

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université de Blida 1-Saad Dahlab
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Département De Biotechnologie
Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique
Option : Biotechnologie Microbienne

**Aptitude de quelques isolats fongiques à produire des enzymes d'intérêt
biotechnologique**

Présenté par :

Mr. Adel MESSAR

Soutenu devant les membres de jury :

Mme N. BENOUSSAID	Présidente	M.C.B	U. BLIDA 1.
Mme L. TAFIFET	Examinatrice	M.C.B	U. BLIDA 1.
Mme F. MOHAMED MAHMOUD	Promotrice	M.C.A	U. BLIDA 1.
Mme H. DJELLOUT	Co promotrice	M.C.B	U. BLIDA 1.

Année Universitaire 2021/2022

REMERCIEMENT

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

En second lieu, je tiens à remercier ma promotrice Mme F.Mohamed Mahmoud pour m'avoir proposé ce sujet, et de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage pratique. Je tenais aussi à l'a remercié de sa disponibilité, son aide, ses précieux conseils et suggestions et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer malgré ses charges académiques et professionnelles.

Je tiens aussi a remercié m'a co-promotrice Mme H.Djellout de m'avoir accompagné, aidé et soutenue.

Mes plus sincères remerciements à Mme N.Benousaid de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ce mémoire de Master.

Mes vifs remerciements vont également à Mme L.Tafifet d'avoir accepté d'examiner mon travail et de l'enrichir par ses propositions.

Mes remerciements à Mme Selma l'ingénieur du laboratoire de Protection et de Valorisation des ressources Agrobiologique (LPVRB) pour son aide ainsi que son encouragement.

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

Mes parents ;

Mes deux sœurs ;

Ma famille ;

Mes professeurs de l'Université de Blida 1 ;

Mes camarades de la promotion ;

Mes amis (es).

RÉSUMÉ

La présente étude s'intéresse à la recherche d'une aptitude de synthèse d'enzymes extracellulaire à intérêt biotechnologique à partir des souches fongiques isolées et identifier à partir du sol rhizosphérique de quatre variétés de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) provenant de la région de Taghit.

L'isolement de cette population fongique est réalisé à partir de 4 cultivars (Biskra, Feggous, Cherka et Ras el Hmar). 31 isolats fongiques ont été obtenus et ont subi une identification sur la base des caractéristiques macroscopique. La majorité des isolats obtenues 83.87% proviennent de la variété de cultivar de Biskra. Une diversité fongique et a abouti à leur classement en 11 groupes ou morphotype. Le morphotype du groupe 1 est le plus abandon 32,26%.

La sélection de 13 souches fongique sur les 31 isolats et ont subi une caractérisation microscopique afin de les identifier. La dominance du genre *Aspergillus* et *Penicillium* a été constaté.

La détermination de l'activité enzymatique des souches fongiques a été réalisé sur la base du test qualitatif pour déterminer leurs capacités de production d'enzymes extracellulaires (Chitinase, phosphatase, amylase, lipase, estérase, pectinase, protéase.)

Les résultats ont été obtenus au niveau du laboratoire de Protection et de Valorisation des ressources Agrobiologique (LPVRB) et montrent une forte aptitude de deux souches *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp. a dégradé 71,43% les substrats . La souche de *Fusairum* sp. a eu le plus bas taux 28,5% de capacité métabolique à synthétisés des enzymes extracellulaire. Les résultats obtenus démontrent la capacité des 13 souches testé de solubiliser le phosphate et démontrent leurs incapacités a synthétisé l'enzyme protéase.

Mot clés : Biotechnologie, champignon rhizosphérique, enzyme extracellulaire, *Phoenix Dactylifera L.*

ملخص

ترتكز هذه الدراسة على البحث عن قدرة وهيئة الإنزيمات خارج الخلية ذات الأهمية في ميدان التكنولوجيا ابتداء من العازلات الفطرية. يعتمد هذا العمل على عزل والتعرف على الفطريات من التربة الرايزوسفيرية لجذور أربعة أنواع من نخيل التمر (*Phoenix dactylifera L*) من منطقة تاغيث.

تم عزل هذه العشيرة الفطرية من 4 أصناف (بسكرة، فيجوس، شركه، رأس الحمر). تم الحصول على 31 عزلة فطرية وتم التعرف عليها بناء على الخصائص العينية. حصلت غالبية العازلات على 83.87% من صنف بسكرة. لوحظ تنوع فطري وتم تصنيف هذه العازلات إلى 11 مجموعات حسب نمط شكلي محدد. النوع morphotype للمجموعة 1 هو الأكثر شيوعاً بنسبة 32.26%.

تم اختيار 13 عازلة فطرية على 31 عزلة ثم تنقيتها لإجراء توصيفها المجهرى للتعرف عليها. لوحظ هيمنة جنس *Aspergillus* *et Penicillium*

تم الحصول على النتائج على مستوى مختبر (LPVRB) وتحديد النشاط الإنزيمي للعازلات الفطرية المميزة مجهرياً على أساس اختبار نوعي لتحديد إنتاج الإنزيمات خارج الخلية.

النتيجة التي تم الحصول عليها بينت قدرة قوية لسلاطين (*Penicillium sp. Aspergillus niger*) على تدهور حوالي 71.43% من الوسائط المختبرة. سلالة *Fusarium sp.* كان لديه أقل قدرة على استقلابية مبكرة لإنتاج إنزيمات خارج الخلية فقط بقدرة إنزيمية قدرها 28.5%.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها قدرة السلالات الـ 13 التي تم اختبارها على ذوبان الفوسفات وإثبات عدم قدرتها على تصنيع إنزيم البروتياز.

الكلمات المفتاحية:

التربة ، الجذور ، فطر الجذور ، العازلة الفطرية ، الإنزيم خارج الخلية ، القدرة الأنزيمية ، *Phoenix Dactylifera L* ، التكنولوجيا الحيوية

Abstract

Abstract

This study focuses on the search for an ability to synthesize extracellular enzymes of biotechnological interest from fungal isolates. This work is based on the isolation and identification of fungi from the rhizospheric soil of four varieties of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) from the Taghit region.

The isolation of this fungal population is carried out from 4 cultivars (Biskra, Feggous, Cherka and Ras El Hmar). 31 fungal isolates were obtained and underwent identification based on macroscopic characteristics. The majority of the isolates obtained 83.87% come from the Biskra cultivar variety. A fungal diversity is observed and these isolates have been classified into 11 groups according to a very specific morphotype. The morphotype of group 1 is the most abandoned with 32.26%.

The selection of 13 fungal isolates was carried out on the 31 purified to carry out their microscopic characterization in order to identify them. The dominance of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* was noted.

The determination of the enzymatic activity of fungal isolates characterized microscopically was made on the basis of qualitative test to determine the production of extracellular enzymes.

The results were obtained at the Laboratory of Protection and Valorization of Agrobiological Resources (LPVRB) and show a strong ability of two strains (*Aspergillus niger* and *Penicillium* sp.) to degrade 71.43% of the media tested. The strain of *Fusarium* sp. had the lowest early metabolic ability to produce extracellular enzymes only an enzymatic ability of 28.5%.

The results obtained show the ability of the 13 strains tested to solubilize phosphate and demonstrate their inability to synthesize the protease enzyme.

Key words: *Phoenix Dactylifera L.*, rhizospheric fungus, fungal isolate, extracellular enzyme, enzymatic ability, biotechnology.

Liste des abréviations utilisées

Liste des abréviations utilisées

A. : *Aspergillus*

J.C.: Jésus Christ

FAO: Food and Agriculture Organization

LRZA : Laboratoire de Recherche des Zones Arides

Foa : *Fusarium oxysporum* f.sp.*albédinis*

PGPF: Plant Growth Promoting Fungi

ISR: résistance systémique induite

ACCD: 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase

EPF: Entomopathogenic fungi

P. : *Penicillium*

PUC : protéine unicellulaire

PDA : Potato Dextrose Agar

LPVRB : Protection et de Valorisation des ressources Agrobiologique

PVK: Pikovskaya

GYP: Glucose Yeast Extract Peptone

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I.....	3
Synthèse bibliographique	3
CHAPITRE I : Synthèse bibliographique	4
I.1. Généralité sur le palmier dattier.....	4
I.1.1-Historique et définition	4
I.1.2-Importance du palmier dattier pour l'agriculture algérienne.....	4
I.1.3-Problèmes agricoles actuels	5
I.2. La flore fongique du sol.....	6
I.2.1-Le sol	6
I.2.2-Notion de biomasse microbienne du sol.....	6
I.3- Généralité sur la rhizosphère	7
I.3.1- La rhizosphère	7
I.3.2-Les composantes reconnues dans la rhizosphère	7
I.3.3-Les activités rhizosphériques	8
I.4-Communauté fongique de la rhizosphère	9
I.4.1-Les Champignons	9
I.5. Les enzymes fongiques en biotechnologie.....	14
I.5.1. Les enzymes en industrie	14
I.5.2. Intérêts de la recherche des enzymes fongiques.....	15
I.5.3. Définition, source et intérêts de différents enzymes fongiques.....	17
Chapitre II : Partie Expérimentale -Matériel et Méthodes	26
II. Matériel et méthodes.....	26
II.1. Matériel.....	26
II.1.1. Matériels biologiques.....	26
II.1.2. Matériels non biologiques.....	27
II.2. Méthodes	27
II.2.1. Isolement des champignons du sol rhizosphérique de palmier dattier.....	27
II.2.2. Dénombrement et sélections des isolats fongiques.....	30
II.2.3. Purification des champignons isolés.....	30
II.2.4. Caractérisation morphologique des isolats fongiques.....	31
II.2.5. Détermination de l'activité enzymatique	31
II.2.5.1. Chitinase	31
II.2.5.2. Phosphatase.....	32

Table des matières

II.2.5.3. Pectinase	32
II.2.5.4. Amylase	32
II.2.5.5. Protéase.....	33
II.2.5.6. Lipase.....	33
II.2.5.7 Estérase :.....	33
Chapitre III : Résultats et discussions	35
III.1. Dénombrement et purification de la flore fongique rhizosphérique.....	35
III.1.1. Dénombrement de la flore microbienne	35
III.1.2. Sélection des isolats fongiques.....	36
III.1.3. Purification des champignons isolés :	37
III.2. Caractérisation macroscopique et microscopique de la flore fongique rhizosphérique	38
III.2.1. Caractérisation macroscopique	38
III.2.2. Caractérisation microscopique	49
III.3 Détermination de l'activité enzymatique.....	55
III.3.1 Activité Chitinasique	55
III.3.2 Activité phosphatasique.....	57
III.3.3. Activité amylolytique	58
III.3.4 Activité lipasique.....	60
III.3.5 Activité estérasique :	61
III.3.6 Activité pectique.....	63
III.3.7. Activité protéolytique.....	64
III.4. Comparaison de l'aptitude enzymatique des souches	66
Conclusion.....	68
References bibliographies	
Annexes	

Liste des figures

Numéro figure	Intitulé	Page
1	Carte de l'Algérie indiquant les différentes zones de palmiers dattiers ; ceux en rouges sont infestés de bayoud, ceux en vert sont non infestés	05
2	Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère	07
3	Représentation schématique des interactions mutualistes entre la plante (autotrophe) et les microorganismes (hétérotrophes) et entre les microorganismes eux-mêmes au sein de la rhizosphère	08
4	Mode d'actions des PGPF	12
5	Les applications des champignons entomopathogènes et leurs principaux effets	13
6	Part du marché mondial des enzymes par application	14
7	Différentes étapes d'isollements des champignons rhizosphériques	29
8	Schéma de l'isolement des champignons à partir du sol rhizosphérique	30
9	Répartition du nombre d'isolats purifiés à partir du sol rhizosphérique des quatre variétés du palmier dattier	37
10	Répartition des isolats selon leurs morphotypes.	49
11	Observation macroscopique et microscopique de TB8121 <i>Fusarium</i> sp.	49
12	Observation macroscopique et microscopique de TB1121 <i>Penicillium</i> sp.	50
13	Observation macroscopique et microscopique de TB4121 <i>Apergillus</i> sp.	50
14	Observation macroscopique et microscopique de TB221 <i>Penicillium</i> sp.	50
15	Observation macroscopique et microscopique de TB241 <i>Penicillium</i> sp.	51
16	Observation macroscopique et microscopique de TB1241 <i>Aspergillus</i> sp.	51
17	Observation macroscopique et microscopique de TB521 <i>Penicillium</i> sp.	51
18	Observation macroscopique et microscopique de TC241 <i>Aspergillus</i> sp.	52
19	Observation macroscopique et microscopique de TC242 <i>Aspergillus</i> sp.	52
20	Observation macroscopique et microscopique de TR41 <i>Penicillium</i> sp.	52
21	Observation macroscopique et microscopique de TB5121 <i>Penicillium</i> sp.	53
22	Observation macroscopique et microscopique de TB721 <i>Aspergillus niger</i>	53
23	Observation macroscopique et microscopique de TB5221 <i>Penicillium</i> sp.	53
24	Histogramme démontrant le nombre de souche par genre	54
25	Activité chitinasique des champignons rhizosphériques testés.	56
26	Activité phosphatasique des champignons rhizosphériques testés.	57
27	Activité amylolytique des champignons rhizosphériques testés.	59
28	Activité lipasique des champignons rhizosphériques testés.	61
29	Activité estérasique des champignons rhizosphériques testés.	62
30	Activité pectique des champignons rhizosphériques testés.	64
31	Activité protéolytique des champignons rhizosphériques testés	65
32	Aptitude enzymatique des meilleures souches selon les genres testés	67

Liste des tableaux

Numéro tableau	Intitulé	Page
1	Source des enzymes fongique	15-16
2	Les champignons ayant une activité protéolytique	24
3	Codes des échantillons étudiés	26
4	Résultats du dénombrement de la flore fongique totale du sol rhizosphérique.	35
5	Résultats du dénombrement de la flore fongique microbienne sur milieu PDA	36
6	Résultat du nombre d'isolats fongiques sélectionner	37
7	Caractérisation macroscopique du groupe 1	38-40
8	Caractérisation macroscopique du groupe 2	41-42
9	Caractérisation macroscopique du groupe 3	43
10	Caractérisation macroscopique du groupe 4	44
11	Caractérisation macroscopique du groupe 5	45
12	Caractérisation macroscopique du groupe 6	46
13	Caractérisation macroscopique des morphotypes représenté par un seul isolat (Groupe 7 à 11)	47-48
14	Résultats de l'activité Chitinasique des différentes isolats	55
15	Résultats de l'activité phosphatasique des différents isolats	56
16	Résultats de l'Activité amylolytique des différentes isolats	58
17	Résultats de l'Activité lipasique des différents isolats	60
18	Résultats de l'activité estérasique des différents isolats	62
19	Résultats de l'activité pectique des différents isolats	63
20	Résultats de l'activité protéolytique des différents isolats	65

INTRODUCTION

Dans le sol, la rhizosphère associée aux plantes, plus spécialement le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) représente l'écosystème le plus dynamique, offrant une association étroite entre les racines des plantes et les communautés microbiennes associées à la rhizosphère. Parmi les microbiotes qui colonisent la rhizosphère, les champignons rhizosphériques occupent une place prépondérante mais sont moins explorés que les bactéries rhizosphériques (Pattnaik et Busi., 2019)

Les champignons rhizosphériques, constitue une interface complexe qui utilise les nutriments libérés par la plante hôte et établit une plateforme pour l'interaction complexe entre la plante, le sol et les champignons rhizosphérique qui l'habitent pour le fonctionnement de l'écosystème et la durabilité environnementale. Ils présentent un large éventail d'applications dans les domaines de la biomédecine, de la pharmacie, de l'industrie (en particulier les industries alimentaire) et de l'agriculture pour maintenir la stabilité du fonctionnement de l'écosystème et la durabilité de l'environnement (Pattnaik et Busi., 2019).

Les enzymes dérivées des champignons présentent d'immenses propriétés physicochimiques telles qu'une efficacité catalytique élevée, une spécificité accrue du substrat, un temps de réaction plus court, un faible apport énergétique et des conditions de réaction douces et écologiques (Senthivelan et *al.* 2016).

Les enzymes fongiques se caractérisent par une puissance de production élevée, des exigences de purification et de séparation plus faciles, en particulier pour les champignons filamenteux, et une catalyse efficace avec une stabilité souhaitée contre les conditions difficiles (El-Gendi et *al.*, 2021).

Les enzymes jouent un rôle important dans les défis que l'humanité doit relever pour utiliser les systèmes biologiques dans un large éventail de domaines. Actuellement, les enzymes fongiques représentent plus de 50 % du marché total des enzymes (Kango et *al.*, 2019).

Cette énorme part de marché est largement attribuée à quelques espèces des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* qui répondent aux exigences de la production d'enzymes à l'échelle commerciale (El-Gendi et *al.*, 2021).

La croissance rapide du marché des enzymes a nécessité la recherche continue de nouveaux producteurs d'enzymes ayant des caractéristiques industrielles souhaitables.

Récemment, la culture des champignons a représenté un concurrent prometteur dans la production d'enzymes en termes de productivité plus élevée et de coût d'investissement plus faible (Kumla et *al.*, 2020).

Dans ce contexte s'intitule le présent travail basé sur l'isolement et la caractérisation de la flore fongique du sol rhizosphérique du palmier dattier (*Phoenixdactylifera* L.) de la région de Taghit (Wilaya de Bechar) sud Algérie et sur la capacité de quelques souches de synthétiser des enzymes d'intérêt biotechnologique.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

I.1. Généralité sur le palmier dattier

I.1.1-Historique et définition

Le palmier dattier fait partie des arbres fruitiers les plus anciennement cultivés, ses fruits sont un merveilleux aliment grâce à leurs effets toniques et légèrement laxatifs. Les archives les plus anciennes en Mésopotamie (Irak actuellement) montrent que sa culture se pratiquait depuis 3500 ans avant J.C. Dans la même époque, les dattiers étaient cultivés en Irak occidental, à travers l'Arabie Saoudite et jusqu'en Afrique du Nord (Mazoyer, 2002).

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante monocotylédone qui appartient à la famille des *Arecaceae*. Il a une longue histoire de culture et d'utilisation en Afrique du Nord et au Moyen- Orient. Cette plante à d'immenses valeurs socioéconomiques (ressource essentielle pour la sécurité alimentaire), environnementales et écologiques (réservoir clé de la biodiversité), en particulier dans les régions arides et semi-arides du monde (Kriaa et *al.*, 2012).

I.1.2-Importance du palmier dattier pour l'agriculture algérienne

Le palmier dattier est cultivé dans de nombreuses oasis réparties dans le sud du pays, où le climat est chaud et sec. Les oasis sont des espaces de vie implantés artificiellement au milieu d'une vaste zone aride où l'eau est présente. Dans ces endroits, unksar (un village en argile) a été construit et des palmiers dattiers ont été plantés autour. Ces systèmes oasiens de production intensive complexe se maintiennent avec un équilibre très fragile. Compte tenu de la géographie de l'Algérie, il est possible de décrire plusieurs régions de culture du palmier dattier (figure 1) (Bouguedoura et *al.*, 2015).

Selon la FAO, la production de dattes en Algérie était estimée à 1,4 million de tonnes en 2019 (FAOSTAT, 2020). Les produits fabriqués à partir de dattes en Algérie sont les Jus, le vinaigre et les bonbons. Ces derniers sont considérés comme une valeur ajoutée pour les variétés de dattes ayant une faible valeur économique et souffrent d'un gaspillage accru. La première unité de production industrielle de sucre liquide à partir de dattes a démarré à Biskra en 2018 (Organisation arabe pour le développement agricole Développement, 2019).

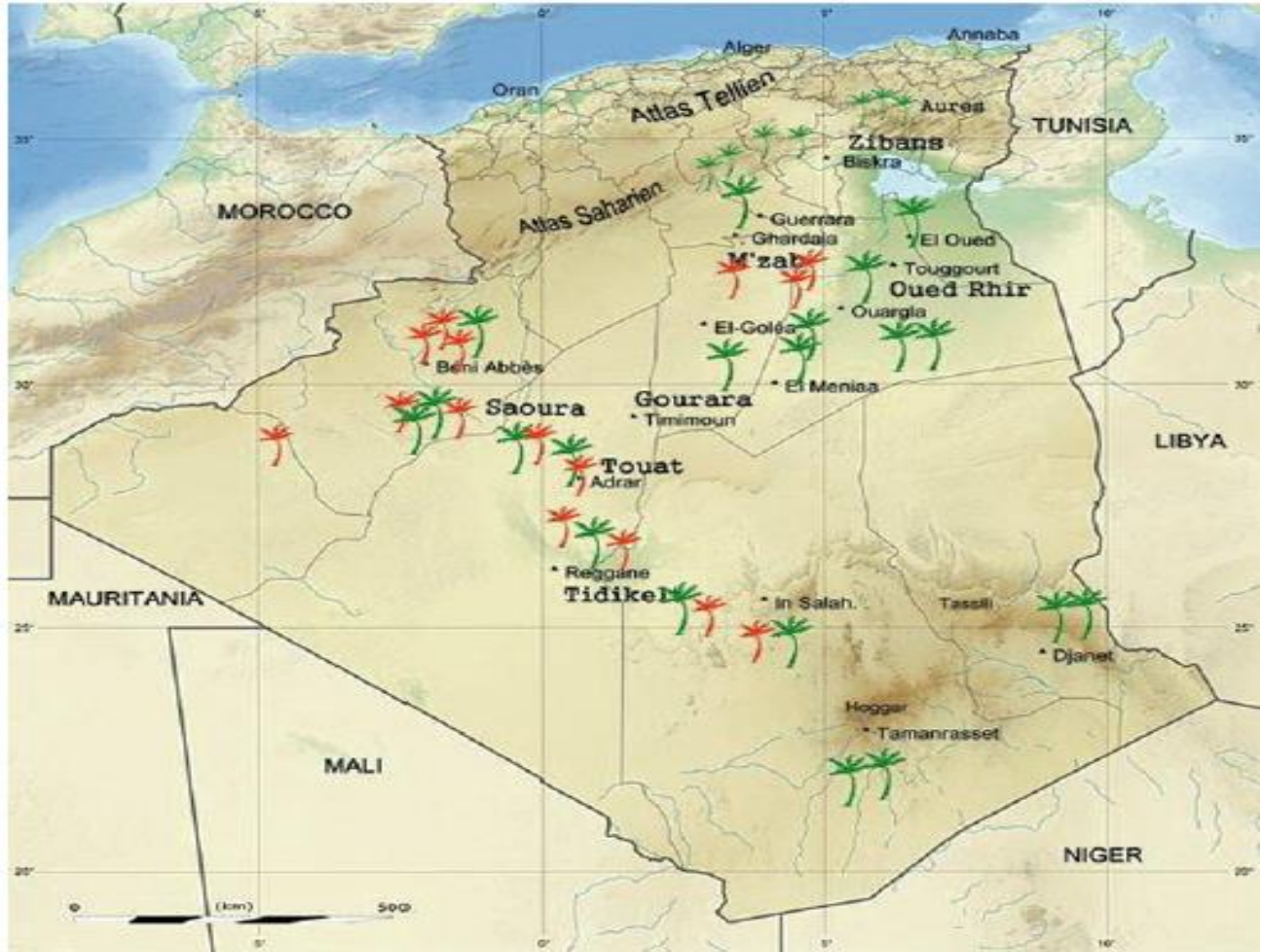


Figure 1 : Carte de l'Algérie indiquant les différentes zones de palmiers dattiers ; ceux en rouges sont infestés de bayoud, ceux en vert sont non infestés (Source : Laboratoire de Recherche des Zones Arides (LRZA), (Bouguedoura et al., 2015).

I.1.3-Problèmes agricoles actuels

Le palmier dattier est l'espèce clé de voûte de l'écosystème oasien algérien qui est affecté par de multiples facteurs : l'érosion génétique due à la maladie du bayoud causée par un champignon du sol, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albédinis* (Foa). Par ailleurs, la population humaine de la région saharienne algérienne a quadruplé au cours des 30 dernières années, ce qui a créé des pressions démographiques. Par conséquent, l'urbanisation augmente au détriment des palmeraies. La progression de la désertification et l'avancée des dunes de sable menaçant les oasis, la salinisation du sol et de l'eau due à une mauvaise gestion du drainage, entraîne une réduction du nombre de palmiers et du rendement des fruits. Enfin, le vieillissement de nombreux palmiers

dattiers ainsi que les maladies provoquant la dégénérescence des palmiers dattiers ont entraîné des altérations de la qualité des fruits et une baisse importante des rendements. Depuis de nombreuses années, les agriculteurs délaissent les dattes au profit de cultures plus rémunératrices comme les légumes (Bouguedoura et *al.*, 2015).

I.2. La flore fongique du sol

I.2.1-Le sol

Le sol est un environnement complexe caractérisé par une grande diversité de microorganismes, de composés chimiques et une structure physique complexe (Wild, 1993). Il est également, le substrat qui fournit un soutien physique et des éléments minéraux pour les plantes constituant un élément fondamental pour l'écosystème terrestre (Nehl et *al.*, 2006).

I.2.2-Notion de biomasse microbienne du sol

La biomasse microbienne du sol est un compartiment à la fois stockeur de constituants essentiels comme le carbone, l'azote et le phosphore et un transformateur des nutriments. Elle est donc importante aux cycles continus des nutriments et à la régulation du compartiment sol de l'écosystème (Cairney,2000).

La biomasse microbienne est considérée comme le compartiment essentiel de transformations de la matière organique dans le sol. Elle est aussi considérée comme le critère biologique le plus fiable et le plus discriminant pour juger rapidement l'état de fertilité des sols (Cheloufi et Jacquin, 2003).

Les microorganismes du sol remplissent un rôle important dans les cycles biogéochimiques, en conditionnant l'efficacité et les mécanismes de l'utilisation de la matière organique du sol. Le sol abrite de nombreux être vivant comme les bactéries, les champignons, les actinomycètes...etc (Bowles et *al.*,2014).

Les populations microbiennes du sol sont immergées dans un cadre d'interactions connues pour affecter la santé des plantes et la qualité du sol. Elles sont impliquées dans des activités fondamentales qui assurent la stabilité et la productivité des systèmes agricoles et des écosystèmes naturels. La recherche stratégique et appliquée a démontré que certaines activités microbiennes coopératives peuvent être exploitées, comme une biotechnologie, pour contribuer à des pratiques agro-technologiques durables, respectueuses de l'environnement et de l'environnement. De nombreuses recherches visent à améliorer la compréhension de la diversité, de la dynamique et de l'importance des populations microbiennes de la rhizosphère (Barea et *al.*, 2005)

I.3- Généralité sur la rhizosphère

I.3.1- La rhizosphère

Le terme ‘rhizosphère’ a été introduit en 1904 par Lorenz Hiltner. Il a défini la rhizosphère comme étant la région du sol située sous les racines des plantes et soumise à leur influence directe et un lieu d'intenses échanges (Faure,2018). Du fait de sa richesse en éléments nutritifs, la rhizosphère contient ainsi 10 à 100 fois plus de microorganismes par gramme de sol que le sol non rhizosphérique (Lopez, 2018).

Ainsi, la rhizosphère est considérée comme un système complexe, hétérogène, dynamique et interactif, qui dépasse la simple notion d’interface entre le monde végétal et le monde minérale (Michel et *al.*, 2005). Cependant, cette mince couche peut être affecté par les contraintes du sol, sa salinisation, sa pollution ou encore par des phénomènes d’acidification (Anoua et *al.*, 1997).

I.3.2- Les composantes reconnues dans la rhizosphère

La rhizosphère est divisée en trois zones : l’endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplane (surface des racines) et l’ectorhizosphère (sol adhérent aux racines ou sol rhizosphérique (figure 2) (Nguyen,2003).

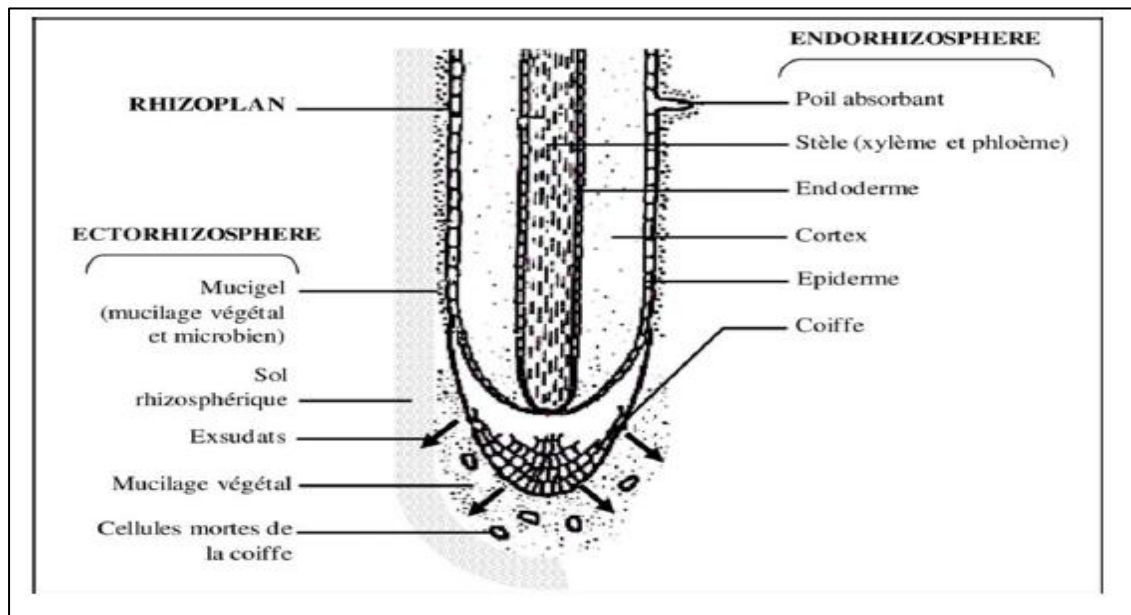


Figure2 : Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (Nguyen, 2003).

I.3.3-Les activités rhizosphériques

Des phénomènes écologiques particuliers se manifestent au niveau de la rhizosphère (figure 3). En effet, les racines sécrètent une quantité importante de matières organiques sous forme de mucilage, d'exsudats et plus de 40% des produits de photosynthèse passent au niveau du système racinaire (Lepinay, 2013).

L'exsudation est employée généralement d'une manière abusive comme synonyme de rhizo-déposition. Elle indique en fait la diffusion passive hors des cellules de composés solubles de faible poids moléculaire, par exemple des sucres ou des acides aminés, qui sont rapidement métabolisés par les microorganismes. Les exsudats racinaires décrivent un élément clé dans les échanges entre la plante et les rhizobactéries, dont la densité et la diversité est en liaison directe avec la nature et la quantité des exsudats racinaires, cette influence se manifeste par une modification de la croissance de la plante (Aouar, 2012).

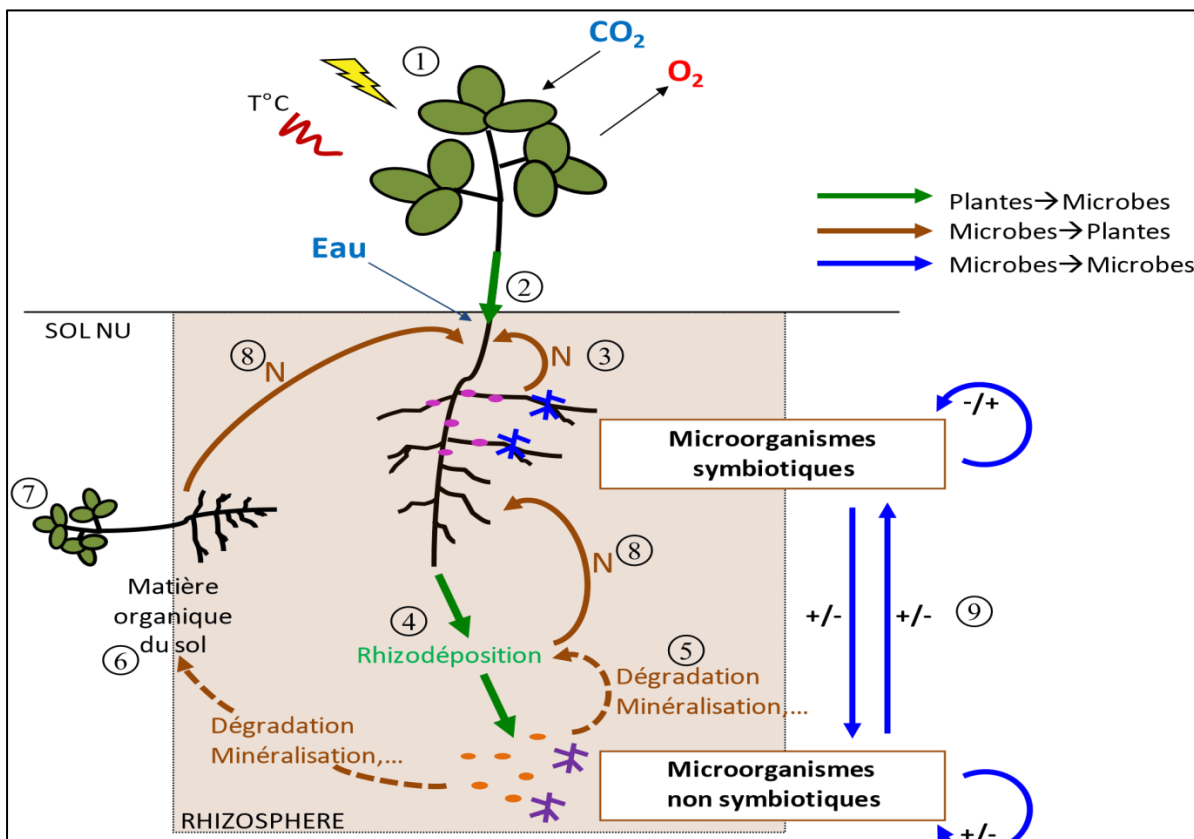


Figure 3 : Représentation schématique des interactions mutualistes entre la plante (autotrophe) et les microorganismes (hétérotrophes) et entre les microorganismes eux-mêmes au sein de la rhizosphère (Lepinay, 2013).

I.4-Communauté fongique de la rhizosphère

I.4.1-Les Champignons

Les champignons ou mycètes (du latin *fungus*, et du grec *sphongos*= éponge) sont classés dans le règne des *Fungi* (Falandysz et Borovička, 2013). Ce sont des organismes eucaryotes caractérisés par une paroi cellulaire contenant la chitine constituée de résidus N-acétylglucosamine, polysaccharide présent surtout chez les insectes (Breuil, 2009). Leur appareil végétatif est composé de filaments ou hyphes et leur reproduction sexuée et/ou asexuée (Breuil, 2009).

Les champignons sont hétérotrophes du point de vue métabolique, ils se nourrissent par résorption de la matière organique élaborée par d'autres organismes autotrophes. Ils sécrètent des enzymes dans le milieu qui digèrent les divers composés organiques qui les entourent et les réduisent en petites molécules solubles. Celles-ci diffusent à travers les parois de leurs hyphes (Gupta, 2004).

Les champignons peuvent être subdivisés en champignons inférieurs et champignons supérieurs. Les champignons inférieurs ou les micromycètes sont unicellulaires et constituent un groupe hétérogène. Alors que les champignons supérieurs ou les macromycètes sont divisés en deux groupes : les Ascomycètes et les Basidiomycètes (Thaung, 2007).

I.4.1.1-Modes de vie des champignons

Les champignons sont répartis en plusieurs catégories selon leur mode de vie (Eyi Ndong et *al.*, 2011).

-Les saprophytes

Les champignons saprophytes se nourrissent en dégradant les matières organiques mortes d'origine végétale ou animale, ils représentent la majorité des macromycètes (Senn-Irletet *al.*, 2012). Il existe plusieurs types de champignons saprophytes : les humicoles qui décomposent la matière organique du sol, les lignicoles sont ceux qui décomposent la matière organique du bois mort, les saprophytes de la litière décomposant les feuilles mortes, brindilles et autres débris végétaux, les herbicoles (sur les plantes herbacées), les fongicoles (sur d'autres champignons), et enfin les coprophiles vivant sur les excréments (Moreau et *al.*, 2002).

-Les parasites

Les champignons parasites se nourrissent à partir de la matière vivante animale ou végétale. Environ de 20% des espèces des champignons connus sont capables de parasitisme. Selon le substrat parasité se distingue les parasites biotrophes survivant sur des organismes vivants et les parasites nécrotrophes survivant en saprophytes sur l'hôte parasité après sa mort (Sicard et Lamoureux, 2006).

Chez certains champignons, la distinction entre les saprophytes et les parasites est parfois difficile car ils mènent les deux modes de vie, c'est le cas du polypore amadouvier et de l'armillaire couleur de miel, qui peuvent parasiter les parties vivantes de l'arbre puis continuer à vivre en saprophytes sur l'arbre mort. Certains champignons parasites sont responsables de diverses pathologies chez l'homme, les animaux, les plantes et même les champignons (Senn-Irlet et *al.*, 2012).

-Les phytopathogènes

L'infection des plantes par un champignon phytopathogène se déroule selon un processus, appelé le cycle de la maladie, dont la complexité varie selon les espèces, mais qui comprend toujours un certain nombre d'étapes obligatoires : l'inoculation, l'adhérence, la germination, la pénétration et l'invasion (Fernandez-Acero et *al.*, 2014). Parmi les champignons phytopathogènes du palmier dattier les plus connus nous citons quatre maladies :

a- Le Bayoud

Le Bayoud est une maladie vasculaire du palmier dattier provoquée par le champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedenis*, se conserve dans le sol ou dans les fragments de palmiers infectés. Il pénètre directement par les racines du palmier et il se localise dans les faisceaux ligneux. Cette maladie se manifeste par un dessèchement des palmes de la couronne moyenne. Elles prennent un aspect plombé (Gris cendre), d'où le nom de Bayoud donné à cette maladie (Achoura, 2013).

b- La pourriture de l'inflorescence ou Khamedj

D'après Djerbi (1988), la pourriture de l'inflorescence est une maladie cryptogamique causée par le champignon *Mauginiellas caettae* Cav. Celui-ci affecte les inflorescences mâles et femelles du palmier dattier au moment de l'émergence des spathes au printemps au moment où les températures commencent à s'adoucir et provoque leur pourriture. L'humidité, est un facteur favorable pour le développement de champignons (Achoura, 2013).

c- La pourriture du Cœur ou Mejnoun (Palmier fou)

Appelée aussi le dessèchement noir des palmes, elle peut être grave et entraîne la mort des sujets atteints. L'agent causal est la forme imparfaite *Thielaviopsis paradoxa*. Le champignon peut envahir aussi bien les parties aériennes que les racines du dattier causant le dessèchement noir des feuilles, la pourriture des inflorescences, la pourriture du cœur et du stipe et la pourriture du bourgeon terminal (Bounaga et Djerbi, 1990).

d- La pourriture du bourgeon ou (Belaat)

C'est une maladie peu fréquente causé par *Phytophthora sp*, surtout signalée en Afrique du Nord. Elle est souvent liée à de mauvaises conditions de drainage. La maladie se caractérise par un blanchissement des palmes, du cœur et par une pourriture humide à progression rapide. Elle est généralement mortelle (Bounaga et Djerbi, 1990).

-Les champignons bénéfiques

a- Les mycorhizes

La symbiose mycorhizienne représente la symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire (Smith et Read, 2008). Cette association qui s'établit entre un champignon et les racines des végétaux supérieurs, elle a un rôle primordial dans la dynamique et la survie des écosystèmes forestiers. Le champignon favorise la nutrition hydrominérale du végétal qui en retour alimente le métabolisme carboné du champignon et le protège physiquement (Senn-Irlet *et al.*, 2012).

b- Les champignons favorisant la croissance des plantes

Les Plant Growth Promoting Fungi (PGPF) sont des saprophytes non pathogènes qui exercent des effets bénéfiques sur les plantes. Ils sont connus pour améliorer la croissance des plantes, supprimer les maladies des plantes et induire une résistance systémique induite (ISR). Certaines espèces de PGPF ont été signalées pour supprimer les maladies bactériennes et fongiques

de certaines plantes cultivées. Les genres de champignons non pathogènes bien connus comprennent : *Aspergillus*, *Piriformospora*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizoctonia* et *Trichoderma* et stimulent différentes caractéristiques des plantes utiles pour des rendements plus élevés (Lopez et Sword, 2015 ; Jaber et Enkerli, 2017).

Les différents modes d'action des PGPF sont résumés par (El-Maraghy et *al.*, 2021) comme suit (Figure 4) :

- Biosynthèse des sidérophores ;
- Fournir à la plante des phytohormones telles que l'acide 3-indole acétique, les acides gibbérelliques et les cytokinines ;
- Augmentation de la biodisponibilité des nutriments insolubles grâce à la mobilisation ;
- Atténuation de l'effet du stress sur la plante et augmentation de la tolérance de la plante contre les conditions de stress, par exemple la sécheresse, la salinité et la température, et sécrétion de 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) qui déprime le niveau d'éthylène dans le corps de la plante ;
- Production de composés antagonistes comme le cyanure d'hydrogène et les antibiotiques qui protègent la plante contre les agents pathogènes et les maladies.

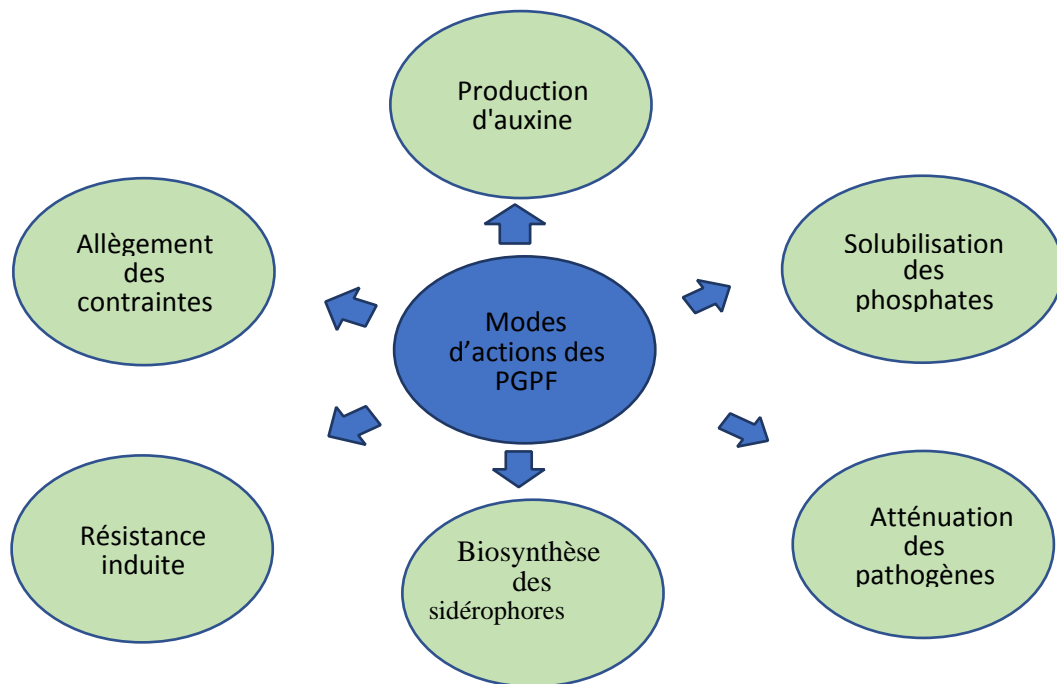


Figure 4 : Mode d'actions des PGPF (Deka et *al.*, 2015).

c- Les champignons entomopathogènes

Les entomopathogènes constituent un groupe spécial de micro-organismes vivant dans le sol et qui infectent et tuent les insectes et autres arthropodes par la pénétration de la cuticule (bioinsecticides). Ils sont actuellement utilisés comme agents de biocontrôle contre les insectes ravageurs des plantes et jouent un rôle essentiel dans leur gestion (figure 5). Bien que les champignons entomopathogènes soient actuellement présents sur le marché agricole, leur potentiel n'a pas encore été totalement exploré (Mantzoukas et *al.*, 2022).

En raison de leur forte activité enzymatique, de leur capacité à produire des métabolites secondaires et d'une bonne croissance dans les milieux de culture, les EPF (Entomopathogenic fungi) sont également testées pour être utilisées dans d'autres domaines de la biotechnologie, par ex. la biosynthèse et la bioconversion de stéroïdes ou de flavonoïdes, qui sont importants d'un point de vue économique (Kozłowska et *al.*, 2019).

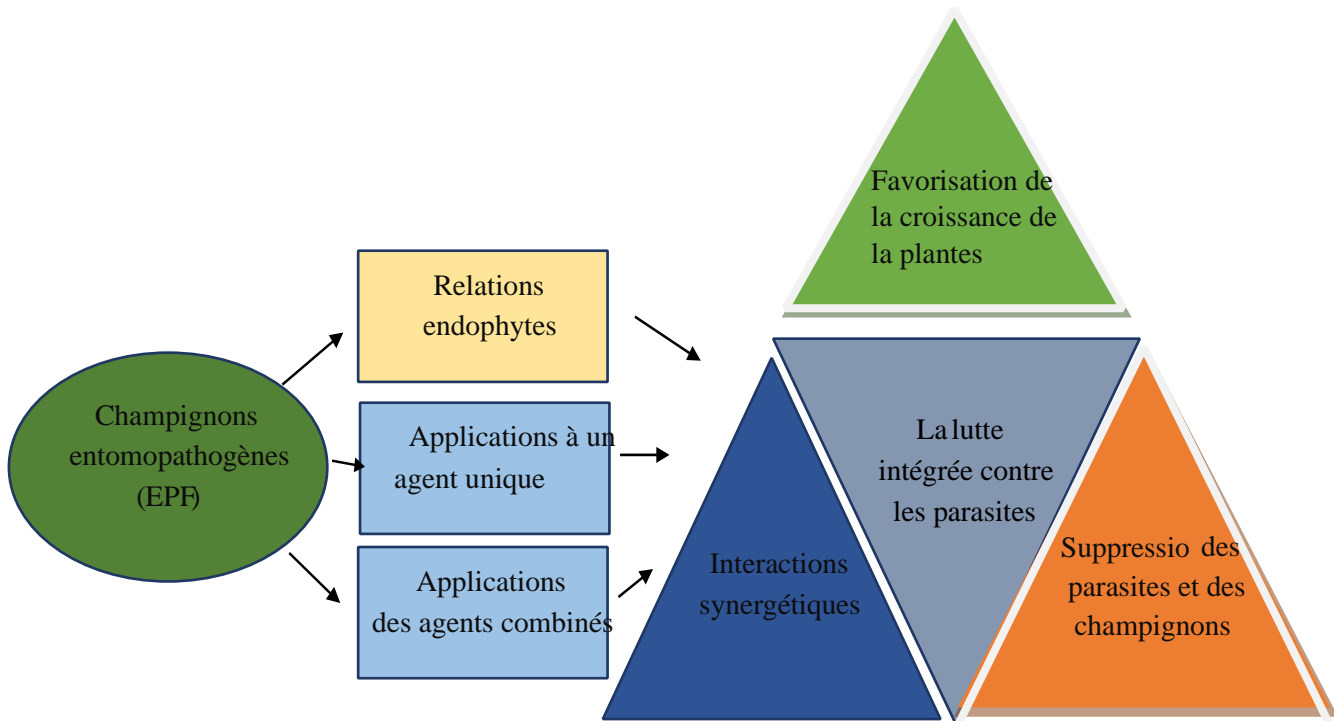


Figure 5 : Les applications des champignons entomopathogènes et leurs principaux effets (Mantzoukas et *al.*, 2022).

Les champignons jouent un rôle important dans la résolution des grands problèmes mondiaux. L'utilisation de produits fongiques peut conduire à une durabilité accrue grâce à une exploitation plus efficace des ressources naturelles. Les applications vont de la valorisation des Biodéchets en produits à valeur ajoutée, à l'utilisation de la biomasse végétale renouvelable comme substitut aux produits pétroliers tels que les produits biochimiques, les plastiques, les engrais et les carburants (Lange, 2014).

Les enzymes fongiques peuvent conduire à la production d'ingrédients alimentaires ayant des effets prébiotiques pour un biote intestinal humain plus sain et donc une plus grande résistance aux maladies liées au mode de vie et peuvent aussi conduire à de nombreuses autre production (Lange, 2014).

I.5. Les enzymes fongiques en biotechnologie

I.5.1. Les enzymes en industrie

Les principales applications industrielles des enzymes comprennent les applications agroalimentaires et les applications non alimentaires telles que les détergents, la production de biocarburants, la nutrition animale ou encore les textiles, le cuir et l'industrie papetière (figure6). Globalement, les applications en nutrition humaine et animale représentent 60% du marché mondial des enzymes, avec une croissance annuelle estimée à 8% (Guerrand, 2017).

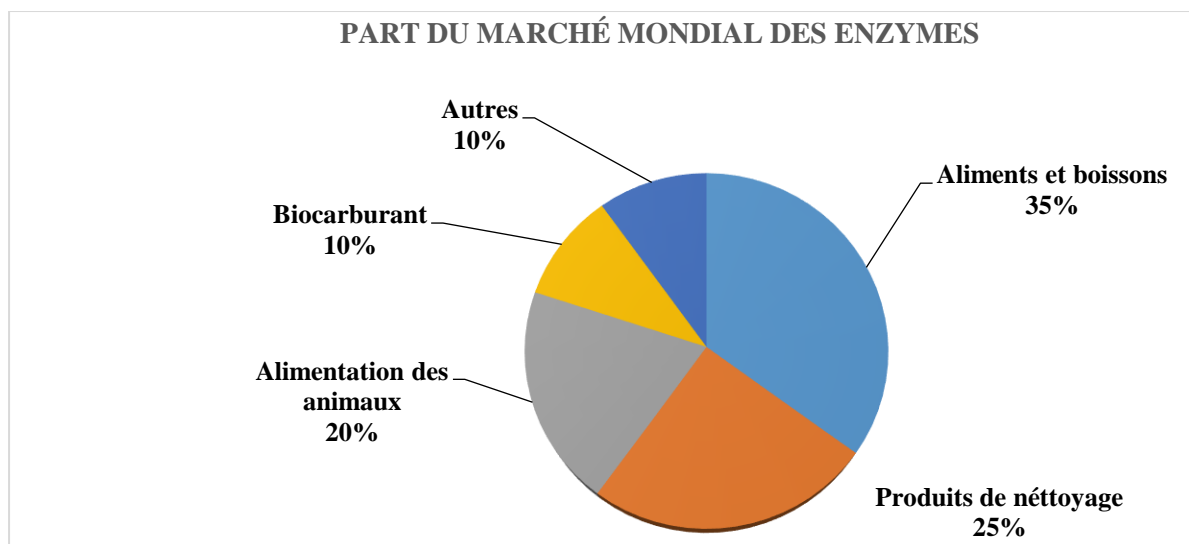


Figure 6 : Part du marché mondial des enzymes par application (Guerrand, 2017).

I.5.2. Intérêts de la recherche des enzymes fongiques

Parmi toutes les enzymes utilisées commercialement, environ la moitié est d'origine fongique, l'autre moitié est d'origine bactérienne. Cependant, cet équilibre évolue maintenant vers l'utilisation d'un plus grand nombre d'enzymes provenant d'un plus large éventail de familles du règne fongique (Lange, 2017).

Les enzymes fongiques sont efficaces, compatibles et adaptés au traitement industriel et ils ont une stabilité protéique suffisante pour conférer aux produits enzymatiques, une durée de conservation acceptable ainsi ; ils fournissent des solutions aux clients, répondent aux demandes d'approbation réglementaires et répondent aux besoins des utilisateurs finaux. Les enzymes fongiques seront essentielles pour passer d'une économie mondiale basée sur les fossiles à une économie basée sur les énergies renouvelables, où la mise à niveau de la biomasse lignocellulosique conduit à la production non seulement de biocarburants, mais également de matériaux biosourcés et de produits chimiques biosourcés, ainsi que de nouveaux aliments pour animaux et ingrédients alimentaires plus sains (Lange, 2017).

Les champignons étant la source de nombreuses enzymes extracellulaires, de nombreuses recherches sont axées sur la production rentable de formulations enzymatiques efficaces (Dhevagi et al., 2021). Les enzymes les plus importants pour l'industrie et leur source sont détaillés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Source des enzymes fongique (Dhevagi et al., 2021)

Enzymes	Co- enzymes	Organisme fongique	Source	Reference
Amylase	α -amylase	<i>Lichtheimia ramosa</i> ,	Bagasse de canne à sucre et litière de feuilles	Oliveira et al. (2016)
	β -amylase	<i>Thermoascus</i>		
	γ - amylase	<i>aurantiacus</i>		
		<i>Aspergillus niger</i>	Sol	Gopinath et al. (2017)
		<i>Rhizopus oryzae</i> CH4	Collection de cultures (Laboratoire d'écologie et de la technologie microbienne, Université de Carthage, Tunisie)	Benabda et al. (2019)
		<i>Aspergillus niger</i> <i>RBP7</i>	Sol	Mukherjee et al. (2019)

Protéase	Protéases acides, Protéases neutres, Protéases alcalines	<i>Aspergillus niger</i> LBA 02	Collection de cultures (Laboratoire de biochimie alimentaire, École d'ingénierie alimentaire, Université de Campinas)	de Castro et al. (2015)
		<i>Penicillium citrinum</i>	Sauce de poisson	Xiao et al. (2015)
		<i>Aspergillus flavipes</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , et <i>Penicillium roquefortii</i>	Collection de cultures (laboratoire de bioprocédés, Institut des Biosciences de Botucatu (UNESP), Brésil)	Novelli et al. (2016)
		<i>Aspergillus flavus</i>	Sol	Franco et al. (2017)
Pectinase	Pectolyase (pectinlyase) Pectozyme	<i>Fusarium sp.</i> PSTF1	Déchets agricoles	Reddy and Saritha (2015)
		<i>Penicillium oxalicum</i> PJ02	Oranges pourries	Li et al. (2015)
		<i>Aspergillus sp.</i>	Agrumes	El Enshasy et al. (2018)
		<i>Aspergillus spp</i>	Sol	
Lipase		<i>Trichoderma sp.</i>	Sol	Musa et al. (2017)
		<i>Penicillium sp.</i>	Sol	Nema et al. (2019)
		<i>Aspergillus niger</i>	Graines oléagineuses	Alabdalall et al. (2020)
Chitinase	Endochitinases, Exochitinases, N- acetylglucosam	<i>Trichodermaviride</i>	Sol de mangrove	Abu Tahon et Isaac (2020)
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	Eau de mer	Atalla et al. (2020)
		<i>Trichoderma koningiopsis</i> UFSMQ40	Punaises de lit	Baldoni et al. (2020)

I.5.3. Définition, source et intérêts de différents enzymes fongiques

I.5.3.1. Les lipases :

Également appelées triacylglycerols acyl hydrolases (EC 3.1.1.3) ; elles font partie de la famille des hydrolases d'esters carboxyliques (Alloue et *al.*, 2008), elles sont considérées comme des enzymes atypiques par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats (Reis et *al.*, 2009).

Leur fonction physiologique est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques, insolubles dans l'eau, se produit à l'interface entre lipide et eau (Alloue et *al.*, 2008).

Dans le milieu eau /solvant organique immiscible, elles sont également capables de catalyser la réaction réversible de synthèse et échangeuse de groupes d'esters et résolution de mélange racémique en alcools et acides optiquement actives (Fickers et *al.*, 2008).

Les producteurs de lipases fongiques les plus courants sont : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium* et *Rhizopus*. Ces dernières années, *Penicillium simplicissimum* a été étudié pour produire des lipases (Rafiq et *al.*, 2020).

I.5.3.1.1 Intérêts des lipases

En industrie alimentaire, les lipases ont été largement utilisées dans l'industrie alimentaire pour synthétiser des arômes ou des précurseurs d'arômes. L'hydrolyse sélective des glycérides de triacycle libère des acides gras libres qui agissent comme des arômes ou des précurseurs d'arômes (Alves Macedo et *al.*, 2003).

Les lipases sont utilisées dans le développement de la saveur des produits laitiers tels que le fromage, la margarine, le lait au chocolat, le beurre et les sucreries pour éliminer la graisse de la viande afin de produire de la viande maigre, la transformation de la viande de poisson (Mishra et *al.*, 2019).

Détergents : La lipase idéale doit hydrolyser divers lipides, résister à un pH plus élevé (pH 10-11) et à des températures (30-60 °C), résistante aux protéases utilisées dans le même détergent avec une capacité à agir sur les substances grasses comme les rouges à lèvres, les graisses de friture, beurre et sauces (Jaeger et Reetz 1998).

Production de biodiesel : le biodiesel est produit à partir de glycérides de triacycle d'animaux, de plantes, d'algues et de champignons. La synthèse de biodiesel implique l'élimination des glycérides de triacycle et la digestion des glycérides de triacycle en acides gras et la transestérification

des acides gras en méthyle d'acide gras. Les lipases sont nécessaires pour décomposer les glycérides de triacycle en acides gras libres, ce qui constitue la deuxième étape de la production de biodiesel poisson (Mishra et *al.*, 2019).

I.5.3.2 Les estérases

Les estérases (E C 3.1.1.1) sont connues pour hydrolyser les solutions d'esters de chaîne acyl courte soluble dans l'eau et inactifs contre les triacylglycérols à longue chaîne insoluble dans l'eau (Chahinian et Sarda, 2009). Elles sont situées dans le réticulum endoplasmique, le cytosol de différents tissus et abondantes dans le foie. Elles présentent une large spécificité en substrat tels que : amides, esters, thioesters, hydrolysent un grand nombre de composés de différentes structures et jouent un rôle très important dans l'élimination des produits toxiques et xénobiotiques (Gilham et Lehner, 2005). Les producteurs d'estérases fongiques les plus courants sont : *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Trichoderma sp* et *Saccharomyces cerevisiae* (Panda et Gowrishankar, 2005)

➤ Intérêts des estérases :

Les estérases jouent un rôle de premier plan dans l'industrie alimentaire et les industries des boissons alcoolisées, où elles ont été principalement utilisées pour la modification de l'huile et de la graisse dans divers jus de fruits et pour produire des parfums et des arômes (Panda et Gowrishankar, 2005). En industrie pharmaceutique, l'estérase joue un rôle majeur dans la synthèse de médicaments chiraux, très utiles pour guérir certaines maladies (Bornscheuer, 2002).

I.5.3.3. Pectinases

Les pectinases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques dans les polymères pectiques. Les substances pectiques présentes dans la tomate, l'ananas, l'orange, la pomme, la pulpe de citron, le zeste d'orange et d'autres agrumes agissent comme substrat naturel pour cette enzyme. Fonctionnellement, les pectinases peuvent être classées en polygalacturonases (qui hydrolysent les liaisons glycosidiques α -(1-4)), les pectines estérases (qui éliminent les groupes acétyle et méthoxy de la pectine), la pectine lyase et la pectate lyase (Saadoun et *al.*, 2013).

Les producteurs de pectinase fongiques les plus courants sont : *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. versicolor*, *A. pulverulentus*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor racemosus*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium Jensenii*, *P. citrinum*, et *Trichoderma viride* (El-Rahim et al., 2020).

➤ Intérêts des estérases :

- Transformation du vin : des enzymes pectinolytiques sont ajoutées aux fruits avant l'ajout de l'inoculum. Ce processus améliore les caractéristiques du vin. Les pectinases maximisent le rendement en jus, l'extraction du vin, facilitent la filtration et intensifient la couleur et la saveur du vin (Mishra et al., 2019).
- Traitement du thé et du café : Les pectinases décomposent les pectines présentes dans les feuilles de thé, accélèrent le processus de fermentation et agissent comme agents antimousse pour le thé car la pectine des feuilles de thé est détruite par les pectinases. Ces dernières sont, généralement, utilisées en combinaison avec d'autres enzymes telles que les cellulases, les hémicellulases et les protéinases. L'extrait enzymatique brut d'*Aspergillus* sp. est plus efficace pour la fermentation du thé par rapport à l'enzyme pectine purifiée utilisée seule dans la fermentation des feuilles de thé, cela est dû aux enzymes fongiques brutes qui contiennent également d'autres enzymes (Mishra et al., 2019).

I.5.3.5. Les amylases

Les amylases (α -amylases, β -amylases et glucoamylases) représentent l'un des groupes d'enzymes les plus importants dans le domaine de la biotechnologie, dont la variété industrielle telle que, l'alimentation, la chimie, les détergents, le textile, qui utilise des enzymes amylolytiques microbiennes pour convertir l'amidon en différentes solutions sucrées. Plusieurs types d'enzymes sont impliqués dans la dégradation de l'amidon, principalement l' α -amylase (1,4 α -glucane glucohydrolase, EC 3.2.1.1), la β -amylase (1,4 α -glucane maltohydrolase, EC 3.2.1.2) et la glucoamylase (1,4 α -glucane glucohydrolase, EC 3.2.1.3) (Pandey et al., 2000).

La meilleure source fongique pour la production d'enzymes amylases comprend : *Aspergillus oryzae*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.awamori*, *A.fumigatus*, *A.flavus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium brunneum*, *P.chrysogenum*, *Rhizopusoryzae*, *Mucor* sp., et *Trichoderma pseudokoningii* (Samanta, 2020).

Intérêts des amylases :

- Industrie des détergents : Les amylases sont le deuxième type d'enzymes utilisés dans la formulation des détergents enzymatiques, et 90 % de tous les détergents liquides contiennent ces enzymes (Mitidieri et *al.*, 2006). Ces enzymes sont utilisées dans les détergents pour la lessive et le lavage automatique de la vaisselle pour dégrader les résidus d'aliments amylacés tels que les pommes de terre, les sauces, les crèmes pâtisseries, le chocolat, etc. et d'autres oligosaccharides plus petits (Mukherjee et *al.*, 2009).
- Industrie alimentaire : Les amylases sont utilisées pour la clarification de la bière ou des jus de fruits, ou pour le prétraitement des aliments pour animaux pour améliorer la digestibilité des fibres (Ghorai et *al.*, 2009).

I.5.3.5 Les chitinase

Les chitinases (EC 3.2.1.14) appartiennent à la classe des hydrolases (EC 3) et la superfamille des enzymes glycosyl hydrolase (GH) (EC 3.2.1) est connue pour dégrader la chitine, qui est un biopolymère complexe résistant à la dégradation. C'est le polymère le plus élevé présent dans la paroi cellulaire fongique, les coquilles de crustacés, et les exosquelettes d'insectes et d'autres membres des arthropodes (Nagpure et *al.*, 2014).

Les sources fongiques de la chitinase sont : *Saccharomyces cerevisiae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Ustilagomaydis*, *Coprinopsis cinerea*, *Trichoderma harzianum*, et *Xenorhabdus nematophila* (Yadav et *al.*, 2020).

La chitinase obtenue de *Penicillium monoverticillium*, *Aspergillus flavus*, et *Fusarium oxysporum* est utilisé pour obtenir certaine longueur de chaîne d'oligomère et également utilisé pour produire de la N-acétylglucosamine (GlcNAc) et des chitooligosaccharides à partir de l' α -chitine à diverses applications dans le domaine de la santé (Zhou et *al.* 2018).

➤ **Intérêts des chitinases :**

La propriété hydrolysante de la chitinase est la propriété unique par laquelle la forme insoluble de la chitine est transférée dans des formes monomères et oligomères plus simples.

L'hydrolyse de la chitine par le processus enzymatique joue un rôle vital dans le domaine médical et industriel en raison de ses propriétés antibactériennes, fongicides, antihypertenseur et la propriété d'amélioration de la qualité des aliments, et ceux-ci sont décrits en détail ci-dessous (Suraja Nayak et al., 2021).

-Agriculture :

- **Biopesticide**

L'activité de la chitinase aide à la dégradation de la chitine présente dans la paroi des insectes via la formation de pores dans l'intestin et l'exosquelette, ce qui réduit la capacité de survie *in vivo*. En outre, la croissance des acariens, des ravageurs et des larves de mouches domestiques est arrêtée en raison du même mécanisme (Sindhu et al., 2017).

- **Biocontrôle :**

Les chitinases affectent diverses parties de la structure fongique complexe, elles sont également considérées comme des enzymes dégradant la paroi cellulaire. Il a été rapporté que la chitinase de *S.marcescens* contribue à la suppression des maladies causées par *S.rolfsii*. Le développement du génie génétique a permis d'introduire avec succès le gène producteur de chitinase dans le *E. coli* qui a contribué au contrôle de la maladie déclenchée par *S. rolfsii* et *R.solani* dans le coton (Selimet al., 2017).

La Chitinases de *Trichoderma* sp. ont été caractérisés et il est considéré comme l'un des agents potentiels de lutte biologique contre les pathogènes fongiques du sol. Un groupe spécifique de bactéries nommé *Streptomyces violaceus niger* produit la chitinase et certains composés antifongiques et montre l'activité anti-fusarium contre les groupes fongiques phytopathogènes (Swarnalakshmi et al., 2016).

- **Biomédicale :**

Le rôle le plus important de l'enzyme chitinase est dans le domaine de la santé humaine, du mode de vie sain et de la fabrication de produits cosmétiques, ainsi que dans le développement de nano-médicaments (Elieh-Ali-Komi et al., 2016).

L'activité antifongique et la qualité hautement biocompatible font de la chitinase et de ses dérivés une partie des applications biomédicales, notamment la cicatrisation des plaies, l'administration de médicaments, l'ingénierie des tissus cartilagineux et la génération de nerfs. La

chitinase peut également être utilisée comme additif pendant la thérapie pour améliorer l'activité et l'effet des médicaments antifongiques (Chavan, et Deshpande, 2014).

-Pharmaceutique

Les déchets chitineux peuvent être utilisés pour la production de protéine unicellulaire (PUC) par la bioconversion de la chitine en ses formes plus simples par la chitinase. Les Chitinases produites par *S.marcescens* sont utilisés pour l'hydrolyse de la chitine présente dans les déchets et le rendement en (PUC) à l'aide de levure *Pichiakudriavzevii* (Felse et Panda, 2000).

-Industriel

La chitinase est hautement essentielle pour la dégradation enzymatique de la paroi cellulaire fongique et conduit à la séparation des protoplastes pour une étude plus approfondie sans endommager ses composants. La Chitinase des membres de *Enterobacter* sp. est la plus efficace pour la dégradation de la paroi cellulaire et l'élimination des protoplastes de l'hyphe fongique d'*Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus florida* (Dahiya et al., 2006).

I.5.3.6 Phosphatases

Les phosphatases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse des esters et des anhydrides de l'acide phosphorique et, elles peuvent être classées comme hydrolases monoesters phosphoriques ou phosphomonoestérases (EC 3.1 .3), les diesters phosphoriques hydrolases ou phosphodiéstérases (EC 3.1.4), les monoesters hydrolases triphosphoriques (EC 3.1.5) et les enzymes agissant sur les anhydrides phosphorylés (EC 3.6.1) et sur les liaisons P–N (EC 3.9) (Schmidt et Laskowski 1961). Les phosphatases peuvent également être subdivisées en fonction de leur régulation (par exemple la calmoduline), des besoins en cations métalliques pour leur activité (par exemple Mg^{2+} et Ca^{2+}) et leur sensibilité à divers inhibiteurs de la phosphatase. Les phosphomonoestérases comprennent les phosphomonoestérases acides et alcalines (qui hydrolysent les liaisons monoester, y compris les mononucléotides et les phosphates de sucre), les phosphoprotéines phosphatases (qui hydrolysent les liaisons phosphoester des phosphosérines, phosphothréonines ou phosphotyrosines), les phytases (EC 3.1.3.26 pour la 4-phytase et EC 3.1.3.8 pour la 3 -phytase, qui hydrolyse les six groupes phosphate de l'inositol hexaphosphate) et des nucléotidases (Nannipieri et al., 2010).

Les sources fongiques reconnues pour avoir une synthèse de l'enzyme phosphatase sont : *Aspergillus flavus*, *A. candidus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. wentii*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Trichoderma isridae*, *Trichoderma* sp. (Khan et al., 2010).

➤ **Intérêts des phosphatases :**

De grandes quantités de phosphates sont disponibles dans le sol, et lorsque la culture microbienne est ajoutée sous forme de biofertilisant, elle solubilise les phosphates. Le phosphore soluble est alors facilement disponible pour les plantes (Nelofer et al., 2016)

I.5.3.7 Les protéases

Les protéases (peptidases ou enzymes protéolytiques) constituent un vaste groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques d'autres protéines. Le clivage des liaisons peptidiques peut conduire à la dégradation des substrats protéiques en leurs acides aminés constitutifs, ou bien il peut être spécifique, conduisant à un clivage sélectif des protéines pour des opérations post-traductionnelles (Souza et al., 2015).

Les protéases sont classées comme hydrolases peptidiques ou peptidases (EC 3.4) et constituent une grande famille d'enzymes, divisée en endopeptidases (EC 3.4.21-99) et exopeptidases (EC 3.4.11-19) (Sabotic et Kos, 2012).

Les protéases microbiennes font partie des enzymes hydrolytiques les plus importantes et ont fait l'objet de nombreuses études (tableau 1).

Les protéases issues de microorganismes ont suscité une grande attention au cours de la dernière décennie en raison de leur potentiel biotechnologique dans divers processus industriels tels que les détergents, les textiles, le cuir, les produits laitiers et les préparations pharmaceutiques (Saran et al., 2007). Les enzymes protéolytiques provenant de microorganismes sont la source préférée dans l'application industrielle des enzymes en raison de l'avantage technique et économique (Saran et al., 2007).

Tableau 2 : Les champignons ayant une activité protéolytique (Singh et *al.*, 2016).

Champignons	<p><i>Aspergillus niger</i>, <i>A. clavatus</i>, <i>A. flavus</i>, <i>A. fumigates</i>, <i>A. awamori</i>, <i>A. oryzae</i>, <i>A. parasiticus</i>, <i>A. ustus</i>, <i>Beauveria bassiana</i>, <i>B. feline</i>, <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Clonostachys rosea</i>, <i>Conidiobolus coronatus</i>, <i>Cordyceps militaris</i>, <i>C. sinensis</i>, <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Graphium putredinis</i>, <i>Mucor circinelloides</i>, <i>Penicillium camemberti</i>, <i>P. citrinum</i>, <i>P. restrictum</i>, <i>P. roqueforti</i>, <i>Phanerochaete chrysosporium</i>, <i>Rhizomucor</i> sp., <i>Rhizopus SMC</i>, <i>R. oryzae</i>, <i>Thermoascus aurantiacus</i>, <i>T. aurantiacus</i>, <i>Thermomyces lanuginosus</i>, <i>T. lanuginosus</i>, <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>T. reesei</i></p>
--------------------	--

La meilleure source fongique pour la production d'enzymes protéases comprend : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, et *Aspergillus flavus* (Yadav et *al.* 2017, 2020).

➤ **Intérêts des protéases :**

Les protéases constituent 60 % du marché industriel mondial en raison de leur énorme potentiel d'application dans diverses industries (Kumar et *al.*, 2015). Les protéases sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique, industrie alimentaire pour la synthèse de peptides, l'industrie du cuir pour le déhousseage (Singh et Bajaj, 2017), l'industrie photographique pour la récupération d'argent (Joshi et Satyanarayana, 2013), l'industrie des détergents comme additif pour la formulation des détergents (Giri et *al.*, 2011) et dans le traitement des résidus de kératine (Harde et *al.*, 2011). De plus, les protéases sont également utilisées pour d'autres applications telles que le nettoyage des lentilles de contact (Pawaret *al.*, 2009), l'élimination du biofilm (Leslie, 2011), l'isolement de l'acide nucléique (Motyan et *al.*, 2013), la lutte antiparasitaire (Joshi et Satyanarayana, 2013), le dégommeage de la soie (Mahmoodi et *al.*, 2010) et la délignification sélective du chanvre (Khan, 2013).

Chapitre II

Partie Expérimentale

-

Matériel et Méthodes

Chapitre II : Partie Expérimentale -Matériel et Méthodes

Dans cette seconde partie, nous décrivons le matériel et les méthodologies adaptées dans nos expérimentations, que nous avons réalisés au niveau du laboratoire Protection et de Valorisation des ressources Agrobiologique (LPVRB) à l'université Saad Dahleb de Blida 1.

- Le présent travail a été réalisé selon deux parties principales : la première est basée sur l'isolement des champignons du sol rhizosphérique de quatre variétés de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) provenant de la région de Taghit en procédant à un dénombrement des colonies fongiques ; ensuite une purification et une caractérisation morphologique de ces isolats fongiques. La seconde partie est consacrée à la recherche d'une éventuelle capacité des isolats fongiques à produire quelques enzymes à intérêt biotechnologique.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériels biologiques

Le sol rhizosphérique de quatre cultivars de palmier dattiers (Biskra, Feggous, Cherka, Ras El Hmar) prélevé à partir de la région de Taghit (Tableau 2). À une profondeur de 45 cm où se trouve la zone la plus riche en racine, trois échantillons pour chaque cultivar ont été prélevés. Ces échantillons du sol rhizosphérique ont été mélangés et homogénéisés afin d'obtenir un seul échantillon représentatif de chaque cultivar.

Tableau 3 : Codes des échantillons étudiés.

Code	Cultivar	Age	Cordonnés
1	Biskra	02 ans	TB
2	Feggous	10 ans	TF
3	Cherka	20 ans	TC
4	Ras El Hmar	25 ans	TR

II.1.2. Matériels non biologiques

- La verrerie, les appareillages (balance, Autoclave, étuve, four pasteur,) ainsi que le milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA).
- Tween 80, tween 20.
- Glucose ($C_6H_{12}O_6$), Agar, peptone, extrait de levure, amidon ($C_6H_{10}O_5$), gélatine, chitine.
- Bleu de bromophénol ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$), pectine, sulfate d'ammonium $(NH_2)_2 SO_4$, phosphate bicalcique ($CaHPO_4$), chlorure de potassium (KCl), magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4$), sulfate de mananèse (II) ($MnSO_4$), sulfate de fer (II) ($FeSO_4$), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4), chlorure d'ammonium (NH_4Cl), chlorure de sodium (NaCl), chlorure de calcium dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$).

II.2. Méthodes

II.2.1. Isolement des champignons du sol rhizosphérique de palmier dattier

Pour réaliser l'isolement des champignons du sol rhizosphérique de quatre variétés de palmier dattier issue de la région de Taghit, nous avons suivis les étapes suivantes :

- **Macération du sol et sa pesée**

Chaque variété de sol rhizosphérique (TB, TF, TC, TR) est mise dans une bassine et puis macérer à l'aide des mains (Figure 9), ensuite chaque variété de sol est pesée à une masse de 10 grammes à l'aide d'une balance de précision.

- **Préparation des solutions mères et ensemencement sur boîte de Pétri**

Pour la préparation des solutions mères, nous avons procédé à la méthodologie suivante (Figure7):

- La préparation de quatre flacons contenant 90 ml d'eau distillée stérile ;
- L'ajout d'une quantité de 10 grammes de sols pour chaque flacon, conformément au code qui le représente à fin d'obtenir des solutions mères codées (TB, TF, TC, TR) ;
- A l'aide d'un vortex, nous avons mélangé et homogénéisé les solutions mères pendant 20 min ;

- Au préalable, quatre tubes à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile codé (TB, TF, TC, TR) ont été préparé ainsi que des tubes à essai pour réaliser les dilutions de 10^{-2} jusqu'à 10^{-4} ;
- A l'aide d'une micropipette, un volume de 1ml de la solution mère est déposé dans chaque tube à essai ;
- Chaque tube est agité à l'aide de vortex vertical monotube pendant 15 min ;
- Des boîtes de Pétri codé selon la région contenant le milieu (PDA, Potato Dextrose Agar) (Johnston et Booth, 1982) (code (TB -2, TB -4, TF -2 etc.)) sont mises à disposition et un volume de 0,5 ml des dilutions de 10^{-2} , 10^{-3} 10^{-4} estensemencé dans chaque boîte ;
- Pour chaque dilution, deux répétitions ont été réalisé pour obtenir un total de 16 boîtes (code (TB -2 (1), TB -2 (2), TB -4 (1), TB -4 (2) etc.) ;
- Dans chaque boîte, l'ensemencement est réalisé par des billes qui remplace l'étaioir pour bien homogénéiser la suspension, suivi du secouement manuel des boîtes et après les billes sont retirées dans un petit bécher ;
- L'incubation des 16 boîtes est faite à 27°C pendant sept jours (Figure 10).

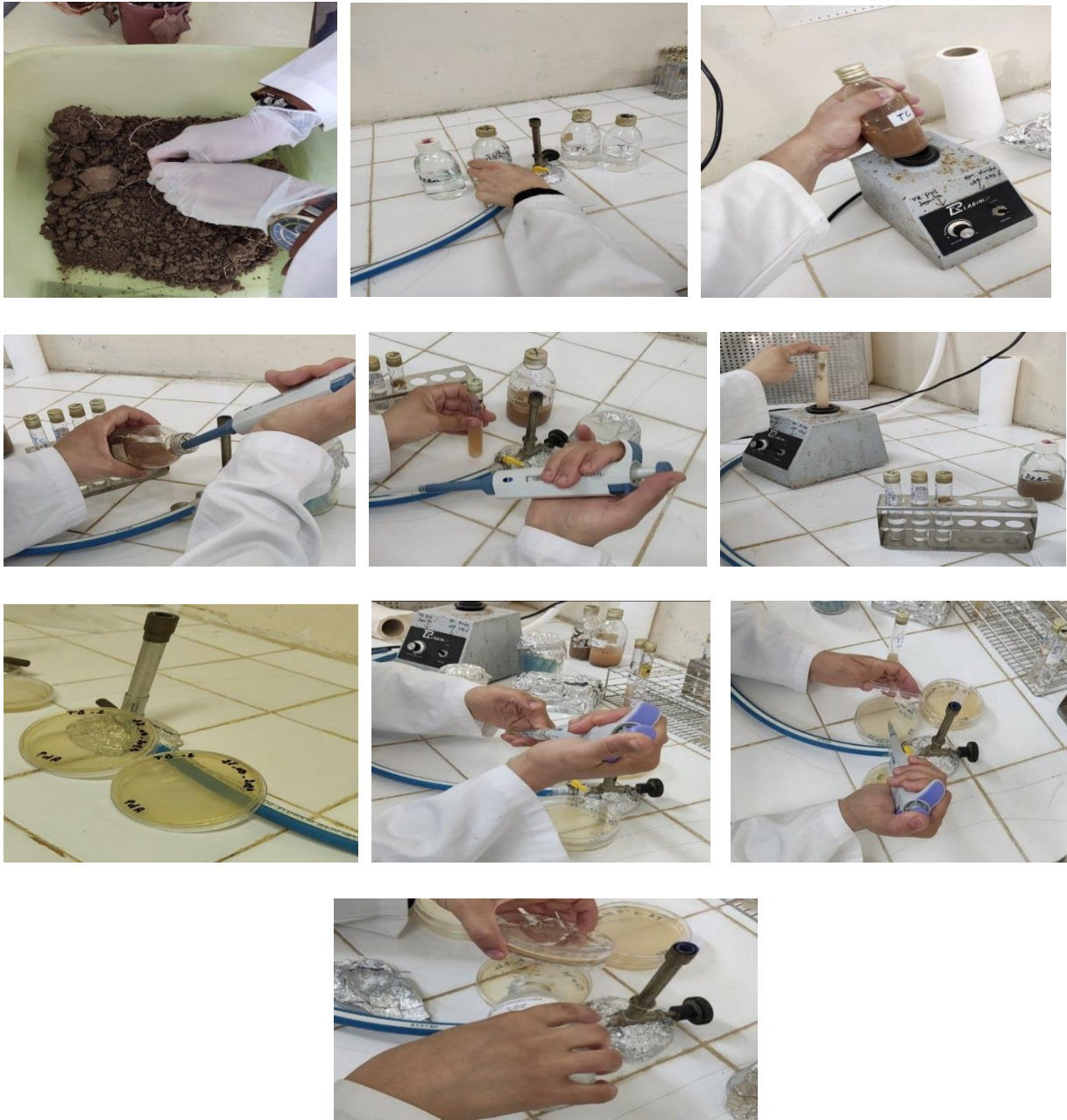
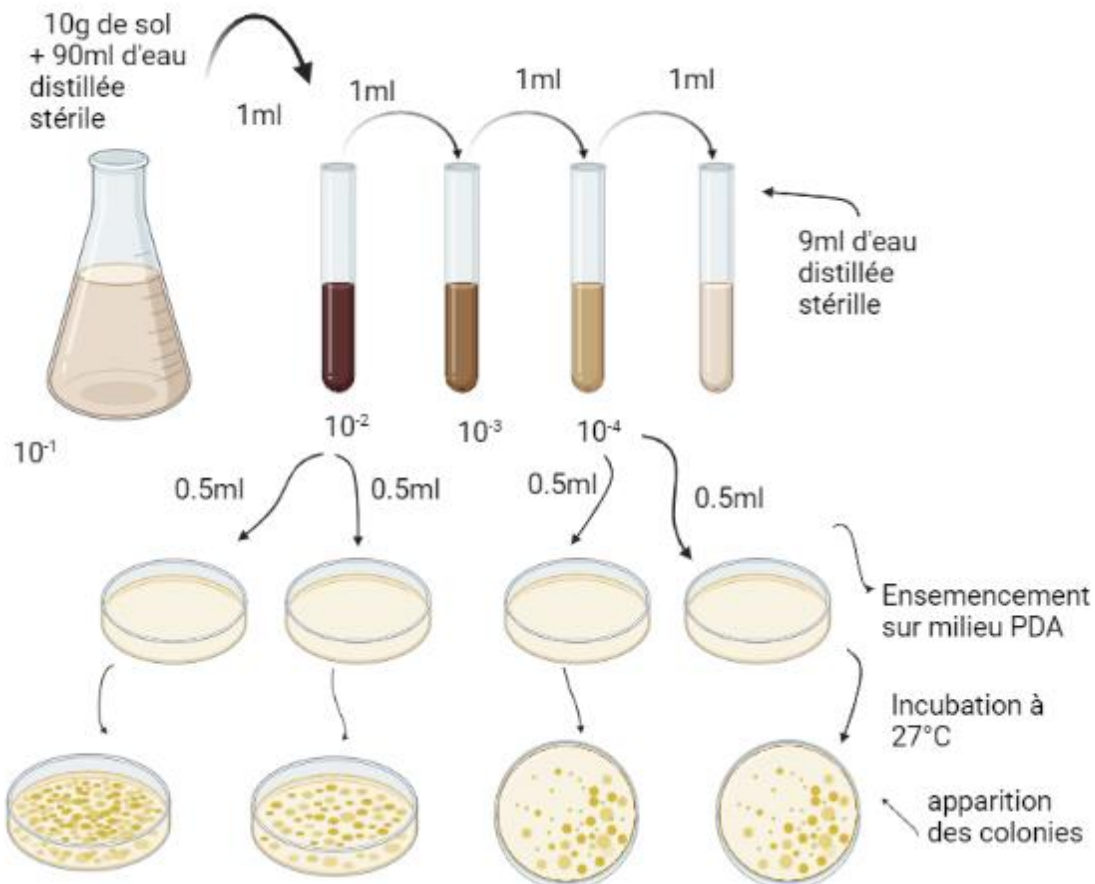


Figure 7 : Différentes étapes d'isolations des champignons rhizosphériques.

Nous avons résumé les différentes étapes d'isollements des champignons rhizosphérique par un schéma (Figure 8)



Figures 8 : Schéma de l'isolement des champignons à partir du sol rhizosphérique.

II.2.2. Dénombrement et sélections des isolats fongiques

Le dénombrement consiste à compter les colonies fongiques présentes sur les boîtes de Pétri. Après le comptage du nombre total des colonies fongiques dans chaque boîte une observation macroscopique des isolats fongiques a été effectuée.

II.2.3. Purification des champignons isolés

La purification des champignons est effectuée grâce à une série de repiquage des isolats qui consiste à transférer aseptiquement un petit fragment dans un milieu neuf et stérile contenant le milieu Potatose Dextrose Agar et mise en incubation à 25°C pour s'assurer de la pureté de l'isolat (Botton et *al.*, 1990).

II.2.4. Caractérisation morphologique des isolats fongiques

II.2.4.1. Caractérisation macroscopique

L'observation morphologique des boîtes contenant les isolats fongiques s'effectue à l'œil nu, en se basant sur des caractères morphologiques des colonies. Nous avons observé attentivement, dans un endroit bien éclairé la :

- L'aspect de la colonie : laineuse, cotonneuse, floconneuse, poudreuse, etc. ;
- Couleur : du recto et du verso de la boîte de Pétri ;
- Pigmentation : présence ou absence d'un pigment diffusible dans le milieu ;
- Forme du contour : régulier, irrégulier, lobé, dentelé, filamenteux...etc. ;
- Surface : plane, plissée, cérébriforme ;

II.2.4.2. Les caractères microscopiques

L'observation microscopique des champignons porte sur la présence des spores, la forme, la présence et l'absence des chlamidospores (Eyi Ndong et *al.*, 2011).

Pour la deuxième partie de notre travail, nous avons recherché une éventuelle production des enzymes à intérêt biotechnologique par les champignons que nous avons préalablement isolés.

II.2.5. Détermination de l'activité enzymatique

La seconde partie de notre travail est commencée par le classement des champignons en groupe ou morphotype selon les caractères morphologiques, et à partir de chaque groupe une souche est sélectionnée pour déterminer son activité enzymatique.

L'étude de l'activité enzymatique consisté à rechercher sept enzymes ; la chitinase, la phosphatase, la pectinase, l'amylase, la protéase, la lipase et l'estérase, en se basant sur des techniques qualitatives grâce à l'utilisation des différents milieux solides.

II.2.5.1. Chitinase

Le test qui indique l'activité de chitinase a été réalisé sur le milieu Potatose Dextrose Agar (PDA), modifié avec remplacement du glucose par la chitine (Annexe A). Les disques mycéliens sont déposés dans des petites boîtes de Pétri contenant le milieu à raison de deux répétitions par souche. Une boîte sans champignon sert comme témoin. Toutes les boîtes sont incubées à 28°C pendant 5 jours. La bonne croissance des souches fongiques dans ce milieu indique la production de chitinase.

II.2.5.2. Phosphatase

Le test de solubilisation du phosphate a été effectué sur le milieu Pikovskaya (PVK) bicalcique solide, modifié par l'addition de 2 ml de bleu de bromophénol modifier par Mohamedmahmoud (Annexe B). Des disques mycéliens, issus de pré-cultures fraîches, sont repiqués dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PVK, à raison de deux répétitions pour chaque souche fongique. Une boîte de Pétri contenant le milieu sans inoculum sert comme témoin. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours. La formation d'halo claire ou la décoloration du milieu PVK autour de la colonie est un indicateur de solubilisation du phosphate et de la présence de phosphatase.

II.2.5.3. Pectinase

La production de pectinase par les champignons a été déterminée selon Cattelan *et al.* (1988). Le milieu M9 agar a été utilisé, additionné de 10g de pectine, de 1,2g d'extrait de levure et de 2ml de bleu de bromophénol (Miller, 1974) (Annexe C). Les disques mycéliens ont été déposés sur le milieu gélosé, à raison de deux répétitions par souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 2 jours. La présence d'un halo claire autour de la colonie indique une réponse positive pour la production de pectinase.

II.2.5.4. Amylase

Le test de production d'amylase a été réalisé en utilisant le milieu GYP (Glucose Yeast Extract Peptone) décrit par Maria *et al.* (2005), auquel on ajoute 2% d'amidon soluble (Annexe C). Des disques mycéliens sont inoculés dans des boîtes de Pétri contenant ce milieu, en raison de deux répétitions pour chaque souche et une boîte sans disque mycélien sert comme témoin. L'incubation se fait à 28°C pendant 3 à 5 jours. L'activité amylolytique a été démontrée en inondant les boîtes avec la solution de lugol. L'apparition de la zone claire formée autour de la colonie révèle la dégradation de l'amidon par l'enzyme.

II.2.5.5. Protéase

Le test de protéase a été réalisé sur le milieu GYP (Maria et *al.*, 2005), additionné de 0,4% de gélatine (gélatine, 8 g / 100 ml d'eau distillée) et 2ml de bleu de bromophénol (Annexe D). Les champignons sont cultivés dans des boîtes de Pétri contenant ce milieu, à raison de trois répétitions par souche. Une boîte sans inoculum sert comme témoin. Après incubation à 28°C pendant 8 jours, les plaques ont été inondées avec du sulfate d'ammonium aqueux. La présence d'un halo clair autour des colonies indique une activité protéolytique.

II.2.5.6. Lipase

L'activité lipolytique a été déterminée en utilisant le milieu Peptone Agar (Annexe D) décrit par Maria et *al.* (2005), auquel nous ajoutons le tween 20 stérilisé préalablement par filtration sous vide (1 ml pour 100 ml du milieu) et 2 ml de bleu de bromophénol. Des boîtes contenant ce milieu sont inoculées avec des disques mycéliens, à raison de deux répétitions par souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. L'incubation des boîtes se fait à 28°C pendant 3 à 5 jours. La présence d'un halo clair indique une réponse positive pour la production de lipase.

II.2.5.7 Estérase :

L'activité estérasique a été déterminée en utilisant le milieu Peptone Agar (Annexe D) décrit par Carrim et *al.* (2006), auquel nous ajoutons le tween 80 stérilisé séparément par filtration sous vide (1 ml pour 100 ml du milieu) et 2 ml de bleu de bromophénol. Des boîtes contenant ce milieu sont inoculées avec des disques mycéliens, à raison de deux répétitions par souche et une boîte sans champignon sert comme témoin. L'incubation des boîtes se fait à 28°C pendant 3 à 5 jours. La présence d'un halo clair indique une réponse positive pour la production d'estérase.

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Dénombrement et purification de la flore fongique rhizosphérique

III.1.1. Dénombrement de la flore microbienne

Après incubation des 16 boîtes, une diversité de la flore microbienne du sol rhizosphérique de palmier dattier est constatée. Un dénombrement c'est-à-dire un comptage total des colonies a été effectué (Tableau 3).

Tableau 4 : Résultats du dénombrement de la flore fongique totale du sol rhizosphérique.

Code, dilution et numéro de la boîte	Nombre de colonies
TB -2 (1)	100
TB -2 (2)	103
TB -4 (1)	14<30
TB -4 (2)	6< 30
TF -2 (1)	220
TF -2 (2)	200
TF -4 (1)	11< 30
TF -4 (2)	7<30
TC -2 (1)	25<30
TC -2 (2)	216
TC -4 (1)	11<30
TC -4 (2)	21<30
TR -2 (1)	73
TR -2 (2)	32
TR -4 (1)	5<30
TR -4 (2)	2<30

Les résultats du dénombrement (Tableau 3) montrent une densité fongique du sol rhizosphérique du palmier dattier des trois cultivars (Biskra, Feggous et Cherka) par rapport variété de Ras El-Hmar et aussi la dilution 10^{-2} est très concentrée en flore microbienne par rapport à la dilution 10^{-4} .

L'Unité Formant Colonie (UFC) a été calculée avec le pourcentage de répartition du nombre de colonies des échantillons des quatre variétés. Les résultats sont représentés dans le (Tableau 4)

Tableau 5 : Résultats du dénombrement de la flore fongique microbienne sur milieu PDA

Répétitions Cultivars	Nombre de colonies		Dénombrement UFC	Pourcentage (%)
	Dilution 10^{-2}	Dilution 10^{-4}		
Biskra	101,5	10<30	1 015	21,00%
Feggous	210,0	9<30	2 100	43,43%
Cherka	120,5	16<30	1 205	24,92%
Ras El-Hmar	52,5	3,5<30	515	10,65%

III.1.2. Sélection des isolats fongiques

La sélection a été faite sur la base d'une analyse macroscopique de chaque boîte. Le nombre d'isolat fongique choisi dans chaque boîte est démontré dans le Tableau 5. Cinq boîtes parmi les seize ont été éliminées parce qu'elles comprenaient une forte densité bactérienne ou une absence d'isolats fongiques.

Les résultats du (Tableau 5) montrent un nombre important d'isolats fongiques du sol rhizosphérique de la variété Biskra du palmier dattier comparé aux trois autres régions. Un total de 27 isolats a été sélectionné pour procéder à leurs purifications.

Tableau 6 : Résultat du nombre d'isolats fongiques sélectionnés.

Code	Nombre d'isolats
TB21	11 isolats
TB41	2 isolats
TB42	2 isolats
TF41	1 isolat
TF42	1 isolat
TC41	2 isolats
TC42	3 isolats
TR21	2 isolats
TR22	1 isolat
TR41	1 isolat
TR42	1 isolat

III.1.3. Purification des champignons isolés :

Une série de repiquage successive des 27 isolats sélectionnés, nous a permis de purifier 31 champignons. Le nombre total d'isolats obtenus par région et représenté dans la (figure 9).

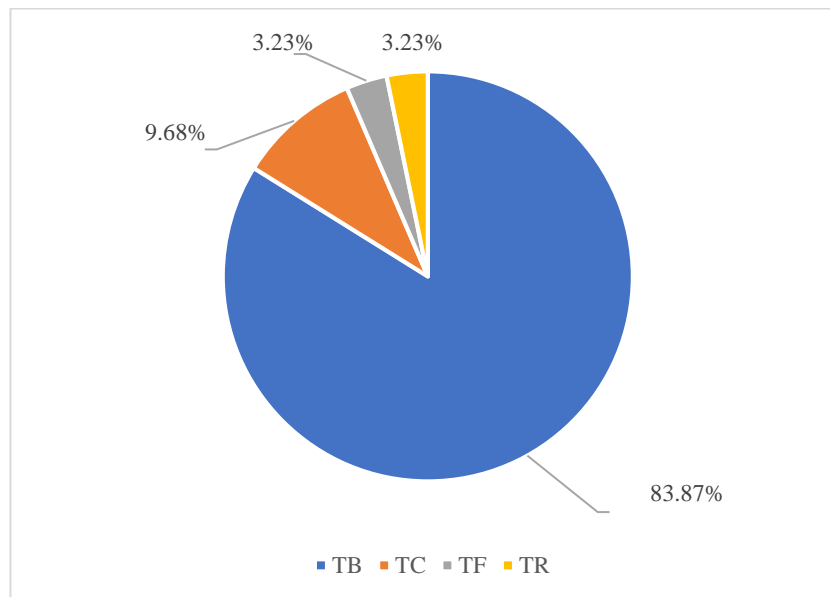


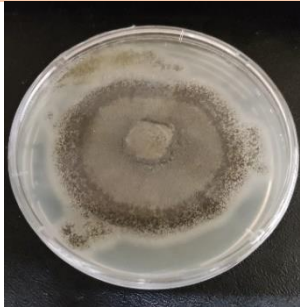
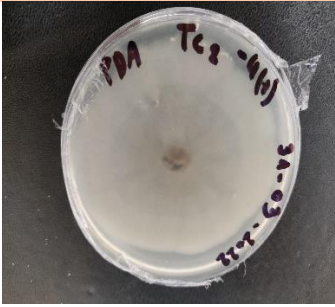


Figure 9 : Répartition du nombre d'isolats purifiés à partir du sol rhizosphérique des quatre variétés du palmier dattier.

III.2. Caractérisation macroscopique et microscopique de la flore fongique rhizosphérique

II.2.1. Caractérisation macroscopique

La caractérisation macroscopique des 31 champignons purifiés nous a permis de les classer en groupe ou morphotype. Les champignons avec un morphotype unique et différent représentent un seul groupe. Les résultats de la caractérisation macroscopique sont représentés dans les Tableaux 6 à 12.

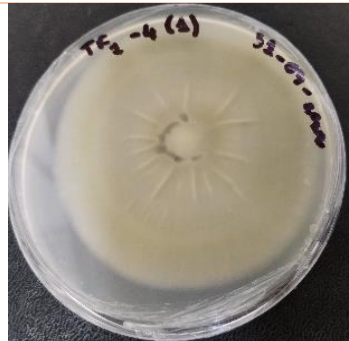
Tableau 7 : Caractérisation macroscopique du groupe 1

Isolats fongiques	Aspects des Colonies	
	Recto de la boite	Verso de la boite
TC241	 <p>Noire poudreuse</p>	 <p>Verte lisse</p>
TB1021	 <p>Noire poudreuse</p>	 <p>Verte lisse</p>

TF141

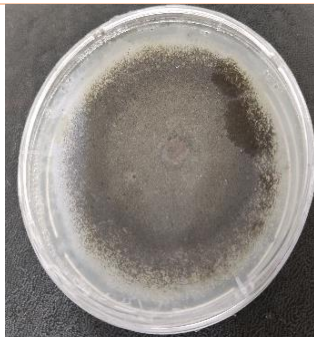


Noire poudreuse



Verte ondulé

TB721



Noire poudreuse

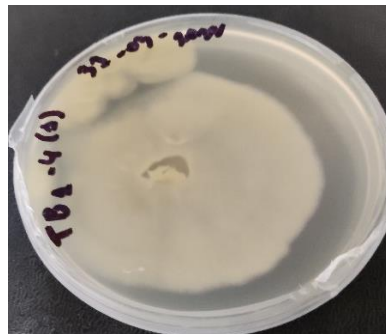


Verte lisse

TB141

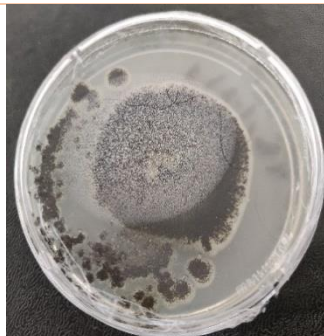


Noire poudreuse



Verte lisse

TB621



Noire poudreuse

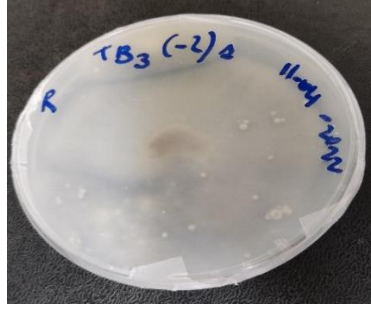


Verte ondulé

TB321



Noire poudreuse



Verte lisse

TC241

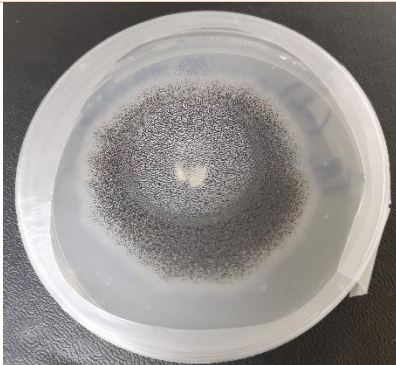


Noire Poudreuse

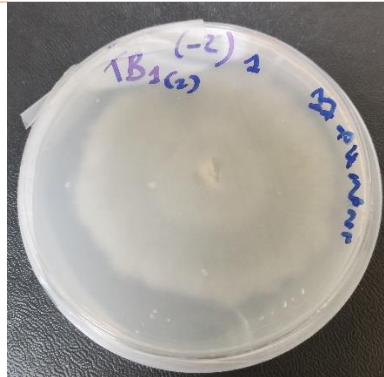


Verte Lisse

TB1221



Noire poudreuse

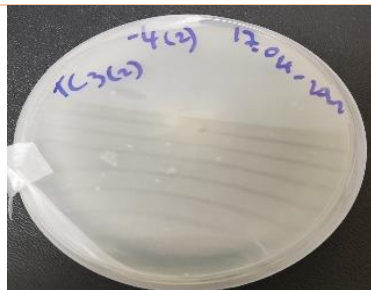


Verte lisse

TC3242






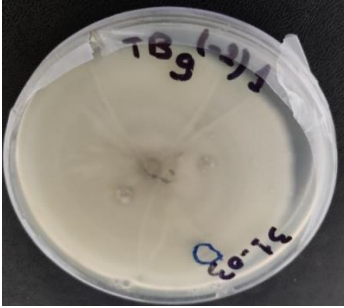


Noire Poudreuse

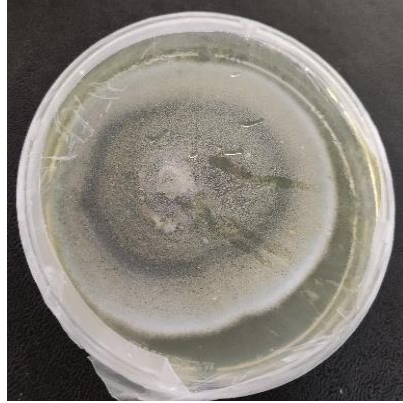


Verte Lisse

Tableau 8 : Caractérisation macroscopique du groupe 2

Isolats fongiques	Aspects des Colonies	
	Recto de la boîte	Verso de la boîte
TR41	 <p>Centre beige / Périphérie Verte poudreuse</p>	 <p>Verte lisse</p>
TB1121	 <p>Centre beige / Périphérie Verte poudreuse</p>	 <p>Verte lisse</p>
TB921	 <p>Centre beige / Périphérie Verte poudreuse</p>	 <p>Verte lisse</p>

TB221

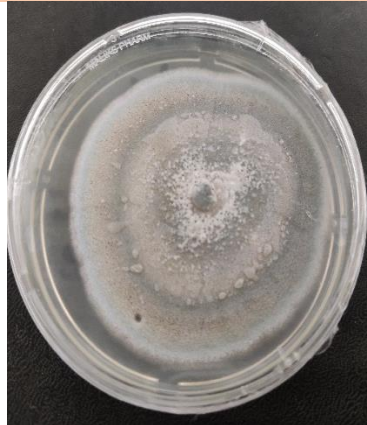


Centre beige / Périphérie Verte
poudreuse

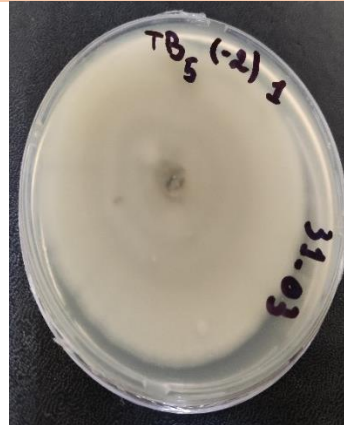


Verte lisse

TB521

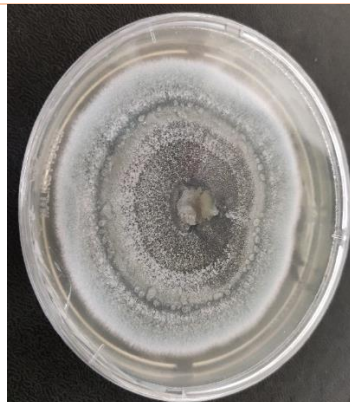


Centre beige / Périphérie Verte
poudreuse

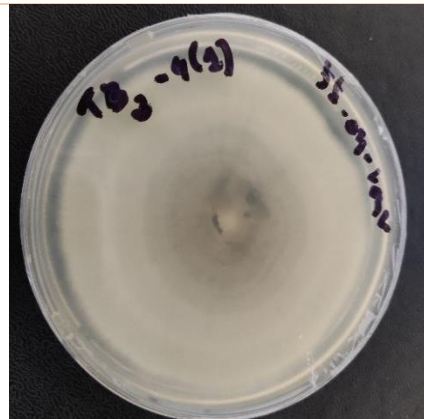


Verte lisse

TB241



Centre beige / Périphérie Verte
poudreuse



Verte lisse

Tableau 9 : Caractérisation macroscopique du groupe 3









	Aspects des Colonies	
Isolats fongiques	Recto de la boîte	Verso de la boîte
TB1121	 <p>Beige Cotonneuse</p>	 <p>Beige ondulé</p>
TB321	 <p>Beige cotonneuse</p>	 <p>Beige ondulé</p>
TB4121	 <p>Beige cotonneuse</p>	 <p>Beige ondulé</p>
TB1221	 <p>Beige cotonneuse</p>	 <p>Beige ondulé</p>

Tableau 10 : Caractérisation macroscopique du groupe 4

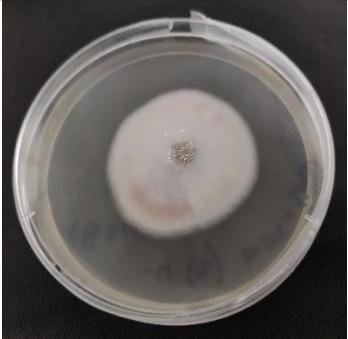
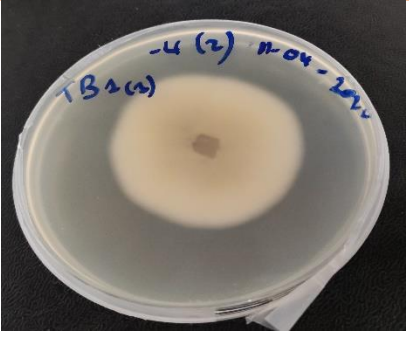

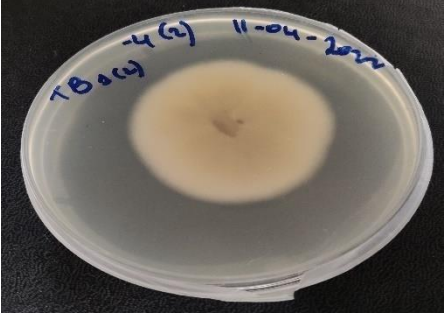
Isolats fongiques	Aspects des Colonies	
	Recto de la boîte	Verso de la boîte
TB1142	 <p>Marron cotonneuse</p>	 <p>Jaune lisse</p>
TB1242	 <p>Marron cotonneuse</p>	 <p>Jaune lisse</p>

Tableau 11 : Caractérisation macroscopique du groupe 5

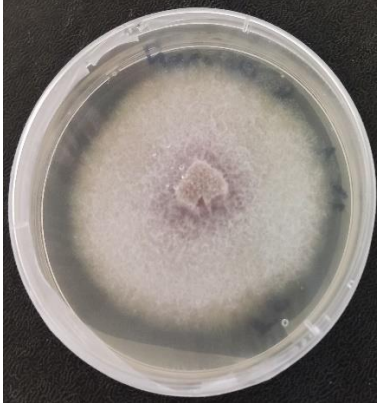
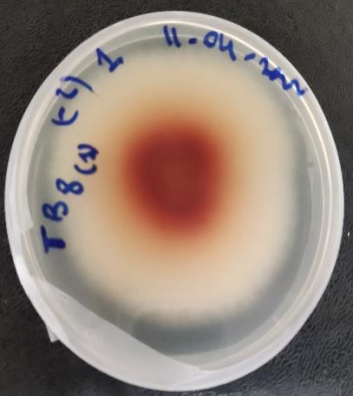

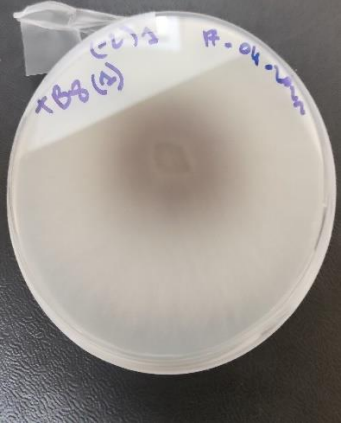
Isolats fongiques	Aspects des Colonies	
	Recto de la boîte	Verso de la boîte
TB8121	 <p>Violet à blanche cotonneuse</p>	 <p>Centre violacé périphérie blanche lisse</p>
TB 81212	 <p>Violet à blanche cotonneuse</p>	 <p>Centre violacé périphérie blanche lisse</p>

Tableau 12 : Caractérisation macroscopique du groupe 6


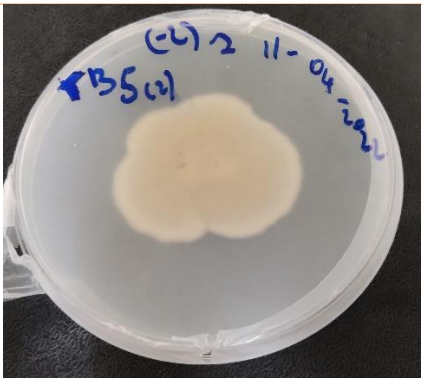
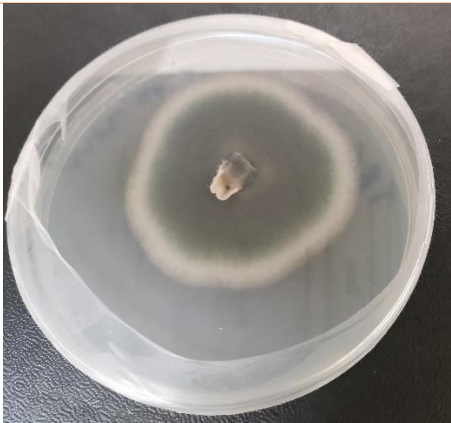
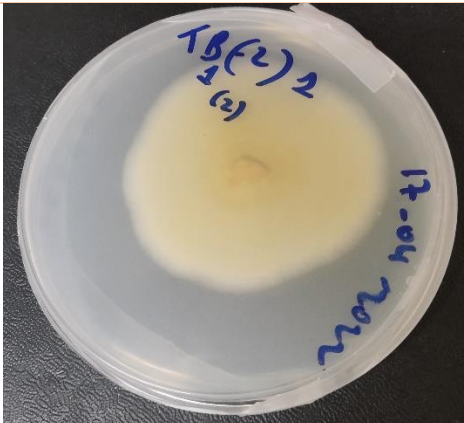


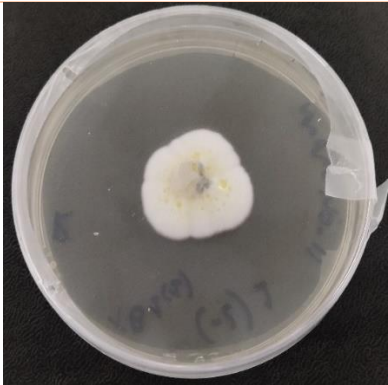
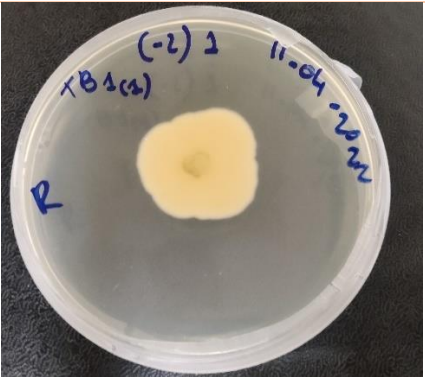
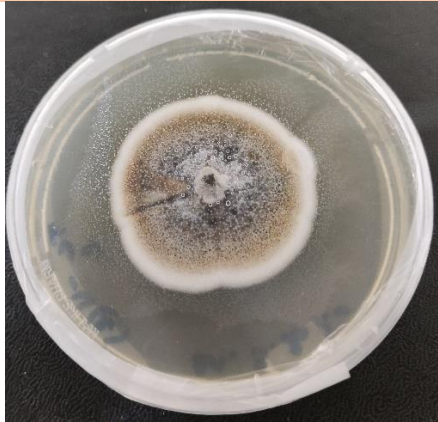
Isolats fongiques	Aspects des Colonies	
	Recto de la boîte	Verso de la boîte
TB5221	 <p>Verdâtre poudreuse</p>	 <p>Jaune lisse</p>
TB1221	 <p>Verdâtre poudreuse</p>	 <p>Jaune lisse</p>

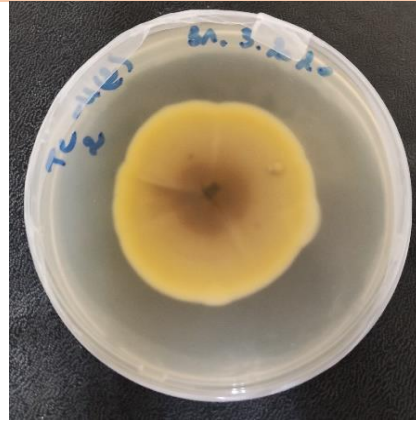
Tableau 13 : Caractérisation macroscopique des morphotypes représenté par un seul isolat (Groupe 7 à 11)

	Aspects des Colonies	
Isolats fongiques	Recto de la boîte	Verso de la boîte
Groupe 7 TB1221	 <p>Blanche granuleuse</p>	 <p>Jaune ondulé</p>
Groupe 8 TB1121	 <p>Centre jaune périphérie banche cotonneuse</p>	 <p>Jaune lisse</p>

Groupe 9
TC242

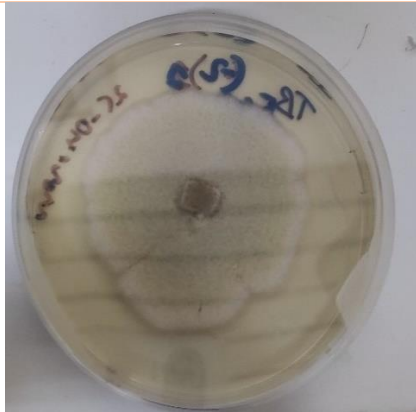


Centre marron périphérie beige
poudreuse

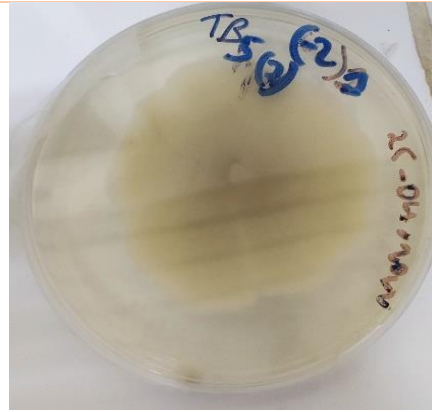


Beige à jaune Ondulé

Groupe 10
TB5221



Jaune poudreuse



Jaunelisse

Groupe 11
TB5121



Verdâtre granuleuse



Vert ondulé

Le classement des isolats selon leurs morphotypes et représenté dans la (Figure 10)

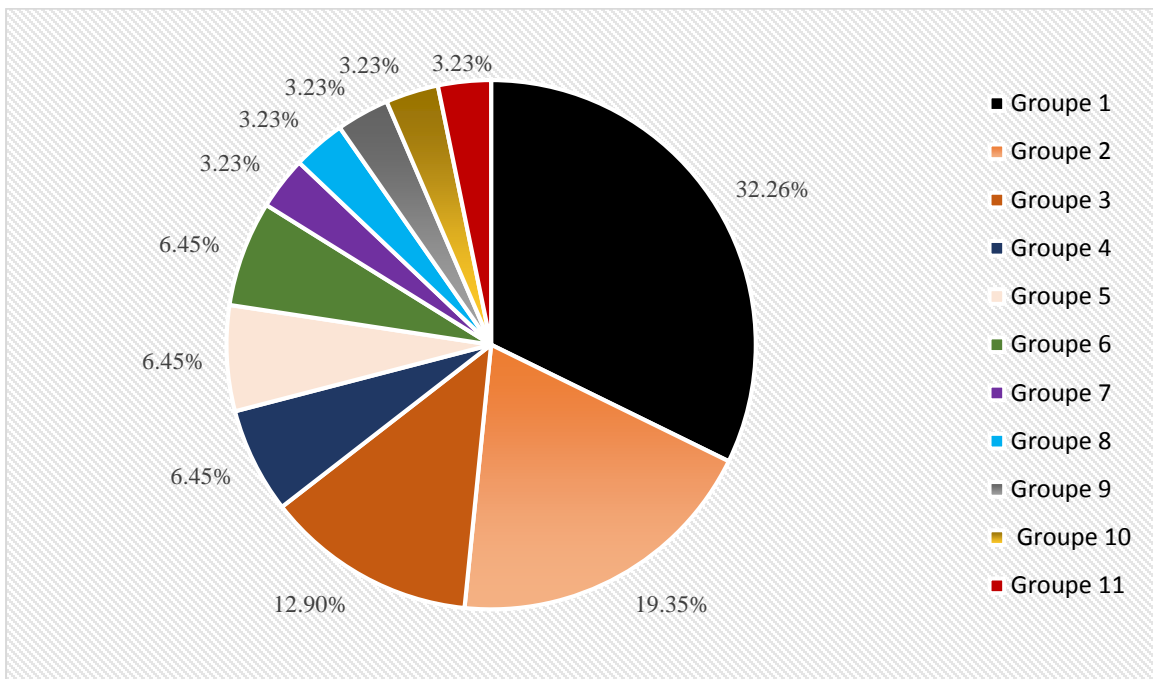


Figure 10 : Répartition des isolats selon leurs morphotypes.

III.2.2. Caractérisation microscopique

Une sélection de 13 champignons a été réalisée sur les 31 purifiés pour procéder à leur caractérisation microscopique afin de les identifier. Un seul isolat de chaque morphotype a subi une caractérisation microscopique. Cette dernière a été effectuée par un microscopique photonique au grossissement x 40. Les résultats obtenus sont montrés dans les Figures 11 à 23.



Figure 11 : Observation macroscopique et microscopique de TB8121 *Fusarium* sp. (Gx40). A : hyphe non cloisonné, B : Microconidies.

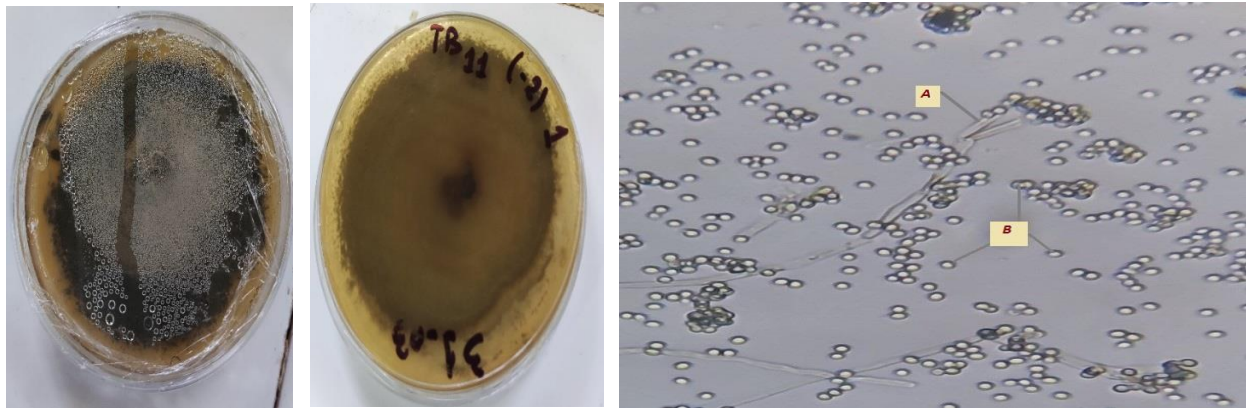


Figure 12 : Observation macroscopique et microscopique de TB1121 *Penicillium* sp. (G×40). A : Hyphes septés, B : spores.

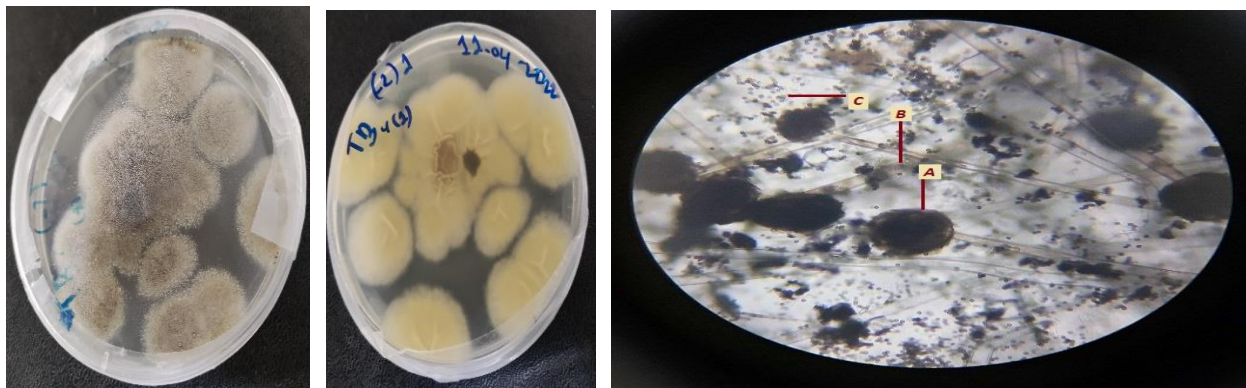


Figure 13 : Observation macroscopique et microscopique de TB4121 *Apegillus* sp. (G×40). A : têteaspergilaire, B : Hyphe non sépté, C : spores.

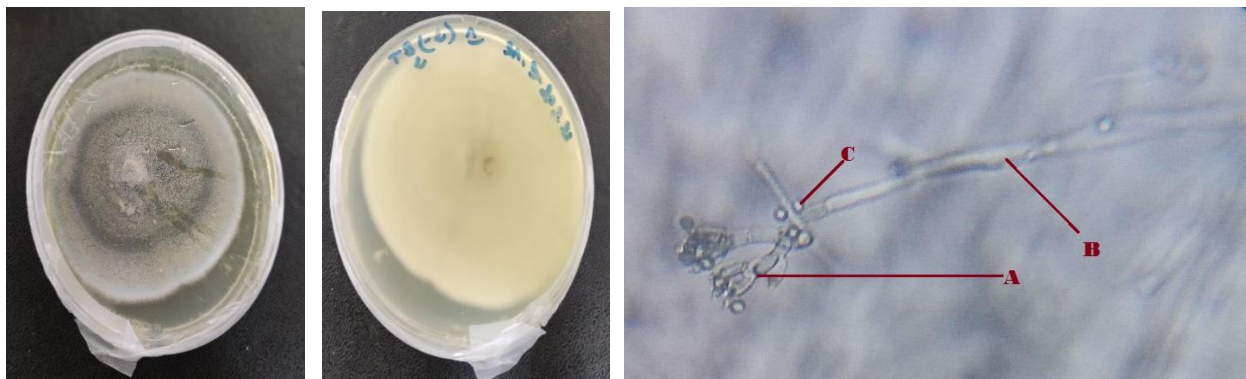


Figure 14 : Observation macroscopique et microscopique de TB221 *Penicillium* sp. (G×40). A : pinceau pinicillaire, B : hyphe, C : spores.

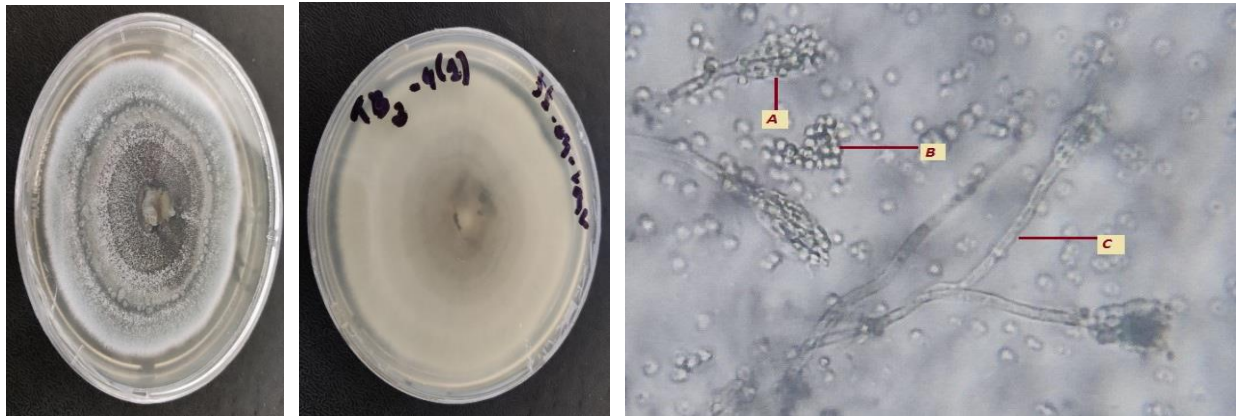


Figure 15 : Observation macroscopique et microscopique de TB241 *Penicillium* sp. (G×40). A : pinceau penicillaire, B : spores, C : Hyphe non cloisonné.

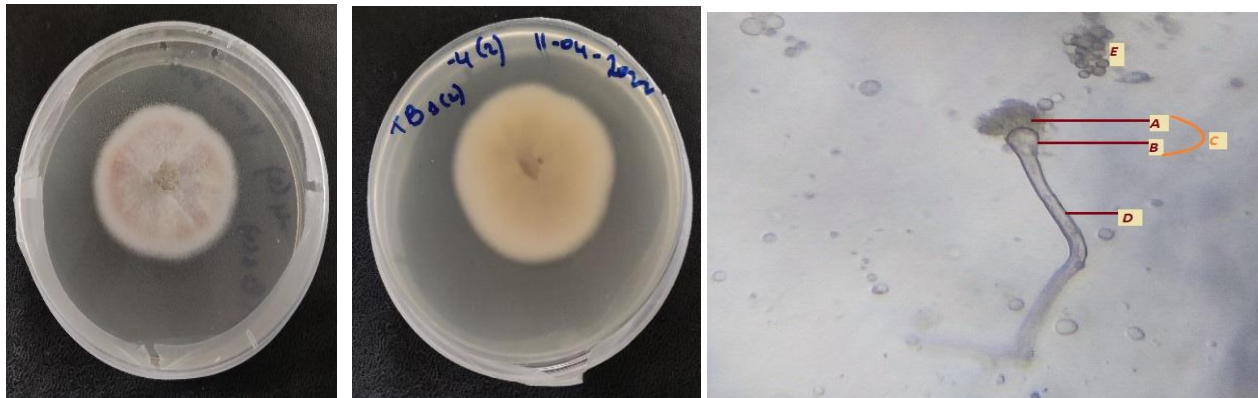


Figure 16 : Observation macroscopique et microscopique de TB1241 *Aspergillus* sp. (G×40). A : conidies, B : Métule, C : tête aspergillaire, D : Hyphe non cloisonné, E : Spores.

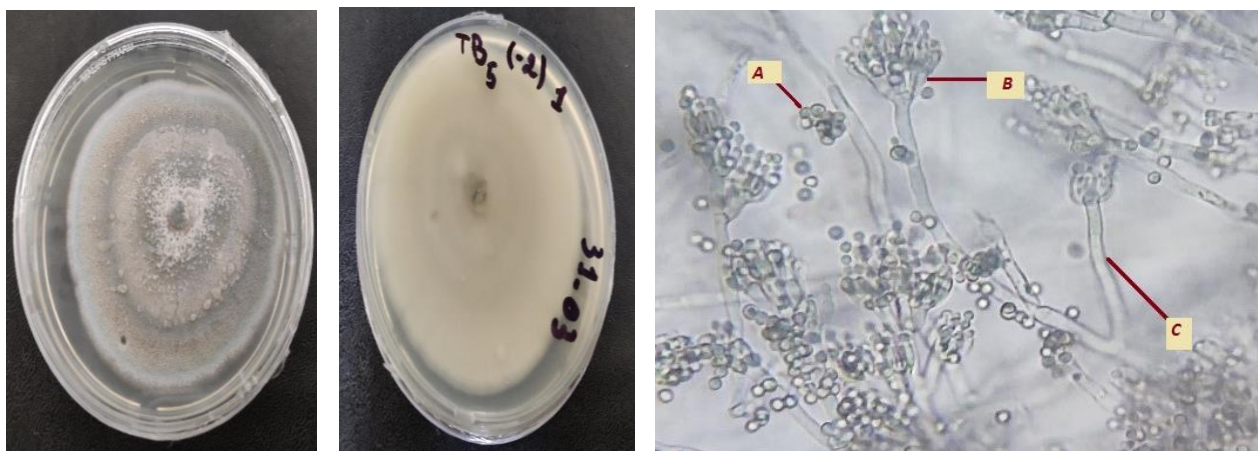


Figure 17 : Observation macroscopique et microscopique de TB521 *Penicillium* sp. (G×40). A : spores, B : pinceau pénicillaire, C : hyphe.

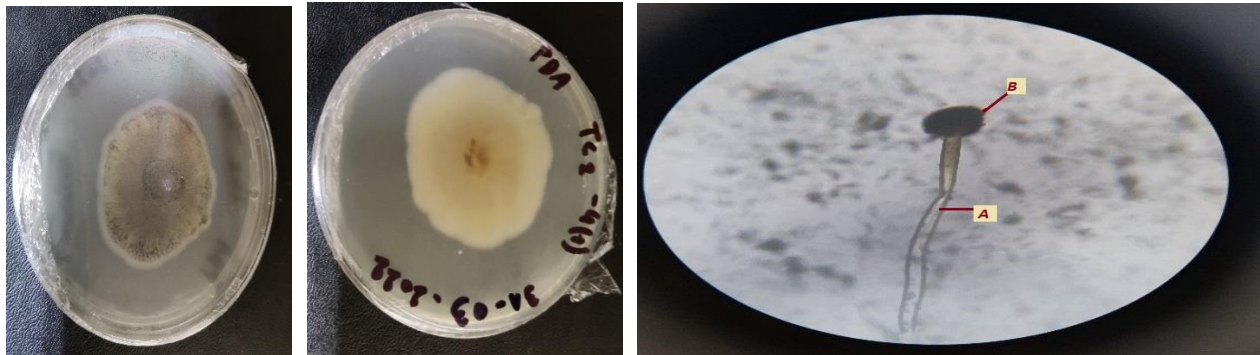


Figure 18 : Observation macroscopique et microscopique TC241 *Aspergillus* sp. (G×40). A : hyphe, B : tête aspergillaire.

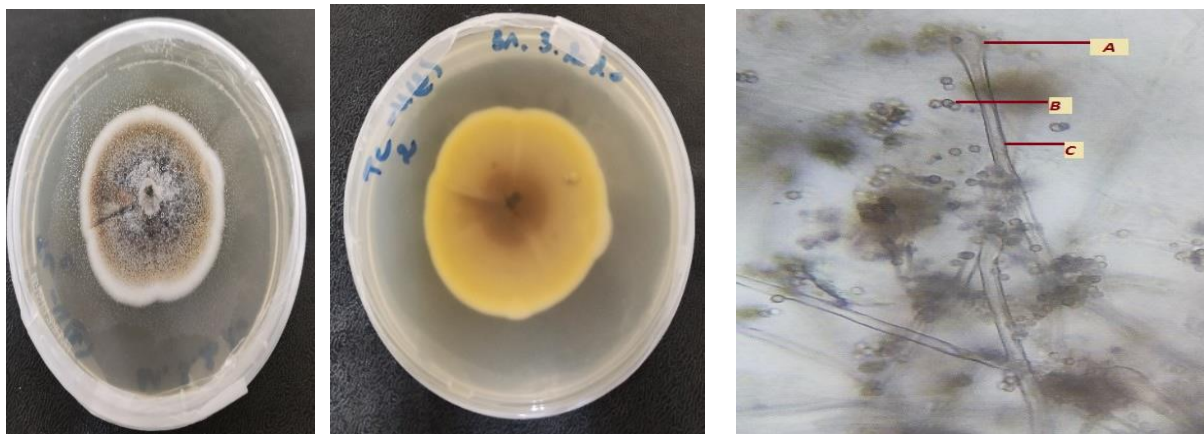


Figure 19 : Observation macroscopique et microscopique TC242 *Aspergillus* sp. (G×40). A : tête aspergillaire, B : Spores, C : hyphe non sépté.

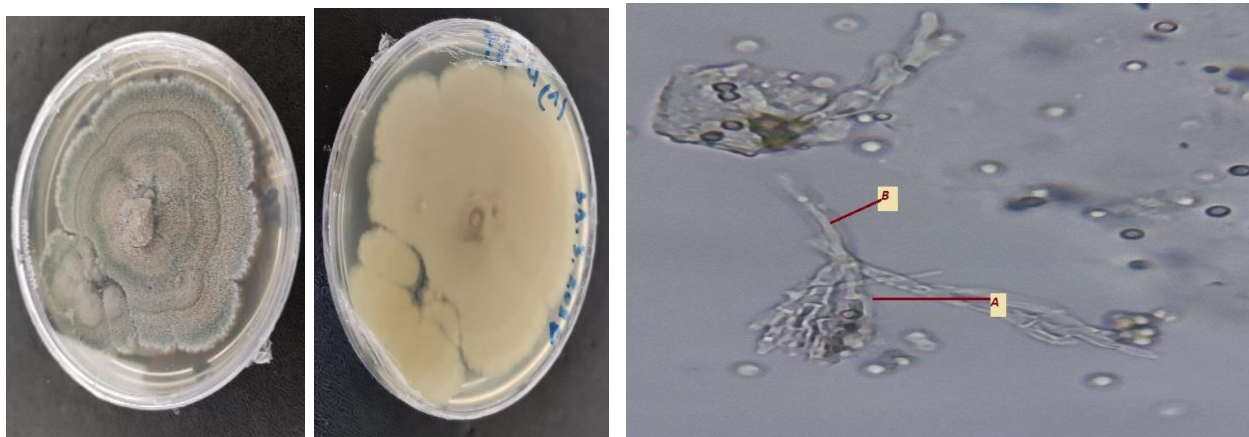


Figure 20 : Observation macroscopique et microscopique de TR41 *Penicillium* sp. (G×40). A : pinceau penicillaire, B : hyphe non cloisonné.

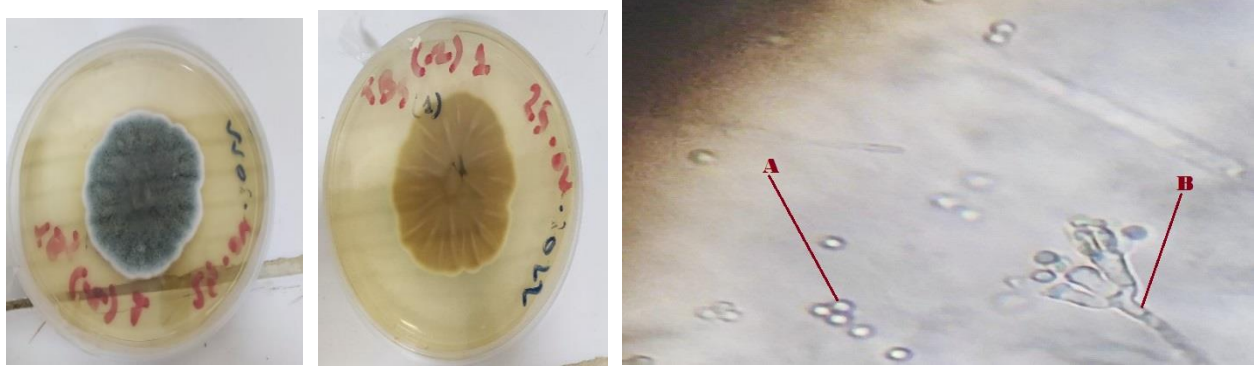


Figure 21 : Observation macroscopique et microscopique TB5121 *Penicillium* sp. (G×40). A : spores, B: hyphe.

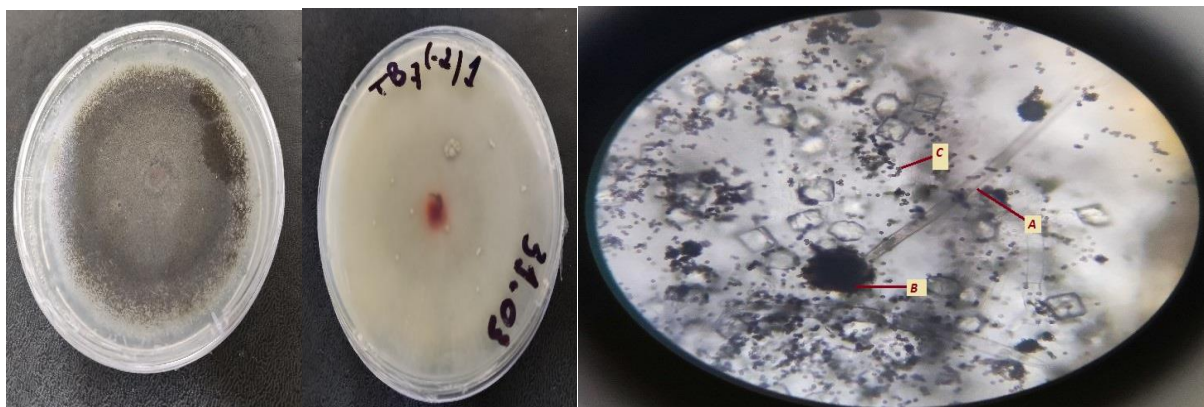


Figure 22 : Observation macroscopique et microscopique TB721 *Aspergillus niger*. (G×40). A : hyphe noncloisonné , B : Tete aspergillaire , C : spores.

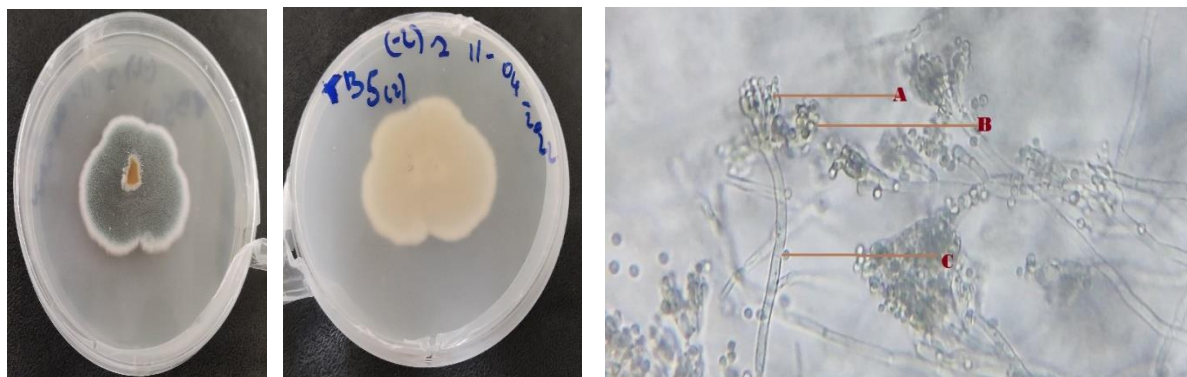


Figure 23 : Observation macroscopique et microscopique TB5221 *Penicillium* sp. (G×40). A : pinceau pinicillaire, B : spores, C : hyphe.

Les Caractéristiques microscopiques du genre *Penicillium* sont déterminées par les hyphes et des conidiophores septés et hyalins. Les conidies et les phialides peuvent être simples ou ramifiées ; les conidiophores sont formés par les phialides secondaires. L'organisation des phialides à l'extrémité des conidiophores est très courante (De Hoog et al. 2000).

Les Caractéristiques microscopiques du genre *Fusarium* sont représentés par des hyphes conidiophores, phialides, macroconidies et microconidies septés et hyalins. En plus de ces éléments de base, des chlamydo-spores sont également produites par certaines espèces. Les phialides sont cylindriques - avec une petite collerette -, solitaires ou produites comme composants d'un système ramifié complexe. La couleur de la colonie, la longueur et la forme des macroconidies, le nombre, la forme et la disposition des fusiformes et la présence ou l'absence de chlamydo-spores sont des caractéristiques clés pour la différenciation des espèces de *Fusarium* (De Hoog et al. 2000).

Les Caractéristiques microscopiques d'*Aspergillus niger* sont définies par des conidies globuleuses à subglobuleuses. Les têtes conidiennes sont marron foncé à noire, radiées et bisériées avec des métules deux fois plus longues que les phialides. *A. niger* est l'une des espèces les plus courantes et les plus facilement identifiables du genre *Aspergillus* (Ellis et al., 2007)

Les résultats obtenus de la caractérisation microscopique nous dévoilent une forte dominance du genre : *Aspergillus* et *Penicillium*. Le nombre de souche caractérisé est démontré dans l'histogramme de la (figure 24).

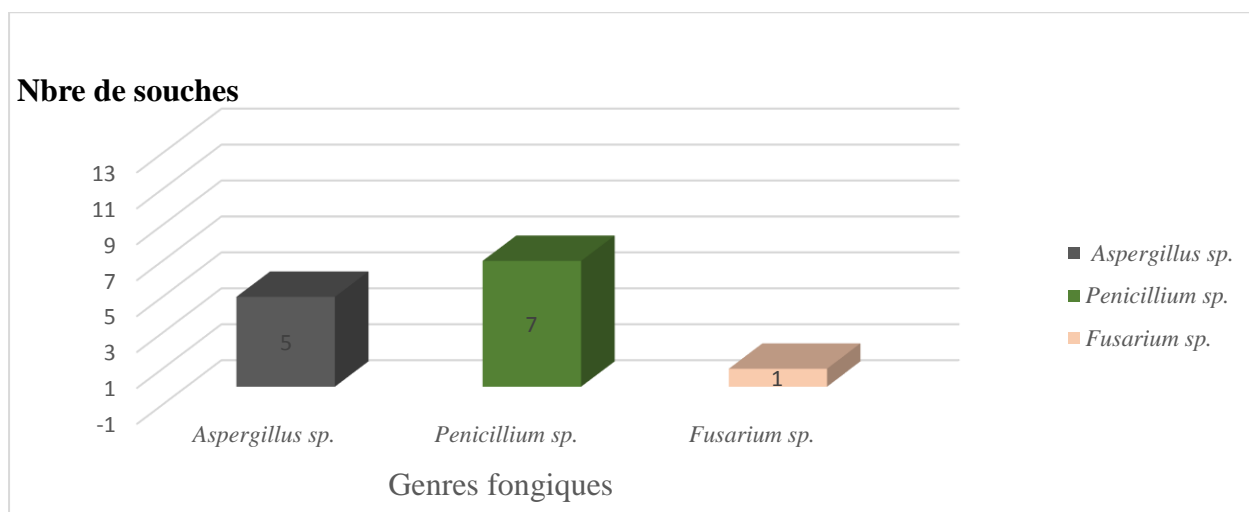


Figure 24 : Histogramme démontrant le nombre de souche par genre.

III.3 Détermination de l'activité enzymatique

La détermination de l'activité enzymatique a été assurée en réalisant des tests qualitatifs permettant de démontrer la production d'enzymes extracellulaires à partir des souches fongiques sélectionnées et caractériser précédemment.

III.3.1 Activité Chitinasique

Les résultats de l'activité chitinasique montrent que 11 des souches testées soit 84,62% montrent une réponse positive dans le cas de la production de chitinase et cela se résume par la croissance des colonies sur ce milieu (Tableau 13 et 25).

Tableau 14 : Résultats de l'activité Chitinasique des différentes souches.

Isolats	Réaction
TB1242 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TB221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB241 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB4121 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TB5121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB5221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB521 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB721 <i>Aspergillus niger</i>	+
TB8121 <i>Fusarium</i> sp.	+
TB1121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TC241 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TC242 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TR41 <i>Penicillium</i> sp.	-

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

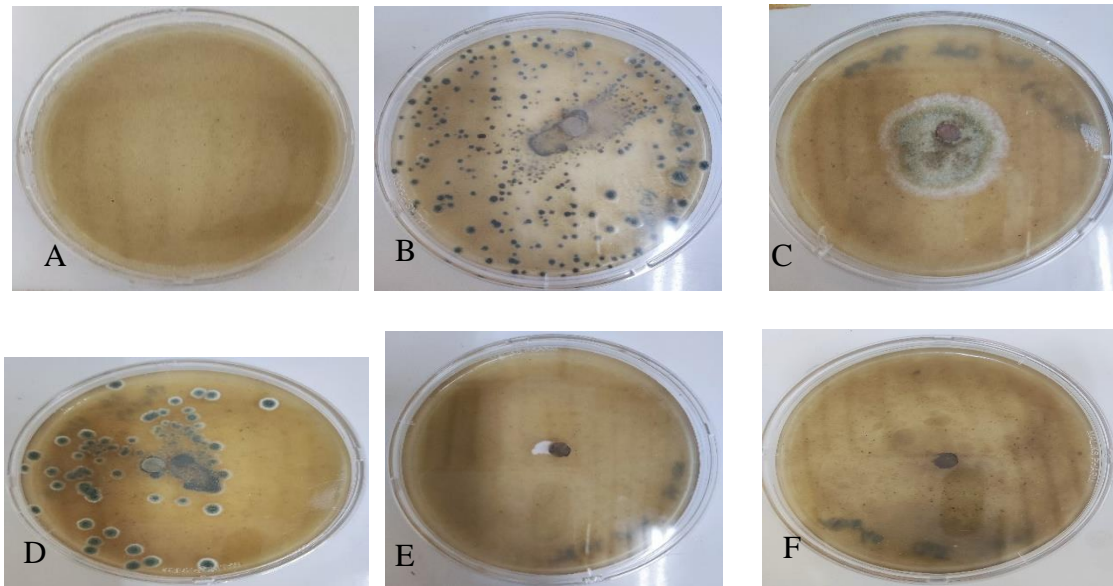


Figure 25 : Activité chitinasique des champignons rhizosphériques testés. A : Témoin, B : TB5221 *Penicillium* sp., C : TB1242 *Aspergillus* sp., D : TB5121 *Penicillium* sp. E : TR41 *Penicillium* sp., F : TB241 *Penicillium* sp.

Les chitinases sont largement distribuées dans les plantes, les bactéries, les champignons, les insectes et les vertébrés (Pérez et *al.*, 2014). Il s'agit du principal composant structural des parois cellulaires des champignons et de l'exosquelette des invertébrés (Seidl, 2008). La chitine est située à différents endroits pour différents champignons tels que les champignons filamenteux qui ont de la chitine dans leurs couches de paroi cellulaire interne près de la membrane plasmique selon Ruiz-Herrera (1991), tandis que les cellules de levure en ont dans les septas et la plaie bourgeonnante selon Bulik et *al.* (2003) avec une teneur plus élevée d'environ 20 % dans les champignons filamenteux et une teneur inférieure de 0,5 à 5 % dans les cellules de levure (Hartl et *al.*, 2012).

Karthik et *al.* (2014) ont regroupé certaines souches fongiques productrices de chitinase parmi elles, nous trouvons plusieurs souches du genre *Aspergillus* sp. et du genre *Penicillium* sp. et une seule du genre *Fusarium* sp. qui est *Fusarium oxysporum* et cela rentre en parfaite corrélation avec les résultats obtenus dans notre étude c'est-à-dire que toutes les souches du genre *Aspergillus* sp. et la majorité des souches de *Penicillium* sp. et la seule souche de *Fusarium* sp. ont toutes synthétisé l'enzyme chitinase pour dégrader le substrat chitine qui remplace le glucose dans le milieu pour pouvoir croître.

III.3.2 Activité phosphatasique

La totalité des champignons testés ont la capacité de solubiliser le phosphate par la production de phosphatase, ce qui est indiqué soit par la décoloration du milieu ou par la formation d'halo claire autour des colonies (Tableau 14 et figure 26).

Tableau 15 : Résultats de l'activité phosphatasique des différents isolats.

Isolats	Réaction
TB1242 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TB221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB241 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB4121 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TB5121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB5221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB521 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB721 <i>Aspergillus niger</i>	+
TB8121 <i>Fusarium</i> sp.	+
TB1121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TC241 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TC242 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TR41 <i>Penicillium</i> sp.	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

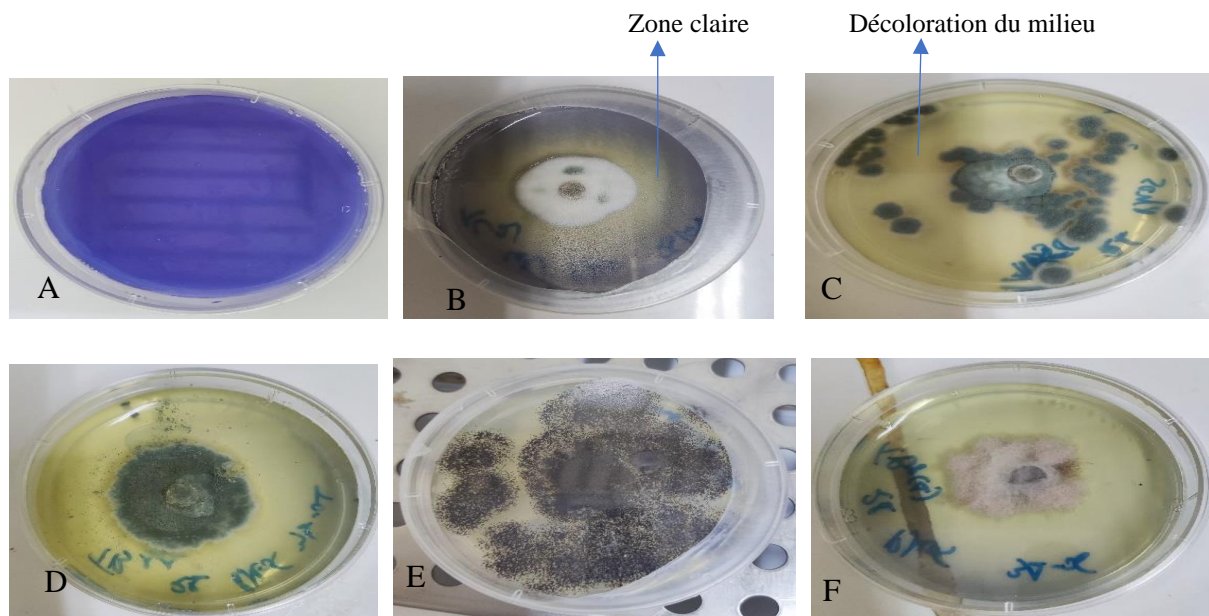


Figure 26 : l'Activité phosphatasique des champignons rhizosphériques testés. A : Témoin, B : TC242 *Aspergillus* sp., C : TB5121 *Penicillium* sp., D : TB1121 *Penicillium* sp., E : TC241 *Aspergillus* sp., F : TB8121 *Fusarium* sp.

Le phosphore (P) est un élément nutritif essentiel nécessaire à la croissance et au développement des plantes. La faible disponibilité du phosphore dans le sol est l'une des principales contraintes pour la production agricole. Les champignons solubilisateurs de phosphate augmentent le phosphore disponible libéré par les sols et contribuent à satisfaire les besoins en phosphore des plantes (Islam et *al.*, 2019)

Islam et *al.* (2019) ont démontré la capacité de 16 isolats fongiques à avoir une activité de solubilisation du phosphate. Les isolats étaient de 7 *Aspergillus sp.*, 7 *Penicillium sp.* et 2 *Taleromyces sp.* Ces auteurs ont testé la croissance et la survie des 16 souches de champignons solubilisant le phosphate à différentes températures : toutes les souches du genre *Penicillium sp.* ont une activité positive de solubiliser le phosphate entre 25 °C et 37 °C et sont négative à 42 °C en parallèle toute les souche du genre *Aspergillus sp.*, comme *Aspergillus niger* ont une activité positive de solubiliser le phosphate entre 25 °C et 42 °C. Les genres de *Fusarium sp.* ont aussi la capacité de solubiliser le phosphate selon Lopez et Sword (2015) ; Jaber et Enkerl (2017). Les résultats obtenus dans ce travail sont en corrélation avec les résultats de ces auteurs.

Nelofer et *al.* (2016) ont isolé du sol, une souche d'*Aspergillus niger* et ils ont révélé sa grande capacité à solubiliser le phosphore en milieu PVK et cela est en parfaite corrélation avec le même test que nous avons réalisé sur la souche *Aspergillus niger* TB721.

III.3.3. Activité amylolytique

Les résultats obtenus montrent que 7 des souches testées soit 53,85% ont une activité amylolytique représentée par un halo clair autour des colonies lors de l'inondation des boîtes avec la solution de lugol (Tableau 15 et figure 27).

Tableau 16 : Résultats de l'Activité amylytique des différentes isolats.

Isolats	Réaction
TB1242 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TB221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB241 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB4121 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TB5121 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB5221 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB521 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB721 <i>Aspergillus niger</i>	-
TB8121 <i>Fusarium</i> sp.	-
TB1121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TC241 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TC242 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TR41 <i>Penicillium</i> sp.	+

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

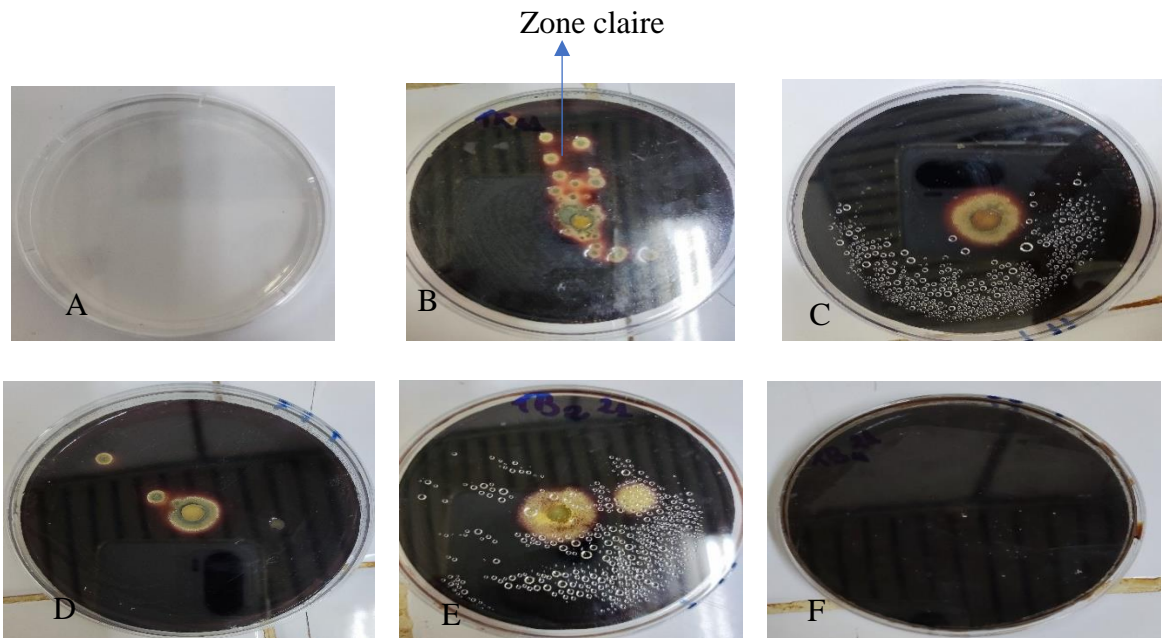


Figure 27 : Activité amylytique des champignons rhizosphériques testés. A : Témoin, B : TR41 *Penicillium* sp., C :TC241 *Aspergillus* sp. D: TR41 *Penicillium* sp., E: TB221 *Penicillium* sp., F: TB4121 *Aspergillus* sp.

Selon Saranraj et Stella (2013), les amylases fongiques sont utilisées pour hydrolyser les glucides, les protéines et autres constituants du soja, du blé en peptides, acides aminés, sucres et autres composés de faible poids moléculaire.

Khokhar et *al.* (2011) ont isolé des champignons filamenteux d'une variété de source des sols rhizosphériques. Ils ont isolé 15 champignons parmi eux *Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma*. Ils se sont appuyés sur une méthode de culture sur plaque qui utilise l'amidon soluble, après incubation de 7 jours à une température de 28°C, Ils ont inondé les boîtes d'une solution iodée et ils ont au final mesuré le diamètre des zones claires autour des colonies. Ils ont constaté que toutes les souches appartenant au genre *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Trichoderma* ont eu la capacité de dégrader l'amidon et de produire une zone claire et cela rentre en adéquation avec les résultats que nous avons obtenus dans notre étude et que là plus pars des souches *Aspergillus* et *Penicillium* ont eu une réaction positive.

III.3.4 Activité lipasique

Les résultats obtenus indiquent que 8 souches testées soit 61,54% ont eu une réponse positive à la production d'enzyme lipasique et cela se résume par la présence d'un halo clair aux bords des colonies (Tableau 16 et Figure 28).

Tableau 17 : Résultats de l'Activité lipasique des différents isolats.

Isolats	Réaction
TB1242 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TB221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB241 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB4121 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TB5121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB5221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB521 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB721 <i>Aspergillus niger</i>	+
TB8121 <i>Fusarium</i> sp.	-
TB1121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TC241 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TC242 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TR41 <i>Penicillium</i> sp.	-

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative.

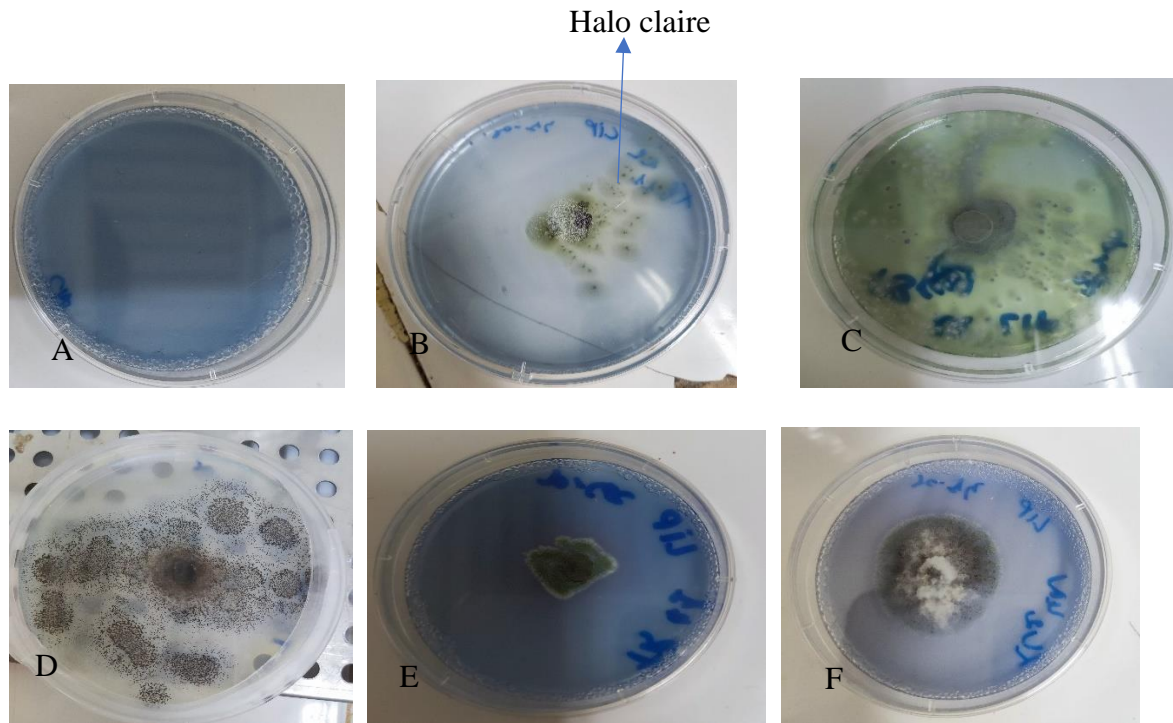


Figure 28 : Activité lipasique des champignons rhizosphériques testés. A : Témoin, B : TB1121 *Penicillium* sp., C : TB5221 *Penicillium* sp., D : TB721 *Aspergillus niger*., E : TR41 *Penicillium* sp., F : TC242 *Aspergillus* sp.

Ramos-Sánchez et al. (2015) ont démontré et mesuré l'activité lipasique de plusieurs souches parmi elles : nous citons *Aspergillus niger*, *A.fumigatus*, *Pennicillium* sp, *Rhizopus oryzae* etc...Ces derniers ont révélé que la souche *Aspergillus niger* avait la plus forte activité lipasique et cela rentre ont corrélation avec les résultats que nous avons obtenu c'est-à-dire que le genre *Aspergillus* et *Penicillium* ont une activité lipasique très importante.

D'après les travaux de De-Oliveira et al. (2020) ont pu constater la capacité d'une souche de *Fusarium* sp. à produire l'enzyme lipasique à différent pH et à différentes températures et ses résultats ne sont pas de corrélation avec le résultat de la souche TB8121 de *Fusarium* sp. n'a pas pu produire l'enzyme lipasique.

III.3.5 Activité estérasique :

Les résultats que nous avons obtenus dévoilent la capacité de 8 des souches testé 61,54% ont eu la capacité de synthétisé l'enzyme estérase et cela résulte par la présence d'un halo claire aux tours des colonies (Tableau 17 et Figure 29)

Tableau 18 : Résultats de l'activité estérasique des différents isolats.

Isolats	Réaction
TB1242 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TB221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB241 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB4121 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TB5121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB5221 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB521 <i>Penicillium</i> sp.	+
TB721 <i>Aspergillus niger</i>	+
TB8.121 <i>Fusarium</i> sp.	-
TB1121 <i>Penicillium</i> sp.	+
TC241 <i>Aspergillus</i> sp.	+
TC242 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TR41 <i>Penicillium</i> sp.	-

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

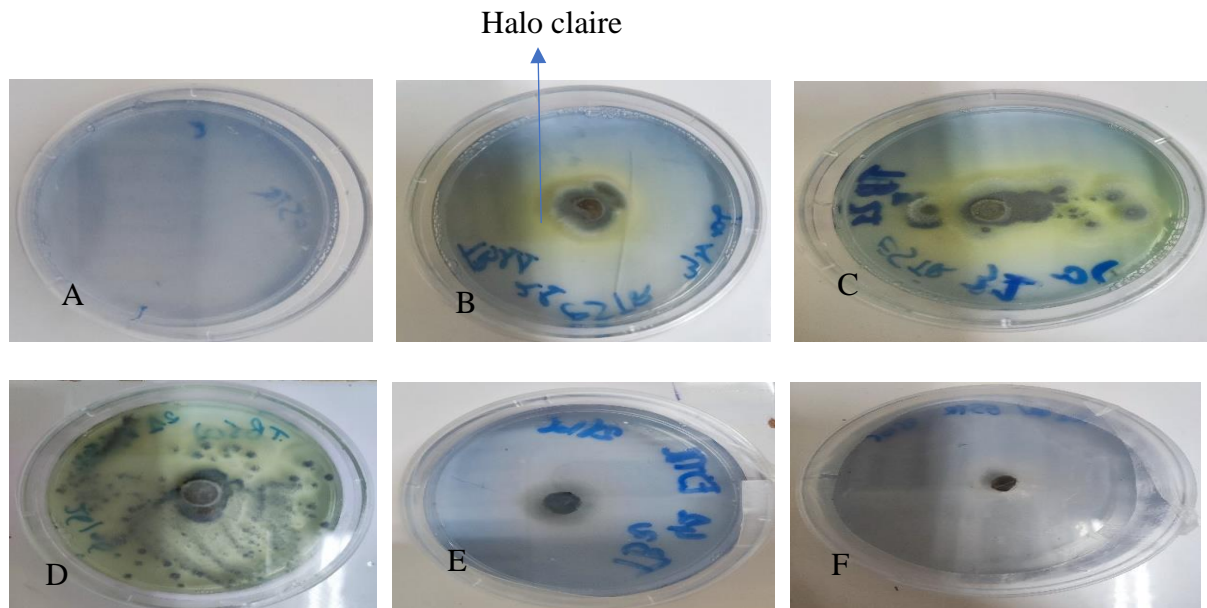


Figure 29 : Activité estérasique des champignons rhizosphériques testés. A : Témoins, B : TB1121 *Penicillium* sp. C : TB5121 *Penicillium* sp., D : TB5221 *Penicillium* sp., E : TB241 *Penicillium* sp., F : TC242 *Aspergillus* sp.

Hamid et *al.* (2021) ont démontré la capacité d'*Aspergillus niger* à produire l'enzyme estérase et ils ont révélé que cette dernière avait une synthèse optimale de l'enzyme à un pH=6 et une incubation de 3 jours et ce résultat est similaire en présence de la souche TB721 *Aspergillus niger* que nous avons testées.

Panda et Gowrishankar (2005) ont attesté que l'enzyme estérase peut être produit par des souches *Aspergillus*, *Penicillium sp.* et de *Fusarium oxysporum* et cela corrobore avec les résultats que nous avons obtenues c'est-à-dire, les souches dans la plus pars font partie du genre *Aspergillus* et *Penicillium* ont eu une réaction positive au test comparé à la souche de *Fusarium sp.* qui a montré une réaction négative.

III.3.6 Activité pectique

Les résultats auxquels nous sommes parvenus révélé que seulement 3 des souches testé 23.08% ont pu synthétiser l'enzyme pectinase. Les isolats qui ont une réponse positive sont a l'ordre de trois et appartiennent aux genre (*Aspergillus* TB4121, *Aspergillus sp.*, TB721 *Aspergillus niger* et TC241 *Aspergillus sp.*) (Tableau 18 et Figure 30).

Tableau 19 : Résultats de l'activité pectique des différents isolats.

Isolats	Réaction
TB1242 <i>Aspergillus sp.</i>	-
TB221 <i>Penicillium sp.</i>	-
TB241 <i>Penicillium sp.</i>	-
TB4121 <i>Aspergillus sp.</i>	+
TB5121 <i>Penicillium sp.</i>	-
TB5221 <i>Penicillium sp.</i>	-
TB521 <i>Penicillium sp.</i>	-
TB721 <i>Aspergillus niger</i>	+
TB8121 <i>Fusarium sp.</i>	-
TB1121 <i>Penicillium sp.</i>	-
TC241 <i>Aspergillus sp.</i>	+
TC242 <i>Aspergillus sp.</i>	-
TR41 <i>Penicillium sp.</i>	-

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

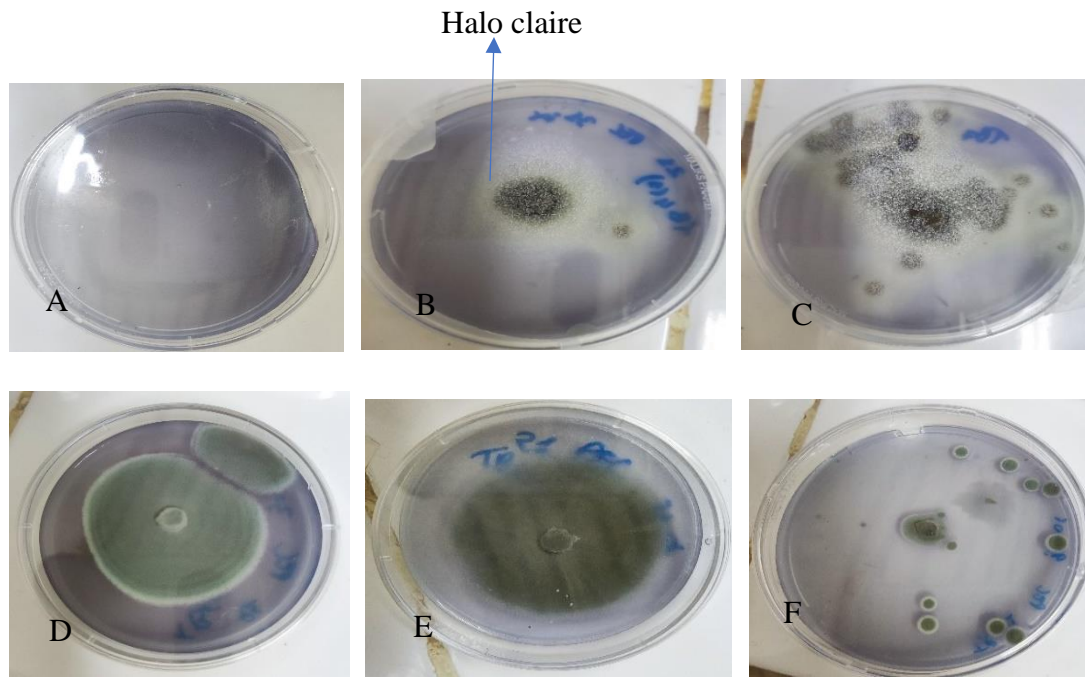


Figure 30 : l'Activité pectique des champignons rhizosphériques testés. A : Témoin, B : TB4121 *Aspergillus* sp, C : TB721 *Aspergillus niger.*, D : TB5121 *Penicillium* sp., E : TB1121 *Penicillium* sp., F : TR41 *Penicillium* sp.

Sudeep et *al* (2020), ont isolé 55 isolats à partir de vingt échantillons du sol différent et ils sont arrivés à l'affirmation que les souches d'*Aspergillus* sp. était le genre responsable de la production de l'enzyme pectinase et cela et en corrélation avec les résultats que nous avons obtenus.

III.3.7. Activité protéolytique

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'aucun isolat testé n'a pu avoir une activité protéolytique et cela se résume dans l'incapacité de tous les champignons testés à produire l'enzyme protéase et cela se résume par une absence totale d'un halo clair aux tours de toute les colonies testés (Tableau 19 et Figure 31).

Tableau 20 : Résultats de l'activité protéolytique des différents isolats.

Isolats	Réaction
TB1242 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TB221 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB241 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB4121 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TB5121 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB5221 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB521 <i>Penicillium</i> sp.	-
TB721 <i>Aspergillus niger</i>	-
TB8.121 <i>Fusarium</i> sp.	-
TB1121 <i>Penicillium</i> sp.	-
TC241 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TC242 <i>Aspergillus</i> sp.	-
TR41 <i>Penicillium</i> sp.	-

(+) : Activité positive ; (-) : Activité négative

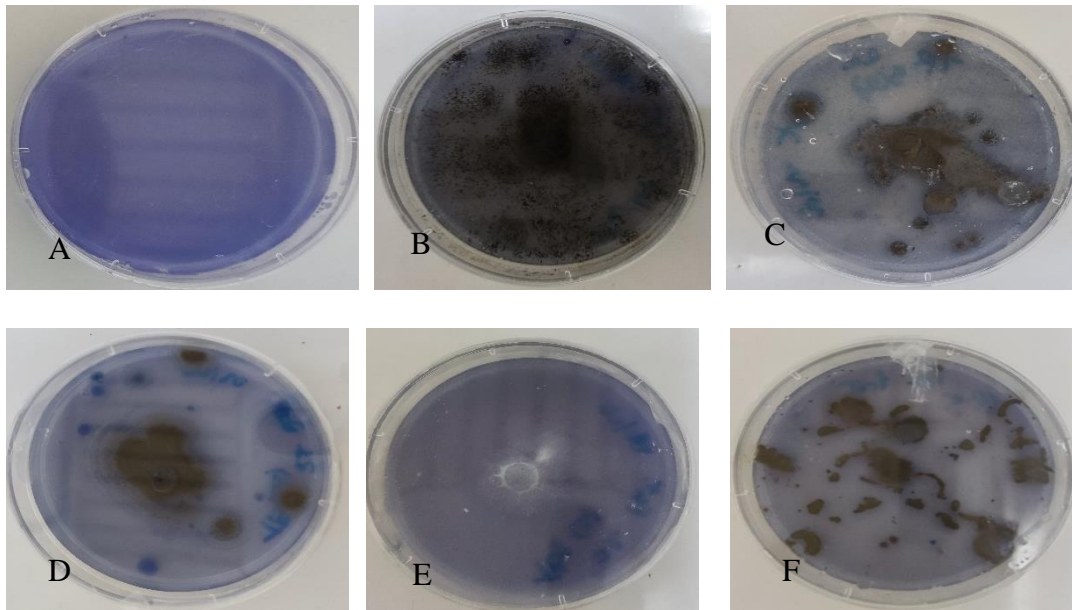


Figure 31 : Activité protéolytique des champignons rhizosphériques testés. A : Témoin, B : TC241 *Aspergillus* sp., C : TB5221 *Penicillium* sp., D : TB5121 *Penicillium* sp., E : TB8121 *Fusarium* sp., F : TB521 *Penicillium* sp.)

Les protéases, qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques, constituent le groupe d'enzymes le plus important du point de vue biotechnologique (Souza et *al.*, 2017).

Chandrasekaran et *al.* (2015) ont démontré la capacité de plusieurs souches issue du sol et prévenant du genre *Aspergillus* comme *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* à produire l'enzyme protéase et cela ne corrobore pas avec les résultats que nous avons obtenus et que la souche TB721 *Aspergillus niger* a eu une réponse négative à l'activité protéolytique.

Maitig et *al.* (2018) ont révélé la capacité de *Fusarium* sp. isolé du sol à produire en bonne quantité l'enzyme protéase, ce résultat n'est pas en corrélation avec la souche de *Fusarium* sp. que nous avons testé.

Jenitta et *al.* (2014) ont montré la capacité de trois différentes souches de *Penicillium* sp. d'avoir une activité protéolytique. Les résultats que nous avons obtenus ne sont pas similaire à ces dernier car toute les touches de *Penicillium* sp. ont eu une réaction négative à la production de l'enzyme protéase.

III.4. Comparaison de l'aptitude enzymatique des souches

Nous avons pris une souche représentative de chaque genre ayant la meilleure aptitude enzymatique et nous les avons comparés.

Les résultats obtenus montrent que la souche *Aspergillus niger* (TB721) a eu la meilleure capacité métabolique a synthétiser des enzymes en ayant le plus de réponse positive au différent milieu parmi les souches d'*Aspergillus* testées. La souche *Penicillium* sp. (TB1121) a eu la forte capacité métabolique à produire des enzymes parmi les souches de *Penicillium* testées. La seule souche de *Fusarium* sp. TB8121 a eu la plus faible aptitude enzymatique comparé aux souches issues des autres genres (Figure 32).

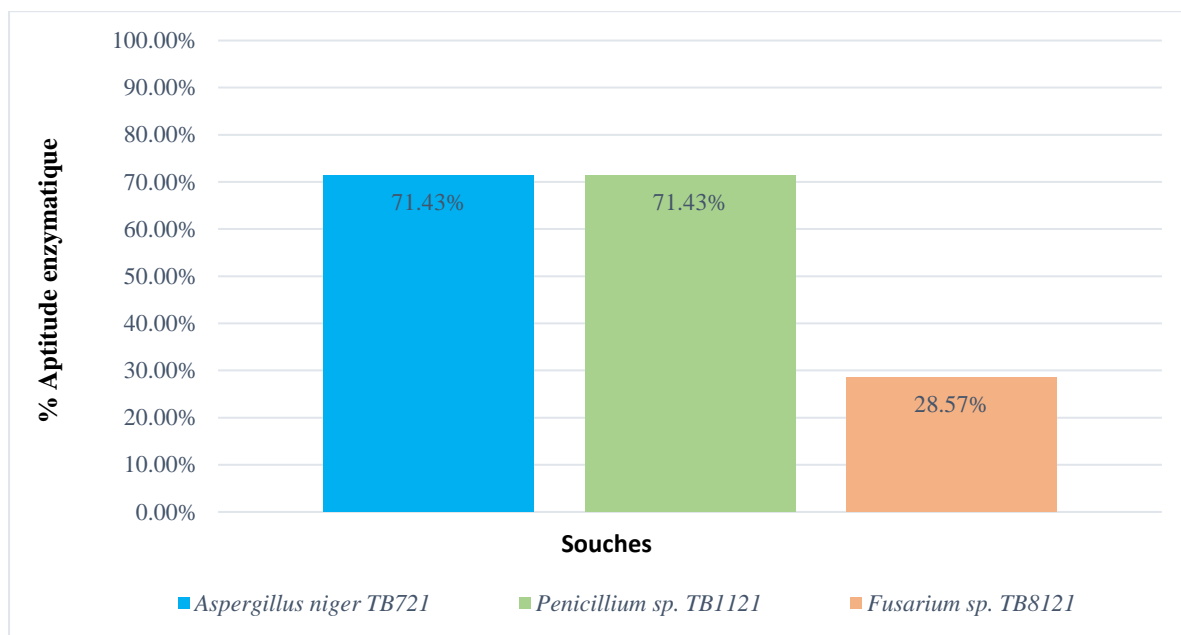


Figure 32 : Aptitude enzymatique des meilleures souches selon les genres testés.

Conclusion

Les champignons sécrètent une gamme d'enzymes qui trouvent de multiples applications biotechnologiques. En raison de leur abondance dans les différents milieux terrestres et aquatiques et ils ont la capacité à utiliser des substrats moins coûteux, de leur facilité de manipulation et de leur remarquable stabilité car ils ont naturellement évolué pour travailler dans un environnement extracellulaire hostile.

Les champignons dans le sol remplissent un rôle extrêmement important et crucial pour le bon fonctionnement de l'écosystème du sol. En recyclant les nutriments, en stabilisant la croissance et le développement des plantes, et en maintenant la durabilité environnementale.

La présente étude a permis de mettre en évidence la richesse de la rhizosphère du sol de palmier dattier Algérien en flore fongique, En isolant une grande quantité d'isolat fongique.

La caractérisation macroscopique de cette flore fongique a permis de classer 31 isolats en 11 groupes de morphotype différent et la caractérisation microscopique de ces isolats de chaque groupe a révélé une dominance du genre *Aspergillus* et *Penicillium* qui sont les plus exploités en biotechnologie par leur multiple application dans différents secteurs industriels, agriculture et médecine.

La détermination de l'activité enzymatique des isolats caractérisés a dévoilé une forte aptitude des champignons de la rhizosphère du sol de palmier dattier à synthétiser des enzymes extracellulaires à intérêts biotechnologiques. La détermination de l'activité phosphatase a démontré que toutes les souches testées ont l'aptitude de solubiliser le phosphore, par ailleurs la détermination de l'activité protéolytique a démontré l'incapacité de toute la souche testée à synthétiser les enzymes protéases. Les tests qualitatifs ont démontré la capacité de TB721 *Aspergillus niger* et de TB1121 *Penicillium* sp. à produire une diversité d'enzymes différents.

En conclusion, la rhizosphère du sol de palmier dattier Algérien est très abondante en flore fongique ayant une multitude d'applications biotechnologiques en produisant une large gamme d'enzymes et cela est dû aux conditions difficiles de la région désertique, ces derniers se sont adaptés pour proliférer et exploiter leurs capacités. Les résultats obtenus se sont déroulés en condition de laboratoire et pourront faire l'objet de plusieurs perspectives :

- Une identification moléculaire des souches fongiques est suggérée.

- La valorisation de la région désertique Algérienne car elle est propice à la prolifération de nombreux champignons pouvant résister aux plus dures conditions industrielles.
- La quantification de la quantité enzymatique synthétisé par les meilleures souches étudiées.
- La recherche des conditions optimales (Température, source de carbone, pH etc.) des souches testées.

References bibliographies

Abu-Tahon M A & Isaac G S (2020), Anticancer and antifungal efficiencies of purified chitinase produced from *Trichoderma viride* under submerged fermentation. *J Gen Appl Microbiol*, Vol 66(1), pp32–40

Alabdallal A H, ALanazi N A, Aldakeel S A, Abdul Azeez S & Borgio J F (2020), Molecular, physiological, and biochemical characterization of extracellular lipase production by *Aspergillus niger* using submerged fermentation. *Peer J* 8:9425

Alloue M , Destain J, Ghalfi H , Thonart P, Aguedo , Wathélet J P & Blecker C (2008), Les lipases immobilisées et leurs applications. *Base*

Alves Macedo G, Soberón Lozano M M & Pastore G M (2003), Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. *Electron J Biotechnol*, Vol 6 (1), pp3–4

Anoua M , Jaillard B , Ruiz, J , Bénét, J C & Cousin B (1997), Couplage entre transfert de matière et réactions chimiques dans un sol. Partie 2 : Application à la modélisation des transferts de matière dans la rhizosphère. *Entropie*, Vol 33(207), pp13-24

Aouar L (2012), Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Mémoire de Master, Université Mentouri, de Constantine

Arab Organization for Agricultural Development (2019), Date Palm Value Chain: Algeria. Prepared by Experts from the Arab Organization for Agricultural Development Khartoum, Sudan

Atalla S M, Gamal N G E & Awad H M (2020), Chitinase of marine *Penicillium chrysogenum* MH745129: isolation, identification, production and characterization as controller for citrus fruits postharvest pathogens. *Jordan J Biol Sci*, Vol 13(1), pp19–28

Azad A K, Sermsintham N, Chandkrachang S , Stevens & W F (2004), Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, Vol 69 (2), pp216-222

Baldoni D B, Antonioli Z I, Mazutti M A, Jacques R J S , Dotto A C, de Oliveira Silveira A et al (2020), Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 using solid state fermentation. *Braz J Microbiol*, Vol 51(4), pp1897-1908

Barea J M , Pozo M J, Azcon R & Azcon-Aguilar C (2005), Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, Vol 56 (417), pp1761-1778

Barton L E & Northup, D E (2011), *Microbial Ecology*. Canada, John Wiley & Sons, p189

Benabda O, M'hir S, Kasmi M, Mnif W & Hamdi M (2019), Optimization of protease and amylase production by *Rhizopus oryzae* cultivated on bread waste using solid-state fermentation. *Journal of Chemistry*

Binod P, Akanksha Karthik, Pandey A et al (2014), Production, purification and properties of fungal chitinases—a review

Bornscheuer U T (2002), Carboxylestérases microbiennes : classification, propriétés et application dans les biocatalyseurs. *FEMS Microbiol Rev*, Vol 26, pp73–81

Botton B, Breton A, Fèvre M, Guy P H, Larpent J P & Veau P (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.

Bouguedoura N, Bennaceur M., Babahani S, & Benziouche, S. E. (2015). Date palm status and perspective in Algeria. In : *Date palm genetic resources and utilization*. Springer, Dordrecht, pp 125-168.

Bounaga N & Djerbi M (1990), Pathologie du palmier dattier, *Les systèmes agricoles oasiens* pp128-132

Bowles D C R , Reuveny R & Butler C D (2014), Moving to a better life? Climate, migration and population health, in *Climate Change and Global Health*, edited by C. D. Butler, CABI, Wallingford, U. K, p135

Breuil M (2009). *Biologie*, 2ème année BCPST-VETO. Eds TEC et DOC, Lavoisier, Paris, p818

Bulik Dorota A, Olczak Mariusz, Lucero Hector A et al (2003), Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryotic cell*, Vol 2 (5), pp886-900.

Burac M (2006), *La caraïbe : données environnementales*. Ed. Karthala, Paris, p463

Cairney T H (2000), Beyond the classroom walls: The rediscovery of the family and community as partners in education, *Educational Review*, Vol 52 (2), pp163–174

Carrim A J I, Barbosa E C & Vieira J D G (2006), Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham (Carobinha-do-campo), *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol 49, pp353-359

Carpentier J B & Klotz L J (1966), Disease of the date palm.: *Date Growers Inst Report*, 43, pp15-21

de Castro R J S, Ohara A, Nishide T G, Bagagli M P, Dias F F G & Sato H H (2015), A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Biocataly Agric Biotechnol*, Vol 4(4), pp678–684

Cattelan A J, Hartel P G & Fuhrmann J J (1999), Screening for plant growth promoting rhizo bacteria top romote early soyabean growth. *Soil Science Society of American journal*, n° 63(6), pp1670-1680

Chahinian H & Sarda L (2009), Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. *Protein. Pept. Lett.* Vol 16 (10), pp 1149-1161

Chandrasekaran S , Kumaresan, S S P & Manavalan, M (2015), Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from paddy soil in Thiruvavur District Tamilnadu. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, Vol 3 (6), pp0-6

Chavan S B & Deshpande M V (2013), Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential, *Biotechnol. Prog.*, Vol 29 (4), pp 833- 846

Cheloufi H & Jacquin F (2003), Influence du pédoclimat sur l'évolution des composés azotés présents dans les sols lorrains : conséquences sur la qualité des eaux

Courtecuisse R (2000), *Photo Guide des champignons de France et d'Europe*. Eds. Delachaux et Niestlé, Paris, p480

Dahiya N , Tewari R & Hoondal, G.S (2006), Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes, A review. *Appl. Microbiol & Biotech.*, Vol 71 (6), pp773-782

Dakhia N, Bensalah M K, Roumani M & Belhamra M (2013), État phytosanitaire et diversité variétale du palmier dattier au Bas Sahara –Algérie

Davet P (1996), *Vie microbienne du sol et production végétale*, éditions INRA

Deka H, Deka S & Baruah C K (2015), Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Value Addition: Mechanism of Action. In *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants*, Springer, Cham, pp305-321

Dhevagi , P., Ramya, A., Priyatharshini, S., Geetha Thanuja, K., Ambreetha, S., & Nivetha, A. (2021). Industrially Important Fungal Enzymes: Productions and Applications. In: *Recent Trends in Mycological Research*. Springer, Cham, pp263-309.

Dommergues Y & Mangenot F (1970), *Ecologie microbienne du sol*, Masson, Paris, p795

Dou F, Wang Z, Li G & Dun B (2019), Microbial transformation of flavonoids by *Isaria fumosorosea* ACCC 37814. *Molecules*, Vol 24(6), p1028

El Enshasy H A, Elsayed E A, Suhaimi N, AbdMalek R & Esawy M (2018), Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. *BMC Biotechnol*, Vol 18(1), pp1-13

El-Gendi H , Saleh A K , Badierah R , Redwan E M, El-Maradny Y A & El-Fakharany E M (2021), A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges, *Journal of Fungi*, Vol 8 (1), p23

El-Rahim W M A, Moawad H, Hashem M M, Gebreil G M & Zakaria M (2020), Highly efficient fungal pectinase and laccase producers among isolates from flax retting liquor. *Biocatal Agric Biotechnol*, Vol 25, p101570

Elieh-Ali-Komi D, Hamblin, M R , *Chitin & Chitosan* (2016), Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int. J. Adv. Res*, Vol 4 (3), p411

El-Maraghy S S, Tohamy A T & Hussein K A (2021), Plant protection properties of the Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF): Mechanisms and potentiality. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, Vol 11(1), pp391-415

Ellis D H, Davis S, Alexiou H , Handke R & Bartley R (2007), *Descriptions of medical fungi*, Vol 2

Eyi Ndong H, Degreef J & De Kesel A (2011), Champignons comestibles des forêts denses d'Afrique centrale. *Taxonomie et identification. ABC Taxa*, Vol 10, p254

Falandysz J & Borovička J (2013), Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. *Appl. Microbiol & Biotechnol*, Vol 97(2), pp477-501

FAO stat (2020), 10-Production of Dates: Top 10 producers. Food and Agriculture Organization (FAO) of United Nations, UN. Accessed via FAOSTAT.

FAO stat (2017), Production FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations
Felse, P A & Panda T (2000), Production of microbial chitinases: a revisit. *Bioprocess. Eng*, Vol 23 (2), pp127-134

Faune Marie Line (2018), La rhizosphère : Point de départ d'un vaste Réseau de Communication, *Agricultures & Territoires, Chambres d'agriculture des Pays de la Loire*, Vol 10 (1)

Fernandez-Acero F J, Carbu M, Garrido C , Vallejo I & Cantoral J M (2007), Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi, *Current Proteomics*, Vol 4(2), pp79-88

Fickers P, Destain J & Thonart P (2008), Les lipases sont des hydrolases atypiques : Principales caractéristiques et application. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, Vol 12 (2)

Fortin J A , Plenchette C & Piché Y (2016), Les mycorhizes. L'essor de la nouvelle révolution verte. 2^{ème} édition Québec, Quae, p10

Fossi B T Tavea F & Ndjouenkeu R (2005), Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils, *African Journal of Biotechnology*. Vol 4 (1), pp14-18

Franco D G, Spalanzani R N, Lima E E, Marchetti C R, Silva P O, Masui D C et al (2017), Biochemical properties of a serine protease from *Aspergillus flavus* and application in dehairing. *Biocatal Biotransformation*, Vol 35(4), pp249–259

Franken, P. & Andrade, D (2014), Isolation and characterization of fungal root endophytes Training School, *Endophytes in Biotechnology and Agriculture*, pp 2-3

Ghorai S, Banik S P ,Verma D, Chowdhury S, Mukherjee S & Khowala S (2009), Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Res. Int.* Vol42 (5-6), pp577–587

Gilham D & Lehner R (2005), Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*. Vol 36 (2), pp139-147

Gilles P (2000), Cultiver le palmier dattier. Ed Gridao, p110

Gilman J.C. (1957), A manual of soil fungi 2nd Edition. Iowa: The Iowa State University Press, pp10-300

Giri S S, Sukumaran S, Sen S S, Olive M, Banu N & Jena P K (2011), Oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. *J Microbiol*, Vol 49 (3), pp455–461

Godfrey T & West S (1996), Textiles. In: *Industrial enzymology*. Macmillan Press, London, pp360–371

Gonzalez R, Nicolau F & Peeples T L (2017), Optimization of the 11 α -hydroxylation of steroid DHEA by solvent-adapted *Beauveria bassiana*, *Biocatal & Biotransformation*, Vol 35(2), pp103–109.

Gopinath S C, Anbu P, Arshad M M, Lakshmipriya T, Voon CH, Hashim U et al (2017), Biotechnological processes in microbial amylase production. *Biomed Res Int*

Guerrand David (2017), Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries OCL Oilseeds and fats crops and lipids, Vol. 24 (4), p403

Gupta R (2004), A text Book of Fungi. Ed. Efficient Offset Printers, New Delhi, India, p343

Gupta R, Beg Q K & Lorenz P (2002), Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol 59 (1), pp15-32

Hamid A, Hussain Z, Tayyab M et al (2021), Production and characterization of a thermostable extracellular esterase from *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol 20 (2), pp839-852

Harde S M, Bajaj I B & Singhal R S (2011), Optimization of fermentative production of keratinase from *Bacillus subtilis* NCIM 2724. *Agric Food Anal Bacteriol*, Vol 1(1), pp54–65

Harkat Hamza, Bousba Ratiba, Benincasa Cinzia, et al (2022). Assessment of biochemical composition and antioxidant properties of Algerian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seed oil. *Plants*, Vol 11 (3), p381

Hartmann A, Rothballer M & Schmid M (2008), Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research , *Plant and Soil*, Vol 312 (1), pp7-14

Hartl Lukas, Zach Simone & Seidl Seiboth Verena (2012), Verena. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, Vol 93 (2), pp533-543

Hendriksen H V, Pedersen S & 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*, Vol 33, pp 6284-6294

Hinsinger P (1998), How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron*, Vol 64, pp225-265

deG S Guarro J , Gene J & Figueras M J (2000), *Atlas of Clinical Fungi*. 2ed, vol1 , Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, p 1126

Islam M K. Sano A, Majumder M S I et al (2019), Isolation and molecular characterization of phosphate solubilizing filamentous fungi from subtropical soils in Okinawa. *Applied Ecology and Environmental Research*, Vol 17 (4), pp 9145-9157.

Jaber L R & Enkerli J (2017) Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Sci Tech*, Vol 27(1), pp28–41

Jaeger K & Reetz M T (1998), Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnoln*, Vol 16 (9), pp396–403

Jenitta X J & Gnanadoss J J (2014), Screening, molecular characterization and phylogenetic analysis of *Penicillium* sp producing high levels of protease. *Int J Curr Sci*, Vol 11, pp10-17

Jonhston A & Booth C (1983), *Plant pathologist's pocketBook*. 2nd edition, Commonwealth Agricultural Bureaux." International Mycological Institute, Kew, England, p439

Khan M S, Zaidi A , Ahemad M , Oves M & Wani P A (2010), Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi–current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, Vol 56, (1), pp73-98

Khan F (2013), New microbial proteases in leather and detergent industries. *Innov Res Chem*, Vol 1 (1), pp1–6

Khokhar I , Mukhtar I & Mushtaq S (2011). Isolation and screening of amylolytic filamentous fungi. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 2011, Vol 15 (1)

Kango, N., Jana, U. K., & Choukade, R. (2019), Fungal enzymes: sources and biotechnological applications. In : *Advancing frontiers in mycology & mycotechnology*. Springer, Singapore, pp 515-538

Kottwitz B, Upadek H & Carrer G (1994), Application and benefits of enzymes in detergents. *Chim Oggi*, Vol 11-12, pp21–24

Kozłowska E, Dymarska M, Kostrzewa-Susłow E & Janeczko T (2019), Cascade biotransformation of estrogens by *Isaria fumosorosea* KCh J2. *Sci Rep*, Vol 9(1), pp1-8

Kriaa W, Sghaier-Hammami B, Masmoudi-Allouche F et al (2012), The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropopagation using completely mature female flowers. *Comptes rendus Biologies*, Vol 335(3), pp194-204

Kumar D & Bhalla T C (2005), Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications, *Appl Microbiol & Biotechnol*, Vol 68 (6), pp726-736

Kumar R S, Rajesh R, Gokulakrishnan S & Subramanian J (2015), Screening and characterization of fibrinolytic protease producing *Bacillus circulans* from mangrove sediments Pitchavaram, South East Coast of India. *Int Lett Nat Sci*, Vol 1, pp10–16

Kumla J, Suwannarach N, Sujarit K, Penkhrue W, Kakumyan P, Jatuwong K et al (2020), Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste. *Molecules*, Vol 25 (12), p2811

Lange L (2017), Fungal enzymes and yeasts for conversion of plant biomass to bioenergy and high-value products. *Microbiology spectrum*, Vol 5 (1), p5.1.13

Lange Lene (2014), The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. *IMA fungus*, Vol 5(2), pp463-471

Lemanceau P (1992), Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*, Vol 12 N°6, pp 413-437

Lemoine C & Claustres G (2002), Mieux connaître les champignons. Eds. Gisserot J-P, France, p128

Lepinay Clémentine (2013), Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale, Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne, France

Leslie A D (2011), Preventing biofilm formation using microbes and their enzymes. *Basic Biotechnol eJournal*, Vol 7 (1), pp6-11

Li P J, Xia J L, Shan Y, Nie Z Y, Su D L, Gao Q R et al (2015), Optimizing production of pectinase from orange peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 using response surface methodology. *Waste Biomass Valori*, Vol 6 (1), pp13–22

Liu J, Nan, Gong Z, Zhang J, Song P, Tang Y, Gao Y et al (2019), Expression and characterization of two chitinases with synergistic effect and antifungal activity from *Xenorhabdus nematophila*. *World J Microbiol & Biotechnol*, Vol 35(7), pp1-10

Lombi E (2001), *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press

Lopez Séverine (2018), Déterminisme de la diversité bactérienne rhizosphérique des hyper accumulateurs de nickel, Thèse doctorat, Université de Lorraine -France

Lüttge U, Kluge M & Bauer G (2002), *Botanique*. 3ème éd. Eds. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, p604.

Mahmoodi N M, Moghimi F, Arami M & Mazaheri F (2010), Silk degumming using microwave irradiation as an environmentally friendly surface modification method. *Fiber & Polym*, Vol 11 (2) pp234-240

Maitig, A M A , Alhoot M A & Tiwari K (2018), Kartikya. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, Vol 12 (4), pp2059-2067

Mantzoukas S, Kitsiou, F Natsiopoulos D & Eliopoulos P A (2022), *Entomopathogenic Fungi: Interactions and Applications*. *Encyclopedia*, Vol 2(2), pp646-656

Maria G L, Sridhar K R & Raviraja N S (2005), Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, Vol 1 (1), pp67-80.

Mazoyer M (2002), *Larousse agricole, le monde agricole au XXI^{ème} siècle* Ed. Mathilde Majorel, p224

Michel C G, Christian W, Jean-Claude R, Jacques B & Jean-Louis M (2005), *Sols et environnement*. Ed, Dunod, Paris, p881

Mitidieri S, Martinelli A.H, Schrank A & Vainstein M H (2006), Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresour Technol*, Vol 97 (10), pp1217-1224

Moreau Pierre-Arthur (2002), *Inventaire des champignons supérieurs et des lichens sur 12 placettes du réseau et dans un site atelier de l'INRA-GIP ECOFOR: résultats d'un projet pilote (1996-1998)*, Office National des Forêts-Direction Technique

Motyan J A, Toth F & Tozser J (2013), Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, Vol 3(4), pp923–942

Mpika J, Kébé L B, Druzhinina L S, Komon-Zélazowska M, Kubicek C P & Aké S (2009), Inhibition de *Phytophthora palmivora*, agent de pourriture brune des cabosses de cacaoyer en Côte d'Ivoire, par *Trichoderma* sp. *Sciences & Nature* 6 (1), pp49 -62

Mukherjee A K, Borah, M & Raí S K (2009), To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α -amylase synthesis by *Bacillus subtilis* DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α -amylase in laundry detergent formulations, *Biochem. Eng. J*, Vol 43(2), pp149-156

Mukherjee R, Paul T, Soren J P, Halder S K, Mondal K C, Pati B R et al (2019), Acidophilic α -amylase production from *Aspergillus Niger* RBP7 using potato peel as substrate: a waste to value added approach. *Waste Biomass Valori*, Vol 10(4), pp851–863

Musa H, Han P C, Kasim F H, Gopinath S C, Ahmad M A (2017), Turning oil palm empty fruit bunch waste into substrate for optimal lipase secretion on solid state fermentation by *Trichoderma* strains. *Process Biochem*, Vol 63, pp35–41

Nagpure, A, Choudhary, B, Kumar, S & Gupta, R.K (2014), Isolation and characterization of chitinolytic *Streptomyces* sp. MT7 and its antagonism towards wood-rotting fungi, *Ann. Microbio*, Vol 64 (2), pp531-541

Nannipieri L, Giagnoni L, Landi & Renella G (2011), Role of Phosphatase Enzymes in Soil, *Phosphorus in Action*, pp215–243

Nehl D B & Knox O G (2006), Significance of Bacteria in the Rhizosphere. In Mukerji K.G.C.Manoharachary, J. Singg (eds.), *Microbial Activity in the rhizosphere. Soil Biology*, Vol 7, pp 89-119

Nelofer R, Syed Q, Nadeem M et al (2016), Isolation of phosphorus-solubilizing fungus from soil to supplement biofertilizer. *Arabian Journal for Science and Engineering*, Vol 41 (6), pp2131-2138

Nema A, Patnala S H, Mandari V, Kota S & Devarai S K (2019), Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. *Bull Natl Res Cent*, Vol 43(1), pp1-8

Nguyen C (2009), Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls, *Sustainable Agriculture*, pp 97-123

Novelli P K, Barros M M & Fleuri L F (2016), Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization, *Food Chem*, Vol 198 pp119–124

Oihabi A (1991), Etude de l'influence des mycorhizes à V.A. sur le Bayoud et la nutrition du palmier dattier. Thèse de Doctorat, Université Cady Ayad Marrakech Maroc

de Oliveira A P A, Silvestre MA, Garcia N F L, Alves-Prado H F, Rodrigues A, Paz MFD et al (2016), Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. *Sci World Journal*

de Oliveira B H , Coradi G V, de Oliva-Neto P & do Nascimento V M G (2020), Biocatalytic benefits of immobilized *Fusarium* sp.(GFC) lipase from solid state fermentation on free lipase from submerged fermentation. *Industrial Crops and Products*, Vol 147, p112235

Pabai F S K (1997), Production, Purification, Characterization of selected microbial lipases and their application for interesterification of better fat

Panda T & Gowrishankar B S (2005), Production and applications of esterases, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 67 (2), pp160-169

Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D & Mohan R (2000), Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, Vol 31 (2), pp135–152

Pattnaik S S & Busi S (2019), Rhizospheric fungi: diversity and potential biotechnological applications. In : *Recent advancement in white biotechnology through fungi*. Springer, Cham, pp 63-84

Pawar R, Zambare V, Barve S & Paratkar G (2009), Application of protease isolated from *Bacillus* sp. 158 in enzymatic cleansing of contact lenses. *Biotechnology*, Vol 8 (2), pp276-280

Pérez L C S, Florido J E B , Navarro S R , Mayagoitia J F C & López M A R (2014), Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, n° 2, pp65-76

Pikovskaya R I (1948), Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologia*, Vol 17, pp362-370

Pillai P, Mandge S & Archana G (2011), Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis*, p13

Pritchard P E (1992), Studies on the bread-improving mechanism of fungal alpha-amylase. *J Biol Educ*, Vol 26 (1), pp12–18

Rafiq M, Nadeem S, Hassan N, Hayat M, Sajjad W, Zada S et al (2020), Fungal recovery and characterization from Hindu Kush Mountain range, Tirich Mir glacier, and their potential for biotechnological applications. *J Basic Microbio*, Vol 60(5), pp444–457

Ramos-Sánchez L B , Cujilema-Quitio, M C , Julian-Ricardo M C, Cordova J & Fickers P (2015), Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, Vol 5 (2), p1

Rao Y K, Lu S-C, Liu B-L et al. (2006), Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes, *Biochem Eng Journal*, Vol 28(1), pp57-66

Rastegari A A, Yadav A N & Yadav N (2020), New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: trends of microbial biotechnology for sustainable agriculture and biomedicine systems: diversity and functional perspectives. Elsevier, Amsterdam

Raven P, H., Johnson G J, Mason K A, Losos J & Singer S S (2011), *Biologie*, 2ème édition. Ed. De Boeck, Bruxelles, p1406

Reddy M P & Saritha K V (2015), Bio-catalysis of mango industrial waste by newly isolated *Fusarium* sp. (PSTF1) for pectinase production. *3 Biotech*, Vol 5(6), pp893–900

Redecker D (2002). New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil. *Research in Microbiology*, 153(3), pp125-130

Reis P, Holmberg K., Watzke H, Leser M. E & Miller R (2009), Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol 147, pp237–250

Rozalska S Soliwoda K & Długonski J (2016), Synthesis of silver nanoparticles from *Metarhizium robertsii* waste biomass extract after nonylphenol degradation, and their antimicrobial and catalytic potential. *RSC Adv*, Vol 6 (26), pp21475–21485

Ruiz-Herrera J (1991), *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. Boca Raton, FL: CRC press. p1–239

Saadoun I, Dawagreh A, Jaradat Z & Ababneh Q (2013), Influence of culture conditions on pectinase production by *Streptomyces* sp. (strain J9), *Int J Life Sci Med Res*, Vol 3 (4), p148

Sabotic J & Kos J (2012), Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* Vol 93(4), pp1351-1375

Samanta S (2020), Enhancement of characteristics and potential applications of amylases: a brief review. *Am J Pure Appl Sci*, Vol 2(2), pp24–35

Saran S, Isar J & Saxena R K (2007), A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *J Biochem Biophys Methods*, Vol 70(4), pp697-699

Saranraj P & Stella D (2013), Fungal amylase—a review. *Int. J. Microbiol. Res*, Vol 4 2), pp203-211

Saranraj P & Stella D (2013), Fungal amylase- a review. *Int J Microbiol Res*, Vol 4(2), pp203–211

Seidl V (2008), Chitinases of Filamentous Fungi: A Large Group of Diverse Proteins with Multiple Physiological Functions. *Fungal Biology Reviews*, n° 22 (1), pp36-42

Selim H M, Gomaa N M., Essa & A M M (2017), Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales : ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. *Biocontrol Sci. Technol*, Vol 27 (1), pp81-95

Senthivelan T, Kanagaraj J & Panda R C (2016), Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach-a review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Vol 21(1), pp19-38

Senn-irlet, Beatrice, EGLI, Simon, BOUJON, Claude, et al (2012). Protéger et favoriser les champignons. Notice pour le praticien (49), Birmensdorf, Suisse, p12

Sicard M & Lamoureux Y (2006), Connaître, cueillir et cuisiner les champignons sauvages du Québec. Ed. Fides, Québec, p365

Sindhu S S, Sehrawat A, Sharma R & Khandelwal A (2017), Biological Control of Insect Pests for Sustainable Agriculture, in: *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects*, Springer Singapore, pp189–218

Singh R, Kumar M, Mittal A & Mehta P K (2016), Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech* Vol 6 (2), pp 1-15

Singh, S & Gaur R (2016), Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea, *J. Appl. Microbiol*, Vol 121 (2), pp 506-518

Singh Rajendra, Mittal Anshumal, Kumar M & Mehta P K (2016), Microbial proteases in commercial applications. *J Pharm Chem Biol Sci*, Vol 4 (3), pp365-374

Singh S & Bajaj B K (2017), Agroindustrial/forestry residues as substrates for production of thermoactive alkaline protease from *Bacillus licheniformis* K-3 having multifaceted hydrolytic potential. *Waste Biomass Valoriz*, Vol 8 (2), pp453–462

Smith S E & Read D. J (1997), *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Cambridge, p605

Souza P M D, Werneck G, Aliakbarian, Bahar et al (2017), Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, Vol 109, pp 1103-1110

Souza P M D , Bittencourt M L D. A, Caprara, C C , Freitas, M D , Almeida R P C D , Silveira, D & Magalhães P O (2015), A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol 46, pp337-346

Sudeep K C, Upadhyaya J, Joshi D R, Lekhak B, Kumar Chaudhary D, Raj Pant B et al (2020), Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, Vol 6(2), p59

Suraja Kumar Nayak, Swapnarani Nayak, Swaraj Mohanty, Jitendra Kumar Sundaray & Bibhuti Bhusan Mishra (2021), *Microbial Chitinases and Their Applications: An Overview.*, Environmental and Agricultural Microbiology: Applications for Sustainability, pp313-340

Swarnalakshmi, K , Senthilkumar, M & Ramakrishnan B (2016), Endophytic actinobacteria: nitrogen fixation, phytohormone production, and antibiosis. In: *Plant Growth Promoting Actinobacteria*, Springer, Singapore, pp123–145

Thaung M M (2007), A preliminary survey of macromycetes in Burma. *Australasian Mycologist*, 26 (1), pp16- 36

Toutain G (1965), Note sur l'épidémiologie du Bayoud en Afrique du Nord, *Al awamia*, Vol 15, pp37-45

Wild A (1993), *Soils and the Environment*, Cambridge University Press. p300

Xiao Y Z, Wu D K, Zhao S Y, Lin W M & Gao X Y (2015), Statistical optimization of alkaline protease production from *Penicillium citrinum* YL-1 under solid-state fermentation. *Prep Biochem Biotech*, Vol45(5), pp447–462

Yadav A N, Mishra S, Kaur D, Yadav N, Kumar A (2020), Agriculturally important fungi for

sustainable agriculture, Perspective for diversity and crop productivity, Vol 1, International Publishing, Cham Springer

Yadav A N, Verma P, Kumar R, Kumar V, Kumar K (2017), Current applications and future prospects of eco-friendly microbes. *EU Voice*, Vol 3 (1), pp21–22

Yosri M, Abdel-Aziz M M & Sayed R M (2018), Larvicidal potential of irradiated mycoinsecticide from *Metarhizium anisopliae* and larvicidal synergistic effect with its mycosynthesized titanium nanoparticles (TiNPs). *J Radiat Res Appl Sci*, Vol 11 (4), pp328–334

Yuan Y, Feng H, Wang L, Li Z, Shi Y, Zhao L, Feng Z & Zhu H (2017), Potential of endophytic fungi isolated from cotton roots for biological control against verticillium wilt disease, Vol 12(1)

Zhou J, Chen L, Kang L, Liu Z, Bai Y, Yang Y et al (2018), ChiE1 from *Coprinopsis cinerea* is characterized as a processive exochitinase and revealed to have a significant synergistic action with endochitinase ChiIII on chitin degradation. *J Agric Food Chem*, Vol 66 (48), pp12773–12782



ANNEXES

Annexes

Annexe A :

Composition des milieux de culture utilisés pour un litre de milieu :

1/ Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) : (Jonsthor et Booth, 1983)

- Pomme de terre 200 g
- Glucose 20 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 10000 ml
- pH 6 autoclavage 20 min à 120°C

2/ Milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth) : (Jonsthor et Booth, 1983)

- Pomme de terre 200 g
- Glucose 20 g
- Eau distillée 10000 ml
- pH 6 autoclavage 20 min à 120°C

3/ Milieu de production de chitinase :

- Pomme de terre 200 g
- Chitine 20 g
- Agar 15 g
- Eau distillé 1000 ml
- pH 6 autoclavage 30 min à 100°C

Annexe B :

Milieu de culture PVK : (Pikovskaya, 1948) :

- $(\text{NH}_2)_2\text{So}_4$ 0,5 g
- Extrait de levure 0,5 g
- Phosphate bicalcique 5 g
- KCL 0,2 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- Glucose 10 g
- Agar 17 g
- MnsSO_4 trace
- FeSO_4 trace
- Bleu bromophénol 2 ml
- Eau distillée 1000 ml
- pH 6.7 autoclavage 30 min à 100°C

Annexe C :

Milieu de culture M9 Agar : (Miller, 1974)

- Na_2HPO_4 6 g
- KH_2PO_4 3 g
- NaCl 0,5 g
- NH_4Cl 1 g
- Eau doublement distillée 1000 ml
- Agar 20 g
- pH 6.8 autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production de pectinase : (Cattelan et al., 1999)

- Milieu minimum M9 agar + 10 g de pectine +1,2 d'extrait de levure additionné de 2 ml bleu bromophénol

Milieu de culture Pepton agar medium : (Maria et al., 2005)

- Peptone 10 g
- NaCl 5 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g
- Agar 16 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 6 autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production d'amylase :

- Milieu minimum de Pepton Agar medium + 2 % d'amidon soluble

Annexe D :

Milieu de production de protéase :

- Milieu minimum de Pepton Agar medium + 0,4 % de gélatine additionné de 2 ml de bleu de bromophénol

Milieu de culture GYP : (Maria et al., 2005)

- Glucose 1 g
- Extrait de levure 0,1g
- Peptone 0,5g
- Agar 16 g
- Eau distillée 1000 ml
- pH 6 autoclavage 30 min à 100°C

Milieu de production de Lipase :

- Milieu minimum de GYP+ 10g de Tween 20 additionné de 2ml bleu bromophénol.

Milieu de production d'Estérase :

- Milieu minimum de GYP+ 10g de Tween 80 additionné de 2ml bleu bromophénol.