* , 230-241.

Chandra, P., Singh R., Arora, P. K. 2020. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories* , 1-42.

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* , 66-69.

Chaudhary D. K., Dahal R. H. 2017. DNA bar-code for identification of microbial communities: a mini-review. *EC Microbiol* , 219-224.

Dendouga, W. 2006. Isolement et identification de moisissures productrices de. Constantine.

dos Santos Aguilar J. G., Sato H. H. 2018. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International* , 253-262.

Dufresne P., Guy S. G. 2014. Identification des champignons d'importance médicale. Institut National de Santé Publique.

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.

Fickers P., Destain, J., Thonart P. 2008. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* , 12, 119-130.

Geoffry K., Achur R. N. 2018. Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* , 241-253.

Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P. 2017. Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *Journal of applied microbiology* , 1368-1379.

Gopinath S. C., Hilda A., Anbu P. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience* , 119-126.

Grégoire P., Fardeau M. L., Guasco S., Bouanane A., Michotey V., Bonin P., Ollivier B. 2009. Les micro-organismes de l'extrême. La Presse thermale et climatique .

Guarro J., Gené J., Stchigel A. M. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews* , 454-500.

Ja'afaru M. I., Chimbekujwo K. I., Ajunwa, O. M. 2020. Purification, characterization and de-staining potentials of a thermotolerant protease produced by *Fusarium oxysporum*. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* , 539-547.

Jančić S., Zalar P., Kocev D., Schroers H. J., Džeroski S., Gunde-Cimerman, N. 2016. Halophily reloaded: new insights into the extremophilic life-style of *Wallemia* with the description of *Wallemia hederæ* sp.nov. *Fungal Diversity* , 97-118.

Jaouani A., Neifar M., Prigione V., Ayari A., Sbissi I., Ben Amor S., Gtari M. 2014. Diversity and enzymatic profiling of halotolerant micromycetes from Sebkha El Melah, a Saharan salt flat in southern Tunisia. *BioMed research international* .

Kgatle M. G., Truter M., Ramusi T. M., Flett B., Aveling T. A. S. 2018. *Alternaria alternata*, the causal agent of leaf blight of sunflower in South Africa . *European Journal of Plant Pathology* , 677-688.

Kumar G., Singh A., Pandey S., Singh J., Chauhan S. S., Srivastava M. 2020. Morphomolecular identification of *Trichoderma* sp. and their mycoparasitic activity against soil borne pathogens. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* , 613-627.

Lacoste C., Fabre A., Pécheux C., Lévy N., Krahn M., Malzac P., Bourgeois P. 2017. Le séquençage d'ADN à haut débit en pratique clinique. *Archives de Pédiatrie* , 373-383.

Lagogianni C. S., Tjamos E. C., Antoniou P. P., Tsitsigiannis, D. I. 2017. First report of *Alternaria alternata* as the causal agent of *Alternaria* bud and blossom blight of Olives. *Plant Disease* .

Maitig A. K., Sharma V., Saxena J., Yadav B., Alam, A., Prakash A. 2018. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology* , 2059-2068.

Melani N. B., Tambourgi E. B., Silveira E. 2020. Lipases: from production to applications. *Separation & Purification Reviews* , 143-158.

Miao P., Tang Y., Wang B., Yin J., Ning L. 2015. Signal amplification by enzymatic tools for nucleic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* , 1-15.

Mohammadian E., Ahari A. B., Arzanlou M., Oustan S., Khazaei S. H. 2017. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanzan Province, Iran. *Chemospher* , 290-296.

Moubasher A. A. H., Abdel-Sater M. A., Soliman Z. S. 2018. Diversity of yeasts and filamentous fungi in mud from hypersaline and freshwater bodies in Egypt . *Czech Mycology* .

Onofre S. B., Abatti D., Refosco D., Tessaro A. A., Onofre J. A. B., Tessaro A. B. 2017. Selection of filamentous fungi producing lipases from residual waters of slaughterhouses. *African Journal of Biotechnology* , 247-253.

Orji F. A., Dike E. N., Lawal A. K., Sadiq A. O., Fashola F., Suberu Y. L., Elemo, G. N. 2016. Properties of *Aspergillus flavus* Cellulase Produced from Solid State Fermentation of Brewers' Spent Grain (BSG) as Substrate. *Biotechnology Journal International* , 1-9.

Salimi Oussama. 2011. Impact sanitaire des moisissures de l'environnement domestique dans la wilaya de Rabat-Salé-Zemmour-Zaër. la wilaya de Rabat-Sale –Zemmour - Zaër.

Quero L. 2018. Développement de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides.

Rajput K., Chanyal S., Agrawal P. K. 2016. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree-Cupressus torulosa D Don. *World J Pharm Pharmaceut Sci* , 1034-1054.

Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. 2019. Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* .

Rinu K., Sati P., Pandey A. 2014. a newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain . *Journal of basic microbiology* , 408-417.

Shrivastava S. 2020. Introduction to Glycoside Hydrolases: Classification, Identification and Occurrence. Singapore: Springer.

Samuel M., Lu M., Pachuk C. J., Satishchandran C. 2003. A spectrophotometric method to quantify linear DNA. *Analytical biochemistry* , 301-306.

Sarmah N., Revathi D., Sheelu G., Yamuna Rani K., Sridhar S., Mehtab V., Sumana C. 2018. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology progress*. 5-28.

Saroj P., Manasa P., Narasimhulu K. 2018. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresources and Bioprocessing* , 1-14.

Sekhar Y. C., Ahammed S. K., Prasad T. N. V. K. V., Devi R. S. J. 2017. Identification of *Trichoderma* species based on morphological characters isolated from rhizosphere of groundnut (*Arachis hypogaea* L). *Int J Sci Environ Technol* , 2056-2063.

Singh R., Mittal A., Kumar M., Mehta P. K. 2016. Microbial proteases in commercial applications. *J Pharm Chem Biol Sci* .

Spatafora J. W., Chang Y., Benny G. L., Lazarus K., Smith M. E., Berbee M. L., Stajich J. E. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* , 1028-1046.

Sun Q., Chen F., Geng F., Luo Y., Gong S., Jiang Z. 2018. A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food Chemistry* , 570-577.

Tiwari S. P., Srivastava R., Singh C. S., Shukla K., Singh R. K., Singh P., Sharma R. 2015. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *J Global Biosci* , 1886-1901.

Vaishnav N., Singh A., Adsul M., Dixit P., Sandhu S. K., Mathur A., Singhania R. R. 2018. *Penicillium*: the next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports* , 131-140.

Wang X. W., Houbraken J., Groenewald J. Z., Meijer M., Andersen B., Nielsen K. F., Samson R. A. 2016. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and *chaetomium-like* fungi from indoor environments. *Studies in Mycology* , 145-224.

Watanabe, T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC press.

X. Liu, A. A.-A.-H. 2011. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry , 947-955.

ANNEXE

Annexes

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

Agar-agar 20 g

Pomme de terre 200 g

Dextrose 20 g

Eau distillée 1000 ml

Milieu 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.

Lait gélosés

Lait écrèmes 100g

Agar 20g

Eau distillé 1000 ml

Milieu de gélatine 5%

Gélatine 50g

Agar 20g

Eau distillé 1000 ml

ملخص

يهتم هذا العمل بتحديد أنشطة التحلل الانزيمي من الفطريات المعزولة من البيئة القاسية (سبخة) و لهذا قمنا بعزل السلالات ولهذا اخترنا 5 من اجل تحديدها موزعة على 4 اجناس *Trichoderma (Gamsii , Koningii)*, *Alternaria*, *Wallemia*, *Chaetomium*. بعد ذلك اختبرنا قدرتها على انتاج انزيمات خارج الخلية (الليباز , السليلولاز, الاميلاز, البروتياز), تفرز جميع السلالات انزيما واحدا على الاقل . تظهر سلالة *Chaetomium piluliferum* اعلى نشاط للسليلولاز و اعلى نشاط لتحلل الدهون سجل من طرف *Wallemia sebi* و *Alternaria alternata* هي الوحيدة التي اظهرت نشاط الاميلاز.

الكلمات المفتاحية: الفطريات, البيئة القاسية, نشاط تحليلي, التربة .

Résumé

Ce travail s'intéresse à la mise en évidence des activités hydrolases chez les moisissures isolées de milieu extrême (Sebkha). 5 souches ont été identifiées, ces souches sont réparties sur 4 genres : *Trichoderma (gamsii, koningii)* *Alternaria*, *Wallemia*, *Chaetomium*. Ensuite, sa capacité à produire des enzymes extracellulaires a été testée (lipase, cellulase, amylase, protéase). Toutes les souches sécrètent au moins une enzyme. La souche *Chaetomium piluliferum* présente l'activité la plus élevée de cellulase, et l'activité lipolytique la plus élevée a été détecté par *Wallemia sebi*. *Alternaria alternata* est la seule souche qui a montré une activité amylolytique.

Mot clé : moisissures, milieu extrême, activité hydrolase, identification, sol.

Abstract

This work is interested in the demonstration of hydrolase activities in molds isolated from extreme environments (Sebkha), so we isolated the strains and select 5 for the identified, these strains are distributed over 4 genera: *Trichoderma (gamsii, koningii)* *Alternaria*, *Wallemia*, *Chaetomium*. Then, we tested the ability of this strain to produce extracellular enzymes (lipase, cellulase, amylase, and protease), all strains secrete at least one enzyme. *Chaetomium piluliferum* strain exhibits the highest cellulase activity, and the highest lipolytic activity was detected by *Wallemia sebi*. *Alternaria alternata* is the only strain which showed amylolytic activity.

Keyword: molds, extreme environment, hydrolase activity, identification, soil.