

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences de La Nature et de La Vie

Département de Biologie



UNIVERSITÉ  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM



UNIVERSITÉ  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM

# Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

## MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par

Ahmed ben klaouz Oussama

&

Belarbi Mohammed

Thème :

# Production des protéases par un isolat de *Penicillium* de l'eau de mer

Soutenue le 21 Juin 2023 devant le jury composé de :

Président	Mme. Sidhoum Warda	MCA	Université de Mostaganem
Encadreur	Mr. Djibaoui Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Examineur	Mr. Bouznad Lahcene	MCB	Université de Mostaganem

Thème réalisé au laboratoire de Microbiologie de l'université de Mostaganem

Année Universitaire : 2022/2023



## Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier Allah de nous avoir donnée la force et la voie d'élaborer ce travail.*

*Nous voudrions présenter nos remerciements les plus sincères à notre encadreur Mr Djibaoui Rachid pour ces judicieux conseils et ses précieuses orientations.*

*Nos remerciements vont aux membres du jury Dr. Sidhoum Warda et Dr. Bouznad Lahcene Pour avoir accepté d'examiner notre travail*

*Ainsi que tous ceux qui ont participés de près ou de loin dans notre cycle universitaire.*

*Nous tenant à remercier sincèrement l'ensemble des enseignants du département biologie et ceux qui ont contribués à nos études.*



*Dédicace :*

*On dédie ce travail à nos chères parents qui ont tout fait  
pour que nous réussissions dans nos vie, que dieu nous  
les protèges.*

*A nos familles.*

*A tous nos camarades.*

*A tous les gens qui nous ont aidés et encouragés à la  
réalisation de ce modeste travail.*

## الملخص

تحت البيئة البحرية الكائنات الحية الدقيقة البحرية على توليد أنظمة إنزيمات متعددة للتكيف مع هذه البيئة المعقدة. لذلك، يمكن أن توفر الإنزيمات الميكروبية البحرية محفزات حيوية جديدة ذات خصائص غير عادية في صناعات النسيج والجلود والأغذية والأدوية وفي مختلف صناعات المنظفات التجارية

قمنا في هذا العمل بدراسة كمية ونوعية الفطريات لثلاث عينات من الرمل من مياه البحر مأخوذة من شاطئ سيدي مجدوب (مستغانم). تظهر نتائج نمو الفطريات المستزرعة في الوسطين PDA + NaCl/3.5 و PDA + 5% NaCl قدرة هذه العزلات البحرية الأصلية على تحمل هذه الظروف الملحية.

أدى تحديد هذه الفطريات المعزولة إلى الحصول على 4 أجناس (بنسيليوم و كلادوسبوريوم و خميرة و فطر بميسليوم عقيم). من بين هذه العزلات المختلفة تم اختيار فطر واحد من جنس بنسيليوم ذو النشاط الأكبر في تحلل للبروتين على أجار الحليب منزوع الدسم. زرعت هذه العزلة المختارة في وسط إنتاج موضوع في دورق ونم تحضينها لمدة 72 ساعة مع الرج. تم الحصول على الإنزيم الخام بعد الترشيح والطررد المركزي. تم تحديد نشاط التحلل البروتيني لهذا الإنزيم بطريقة انتشار آبار الأجار على أجار الحليب منزوع الدسم حيث بلغ قطر منطقة التحلل 50 مم.

الكلمات المفتاحية: الفطريات البحرية - البروتياز - البنسيليوم - نشاط التحلل البروتيني

## **Résumé :**

L'environnement marin incite les micro-organismes marins à générer des systèmes enzymatiques multiples pour s'adapter à cet environnement complexe. Par conséquent, les enzymes microbiennes marines peuvent offrir de nouveaux biocatalyseurs aux propriétés extraordinaires dans les industries du textile, du cuir, alimentaire et pharmaceutique et dans diverses industries de détergents commerciaux.

Dans le présent travail nous avons procédé à une étude quantitative et qualitative des champignons de trois échantillons de sable de l'eau de mer prélevés d'une plage de Sidi Medjdoub (Mostaganem). Les résultats de croissance des champignons étudiés dans un milieu PDA+3,5% de NaCl et PDA+5% de NaCl montrent la capacité de ces isolats d'origine marine à tolérer ces conditions salines

L'identification des champignons a permis d'obtenir 4 genres fongiques (*Penicillium*, *Cladosporium*, une levure et un isolat à mycélium stérile). Parmi ces isolats différents 1 champignons du genre *Penicillium* a été sélectionnés pour son activité la plus protéolytique après criblage sur gélose au lait écrémé. Cet isolat sélectionné a été inoculé dans un milieu de production en Erlenmeyer incubé pendant 72 heures sous agitation. L'enzyme brute a été obtenue après filtration et centrifugation. Le dosage de l'activité protéolytique de cette enzyme a été effectué par la méthode de diffusion de puits d'agar sur gélose au lait écrémé où le diamètre de la zone de lyse a atteint 50 mm.

Mots clés : champignons marins – Protéases – *Penicillium* – Activité protéolytique

## **ABSTRACT:**

The marine environment prompts marine microorganisms to generate multiple enzyme systems to adapt to this complex environment. Therefore, marine microbial enzymes can offer new biocatalysts with extraordinary properties in the textile, leather, food and pharmaceutical industries and in various commercial detergent industries.

In the present work, we carried out a quantitative and qualitative study of the fungi of three samples of sand from seawater taken from a beach of Sidi Medjdoub (Mostaganem). The results of fungi growth cultured in a PDA+3.5% NaCl and PDA+5% NaCl medium show the ability of these isolates of marine origin to tolerate these saline conditions

The identification of the fungi achieved to four fungal genera (*Penicillium*, *Cladosporium*, a yeast and an isolate with sterile mycelium). Among these different isolates 1 fungi of the genus *Penicillium* was selected for its most proteolytic activity after screening on skimmed milk agar. This selected isolate was inoculated into a production medium in an Erlenmeyer flask incubated for 72 hours with shaking. The crude enzyme was obtained after filtration and centrifugation. The determination of the proteolytic activity of this enzyme was carried out by the method of diffusion of agar wells on skimmed milk agar where the diameter of the lysis zone reached 50 mm.

**Keywords:** Marine fungi – Proteases – *Penicillium* – Proteolytic activity

# Table des matières

Remercîment

Dédicace

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
<b>Partie 1 : synthèse bibliographique</b>	
Chapitre I : Généralités sur le genre <i>Penicillium</i>	3
I.1 Description morphologique et taxonomie de <i>Penicillium</i> :	3
I.1.1 Morphologie :	3
I.1.2 Taxonomie :	4
I.2 Distribution écologique de <i>Penicillium</i> :	4
I.3 <i>Les Penicillium</i> de l'eau de mer :	4
I.4 Intérêt économique de <i>Penicillium</i> :	5
Chapitre II : Généralité sur les protéases	7
II.1 Origines des protéases :	7
II.1.1 Protéases d'origine végétale :	7
II.1.2 Protéases d'origine animale :	7
II.1.3 Protéases d'origine microbienne :	7
II.1.4 Protéases des bactéries :	7
II.1.5 Mycoprotéases :	8
II.1.6 Protéase de levure :	9
II.2 Classification et nomenclature des protéases :	10
II.2.1 Classification de protéase :	10
a. Selon la longueur de la chaîne polypeptidique :	10
b. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique :	10
c. Selon la nature de résidu impliqué :	11
II.2.2 Nomenclature des protéases :	12
a. La nomenclature commune :	12
b. La nomenclature fonctionnelle (systématique) :	13
c. La nomenclature officielle (numéro de code) :	13

<b>II.3 Applications des protéases :</b> .....	13
<b>II.3.1 Protéase pour les applications de recherche :</b> .....	13
<b>II.3.2 Protéase pour la recherche en protéomique :</b> .....	13
<b>II.3.3 Protéase pour la recherche industrielle appliquée :</b> .....	13
<b>a. Boulangerie :</b> .....	14
<b>b. Produits à base de soja :</b> .....	14
<b>c. La fabrication du fromage :</b> .....	14
<b>d. Produits pharmaceutiques et médicaux :</b> .....	15
<b>e. Industrie des détergents :</b> .....	15
<b>f. Traitement des eaux usées industrielles :</b> .....	15

## Partie 2 : partie expérimentale

<b>Chapitre I : Matériels et méthodes</b>	16
<b>I.1 Lieu et durée du travail</b> .....	16
<b>I.2 Objectifs de l'étude</b> .....	16
<b>I.3 Matériels et réactifs</b> .....	16
<b>I.4 Echantillonnage</b> .....	16
<b>I.4.1 Lieux de prélèvement des échantillons</b> .....	16
<b>I.4.2 Technique de prélèvement</b> .....	17
<b>I.5 Les milieux de cultures :</b> .....	17
<b>I.6 Méthodes</b> .....	18
<b>I.6.1 Isolement des champignons:</b> .....	18
<b>a. Observation macroscopique d'isolats fongiques :</b> .....	19
<b>b. Observation microscopique d'isolats fongiques :</b> .....	19
<b>I.6.4 Purification:</b> .....	19
<b>I.6.5 Test de salinité:</b> .....	19
<b>I.6.6 Screening des champignons pour la production de protéase alcaline :</b> .....	19
<b>I.6.7 Production de protéases :</b> .....	20
<b>I.6.8 Dosage de L'activité protéolytique de l'enzyme brute</b> .....	21
<b>Chapitre II : Résultats et discussions</b>	22
<b>II.1 Dénombrement des champignons :</b> .....	22
<b>II.2 Choix des isolats :</b> .....	24
<b>II.3 Identification des isolats fongique :</b> .....	25
<b>II.4 Test de salinité :</b> .....	29
<b>II.5 Test protéolytique :</b> .....	30

<b>II.6 Production de protéase en milieu liquide :.....</b>	<b>31</b>
<b>II.7 Estimation de l'activité protéolytique par la protéase brute.....</b>	<b>32</b>

**Conclusion**

**34**

## **Liste des figures:**

- Figure 01** Caractères morphologique de *Penicillium*.
- Figure 02** Représentation du marché mondial des enzymes (Rao et al., 1998).
- Figure 03** Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).
- Figure 04** Site de prélèvement vu par satellite.
- Figure 05** Site de prélèvement vu panoramique.
- Figure 06** Les échantillons prélevés des 3 points (sites).
- Figure 07** Schéma représentatif de la technique de dilution et d'ensemencement.
- Figure 08** Milieu de culture avant l'inoculation avec la suspension des spores de *Penicillium*.
- Figure 09** Centrifugeuse à haute vitesse.
- Figure 10** Isolement de champignons sur milieu PDA à partir du point C
- Figure 11** Aspects des colonies d'isolats obtenus à partir des trois points de prélèvement
- Figure 12** Observation macroscopique de genre *Penicillium* spp.
- Figure 13** Observation microscopique de genre *Penicillium* spp.
- Figure 14** Morphologie macro et microscopique de la levure isolée.
- Figure 15** Observation microscopique de genre *Cladosporium*.
- Figure 16** Aspects macroscopiques d'un champignon à mycélium stérile
- Figure 17** Effet du stress salin à 3,5% et 5% de chlorure de sodium sur la croissance des isolats fongique.
- Figure 18** Zones d'hydrolyse obtenues par les champignons étudiés.
- Figure 19** Croissance du mycélium dans le milieu de production de protéase (Suryawamshi et Pandya, 2017).
- Figure 20** Surnageant obtenu après centrifugation.
- Figure 21** Test du pouvoir protéolytique de la protéase extraite.

## **Liste des tableaux :**

- Tableau 01:** Taxonomie de *Penicillium*.
- Tableau 02:** quelques espèces fongiques productrices de la protéase.
- Tableau 03:** Résultats du dénombrement de champignon.
- Tableau 04:** Isolats fongique choisis.
- Tableau 05:** Diamètre des zones de protéolyse (en cm) obtenues par les champignons étudiés

# Introduction

## **Introduction**

L'immense diversité génétique et biochimique des micro-organismes marins suscite actuellement un intérêt considérable en tant que nouvelle source prometteuse d'enzymes avec des activités spéciales dont certaines ont déjà été utilisées dans des applications industrielles. Ces microorganismes sont induits par la complexité de l'environnement marin impliquant une salinité élevée, une pression élevée, une basse température et des conditions de lumière spéciales. Les utilisations d'enzymes ont considérablement augmenté au cours des dernières années. Les perspectives sont excellentes pour continuer à augmenter l'utilisation des enzymes actuellement disponibles dans les applications actuelles, et dans de nouvelles utilisations, et également dans l'utilisation de nouvelles enzymes à de nombreuses fins.

Le Japon augmente constamment son soutien à la recherche sur les enzymes microbiennes marines. En outre, le Canada, l'Espagne, la Finlande, la Russie et d'autres pays ont également intensifié leurs recherches sur les bioenzymes marines. Collectivement, en raison de la diversité biologique marine et de la spécificité du métabolisme biologique, l'étude à l'échelle mondiale ne fait que commencer, mais elle a un énorme potentiel de développement et d'applications avec des retombées industrielles (**Zhang et Kim, 2010**).

L'industrie biotechnologique moderne s'intéresse à l'utilisation des enzymes, leur origine naturel les rends moins polluants, moins onéreux (**Outtrup, 1990**), et plus respectueux de l'environnement. Leur pouvoir de rester active et stable dans des conditions extrêmes, et leur capacité de « turnover », c'est-à-dire la capacité pour une seule molécule enzymatique de reproduire un nombre considérable de fois la même réaction. De plus leur domaines d'utilisation est vastes ce qui a pousser les industriels a opté pour leur utilisations.

Actuellement les protéases représente le groupe d'enzyme le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologies industrielle tels que (pharmaceutique, médicale, détergents, textile, alimentaire...etc.) (**Gupta et al., 2002 ; Benkiar et al., 2013 ; Zaferanloo et al., 2014**).

. Dans le présent travail on a procédé à la recherche des champignons producteurs de protéases de l'environnement marin qui est exceptionnellement complexe et englobe une grande diversité biologique inexplorée. . Ces champignons ont été isolés à partir des sables de mer de la côte de la wilaya de Mostaganem (Sidi Mejdoub en suite identifiés et criblés pour l'activité protéolytique. L'enzyme a ensuite été produite dans un milieu liquide agité, puis un essai sur milieu solide pour l'activité protéase a été effectué en utilisant l'enzyme brute

Le manuscrit est structuré de deux parties, la première concerne la recherche bibliographique qui présente en premier lieu des généralités sur le genre *Penicillium* et en

second lieu elle présente des généralités sur les protéases : La deuxième partie concerne le côté pratique dans lequel le matériel et les méthodes suivis dans ce travail sont expliqués, puis les résultats sont présentés, discutés, pour tirer à la fin une conclusion

*partie*  
*I*

# Synthèse bibliographique

Chapitre I :  
Généralités sur le genre *Penicillium*

# Chapitre I : Généralités sur le genre *Penicillium*

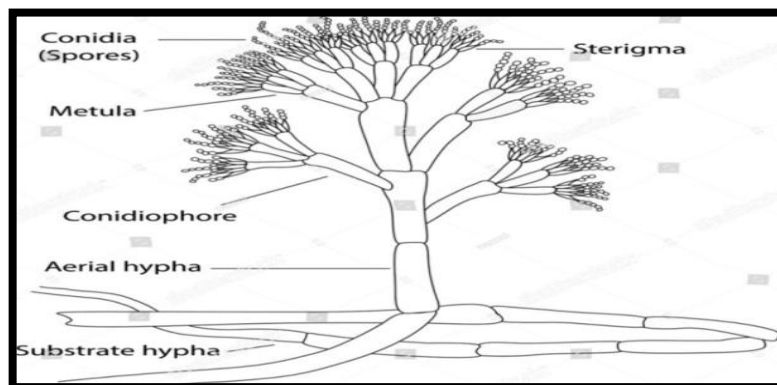
Parmi les innombrables formes de vie que contient la terre et qui constituent une infinie diversité, figure les Mycota ou Mycetæ. C'est des champignons, qui se distinguent par un mode de vie et un système de reproduction particulier. Ces champignons, sont classés dans le règne fongique, dérivé du mot latin fungus. (Le Tacon, 2012), (Pillot, 2017 ; Dommergues et Mangenot, 1970)

## **I.1 Description morphologique et taxonomie de *Penicillium* :**

### **I.1.1 Morphologie :**

Les colonies ont souvent une croissance rapide, dans une couleur verdâtre parfois blanche, et au niveau microscopique (**fig.1**) on a : (Sanchez et al. 2017).

- Structure en forme de pinceau
- Filaments mycéliens : fins, septés, à bords parallèles
- Conidiogénèse : type blastique phialidique
- Conidiophores :
  - Fins
  - Simples ou ramifiés
- Phialides :
  - Forme de bouteille (extrémité effilée)
  - Disposition : en verticille au sommet du conidiophore
- Conidies :
  - Unicellulaires
  - Forme : globuleuse ou ovale
  - Disposition : en chaînes basipètes



**Figure 01 :** Caractères morphologique de *pénicillium*

### I.1.2 Taxonomie:

**Tableau 1.** Taxonomie de *Penicillium*. (Institut national desanté publique du Québec)

<b>Règne</b>	<b>Fungi</b>
<b>Phylum</b>	Ascomycota
<b>Classe</b>	Euascmycetes
<b>Ordre</b>	Eurotiales
<b>Famille</b>	Trichomaceae
<b>Genre</b>	<i>Penicillium</i>
<b>Espèce</b>	spp.

### I.2 Distribution écologique de *Penicillium* :

Dans le compost et sur les plantes et le bois en décomposition, *Penicillium* prospère. De même sur les denrées sèches, les céréales, les épices et les produits frais. De manière marquée, il pousse sur les matériaux de construction dans les espaces endommagés par l'eau et dans la poussière domestique. Dans le monde marin, il joue un rôle de saprophyte de la vie végétale en décomposition ou de parasite des algues et des créatures marines.

### I.3 Les *Penicillium* de l'eau de mer :

Les champignons marins ont une diversité estimée à 1112 espèces **Balabanova L., et al (2018)** marines fongiques dans 472 genres. Ils sont fréquemment présents dans les zones intertidales, les salines et les mangroves, mais peut aussi être trouvé dans des environnements extrêmes tels que les sédiments marins profonds, glace et eaux sur salées **Raghukumar C (2008)**. Ils agissent comme agents pathogènes et symbiotes d'autres organismes marins, tels que les algues, les coraux et les éponges et sont écologiquement pertinents en raison de leur performance dans les processus biochimiques tels que la régénération des nutriments en tant que décomposeurs de matière organique. Espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Trichoderma* se trouvent couramment dans les milieux marins en tant que champignons marins facultatifs à l'origine d'environnements terrestres où ils ont développé des morpho-caractéristiques logiques et physiologiques qui leur permettent de s'adapter aux conditions marines **Cantrell SA., et al (2006)**. Les espèces de *Penicillium* sont parmi les champignons provenant de divers environnements extérieurs et

intérieurs, y compris les substrats marins tels que les éponges, les coraux, les algues et sable. De nombreuses espèces de *Penicillium* sont économiquement, bio-technologiquement et médicalement importantes avec de vastes répercussions. Par exemple, les espèces marines de *Penicillium* sont pro-productrices de métabolites secondaires potentiellement utiles comme médicaments et antibiotiques. En particulier, les *Penicillium* d'origines marines sont des sources potentielles de composés bioactifs uniques qui sont produites en raison des conditions naturelles des milieux marins. Actuellement, ce genre est bien disposé en sous le genre *Aspergillus* et *Penicillium* avec 14 et 11 sections, respectivement. **Visagie CM., et al (2014) Frisvad JC.,et al (2004) Deshmukh SK., et al (2018).**

### **I.4 Intérêt économique de *Penicillium* :**

Le *Penicillium* a un intérêt économique précieux en raison de ses propriétés médicinales, en particulier sa capacité à produire des antibiotiques. Ce champignon est utilisé dans l'industrie médicale depuis des décennies et a sauvé des vies. De plus, *Penicillium* est également important dans l'industrie alimentaire, où il est utilisé dans la production de fromage et d'autres aliments fermentés. La saveur et la texture uniques de ces aliments peuvent être attribuées métabolites remarquables de ce champignon, Le *Penicillium* est utilisé dans la production de divers enzymes et produits chimiques, ce qui en fait un atout précieux dans le secteur de la biotechnologie. Dans l'ensemble, *Penicillium* joue un rôle capital dans de nombreuses industries et son impact économique ne peut être négligé. L'utilisation de divers champignons, tels que *Penicillium caseicolum* et *P. roqueforti*, dans l'industrie fromagère revêt une importance particulière. L'introduction de ces champignons donne au fromage leur particularité et leur saveur (**Universalis.Fr**).

Le *Penicillium* est un genre de moisissures cosmopolite bien connu qui comprend plus de 350 espèces jouant divers rôles dans les écosystèmes naturels, l'agriculture et la biotechnologie. Il existe des espèces de *Penicillium* qui sont bénéfiques pour l'humanité à partir de diverses caractéristiques et beaucoup sont encore inexplorées qui doivent être identifiées. L'importance de *Penicillium* va de la bioremédiation, des générateurs d'enzymes et de biogaz, des sources d'antioxydants, des producteurs de vitamines, de la provenance des pigments pour les colorants textiles / cosmétiques et les plus éminents de tous en tant qu'agents antibiotiques et certains même avec des propriétés antifongiques. Ces minuscules organismes sont plus que des bénédictions pour l'humanité (**Sharaf Ali et al., 2016**) . Des exemples de rôles bénéfiques sont : *Penicillium chrysogenum* produit la pénicilline, *Penicillium griseofulvum* produit la griséofulvine, plusieurs espèces de *Penicillium* produisent des substances anticancéreuses

telles que *Penicillium albocoremium* (Andrastin A), *P. decumbens* (Bredenin). *Penicillium roqueforti* est utilisé pour la production de Roquefort et *Penicillium camemberti* est utilisé pour la production de camembert. Plusieurs espèces de *Penicillium* produisent des enzymes qui sont utilisées dans l'industrie, par ex. les cellulases et les xylanases produites par les espèces de *Penicillium* ont de larges applications dans l'alimentation humaine et animale, l'industrie textile et les industries de la pâte à papier. Les espèces de *Penicillium* sont également utilisées pour la biodégradation du pétrole et peuvent être utilisées pour restaurer l'écosystème lorsqu'elles sont contaminées par le pétrole. L'enzyme peroxydase des espèces de *Penicillium* a des activités biodégradables potentielles qui dégradent le colorant amarante, l'orange G, les colorants hétérocycliques comme l'azur B et le colorant pour les lèvres. De plus, certaines espèces fonctionnent comme des décomposeurs de matériaux morts et peuvent être utilisées dans le recyclage des déchets. Récemment, des espèces de *Penicillium*, telles que *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum* et *P. waksmanii*, sont utilisées pour la biosynthèse écologique de nanoparticules d'or à partir d'une solution d'AuCl. Les nanoparticules d'or sont formées de manière assez uniforme avec une forme sphérique avec un diamètre moyen Z de 153,3 nm, 172 nm et 160,1 nm pour les 3 espèces, respectivement. D'autre part, certaines espèces sont connues pour provoquer des maladies chez les plants et chez l'homme. (Refai *et al.*, 2015)

Le *Penicillium* constitue un exemple remarquable d'hydrolyse enzymatique, dans la création d'acide amino-6-pénicillanique. Qui sert d'intermédiaire dans la fabrication de pénicillines semi-synthétiques comme l'ampicilline et l'amoxicilline. Ce qui prouve l'importance de ce processus. C'est l'hydrolyse de la pénicilline V que ces microbes utilisent pour produire cet acide. Pharmaceutique.

# Chapitre II :

## Généralité sur les protéases

## Chapitre II : Généralité sur les protéases

Les protéases sont un groupe très complexe d'enzymes qui appartiennent à la classe des hydrolases formées par une ou plusieurs chaînes polypeptidiques (**Kumar, 2005**).

Ce sont les enzymes qui catalysent les liaisons peptidiques de toute molécule protéique, qui scinde la protéine en fragments polypeptidiques. Les protéases sont les enzymes les plus importantes pouvant être produites par plusieurs genres de champignons et d'autres organismes (**Frazier, 1967**).

### II.1 Origines des protéases :

#### II.1.1 Protéases d'origine végétale :

Les enzymes d'origine végétale, en particulier les protéases, sont techniquement classées par ordre décroissant. La papaine en provenance du latex de fruit la papaye (*Carica papaya*). (**Scriban, 1993 ; Pelmont, 1995 ; Rao et al., 1998**), la ficine (*Ficus glabrata*) (**Scriban., 1993**), la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus*) et la kératinase. Elles représentent certaines des protéases les plus répandues (**Rao et al., 1998**).

#### II.1.2 Protéases d'origine animale :

La plupart des protéases animales sont synthétisées par le pancréas sous forme de précurseurs qui peuvent être activés de manière auto-catalytique dans des conditions bien définies (**Rao et al., 1998**). Parmi ces protéases, on peut citer : la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine.

#### II.1.3 Protéases d'origine microbienne :

Les protéases microbiennes sont supérieures aux protéases d'autres sources car elles possèdent presque toutes les propriétés requises pour les applications industrielles (**Sandhya et al., 2005**). Ces protéases peuvent être produites par des moisissures, des levures et des bactéries (**Devi et al., 2008**).

#### II.1.4 Protéases des bactéries :

Il s'agit essentiellement de subtilisine ou de subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et certains genres apparentés. Ils sont très stables et résistent à l'action des détergents. De plus, ils sont naturellement secrétés dans le milieu, ce qui facilite sa purification (**Calk et al. 2000 ; Frazier, 1967**). Les bactéries psychrophiles du lait, en particulier *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas putida*, produisent des

métalloprotéases thermostables qui sont particulièrement utiles dans la coagulation du lait et l'affinage du fromage. Ces bactéries sont détruites par la pasteurisation, mais les protéases extracellulaires qu'elles produisent ne sont que partiellement inactivées (Cousin *et al.*, 1982). Les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* jouent un rôle très important dans l'affinage des fromages (Desmazeaud, 1978).

### II.1.5 Mycoprotéases :

Les protéases fongiques sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation de mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration (Hajji *et al.*, 2008). Ces moisissures qui peuvent se développer sur des substrats à basse valeur marchande (Boyce et walsh, 2012). Elles sont les enzymes les plus importantes et sont produites par divers genres de champignons tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothelioma*. Ces protéases représentent 40 % du marché mondial des enzymes industrielles (Frazier, 1967; Ul-haq *et al.*, 2003).

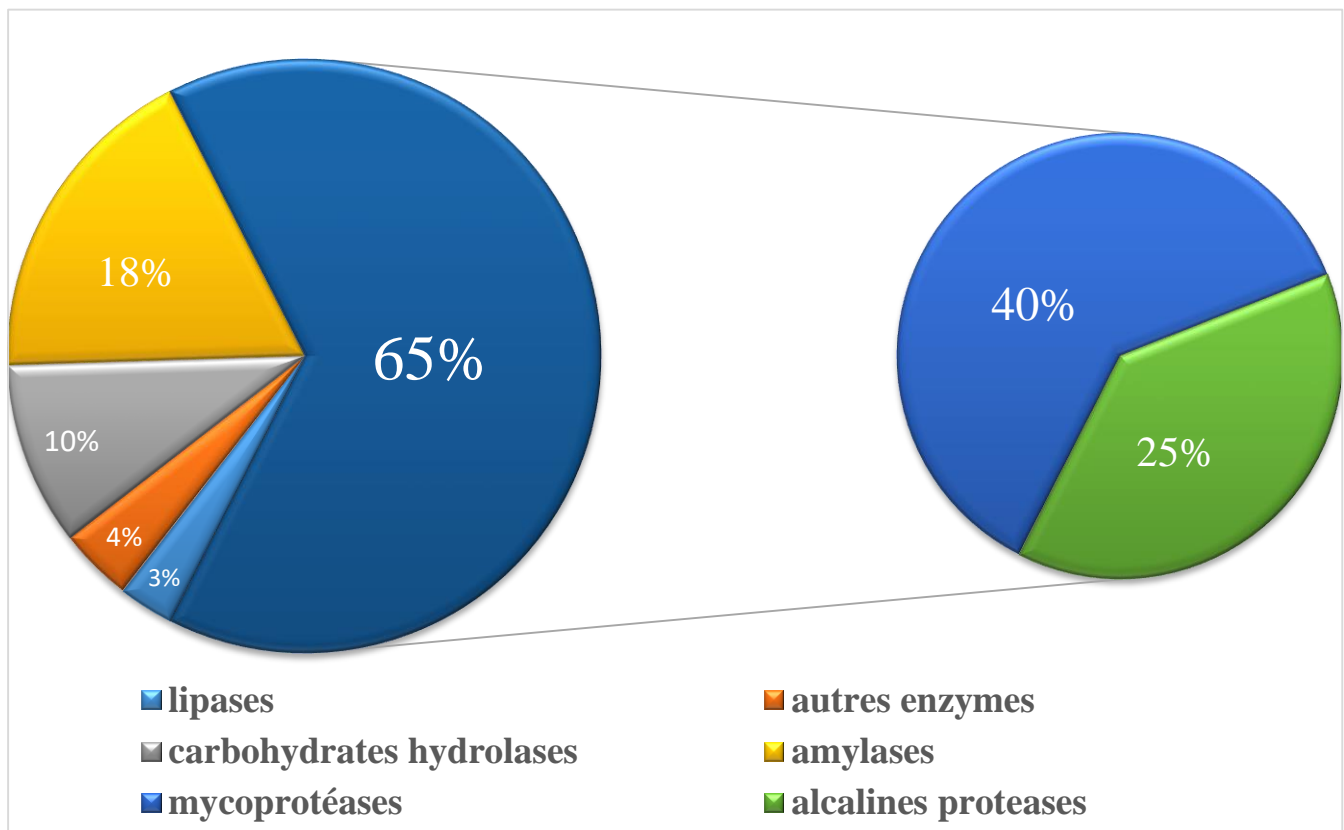


Figure 2. Représentation du marché mondial des enzymes (Rao *et al.*, 1998)

### II.1.6 Protéase de levure :

Certaines levures produisent des enzymes protéolytiques, tel que le *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* et *Debaria*. Par exemple, le *Saccharomyces cerevisiae* produit trois protéases ; les aspartyl protéases, les sérines protéases et les métalloprotéases. L'activité protéolytique de ces genres est particulièrement utile pour l'affinage des fromages (**Kresze, 1991 ; Boiron, 1996**)

**Tableau 2 :** quelques espèces fongiques productrices de la protéase (Lakba Hadjer ; Soucha Hayet. 2015)

Source	Espèces	Référence
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i>	García-Gómez et al., 2009
	<i>Mucor circinelloides</i>	Sathya et al., 2009
	<i>Conidiobolus coronatus</i>	Laxman et al., 2005
	<i>Penicillium</i> sp.	
	<i>Aspergillus terreus</i>	Bauveria Germano et al., 2003
	<i>Aspergillus felina</i>	<i>Aspergillus clavatus</i> Wu et al., 2006
	<i>ES1</i>	<i>Endothia parasitica</i> Agrawal et al., 2005
	<i>Aspergillus niger</i>	Hajji et al., 2008
	<i>Aspergillus flavus</i>	Durand et Monson, 1982
	<i>Aspergillus Candidus</i>	Jernejc et Cimerman, 2001
	<i>Aspergillus saitoi</i>	Jernejc et Cimerman, 2001
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	//
	<i>Aspergillus sojae</i>	Dahot, 1987
	<i>Aspergillus melleus</i>	//
	<i>Fusarium culmorum</i>	Botton et al., 1990
	<i>Geotrichum candidum</i>	Dahot, 1987
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Urbanek et Yirdaw, 1984
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Boiron, 1996
	<i>Trichoderma viride</i>	Boiron, 1996
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	<i>Mucor</i> Delgado-Jarana et al., 2002
	<i>bacilliformis</i>	<i>Mucor miehei</i> Uchicoba et al., 2001
	<i>Stachybotrys chartarum</i>	Ul-Haq et al., 2003
	Fernandez-Lahore et al., 1998	
	Durand et Monson, 1982	
	Miller, 2002	
Levures	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Chi et al., 2007 Tobe et al., 1976
	<i>Candida lypolytica</i>	

## II.2 Classification et nomenclature des protéases :

### II.2.1 Classification de protéase :

Avant 1961, les enzymes ont été dénommées selon le nom du substrat sur lequel elles agissent en ajoutant le suffixe ase. En 1961, l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (UIBMB) a donné une nouvelle classification aux protéases elle se base sur plusieurs critères tels que la longueur de la chaîne polypeptidique, le mode d'attaque de la chaîne, le pH d'activité et la nature de résidu impliqué dans le site actif (Colwell et Grigorova, 1989 ; Rao et al. 1998).

#### a. Selon la longueur de la chaîne polypeptidique :

C'est le premier critère de classification des enzymes protéolytiques. Il existe deux catégories ; les protéases qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques et les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres (Frazier, 1967 ; Colwell et Grigorova, 1989).

#### b. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique :

En fonction de leur mode d'attaque (fig.3), les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les endopeptidases et les exopeptidases (Scriban, 1999 ; Moodie, 2001).

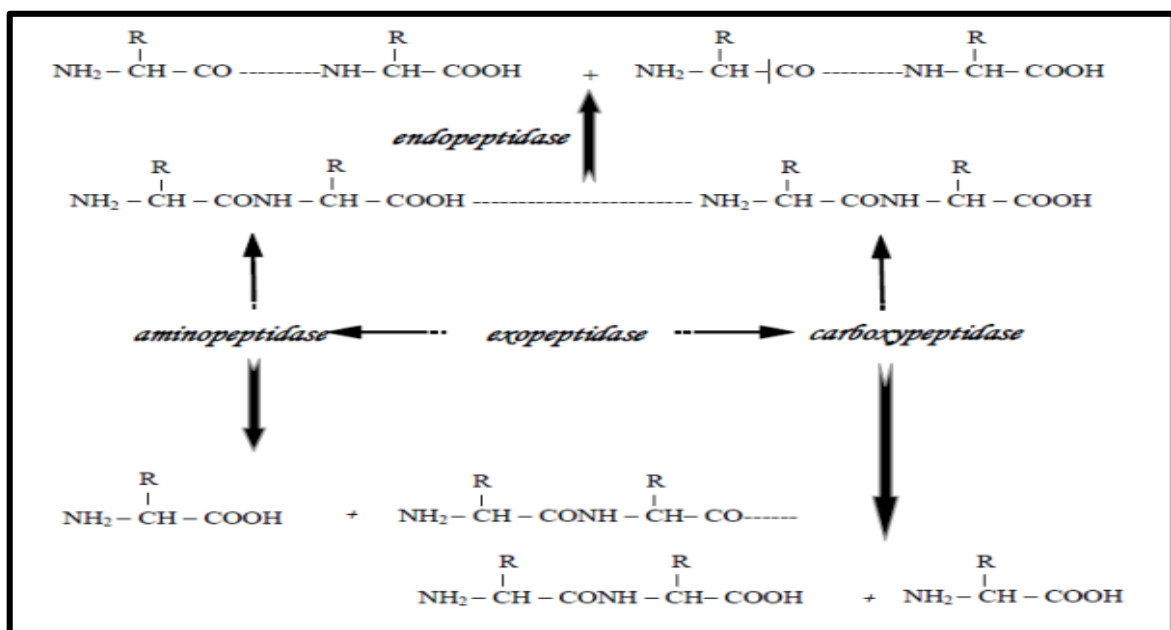


Figure 3 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

➤ **Exopeptidase :**

Les exopeptidases sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C-terminales des protéines. Il se divise en deux catégories d'exopeptidases : les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Ces enzymes sont rarement utilisées en industrie.

➤ **Les aminopeptidases :**

Leur action commence à l'extrémité NH<sub>2</sub> libre du polypeptide et leur activité dépend souvent de la présence d'ions métalliques. (Rao *et al.*, 1998)

➤ **Les carboxypeptidases :**

Ils attaquent à partir de l'extrémité COOH libre du peptide. (Scriban, 1999 ; Trap et Boireau, 2000) .L'activation de ces différentes enzymes entraîne la libération de dipeptides et de tripeptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés (Scriban, 1999).

**C. Selon la nature de résidu impliqué :**

Dans le site actif Les séquences primaires et la spécificité des acides aminés de leur site actif ont permis la classification des endopeptidases.

➤ **Endopeptidase :**

La plupart des enzymes utilisées dans l'industrie sont des endopeptidases. Ils se caractérisent par leur hydrolyse à des sites spécifiques de la chaîne polypeptidique éloignés des extrémités N- et C-terminales. La présence de groupes amino ou carboxyle libres peut inhiber l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont classées en 4 classes (séryl protéases, cystéinyl protéases, aspartyl protéases et métalloprotéases (Lakba Hadjer ; Soucha Hayet. 2015)

➤ **Séryl protéases :**

Les protéases à sérine existent largement dans la nature, à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes. Leur mécanisme catalytique implique l'intervention d'un résidu sérine (Reginald *et al.* 1975 ; Kortt *et al.* 1994 ; Pelmont, 1995 ; Trap et Boireau, 2000).

➤ **Cystéyl protéases :**

Les protéases à cystéine, ou thiols, ont peu d'applications industrielles. Ces protéases se trouvent chez les procaryotes et les eucaryotes. La plupart de ces protéases ne sont activées qu'en présence d'agents réducteurs tels que l'histidine, l'aspartate et la cystéine (Kresze, 1991 ; Pelmont, 1995).

➤ **Aspartyl protéases :**

Les protéases aspartiques, également appelées protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend de la présence de résidus d'acide aspartique dans le site actif de l'enzyme. Ces enzymes présentent un intérêt industriel dans les domaines nécessitant une hydrolyse des protéines à faible pH (Pelmont, 1995 ; Rao *et al.*, 1998).

➤ **Métalloprotéases :**

Les métalloprotéases forment un groupe de protéases très diverses. Ces enzymes contiennent des ions métalliques divalents, généralement  $Zn^{2+}$ , qui sont nécessaires à leur activité. Ces enzymes sont généralement des protéases dites neutres avec un pH optimal proche de 7,0. Cependant, certaines métalloprotéases sont des protéases alcalines avec un pH optimal d'environ 10 (Wilkesman et Kurz, 2009 ; Belitz *et al.*, 2009).

## II.2.2 Nomenclature des protéases :

Il existe 3 types de nomenclatures : Bechkri S (2022)

### a. La nomenclature commune :

Un certain nombre d'enzymes sont fréquemment désignés à l'aide de noms communs.

Exemples :

- Pepsine (end protéase digestive du suc gastrique).
- Trypsine (end protéase digestive du suc pancréatique).
- Chymotrypsine (protéase digestive fabriquée par le pancréas).
- Papaine (protéase trouvée dans le latex de la papaye et dans l'ananas).

Pour certaines enzymes, on ajoute le suffixe "ase" au nom du substrat attaqué.

Exemples :

- Les peptidases, dont les substrats sont des peptides. Bechkri (2022)

### **b. La nomenclature fonctionnelle (systématique) :**

Elle prend en compte le nom du substrat de l'enzyme et le type de réaction catalysée. Pour désigner une enzyme, on indique successivement :

- Le nom du substrat
- Le type de réaction catalysée
- Le suffixe "ase". **Bechkri (2022)**

### **c. La nomenclature officielle (numéro de code) :**

Dans la nomenclature dite "officielle", la classification des enzymes est basée sur des critères de spécificité. Une enzyme possède un numéro de code, précédé des lettres E.C. (Enzyme commission) et comportant 4 chiffres séparés par des points. L'enzyme s'écrit de manière générale sous la forme : E.C. X1.X2.X3.X4

X1 : Varie de 1 à 6 et indique les 6 types de réactions catalysées par les enzymes (classe).  
**Bechkri S (2022)**

## **II.3 Applications des protéases :**

### **II.3.1 Protéase pour les applications de recherche :**

Les exopeptidases sont nécessaires pour un clivage protéique précis, facilitant la décomposition catalytique des protéines en polypeptides ou en acides aminés simple.  
**(Ataman chemicals)**

### **II.3.2 Protéase pour la recherche en protéomique :**

Les protéases sont des outils couramment utilisés dans la recherche en protéomique. Elles conviennent à la digestion des protéines en petits fragments peptidiques en vue d'une analyse par spectrométrie de masse suivie d'un séquençage. La trypsine donne des peptides qui se situent dans la plage de masse utile de la spectrométrie de masse. Elle est reconnue comme la protéase la plus utilisée pour l'identification des protéines. **(Merck)**

### **II.3.3 Protéase pour la recherche industrielle appliquée :**

Les protéases ont une importance commerciale dans différents domaines de l'industrie et de la recherche appliquée et ont diverses applications. En raison de leur diversité de propriétés physiologiques, l'hydrolyse à des valeurs de pH extrêmes ou à des températures élevées,

sont parfaitement adaptés à une utilisation dans les secteurs pharmaceutique, diagnostique, textile et alimentaire. Les applications spécifiques de ces protéases comprennent, entre autres, l'analyse des fibres alimentaires et les additifs pour nettoyage en place (NEP). (Merck)

#### **a. Boulangerie :**

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten une protéine insoluble qui détermine les propriétés de la pâte. Selon les propriétés recherchées de la pâte, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser plus ou moins le gluten. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Les protéases d'origine bactérienne sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la résistance de la pâte, (Rao et al. 1998).

#### **b. Produits à base de soja :**

Les protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis longtemps dans la préparation de la sauce de soja et d'autres produits à base de soja. La modification de la protéine de soja par la protéase contribue à améliorer ses propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline à pH 8 permet l'élaboration d'hydrolysats protéiques solubles aux propriétés nutritionnelles très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiques dans les jus de fruits et les boissons à base de jus ainsi que dans les formulations d'aliments diététiques. (Rao et al, 1998).

#### **c. La fabrication du fromage :**

Des études approfondies ont démontré que la plupart des protéases acides microbiennes ont une forte capacité à coaguler le lait pour former le caillé, qui représente une étape clé dans la production de fromage ce qui facilite l'expansion de l'industrie fromagère. , son développement a été limité par la pénurie de présure animale. Le traitement chimique des extraits enzymatiques obtenus à partir de *Mucor meihei* avec des agents oxydants a permis d'obtenir des enzymes aux propriétés similaires à la chymosine de veau en termes de productivité et de qualité du produit final (Aguilar et al., 2008). les protéases alcalines produites par *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, et d'autres espèces de *Mucor* sont également utilisées (Aguilar et al., 2008 ; Channe et Shewale, 1998 ; Merheb et al., 2007).

#### **d. Produits pharmaceutiques et médicaux :**

Également utilisé dans le développement de produits d'importance médicale. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* par exemple sont utilisées comme auxiliaires digestifs chez certaines personnes présentant des déficiences en enzymes lytiques dans le système digestif. En outre, la collagénase de *Clostridium*. Ou la subtilisine en combinaison avec des antibiotiques pour les brûlures et les plaies. L'élastase de *Bacillus subtilis* peut être utilisée dans le traitement des furoncles d'abcès et des plaies profondes (**Kudrya et Simonenko, 1994**). Enfin, l'asparaginase d'*E. coli* a été utilisée pour éliminer l'asparagine du sang de certains patients atteints de certains types de leucémie (**Rao et al., 1998 ; Gupta et al., 2002**).

#### **e. Industrie des détergents :**

Les protéases présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents pour leur capacité à faciliter l'élimination des taches de protéines en raison de leurs avantages uniques qui ne sont pas possibles avec les technologies détergentes traditionnelles (**Gupta et al., 2002**). Ils sont maintenant ajoutés comme ingrédient majeur, représentant environ 25 % des ventes totales d'enzymes dans le monde. Les principales conditions préalables à l'utilisation des protéases dans la production de détergents comprennent : l'action sur une variété de substrats, l'activité et la stabilité à un pH et une température élevés, et en présence d'agents oxydants ajoutés. Aujourd'hui, les protéases dans les détergents disponibles dans le commerce sont toutes des protéases à sérine produites par *Bacillus sp* (**Chellappan et al., 2006; Guo et Ma, 2008**). Récemment, les protéases produites par un petit nombre de sources fongiques, telles que *Penicillium sp*, *Aspergillus parasiticus*, *Condiobolus coronatus* et *Engyodontium album*, ont été étudiées pour de telles applications (**Rashbehari et al., 2003; Sandro et al., 2003; Chellappan et al., 2006**).

#### **f. Traitement des eaux usées industrielles :**

Les protéases sont de plus en plus reconnues comme un moyen efficace de traitement des déchets industriels. Des essais dans diverses industries agro-alimentaires produisant des déchets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants montrant le potentiel des protéases pour le traitement de tels déchets (**Kumar et al., 1999**). Des enzymes protéolytiques de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Streptomyces* et diverses souches d'*Aspergillus* sont actuellement utilisées dans ce domaine (**Gupta et al., 2002 ; Hernandez et al., 2006**).

***PARTIE  
II***

**PARTIE  
EXPERIMENTALE**

# Chapitre I :

## Matériels et méthodes

# Chapitre I : Matériels et méthodes

## I.1 Lieu et durée du travail

Les travaux ont été entièrement réalisés au sein du Laboratoire de Recherche de Microbiologie et Biologie Végétale à l'Université de Abdelhamid Ibn Badis (Mostaganem).

## I.2 Objectifs de l'étude

Cette étude vise à l'isolement, purification et identification des champignons de l'eau de mer et de sélectionner un isolat de *Penicillium* le plus producteur de protéases.

## I.3 Matériels et réactifs

L'ensemble des équipements et réactifs utilisés lors de nos travaux sont indiqués dans l'annexe 1.

## I.4 Echantillonnage

### I.4.1 Lieux de prélèvement des échantillons

Les échantillons de sable de mer on était prélevé sous l'eau de mer de la baie située au pied du mausolée sidi el Mejdoub situé lui-même au nord-est de la ville de Mostaganem.

Le prélèvement c'est effectué de diffèrent point : Point A, Point B et Point C ce dernier représente un petit port exploité par des pêcheurs. (Fig. 4 et 5)



Figure 04. Site de prélèvement vu par satellite



Figure 05. Site de prélèvement vu panoramique.

#### I.4.2 Technique de prélèvement

Les échantillons de sable furent collectés près du flux de la mer à 2 cm de profondeur à l'aide d'une spatule ensuite introduits dans des flacons désinfectés, étiquetés (fig. 6) et transportés rapidement au laboratoire.

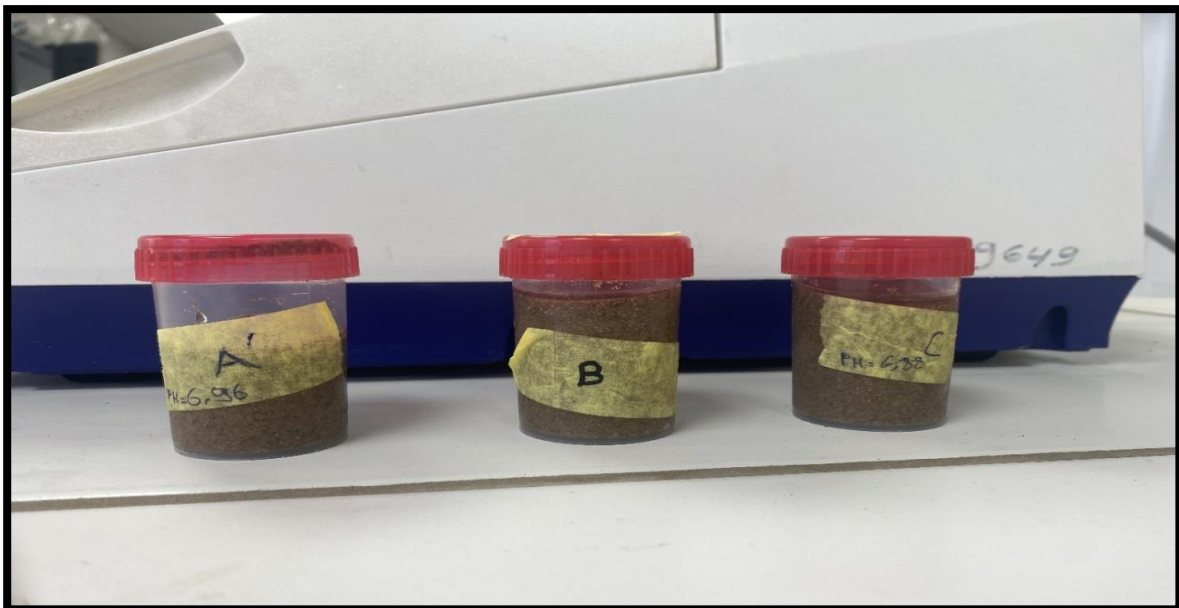


Figure 6. Les échantillons prélevés des 3 points (sites)

#### I.5 Les milieux de cultures :

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et Sabouraud : utilisés pour les isolements et purification des champignons.

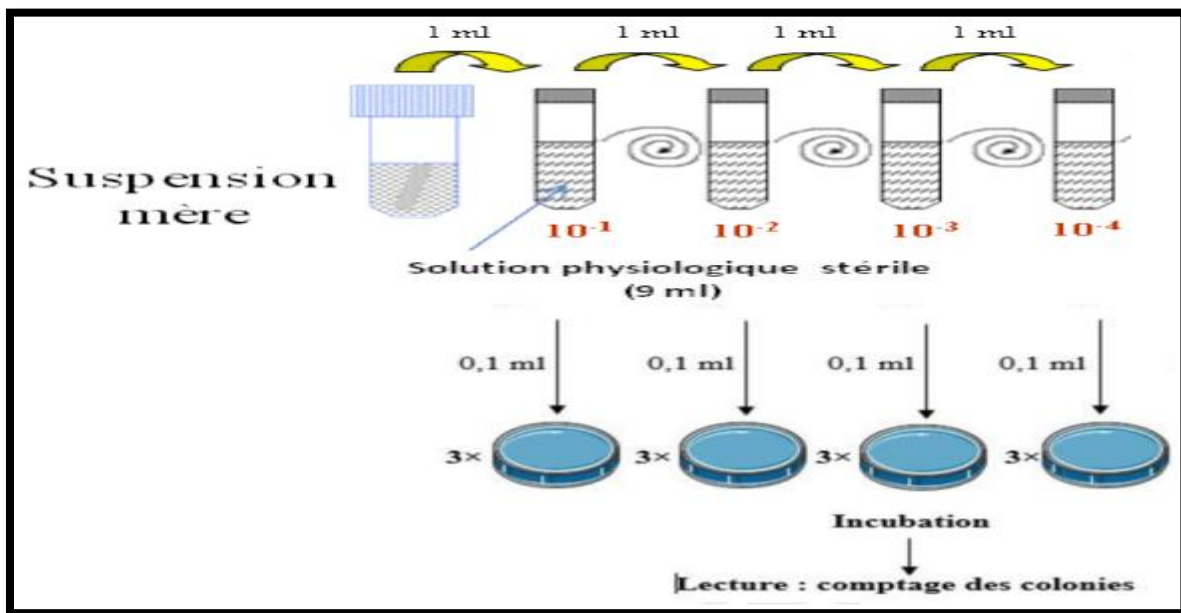
**Milieu PDA+ 5% NaCl et Milieu PDA+3,5% NaCl :** utilisés pour réaliser de test de résistance à la salinité des champignons.

**Milieu GNL (gélose nutritif au lait) :** utilise pour faire le test de protéolyse par les champignons.

## I.6 Méthodes

### I.6.1 Isolement des champignons :

Les échantillons sont des quantités de sable de mer. 1 g de chaque échantillon est mis dans un tube de 9 ml d'eau physiologique stérile (9% de NaCl). Les tubes sont alors mis en agitation, puis une série de dilutions décimales (de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) est effectuée à partir de chaque échantillon. Dans une boîte de Pétri contenant le milieu PDA ou Sabouraud, 0,1 ml de surnageant est déposé et étalé avec un étalier stérile. Après l'ensemencement les boîtes sont incubées à 25°C pendant 7 jour (**figure 07**).



**Figure 07.** Schéma représentatif de la technique de dilution et d'ensemencement.

### **I.6.2 Dénombrement des isolats fongique :**

Le dénombrement a été effectué sur des boites de pétri présentant des colonies fongiques après 7 jours d'incubation à 25 °C.

### **I.6.3 Identification :**

#### **a. Observation macroscopique d'isolats fongiques :**

Les caractères macroscopiques des colonies et de la culture fongiques, à savoir : l'aspect, la texture, la pigmentation, la couleur du mycélium, la couleur des colonies au revers, la nature du type de croissance (aérienne ou radiale) sont déterminés à l'œil.

#### **b. Observation microscopique d'isolats fongiques :**

L'examen microscopique direct était basée sur la détermination des caractères morphologiques des hyphes (type de thalle, la couleur des hyphes, la structure des conidiospores, etc.) ainsi que la forme de reproduction (spores endogène ou exogènes, type de forme de reproduction, mode de formation des conidies, présence de chlamydospores, etc). Dans la présente étude, la technique d'impression sur ruban adhésif est utilisée pour l'identification microscopique.

### **I.6.4 Purification :**

Après 7 jours d'incubation, on passe à l'étape de purification des cultures. . Les champignons choisis ont été numérotés et puis purifiées par la méthode des stries. Cette dernière a permis d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées.

### **I.6.5 Test de salinité :**

Cette méthode consiste à ensemencer la souche fongique sur milieu PDA + 5% NaCl et milieu PDA + 3,5 % NaCl mis dans des boites Pétri. Ces dernières sont incubés a 25°C pendant 3 à 7 jour.

### **I.6.6 Screening des champignons pour la production de protéase alcaline :**

La gélose au lait est utilisée pour la mise en évidence de la présence d'une activité protéolytique (hydrolyse des protéines) chez les souches fongiques (**Clarke et Steel, 1966**). On mit dans des boites de Pétri le milieu GNL. L'ensemencement des champignons a été fait par touche centrale à l'aide d'une anse de platine et l'incubation a été effectuée à une température de 25°C, pendant 5 à 7 jours. (**Smith et al., 1952**). La lecture des résultats est faite en observant des zones de lyse (zones claires) autour des colonies. .

### I.6.7 Production de protéases :

La fermentation a été effectuée dans des flacons Erlenmeyer (250 ml) contenant les milieux de production de **protéases**. Un flacon de 200 ml contenant 100 ml de milieu de production de protéases composé de : Caséine 1g, Extrait de levure 0,6g, Urée 0,6g,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,6g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,6g,  $\text{NHCl}$  0,6g, Glucose 1g. Le milieu de production liquide a été ajusté à  $\text{PH} = 8,5$  et inoculés par, 2 ml de suspension de spore de *penicillium*, ensuite incubés à  $25^\circ\text{C}$  pendant 72h, sous agitation permanente de 120 tr/min. récupéré. L'extraction de l'enzyme a été effectuée par simple filtration du milieu en utilisant du papier filtre Whatman n°. 1 pour la séparation du mycélium fongique (**karathik J,2014**). Ensuite, le filtrat a été centrifugé à 10 000 tr/min pendant 15 min (**fig. 8**). Le surnageant clair a été pris comme enzyme brute (**Sind et Hamid, 2013**).



**Figure 8.** Milieu de culture avant l'inoculation avec la suspension des spores de *Penicillium*



Figure 9. Centrifugeuse à haute vitesse.

### I.6.8 Dosage de L'activité protéolytique de l'enzyme brute

Afin de déterminer l'activité de l'activité protéolytique de l'enzyme de **protéases** brute une méthode de diffusion en puits a été réalisée sur gélose au lait écrémé. 0,5  $\mu$ l d'enzyme brute a été mise dans chaque puits réalisés dans une gélose au lait écrémé. Les boites ont été incubées à une température de 25°C, pendant 48 heures. La zone de protéolyse a été observée sous la forme d'une zone claire d'hydrolyse autour du puits. Les zones ont été mesurées à l'aide d'une échelle de

# Chapitre II : Résultats et discussions

## Chapitre II : Résultats et discussions

### II.1 Dénombrement des champignons :

. Le dénombrement de la microflore fongique présente dans les différents échantillons (PTA, PTB, PTC) étudiés a été réalisé par le comptage de nombre de colonies apparus sur le milieu PDA après 7 jours d'incubation en utilisant la loi de dénombrement suivante.

<b>La loi de dénombrement :</b>	$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1.n_2).d}$
---------------------------------	---

- $n_1$  : nombre de boites comptées à la dilution retenue la plus faible.
- $n_2$  : nombre de boites comptées à la seconde dilution retenue.
- $d$  : facteur de dilution.
- $V$  : volume d'ensemencement.

**Exemple :**

- l'échantillon PTA de dilution  $10^{-2}$ .

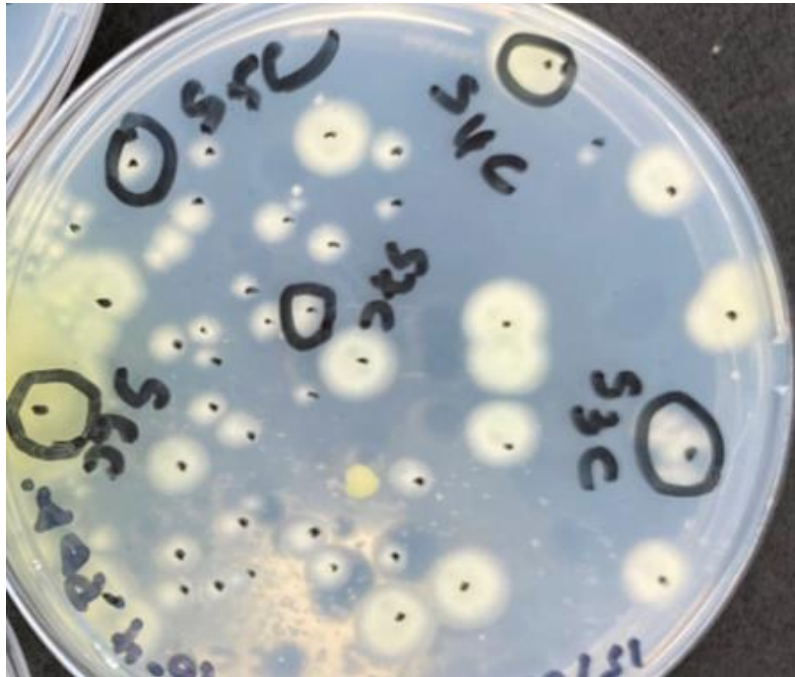
$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1.n_2).d} = \frac{3}{0,1(1 + 0,1.1).10^{-2}} = 3300 \text{ UFC}$$

**Tableau 3.** Résultats du dénombrement de champignon.

<i>Dilution</i> <i>Echantillon</i>	$10^{-2}$		$10^{-3}$		$10^{-4}$	
	colonies	UFC	colonies	UFC	colonies	UFC
<b>PTA</b>	3	$3,3 \times 10^3$	9	$9,9 \times 10^4$	0	0
<b>PTB</b>	4	$4,4 \times 10^3$	0	0	0	0
<b>PTC</b>	0	0	0	0	43	$4,73 \times 10^6$

Les résultats de l'isolement des champignons sur le milieu PDA à partir du sable de mer de la plage de Sidi Medjdoub (Mostaganem) nous a permis d'obtenir un ensemble de colonies à aspect filamenteux de couleurs et aspects différents.

L'incubation pendant une période de 3 à 7 jours à une température de 25° a montré un nombre d'isolats élevé au point C par rapport aux points B et A (fig. 10 et 11) ce qui rend ce point probablement plus contaminés. Ceci est due peut être à cette zone qui est exploitée et fréquentée pendant toute l'année par des pêcheurs comme un port de pêche ce qui augmente la quantité des biodéchets sur la plage et en conséquence la prolifération des microorganismes,



**Figure 10 :** Isolement de champignons sur milieu PDA à partir du point C

## II.2 Choix des isolats :

14 champignons ont été choisis à partir de différents site. (**Tableau 4**). Les isolats ont été ensuite purifiés sur le milieu PDA (**fig. 11**).

**Tableau 4.** Isolats fongique choisis.

<b><u>POSITION</u></b>	<b>Souche</b>	<b>dilution</b>
<b><u>PTA</u></b>	• MS2	<b><math>10^{-3}</math></b>
	• MS3	
	• S1A	<b><math>10^{-2}</math></b>
	• S2A	
• MS1		
	• MS5	<b><math>10^{-1}</math></b>
<b><u>PTB</u></b>	• MS4	<b><math>10^{-3}</math></b>
	• MS6	<b><math>10^{-4}</math></b>
<b><u>PTC</u></b>	• S1C	<b><math>10^{-2}</math></b>
	• S2C	<b><math>10^{-3}</math></b>
	• S3C	<b><math>10^{-4}</math></b>
	• S4C	
	• S5C	
• S7C		

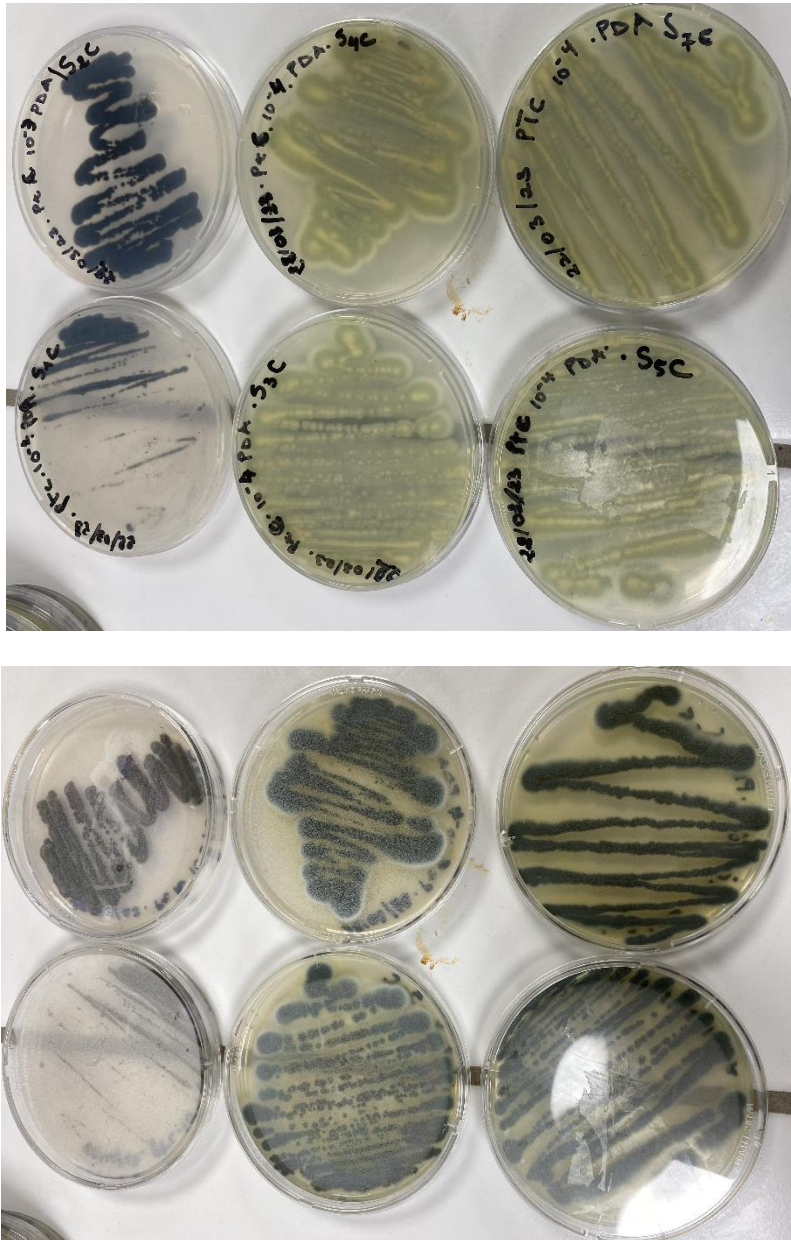


Figure 11 : Aspects des colonies d'isolats obtenus à partir des trois points de prélèvement

### II.3 Identification des isolats fongique :

L'identification de souches fongiques isolées à partir de (PTA, PTB, PTC) a permis de répertorier les genres des champignons filamenteux. L'observation à l'œil nu des deux isolats « S3C et S7C » purifiés sur milieux PDA et sabouraud a permis de constater des colonies à croissance modérée, à texture laineuse avec un mycélium aérien court ou poudreux. Les colonies en culture variaient généralement en couleur du blanc, du vert au jaunâtre avec un dessous incolore, beige ou gris verdâtre et un pigment jaunâtre diffusé dans le milieu.

L'identification microscopique était basée sur l'étude des formations de spores, des conidiophores et des hyphes.(Salvamani et Nawawi, 2014). Sous le microscope optique les deux isolats présente un mycélium septé avec présence des formes en pinceau et des conidies en chaîne, ce qui nous a permis de les classer comme *Penicillium*. (fig. 12 et 13).

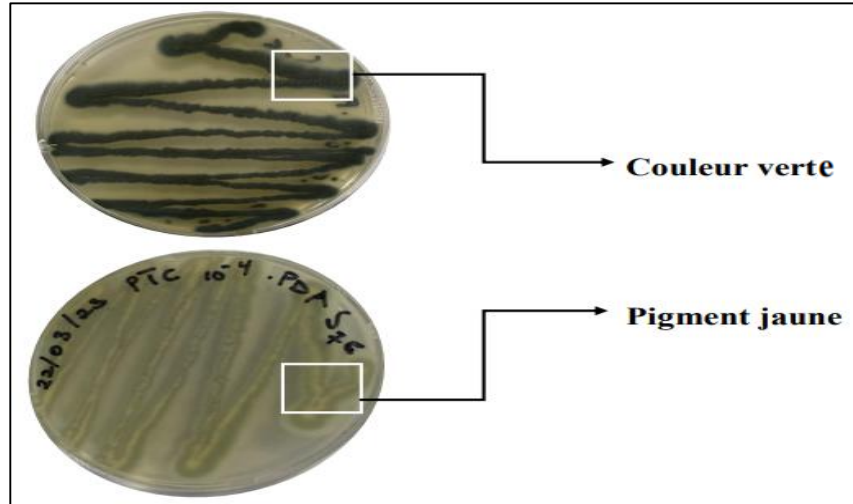


Figure 12. Observation macroscopique du genre *Penicillium* sp

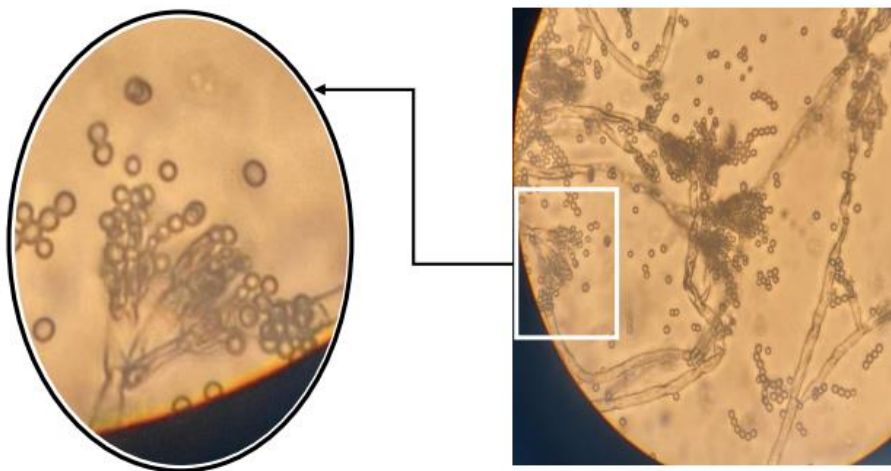
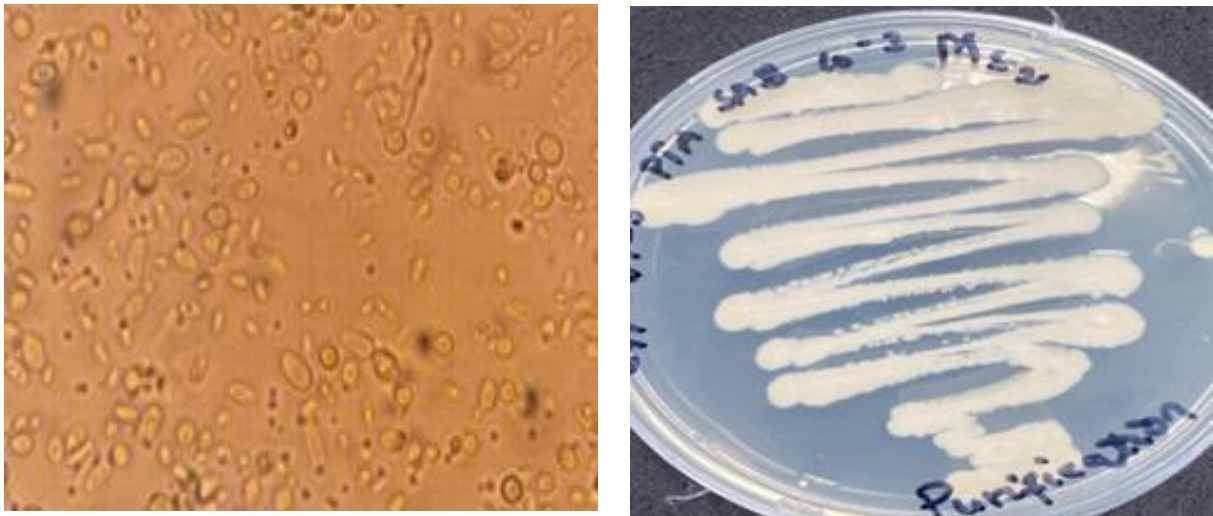


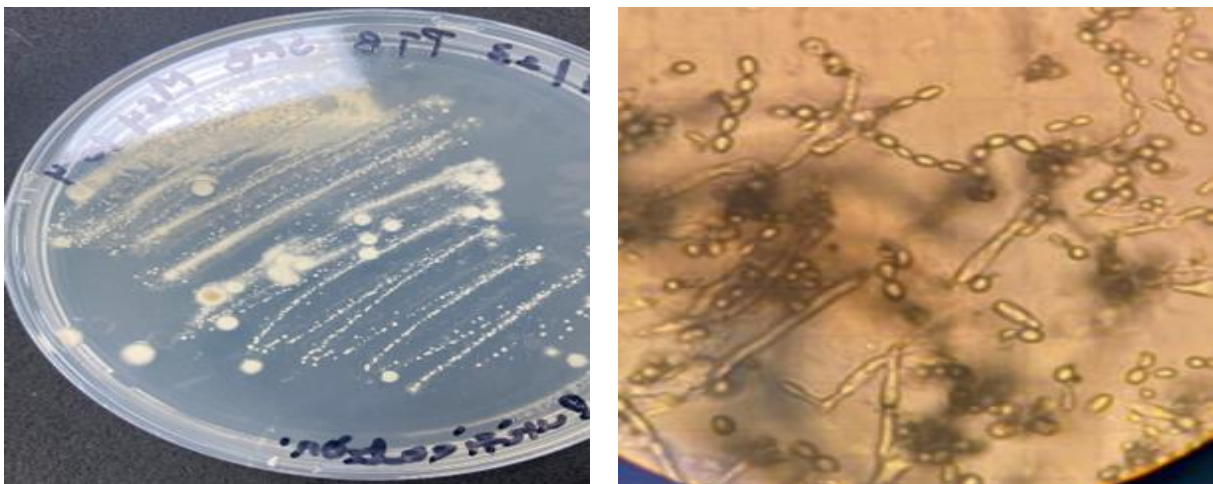
Figure 13. Observation microscopique du genre *Penicillium* spp

Un isolat est caractérisé par des colonies blanches d'aspect velouté et apparaît au microscope sous forme de cellules ovales et allongées avec un noyau. Certaines de ces cellules bourgeonnent, certains filaments sont également présents. Ces caractères indiquent que cet isolat est une levure proche de l'espèce *Candida albicans* (fig. 14).



**Figures 14 :** Morphologie macro et microscopique de la levure isolée.

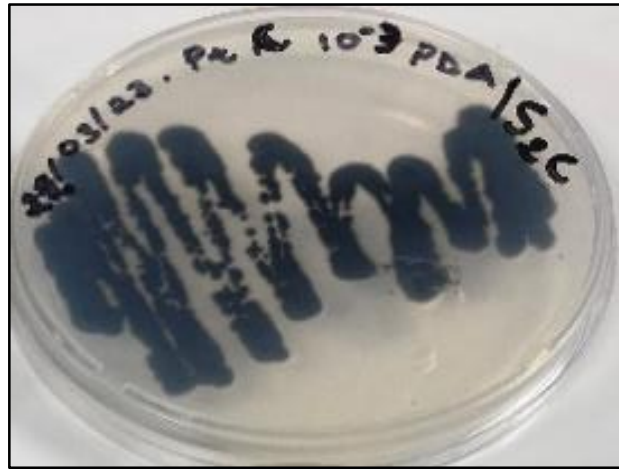
Un (01) isolat avec un mycélium blanc poudreux qui vire au vert olive à noirâtre avec le temps. Le revers est noir olive et les conidiophores sont plus ou moins distincts des hyphes végétatifs, étant dressés, droits ou flexueux, ne se ramifiant que dans la région apicale, les conidies sont produites en chaînes. Une présence de chaînes de conidies qui se désarticulent facilement. Ces caractéristiques correspondent au genre *Cladosporium* (**Fig. 15**).



**Figure 15:** Observation microscopique de genre *Cladosporium*

Un (01) isolat avec des colonies de couleur blanche virant au brun avec le temps et de couleur vert noirâtre. Il a un mycélium stérile (dépourvu de spores). Comme ces champignons ne produisent pas de spores, il est impossible d'utiliser les méthodes traditionnelles de

comparaison morphologique pour les classer. Cependant, des techniques moléculaires peuvent être appliquées pour les déterminer (fig. 16).



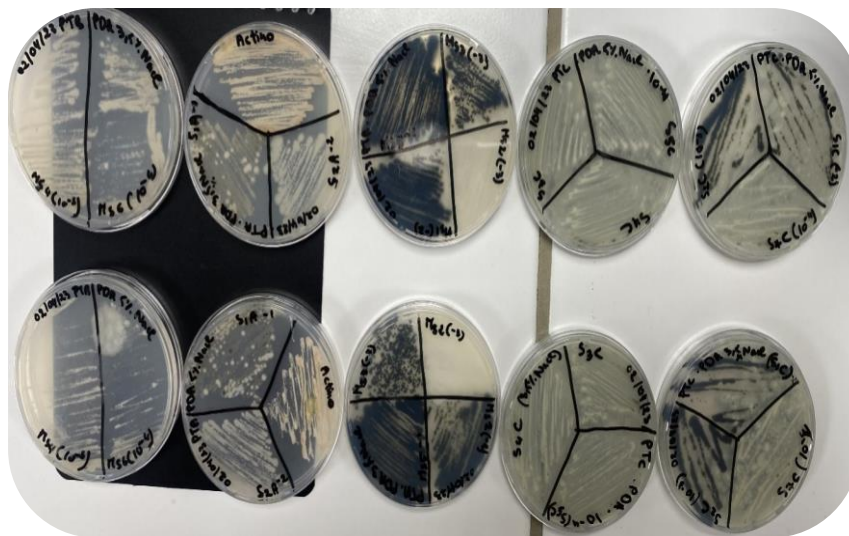
**Figures 16** : Aspects macroscopiques d'un champignon à mycélium stérile.

L'étude des aspects macroscopiques et microscopiques des champignons isolés du sable marin de Sidi Megjdoub a montré la présence de 4 genres : *Penicillium*, *Cladosporium*, une levure et un isolat à mycélium stérile. Ces derniers sont des formes végétatives sans spores, soit parce que leur milieu de culture ne favorise pas la sporulation, soit ils appartiennent donc au groupe des champignons à mycélium stérile. Comme mentionné ci-dessus, les isolats S3C et S7C ont été identifiés comme *Penicillium* spp en raison de la morphologie microscopique des septa, et présence des formes penicillates. **Samanthi, (2019)** a indiqué que les espèces fongiques dominantes isolée du sable de plage humide comprend *Aspergillus*, *Penicillium* spp, *Cladosporium* et des champignons de type levure (**Mancini, 2005 ; Moazeni et al., 2023**). D'après des études antérieures, *Penicillium* spp et *Aspergillus* spp appartiennent aux Ascomycètes et sont tous deux des moisissures à intérêts biotechnologiques. Comme mentionné ci-dessus, les isolats S3C et S7C ont été identifiés comme *Penicillium* spp et en raison de la morphologie microscopique des septa, de la structure des conidiophores en forme de brosse (**Samanthi, 2019**). Plusieurs études dans la littérature indiquent la présence de ces genres saprophytes dans le sable marin. **Gonzalez et al. (1998)** mentionnent une prédominance de *Cladosporium cladosporoides* dans les sables de trois plages mexicaines. D'après **Izquierdo et al. (1986)** 16 espèces de champignons ont été isolées du sable des plages le long de la côte méditerranéenne nord-est de l'Espagne, dont la majorité appartient aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*. L'étude menée sur le sable de deux plages à Casablanca (Maroc) par **Abdallaoui et al (2007)** montre que 70 champignons ont été isolés à partir de 56 échantillons, dont 19 levures (dix *C. albicans* et neuf autres), cinq

*Trichophyton rubrum*, quatre *Scybalidium dimidiatum*, 25 *Aspergillus* sp., 13 *Penicillium* sp., deux *Cladosporium* et deux *Scedosporium*. Dans une autre étude, 5 genres de champignons filamenteux collectés dans l'eau de mer du port d'Oran ont été identifiés à *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Acremonium* (Maamar, 2015). Izquierdo *et al.* (1986) ont signalé la dominance du genre *Aspergillus* dans les zones inondées et intermédiaires dans des conditions de marée haute. Larrondo et Calvo, (1989) indiquent dans une étude réalisée dans la région de l'Attique en Grèce que les isolats fongiques obtenus comprenaient des espèces de levures *Candida* et des moisissures des genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Helminthosporium* et *Aspergillus niger*. Aboulhassane, (2020) a mentionné que des champignons tels que : *Candida* et *Trichophyton*, ont été trouvés sur certaines plages les plus fréquentées par les gens, surtout en juillet et août.

#### II.4 Test de salinité :

Les résultats de croissance des champignons étudiés dans un milieu PDA+3,5% de NaCl et PDA+5% de NaCl montrent une croissance dans toutes les boîtes de Pétri. Ceci indique la capacité de ces isolats d'origine marine à tolérer ces conditions salines (fig. 17)



**Figure 17 :** Effet du stress salin à 3,5% et 5% de chlorure de sodium sur la croissance des isolats fongique

Ces résultats montrent aussi que ces champignons halotolérants peuvent largement tolérer la salinité de la mer méditerranéenne. Plusieurs travaux ont indiqués que les champignons marins ont des exigences pour le chlorure de sodium à des concentrations voisines à celles retrouvées dans l'eau des mers (Maamar, 2015). Les résultats des travaux de Chamekh *et al.* (2019) qui a travaillé sur des échantillons de sol de sebkha d'Oran indiquent que sur 25 isolats qui ont



**Tableau 05** : Diamètre des zones de protéolyse (en cm) obtenues par les champignons étudiés.

<u>POSITION</u>	<u>Souche</u>	<u>Diamètre</u>
<b><u>PTA</u></b>	• MS2	±
	• MS3	3.7
	• S1A	-
	• S2A	-
	• MS1	2.3
	• MS5	1.65
<b><u>PTB</u></b>	• MS4	-
	• MS6	2,5
<b><u>PTC</u></b>	• S1C	2.25
	• S2C	2.35
	• S3C	5.65
	• S4C	4,8
	• S5C	5.1
	• S7C	4,9

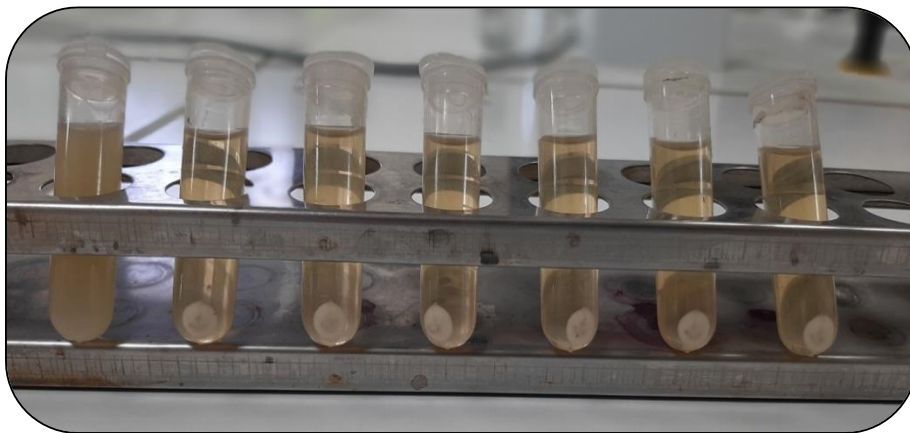
## II.6 Production de protéase en milieu liquide :

Les résultats de la production de protéase en milieu liquide incubé à 25°C sous agitation à 120 tr/min pendant 72 heures ont montré une bonne croissance en Erlenmeyer (**fig. 20**).

L'extraction de l'enzyme brute à partir du milieu de fermentation suivant **Suryawamshi et Pandya, 2017** a été réalisé par une séparation du mycélium par une filtration avec un papier filtre Whatman n°. 1 suivie d'une centrifugation à 10 000 tr/min pendant 15 minutes. Cette extraction a abouti à l'obtention d'un surnageant clair contenant la protéase brute recherchée (**figure 19**).



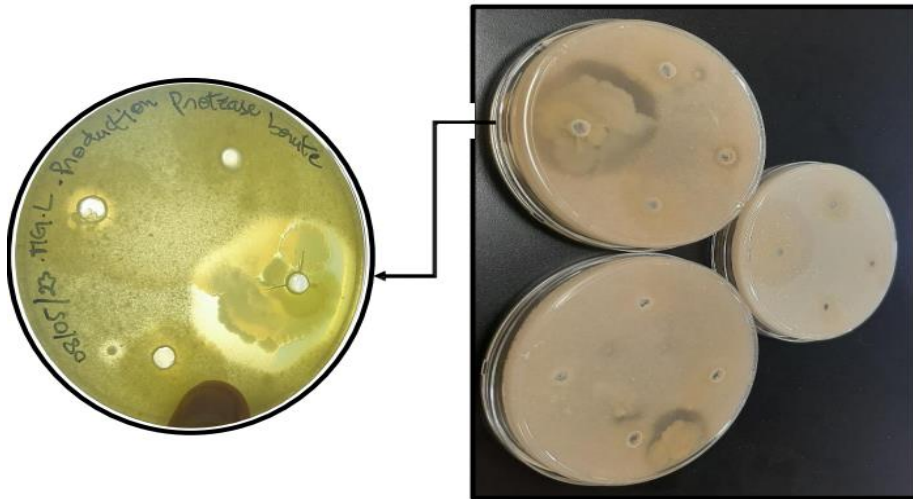
**Figure 19.** Croissance du mycélium dans le milieu de production de protéase



**Figure 20 :** Surnageant obtenu après centrifugation.

### **II.7 Estimation de l'activité protéolytique par la protéase brute.**

L'enzyme brute mise dans des puits dans la gélose nutritive au lait a donné une zone hydrolyse de la caséine de 43 mm (fig. 21). La zone de protéolyse a été observée après une incubation à une température de 25°C, pendant 48 heures. NS TRAVDAAIL similaire réalisé par **Suryawamshi et Pandya, (2017)** sur gélose au lait écrémé l'enzyme brute de *Trichoderma* a donné des zones de protéolyse de 22 à 30 mm.



**Figure 21** : test du pouvoir protéolytique de la protéase extraite.

Les résultats présentés par **Suryawamshi et Pandya, (2017)** indiquent que deux isolats fongiques identifiés comme *Trichoderma longibrachiatum* et *Aspergillus Niger* sont des producteurs de protéases alcalines. *Aspergillus niger* montre plus d'activité protéolytique, en produisant une zone de 35 mm sur gélose au lait écrémé contre une zone de 22 mm produite par *Trichoderma longibrachiatum*.

# Conclusion

## **Conclusion :**

La protéase est une enzyme phénoménal pour l'industrie pharmaceutique allant des produits détergents jusqu'au textile... sachant que la propriété primaire de cette enzyme est la dégradation des protéines, son utilisation est très vaste et très demandé étant donné qu'elle représente la plus grande part du marché enzymatique, grâce aux avantages qu'elle présentent surtout dans la substitutions des agents chimiques toxiques (**Gupta et al., 2002 ; Benkiar et al., 2013 ; Zaferanloo et al., 2014**).

Le travail présenté ci-dessus a pour but d'isoler à partir des échantillons de sable de la plage de Sidi Mejdoub auquel nous avons effectués une série de tests pour définir et identifiés les champignons qui s'y trouve et ainsi détecter leurs pouvoir protéolytique.

Après l'étude mener nous pouvons conclure que la moisissure *Penicillium isolé de la plage Sidi elMejdoub* possède un pouvoir protéolytique important par rapport a d'autres champignons isolés du même site

Les résultats présentés dans ce travail démontrent que le monde marin peut être une source de substances bénéfiques et que le stress salin peut induire chez les champignons la production d'enzymes. Par conséquent, les champignons, peuvent fournir des métabolites qui peuvent contribuer dans le développement de l'économie nationale.

# **Références bibliographiques**

## **Références bibliographiques :**

**Abdallaoui M.Soussi Boutayeb .H, Guessous-Idriss. N. (2007).** Fungal flora from the sand of two beaches of Casablanca (Morroco): Analysis and epidemiological corollary. *Journal de Mycologie Médicale* Volume 17, Issue 1, March 2007, Pages 58-62.

**Aguilar C. N., Gerardo G. S., PLilia A., Raul R. H., José M. H. and Juan C. E. (2008).** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*.4 (4): 354-366.

**Balabanova L, Slepchenko L, Son O, Tekutyeva L.** Biotechnology potential of marine fungi degrading plant and algae polymeric substrates. *Front Microbiol* 2018 ; 9:1527.

**BECHKRI S (2022).** Cours d'Enzymologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1. (**Polycopie**)

**Belitz H. D., Grosch W. and Schieberle P. (2009).** Food chemistry.4ème Ed Springer Verlag Berlin. P.1070.

**Benkiar A., Zarai Jaouadi N., Badis A., Rebzani F., Boulkour Touioui S., Rekik H., Naili B., Ferradji F.Z., Bejar S., Jaouadi B. 2013 .**Biochemical and molecular characterization of a thermo and detergent stable alkaline serine kerationolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather biodegradation process , international , biodeterioration , biodegradation , **83**, pp. 129-138.

**Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P. 19-79.

**Calk P., Takaç S., Calk G. &Ozdamar T. H. (2000).** Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus lichniformis*. *Enz. Microbiol. Technol.* 26(1). 45-60.

**Cantrell SA, Casillas-Martínez L, Molina M.** Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using mor- phological and molecular techniques. *Mycol Res* 2006; 110:962– 970.

**Channe P. S. and Shewale J. G. (1998).** Influence of culture condition on the formation of milk-clotting protease by *Aspergillus niger*MC4. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14. 11-15

- Chellappan S., Jasmin C., SoorejBasheer M., Elyas K. K., SaritaBhat G. and Chandrnasekaran M. (2006).** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontiu malbum* BTMFS10 under solid state fermentation. *ProcessBiochemistry*. 41.956-961.
- Colwell R. R. et Grigorova. R. (1989).** *Methods in microbiology*. (Ed) St E dimundsbert press limited. Great Britain. P: 133-138.
- Cousin D., Matagne A., Laemmlu U. K. & Stewart D. J. (1982).** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34. 1157-1166.
- Deshmukh SK, Prakash V, Ranjan N.** Marine fungi: a source of potential anticancer compounds. *Front Microbiol* 2018 ; 8:2536.
- Desmazeaud M. et Hermier J. (1978).** Isolement, purification et propriétés d'une protéase exocellulaire de *Micrococcus caseolyticus*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 8(4). 565-577.
- Devi M. K., Banu A. R., Gnanaprabhal G. R., Pradeep B. V. et Planiswamy M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.* 1(7). 1-6.
- Frazier W. C. (1967).** *Food microbiology*. Academic presse. London. P: 3-429.
- Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA.** Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* sub- genus *Penicillium*. *Stud Mycol* 2004; 49:201–241.
- Gonzalez M.C., Herrera T., Ulloa M., Hanlin R.T. (1998).** Abundance and diversity of microfungi in three coastal beaches of Mexico . *mycoscience*, 39,115-121.
- Guo J. P. and Ma Y. (2008).** High level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 58. 301-308.
- Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. (2002).** Bacterial alkaline proteases. molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59. 15-32.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S., Chauhan B. (2002).** An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbial Biotechnol*, 60 (4), pp.381-395.

- H.K. Suryawanshi and N.D. Pandya (2017)** Int. J. Appl. Sci. Biotechnol. Vol 5(3): 397-402.
- Hajji M., Rebai A., Gharsallah N., Nasri M. (2008).** Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79. 915–923.
- Hernández M. S., Marilú R., Nelson P. G. et Renato P. R. (2006).** Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. Journal of Food Engineering. 73. 93-100.
- Izquierdo J., Piera G., Aledany MC., Lucena F. (1986).** Studio de la flora fungica de la arena de la playa de barcelona. (A study of the fungal of the beaches in barcelona.) Athens, Unites Nations Environment Programme, Mediterranean Action Plan, Mediterranean Marine Pollution Monitoring and research programme (MED POL Research Project Final Report.
- Kortt A. A., Burns J. E. Vaughan J.A. et Stewart D. J. (1994).** Purification of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*. Biochem. Mol. Biology Int. 34(6). 1157-1166.
- Kresze G. B. (1991).** Proteases during purification. Bioprocess-technol. 12. 85-120.
- Kudrya. V. A. Simonnenko. I. A. (1994).** Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Appl. Microbial biotechnol .41. 505-509.
- KUMAR C.G. et TAKAGI H., 1999.** Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advances 17: 561-594.
- Kumar S., Sharma N.S., Saharan M. R. and Singh R. (2005).** Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*. purification and characterization. Process Biochemistry. 40. 1701-1705.
- Lakba Hadjer ; Soucha Hayet. (2015).** Production des protéases par les mycètes isolés de milieux sahariens ; Mémoire de master ; Université des frères Mentouri Canstantine
- MAAMAR Ahlem (2015)** étude de la biodégradation du pétrole brut par le peuplement fongique du port d'Oran.
- Merheb Carolina W., Cabral H., Gomes E. and Da-Silva R. (2007).** Partial characterization of protease from a thermophilic fungus. *Thermoascus aurantiacus*. and its hydrolytic activity on bovine casein. Food Chemistry. 104. 127-131.

**Moodie P. (2001).** Traditional baking enzymes- proteases. Enzyme Development Corporation. 212. 736- 1580.

**Neelakantan S., Nohanty A. K. and Kaushik J. K. (1999).** Production and use of microbial enzymes for dairy processing. Current Sciences. 77. 143-148.

**Pelmont J. (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.

**Raghukumar C.** Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. Fungal Divers 2008;31:19–35.

**Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. & Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biology Rev. 62(3). 597-635.

**Rashbehari T., Binita S. and Rintu B. (2003).** Purification and characterization of a protease from solid-state cultures of *Aspergillus parasiticus*. Process Biochemistry. 38. 1553-1558.

**Refai M., El-Yazid H.A., Tawakkol W. (2015).** Monograph on the Genus *Penicillium*: A Guide for Historical, Classification, and Identification of Penicillin, their Industrial Applications and Detrimental Effects. Cairo University; Giza, Egypt.

**Reginald T., Monod M. A., Faith Y. K. et Jatou-Ogay R. (1975).** The secreted protease of *Aspergillus* and their possible role in virulence. Can. J. botany. 73 (1). 1081-1086.

**Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. and Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry. 40. 2689-2694.

**Sandro G. Ashok P., Clarice A. O., Saul N. R. and Carlos R. S. (2003).** Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 32. 246-251.

**Scriban. R. 1999.** Biotechnologie. 5eme édition technique et documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.

**Sharaf Ali Fatima, Khalid Mehmood, Muhammad Anwar, Ali Akbar, Samiullah, Junaid**

**Baber, Said Qasim, Imran Ali. (2016).** Biotechnology of Penicillium Genus Lasbela, U. J.Sci.Techl., vol. V, pp.201-207,

**Sind SO and Hamid GH (2013)** Qualitative and quantitative screening of alkaline protease production from some pathogenic bacteria. Journal of Kerbala University 11(3).

**Sumantha A., Larroche C. and Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases. A perspective. Food Technology and Biotechnology. 44(2). 211-220.

**Trap C. Boreau P. (2000).** Les protéases chez les helminthes. Vet. Res. 31. 461-471.

**Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A. &Quadeer M. A. (2003).** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. Biotechnology. 2(1). 30-36.

**Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW et al.** Identification and nomenclature of the genus Penicillium. Stud Mycol 2014;78:343–371. Gonçalves et al., Int J Syst Evol Microbiol

**Wilkesman J. et Kurz L. (2009).** Protease Analysis by Zymography. A review on techniques and patents. Recent Patents on Biotechnology. 3. 175-184.

**Zaferanloo B., Quang T.D., Daumoo S. Ghorbani M.M., Mahon P.J., palombo E.A. 2014.** Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an australian native plant. *World J Microbiol biotechnol*, 30, pp. 1755-1762.

**Sites web :**

[https://www.champignons77.org/breves/presentation\\_generale\\_des\\_champignons.pdf](https://www.champignons77.org/breves/presentation_generale_des_champignons.pdf)

<http://dspace.univmsila.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/30595/These%20de%20HADJ%20HAFSI%20Yamna%20%20Inventaire%2C%20cartographie%20et%20identification%20des%20macromyc%C3%A8tes%20dans%20la%20r%C3%A9gion%20de%20M%E2%80%99sila.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

<https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/penicillium-spp>

<https://www.inspq.qc.ca/printpdf/book/export/html/380>

<https://www.universalis.fr/encyclopedie/ascomycetes/4-importance-economique/>

[www.microbiologyresearch.org](http://www.microbiologyresearch.org)

# **Annexe**

## **Annexe 01:**

- **Milieu PDA :** Pour 1L d'eau distillée
  - Pomme de terre 250 g
  - Glucose 20 g
  - Agar 20 g
  
- **Milieu PDA+3, 5% NaCl :** Pour 250 ml d'eau distille
  - Milieu PDA + 8,5 g de NaCl
  
- **Milieu PDA+5% NaCl :** Pour 250 ml d'eau distille
  - Milieu PDA + 12,5 g de NaCl
  
- **Milieu Sabaurd :**
  - Neopeptone
  - Glucose
  - Actidione
  - Chloramphenicol
  - Sulfate de magnesium
  - Phosphate monopotassique
  - Agar
  
- **Milieu GNL (Milieu gélosé nutritive au lait) (Jaouadi et *al.*, 2008) :**
  - Extrait de levure 3 g
  - Peptone 5 g
  - Agar 15 g
  - Lait écrémé (0% MG) 250 ml
  - Eau distillée 1000 ml
  
- **Diluant (l'eau physiologie) :**
  - L'eau distillée stérile
  - NaCL 0.9 %

## Annexe 02 :

<b>Matériels</b>	<b>Produits (les réactifs)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• les lames</li><li>• Lamelles</li><li>• pipette pasteur (râteau).</li><li>• Micropipette et les embouts</li><li>• Ance de platine</li><li>• Portoir</li><li>• Tubes à essais</li><li>• Bec Bunsen</li><li>• Etuve</li><li>• Incubateur – agitateur</li><li>• Centrifugeuse</li><li>• Tube de centrifugation a haute vitesse</li><li>• Erlenmeyer</li><li>• Barreau magnétique</li><li>• Eprouvette</li><li>• Entonnoir</li><li>• Agitateur magnétique chauffant</li><li>• Microscope optique</li><li>• Les boites de petri</li><li>• Spatule</li><li>• Briquet</li><li>• Flacon stérile</li><li>• Balance precise</li><li>• Pince</li><li>• Aluminium</li><li>• Cotton</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• L'eau distillée</li><li>• Diluant (l'eau physiologie)</li><li>• Pomme de terre</li><li>• Glucose</li><li>• Agar</li><li>• NaCl</li><li>• Neopeptone</li><li>• Glucose</li><li>• Actidione</li><li>• Chloramphenicol</li><li>• Sulfate de magnesium</li><li>• Phosphate monopotassique</li><li>• Extrait de levure</li><li>• Peptone</li><li>• Agar</li><li>• Lait écrémé (0% MG)</li><li>• HCL</li><li>• NaOH</li></ul>