

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : Sciences biologiques
Option : Biochimie Appliquée

Thème

Activités amylolytiques et protéolytiques de
certains champignons endophytes foliaires
issus de l'ortie (*Urtica dioica* L.)

Présenté par :

Soutenu le : 10 Septembre 2017

HADDADI Massissilya

HAMRANI Thinhinane

Devant le jury composé de :

M^r TITOUCHE	Maître assistant (A)	UMMTO	Président
M^{me} SALMI	Maître assistant (B)	UMMTO	Rapporteur
M^{me} TALEB	Maître de conférences (B)	UMMTO	Examineur
M^{lle} ASMANI	Maître de conférences (B)	UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2016 - 2017

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier DIEU le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la volonté afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice **M^{me} SALMI Djouza**, Maître assistant (B) en Biochimie Appliquée, à l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou (UMMTO), de nous avoir proposé de travailler avec elle sur le thème de ce mémoire et de n'avoir jamais lésiné à nous prodiguer conseils et assistance pour la bonne conception de celui-ci.*

*Nos remerciements vont à **M^r TITOUCHE Y.**, Maître assistant (A) à l'UMMTO, pour avoir accepté de présider le jury et pour son soutien durant la réalisation de la partie expérimentale au laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB)*

*Nous sommes reconnaissantes à **M^{me} TALEB K.**, Maître de conférences (B) à l'UMMTO et **M^{lle} ASMANI K.**, Maître de conférences (B) à l'UMMTO, d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir consacré une partie de leur temps à examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont à **M^r CHARGUI A.** et **M^{lle} DERMECHE S.**, à toute l'équipe du laboratoire LABAB et à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- * A mes très chers parents qui m'ont toujours entouré d'amour et de tendresse et qui n'arrêtent pas de me soutenir, de m'encourager et de me procurer tout ce dont j'ai besoin, pour leur témoigner de mon immense amour et la reconnaissance pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris et qui n'arrêtent d'entreprendre à mon égard ;*
- * A Mon formidable grand frère Mohammed et mes chères petites sœurs Kahina et Céline à qui je souhaite tout le bonheur du monde et la réussite dans la vie ;*
- * A mes adorables oncles, tantes, cousins et cousines ainsi qu'à toute la famille HADDADI et la famille NAIT BELAID ;*
- * A mes très chers grands parents à qui je souhaite une longue vie en bonne santé ;*
- * A la mémoire de mon défunt grand-père Mohammed, que DIEU l'accueille dans son vaste paradis, qui restera toujours présent dans mon esprit et sera à tout jamais la pièce manquante du puzzle de ma vie ;*
- * A la personne qui a toujours su m'épauler et me pousser à aller de l'avant, à mon cher Saada ;*
- * A ma très chère Tina et toute sa famille ;*
- * A mes très chers amis ;*
- * A toutes les personnes que j'aime et que je respecte.*

HADDADI Massissilya

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- * A mes précieux parents « Kamel et Tassadit » pour leur exprimer tout le respect et l'amour que j'ai pour eux et pour leurs témoigner ma reconnaissance pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris à mon égard ;*
- * A Mon très cher adorable petit frère Amine ;*
- * A mes très chères sœurs aux quels je souhaite la réussite dans leurs vies et leurs conjoints : Saloua, Lylia et Thanina ;*
- * A Mes cousins, ainsi que toute la famille HAMRANI*
- * A ma très chère Massissilya et toute sa famille ;*
- * A mes très cher(e)s ami(e)s ;*
- * A toute la promotion Biochimie Appliquée ;*
- * A mes collègues de travail qui m'ont beaucoup soutenu surtout Ryma ;*
- * A tous les enseignants qui m'ont encadré durant toute la période passée de mon cursus universitaire.*

HAMRANI Thinhinane

Résumé

De nombreuses études récentes portent sur les champignons endophytes qui constituent un important réservoir d'enzymes extracellulaires. Ils représentent aussi un modèle symbiotique très intéressant des plantes, notamment l'ortie (*Urtica dioica* L.) qui est une plante médicinale très répandue et connue pour ses diverses vertus thérapeutiques. A la lumière de ces connaissances, nous avons jugé utile de débiter un travail portant sur l'activité enzymatique, amylolytique et protéolytique, de certains champignons endophytes issus de l'ortie étant donné l'importance majeure des amylases et protéases fongiques en industries (alimentaire, pharmaceutique, détergents,...).

L'étude a été conduite en utilisant dix souches fongiques isolées à partir des feuilles de l'ortie. Après un test de mise en évidence de l'activité amylolytique et protéolytique sur milieux solides à base de substrats spécifiques (amidon et gélatine respectivement), six souches ont été retenues : *Alternaria* sp1., *Alternaria* sp2., *Trichoderma* sp., *Epicocum* sp., *Ulocladium* sp. et une souche non déterminée. Ces dernières qui sont toutes productrices d'amylases et de protéases à l'exception de la souche *Alternaria* sp.1, productrice de protéases uniquement, ont été sélectionnées pour la production enzymatique par fermentation submergée à 28°C durant six jours. La concentration en protéines des extraits bruts obtenus par filtration a été estimée à la méthode de Lowry *et al.* (1951). Concernant les activités enzymatiques, l'activité protéolytique a été dosée à la méthode d'Anson modifiée avec la caséine bovine comme substrat, alors que l'activité amylolytique a été estimée à la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNSA). Ces dosages ont révélés que l'activité amylolytique est plus importante que l'activité protéolytique.

Par la suite, une caractérisation biochimique des enzymes produites a été effectuée. En effet, les températures et les pH optima de production et de réaction enzymatique ont été déterminés pour chaque souche. Les deux types d'enzymes sont majoritairement produits à 28°C mais à des pH différents en fonction de l'enzyme et de la souche concernée. Des PAGE-SDS ont été réalisées afin d'évaluer les profils protéiniques de nos extraits et estimer le PM de chaque protéine. Les activités enzymatiques ont été vérifiées par zymogrammes et les PM des enzymes ont été estimés en comparaison avec le profil électrophorétique.

Mots clés : champignons endophytes, amylases, protéases, activité enzymatique, amidon, caséine.

Abstract

Numerous recent studies have focused on endophytic fungi, which constitute an important reservoir of extracellular enzymes. Mycoendophytes represent a very interesting symbiotic model of plants like nettle (*Urtica dioica* L.), a widespread medicinal plant which is famous for its therapeutic properties. In the light of this knowledge, it was considered useful to start work on the enzymatic activity (amylolytic and proteolytic ones) of certain endophytic fungi from the nettle, given the major importance of fungal amylases and proteases in industries (food, pharmaceutical, detergents ...).

The study was conducted using ten fungal strains isolated from the leaves of nettle. After a test to demonstrate the amylolytic and proteolytic activities on solid mediums containing specific substrate (starch and gelatine respectively), six strains were retained: *Alternaria* sp1., *Alternaria* sp2., *Trichoderma* sp., *Epicocum* sp., *Ulocladium* sp. and an undetermined strain. All these strains are producing both amylases and proteases with the exception of *Alternaria* sp1., producing only proteases, were selected for enzymatic production by submerged fermentation at 28°C for six days. The protein content of the enzyme extracts obtained by filtration was estimated by the method of Lowry *et al.*, (1951). Concerning the enzymatic activities, the proteolytic activity was assayed with the modified method of Anson with bovine casein as substrate, while the amylolytic activity was estimated using the method of dinitrosalicylic acid (DNSA).

Subsequently, a biochemical characterization of the enzymes produced was carried out. In fact, the optima of temperatures and pH of production and enzymatic reaction were determined for each strain. Contrary to optimum pH which fluctuate from one strain to another for each enzyme, optimum temperature for both amylases and proteases production was found to be 28°C for major strains. Then, SDS-PAGE was carried out in order to evaluate the protein profiles of our extracts and estimates the molecular weight of each protein. The enzymatic activities were verified by zymograms and the molecular weights of the enzymes were estimated in comparison with the electrophoretic profile.

Key words: endophytic fungi, amylases, proteases, enzymatic activity, starch, casein.

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
Arg	Arginine
AS	Activité spécifique
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine Triphosphate
BSA	Albumine Sérique Bovine
DNSA	Acide Dinitrosalicylique
DO	Densité optique
EC	Enzyme Commission
G	Grossissement
Glu	Glutamate
GRAS	Generally Recognized As Safe
HgCl₂	Chlorure de Mercure
IUB	International Union of Biochemistry
kDa	Kilo Dalton
LABAB	Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies
Leu	Leucine
Lys	Lysine
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
Phe	Phénylalanine
PM	Poids Moléculaire
R²	Coefficient de Corrélation
SDS	Dodécyl Sulfate de Sodium

<i>SmF</i>	Fermentation submergée ou <i>submerged fermentation</i>
TCA	Acide Trichloroacétique
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène-diamine
TRIS	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
U	Unité international ($\mu\text{mol /ml/min}$)
V	Volte
Val	Valine

Liste de figures

N° des figures	Pages
Figure 01: Parts des marchés occupées par les enzymes dans les différents secteurs	04
Figure 02: distribution des ventes des enzymes	04
Figure 03: Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique	10
Figure 04 : Principales types d'amylases et leurs sites de coupure sur la molécule d'amidon	15
Figure 05 : Structure monomérique de l' α -amylase	18
Figure 06 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques.....	19
Figure 07 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes .	22
Figure 08 : Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al. (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence ; R ² : coefficient de corrélation.	29
Figure 09: Réaction de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique	30
Figure 10 : Courbe étalon pour le dosage de l'activité amylolytique par la méthode de BERNFELD (1955). Le maltose est utilisé comme sucre réducteur de référence	30
Figure 11: Courbe étalon pour le dosage de l'activité protéolytique par la méthode modifiée d'ANSON. La tyrosine est utilisée comme composé non-protéique soluble de référence.....	32
Figure 12 : Photographie de l'unité d'électrophorèse sur mini-cuve HOEFER SE 280.....	34
Figure 33 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS en utilisant un standard protéique composé de BSA (67 kDa), ovalbumine (45 kDa), chymotrypsinogène (23kDa), β -lactoglobuline (18 kDa) et α -lactalbumine (14 kDa)	35

Figure 44 : Effet du pH du milieu sur la production de l' α -amylase des différentes souches retenues.	41
Figure 15 : Effet du pH du milieu sur la production des protéases des différentes souches retenues	42
Figure 16 : Effet de la température sur la production amylolytique des souches sélectionnées, chacune à son pH optimal d'activité.	43
Figure 17 : Effet de la température sur la production protéolytique des souches sélectionnées, chacune à son pH optimal d'activité	44
Figure 18 : Effet du pH de la réaction sur l'activité amylolytique des différentes souches retenues	44
Figure 19 : Effet du pH de la réaction sur l'activité protéolytique des différentes souches retenues	45
Figure 20 : Effet de la température sur la réaction amylolytique des souches sélectionnées .	46
Figure 21 : Effet de la température sur la réaction protéolytique des souches sélectionnées	46
Figure 22 : Profil électrophorétique en PAGE-SDS en présence de β -mercaptoéthanol des extraits protéiques des différentes souches productrices d'amylases (T=15%, C=12%)	47
Figure 23 : Profil électrophorétique en PAGE-SDS en présence de β -mercaptoéthanol des extraits protéiques des différentes souches productrices de protéases (T=15%, C=12%)....	48
Figure 24 : Activité amylolytique des différentes souches par la technique du zymogramme	49
Figure 25 : Activité protéolytique des protéases des différentes souches par la technique du zymogramme	50

Liste des tableaux

N° des tableaux	pages
Tableau I: Les six classes d'enzymes	05
Tableau II: Spécificité des protéases	06
Tableau III: Exemples de protéases microbiennes	08
Tableau IV: Classification des protéases	09
Tableau V : Quelques protéases fongiques et leurs applications industrielles	13
Tableau VI : Les différentes origines de l' α -amylase microbienne.....	16
Tableau VII: Propriétés physico-chimique de l' α -amylase produite par certains micro-organismes	17
Tableau VIII : Différentes applications des α -amylases	20
Tableau IX : Classification des champignons endophytes selon certains critères	23
Tableau X: Substances à activité antimicrobiennes issues de champignons endophytes	25
Tableau XI : Enzymes extracellulaires produites par des endophytes isolés des arbres des forêts tropicales des montagnes du Ghât en Inde	26
Tableau XII : Résultats du test de mise en évidence de l'activité amylolytique des cultures sur gélose à l'amidon	36
Tableau XIII : Résultats du test de mise en évidence de l'activité protéolytique des cultures sur gélose à la gélatine	37
Tableau XIV : Aspect macroscopique et microscopique des souches à activité amylolytiques et protéolytique	39
Tableau XV : Résultats du dosage de l'activité amylolytique des différents extraits	40
Tableau XVI: Résultats du dosage de l'activité protéolytique	40

Liste des annexes

Annexe 01 : Milieu PDA

Annexe 02 : Milieux synthétiques solide pour la recherche de production d'amylases et de protéases

Annexe 03 : Solutions de mise en évidence des activités enzymatiques

Annexe 04 : Milieux de fermentation pour la production d'enzymes

Annexe 05 : Mode opératoire de la méthode de LOWRY *et al.* (1951)

Annexe 06 : Réactif et solution tampon pour le dosage de l'activité amylolytique

Annexe 07 : Solutions utilisées pour le dosage de l'activité protéolytique

Annexe 08 : Différentes solutions tampons pour les variations du pH

Annexe 09 : Tampons et solutions utilisés en électrophorèse



Sommaire

Sommaire

	Page
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Sommaire	
Introduction générale	01
1. Synthèse bibliographique	03
1.1. Les enzymes	03
1.1.1. Généralités sur les enzymes	03
1.1.1.1. Définition	03
1.1.1.2. Sources des enzymes industrielles	03
1.1.1.3. Marché des enzymes	03
1.1.1.4. Classification des enzymes.....	04
1.1.2. Les enzymes protéolytiques	06
1.1.2.1. Définition	06
1.1.2.2. Sources des enzymes protéolytiques	06
1.1.2.3. Classification des protéases.....	08
1.1.2.4. Applications industrielles des protéases	10
1.1.3. Les enzymes amylolytiques	14
1.1.3.1. Définition	14
1.1.3.2. Classification des amylases	14
1.1.3.3. Données sur l'α amylase	15
1.1.3.3.1. Origines	15
1.1.3.3.2. Caractéristiques de l'α amylase	17
1.1.3.3.3. Structure de l' α amylase	18
1.1.3.3.4. Mode d'action de l' α amylase	18
1.1.3.3.5. Utilisation industrielle de l' α amylase	19
1.2. Les champignons endophytes	21
1.2.1. Définition	21
1.2.2. Diversité des champignons endophytes	21

1.2.3. Mode de reproduction et de transmission	22
1.2.4. Classification des champignons endophytes	22
1.2.4.1. Famille des « Clavicipitaceae »	22
1.2.4.2. Famille des « Non Clavicipitaceae »	22
1.2.5. Interactions endophyte-hôte	23
1.2.6. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs	24
1.2.6.1. Champignons endophytes comme source d'antibiotiques	25
1.2.6.2. Champignons endophytes comme source de substances antifongiques et antilevuriennes.....	25
1.2.6.3. Champignons endophytes comme source de substances antivirales	25
1.2.6.4. Champignons endophytes comme source de substances anticancéreuse	25
1.2.6.5. Champignons endophytes comme source de substances antioxydantes.....	26
1.2.6.6. Champignons endophytes comme source d'enzymes.....	26
2. Matériels et méthode	27
2.1. Matériel	27
2.1.1. Matériel biologique	27
2.1.2. Appareillage	27
2.1.3. Verrerie et autres matériel	27
2.1.4. Produits et réactifs	27
2.2. Méthodes	28
2.2.1. Recherche des activités amylolytique et protéolytique sur milieux solides	28
2.2.1.1. Inoculation des milieux	28
2.2.1.2. Mise en évidence	28
2.2.2. Fermentation submergée	28
2.2.3. Méthodes analytiques	28
2.2.3.1. Dosage des protéines	28
2.2.3.2. Dosage de l'activité amylolytique	29
2.2.3.3. Dosage de l'activité protéolytique	31
2.2.4. Caractérisation biochimique des enzymes	32
2.2.4.1. Détermination du pH optimum de la production enzymatique	32
2.2.4.2. Détermination de la température optimale de production enzymatique	32
2.2.4.3. Détermination du pH optimum des activités enzymatiques.....	32
2.2.4.4. Détermination de la température optimale des activités enzymatiques.....	33
2.2.5. Méthodes électrophorétiques	33
2.2.5.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (PAGE-SDS)	33

2.2.5.2. Zymogramme	35
3. Résultats et discussion	37
3.1. Recherche des activités enzymatiques	37
3.2. Caractérisation biochimique	41
3.2.1. Effet du pH et de la température sur la production enzymatique	41
3.2.1.1. Détermination du pH optimal de production enzymatique	41
3.2.1.2. Effet de la température sur la production enzymatique	43
3.2.2. Effet du pH et de la température sur la réaction enzymatique	45
3.2.2.1. Effet du pH sur la réaction enzymatique	45
3.2.2.2. Effet de la température sur la réaction enzymatique	46
3.3. Interprétation des profils électrophorétiques et du zymogramme	48
3.3.1. Interprétation des profils électrophorétiques	48
3.3.2. Interprétation des zymogrammes	49
Conclusion	51
Références bibliographiques	53
Annexes	

Introduction

Introduction

Les végétaux, en dépit du fait qu'ils soient des organismes autotrophes, ils vivent universellement en symbiose avec d'autres organismes microscopiques (OSES *et al.*, 2008). Parmi ces derniers, les champignons endophytes représentent un modèle symbiotique très intéressant des plantes (LADJAL, 2012). Parmi ces dernières, on cite l'ortie (*Urtica dioïca* L.) qui est une plante médicinale très répandue en Algérie et surtout très appréciée pour ces propriétés thérapeutiques multiples (antioxydantes, anticoagulantes, immunosuppressives,...).

L'interaction complexe avec cette plante, permet aux mycoendophytes de coloniser toutes les parties de leur hôte et d'être impliqués dans une multitude de processus biologiques allant de l'amélioration de l'état nutritif à celui du stress abiotique, en passant par la résistance aux ravageurs et aux maladies. En retour, l'hôte procure aux champignons un habitat et des éléments nutritifs (SAIKKONEN *et al.*, 1998). L'ensemble de ces implications est assuré par la production d'un arsenal enzymatique, ce qui fait des champignons endophyte, des microorganismes d'un grand intérêt économique (STROBEL, 2003).

Ces biocatalyseurs qu'on attribué auparavant à une origine animale et végétale uniquement, sont avérés avoir également une origine microbienne. De nos jours, les enzymes microbiennes sont de loin les plus appréciées pour une production à grande échelle, ainsi que pour de multiples utilisations industrielles (BURHAN *et al.*, 2003).

La production de ces enzymes à partir de culture de champignons peut se faire soit sur substrat solide, comme le cas de déchets agroalimentaires utilisés au cours de ces dernières années pour tenter de les valoriser, soit en culture submergée utilisée pour la production de la plupart des métabolites d'origine microbienne.

Le marché mondial des enzymes est représenté par 80% des hydrolases, particulièrement les protéases et les amylases qui trouvent diverses applications dans de nombreux domaines (KOLLI et ZATOUT, 2015). En effet, l'utilisation de ces dernières s'étend sur des secteurs variés tels que les industries alimentaires (panification, brasserie...), les industries pharmaceutiques et médicales, les industries de détergents et les industries du cuir et du textile. Toutefois, en Algérie, ces hydrolases utilisées industriellement sont importées en totalité (ZOUBIRI, 2012).

A la lumière de ces connaissances, nous avons jugé utile de débiter un travail portant sur la recherche et l'étude des activités amylolytiques et protéolytiques de certains champignons endophytes foliaires isolés à partir de l'ortie. Pour cela, le choix des milieux de fermentation appropriés est essentiel pour assurer une bonne croissance de ces microorganismes et pour induire la production d'amylases et de protéases extracellulaires. De plus, les enzymes produites doivent être en quantités suffisantes pour qu'elles soient caractérisées et que leurs masses moléculaires soient estimées.

Notre travail a donc pour objectif, la sélection de souches fongiques issues de l'ortie, produisant des amylases et/ou protéases extracellulaires ainsi qu'une caractérisation biochimique des enzymes éventuellement produites par ces champignons endophytes.

Le travail expérimental s'articule sur :

- la réalisation d'une culture de champignons sur milieux solides à base de substrat spécifique pour chaque enzyme, suivie d'une mise en évidence des activités enzymatiques ;
- la production d'enzymes par fermentation submergée des souches retenues ;
- la détermination des températures et pH optima de la production ainsi que de la réaction enzymatique ;
- l'évaluation des profils protéiques des extraits enzymatiques bruts de chaque souche par une électrophorèse dans les conditions dénaturantes ;
- l'estimation des poids moléculaires des enzymes par des zymogrammes.

1. Synthèse bibliographique

1.1. Les enzymes

1.1.1. Généralités sur les enzymes

1.1.1.1. Définition:

Selon SINE (2010), le mot « enzyme » vient du grec « énzymo » ; « én » qui signifie à l'intérieur et « zymo » qui veut dire ferment ou levain. Cependant, à l'origine les enzymes ont été nommées ferments puis diastases.

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

Ces catalyseurs biologiques sont les outils-clés de la biotechnologie et de la bio-industrie (ARNAUD *et al.*, 1993). Contrairement, aux produits chimiques qui présentent plusieurs inconvénients, les enzymes accélèrent les réactions et améliorent les relations coûts/efficacité des procédés (SANDHYA *et al.*, 2005 ; SINE, 2010).

1.1.1.2. Sources des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles proviennent de trois principales sources : végétale, animale et microbienne (AVIRON-VIOLET *et al.*, 1982 ; ARNAUD *et al.*, 1993). Leurs méthodes d'obtention diffèrent selon leur source.

Les enzymes animales peuvent être extraites par une homogénéisation mécanique des organes d'animaux, préalablement conservés à basse température, ainsi qu'une digestion enzymatique du tissu qui peut faciliter la libération de la molécule d'intérêt. Alors que les enzymes végétales sont obtenues à partir d'un broyage du matériel végétal qui peut être associé à un traitement pour digérer les structures les plus résistantes. Pour les enzymes issues des micro-organismes dites enzymes de fermentation ou de production, ce sont les plus utilisées. Ceci est dû au développement des procédés biotechnologiques qui permettent de modifier les propriétés des microorganismes afin de faciliter l'isolement de ces molécules bioactives (SINE, 2010).

L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. En effet, les principaux avantages des enzymes de production par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production (SCRIBAN, 1993).

1.1.1.3. Marché des enzymes

En 2001, le marché global des enzymes industrielles était estimé à presque deux milliards d'euros (COLLINS *et al.*, 2005).

La naissance de l'industrie des enzymes a coïncidé avec le début du vingtième siècle et avec l'apparition des premières enzymes microbiennes, essentiellement des amylases. Aujourd'hui, l'application de différentes enzymes a connu un grand essor dans des domaines extrêmement variés (RAO *et al.*, 1998) . Selon LARRETA-GARD (1997), les enzymes sont utilisées dans toutes les industries de la fermentation, que ce soit pour les produits

agroalimentaires (distillerie, jus de fruit, sucre, additifs, viandes, céréales, laits, fromages, plats cuisinés, pain, biscuiterie,...), dans l'industrie pharmaceutique (antibiotiques, acides divers, vitamines,...), l'industrie biomédicale (protéines recombinantes, réactifs,...), les industries biochimiques du nettoyage et de la décontamination (lessives, détergents, traitement de l'eau et des surfaces,...) (figure 01).

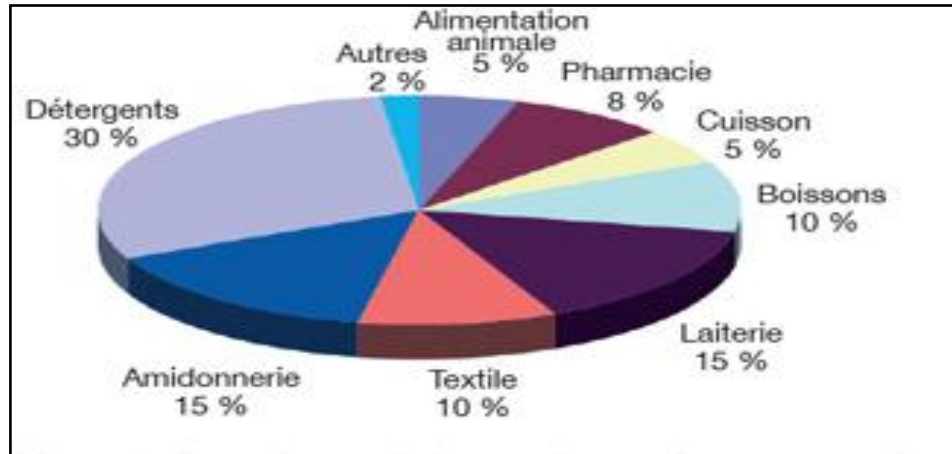


Figure 01: Parts des marchés occupées par les enzymes dans les différents secteurs (LARRETA-GARDE, 1997).

Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent une place leader de la vente des enzymes avec presque 60% (figure 02).

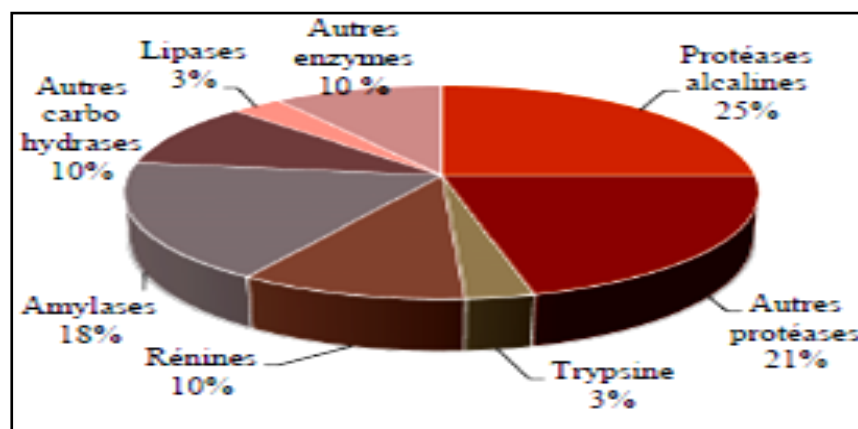


Figure 02: distribution des vente des enzymes (RAO *et al.*, 1998)

1.1.1.4. Classification des enzymes

Toutes les enzymes sont d'abord produites à l'intérieur des cellules mais certaines sont excrétées à l'extérieur de celle-ci (SIMON et MEUNIER, 1970). De ce fait, on distingue deux types d'enzymes :

- **les enzymes intracellulaires ou endoenzymes** : elles synthétisent les divers composants cellulaires et décomposent les nutriments afin de pouvoir répondre aux besoins énergétiques de la cellule ;
- **les enzymes extracellulaires ou exoenzymes** : elles agissent à l'extérieur sur les diverses substances organiques telles que les protéines, les hydrates de carbone ou les lipides formant des dérivés généralement solubles et susceptibles d'être absorbés à travers la membrane cellulaire.

Par ailleurs, vu que le nombre d'enzymes est en augmentation, l'Union internationale de biochimie (International Union of Biochemistry « IUB ») formula en 1961 la première recommandation et fonda la base de la nomenclature en établissant une classification de 712 enzymes qui a été réactualisée en 1992 en comprenant 3196 enzymes (SINE, 2010).

Selon AEHLE (2004), il existe trois principes pour mettre en place la classification et la nomenclature :

- le nom de l'enzyme se termine par « ase » à l'exception du système multienzymatique ;
- l'enzyme est nommée et classée selon le type de réaction qu'elle catalyse ;
- la classification est codée par l'Enzyme Commission (EC) facilitant l'identification. Ce code est le seul à figurer dans la littérature scientifique.

Donc, selon la première recommandation (1961), les enzymes sont classées en six classes (tableau I). Elles sont désignées par un nom systématique (indiquant la nature du substrat ou des substrats, le type de réaction catalysée), un numéro d'ordre à quatre chiffres, précédé de E.C. (Enzyme Commission) et dont le premier chiffre indique la classe, le deuxième la sous-classe, le troisième la sous-sous-classe, le quatrième le numéro d'ordre dans la sous-sous-classe (AEHLE, 2004 ; ASSAMOI *et al.*, 2009).

Tableau I: Les six classes d'enzymes (SINE, 2010).

Classes	Code chiffré	Réactions catalytiques
Oxydoréductases	(EC 1.x.x.x)	Réaction d'oxydoréduction (transfert d'électrons ou d'atome d'hydrogène)
Transférases	(EC 2.x.x.x)	Transfert de groupe spécifique (méthyle, acyle, glucosyle, phosphate,...)
Hydrolases	(EC 3.x.x.x)	Clivage de divers liens comme C-C, C-O, C-N,... ce sont des réactions d'hydrolyse
Lyases	(EC 4.x.x.x)	Clivage de divers liens comme C-C, C-O, C-N,... par élimination. C'est-à-dire addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
Isomérases	(EC 5.x.x.x)	Réaction d'isomérisation où un composé est transformé en un de ses isomères (réarrangement structurale de la molécule).
Ligases	(EC 6.x.x.x)	Formation de liens chimiques couplés (entre X et Y) avec la rupture d'ATP.

1.1.2. Les enzymes protéolytiques

1.1.2.1. Définition

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques (KUMAR *et al.*, 2008) (tableau II), en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique (SCRIBAN, 1999). Ce processus implique l'utilisation d'une molécule d'eau ce qui les classe parmi les hydrolases.

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes (pro-enzymes inactives) qui seront converties en forme active par une protéolyse limitée, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (PELMONT, 1995 ; BENSMAIL, 2012).

Tableau II: Spécificité des protéases (RAO *et al.*, 1998).

Enzyme	Liaison peptidique à clivée
Trypsine	-Lys (ou Arg)↓-----
Chymotrypsine, subtilisine	-Trp (OU Tyr , Phe, Leu)↓-----
Staphylococcus V8 protéase	-Asp (ou Glu)↓-----
Papaïne	-Phe (ou Val, Leu)- Xaa↓-----
Thermolysine	---↓Leu (ou Phe) -----
Pepsine	-Phe (ou Tyr, Leu)↓ Trp (ou Phe, Tyr)

(La flèche indique le site d'action des protéases. Xaa, n'importe quel acide aminé)

1.1.2.2. Sources des enzymes protéolytiques

Comme toute enzyme, les protéases, vue leur important rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire, sont omniprésentes dans tous les organismes vivants (RAO *et al.*, 1998 ; GUPTA *et al.*, 2002 ; SANDHYA *et al.*, 2005).

➤ Protéases végétales

Selon RAO *et al.* (1998), les protéases végétales sont de moins en moins exploitées en technologie. Parmi ces biocatalyseurs végétales, les plus connus sont : la papaïne, la bromélaïne, la kératinase et la ficine.

- **La papaïne** : enzyme extraite du latex d'un fruit équatorial et tropical (*Carica papaya*). Elle est largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés (ALAIS, 1975 ; SCRIBAN, 1993; PELMONT, 1995; RAO *et al.*, 1998) ;
- **La bromélaïne** est extraite à partir de l'ananas (*Ananas comosus*). Elle est moins thermostable que la papaïne (RAO *et al.*, 1998) ;
- **La ficine** est issue du figuier (*Ficus glabrata*) (SCRIBAN, 1993 ; MOODIE, 2001) ;
- **Les kératinases** sont produites par certains groupes botaniques pour dégrader les cheveux et la laine. Cette digestion est importante pour la production d'acides aminés

essentiels tels que la lysine et pour la prévention du colmatage des systèmes de traitement des eaux usées (RAO *et al.*, 1998).

➤ Protéases animales

La plupart des protéases d'origine animale sont pancréatique (RAO *et al.*, 1998), mais seules les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants présentent un intérêt industriel (MCKENZIE, 1971; ALAIS, 1975; SCRIBAN, 1999).

- **La trypsine** (23,3 kDa) est la principale enzyme digestive intestinale. L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne (RAO *et al.*, 1998) ;
- **La chymotrypsine** (23,8 kDa), la chymotrypsine pure est très coûteuse et elle est utilisée uniquement pour les applications de diagnostic et d'analyse (RAO *et al.*, 1998) ;
- **La pepsine** (34,5 kDa) est une protéase acide présente dans l'estomac de presque tous les vertébrés (RAO *et al.*, 1998), seules les pepsines bovines et porcines présentent un intérêt industriel (SCRIBAN, 1993) ;
- **La rénine** (30,7 kDa) est un constituant majeur de la présure utilisé en industrie laitière comme agent principal de caillage du lait (PELMONT, 1995). Elle a la propriété de couper la liaison Phe-Met dans la κ -caséine pour générer une *para*- κ -caséine et un glycopeptide C-terminal (RAO *et al.*, 1998).

➤ Protéases microbiennes

Selon DEVI *et al.* (2008), Les protéases microbiennes peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries. Quelques exemples de microorganismes producteurs de protéases sont présentés dans le tableau III.

- Protéases des moisissures

Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, de ce fait une simple filtration permet la séparation du mycélium du milieu de fermentation (SANDHYA *et al.*, 2005; DEVI *et al.*, 2008). En plus, ces moisissures sont des souches GRAS (Generally Recognized As Safe) et peuvent se développer sur des substrats moins chers (DEVI *et al.*, 2008).

Elles peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*,... (UL-HAQ *et al.*, 2003).

- Protéases des levures

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques. Il s'agit essentiellement des genres : *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* et *Debaryomyces* (LOUDJANI et BELMERABET, 2016).

- Protéases des bactéries

Les protéases dérivées de bactéries proviennent particulièrement des souches de *Bacillus* (BELMESIKH, 2011). Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et

résiste bien à l'action des détergents. Par ailleurs, elle est naturellement excrétée dans le milieu, ce qui facilite sa purification (LOUDJANI et BELMERABET, 2016).

Tableau III: Exemples de protéases microbiennes (BELMESSIKH, 2011).

Sources	Espèces	Références
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor circinelloides</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Bauveria felina</i> <i>Aspergillus clavatus ESI</i>	Garcia-Gomez <i>et al.</i> , 2009 Sathya <i>et al.</i> , 2009 Laxman <i>et al.</i> , 2009 Germano <i>et al.</i> , 2003 Wu <i>et al.</i> , 2006 Agrawal <i>et al.</i> , 2005 Hajji <i>et al.</i> , 2007
Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida lypolitica</i>	Chi <i>et al.</i> , 2007 Tobe <i>et al.</i> , 1976
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Virgibacillus sp. SK33</i> <i>Synergistes sp.</i>	Ferrero <i>et al.</i> , 1996 George <i>et al.</i> , 1995 Soares <i>et al.</i> , 2005 Patel <i>et al.</i> , 2005 Sinsuwan <i>et al.</i> , 2008 Kumar <i>et al.</i> , 2008a
Actinomycètes	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Nocardiosis alkaliphila sp.</i>	Mehta <i>et al.</i> , 2006 Hozzein <i>et al.</i> , 2004

1.1.2.3. Classification des protéases

Elles peuvent être classées selon plusieurs critères : la longueur de la chaîne polypeptidique, le pH et site d'action.

➤ Selon la longueur de la chaîne polypeptidique

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il existe deux catégories (FRAZIER, 1967 ; COLWELL et GRIGOROVA, 1989) :

- les protéases, qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques ;
- les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres.

➤ Selon le pH

Elles sont classées selon la gamme de pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres ou alcalines (KUMAR *et al.*, 2008). Dans ce contexte, les moisissures représentent un groupe de microorganismes physiologiquement différents des autres groupes. Elles possèdent une gamme d'enzymes actives à des pH différents, c'est le cas des protéases produites par *Aspergillus oryzae*, *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti*. Certaines protéases fongiques ont des optima de pH très acides de 2.5 à 5.0 (BOTTON *et al.*, 1990 ; MECHAKRA *et al.*, 1999).

➤ Selon le site d'action

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les endopeptidases et les exopeptidases (SCRIBAN, 1999 ; MOODIE, 2001) (tableau IV).

- **Les exopeptidases** : elles agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique. En se basant sur la nature de l'extrémité N ou C terminale. Elles sont classées en amino et carboxypeptidases, respectivement (figure 03) ;
- **Les endopeptidases** : elles sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique (Rao *et al.*, 1998). Celles-ci sont divisées en quatre familles en se basant sur le mécanisme catalytique (KUMAR *et al.*, 2008) :
 - **les protéases à sérines (EC 3.4.21.x)** : leur mécanisme catalytique implique l'intervention d'un résidu sérine. Parmi ces protéases, on trouve la chymotrypsine, la trypsine, l'élastase et la subtilisine (DENDOUGA, 2006) ;
 - **les protéases à cystéines (EC 3.4.22.x)** : leur activité catalytique nécessite la présence d'histidine, d'aspartate et de cystéine. Elles comprennent entre autres la papaine, la bromélaïne, la ficine et les cathepsines (B, L et H) du complexe lysosomal qui participent au renouvellement des protéines dans la cellule (KRESZE, 1991 ; PELMONT, 1995) ;
 - **les protéases à aspartate (EC 3.4.23.x)** : sont caractérisées par la présence de deux résidus essentiels d'aspartate et sont inhibées par la pepstatine ou par des époxydes. La pepsine et la chymosine (rénine) appartiennent à cette famille (PELMONT, 1995 ; RAO *et al.*, 1998) ;
 - **les métalloprotéases (EC 3.4.24.x)** : contiennent des cations métalliques dans leur site actif, généralement du zinc. Le métal est un agent électrophile qui exacerbe la réactivité de l'eau avant son attaque nucléophile sur le carbonyle de la liaison peptidique à rompre. Les exemples les plus remarquables sont la thermolysine et les endopeptidases de la brosse intestinale de la famille des astacines (PELMONT, 1995 ; JAKUBOWSKI, 2001).

Tableau IV: Classification des protéases (RAO *et al.*; 1998).

Type de protéase	Classe et sous-classes
Exopeptidases	• Amino-peptidases: - Peptidyle peptidases - Dipeptidyle peptidases - Tripeptidyle peptidases • Carboxypeptidases: - Sérine carboxypeptidases - Métallo-carboxypeptidases - Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	• Protéases sérines • Protéases cystéines ou protéases thiols • Protéases aspartiques ou protéases acides • Métalloprotéases

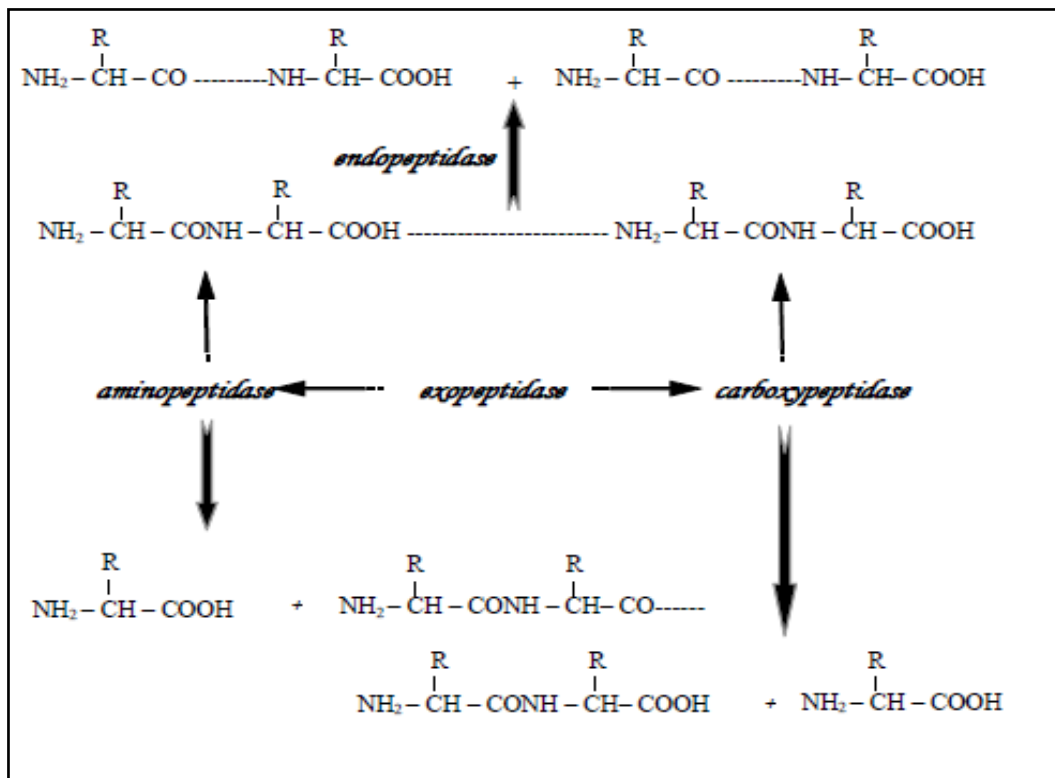


Figure 03: Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (SCRIBAN, 1999).

1.1.2.4. Applications industrielles des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Les principales industries utilisatrices de protéases sont l'industrie alimentaire avec ces différentes applications, l'industrie des détergents pour lessives, la tannerie et l'industrie pharmaceutique et médicale (tableau V).

1.1.2.4.1. Industrie alimentaire

L'application des protéases à l'industrie alimentaire n'est pas récente. Ce secteur représente le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui, à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées, donnent lieu à une grande diversité d'applications (AVIRON-VIOLET *et al.*, 1982).

- **Fabrication de fromages:** représente la majeure application de protéases dans l'industrie alimentaire (RAO *et al.*, 1998). Les enzymes coagulantes fongiques sont les plus utilisées pour cette fin, car elles donnent de bons résultats souvent comparables à ceux obtenus par la présure et la pepsine bovine et porcine. Tandis que, la présure végétale a été écartée à cause de son activité protéolytique élevée (AVIRON-VIOLET *et al.*, 1982). Ces enzymes permettent de coaguler le lait rapidement à son pH naturel avec très peu de dégradation subséquente des protéines du lait. Par conséquent, il y a formation du caillé, l'étape clé dans les produits fromagères (SUMANTHA *et al.*, 2006).

Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica*. Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *Aspergillus oryzae* ont également été utilisées pour l'affinage des fromages (AGUILAR *et al.*, 2008) ;

- **panification** : Les endo et les exoprotéinases d'*Aspergillus oryzae* (papaïne ou bromélaïne) sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte. Ces protéases attaquent le gluten de la farine et empêchent la rétention le dioxyde de carbone produit par les levures (MEUNIER, 1999). Un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage et d'augmenter ainsi le volume de la mie (AVIRON-VIOLET *et al.*, 1982 ; AGUILAR *et al.*, 2008). Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (RAO *et al.*, 1998) ;
- **Attendrissement des viandes** : Les protéases permettent une dégradation primaire des tissus connecteurs de collagène et d'élastine, et la majeure partie de l'action enzymatique s'effectue dans une gamme de température de 40 à 60°C.

La papaïne est largement utilisée à cette fin. Ainsi, il est possible de l'appliquer sur la viande immédiatement avant la préparation ou bien l'enzyme peut être injectée à l'animal juste avant l'abattage. Ceci est possible, car l'enzyme est alors inoculée sous sa forme oxydée inactive laquelle devient active par réduction dans le corps de l'animal. L'enzyme attendrisseur idéal doit attaquer les tissus connecteurs à de faibles températures et être inactivée à 50°C. Elle doit aussi avoir une bonne activité aux pH usuels de la viande, soit entre 4 et 5.

Comme la papaïne, certaines enzymes protéolytiques microbiennes, telle que la protéase alcaline d'*Aspergillus oryzae*, sont employées comme des additifs pour augmenter la digestibilité des aliments et l'attendrissement des viandes ;

- **brasserie** : l'action protéolytique de la papaïne donne à la bière finie une bonne stabilité colloïdale à froid (DURAND et MONSON, 1982) et ceci en empêchant la formation d'un précipité de protéine et de tannin causé par l'entreposage à froid de la bière ;
- **Préparation de produits à base de soja** : se fait par des protéases neutres ou alcalines d'origine fongique qui sont utilisées depuis très longtemps. Le traitement de ces produits par la protéase alcaline permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans la formulation des aliments diététiques (RAO *et al.*, 1998).

1.1.2.4.2. Industrie pharmaceutique et médicale

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces, notamment :

- comme aide à la digestion, cas des protéases d'*Aspergillus oryzae* (RAO *et al.*, 1998) ;
- traitement des brûlés, plaies et des ulcères dermiques par combinaison des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines avec des antibiotiques (RAO *et al.*, 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 al.*, 2006) ;
- traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes pouvant se faire par une élastotérase provenant de *Bacillus subtilis* (KUDRYA et SIMENENKO, 1994) ;
- vaccination antiparasitaire, étant donné que les protéases jouent un rôle critique dans la virulence des agents pathogène (COLWELL et GRIGOROVA, 1989)

1.1.2.4.3. Détergents

Les détergents constituent l'application industrielle la plus importante des enzymes. Les protéases jouent un très grand rôle dans l'amélioration du pouvoir détergent d'une lessive. Elles sont capables de dissoudre les taches protéiques à basse température contrairement aux produits chimiques qui ne possèdent pas des propriétés équivalentes même à haute température. La protéase la plus fréquemment utilisée est la subtilisine de *Bacillus* qui est capable de cliver de nombreux liens peptidiques avec une préférence pour les résidus hydrophobes (SINE, 2010).

1.1.2.4.4. Tannerie et textile

Les protéases alcalines d'*Aspergillus* et de *Bacillus* sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine de la peau à tanner et ceci dans ces trois traitements : reverdissage, le délainage et le confitage (RAO *et al.*, 1998 ; LAXMAN *et al.*, 2005).

La protéase neutre de *Bacillus subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle.

1.1.2.4.5. Autres applications industrielles

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (LOUDJANI et BELMERABET, 2016).

Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (AVIRON-VIOLET *et al.*, 1982).

la subtilisine (enzyme bactérienne), est utilisée en conserverie comme additif dans les conserves alimentaires pour détruire les spores des germes *Clostridium* (RAO *et al.*, 1998 ; DURAND et MONSON, 1982).

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

Tableau V : Quelques protéases fongiques et leurs applications industrielles (MECHAKRA, 2006)

Genre	Espèce	Type d'enzyme	Applications industrielles
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	p. ac	Aide digestive, préparation des sauces de soja et panification
	<i>oryzae</i>	p.ac, p.n et p. al	Attendrissage des viandes, aide digestives, détergents et brasserie
	<i>melleus</i>	p. al	Détergents pour lessives
	<i>candidus</i>	p. al	Détergents pour lessives
	<i>flavus</i>	p. al	Clinique
	<i>saitoi</i>	p. ac	Affinage des fromages
	<i>parasiticus</i>	p. al	Détergents pour lessives
	<i>sojae</i>	p. al	Préparation des sauces de soja
<i>Endothia</i>	<i>parasitica</i>	p. ac	Coagulation du lait et affinage des fromages
<i>Fusarium</i>	<i>culmorum</i> <i>sp.</i>	p. ac p. al	Médicale (phytopathologie) Hydrolyse des protéines de céréales
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	p. n	Affinage des fromages
<i>Mucor</i>	<i>Bacilliformis</i>	p. ac	Coagulation du lait
<i>Penicillium</i>	<i>Camemberti</i>	p.ac, p.n et p.al	Industrie laitière (affinage des fromages et coagulation du lait)
<i>Rhizomucor</i>	<i>Miehei</i>	p. ac	Coagulation du lait et attendrissage des viandes
<i>Rhizopus</i>	<i>Oligosporus</i>	p. ac	Hydrolyse des protéines destinées à l'industrie alimentaire
<i>Stachybotrys</i>	<i>Chartarum</i>	p. al	Détergents
<i>Trichoderma</i>	<i>Harzianum</i>	p. ac	Applications alimentaire et médicale

(p.ac.: protéase acide ; p.al.: protéase alcaline et p.n.: protéase neutre)

1.1.3. Les enzymes amylolytiques

1.1.3.1. Définition

Les amylases sont des hydrolases importantes qui ont été largement utilisées depuis de nombreuses décennies (GUPTA *et al.*, 2008 ; SUNDARRAM et MURTHY, 2014). Ce sont des enzymes qui catalysent spécifiquement l'hydrolyse de l'amidon.

L'amidon est le constituant polysaccharidique majeur de certains produits agricoles comme les produits amylacés (blé, maïs, riz,...) et les tubercules notamment la pomme de terre. Ce polysaccharide est une substance de réserve ayant la propriété d'être insoluble dans l'eau. Cette molécule contient deux types de molécules formées de résidus d' α -D-glucose : l'amylose qui est un polymère linéaire caractérisé par des enchainements α -1,4 et l'amylopectine se caractérisant par une structure branchée correspondant à 5% de résidus liés en α -1,6. Il est à noter que ce pourcentage d'amylopectine varie selon la source, ainsi, pour le blé, il correspond à 25% alors que pour le maïs il est compris entre 97 et 99% (SINE, 2010).

1.1.3.2. Classification des amylases

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon, substrat spécifique des amylases, est à l'origine de la classification de ces dernières en trois types d'enzymes amylolytiques de genre glycosyl hydrolases (SUNDARRAM et MURTHY, 2014) (figure 04).

➤ Les enzymes spécifiques des liaisons α -(1, 4)

- L' α -amylase (EC 3.2.1.1)

L' α -amylase ou α -(1,4) D-glucane glucanohydrolase est une endo-glycanase appartenant à la classe des hydrolases. Elle est connue sous différents noms : thermolase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A et le plus courant est l'amylase dextrinase ou liquéfiant. Elle est capable de franchir la liaison α -(1,6) glucosidique de l'amylopectine, sans pourtant l'hydrolyser. Leur action s'effectue au niveau des liaisons α -(1,4) de l'amylose et libère du D-glucose, D-maltose et une petite quantité de dextrine (ZOUBIRI, 2011). Elle est retrouvée dans tous les organismes vivants d'où le nom d'enzyme ubiquitaire (HAQ *et al.*, 2003)

- La β -amylase (EC 3.2.1.2)

La β -amylase ou α -(1,4) glucane maltohydrolase est une exo-glycanase. Elle attaque les chaînes d'amylose et d'amylopectine à partir de l'extrémité non réductrice pour produire du β -maltose de manière récurrente. Le nom de β -amylase lui est attribué en raison de la configuration stéréochimique du maltose libéré par l'hydrolyse d'amidon. Comme il est impossible de franchir les liaisons ramifiées dans l'amylopectine, l'hydrolyse s'arrête à deux ou trois résidus de glucose avant celles-ci. Cette action est donc incomplète, ce qui conduit à la production de 50 à 60% de maltose et le reste est formé de dextrine (VALLIER *et al.*, 1977 ; SUNDARRAM et MURTHY, 2014).

Les principales sources de β -amylase sont les graines de plantes supérieures et de patates douces. Elle est également présente dans les fruits et assure pendant la maturation des fruits, la décomposition de l'amidon en maltose, ce qui entraîne la douceur des fruits mûrs (SUNDARRAM et MURTHY, 2014).

➤ Les enzymes spécifiques des liaisons α -(1,6)

- L'Iso amylase (EC 3.2.1.68)

L'Iso amylase est dite enzyme débranchante car elle hydrolyse les liaisons α -(1,6) présentes dans les polysaccharides tels que l'amylopectine. Elle provient généralement des

levures et moisissures (DICKO, 1999). Cette enzyme libère des fragments d'amylose ou des oligomères de glucose.

- La pullulanase (EC 3.2.1.41)

C'est également une enzyme déramifiante spécifique à l'hydrolyse des liaisons α -(1,6) de pullulane et qui peut être obtenue à partir de *Aerobacter aerogenes* (DICKO, 1999). La pullulanase est incapable d'hydrolyser totalement l'amylopectine qui est beaucoup plus ramifiée que le glycogène (SCRIBAN, 1993). Elle est donc combinée avec l'amyloglucosidase pour le processus de saccharification complète de l'amidon (DICKO, 1999).

➤ Les enzymes spécifiques des liaisons α -(1,4) et α -(1,6)

- La gamma-amylose (EC 3.2.1.3)

La γ -amylase encore appelée : amyloglucosidase, glucoamylase ou acide maltase, clive les liaisons glucosidiques α -(1,6), en plus de cliver les dernières liaisons glucosidiques α -(1,4) à l'extrémité non réductrice de l'amylose et de l'amylopectine. Cette enzyme est la plus efficace dans les milieux acides, d'où son nom acide maltase. Elle a un pH optimal d'activité pouvant aller de 3 à 7 (SUNDARRAM et MURTHY, 2014).

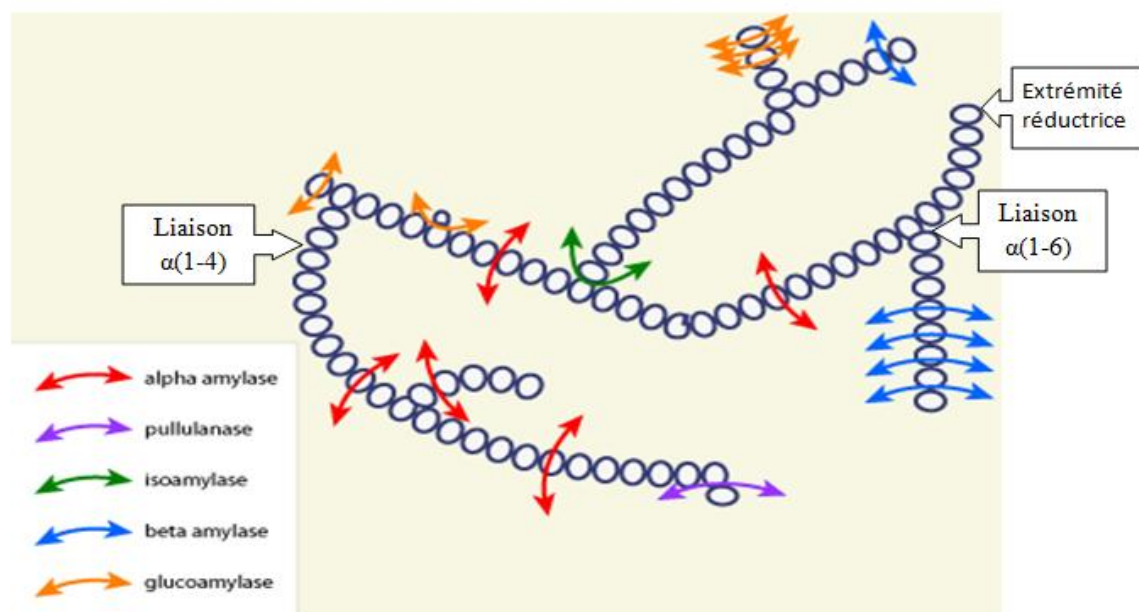


Figure 04: Principales types d'amylases et leurs sites de coupure sur la molécule d'amidon

1.1.3.3. Données sur l' α -amylase

L' α -amylase est de loin l'enzyme amylolytique la plus étudiée et la mieux connue de toutes. De ce fait, une partie présentant ses origines, sa structure, son mode d'action et quelques unes de ces caractéristiques lui est consacrée.

1.1.3.3.1. Origines

L' α -amylase est une enzyme ubiquitaire qui peut être isolées à partir de divers organismes vivants soit par extraction à partir de cellules animales ou végétales, soit par fermentation de cellules microbiennes (HAQ *et al.*, 2002).

Généralement l' α -amylase animale est extraite de la salive humaine et du pancréas des mammifères, tels que les porcs et les veaux (BERTHEAU *et al.*, 1985 ; CHATTERTON *et*

al., 1996) où elle joue un rôle clé dans la digestion des polysaccharides. Cependant, la difficulté réside dans l'approvisionnement de la matière première (organe difficile à collecter) et le coût de l'extraction (SACI, 2012).

En ce qui est de l' α -amylase végétale qui est d'une importance primordiale dans le métabolisme glucidique produisant l'énergie nécessaire à la germination et au développement embryonnaire, elle est principalement extraite à partir de céréales, notamment le blé, l'orge, le son ou le riz (SRINIVAS RAO *et al.*, 2004). Néanmoins, l'obtention d'enzymes d'origine végétale est soumise aux contraintes saisonnières des récoltes (SACI, 2012).

Quant aux α -amylases microbiennes, elles sont les plus préférées pour la production à grande échelle (HAQ *et al.*, 2002) qui est contrôlée par l'amidon. Il s'agit d'une induction de l'enzyme par son substrat naturel (NOUADRI, 2011). On distingue deux origines pour les α -amylases microbiennes : origine bactérienne ou origine fongique (SACI, 2012).

- L' α -amylase bactérienne : Industriellement, elle est obtenue par fermentation des *Bacillaceae* (SICARD, 1982 ; SUMITANI *et al.*, 2000). Cependant d'autres espèces, produisent également cette enzyme telle que *Thermobifida fusca* et *Streptomyces sp.* ;
- L' α -amylase fongique : Les producteurs principaux de l' α -amylase sont les moisissures des genres *Aspergillus* et *Rhizopus*, mais aussi les levures participent à la production de cette enzyme (tableau VI).

Tableau VI: Les différentes origines de l' α -amylase microbienne (SACI,2012).

	Enzymes microbiennes	Références
Bactéries	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus steorothermophilus</i> <i>Bacills circulans</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacills coagulans</i> <i>Thermomonospora fuska</i> <i>Alteromonas haloplanktis</i> <i>Termus filiformis</i> <i>Streptomyces rimosus</i>	KANDRA <i>et al.</i> , (2002). DAUTER <i>et al.</i> , (1999). DEY <i>et al.</i> , (2002). UIGER et CURAKOGLU, (2001). BABU et SATYANARAYANA, (1993). BUSH et STUTZENBERGER, (1997). FELLER <i>et al.</i> , (1992). EGAS <i>et al.</i> , (1998). VUKLIE <i>et al.</i> , (1992).
Moisissure	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus sojae</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Penicillium griseoroseum</i>	AGGER <i>et al.</i> , (1998). BOTTON <i>et al.</i> , (1990). KHOO, (1994). AIDOO <i>et al.</i> , (1981). LUCIO DE SOUZA <i>et al.</i> , (1997) ; CUVEILLIER, (1999). SOCCOL <i>et al.</i> , (1994) RAY, (2001).
Levure	<i>Saccharmyces cerevisiae</i> <i>Candida</i> <i>Pichia</i> <i>Endomycopsis</i> <i>Lipomyces</i>	RUOHONEN <i>et al.</i> , (1991). BOUIX et LEVEAU, (1999).

1.1.3.3.2. Caractéristiques de l' α -amylase

L' α -amylase est considérée comme l'enzyme industrielle la plus importante et la plus ancienne d'après GUPTA *et al.*, (2008). De plus elle occupe 13% des 28% que les glucanases occupent du marché mondial (LARPENT-GAURGAUD et SANGLIER, 1992).

Son poids moléculaire diffère d'une origine à une autre et d'une espèce à une autre. Il peut varier de 40 à 90 kDa. Généralement celui des α -amylases fongiques s'échelonne entre 40 et 70 kDa (BERRY et PATERSON, 1990).

Pour que cette enzyme soit active, elle nécessite un cofacteur qui est le calcium (SUNDARRAM et MURTHY, 2014). Ce dernier ne participe pas directement à la formation du complexe enzyme-substrat, mais il maintient l'enzyme dans une conformation optimale pour un maximum d'activité et de stabilité. Cependant, à haute concentration (généralement supérieure à 20mM), le calcium devient inhibiteur de l'activité enzymatique (KOLLI et ZATOUT, 2015). Par ailleurs, l'activité enzymatique de l' α -amylase n'est pas modifiée par les ions K^+ , Na^+ , NH_4^+ , mais elle est fortement inhibée par l'éthylène diamine tétra acétate (EDTA) et les métaux lourds (IGARASHI *et al.*, 1998 ; TALAMOND *et al.*, 2002).

En ce qui est de la température optimale d'action de l' α -amylase, elle varie selon l'origine et se situe entre 40 et 90°C avec une faible thermostabilité pour l' α -amylase fongique dont l'optimum est de 50 à 70°C (BAKRI, 2003). Par contre, l' α -amylase bactérienne est réputée pour sa grande thermostabilité. En effet celle du genre *Bacillus* est caractérisée par un optimum de température allant de 70 à 90°C (KOLLI et ZATOUT, 2015).

Quant au pH optimal d'activité, il est généralement compris entre 4 et 8. Les α -amylases bactériennes présentent un optimum supérieur à la neutralité, alors que les α -amylases fongiques ont des optima compris entre 4 et 6 (KOLLI et ZATOUT, 2015) (Tableau VII).

Tableau VII : Propriétés physico-chimiques de l' α -amylase produite par certains microorganismes (NOUADRI, 2011).

	Microorganisme	T° optimale	pH optimum	P.M. (Dalton)	Références
Bactéries	<i>Bacillus sp</i>	60	11-12	96 000	KIM <i>et al.</i> , (1995)
	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	59 000	BRUMUM <i>et al.</i> , (1991)
Moisissures	<i>Aspergillus awamori</i>	50	4.8 – 5.0	54 000	BHELLA et ALTOSAR, (1985)
	<i>Aspergillus flavus</i>	55	6.0	52 500	KHOO <i>et al.</i> , (1994)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	5.5	65 000	
	<i>Aspergillus oryzae</i>	50	4.5 – 5.0	59 000	PLANCHO COLONA, (1995)
	<i>Penicillium expansum</i>	60	4.5	64 000	KUNDU et DAS, (1970)
	<i>Rhizopus sp</i>	60-65	4.0 – 5.6	64 000	DOYLE <i>et al.</i> , (1989) VAYSSIER <i>et al.</i> , (1990)
Levures	<i>Saccharomycopsis cerevisiae</i>	60	5.0	-	OLASUPU <i>et al.</i> , (1996)

1.1.3.3.3. Structure de l' α -amylase

L' α -amylase est une glycoprotéine monomérique (De SOUZA *et al.*, 2010 et ERNEST *et al.*, 2014) comportant trois domaines globulaires (A, B et C) (LI *et al.*, 2014). Elle renferme une partie glucidique formée essentiellement de D-mannose mais aussi de D-glucose, D-galactose, D-xylose et D-glucosamine (STEFANOVA et EMANUILOVA, 1992). La partie glucidique est chimiquement associée à la chaîne polypeptidique constituée de 471 à 483 résidus d'acides aminés, avec 4 ou 5 ponts disulfures (HESLOT, 1996). Le domaine central A, forme un tonneau (β/α)₈ contenant 8 feuillets β plissés et qui se disposent de façon parallèle et de 8 hélices. Il porte le site actif à la partie C-terminale des feuillets (BURHAN, 2003). Le domaine B est formé d'une boucle de 64 résidus d'acides aminés et constitue une sorte de « couvercle » au-dessus du site actif. Le domaine C, essentiel pour le repliement post-traductionnel de l' α -amylase, est constitué d'un tonneau de 8 feuillets antiparallèles (figure 04).

En dehors de ces trois domaines, certaines enzymes de la famille GH13 possèdent aussi des modules supplémentaires dont «E » à leur extrémité C-terminale, jouant un rôle dans l'adsorption d'amidon (JEMLI *et al.*, 2008).

En outre, des sites de fixation à forte affinité des ions Ca^{2+} ont été décrits, ce qui fait de l' α -amylase une métallo-enzyme à calcium (BUISSON *et al.*, 1987). La liaison de cet ion entre le domaine A et le domaine B joue un rôle stabilisateur du site actif. Cependant, d'autres sites de fixation du Ca^{2+} à faibles affinité existent au rond de la poche de fixation du substrat. Ceci explique que le calcium exerce un effet inhibiteur de l'activité enzymatique à hautes concentrations. Pour certaines α -amylases, la présence de sites de fixation du Cl^- ou de Zn^{2+} est également signalée (DALI et HAMAME, 2016).

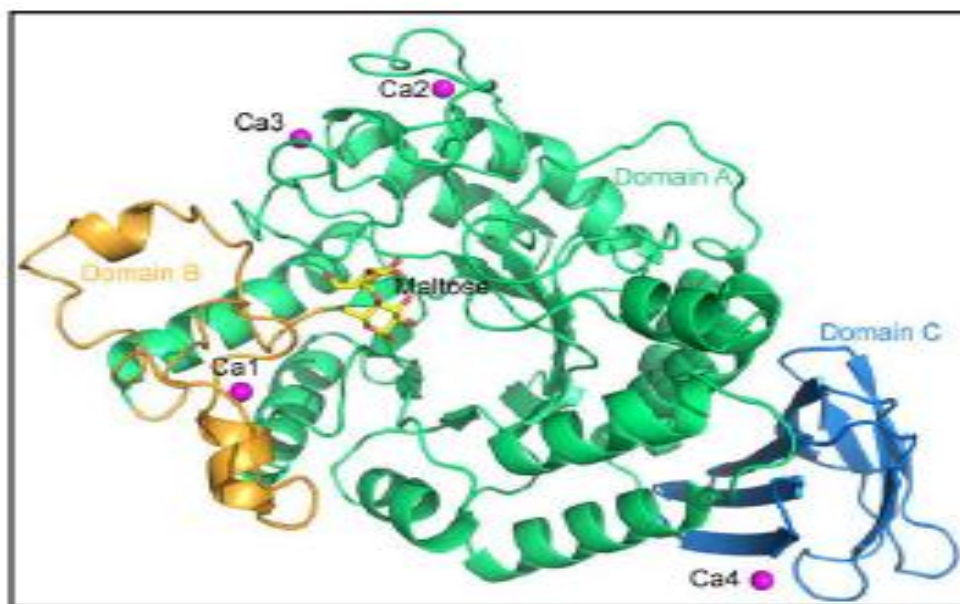


Figure 05 : Structure monomérique de l' α -amylase (DALI et HAMAME, 2016).

1.1.3.3.4. Mode d'action de l' α -amylase

L'activité catalytique de l'enzyme implique la participation des trois acides aminés du site actif : Asp 231 (nucléophile catalytique), Glu 261 (donneur catalytique de l'hydrogène) et Asp 328 (l'aide de catalyse qui est un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué) (PARK *et al.*, 1997). Les deux premiers acides carboxyliques sont les groupes impliqués dans la réaction catalytique qui est réalisée en trois étapes (figure 05) :

- le Glu en position 261 va fournir un proton à l'oxygène glucosidique. Cette étape est aussi tôt suivie d'une attaque nucléophile sur carbone anomérique du sucre par Asp en position 231. De ce fait, il y a libération de l'extrémité réductrice du substrat ;
- le maintien du Glu 261 en forme déprotonée aboutit à la mise en place d'une molécule d'eau remplaçant ainsi l'oxygène de la liaison osidique rompue ;
- régénération de l'état initial et libération de l'autre fragment du substrat, par hydrolyse du lien covalent entre l'oxygène nucliophile de l'Asp 231 et le carbone anomérique de résidu du sucre (NIELSON *et al.*, 2001).

Le mécanisme d'action de l' α -amylase est une caractéristique de l'enzyme et qui peut se faire de différentes manières, en adoptant un seul type d'attaque ou en combinant entre deux types :

- attaque aléatoire : l' α -amylase hydrolyse aléatoirement les liaisons glucosidiques, libérant deux fragments qui seront séparément attaqués ;
- attaque préférée : l' α -amylase montre une préférence pour certaines liaisons dans le substrat ;
- attaque répétitive ou multiple : elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat, pour hydrolyser les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat (NOUADRI, 2011).

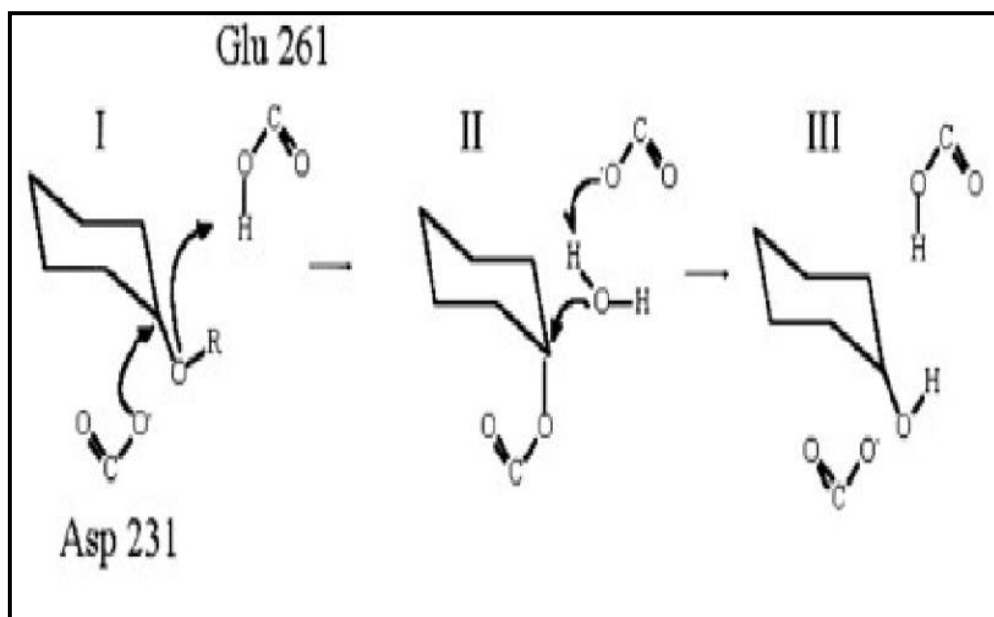


Figure 06 : Mécanisme catalytique des hydrolases glycosyliques (NIELSON, 2001).

- (I) Protonation de l'oxygène glycosidique par le donneur d'hydrogène (Glu 261) et attaque sur le glucose (C1) par le nucléophile (Asp 231). Départ de la fin réductrice du substrat.
 (II) L'activation d'une molécule d'eau, clivage de la liaison covalente C1 Asp 231.
 (III) Régénération des états initiaux de protonation.

1.1.3.3.5. Utilisation industrielle de l' α amylase

La première utilisation des α -amylases remonte à 1984, comme aide pharmaceutique pour le traitement de désordres digestifs (BENNETT, 1998). De nos jours, cette enzyme trouve une application dans tous les processus industriels se rapportant à l'amidon. Le tableau VIII rapporte en bref les divers domaines d'application des α -amylases.

Tableau VIII : Différentes applications des α -amylases (ZOUBIRI,2012).

Industries	Applications
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagnée d'une chute importante de la viscosité (liquéfaction) (ALAIS <i>et al.</i> , 2008)
Sucrierie	Réduction de la viscosité des sirops de cannes à sucre, en hydrolysant les contaminants amylacés pour assurer la réussite de processus de cristallisation (VAN DER MAAREL <i>et al.</i> , 2002).
Biscuiteries et panification	Amélioration des propriétés rhéologiques et fermentaires de la pâte, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croûte (PANDEY <i>et al.</i> , 2000).
Industrie textile	Désencollage textile, qui permet d'éliminer la colle d'amidon qui enduit les fibres et les protège au cours du tissage (HENDRIKSEN <i>et al.</i> , 1999).
Papeterie	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).
Détergent	Dégradation des taches à base d'amidon, ce qui facilite le découpage physique de la tache (NIELSON <i>et al.</i> , 2001).
Industrie pharmaceutiques	Utilisé comme aide digestif pour éviter les dyspepsies (indigestions) et les fermentations intestinales et dans le traitement de diabète et de l'obésité (NIELSON <i>et al.</i> , 2001).
Environnement	Traitement des eaux résiduaires (SACI, 2012).

1.2. Champignons endophytes

Contrairement aux végétaux, la nature hétérotrophes des champignons les a conduits à adopter plusieurs modes de vie : saprophytisme, parasitisme, symbiotisme et endophytisme (CANARD et SENEQUIER-CROZET, 2016). Ces organismes hétérotrophes sont regroupés en deux catégories majeures :

- les champignons mycorhizes qui résident seulement dans les racines mais qui s'étendent en dehors dans la rhizosphère ;
- les champignons endophytes qui résident entièrement dans les tissus des plantes, et colonisent les espaces inter et /ou intracellulaires des racines ainsi que les parties aériennes: tiges et feuilles.

Les champignons endophytes ont fait l'objet de plusieurs recherches notamment chez les plantes après que Charles BACON et ses collègues les ont découverts pour la première fois, suite à une intoxication du bétail causée par des alcaloïdes contenus dans les plantes de fétuque consommées (plantes fourragères) et produits par les endophytes (MANSOURI, 2011).

1.2.1. Définition

Littéralement, le mot endophyte est dérivé du grec, « endo » ou « endon » qui veut dire « intérieur », et « phyte » ou « phyton » qui veut dire « plante ». Le terme « endophytes » a été introduit en 1866 par DE BARY, pour décrire tout microorganisme vivant à l'intérieur d'une plante. De ce fait, les champignons endophytes sont des champignons microscopiques qui vivent dans tous les tissus de la plante d'une façon asymptomatique, c'est-à-dire, sans causer de tords à leur hôte (PETRINI, 1991).

1. 2.2. Diversité des champignons endophytes

Les champignons constituent un vaste groupe diversifié, estimé à plus de 1.5 millions d'espèces, dont seulement 100.000 (soit 7%) sont décrites et près de 1% sont appréciées pour leur production de métabolites secondaires (HUANG *et al.*, 2008). A ce jour, toutes les plantes étudiées sont colonisées par des endophytes qui, de ce fait, dits organismes ubiquistes (BEN FODDIL, 2015). En moyenne, une seule espèce de plante peut renfermer jusqu'à 50 espèces différentes d'endophytes (OSES *et al.*, 2008).

La plupart des champignons endophytes identifiés appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota*. Cependant, certains appartiennent à d'autres taxons tels que les *Deuteromycota*, *Basidiomycota* , *Zygomycota* et les *Oomycota* (SAAR *et al.*, 2001).

La colonisation des tissus internes des plantes-hôtes par les endophytes, peut se faire de trois manière (STONE *et al.*, 2004) (figure 06) :

- intracellulaire et limitée à quelques cellules individualisées ;
- intercellulaire localisée ou systémique ;
- à la fois intra- et intercellulaire.

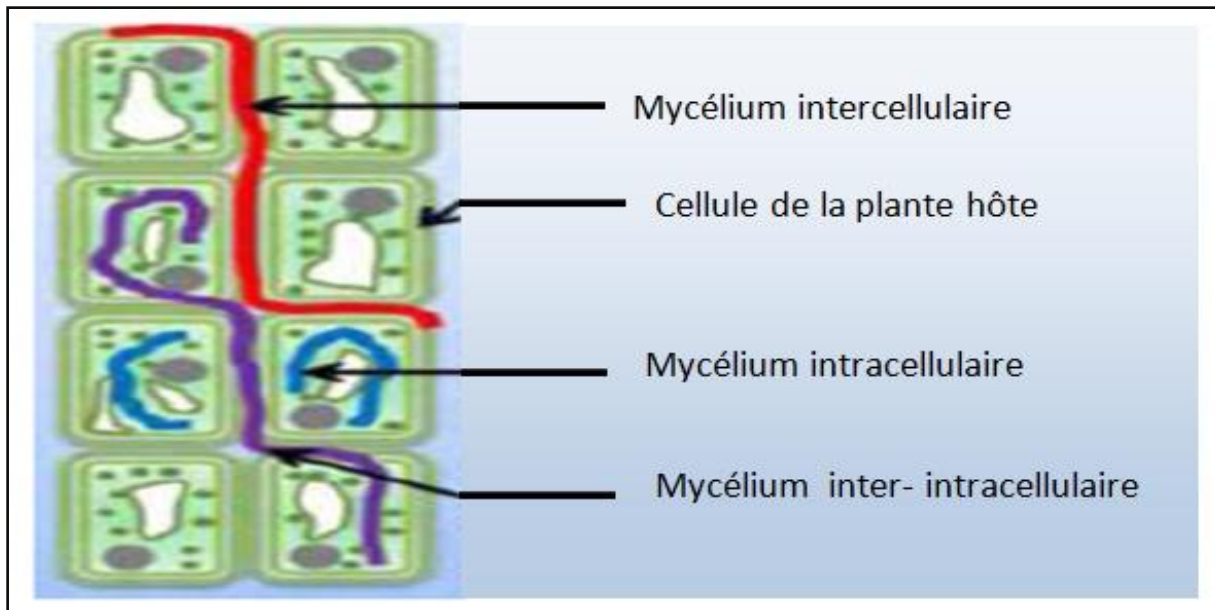


Figure 07 : Modes de croissance des champignons endophytes dans les tissus des plantes (CANARD et SENEQUIER-CROZET, 2016).

1.2.3. Mode de reproduction et de transmission

Les endophytes se reproduisent via deux modes (ZERROUG, 2011) :

- Le premier se fait par une croissance végétative complètement interne des hyphes (SELOSSE et SCHARDL, 2007), et ceci par une transmission verticale qui est une transmission du champignon systémique de la plante hôte à sa progéniture par l'intermédiaire de ses graines (SAIKKONEN *et al.*, 2004 ; MANSOURI, 2011). C'est le principal mode de transmission des champignons endophytes (SAIKKONEN *et al.*, 2010).
- Le second se fait via les spores ; ce groupe de champignons se transmet horizontalement (SAIKKONEN *et al.*, 2004), c'est-à-dire le champignon peut être transmis soit par spores sexuées ou asexuées (SAIKKONEN *et al.*, 2004) pour infecter d'autres plantes (ARNOLD *et al.*, 2003 ; GALLERY *et al.*, 2007).

1.2.4. Classification des champignons endophytes

D'après RODRIGUEZ *et al.* (2009), les champignons endophytes sont actuellement divisés en 4 classes (tableau IX) selon la famille de l'endophyte concerné, la localisation dans les tissus de l'hôte et le mode de transmission.

1.2.4.1. Famille des « Clavicipitaceae »

Cette famille comprend les Ascomycètes colonisateurs de bourgeons et du rhizomes. Ce sont des champignons essentiellement parasites des plantes, d'insectes ou autres (SUNG *et al.*, 2007 ; RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Ils sont décrits en une seule classe qui est la classe 1 regroupant 37 genres dont quatre possèdent des espèces capables d'endophytisme : *Balansia*, *Ephelis*, *Epichloë* et *Neotyphodium* (WHITE *et al.*, 2000).

1.2.4.2. Famille des « Non Clavicipitaceae »

Selon RODRIGUEZ *et al.* (2009), les champignons appartenant à cette famille, ont été isolés à partir de bourgeons et/ou de racines de presque toutes les plantes étudiées, ils sont répartis en trois classes : classe 2, 3 et 4. Les mycoendophytes de ce groupe sont

majoritairement des Ascomycètes (SAIKKONEN *et al.*, 2010) et Basidiomycetes (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

➤ Classe 2

Les champignons endophytes de classe 2 présentent un spectre d'hôte large. Ils peuvent coloniser toutes les parties de la plante et croissent de manière extensive principalement dans le milieu intercellulaire. Leur transmission est le plus souvent verticale, mais il y a parfois une transmission horizontale, en particulier lorsque l'hôte est en sénescence : le champignon émerge de l'hôte et sporule. Certains de ces endophytes sont également saprophytes et peuvent coloniser le sol (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

➤ Classe 3

Le spectre des hôtes colonisé par les individus de cette classe est très large. Ils occupent les parties aériennes en particulier, les bourgeons. Leur transmission est strictement horizontale, en particulier lorsque l'hôte est en sénescence : le champignon émerge et produit des spores sexuées ou asexuées (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Cette classe d'endophytes regroupe toutes les espèces fongiques colonisatrices des feuilles des arbres dont les plus fréquents sont *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Glomerella*, *Aureobasidium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Acromoniella*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cordyceps*, *Curvularia*, *Geotrichum*, *Monilia*, *Mucor*, *Neoscytalidium*, *Phomopsis*, *Rhizoctonia*, *Scedosporium*, *Xylaria* et *Paraphaesphaeria* (BENFODDIL, 2015).

➤ Classe 4

Les individus de cette classe présentent un spectre d'hôte large. Ils colonisent uniquement les racines (principalement le cortex) de la plante, de manière extensive. Ils sont caractérisés par la nature de leurs hyphes qui sont septées et de couleur sombre due à la présence de mélanine. Ils colonisent asymptomatiquement les milieux intra et extracellulaires de l'hôte. Ils se reproduisent de façon asexuée avec un mode de transmission strictement horizontal (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Tableau IX : Classification des champignons endophytes selon certains critères (RODRIGUEZ *et al.*, 2009 in CANARD et SENEQUIER-CROZET, 2016)

Critères de classification	Clavicipitaceae	Non Clavicipitaceae		
	Classes 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
La gamme d'hôtes	Etroit	Vaste	Vaste	Vaste
Tissus colonisés	Bourgeons et rhizome	Bourgeons, rhizome et racines	Bourgeons	Racines
Colonisation de la plante	extensive	extensive	limitée	extensive
Biodiversité de la plante	faible	faible	Haute	inconnue
Transmission	Verticale et horizontale	Verticale et horizontale	horizontale	horizontale

1.2.5. Interactions endophyte-hôte

Il existe différentes interactions qui sont variables d'un endophyte à un autre et d'un hôte à un autre. Elles dépendent des facteurs abiotiques, des interactions avec d'autres

espèces, de la géographie et de la phylogénie (SAIKKONEN *et al.*, 1998), et varient de l'antagonisme au mutualisme. C'est pour cette raison que la gamme d'interactions endophyte-hôte est considérée comme un continuum (ZABALGOGEAZCOA, 2008).

La nature de l'interaction entre hôte et endophyte change aussi selon le mode de transmission de ce dernier. En effet, elle sera une interaction mutualiste si la transmission est verticale par croissance dans les graines et sera plus hostile si le champignon est transmis horizontalement par les spores (SAIKKONEN *et al.*, 1998).

Certains endophytes sont des pathogènes latents, mais ne constituent pas une grande fraction des endophytes. Comme par exemple *Phomopsis citri* et *Fusicoccum aesculi* qui ont été isolée de *Citrus sp.*, ainsi que *Phomopsis viticola* isolé de *Vitis vinifera*. Cependant, ces endophytes pathogènes ont co-évolué avec leurs hôtes et ne sont donc pas très virulents, et ne causent aucun symptôme à leurs hôtes, mais si la plante est stressée ou bien la sénescence des feuilles commence, la sporulation de ces agents pathogènes commence (HYDE et SOYTONG, 2008).

D'autres endophytes ont été isolés à partir des tissus sains de plantes. Ces mêmes champignons sont retrouvés couramment sur des plantes sénescents. Ces endophytes sont considérés comme saprophytes latents, colonisant asymptomatiquement des espaces restreints tant que leurs hôtes se développent ; dès que ces derniers sont infectés ou décèdent, ces saprophytes se développent et se reproduisent (ZABALGOGEAZCOA, 2008).

A l'autre extrémité des interactions, il y a les endophytes mutualistes, qui procurent à l'hôte de nombreux avantages, tel la résistance aux stress biotiques provoqué par des herbivores ou des parasites, ou bien abiotiques comme la sécheresse, la salinité... (SAIKKONEN *et al.*, 1998).

En retour, l'hôte procure à l'endophyte une protection contre la dessiccation, des éléments nutritifs issus de la photosynthèse et lui permet aussi en cas de transmission verticale, le passage à la prochaine génération (ZABALGOGEAZCOA, 2008).

1.2.6. Champignons endophytes comme source de produits naturels bioactifs

Selon STROBEL (2002), les champignons endophytes, en plus d'être impliqués dans la relation hôte-endophyte, ils peuvent aussi avoir des applications en médecine, agriculture et en industrie, ceci grâce à la production de substances bioactives. Ces dernières seront le remède efficace à plusieurs problèmes : la résistance de plusieurs bactéries aux médicaments, l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que d'autres problèmes de santé et d'environnement.

Les mycoendophytes sont favorisés par leur capacité à produire le plus grand nombre de métabolites secondaires bioactifs de grande diversité structurale et qui sont : alcaloïdes (amines, amides...), peptides, stéroïdes, terpénoïdes, phénols, quinones, composés aliphatiques, flavonoïdes etc. (STROBEL *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006). Les alcaloïdes d'endophytes sont souvent concentrés dans les semences, ça va prévenir les graines de prédateurs et augmenter ainsi la dispersion des graines. (SAIKKONEN *et al.*, 2013).

Ces substances naturelles sont dotées d'un large spectre d'activité biologique, comprenant des composés antibiotiques, antifongiques, antiviraux, immunosuppresseurs, agents anticancéreux, antioxydants, etc. (STROBEL et DAISY, 2003 ; STROBEL *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2006 ; ZHANG *et al.*, 2006).

1.2.6.1. Champignons endophytes comme source de substances antibactériennes

Selon GUO et *al.* (2006), les antibiotiques sont définis comme des molécules organiques naturelles produites par des microorganismes. Ce sont les produits bioactifs les plus isolés à partir des endophytes. Certains exemples sont illustrés dans le tableau X.

Tableau X : Substances à activité antimicrobiennes issues de champignons endophytes (AOUARIB et LEMSARA, 2016).

Antibiotique	La bactérie ciblée	Références bibliographiques
Guanacastepenes, spécialement guanacastepene A	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	HELLWIG <i>et al.</i> , 2002 ; GIMENEZ <i>et al.</i> , 2007
periconicine A, et B	<i>Staphylococcus aureus</i>	HELLWIG <i>et al.</i> , 2002 ; GIMENEZ <i>et al.</i> , 2007
Altersetine (purifié à partir d' <i>Alternaria sp.</i>)	bactéries pathogènes à Gram positif	HELLWIG <i>et al.</i> , 2002 ; GIMENEZ <i>et al.</i> , 2007
phomopsichalasmine (nouvelle cytochalasine purifié à partir de <i>Phomopsis sp.</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella gallinarum</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	STROBEL <i>et al.</i> , 2004

1.2.6.2. Champignons endophytes comme source de substances antifongiques et antilevuriennes

L'interaction endophytes-plante fait que ces microorganismes protègent leurs hôtes des facteurs biotiques, notamment les infections par des levures et d'autres mycoendophytes pathogènes. Ceci est réalisable grâce à la production de nombreuses substances antifongiques et antilevuriennes dont :

- la sordine : le premier agent antifongique isolé par SIGG et STOLL en 1966 à partir de *Sordaria araneosa*. Cet agent appartient à la famille des Sordarines qui présentent une grande diversité de structure aux propriétés antifongiques (GIMENEZ *et al.*, 2007) ;
- la cryptocandine A : un peptide antimycosique isolé du champignon *Cryptosporiopsis quercina*, démontre une activité contre *Sclerotinia sclerotiorum* et *Botrytis cinerea* (STROBEL *et al.*, 2004).

1.2.6.3. Champignons endophytes comme source de substances antivirales

Comme on l'a déjà mentionné, l'émergence de résistance aux médicaments, de l'épidémie du VIH ainsi que des infections opportunistes associées à cette dernière, tels les cytomégalovirus et polyomavirus, rend le développement de nouveaux médicaments antiviraux une priorité. Deux inhibiteurs de la protéase du cytomégalovirus, l'acide cytonique A et l'acide cytonique B, ont été isolés à partir de la culture du champignon endophyte *Cytospora sp.* isolé du *Quercus sp.* Il y a aussi xanthoviridicatine E et xanthoviridicatine F produits par l'endophyte *Penicillium chrysogenum* et qui inhibent la réaction de clivage de l'intégrase du VIH (GUO *et al.*, 2000 ; SINGH *et al.*, 2003).

1.2.6.4. Champignons endophytes comme source de substances anticancéreuses

L'émergence des cancers de tout genre prenant quotidiennement d'innombrables vies dans le monde entier, a poussé les industries pharmaceutiques à la recherche de molécules anticancéreuses. Justement, dans le cadre de cette recherche, plusieurs études sont portées sur

des champignons endophytes, étant donné qu'ils présentent un réservoir de substances à effets thérapeutiques. Il s'est avéré que de nombreux mycoendophytes notamment ceux appartenant aux genres : *Taxomyces*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Alternaria*, colonisant principalement les plantes du genre *Taxus*, produisent le paclitaxel, communément appelé taxol, molécule anticancéreuse très utilisée en cancérologie depuis les années 90 (CANARD et SENEQUIER-CROZET, 2016). Il est aussi rapporté que les actinomycètes sont la source de substances antitumorales dont l'actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine et dannomycine (SACI, 2012).

1.2.6.5. Champignons endophytes comme source de substances antioxydantes

Les substances antioxydantes sont naturellement retrouvées dans les plantes médicinales, fruits et légumes frais mais aussi certains champignons endophytes. Parmi ces endophytes producteurs d'antioxydants, on cite *Aspergillus niger* produisant une aurasperone A et *Fusarium sp.* produisant deux cérébrosides. Ces substances ont une activité inhibitrice de la xanthine oxydase (AOUARIB et LEMSARA, 2016).

1.2.6.6. Champignons endophytes comme source d'enzymes

Les différents modes de vie adoptés par les champignons endophytes font d'eux des producteurs d'une grande variété de catalyseurs biologiques. En effet ces enzymes permettent aux endophytes d'infecter les plantes en brisant les différentes barrières de celles-ci, de contourner leurs défenses chimiques afin de pouvoir survivre dans les tissus vivants et de dégrader les cellules des tissus végétaux en sénescence et donc continuer de vivre comme des organismes saprotrophes (SUN *et al.*, 2011).

Parmi les enzymes extracellulaires produites par les endophytes, on cite : les amylases, cellulases, chitinases, chitosonases, laccases, lipases, pectinases et protéases. SURYANARAYANAN *et al.* (2012), rapportent à travers leur investigation dans les forêts tropicales des montagnes du Ghât en Inde, que les mycoendophytes foliaires isolés des arbres sont producteurs de ces biocatalyseurs (tableau XI).

La production de ces enzymes par des mycoendophytes isolés à partir de plantes tolérantes des conditions de vie extrêmes, fait d'elles d'excellents candidats pour des applications industrielles diverses (SURYANARAYANAN *et al.*, 2012).

Tableau XI : Enzymes extracellulaires produites par des endophytes isolés des arbres des forêts tropicales des montagnes du Ghât en Inde (SURYANARAYANAN *et al.*, 2012)

Enzyme produite	Nombre d'isolats fongiques endophytes testé	Pourcentage de résultats positifs (%)
Amylase	133	60
Cellulase	134	61
Laccase	134	65
Lipase	113	84
Pectinase	118	58
Pectate lyase	134	56
Protéase	134	59
Tyrosinase	134	38



Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologies (LABAB), de l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou.

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel biologique

Les souches fongiques étudiées ont été fournies par notre encadreur madame SALMI. Elles ont été isolés à partir des feuilles d'*Urtica dioïca* L.. Ces souches sont au nombre de dix et ont été cultivées sur milieux PDA (*potato dextrose agar*) (annexe 01) à 28°C pendant six jours puis conservées à 4°C. Le repiquage est réalisé à chaque utilisation.

2.1.2. Appareillage

- Bain-marie (MEMMERT) ;
- Autoclave (PBINTERNATIONAL) ;
- étuves à 25, 28 (MEMMERT) et 30°C (BINDER);
- spectrophotomètre (MEDLINE SCIENTIFIC LIMITED) ;
- balance (DENVER INSTRUMENT) ;
- balance de précision (SARTURIUS) ;
- pH mètre (METROHM) ;
- réfrigérateur (ESSALEM ELECTRONICS) ;
- lyophilisateur ;
- unité d'électrophorèse sur mini-cuves verticales (HOEFER SE 280, USA) ;
- agitateurs variés (magnétique chauffant et non chauffant, basculant, vortexeur) ;
- becs benzen.

2.1.3. Verrerie et autres matériel

- **Verrerie** : béchers, tubes à essai, pipettes graduée, fioles jaugées, éprouvettes, cristallisoirs, flacons, erlenmeyers, entonnoirs ;
- **autres matériel** : anse à boucle, micropipette, boîtes Pétri en plastiques, poire, Spatules, coupelles, compresses stériles, gants, bavettes,...

2.1.4. Produits et réactifs

- **Solvants** : acide dinitrosalicylique (DNSA), acide trichloroacétique (TCA), acide acétique, acide chlorhydrique (HCl) ;
- **sels et tampons** : chlorure de sodium (NaCl) monopotassium phosphate (KH_2PO_4), phosphate dissodique (Na_2HPO_4), sulfate de magnésium (MgSO_4), chlorure de potassium (KCl), nitrate de sodium (NaNO_3), hydroxyde de sodium (NaOH), iode (I), iodure de potassium (KI), glycine, TRIS ;
- **colorants et réactif spécifique** : réactif de Follin-Ciocalteu, Lugol, chlorure de mercure (HgCl_2), bleu de Coomassie R250, dodécyl sulfate de sodium (SDS), acrylamide, N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED), persulfate d'ammonium, 2-mercaptoethanol,...
- **autres produits** : gélatine, caséine, amidon, extrait de levure, extrait de viande, peptone, agar.

2.2. Méthodes

2.2.1. Recherche des activités amylolytique et protéolytique sur milieux solides

2.2.1.1. Inoculation des milieux

Deux différents milieux synthétiques, l'un comportant l'amidon, l'autre la gélatine qui sont respectivement les substrats des amylases et protéases (annexe 02), sont répartis dans des boîtes Pétri. Par la suite deux disques de biomasse fongique, appartenant à une même souche, sont prélevés soigneusement à l'aide d'une anse à boucle puis déposés dans les boîtes, la partie mycélienne en contact avec la gélose. L'incubation a lieu dans une étuve réglée à 28°C pendant six jours.

2.2.1.2. Mise en évidence

La mise en évidence de la production des amylases et des protéases est effectuée par l'addition de solution de lugol et de chlorure mercurique (annexe 03) et apparition de zones claires correspondant respectivement à l'hydrolyse de l'amidon par les amylases et de la gélatine par les protéases.

➤ Principe

La solution de lugol permet la coloration du milieu contenant de l'amidon en bleu violacé. Ceci est dû à la formation d'un complexe entre l'iode et l'amidon. De ce fait, l'activité amylolytique est révélée par l'apparition de zones claires autour de la biomasse fongique.

Quant à la solution de chlorure mercurique, elle réagit avec la gélatine pour former un précipité blanc. Donc l'activité protéolytique se traduit par des zones claires autour du mycélium.

2.2.2. Fermentation submergée

Les souches qui se sont révélées à activités amylolytique et protéolytique importantes, ont été sélectionnées pour la production d'enzymes par fermentation submergée. La composition des milieux de culture liquides est détaillée en annexe 04.

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu liquide. Chacun de ces erlenmeyers a été inoculé par quatre disques de champignons, puis incubés pendant six jours à 28°C.

2.2.3. Méthodes analytiques

Afin de caractériser les extraits enzymatiques, plusieurs dosages sont effectués sur ces extraits bruts obtenus par simple filtration des milieux de fermentation en utilisant un tissu de filtration puis des compresses stériles.

2.2.3.1. Dosage des protéines

La quantité de protéines contenue dans les extraits est estimée par une méthode colorimétrique qui est la méthode de LOWRY *et al.* (1951), avec l'albumine sérique bovine (BSA) comme étalon.

➤ Principe

Le réactif de Follin-Ciocalteu ou acide phospho-tungsto-molybdique est plus au moins réduit par les protéines. Le phosphomolybdate et le phosphotungstate réagissent avec les groupements phénoliques du tryptophane et de la tyrosine et, dans une moindre mesure, ceux de la cystéine et de l'histidine pour donner des complexes colorés en bleu dont l'intensité est

mesurée au spectrophotomètre à 750 nm. Un traitement préalable des solutions protéiques au cuivre en milieu basique agit sur les liaisons peptidiques et augmente la sensibilité du dosage.

➤ Protocole expérimentale

Ajouter 5ml de solution C à 1ml de chaque extrait dilué à 1/100. Après une incubation de 10 min à température ambiante, ajouter 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu et bien homogénéiser. Laisser reposer 30min à température ambiante, à l'obscurité avant de mesurer l'absorbance à 750 nm contre le blanc.

La densité optique (DO) lue au spectrophotomètre à 750 nm permet la détermination de la concentration en protéines des échantillons en se référant à une courbe d'étalonnage $DO = f(C)$ établie avec des solutions de BSA en concentrations connues (figure 08). Les différentes solutions ainsi que la gamme étalon utilisées pour le dosage des protéines sont données en annexe 05.

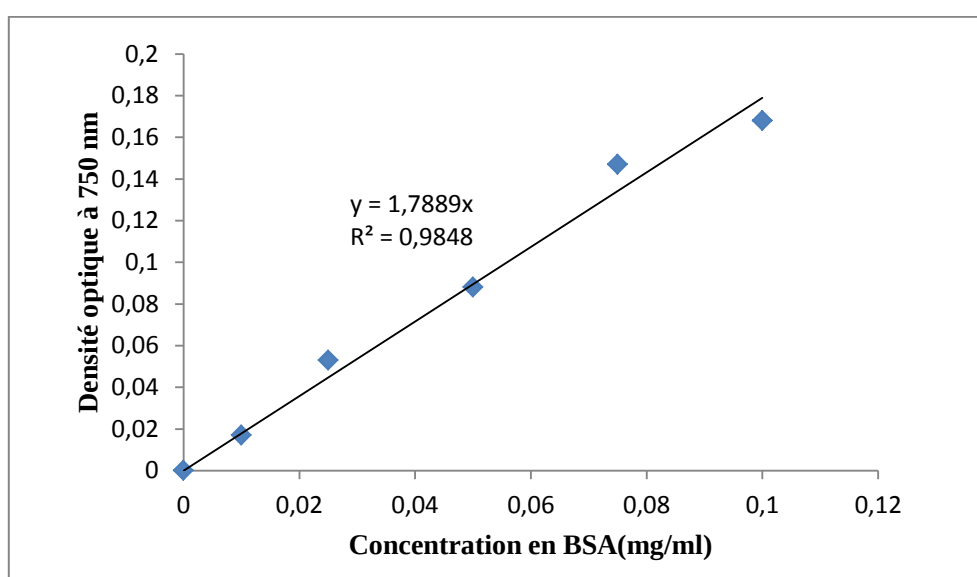


Figure 08 : Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al.* (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence ; R^2 : coefficient de corrélation.

2.2.3.2. Dosage de l'activité amylolytique

L'activité amylolytique a été estimée selon la méthode de BERNFELD (1955), encore appelée méthode de dosage des sucres réducteurs à l'acide dinitrosalicylique (DNSA).

➤ Principe

Le principe de cette méthode est basé sur les propriétés réductrices des sucres libérés lors de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon notamment le maltose. A chaud et en milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (ou acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque) qui joue le rôle d'oxydant, le maltose étant le réducteur. Cette réaction de réduction aboutit à la formation de l'acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrosalicylique qui un composé de couleur rouge (figure 09).

La réaction est colorimétrique et l'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la quantité du maltose libérée. L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale (U/ml), correspondant à une µmole du maltose libéré par minute et par millilitre d'extrait.

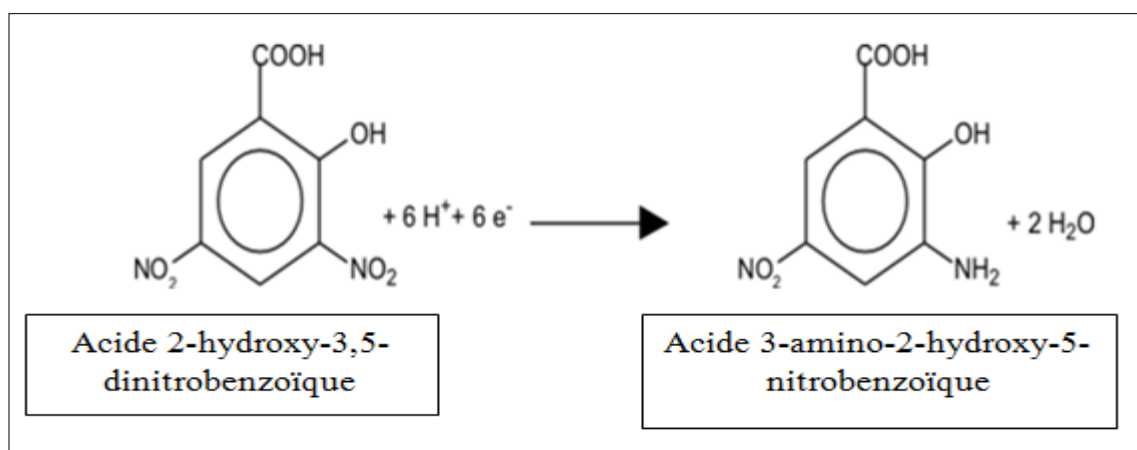


Figure 09: Réaction de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique.

➤ Protocole expérimentale

Un ml de chaque extrait enzymatique est ajouté à 1ml de la solution d'amidon à 1% préparé dans du tampon phosphate pH 5. Après agitation le mélange a été incubé à 40°C pendant 30 minutes avec un tube témoin représentant le blanc. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml de DNSA suivie d'un chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement dans un bain de glace, 10 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'absorbance est mesuré à 540 nm contre le blanc.

La concentration du maltose libéré lors de l'hydrolyse de l'amidon est déterminée à partir d'une courbe étalon DO = f (C) établie avec des concentrations du maltose (figure 10). La préparation de la gamme étalon, du réactif DNSA et du tampon phosphate est détaillée en annexe 06.

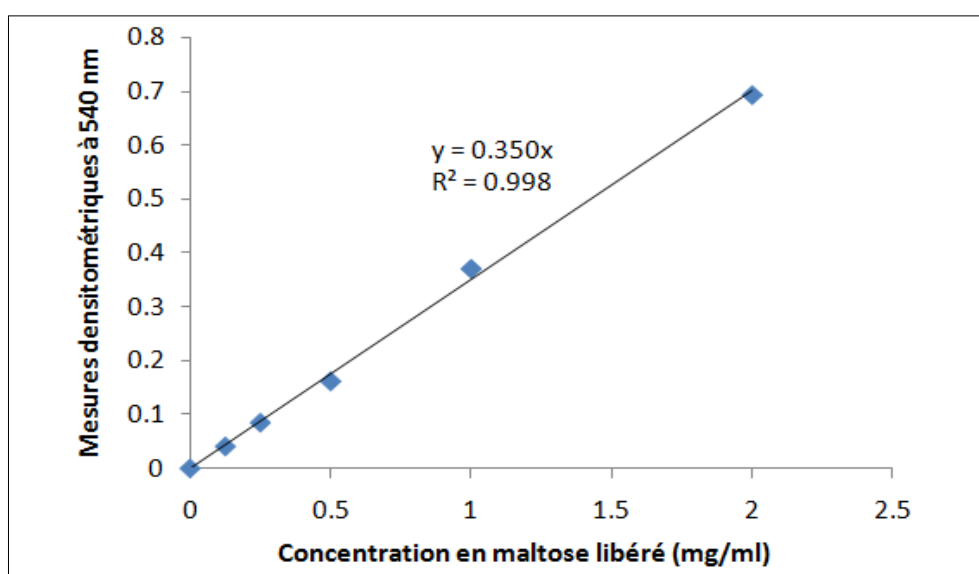


Figure 10 : Courbe étalon pour le dosage de l'activité amylolytique par la méthode de BERNFELD (1955). Le maltose est utilisé comme sucre réducteur de référence.

2.2.3.3. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été estimée selon la méthode modifiée d'ANSON, en utilisant la caséine comme substrat.

➤ Principe

Les protéases catalysent la réaction d'hydrolyse des protéines et polypeptides aboutissant à la formation de peptides simples et acides aminés libres. L'addition du TCA permet la précipitation des molécules non-hydrolysées et ainsi la récupération de la fraction soluble, comportant des composés azotés non-protéiques, par simple filtration. La tyrosine étant l'acide aminé présent dans toutes les protéines et se trouvant en solution, est utilisé comme référence pour le dosage colorimétrique de l'activité protéolytique par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier réagit avec les groupements phénoliques de la tyrosine et du tryptophane pour former un complexe bleu. L'activité enzymatique est exprimée par unité internationale (U/ml), correspondant à une μ mole de tyrosine libérée par minute et par millilitre d'extrait.

➤ Réaction enzymatique

Les mélanges réactionnels sont préparés par addition de 1 ml de chaque extrait enzymatique à 1 ml de solution de caséines à 1% dans du tampon phosphate pH 8. 1 ml de solution de substrat est pris comme témoin représentant le blanc. Après agitation et incubation à 40°C pendant 30min, la réaction est arrêtée par l'ajout de 6ml de TCA à 4%. Les mélanges sont laissés reposer 15 à 20 min à température ambiante ce qui entraîne la précipitation des macromolécules non-hydrolysées. Les précipités sont par la suite éliminés par simple filtration sur compresses stériles.

➤ Protocole de dosage

La concentration en composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat est dosée par la méthode modifiée d'ANSON. 1 ml de chaque filtrat est mélangé avec 2 ml de solution Na_2CO_3 à 15% dans du NaOH (0.1N). Après agitation et incubation pendant 15 min à température ambiante, 6.5 ml d'eau distillée sont ajoutés aux mélanges. Par la suite, on a ajouté 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1/10. Les mélanges ont été bien agités puis incubés au bain-marie à 30°C et à l'obscurité pendant 30 min.

L'absorbance des mélanges réactionnels de couleur bleue est mesurée à 750 nm contre le témoin. L'activité protéolytique est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 $\mu\text{g/ml}$ (figure 11). L'activité enzymatique se traduit par unité internationale (U/ml) qui est définie par la concentration en μ mole de tyrosine libérée par minute et par millilitre d'extrait à 40°C et à pH 8. La préparation des différentes solutions utilisées pour le dosage de l'activité protéolytique, ainsi que la gamme étalon est détaillée dans l'annexe 07.

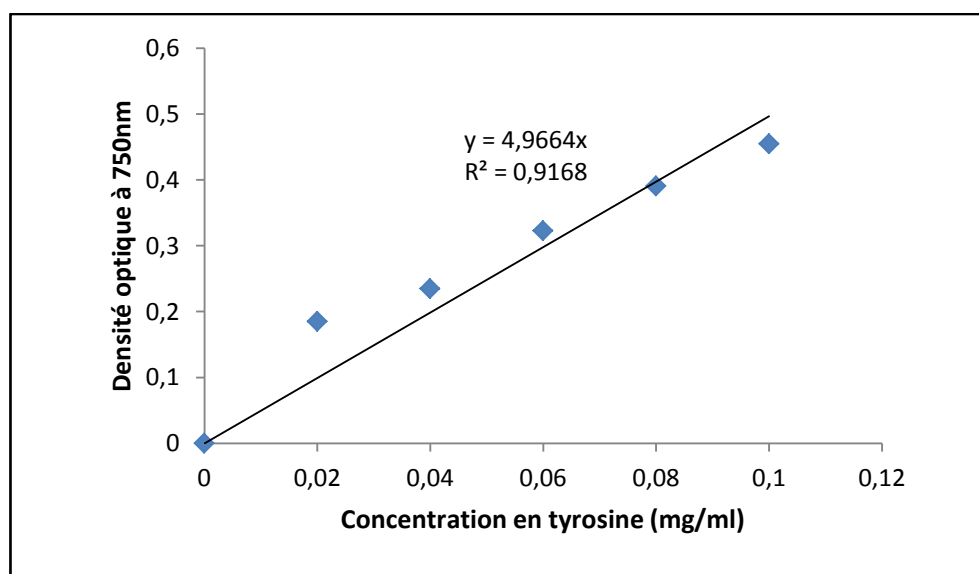


Figure 11: Courbe étalon pour le dosage de l'activité protéolytique par la méthode modifiée d'ANSON. La tyrosine est utilisée comme composé non-protéique soluble de référence.

2.2.4. Caractérisation biochimique des enzymes

Afin de caractériser les enzymes amylolytiques et protéolytiques produites par les souches fongiques, plusieurs tests sont utilisés notamment les tests de variation de pH et de température permettant la détermination des optima de la production et de l'activité enzymatique, ceci par dosage des activités.

2.2.4.1. Détermination du pH optimum de la production enzymatique

Le pH optimum de production enzymatique est déterminé par culture de champignons, à 28°C pendant six jours, dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu de fermentation liquide mais à pH différents.

Concernant la production d'amylases, les valeurs de pH sont comprises entre 4 et 6 (avec un intervalle de 0.5 unité). Quand à la production de protéases, la gamme de pH utilisée est comprise entre pH 6 et pH 10 (avec un intervalle d'une unité).

2.2.4.2. Détermination de la température optimale de production enzymatique

La température optimale de production enzymatique est déterminée par une culture de six jours des souches, chacune à son pH optimum, dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu de fermentation liquide. L'incubation est réalisée à différentes températures : 25, 28 et 30°C.

2.2.4.3. Détermination du pH optimum des activités enzymatiques

Le pH optimum de l'activité enzymatique est déterminé après fixation de la température de la réaction à 40°C et variation des pH des solutions de substrats dans une plage de pH allant de 3 à 8 pour les α -amylases et de 5 à 10 pour les protéases (avec un intervalle d'une unité).

Trois solutions tampon sont utilisées pour la préparation des solutions de substrats à différents pH (voir annexe 08) :

- Tampon glycine-HCl pour les pH 3 et 4 ;
- Tampon phosphate pour les pH 5, 6, 7 et 8 ;
- Tampon glycine-NaOH pour les pH 9 et 10.

2.2.4.4. Détermination de la température optimale des activités enzymatiques

Les températures optimales de l'activité enzymatique de chaque extrait sont recherchées après détermination de leurs pH optima. Les températures utilisées pour le déroulement des réactions, varient entre 30 et 80°C avec un intervalle de 10°C.

2.2. 5. Méthodes électrophorétiques

Les méthodes électrophorétiques permettent l'obtention de profils protéiques des différents extraits bruts (cas de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes « PAGE-SDS ») ainsi que l'estimation de la masse moléculaire des enzymes par technique de zymogramme.

2.2.5.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (PAGE-SDS)

➤ Principe

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une méthode d'analyse permettant le fractionnement des constituants d'un mélange protéique sous l'action d'un champ électrique. La séparation est basée uniquement sur le poids moléculaire des protéines.

Cette technique est réalisée dans des conditions dénaturantes grâce à la présence du SDS qui confère une charge négative pour toutes les molécules, éliminant ainsi la charge comme autre critère de séparation.

➤ Conditions générales de la conduite de l'électrophorèse

La méthode suivie est celle de LAEMMLI (1970) qui consiste en l'utilisation d'un système bi-phasique constitué de deux gels à porosité et à pH différents : un gel de concentration faiblement réticulé (4%) préparé en tampon tris-HCl (0.5M, pH 6.8) n'exerçant aucun effet de tamisage sur les protéines, et un gel de séparation à 12% préparé en tampon tris-HCl (1.5M pH 8.8) permettant la séparation des composés selon leur poids moléculaire.

La polymérisation des deux gels est assurée par l'incorporation du persulfate d'ammonium (agent de polymérisation) et du TEMED (accélérateur de polymérisation). Dès l'ajout du TEMED, les gels sont aussitôt coulés entre deux plaques, l'une en verre, l'autre en alumine. On commence toujours par le gel de séparation puis celui de concentration. Une fois ce dernier coulé, un peigne est immédiatement introduit pour assurer la formation des puits servant pour le dépôt des échantillons.

Après polymérisation, les deux plaques sont transférées dans un dispositif de migration et plongées dans un tampon d'électrode. A ce moment là, le peigne peut être retiré car les puits seraient bien formés (figure 12).

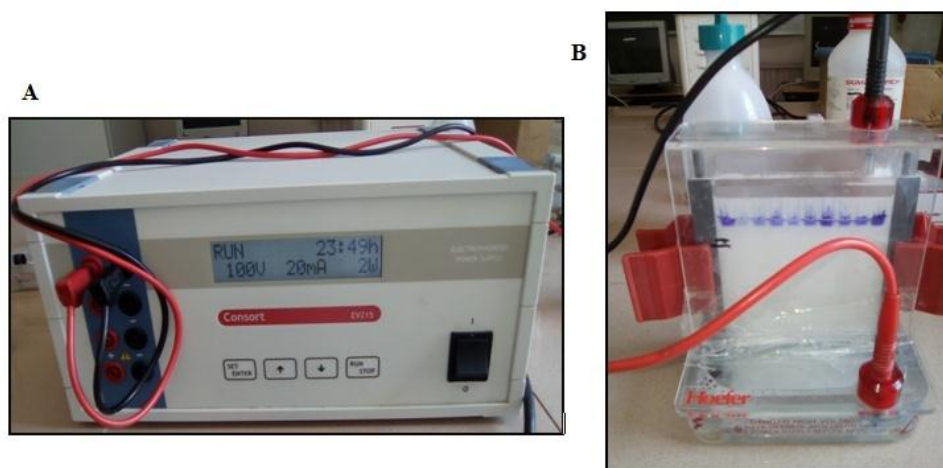


Figure 12: Photographie de l'unité d'électrophorèse sur mini-cuve HOEFER SE 280.
A: Générateur ; B: Cuve de migration.

➤ Préparation des échantillons

Les extraits enzymatiques bruts lyophilisés sont dissous dans un tampon d'échantillon composé du tampon tris-HCl à pH 6.8, SDS, 2-mercaptoéthanol et bleu de bromophénol (annexe 09). Après un chauffage à 100°C pendant 4 à 5 minutes, un refroidissement à l'eau de robinet est aussitôt effectué. Par la suite, 100 µl de glycérol à 50% sont rajoutés pour chaque solution d'échantillon.

➤ Dépôt des échantillons dans le gel et mise sous tension

Une quantité d'environ 20 µl de chaque solution d'échantillon est déposée dans chaque puits à l'aide d'une micro-seringue Hamilton. Le premier puits est réservé pour les marqueurs de tailles.

La migration des protéines est effectuée sous une tension continue de 200 V et un courant de 20 mA, à température ambiante. Elle est suivie grâce au bleu de bromophénol rajouté dans les solutions d'échantillons. Ainsi, la migration est arrêtée lorsque le colorant sort du gel d'acrylamide. Par la suite, le gel de concentration est écarté du gel de séparation sur lequel la révélation des bandes protéiques est effectuée.

➤ Révélation des bandes électrophorétiques

La révélation des bandes protéiques se fait par trois étapes :

- fixation dans une solution de TCA à 12% ;
- coloration par immersion du gel dans une solution de coloration au bleu de Coomassie R250 à 0.2% ;
- décoloration par immersion du gel dans un mélange d'eau, méthanol et TCA.

Chacune de ces étapes est effectuée sous agitation modérée à l'aide d'un agitateur basculant. La préparation des gels et des solutions utilisées en PAGE-SDS, est détaillée dans l'annexe 09.

➤ Détermination des poids moléculaires des protéines

L'existence d'une relation linéaire dans la zone de fractionnement entre le Log (PM) et la distance de migration permet la détermination des poids moléculaires des protéines. Pour cela, les marqueurs de tailles qui sont des protéines de PM connus, à savoir, l'albumine sérique bovine (67 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), le chymotrypsinogène (23kDa) la β-

lactoglobuline (18 kDa) et l' α -lactalbumine (14 kDa), migrent dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une courbe de calibration du gel de séparation, établie en utilisant ces protéines, est tracée (figure 12). Les PM des différentes entités protéiques sont déterminés graphiquement sur cette courbe (PM)= f (distance).

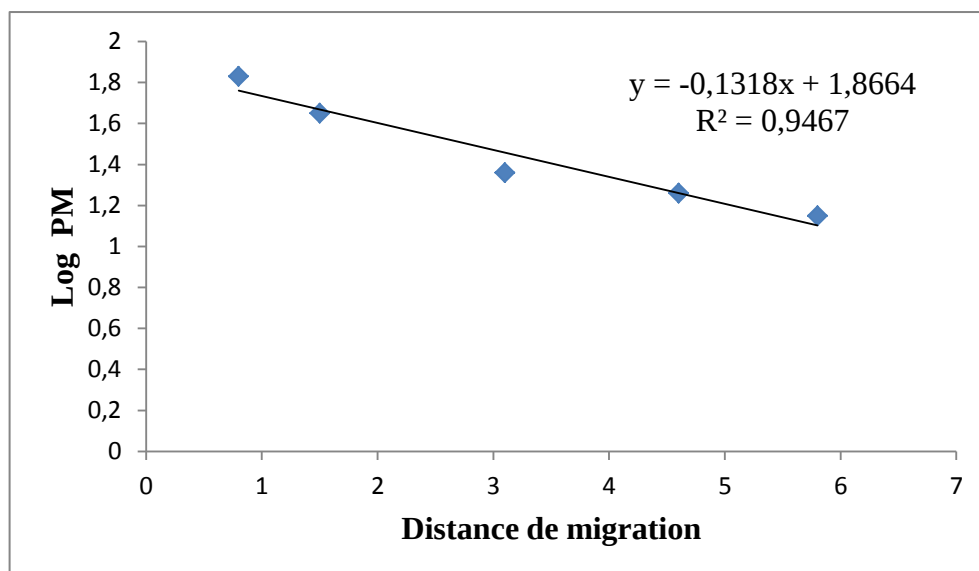


Figure 13: Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS en utilisant un standard protéique composé de BSA (67 kDa), ovalbumine (45 kDa), chymotrypsinogène (23kDa), β -lactoglobuline (18 kDa) et α -lactalbumine (14 kDa).

2.2. 5.2. Zymogramme

➤ Principe

Cette technique électrophorétique est une variante de la PAGE-SDS qui, grâce à l'incorporation d'un substrat approprié dans la préparation du gel et l'utilisation d'une coloration spécifique, permet à la fois une mise en évidence de l'activité enzymatique directement sur gel et une estimation de la masse moléculaire de l'enzyme par comparaison au profil obtenu par la PAGE-SDS.

➤ Mode opératoire

La démarche suivie répond aux mêmes normes que celles de la PAGE-SDS à l'exception de quelques modifications. Pour la préparation des échantillons, elle se fait sans ajout d'agent réducteur (2-mercaptoéthanol) ou traitement thermique. Lors de la préparation du gel de séparation, 5ml de solution de substrat approprié (amidon ou caséines bovines) à 1%, sont ajoutés.

Après migration dans les mêmes conditions expérimentales, chaque gel (un correspondant au zymogramme des amylases, l'autre à celui des protéases) est immergé dans une solution de TCA à 12%. Par la suite, trois lavages de 20 min sont effectués par une solution de triton X-100 à 2.5%. Les gels traités sont incubés chacun à 40°C pendant 16 à 18h, en présence de tampons appropriés pour chaque extrait (chacun correspondant au pH optimum d'activité).

À la fin de l'incubation, les gels sont immergés dans des solutions de coloration sous agitation modérée. Concernant les amylases, la coloration est effectuée au lugol, suivie d'un lavage à l'eau distillée. Quant aux protéases, une coloration est réalisée au bleu de Coomassie R250 à 0.2%, suivie d'une décoloration identique à celle de la PAGE-SDS.



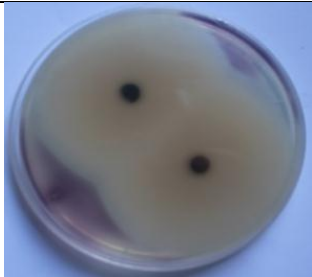
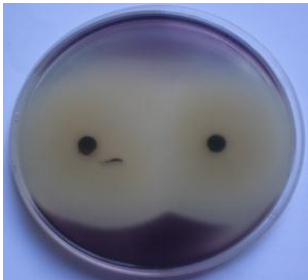
Résultats et discussion

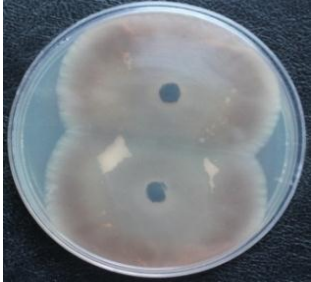
3. Résultats et discussion

3.1. Mise en évidence des activités enzymatiques

D'après les résultats obtenus et présentés dans le tableau XII, la plupart des souches étudiées présentent une activité amylolytique qui se traduit par apparition d'importantes zones claires autour des biomasses fongiques correspondant à l'hydrolyse d'amidon. Seules trois souches parmi les dix utilisées ($P_1F_1C_4$, $P_6F_8C_2$ et $P_7F_6C_1$) présentent à peine des zones d'hydrolyse d'amidon.

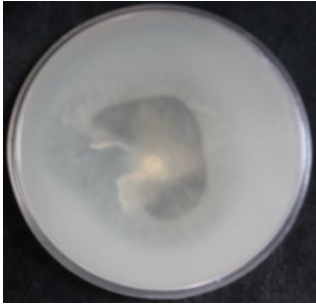
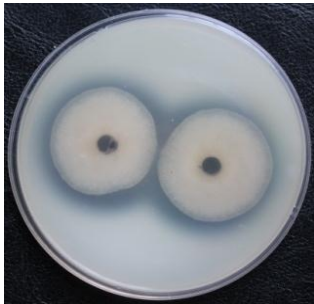
Tableau XII : Résultats du test de mise en évidence de l'activité amylolytique des cultures sur gélose à l'amidon.

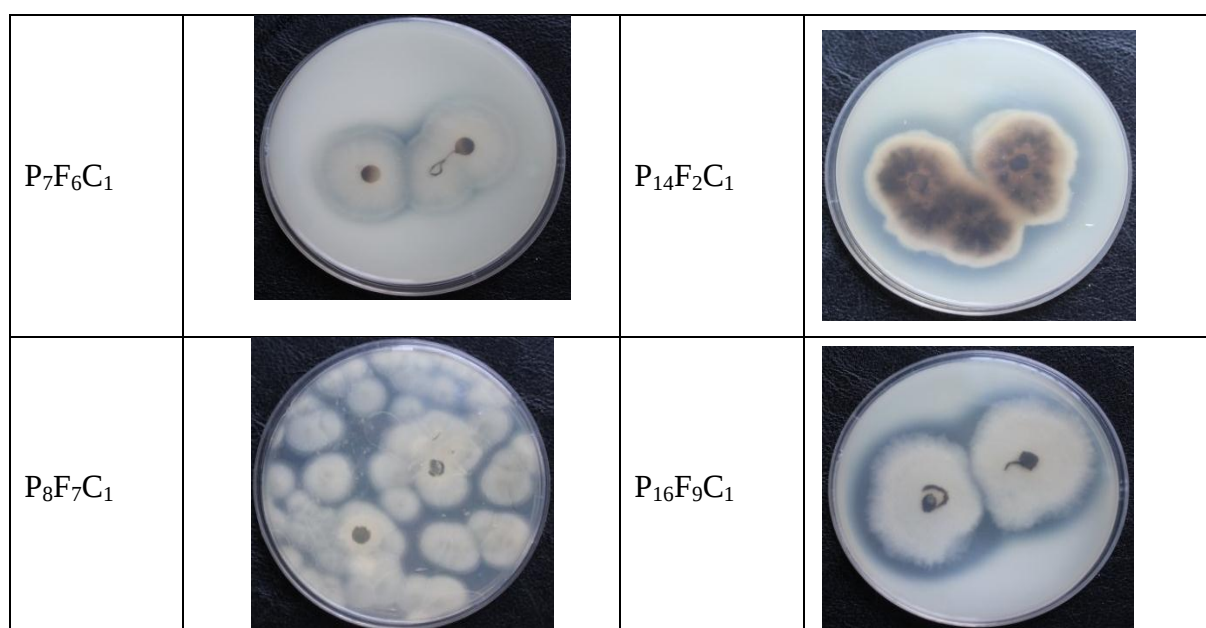
Code de la souche	Activité amylolytique	Code de la souche	Activité amylolytique
$P_1F_1C_4$		$P_8F_{10}C_1$	
$P_6F_7C_1$		$P_{12}F_9C_1$	
$P_6F_8C_2$		$P_{13}F_2C_1$	
$P_7F_6C_1$		$P_{14}F_2C_1$	

P ₈ F ₇ C ₁		P ₁₆ F ₉ C ₁	
--	---	---	---

Quant au test de mise en évidence de l'activité protéolytique, il révèle que la plupart des souches produisent des protéases qui hydrolysent la gélatine donc présentent des halos clairs, sauf les souches : P₆F₈C₂, P₆F₇C₁ et P₇F₆C₁ qui ne présente aucune zone d'hydrolyse (Tableau XIII).

Tableau XIII : Résultats du test de mise en évidence de l'activité protéolytique des cultures sur gélose à la gélatine.

Code de la souche	Activité protéolytique	Code de la souche	Activité protéolytique
P ₁ F ₁ C ₄		P ₈ F ₁₀ C ₁	
P ₆ F ₇ C ₁		P ₁₂ F ₉ C ₁	
P ₆ F ₈ C ₂		P ₁₃ F ₂ C ₁	



L'aspect des zones d'hydrolyse d'amidon et de gélatine varie d'une souche à une autre suivant la forme des biomasses fongiques (lobée, ronde, ovale,...). Leurs dimensions diffèrent en fonction de l'intensité de l'hydrolyse enzymatique des substrats.

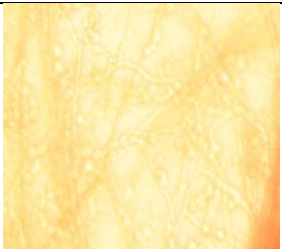
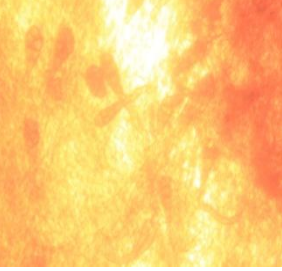
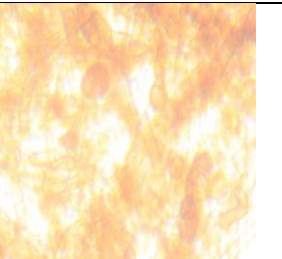
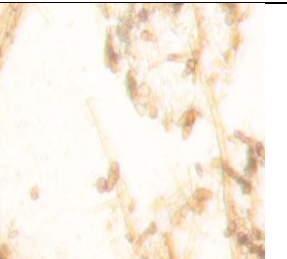
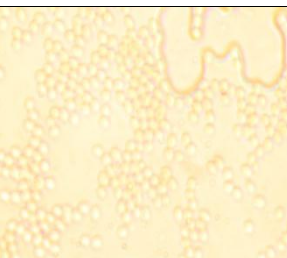
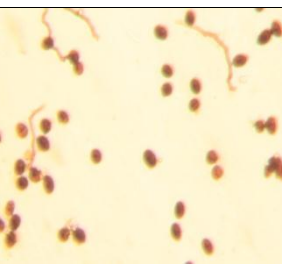
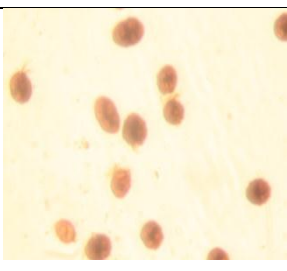
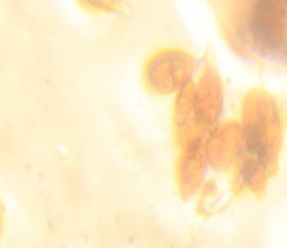
Il est tout de même à noter que pour les souches répondant positivement aux tests de mise en évidence des deux activités enzymatiques, les zones d'hydrolyse d'amidon sont plus importantes que celles d'hydrolyse de la gélatine, ce qui suggère que l'activité amylolytique est plus importante que l'activité protéolytique.

La sélection des souches est effectuée en fonction des dimensions de zones d'hydrolyse les plus importantes, et en tenant compte des souches les plus productrices des deux enzymes. Les souches retenues pour la production d'enzymes par fermentation submergée sont les suivantes : P₈F₁₀C₁, P₈F₇C₁, P₁₂F₉C₁, P₁₃F₂C₁, P₁₄F₂C₁ et P₁₆F₉C₁. Elles sont toutes productrices des deux enzymes à l'exception de P₈F₁₀C₁, productrice de protéases uniquement.

L'aspect macroscopique, microscopique à différents grossissements ainsi que l'identification des souches sélectionnées faite par notre encadreur M^{me} SALMI et confirmée par M^{me} SMAIL-SADOUNEN, sont représentés dans le tableau XIV.

Les six souches retenues pour la production enzymatique correspondent respectivement à : *Alternaria sp1.*, souche non déterminée, *Alternaria sp2.*, *Trichoderma sp.*, *Epicocum sp.* et *Ulocladium sp.*. Ces résultats concordent avec ceux de AOUARIB et LAMSARA (2016), portant sur l'activité antimicrobienne et enzymatique des champignons endophytes, ainsi que les travaux de SALEEM et IBRAHIM (2014), qui ont montré que les souches citées ci-dessus sont toutes productrices d'amylases.

Tableau XIV : Aspect macroscopique et microscopique des souches à activité amylolytique et protéolytique.

Nom de la souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	
		G 100	G 400
Souche non identifiée (P ₈ F ₇ C ₁)			
<i>Alternaria</i> sp1. (P ₈ F ₁₀ C ₁)			
<i>Alternaria</i> sp2. (P ₁₂ F ₉ C ₁)			
<i>Trichoderma</i> sp. (P ₁₃ F ₂ C ₁)			
<i>Epicocum</i> sp. (P ₁₄ F ₂ C ₁)			
<i>Ulocladium</i> sp. (P ₁₆ F ₉ C ₁)			

La détermination des activités enzymatiques des extraits des souches retenues montre que les valeurs des activités amylolytiques sont supérieures à celles des activités protéolytiques. L'activité amylolytique la plus importante est celle obtenues par *Epicocum sp.* ($170 \cdot 10^{-3}$ U), suivie de *Alternaria sp2.* et *ulocladium sp.*, qui présente des activités relativement similaires ($95 \cdot 10^{-3}$ U et $98 \cdot 10^{-3}$ U respectivement). Les plus faibles activités sont celles de *Trichoderma sp.* ($65 \cdot 10^{-3}$ U) et la souche non déterminée ($59 \cdot 10^{-3}$ U) (tableau XV).

Tableau XV: Résultats du dosage de l'activité amylolytique des différents extraits.

Extraits	Activité amylolytique (UI)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité spécifique « AS » (UI.mg ⁻¹)
Extrait d'une souche non déterminée	$59 \cdot 10^{-3}$	13.8	$4.3 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Alternaria sp2</i>	$95 \cdot 10^{-3}$	5.2	$18.2 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Tichoderma sp.</i>	$65 \cdot 10^{-3}$	11.6	$5.6 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Epicocum sp.</i>	$170 \cdot 10^{-3}$	8.7	$19.6 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Ulocladium sp.</i>	$98 \cdot 10^{-3}$	8.1	$12.1 \cdot 10^{-3}$

Quant à l'activité protéolytique, elle est dominée par la souche non déterminée ($15.9 \cdot 10^{-3}$ U), suivie de tout près par *Alternaria sp1.* ($12.8 \cdot 10^{-3}$ U). Les quatre souches restantes présentent des activités relativement proches, allant de $5.9 \cdot 10^{-3}$ à $7.9 \cdot 10^{-3}$ U (tableau XVI).

Tableau XVI : Résultats du dosage de l'activité protéolytique des différents extraits.

Extraits	Activité protéolytique (UI)	Concentration en protéines (mg/ml)	Activité spécifique « AS » (UI.mg ⁻¹)
Extrait d'une souche non déterminée	$15.9 \cdot 10^{-3}$	14.4	$1.1 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Alternaria sp.1</i>	$12.8 \cdot 10^{-3}$	8.2	$1.6 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Alternaria sp.2</i>	$5.9 \cdot 10^{-3}$	8.6	$0.7 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Tichoderma sp.</i>	$7.3 \cdot 10^{-3}$	7.2	$1 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Epicocum sp.</i>	$6 \cdot 10^{-3}$	12.3	$0.5 \cdot 10^{-3}$
Extrait de <i>Ulocladium sp.</i>	$7.9 \cdot 10^{-3}$	9.2	$0.9 \cdot 10^{-3}$

3.2. Caractérisation biochimique

3.2.1. Effet du pH et de la température sur la production enzymatique

3.2.1.1. Détermination du pH optimal de production enzymatique

Parmi les paramètres physico-chimiques du milieu de culture, le pH joue un rôle important sur la croissance, le développement et la physiologie des champignons (LAGZOULI *et al.*, 2007). La plupart des champignons se développent normalement à pH compris entre 3 et 8 (BOIRON, 1996). Outre la croissance, le pH joue un rôle primordial dans

la production de métabolites. En effet, les variations de pH sont indicatrices de changements dans les activités métaboliques du microorganisme (BELLON-MAUREL *et al.*, 2003).

Selon BANERJEE *et al.* (2016), le pH du milieu joue un rôle sur la production d'enzymes en affectant leur biosynthèse par la stimulation de processus enzymatiques et le transport de composants à travers la membrane cellulaire. La baisse des activités enzymatiques au-delà des pH optima de production est due certainement à l'action des protéases libérées dans le milieu lors de la lyse du mycélium de la moisissure en phase de déclin et aussi à l'apparition des inhibiteurs (BOIRON, 1996).

➤ pH optimal de production d'amylases

L'évolution de l'activité amylolytique en fonction du pH de production de l' α -amylase, par les cinq souches retenues, est représentée dans la figure 14. On remarque que les amylases sont produites par toutes les souches tout au long de la plage de pH allant de 4 à 6. Néanmoins, les valeurs d'activités sont maximales à un pH donné qui représente l'optimum de production enzymatique. Il est à noter que le pH optimal de production diffère d'une souche à une autre et que de part et d'autre cette valeur optimale, les activités amylolytiques diminuent considérablement.

On note une activité maximale, représentant l'optimum de production d'amylase, à pH 4.5 pour trois souches : *Epicocum sp.* ($173 \cdot 10^{-3}$ U), *Alternaria sp2.* ($117 \cdot 10^{-3}$ U) et *Trichoderma sp.* ($59 \cdot 10^{-3}$ U). Quant à la souche non déterminée, elle présente un maximum d'activité à pH 4 ($136 \cdot 10^{-3}$ U). Alors que *Ulocladium sp.* ($145 \cdot 10^{-3}$ U), présente un pH optimum de production de l'ordre de 6. A cette même valeur, on constate que les souches ayant un pH optimum de 4.5, présentent aussi une activité amylolytique importante. Dans le cas de *Epicocum sp.*, elle atteint une activité similaire à celle obtenue au pH 4.5 ($170 \cdot 10^{-3}$ U). Ceci peut être expliqué par la production de deux types d' α -amylases ce qui corrobore les résultats de SHARMA et SATYANARAYANA (2013) qui ont démontré l'existence d' α -amylases acides produites à pH compris entre 3 et 5.5 et des amylases neutres produites à pH de 6 et 8.

Ces résultats, sont presque similaires aux travaux de ZOUBIRI (2012) sur les α -amylases produites par *Alternaria sp.* et *Rhizopus sp2.* qui ont un maximum d'activité au pH 4 à 4.5 ; et ceux rapportés par FERHAT HAMIDA et LAKLOUKA (2015) pour les amylases levuriennes qui ont un optimum de 4.5. Il a aussi été rapporté que le pH 6 est le pH optimum pour la plupart des amylases fongiques (DALI et HAMAME, 2016).

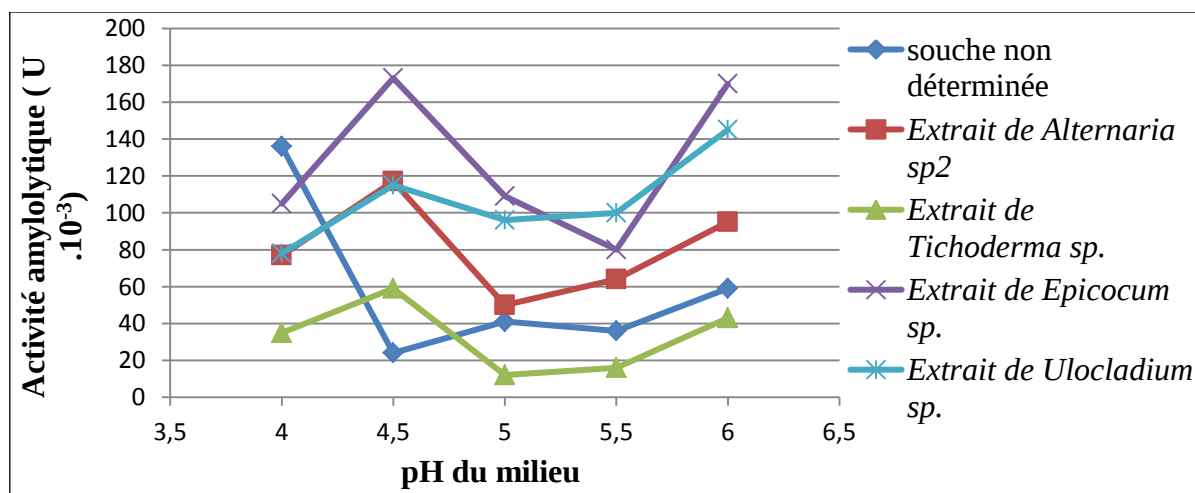


Figure 14: Effet du pH du milieu sur la production d'amylases par les différentes souches retenues.

➤ pH optimal de production de protéases

L'effet du pH sur l'activité protéolytique donne un pH optimum de production de l'ordre de 6 pour la souche non déterminée et *Alternaria sp2.*, un pH optimum de 8 pour *Alternaria sp1.* et *Epicocum sp.* et un pH optimum de 10 pour *Ulocladium sp.* et *Trichoderma sp.* (Figure 15).

La même figure indique que les deux souches *Epicocum sp.* et *Ulocladium sp.*, présentent également des activités protéolytiques à pH 6 et 10 et à pH 7 respectivement mais moins importantes que les précédentes. Ces souches produisent donc, au moins deux protéases; ce qui corrobore les études de DENDOUGA (2006) sur l'isolement et l'identification des moisissures productrices de protéases et l'extraction et l'étude des propriétés de ces dernières.

Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux concernant le genre *Aspergillus* qui représente le genre fongique le plus étudié, notamment ceux de CHANDRASEKARAN *et al.* (2015) qui rapportent que la souche *Aspergillus flavus* présente un pH optimum de production de 8 et que *Aspergillus niger* présente un pH optimum de 7. Par ailleurs, les résultats des travaux de KALPANA DEVI *et al.* (2008) et ceux de OLUDUMILA *et al.* (2015) montrent que *Aspergillus niger* produit également une protéase alcaline à pH 10.

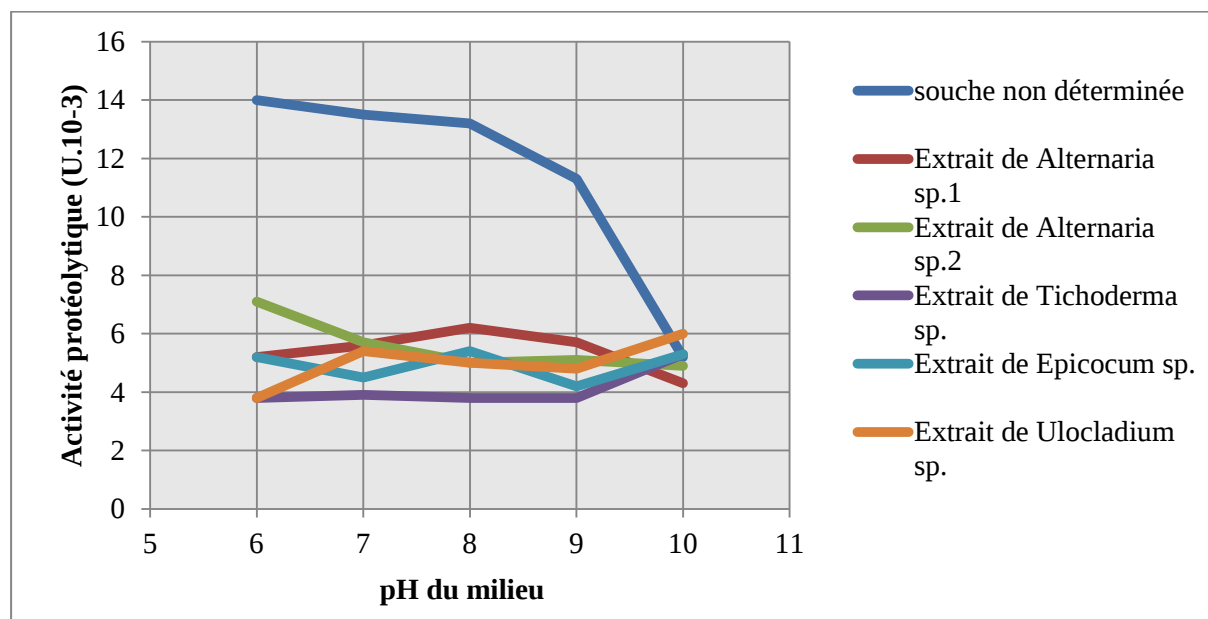


Figure 15 : Effet du pH du milieu sur la production de protéases par les différentes souches retenues.

3.2.1.2. Effet de la température sur la production enzymatique

La température est un paramètre physico-chimique critique pour la croissance des champignons, ainsi que pour la production de métabolites y compris les enzymes. Les différentes souches ont été cultivées chacune à son pH optimal de production enzymatique et incubées à trois différentes températures, voir 25, 28 et 30°C, afin de déterminer leur température de production optimale.

➤ Température optimale de production d'amylases

L'évolution de l'activité amylolytique en fonction des températures d'incubation est la même pour toutes les souches (figure 16). En effet, toutes les souches présentent une valeur maximale à 28°C qui est donc l'optimum de production et diminue considérablement de part et d'autre cet optimum. Ce résultat est le même que celui rapporté par KHAN et YADAV

(2011) pour *Aspergillus niger* et proche des résultats de TASKIN et ERDAL (2010), qui montrent que la température optimale pour la production maximale d' α -amylase par *Penicillium expansum* ne dépasse pas 30 °C.

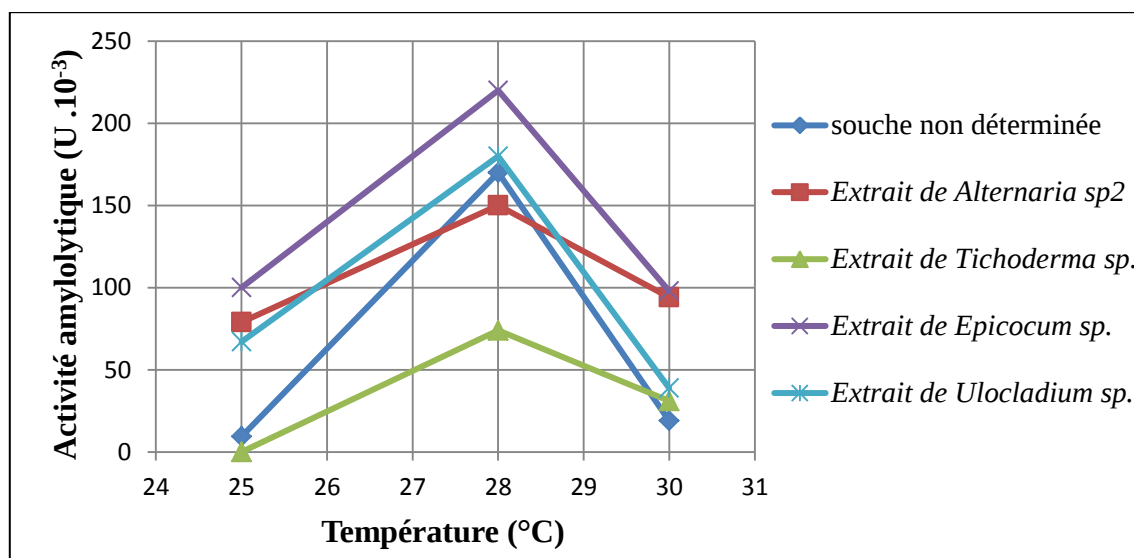


Figure 16 : Effet de la température sur la production amylolytique des souches sélectionnées, chacune à son pH optimal d'activité.

➤ Température optimale de production de protéases

En ce qui concerne l'effet de la température sur la production des enzymes protéolytiques, la température optimale est de 25°C pour *Alternaria sp1.*, de 28°C pour la souche non déterminée, *Alternaria sp2.* et *Ulocladium sp.* et de 30°C pour *Trichoderma sp.* et *Epicocum sp.*. Par ailleurs, les variations d'activité protéolytiques, aux températures choisies, ne sont pas significatives (figure 17). CHANDRASEKARAN *et al.* (2015) et BENSMAIL (2012) rapportent une température optimale de 30°C pour *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* respectivement.

Les enzymes protéolytiques, produites par presque toutes les souches, présentent des activités maximales relativement proches : $4.4 \cdot 10^{-3}$ U pour *Trichoderma sp.*, $4.8 \cdot 10^{-3}$ U pour *Ulocladium sp.*, $5 \cdot 10^{-3}$ U pour *Epicocum sp.*, $5.6 \cdot 10^{-3}$ U pour *Alternaria sp1.* et $6.7 \cdot 10^{-3}$ U pour *Alternaria sp2.* ; à l'exception de la souche non déterminée qui présente une activité maximale plus ou moins importante ($15 \cdot 10^{-3}$ U).

Les variations de températures semblent affecter la production enzymatique, chose constatée par la diminution des valeurs d'activités de part et d'autre les valeurs optimales. En effet, la baisse de température diminue l'activité car elle ne convient pas à la croissance des microorganismes, ce qui réduit la production d'enzyme (DALAL BEDAN *et al.*, 2014) ; tandis que l'élévation de celle-ci au-delà de 40°C conduit à la dénaturation thermique des enzymes impliquées dans les voies métaboliques de biosynthèse enzymatique (BANERJEE *et al.*, 2016).

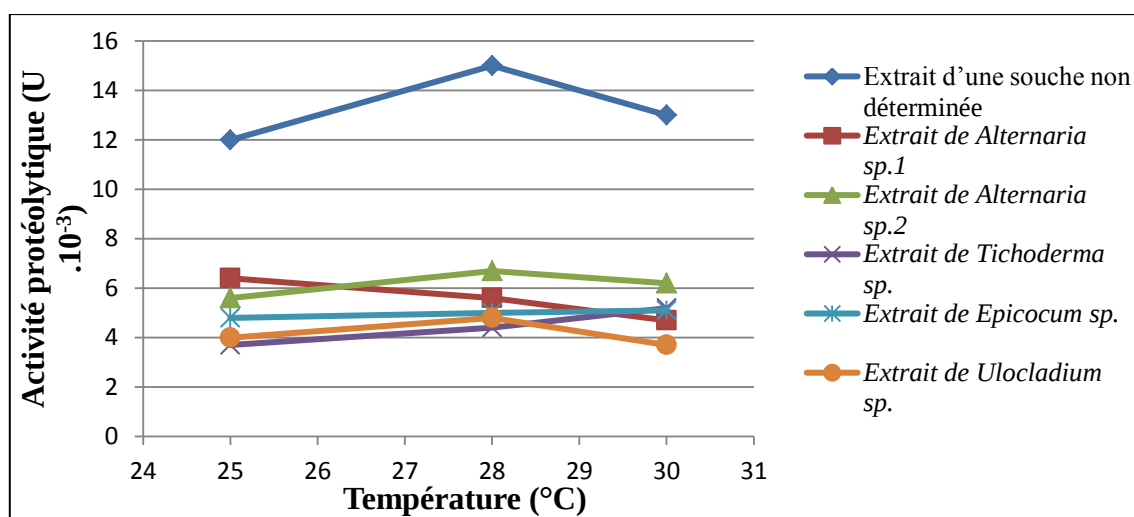


Figure 17 : Effet de la température sur la production protéolytique des souches sélectionnées, chacune à son pH optimal d'activité.

3.2.2. Effet du pH et de la température sur la réaction enzymatique

L'étude de l'effet du pH et de la température sur les réactions enzymatiques (amylolytique et protéolytique) est effectuée après optimisation de ces mêmes facteurs pour la production enzymatique pour chaque souche fongique.

3.2.2.1. Effet du pH sur la réaction enzymatique

➤ pH optimum de la réaction amylolytique

L'effet des variations du pH de la réaction sur les activités amylolytiques des différentes souches sélectionnées est représenté dans les figures 18. En effet, les activités amylolytiques varient presque de la même manière le long de l'intervalle de pH allant de 3 à 8. Elles présentent toutes des valeurs maximales à pH 5 allant de 75 .10⁻³ U pour *Trichoderma* sp. à 220 .10⁻³ U pour *Epicocum* sp. en passant par des valeurs relativement proches pour *Alternaria* sp2. (150 .10⁻³ U), la souche non déterminée (170 .10⁻³ U) et *Ulocladium* sp. (180 .10⁻³ U). Concernant la souche non déterminée et *Alternaria* sp2., elle présentent également des activités à pH 8 mais moins importantes que celles préalablement enregistrées à pH 5.

Ce résultat est proche de celui rapporté par TRIBST et CRISTIANINI (2012) pour les α -amylases fongiques qui ont un pH optimal de 5.8, et se situ dans la plage de pH allant de 4.5 à 6.6 déterminé par NGUYEN *et al.* (2002) pour les champignons thermophiles.

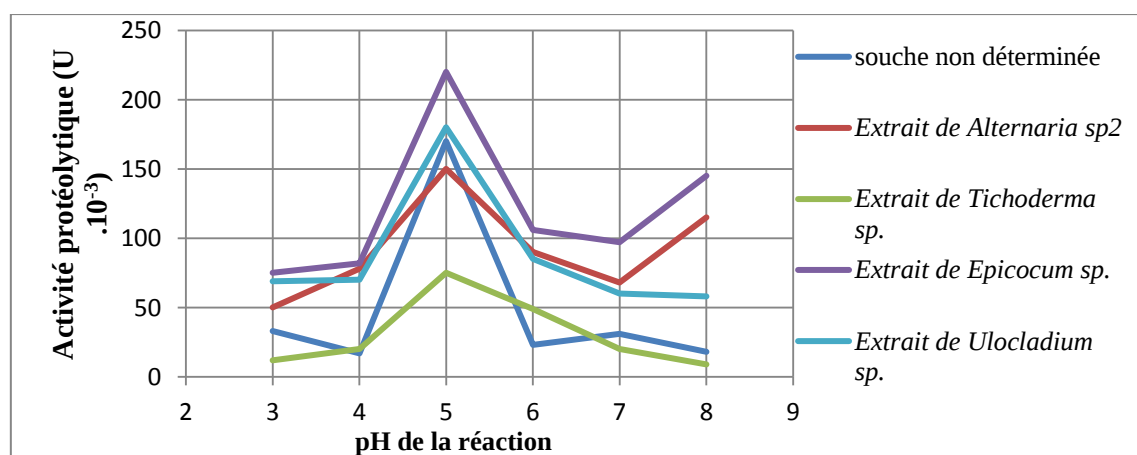


Figure 18 : Effet du pH de la réaction sur l'activité amylolytique des différentes souches retenues.

➤ pH optimum de la réaction protéolytique

Concernant l'activité protéolytique, on note pour chaque souche des valeurs relativement proches le long de la plage de pH choisie (figure 19). Cependant, trois différentes valeurs de pH optimum de la réaction, sont déterminées pour les six souches retenues. En effet, la souche non déterminée et *Ulocladium sp.* présentent un pH optimum de réaction de l'ordre de 5, *Alternaria sp1.* présente un maximum d'activité ($8.3 \cdot 10^{-3}U$) à pH 6 et les souches restantes, *Alternaria sp2.*, *Trichoderma sp.* et *Epicocum sp.*, présentent des activités maximales ($10.2 \cdot 10^{-3}U$, $6.6 \cdot 10^{-3}U$ et $7.1 \cdot 10^{-3}U$ respectivement) lorsque le pH de la réaction est fixé à 10.

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par BOUCHERIT (2011) pour la protéase acide d'une moisissure isolée à partir de sebkha, ainsi que OSENI (2011) qui a travaillé sur *Aspergillus niger*.

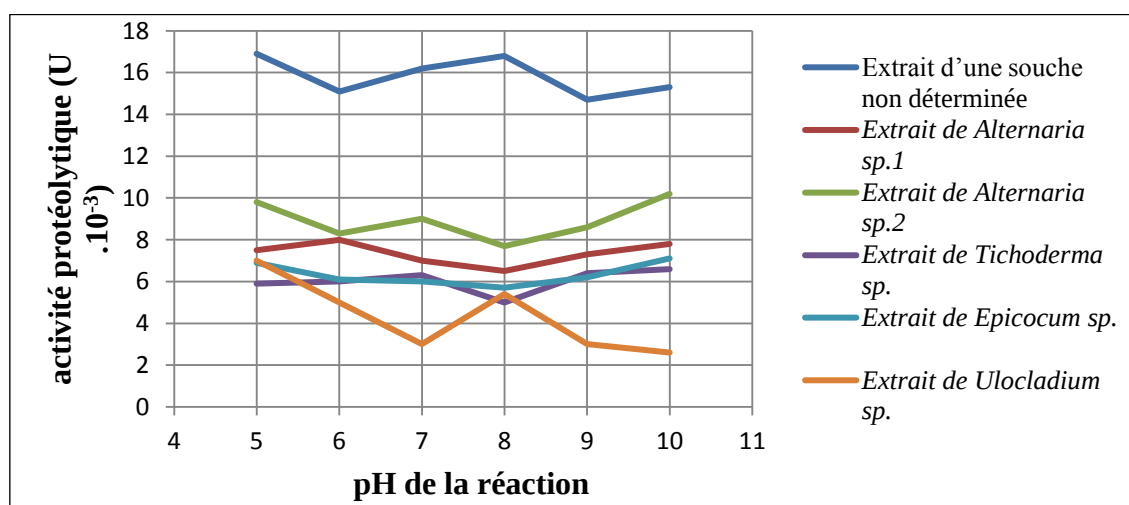


Figure 19 : Effet du pH de la réaction sur l'activité protéolytique des différentes souches retenues

Les différences des pH optima de la réaction enzymatique (qu'elle soit amylolytique ou protéolytique), existants entre les différentes souches, sont dues probablement à une variation dans la composition en acides aminés et donc de la conformation structurale du site actif. Ce dernier diffère d'une souche à une autre et développe un état de protonation spécifique pour une activité optimale donnée (DALI et HAMAME, 2016). Ce qui suggère qu'une enzyme ne peut avoir qu'un seul pH optimal.

Quant aux variations du pH autour du pH optimal, elles entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements composants le site actif de l'enzyme. Des modifications plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (LOUDJANI et BELMERABET, 2016).

3.2.2.2. Effet de la température sur la réaction enzymatique

➤ Température optimale de la réaction amylolytique

L'évolution de l'activité amylolytique en fonction des températures de réaction, allant de 40 à 80 °C présente un maximum d'activité amylolytique à 40°C pour toutes les souches (figure 20). Cette température se situe dans l'intervalle 30-45°C, déterminé par SINDHU *et al.* (2009) indiquant qu'une meilleure production d'enzymes amylolytiques par les micromycètes est obtenue dans cette gamme de température. Cependant une autre activité

significative est enregistrée à 60°C pour *Epicocum sp.* ($145 \cdot 10^{-3}$ U), *Alternaria sp2.* ($105 \cdot 10^{-3}$ U) et *Ulocladium sp.* ($81 \cdot 10^{-3}$ U). Ces résultats sont donc en accords avec ceux trouvés pour l'effet du pH et qui suggèrent que ces souches produisent plus d'une seule enzyme.

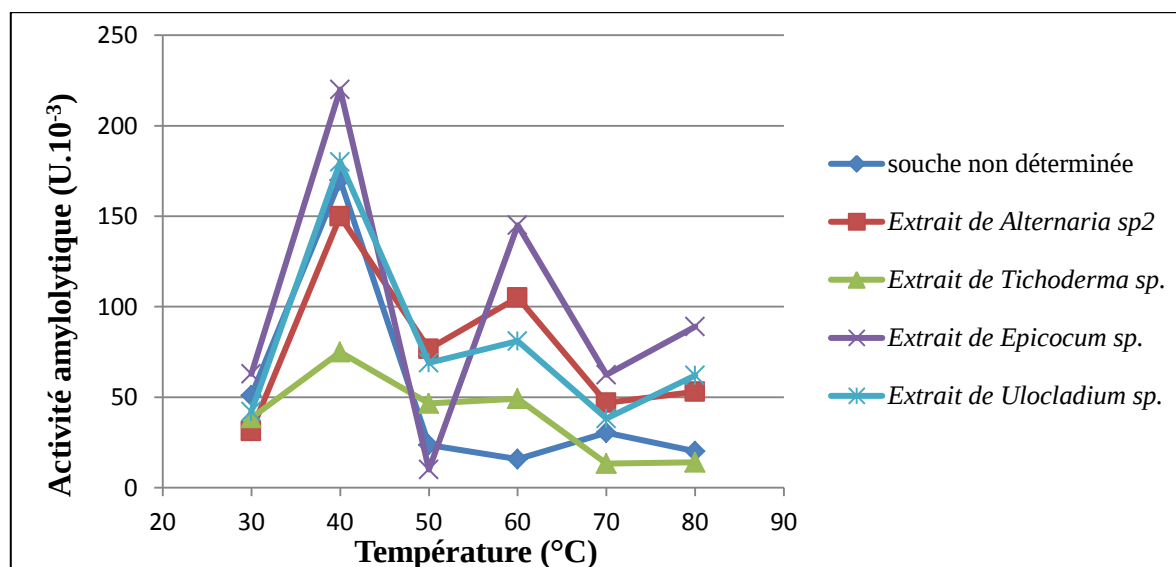


Figure 20 : Effet de la température sur la réaction amylytique des souches sélectionnées.

➤ Température optimale de la réaction protéolytique

En ce qui concerne l'effet de température sur l'activité protéolytique, la température optimale est également 40°C (figure 21). Elle est similaire à celle obtenue par LOUDJANI et BELMERABET (2016) pour le champignon *Metarhizium anisopliae* et proche de celle de *Aspergillus niger* (30°C) déterminée par KALPANA DEVI *et al.* (2008). Au-delà des optima de température, l'activité diminue considérablement. Par ailleurs, la souche *Alternaria sp1.* présente une autre activité significative à 60°C. ce résultat est le même que celui rapporté pour quelques protéases fongiques présentant des optima de température de 60°C (SINGH *et al.*, 1994; CHELLAPPAN *et al.*, 2006).

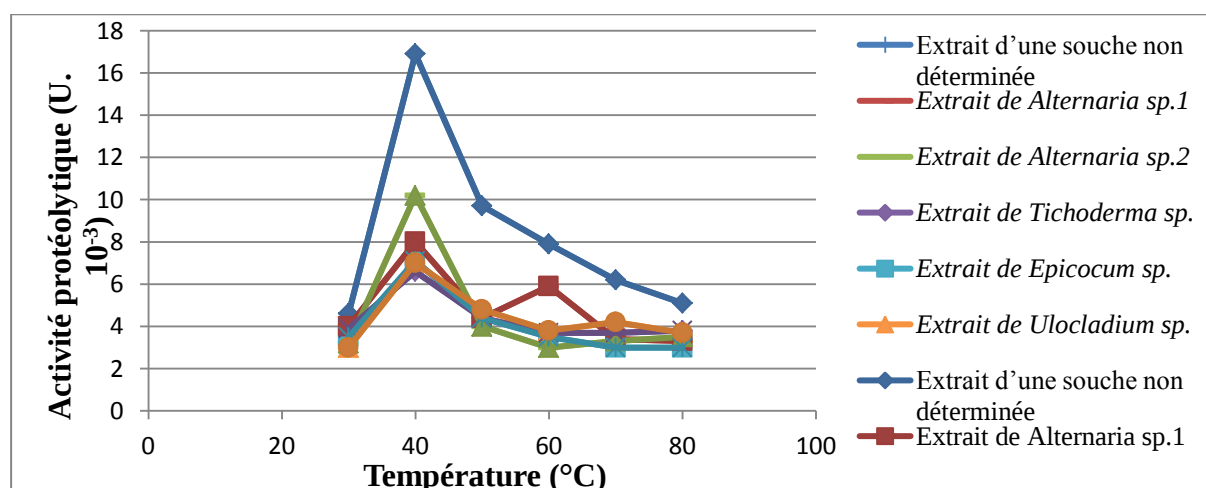


Figure 21: Effet de la température sur la réaction protéolytique des souches sélectionnées.

L'effet des températures trop élevées sur les réactions enzymatiques, s'explique par un changement structural et fonctionnel des enzymes suite à la rupture des liaisons qui les stabilisent (OYELEKE *et al.*, 2010).

3.3. Interprétation des profils électrophorétiques et des zymogrammes

3.3.1. Interprétation des profils électrophorétiques

Les échantillons et les marqueurs de PM, repris dans le tampon d'échantillon, sont séparés sur un gel de poly-acrylamide discontinu, constitué d'un gel de concentration à 4% et d'un gel de séparation à 12%.

L'estimation du poids moléculaire des protéines contenues dans les différents extraits bruts est réalisée par extrapolation sur la courbe d'étalonnage de logarithme de masse moléculaire des protéines standards en fonction de leur mobilité relative (d/D , d : distance parcourue, D : longueur de la bande).

➤ Profils électrophorétiques des amylases

L'analyse des profils électrophorétiques obtenus par PAGE-SDS des extraits protéiques des différentes souches productrices des amylases, montre des différences d'un extrait à un autre (figure 22).

On note la présence de plusieurs bandes protéiques d'intensités différentes chez *Trichoderma sp.*. Le profil de la souche non déterminée révèle quatre bandes superposées deux à deux dont les masses moléculaires sont de 69 kDa, 67 kDa, 39 kDa et 37 kDa. Tandis que l'extrait de *Alternaria sp2*. Présente deux bandes nettement moins apparentes, l'une de 67 kDa et l'autre de 22 kDa. Les MM de 67 et 69 kDa sont proches de celle rapporté par NOUADRI (2011) pour l'alpha amylase de *Penicillium camemberti* PL21 qui est de 60.5 kDa.

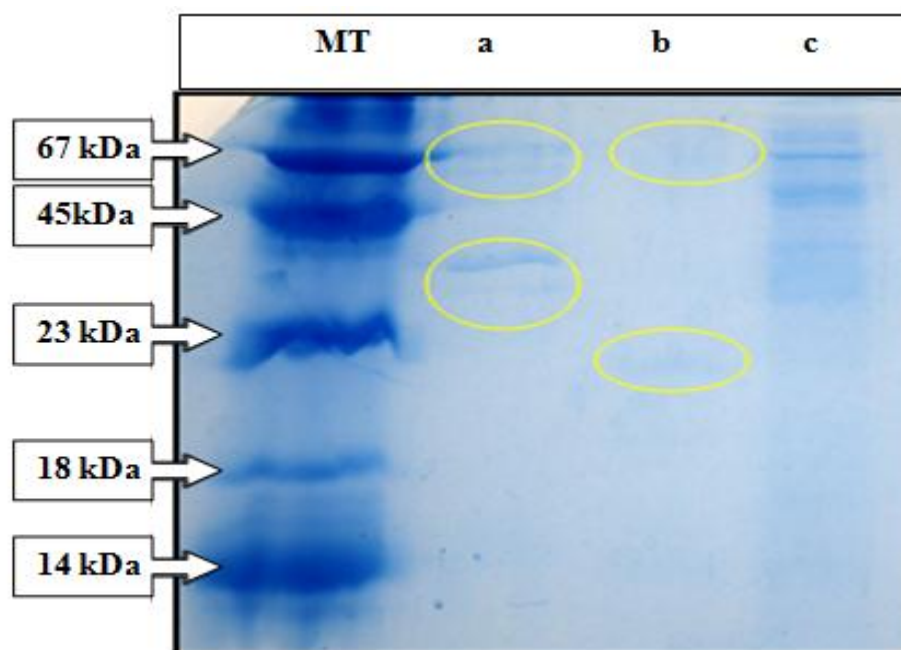


Figure 22 : Profil électrophorétique en PAGE-SDS en présence de β -mercaptoéthanol des extraits protéiques des différentes souches productrices d'amylases (T=15%, C=12%). **(MT)** marqueur de taille ; **(a)** extrait d'une souche non déterminée ; **(b)** extrait de *Alternaria sp2*. ; **(c)** extrait de *Trichoderma sp.*.

➤ Profils électrophorétiques des protéases

Concernant le profil électrophorétique des extraits protéiques des différentes souches productrices de protéases (figure 23), il révèle plusieurs bandes de différentes intensité pour l'extrait de *Trichoderma sp.*, deux bandes pour l'extrait de la souche non déterminée (l'une d'une MM de 67 kDa et l'autre de 40 kDa) alors que l'extrait de *Alternaria sp2.* renferme aussi deux bandes mais d'intensité moindre (la première bande est de 23 kDa et l'autre de 14 kDa). Concernant le profil de l'extrait de *Aternaria sp1.*, une seule bande de faible intensité est apparue.

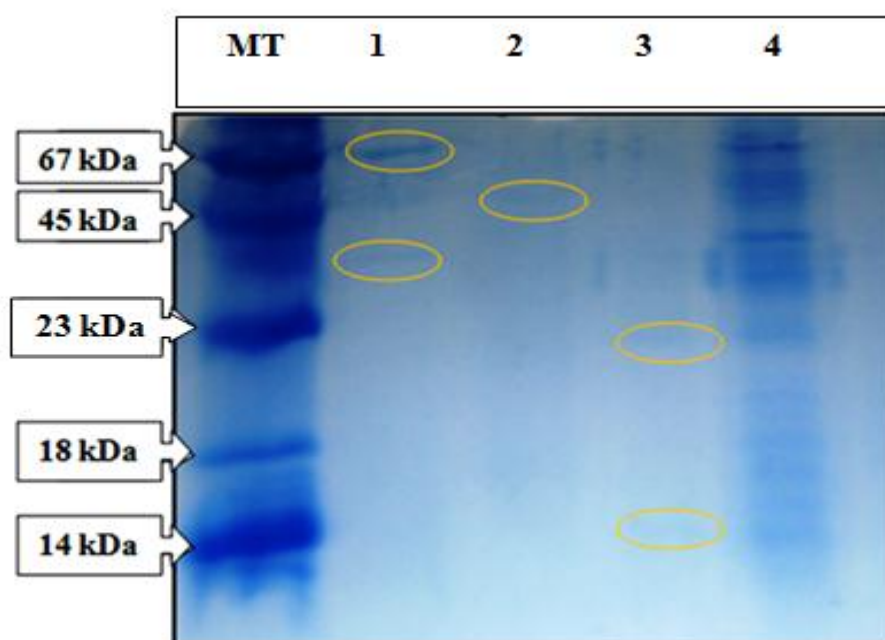


Figure 33 : Profil électrophorétique en PAGE-SDS en présence de β -mercaptoéthanol des extraits protéiques des différentes souches productrices de protéases (T=15%, C=12%). (MT) marqueur de taille ; (1) extrait d'une souche non déterminée ; (2) extrait de *Alternaria sp1.* ; (3) extrait de *Alternaria sp2.* ; (4) extrait de *Trichoderma sp.*

3.3.2. Interprétation des zymogrammes

➤ Zymogramme des amylases

Afin de déterminer les bandes qui représentent les amylases, un zymogramme a été réalisé mais en incorporant leur substrat spécifique (amidon à 1%) dans le gel de séparation. Des zones claires doivent donc apparaître suite à l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. Une α -amylase commerciale a été utilisée pour vérifier l'efficacité du procédé.

Le zymogramme des amylases ne révèle aucune zone d'hydrolyse (figure 24). Cela pourrait s'expliquer par une faible activité amylolytique non détectable par cette méthode sans pour autant signifier absence d'enzymes. Le choix du protocole expérimental est donc remis en question du fait que même une α -amylase commerciale (α -amylase type VI-10 units/mg) n'a donné aucun résultat. Plusieurs hypothèses peuvent être relevées notamment :

- la porosité du gel qui n'est pas approprié et la taille de l'amidon qui pourrait empêcher la migration de l'enzyme et le déroulement de la réaction d'hydrolyse ;
- L'absence de sels minéraux dans le gel et qui sont des cofacteurs indispensables à l'activité enzymatique.

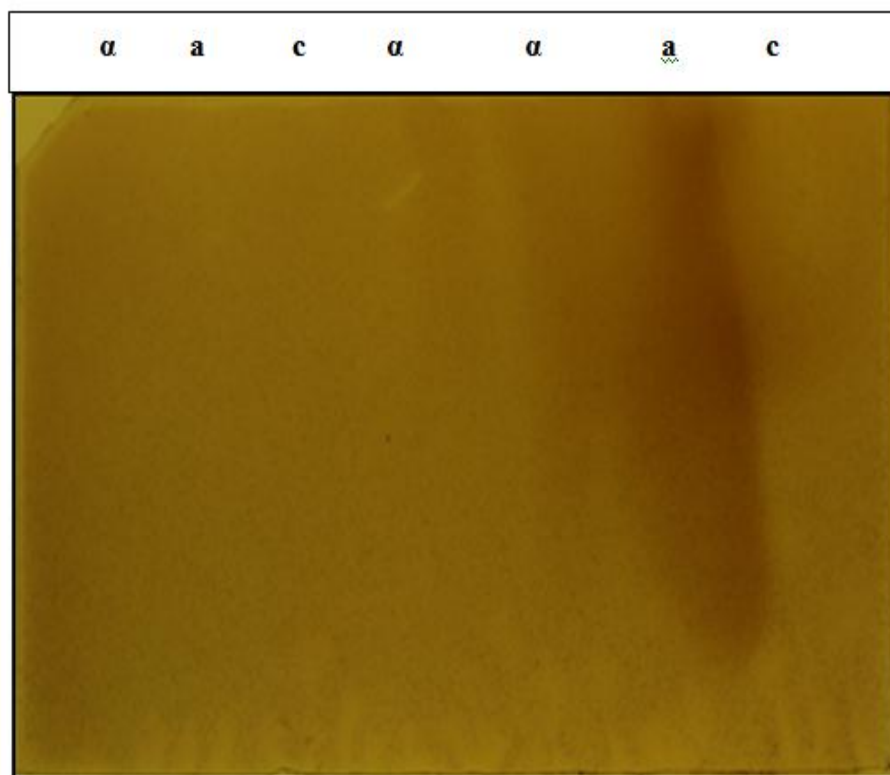


Figure 24 : Activité amylolytique des différentes souches par la technique du zymogramme. **(a)** extrait d'une souche non déterminée ; **(c)** extrait de *Trichoderma* sp. ; **(α)** alpha amylase.

➤ Zymogramme des protéases

L'activité protéolytique sur gel de polyacrylamide à base de la caséine (1%) des différents extraits enzymatiques est vérifiée par zymogramme (figure 25) et les masses moléculaires des protéases sont estimée en comparaison avec les profils électrophorétiques obtenus par PAGE-SDS.

Au niveau de l'extrait de la souche non déterminé, on observe une traînée claire sur fond bleu témoignant de l'importante hydrolyse de caséines par les protéases. Ceci suggère que cet extrait renferme plusieurs protéases de masse moléculaire très proche et confirme que les deux bandes du profil obtenu par PAGE-SDS sont des protéases de 67 et de 40 kDa. Une autre petite zone est observée aux alentours de 18 kDa.

GAIS, (2011) et KUMAR *et al.*, (2008) rapportent que les protéases de *Myxococcus xanthus* 422, de *Rhizopus stolonifer* et de *Synergistes* sp. ont des poids moléculaires de 40, 43 et 60 kDa respectivement.

Pour la souche *Alternaria* sp2., elle présente une importante activité protéolytique correspondant à une protéase de 67 kDa dont la bande n'est pas apparente au niveau du profil de la SDS-PAGE. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la concentration de l'enzyme dans l'extrait soit très faible. Quant à l'extrait de *Trichoderma* sp., il révèle une faible zone d'hydrolyse aux alentours de 67 kDa qui permet de dire que la protéase correspond à la première bande du profil électrophorétique des protéases obtenu par PAGE-SDS.

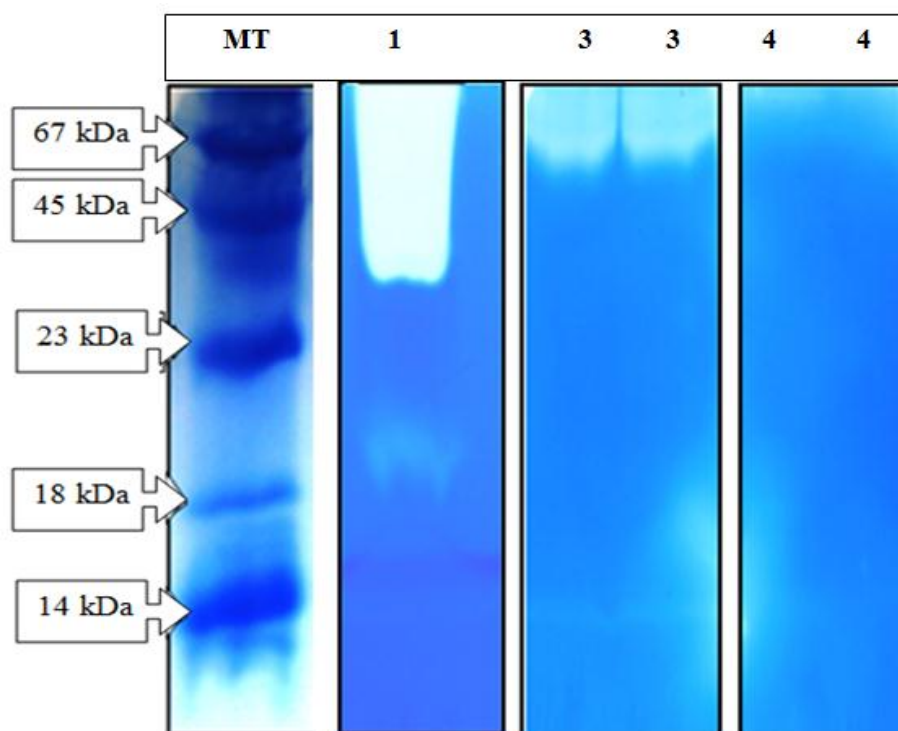
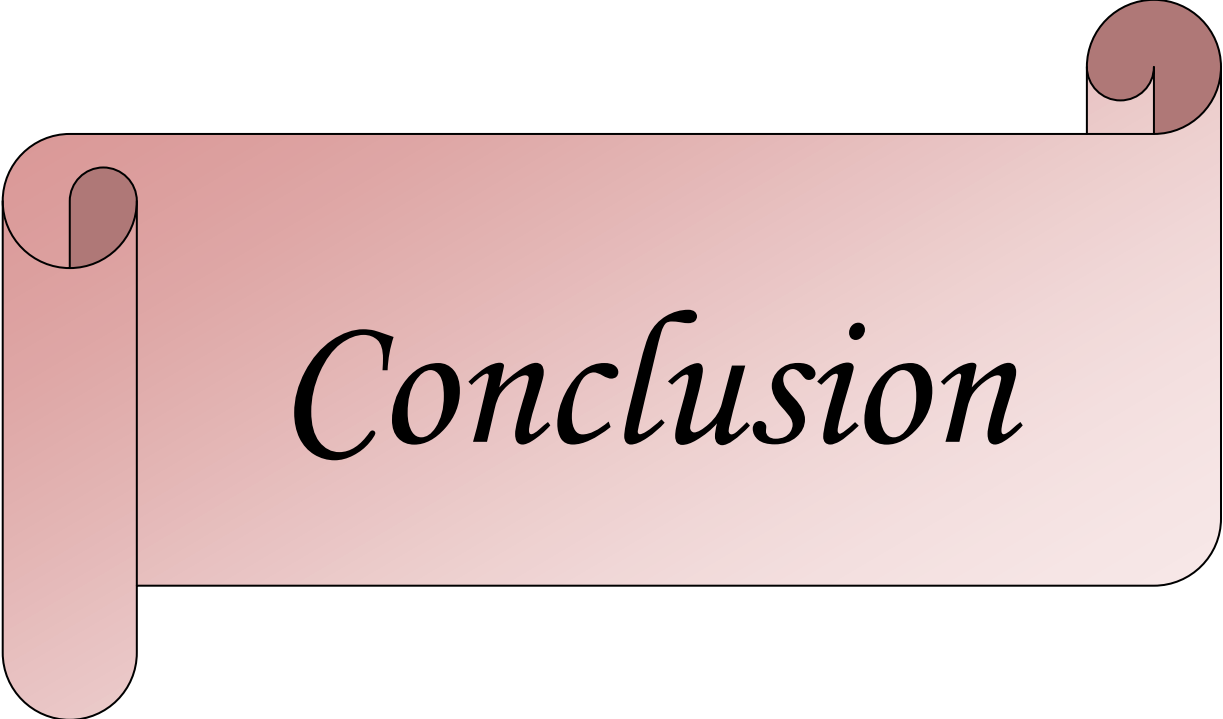


Figure 25 : Activité protéolytique des protéases des différentes souches par la technique du zymogramme. **(MT)** marqueur de taille ; **(1)** extrait d'une souche non déterminée ; **(3)** extrait de *Alternaria* sp2. ; **(4)** extrait de *Trichoderma* sp..



Conclusion

Conclusion

Les nombreuses utilisations des enzymes et le besoin croissant en biocatalyseurs pouvant supporter les procédés industriels, a orienté les recherches vers les champignons endophytes, réservoirs de substances bioactives.

Dans cette étude, dix souches fongiques isolées à partir d'une plante médicinale *Urtica dioica* L. ont été utilisées. Six souches ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des amylases et des protéases : *Alternaria sp1.*, *Alternaria sp2.*, *Trichoderma sp.*, *Epicocum sp.*, *Ulocladium sp.* et une souche non déterminée. Ces dernières sont toutes productrices des deux enzymes à l'exception de *Alternaria sp1.*, productrice de protéases uniquement.

Les souches retenues ont été soumises à une fermentation submergée afin de produire ces enzymes et de doser leurs activités. L'activité amylolytique la plus importante est celle enregistrée par *Epicocum sp.* avec une valeur de $170 \cdot 10^{-3}$ U, alors que l'activité protéolytique est trônée par la souche non déterminée ($15.9 \cdot 10^{-3}$ U).

Afin de mieux connaître les caractéristiques biochimiques de nos enzymes, les pH et les températures optima de la production et des réactions enzymatiques, ainsi que les poids moléculaires ont été déterminés. En effet, le pH de production de la plus part des amylases tourne autour de 4.5 alors qu'il varie d'une souche à une autre, voir pH 6, 8 et 10, pour les protéases. En ce qui est de la température de production enzymatique, elle est de 28°C pour toutes les amylases, et varie pour les protéases. Après optimisation de la production enzymatique, la détermination des pH et des températures optima de la réaction enzymatique a été effectué pour chaque souche. Il s'est avéré que le pH optimal de la réaction est le même pour toutes les amylases produites (pH 5), mais pour les protéases il varie encore d'une souche à une autre (pH 5, 6 et 10). Concernant la température de la réaction, elle est la même pour les deux types d'enzymes (40°C).

Cependant, certaines fluctuations des valeurs des activités enzymatiques (amylolytiques et protéolytiques) ont été enregistrées pour toutes les souches suites aux variations du pH et de la température de production et de réaction. Ceci pourrait être expliqué par la production de différents types d'amylases ou de protéases par une même souche.

Les profils électrophorétiques des deux enzymes montre la présence de plusieurs bandes protéiques d'intensité différentes. Chaque extrait étudié, révèle au moins deux bandes protéiques de masses moléculaires différentes. Ceci suggère l'existence de plusieurs amylases ou protéases dans un même extrait.

Afin de vérifier cette hypothèse et d'estimer les poids moléculaires des enzymes, un zymogramme des protéases et un autre des amylases ont été réalisés. Le zymogramme des protéases révèle des zones claires sur fond bleu, en forme de traînées et non de bandes focalisées confirmant ainsi l'hypothèse préalablement posée. En effet, les bandes obtenues en PAGE-SDS correspondent à des protéases de masse moléculaire de 67kDa pour la protéase de *Alternaria sp2.* et *Trichoderma sp.*, 67kDa, 40kDa et 18.9kDa pour les protéases produites par la souche non déterminée. Tandis que le zymogramme des amylases, n'a pas présenté de zones d'hydrolyse. Ceci est probablement dû au protocole suivi ou à l'absence de l'ensemble des paramètres nécessaires au déroulement de la réaction amylolytique notamment : les sels minéraux, la source d'azote,... Par conséquent, il est important de refaire cette technique pour les amylases, en tenant compte de tous les paramètres.

En perspectives de ce travail, il serait intéressant :

- de faire une optimisation de tous les paramètres se rapportant à une meilleure production enzymatique ceci par l'étude des effets de plusieurs facteurs notamment : la

variation de la nature et la concentration des composants des milieux de fermentation (sels minéraux, source de carbone et source d'azote) ainsi que la durée d'incubation et la vitesse d'agitation ;

- de purifier les enzymes pour une meilleure caractérisation par précipitation au sulfate d'ammonium et des dialyses ou encore, utiliser des techniques plus performantes telles que les chromatographies (chromatographie échangeuse d'ions, chromatographie d'interactions hydrophobes, chromatographie sur gel de filtration) ;
- de faire un suivie des cinétiques enzymatiques pour déterminer les paramètres cinétiques de chaque enzyme (la constante de Michaelis « K_m » et la vitesse maximale « V_{max} ») et d'étudier la stabilité des enzymes pour d'éventuelles utilisations industrielles.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- AEHLE W. (2004).** Enzymes in industry : Production and Applications. Wiley-vch Verlag Gmbh & Co.KGaA, 2^{ème} édition, Weinheim.
- AGGER T., SPHOR A. B., CARLESEN M. et NIELSEN J. (1998).** Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations verification of morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnology and Bioengineering*, **57**, 321-329.
- AGRAWAL D., PATIDAR P., BANERJEE T. et PATIL S. (2005).** Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, **40**, 1131–1136.
- AGUILAR C.N., GUTIERREZ-SANCHEZ G., RADO-BARRAGAN P.A., RODRIGUEZ-HERRERA R., MARTINEZ-HERNANDEZ J.L. et CONTRERAS-ESQUIVEL J.C. (2008).** Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **4** (4), 354 366.
- ALAIS C. (1975).** Sciences du Lait : Principes et Techniques Laitières. Masson, Paris.
- ALAIS C., LINDEN G. et MICLO L. (2008).** Biochimie Alimentaire. Dunod, 6ème édition, Paris.
- AOUARIB K. et LEMSARA R. (2016).** Etude des activités antimicrobienne et enzymatique des champignons endophytes isolés à partir d'*Artemisia absinthium*. Diplôme de Master Académique, Université KASDI Merbah, Ouargla, Algérie.
- ARNAUD A., BERCET C., BOCQUET J., BOUX M., CERISIER Y., CUVELLIER G.F., DE NETTANCOURT D., ENGASSER J.M., GALZY P., GOURSAUD J., GUERRINI M., GUIRAUD J.P., IWENA A., JUPIN C., LEBEAULT J-M, LEVEAU J-Y., MARTIAL J., MAWAS C., NORMAND-PLESSIER F., PIERRARDS., POURQUE J., RAUGEL P-J., RICHARD H., STEENBRUGGE H., TEOULE E., TOMAS D. et VANDECASTEELE J-P. (1993).** Biotechnologies. Technique et documentation, 4^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- ARNOLD A. E., MEJIA L.C., KYLLO D., ROJAS E.I., MAYNARD Z., ROBBINS N. et HERRE E.A. (2003).** Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 15649-15654.
- ASSAMOI A.A., DESTAIN J., THONART P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **13** (2), 281–294.
- AVIRON-VIOLET P., BARET J.L., BERTRAND C., BLAZY B., BOUVIER F., COMTAT M., COULET P.R., DUPUY P., HERVAGAULT J.F, JOYEUX A., LAURENT J., MONSAN P., THOMAS D., SICARD P. et VAN BEYNUM G.M.A. (1982).** Les enzymes. Production et Utilisation Industrielles. Durand G. et Monsan P. (éds), Bordas, Paris.

- BABU K.R., et SATYANARAYAN T. (1993).** Extracellular calcium-inhibited alpha-amylase of *Bacillus coagulans* B49. *Enzyme and Microbial Technology*, **15**, 1066-1069.
- BAKRI Y., JACQUES PH. ET THONART PH. (2003).** Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **108**, 737-748.
- BANERJEE S., MAITI T.K. et ROY R.N. (2016).** Identification and product optimization of amylolytic *Rhodococcus opacus* GAA 31.1 isolated from gut of *Gryllotalpa Africana*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **14**, 133–141.
- BELLON-MAUREL V., CHRISTEN P. et ORLIAC O. (2003).** Sensors and measurements in solid-state fermentation: A review. *Process Biochemistry*, **38**, 881-896.
- BELMESSIKH A. (2011).** Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Diplôme de Magister, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.
- BEN FODDIL O. (2015).** Inventaire des champignons endophytes des feuilles de *Pistacia atlantica* Desf. de dayate El Gouffa (Laghout, Algérie). Diplôme de Magister, Université Mouloud MAMMERI, Tizi-Ouzou, Algérie.
- BENNETT J.W. (1998).** Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, **66**, 101-107.
- BENSMAIL S. (2012).** Optimisation de la production de la protéase acide par *Aspergillus niger* sur milieu solide : purification et caractérisation. Diplôme de Magister, Université M'Hamed BOUGARA, Boumerdès, Algérie.
- BERGMEYER H.U., GAWEKN K., et al. (1979).** Principes de l'Analyse Enzymatique. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- BERRY D.R. et PATERSON A. (1990).** Enzymes in food industry ; in: « Enzymes chemistry impact and application ». Chapman H. ed., London.
- BERTHEA Y., KOTOUJANSKY A. et COLENOA A. (1985).** Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hymolyses et de dépolymérisation ; in : « Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêt industriel », Gautier-Villard (éd.), Paris.
- BHELLA R.S. et ALTOSAAR I. (1985).** Purification and some properties of the extracellular alpha-amylase from *Aspergillus awamori*. *Journal of Microbiology*, **13**, 149-153.
- BOIRON P. (1996).** Organisation et Biologie des Champignons. Edition Nathan, Paris.
- BOTTON B., BERTERON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J. P., REYMOND P., SANGLIER J. J., VAYSSIER Y. et VEAU P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Biotechnologies, 2ème éd., Masson, Paris.
- BOUCHERIT Z. (2011).** Production et étude des propriétés de la protéase acide d'une moisissure isolée de Sebkha. Diplôme de Magister, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.
- BOUX M. et LEVEAU J. Y. (1999).** Production des enzymes. Edition Scriban R., Paris.
- BRADY S.F. et CLARDY J. (2000).** CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products*, **63**, 1447-1448.

- BRUMM P.J., HEBEDA R.E., TEAUGUE W.M. (1991).** Enzymes in industry; in: «Enzymes chemistry impact and application». Chapman H. (ed.), London.
- BURHAN A., UNALDI N., CORAL G., COLAK O., AYGAN A. et GUILNAZ O. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an *alkaliphilic Bacillus sp.* isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, **38**, 1397-1403.
- BUSCH J. E. et STUTZENBERGER F. J. (1997).** Amylolytic activity of *Thermomonospora fusca*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13** (6), 637-642.
- CANARD B. et SENEQUIER-CROZET A. (2016).** Les champignons endophytes : impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. Diplôme de docteur en pharmacie, Université de Grenoble Alpes, France.
- CHANDRASEKARAN S., PILLAI KUMARESAN S.S. et 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** (06), 66-69.
- CHATTERTON J-R. VOGELSONG K-M., LU Y- ELLMAN A-B. et HUDGENS G-A. (1996).** Salivary amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical Physiology Journal*, **16** (4), 344-348.
- CHELLAPPEN S., JASMIN C., BASHEER S.M., ELYAS K.K., BHAT S.G. et CHANDRASEKARAN M. (2006).** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **41**, 956–961.
- CHI Z., MA C., WANG P. et LI H.F. (2007).** Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresour. Technology*, **98**, 534–538.
- CHIBA S. (1988).** Amyloglycosidase ; in : «Handbook of Amylases and related enzymes» The Amylase Research Society of Japan (ed.), Pergamum Press, Oxford.
- COLLINS S. DIOMI M., ELISAVET K. et PAUL C. (2005).** Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Biotechnology and Technology*, **3**, 23–38.
- COLWELL R.R. et GRIGOROVA R. (1989).** Methods in Microbiology. St dimundsbert press limited (ed.), London.
- CUVEILLIER G. F. (1999).** Réacteurs enzymatiques à enzymes libres. Scriban R. éd., Paris.
- DALAL BEDAN S., GHAZI AZIZ M. et ALI AL-SAADY J. R. (2014).** Optimum conditions for α - amylase production by *Aspergillus niger* mutant isolate using solid state fermentation. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, **2**(4), 450-456.
- DALI N.S. et HAMAME A. (2016).** Recherche de levures productrices d'enzymes glycolytiques exocellulaires thermostables : Production (sur boîte de Pétri et en batch) et Caractérisation des enzymes produites. Diplôme de Master, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.

DAUTER Z., DAUTER M., BRZOZOWSKI A.M., CHRISTENSEN S., BORCHERT T.V., BEIER J.L., WILSON K.S. et DAVIES G.J.(1999). X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearotheophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Journal of Biochemistry*, **38**, 8385-8392.

DENDOUGA W. (2006). Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Diplôme de Magister, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.

DEVI M.K., BANU A.R., GNANAPRABHAL G.R., PRADEEP B.V. et PALANISWAMY M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, **1**(7), 1–6.

DEY S. et AGARWAL S. O. (1999). Characterization of a thermostable alpha-amylase from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain Sd 12. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysic.* **36**(3), 150-157.

DICKO M.H. (1999). Purification et Propriétés Physico-chimiques des Enzymes de *Curculigo pilosa*, *Gladiolus klattianus* et *Boscia senegalensis* Catalysant l'Hydrolyse des Polysaccharides (Amidon et β -glucanes). Thèse de Doctorat, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

DOYLE S., KELLY M. et FOGARTY W. (1989). Different factors affecting growth and amylase production by fungi inhabiting poultry feeds. *Journal of Basic Microbiology*, **37**(6), 586-592.

DROUIN M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître en sciences. Canada.

DURAND G. et MONSON P. (1982). Les Enzymes: Production et Utilisations Industrielles. Bordas, Paris.

EGAS M. C., DA COTA M. S., COWMAN D. A. et PIERES E. M. (1998). Extracellular α -amylase from *Thermus Filiformis* ork A2: purification and biochemical characterization. *Extremophiles*, **2**(1), 23-32.

ERDEL S. et TASKIN M. (2010). Production of amylase by *Penicillium expansum* MT-1 in solid state fermentation using wasteloquat (*Eriobotrya japonica* Lindley) kernels as substrate. *Romanian Biotechnological Lettets*, **15** (30), 5342–5350.

FELLER G., LONHIENNE T., DEROANNE C., LIBIOULLE C., VAN BEEUMEN J. et GERDAY C. (1992). Purification, Characterisation and nucleotide sequence of the thermolabile α -amylase from the Antarctic psychrotroph *Alternomomonas haloplanctis* A23. *Journal of Biology and Chemistry*, **267**(8), 5217-5221.

FERHAT HAMIDA S. et LAKLOUKA N. (2015). Contribution à l'étude de l'alpha amylase levurienne : optimisation des conditions de production. Diplôme de Magister Académique, Université Echahid HAMMA Lakhdar, El Oued, Algérie.

FERRERO M.A., CASTRO G.R., ABATE C.M., BAIGORI M.D. et SINERIZ F. (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, 327–32.

- FRAZIER W.C. (1967).** Food microbiology. *Academic press*, London.
- GAIS S. (2011).** Optimisation de la production de la protéase de *Rhizopus stolonifer* sur milieu solide: purification et caractérisation. Mémoire de magister, Université M'Hamed BOUGARA, Boumerdès, Algérie.
- GALLERY R.E., DALLING J. W. et ARNOLD A.E. (2007).** Diversity, host affinity, and distribution of seed-infecting fungi : a case study with *Cecropia*. *Ecology*, **88**, 582-588.
- GARCIA-GOMEZ M.J., HUERTA-CHOA S., LOERA-CORRAL O. et PRADO-BARRAGAN L.A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*, **112**, 604–608.
- GEORGE S., RAJU V., KRISHNAN M.R.V., SUBRAMANIAN T.V. et JAYARAMAN K. (1995).** Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Process Biochemistry*, **30**, 457–462.
- GERMANO S., PANDEY A., OSAKU C.A., ROCHA S.N. et SOCCCOL C.R. (2003).** Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 246–251.
- GIMENEZ C., CABRERA R., REINA M. et GONZÁLEZ-COLOMA A. (2007).** Fungal Endophytes and their Role in Plant protection current organic. *Bentham Science Publishers*, **2**, 8-16.
- GUO B., WANG S., SUN X. et TANG K. (2006).** Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **44**, 136–142.
- GUO. B, DAI J.R., NG S., HUANG Y., LEONG C., ONG W. et KARTE B.K. (2000).** Cytonic acids A and B: Novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endopytic fungus *Cytonaema* species. *Journal of Natural Products*, **63**, 602-604.
- GUPTA A., GUPTA V-K., MODI D-R. et YADAVA L-P. (2008).** Production and characterization of α - amylase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology*, **7** (3), 551-556.
- GUPTA R., BEG Q. K. et LORENZ P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 15-32.
- HAJJI M., KANOUN S., NASRI M. et GHARSALLAH N. (2007).** Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*, **42**, 791–797.
- HAQ I.U., RANI S., ASHRAF H. et QADEER M.A. (2002).** Biosynthesis of alpha amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Science*, **2**(2), 73-75.
- HELLWIG V., GROTHE T., MAYER B.A., ENDERMANN R., GESCHKEF. U., HENKEL T. et STADLER M. A. (2002).** A new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *Journal of Antibiotics*, **55**(10), 881-892.
- HENDRIKSEN H.V., PEDERSEN S. et BISGARD-FRANTZEN 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.

- HOZZEIN WAEL N., LI WEN-JUN, ALI MOHAMMED I.A., OLA HAMMOUDA M., AHMED S., XU L.H. et JIANG C.L. (2004).** *Nocardiosis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycetes isolated from desert soil in Egypt. *International Journal of Microbiology*, **54**, 247–252.
- HUANG W. Y., CAI Y. Z., HYDE K. D., CORKE H. et SUN M. (2008).** Biodiversity of endophytic fungi with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, **33**, 61-75.
- HYDE K.D. et SOYTONG K. (2008).** The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, **33**, 163-173.
- IGARASHI K., HATADA Y., HAGIHARA H., TAKAIWA M., EUMURA T., ARA K., OZAKI K., KAWAI M., KOBAYASHI T., ITO S. (1998).** Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (9), 3382-3389.
- JAKUBOWSKI (2001).** Proteinase chemistry and molecular biology. *Journal of Biochemistry*, **23** (5), 1825-1827.
- KALPANA DEVI M., RASHEEDHA BANU A., GNANAPRABHAL G.R., PRADEEPB.V. et PALANISWAMY M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*, **1**(7), 20-31.
- KANDRA L., GYEMANT G., FARKAS E. et LIPTAK A. (1997).** Action pattern of porcine pancreatic α -amylase on three different series of beta-maltooligosaccharide glycosides. *Carbohydrate Research*, **289**(3), 237-242.
- KHAN J. A. et YADAV S. K. (2011).** Production of alpha amylases by *Aspergillus Niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, **1**, 100-108.
- KHOO S. L., AMIRUL A. A., KAMARUZAMAN M., NAZALAN N. et AZIZAN M. N. (1994).** Purification and characterization of α -amylase from *Aspergillus flavus*. *Folia Microbiology*, **39**(5), 392-398.
- KHOO S. L., NAZALAN N., RAZIP M. S. et AZIZAN M. N. (1994).** Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiology*, **41**(2), 65-74.
- KIM O. R. (1995).** Purification and characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast *Filobasidium Sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, **44**(6), 374-382.
- KRESZE G. B., 1991.** Proteases during purification. *Bioprocess technology*, **12**, 85-120.
- KUDRYA V.A. et SIMONENKO I.A. (1994).** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**, 505–509.
- KUMAR A.G., NAGESH N., PRABHAKAR T.G. et SEKARAN G. (2008).** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresources of Technology*, **99**, 2364–2372.

- KUMAR D., SAVITRI , THAKUR N., VERMA R. et BHALLA T.C. (2008b).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Journal of Microbiological research*, **3**(12), 661–672.
- KUNDU T. et DAS S. (1970).** A thermostable α -amylase producing maltohexose from a new isolated *Bacillus sp.*: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 584–589.
- LADJAL S. (2012).** Activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*Pinus halipensis* Mill.) de la région de M'sila. Diplôme de Magister, Université Ferhat ABBAS, Sétif, Algérie.
- LAGZOULI M., MENNANE Z., AITOUNEJJAR A., EL KETTANI Y., ELYACHOU M., OUHSSINE M., BERNY E.H. et JADAL M. (2007).** Optimization of composition of media for the production of extracellular glucoamylase by *Candida guilliermii*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **10**(19), 3322-3329.
- LARPENT-GOURGAUD M. et SANGLIER J.J. (1992).** Biotechnologies, Principes et Méthodes. Ed Doin, Paris.
- LAXMAN R.S., SONAWANE A.P., MORE S.V., RAO B.S., RELE M.V., JOGDAND V.V., DESHPANDE V.V. et RAO M.B. (2005).** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, **40**, 3152-3158.
- LI C. (2014).** Close relationship of a novel *Flavobacteriaceae* α -amylase with archaeal α -amylases and good potentials for industrial applications. *Biotechnol. Biofuels.*, **18** (7), 27-38.
- LOUDJANI H. et BELMERABET K. (2016).** Etude des paramètres physico-chimiques de la production de protéase par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Diplôme de Master, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.
- LUCIO DE SOUZA E., ERIKA M. E. H., CASTILHO V. M., DELIMA A., BELLINI M. Z., CRUZ D. et CRUZ Z. R. (1996).** Purification and characterization of α -amylase from *Rhizopus sp.* *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **39** (4), 831-839.
- MANSOURI A. (2011).** Les champignons endophytes chez le blé dur (*Triticum durum*.Desf): Occurrence et rôle dans la tolérance au stress hydrique. Diplôme de Magister, Université El-Hadj Lakhdar, Batna, Algérie.
- MAZUR A. K. et NAKATANI H. (1993).** Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **36** (1), 29-38.
- MC TIGUE, KELLY C.T., DOYLE E.M., FOGARTY W.M. (1995).** The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus sp.* IMD 370. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**, 570-573.
- MCKENZIE H.A. (1971).** Milk Proteins Chemistry and Molecular Biology. Berkeley square ed., London.
- MECHAKRE A., AUBERGER B., REMEUF F. et LENOIR J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences des Aliments*, **19** (6), 663-675.

- MEHTA V.J., THUMAR J.T. et SINGH S.P. (2006).** Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource Technology*, **97**, 1650–1654.
- MOODIE P. (2001).** Traditional baking enzymes-proteases. *Enzyme Development Corporation*, **212**, 736-1580.
- NGUYEN Q. D., REZESSY-SZABO J. M., CLAEYSSSENS M., STALS I. et HOSCHKE A. (2002).** Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 345–352.
- NIELSON J-E., BORCHERT T-V et VRIEND G. (2001).** Protein Engineering: the determinant of α -amylase pH-activity profiles. *Oxford University Press*, **14** (7), 505-512.
- NIGAM P. AND SINGH D. (1995).** Enzymes and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, **17**(9), 770-778.
- NOUADRI T. (2011).** L' α -amylase de *Penicillium camemberti* PL21 : Production, Purification, Caractérisation et Immobilisation. Thèse de Doctorat, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.
- OLASUPO M., WISBECK E., HOCH I., JONAS R. (1996).** Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Pseudomonas* ATCC29191 in medium containing C.S.L. as source of vitamins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 116-122.
- Oludumila O.R., ABU TEMITOPE F.A., ENUJIUGHA V. N. nujiugha Victor Ndigwe1 et SANNI D.M. (2015).** Extraction, purification and characterization of protease from *Aspergillus Niger* isolated from yam peels. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, **4**(2), 125-131.
- OSENI O.A. (2011).** Production of Microbial Protease from Selected Soil Fungal Isolates. *Nigerian Journal of Biotechnology*, **23**, 28 – 34.
- OSER R., VALENZUELA S., FREER J., SANFUEENTES E. et RODRIGUEZ J. (2008).** Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*, **33**, 77-86.
- OYELEKE S. B., EGWIM E.C et AUTA S.H. (2010).** Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, **2**(7), 83-87.
- PANDEY A., NIGAM P., SOCCOL C.R., SOCCOL V. T., SINGH D. et MOHAN R. (2000).** Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **31**, 135-152.
- PARK C.S., CHANG C.C., KIM J.Y., OGRYDZIAK D.M. et RYUI D.D.Y. (1997).** Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biology and Chemistry*, **272** (11), 6876-6881.
- PATEL R., DODIA M. et SINGH S.P. (2005).** Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry*, **40**, 3569-3575.
- PEIXOTO-NOGUEIRA S.C., SANDRIM V.C., GUIMARÃES L.H.S., JORGE J.A., TERENCE H.F. AND POLIZELI M.L.T.M. (2008).** Evidence of thermostable amylolytic

activity from *Rhizopus microsporus* and *Rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, **31**, 329-334.

PELMONT J. (1995). Enzymes : catalyseurs du monde vivant. *Presse Universitaire de Grenoble*, **621**, 652–654.

PETRINI O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves; in: «Microbial Ecology of Leaves» ANDREWS J. et HIRANO S. (eds.), Springer Verlag.

PLANCHOT V. et COLONNA P. (1995). Purification and characterization of extracellular alpha amylase from *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydrate Research*, **1**, 97-109.

POZA M., SIEIRO C., CARREIRA L., BARROS-VELAZQUEZ J. et VILLA T. G. (2003). Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 422. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**, 691-698.

RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S. et DESHPANDE V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review*, **62**, 597–635.

RAY R. R. (2001). Production of α -amylase and xylanase by an alkalophilic strain of *Penicillium griseoroseum* RR-99Acta. *Microbiology*, **50**(4), 305-309.

RODRIGUEZ R.J., WHITE J.F., ARNOLD A.E. et REDMAN RS. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, **182** (2), 314-30.

RUOHONEN L., PENTTILA M. et KERANNEN S. (1991). Optimisation of *Bacillus* α -amylase production by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnology*, **7**(4), 337-346.

SAAR D. E., POLANS N. O., SORENSEN P. D. et DUVALL M. R. (2001). Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: Detection and methods of avoidance. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**, 249-260.

SACI A. (2012). Production d'alpha-amylase par *Streptomyces* sp. Optimisation d'un milieu de production à base de déchets d'orange. Diplôme de Magister, Université de MENTOURI, Constantine, Algérie.

SAIKKONEN K., FAETH S., HELANDER M. et SULLIVAN T. (1998). Fungal endophytes: Continuum of interactions with host plant. *Annual Review of Ecological Systems*, **29**, 319-343.

SAIKKONEN K., GUNDEL P.E. et HELANDER M. (2013). Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. *Journal of Chemistry and Ecology*, **39**(7), 948-962.

SAIKKONEN K., WALI P., HELANDER M. et FETH S.H. (2004). Evolution of endophyte – plant symbioses. *Trends in plant science*, **9**(6), 275-280.

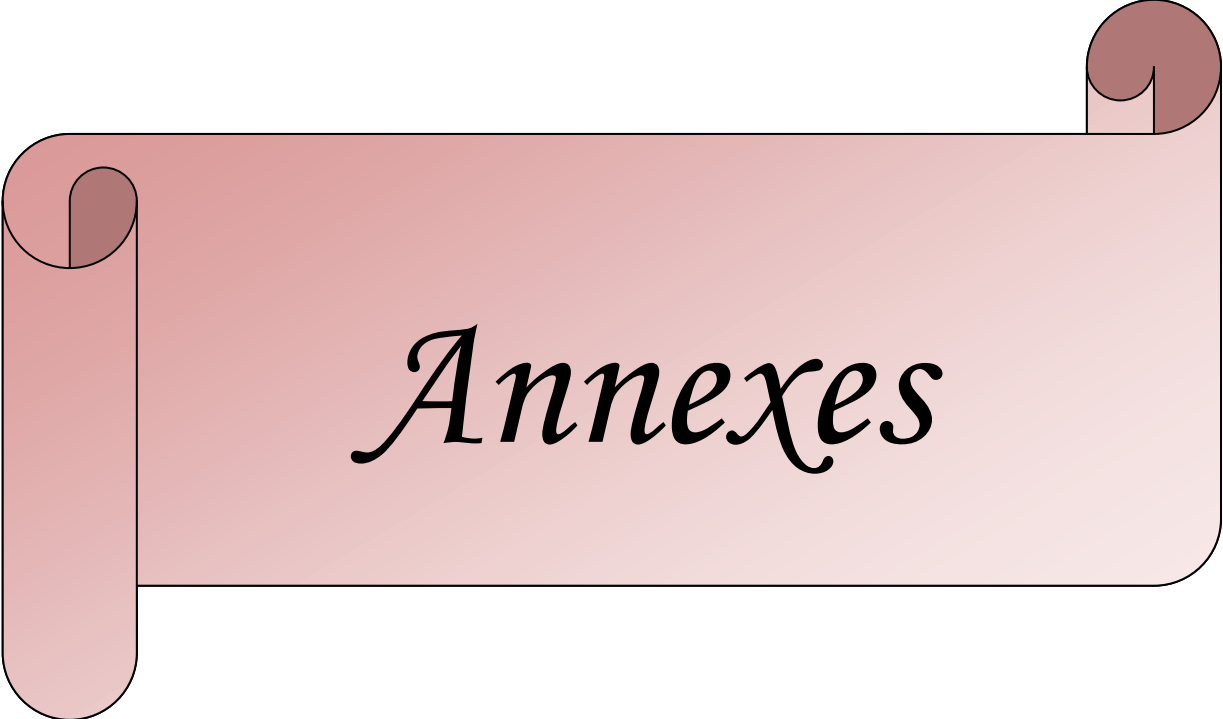
SAIKKONEN K., WALI P.R. et HELANDER M. (2010). Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. *PLoS One*, **5**(6), 371-396.

SANDHYA C., NAMPOOTHIRI K.M. et PANDEY A. (2005). Microbial proteases. *Biotechnology*, **17**, 165-179.

- SANDHYA C., SUMANTHA A., SZAKACS G. et PANDEY A. (2005b).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **40**, 2689–2694.
- SATHYA R., PRADEEP B.V., AAGAYARKANNI J. et PALANISWAMY M.(2009).** Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **14**, 765-794.
- SAVCHEKO A., VIEILLE C., KANG S. AND ZEIKUS J. C. (2002).** *Pyrococcus* α -amylase is stabilized by calcium and zinc. *Department of biochemistry molecular biology, university east Lausang*, **5**, 111-123.
- SCRIBAN R. (1993).** Biotechnologie. Technique et Documentation, 4ème édition, Lavoisier, Paris.
- SCRIBAN R. (1999).** Biotechnologie. Technique et Documentation, 5ème édition, Lavoisier, Paris.
- SELOSSE M.A.et SCHARDL C.L. (2007).** Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission. An evolutionary perspective. *New Phytologist*, **173**, 452-458.
- SHARMA A. et SATYANARAYANA T. (2013).** Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*. **48**(2), 201-211.
- SICARD P. (1982).** Applications industrielles des enzymes ; in : « Les enzymes, production et utilisation industrielles » Durand G., Monson P. (éds.), éditions Gauthier-Villars, Paris.
- SIMON P. et MEUNIER R. (1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson et Cie, Paris.
- SINDHU R., SUPRABHA G.N. et SHASHIDHAR S. (2009).** Optimization of process parameters for the production of α -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, **3** (9), 498-503.
- SINE J-P. (2010).** Enzymologie et applications. Ellipses Edition marketing S.A, Paris.
- SINGH A., GHOSH V.K. et GHOSH P. (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters Applied Microbiology*, **18**, 177-180.
- SINGH S.B., ZINK D.L., GUAN Z., COLLADO J., PELAEZ F., FELOCK P.J. et HAZUDA D.J. (2003).** Isolation, structure, and HIV-1 integrase inhibitory activity of xanthoviridicatin E and F, two novel fungal metabolites produced by *Penicillium chrysogenum*. *Helvetica Chimica Acta*, **86**, 3380-3385.
- SINSUWAN S., RODTONG S. et YONGSAWATDIGUL J. (2008).** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochemistry*, **43**, 185–192.
- SOARES V.F., CASTILHO L.R., BON E.P.S. et FREIRE D.M.G. (2005).** High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124.

- SOCOL C. R., MARIN B. et RAIMBAUT M. (1994).** Breeding and growth of *Rhizopus* in rawcassava by solide state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**, 330-336.
- SRINIVASA RAO M., REDDY G., VENKATESWARA RAO G. et SAMBASIVA RAO K. R.S. (2004).** Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*, **4**, 289-291.
- STONE J. K., WHITE J. F. et POLICHOOK J. D. (2004).** Endophytic fungi; in: « Mueller. Measuring and Monitoring Biodiversity of fungi Inventory and monitoring methods » Bills G. and Foster M. (eds.), Elsevier Academic Press, Boston.
- STROBEL G. et DAISY B. (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Review*, **67**, 491-502.
- STROBEL G., DAISY B., CASTILLO U. et HARPER J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, **67**, 257-268.
- STROBEL G.A. (2002).** Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22**, 315-333.
- SUMANTHA A., LARROCHE C. et PANDEY A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, **244**, 211-220.
- SUMITANI J. I., TOTTORI T., KAWAGUCHI T. et ARAI M. (2000).** New type of starch-binding domain : the direct repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus sp.* n°195 α -amylase contributes of starch degrading. *Biochemistry*, **35**, 477-484.
- SUNG G.H., HYWEL-JONES N.L., SUNG J.M., LUANGSA-ARD J.J., SHRESTHA B. et SPATAFORA J.W. (2007).** Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the Clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol.*, **57**, 5-59.
- SUNITHA V.H., NIRMALA D. et SRINIVAS C. (2013).** Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **9** (1), 01-09.
- SURYANARAYANAN T.S., THIRUNAVUKKARASU N., GOVINDARAJULU M.B. et GOPALAN V. (2012).** Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*, **54**, 19-30.
- TALAMOND P., DESSEAUX V., MOREAU Y., SANTIMONE M. et ARSEILLEMOUREN G. (2002).** Isolation, characterization and inhibition by acarbose of the alpha-amylase from *Lactobacillus* fermentation: comparison with *Lb.Manihotivorans* and *Lb.Plantarum* amylases. *Comparative Biochemistry and Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, **133** (3), 351-60.
- TOBE S., TAKAMI T., IKEDA S. et HORIKOSHI K. (1976).** Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. *Agriculture, Biology and Chemistry*, **40**, 1087-1092.
- TOLAN J-S. (1996).** Pulp and paper ; in : « Industrial enzymology » Godfrey T and West S. (eds.), Stockton Press, 2^{eme} ed., New York.

- TRIBST A.A.L. et CRISTIANINI M. (2002).** High pressure homogenization of a fungi α -amylase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **13**, 107-111.
- ÜLGER C. et ÇURAKOG Ç. (2001)** α -amylase production by *Bacillus Subtilis* and *B. amyloliquefaciens* in different PEG solution. *Microbiology and Biotechnology*, **17**, 93-94.
- UL-HAQ I., MUKHTAR H., DAUDI S., SIKANDER A. et QUADEER M. A. (2003).** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab Conditions. *Biotechnology*, **2** (1), 30-36.
- VALLIER, P., BATA, J. et COLABERT L. (1977).** Optimal conditions of alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* in liquid media. *Annals of Microbiology (Paris)*, **128** (3), 359-371.
- VAN DER MAAREL M.J., VAN DER VEEN B., UITDEHAAG J.C.M., LEEMHUIS H. et DIJKHUIZEN L. (2002).** Properties and applications of starch converting enzymes of alpha-amylase family. *Biotechnology*, **94**, 55-137.
- VAYSSIER J.J. et VEAU P.Y. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson, Paris, **8**, 210-220.
- VUKELIE B., RITONJA A., RENKO M., POKORNY M. et VITALE L. J. (1992).** Extracellular α -amylase from *Streptomyces rimosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **37**, 202-204.
- WHITE J.F., REDDY P.V. et BACON C.W. (2000).** Biotrophic endophytes of grasses: a systematic appraisal. *Microbial endophytes*, **3**, 49-62.
- WU T.Y., MOHAMMAD A.W., JAHIM J.Md. et ANUAR N. (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 1223-1229.
- ZABALGOGEAZCOA I. (2008).** Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **6**, 138-146.
- ZERROUG A. (2011).** Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.). Diplôme de Magister, Université Ferhat ABBAS, Sétif, Algérie.
- ZHANG H.W., SONGY. C. et TAN R. X. (2006).** Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, **23**, 753-771.
- ZOUBIRI L. (2001).** Production d' α -amylase par des moisissures cultivées sur milieu à base de rebuts de dattes. Diplôme de Magister, Université MENTOURI, Constantine, Algérie.



Annexes

Annexes

Annexe 01 : Milieu PDA

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	20g
Agar.....	20g
Eau distillée	1L

Annexe 02 : Milieux synthétiques solide pour la recherche de production d'amylases et de protéases

1. Milieu synthétique à l'amidon

Amidon soluble	5g
Extrait de levure	0,75g
Extrait de viande.....	0,75g
Peptone.....	2,5g
NaCl	2,5g
MgSO ₄	0,25g
KH ₂ PO ₄	0,25g
Agar	7,5 g
Eau distillée	qsp 500 ml

2. Milieu synthétique à la gélatine

Gélatine	5g
Extrait de viande.....	0,75g
Peptone.....	2,5g
NaCl	2,5g
Agar	7,5 g
Eau distillée	qsp 500 ml

Les différents composants sont solubilisés à ébullition dans le bain-marie puis stérilisés à 120°C pendant 15min.

Annexe 03 : Solution de mises en évidence des activités enzymatiques

1. Lugol

Iode	0,3g
Iodure de potassium.....	3g
Eau distillée	qsp 100 ml

Après homogénéisation, transférer dans un flacon couvert d'aluminium et conserver à 4°C.

2. Solution de chlorure mercurique

Chlorure de mercure (HgCl_2).....	15g
HCl (7M).....	20ml
Eau distillée	qsp 100 ml

Après homogénéisation, transférer dans un flacon et conserver à 4°C.

Annexe 04 : Milieux de fermentation pour la production d'enzymes

1. Milieu de fermentation pour la production d'amylases

Amidon soluble	5g
Extrait de levure	0,75g
Extrait de viande.....	0,75g
Peptone.....	2,5g
NaCl	2,5g
MgSO_4	0,25g
KH_2PO_4	0,25g
KCl.....	0,25g
Eau distillée	qsp 500 ml

2. Milieu de fermentation pour la production de protéases

Gélatine	5g
Extrait de viande.....	0,75g
Peptone.....	2,5g
NaCl	2,5g
MgSO_4	0,25g
KH_2PO_4	0,25g
KCl.....	0,25g
Eau distillée	qsp 500 ml

Dissoudre les composants par simple agitation. Par la suite, répartir dans des flacons de 500ml contenant chacun 50ml de milieu, puis stériliser à 120°C pendant 15 min.

Annexe 05 : Mode opératoire de la méthode de LOWRY *et al.* (1951)

1. Solutions utilisées pour le dosage

1.1. Solution alcaline A

Carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3)	5g
NaOH (0,1 N).....	qsp 250 ml

1.2. Solution cuivrique B

Solution CuSO_4 (0,32g/100ml H_2O).....	4ml
---	-----

Solution de tartrate double de sodium et de potassium (1g/100ml)..... 4ml

1.3. Solution C

Solution cuivrique B..... 2 ml

Solution alcaline A 100 ml

1.4. Solution mère de BSA

BSA..... 0,01g

Eau distillée qsp 100 ml

2. Gamme étalon de BSA

A partir de la solution mère de BSA, différentes dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

Concentration en BSA (mg/ml)	0	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1
Solution mère de BSA (µl)	0	100	250	500	750	1000
Eau distillée (µl)	1000	900	750	500	250	0

Annexe 06 : Réactif et solution tampon pour le dosage de l'activité amylolytique

1. Réactif DNS

DNS..... 1g

Solution NaOH 2N 20 ml

Solution de tartrate double de sodium et de potassium (3g/50 ml)..... 50 ml

Eau distillée qsp 100 ml

2. Tampon phosphate pH 5

Solution KH_2PO_4 (0,9073g/100 ml H_2O)..... 99,2 ml

Solution Na_2HPO_4 (0,5935g/100 ml H_2O)..... 0,8 ml

3. Gamme étalon de maltose

A partir de la solution mère de BSA, différentes dilutions (de volume final de 2ml) sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

Concentration en maltose (mg/ml)	0	0,125	0,250	0,5	1	2
Solution mère de maltose (µl)	0	125	250	500	1000	2000
Eau distillée (µl)	2000	1875	1750	1500	1000	0

Annexe 07 : Solutions utilisées pour le dosage de l'activité protéolytique

1. Tampon phosphate pH 8

Solution KH_2PO_4 (0,9073g/100 ml H_2O)..... 3,7 ml

Solution Na_2HPO_4 (0,5935g/100 ml H_2O)..... 96,3 ml

2. Solution mère de tyrosine

Tyrosine..... 0,01g

Eau distillée qsp 100 ml

3. Gamme étalon de tyrosine

A partir de la solution de tyrosine, différentes dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

Concentration en tyrosine (mg/ml)	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Solution mère de tyrosine	0	200	400	600	800	1000
TCA 4%	1000	800	600	400	200	0

Annexe 08 : Différentes solutions tampons pour les variations du pH

1. Tampon glycine

Glycine 0,4 g

Eau distillée qsp 100 ml

Ajuster le pH avec du HCl 4M ou NaOH 4M aux pH voulus.

2. Tampon phosphate pH 6

Solution KH_2PO_4 (0,9073g/100 ml H_2O)..... 88,9 ml

Solution Na_2HPO_4 (0,5935g/100 ml H_2O)..... 11,1 ml

3. Tampon phosphate pH 7

Solution KH_2PO_4 (0,9073g/100 ml H_2O)..... 41,3 ml

Solution Na_2HPO_4 (0,5935g/100 ml H_2O)..... 58,7 ml

Annexe 09 : Tampons et solutions utilisés en électrophorèse

1. Gel de séparation à 12%

Solution acrylamide/bis 40% 2,28 ml

H_2O 3,22 ml

Tampon Tris-HCl pH 8,8..... 1,87 ml

SDS 10% 75 μl

Persulfate d'ammonium 10%..... 90 μl

TEMED 11 μl

2. Gel de concentration 4%

Solution acrylamide/bis 40% 500 μl

H_2O 3,2 ml

Tampon Tris-HCl pH 6,8.....	1,25 ml
SDS 10%	50 µl
Persulfate d'ammonium 10%.....	90 µl
TEMED	11 µl

3. Tampon d'échantillon

Tampon Tris-HCl pH 6,8.....	500 µl
SDS 10%	250 µl
2-mercaptoéthanol	50 µl
Bleu de bromophénol.....	quelques grains