

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun–Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière : "Sciences Biologiques"

Spécialité : "Biologie Moléculaire et Cellulaire"

Présenté par :

GUÉMOUR Amina

HERGOUN Aicha

MOUMENE Boutheina

Thème

**Dosage de l'activité protéolytique des espèces de moisissures  
potentiellement productrices de mycotoxines dans les fèves  
sèches commercialisées dans la région de Tiaret**

Soutenu publiquement le : 26 / 06 / 2019

**Jury:**

**Président: Dr. MANSOURI D.**

**Grade « MCB »**

**Promoteur: Dr. YEZLI W.**

**Grade « MCB »**

**Co-promoteur: Dr. BENSALD M.O.**

**Grade « MCA »**

**Examinatrice: Dr. MOULAY M.**

**Grade « MCA »**

**Année universitaire 2018 / 2019**

## *Remerciement*

En ces quelques lignes je tiens à remercier, Dieu le tout puissant de m'avoir donné la patience et le courage pour terminer ce travail, et toutes les personnes qui m'ont apporté leurs soutien et leurs aide tout au long de ce travail et plus particulièrement :

Mon promoteur Dr. YEZLI Wassim, pour ses conseils, ses encouragements, sa patience sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.

Je souhaite remercier aussi notre Co-promoteur Dr. BENSALD MO. pour avoir accepté de diriger et corriger ce mémoire, pour sa disponibilité et son temps, pour tous ses conseils.

Nous tenons à manifester notre gratitude à Dr. MANSOURI D., d'avoir accepté de nous faire l'honneur de présider le jury.

Nos vifs remerciements s'adressent à Dr. MOULAY M., pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Notre plus grande reconnaissance s'adresse à Pr. AGGAD H., Professeur à l'université Ibn Khaldoun, Tiaret, pour tout le soutien moral et matériel fourni dans son laboratoire.

Nous adressons aussi nos remerciements aux personnes que je nomme « ressources » notre responsable de spécialité Dr. TAIBI K. et tous l'équipe de formation : Dr. BOUSSAID – Dr. ACHIR – Dr. AIT ABDELRAHIM - Dr. SASSI- Dr. ACEM - Dr. BENAÏSSA.



*Je dédicace cette mémoire à . . .*



A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes chères sœurs (Dr. Amina, Dr. Nawel, karima, Houda, Ahlem) pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral. Et à mon cher frère (Mohamed).

A toute ma famille de près et de loin pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible, Merci d'être toujours là pour moi.

A ma deuxième famille (mon fiancée) Pour tout l'encouragement, le respect et l'amour que tu m'as offert, Je te dédis ce travail, qui n'aurait pas pu être achevé sans ton éternel soutien et optimisme.

J'espère te combler et te rendre toujours heureux.

Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

**MOUMENE Boutheina**

# *Dédicace*

## *A mon très cher père*

De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme.

En témoignage de brut d'années des sacrifices, des sollicitudes, d'encouragement et de prières.

## *A ma très chère mère*

Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et de tous vos efforts.

## *A mes chers frères*

**GUMOUR Amina**

# Dédicace

*Je dédie cette mémoire*

A ma chère mère Lalia

A mon cher père Abdelkader

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir

Et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mon cher mari Abdelilah.

Ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement  
m'ont permis de réussir mes études.

A mes frères Youcef, Mokhtar et Ameer.

A mes chères sœurs Houda, Fatima, Tefaha, Khaldia, Houiria, Hadjer.

Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A ma belle-mère Fatima

Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficile.

A tous ma famille

A tous mes cher(e)s ami(e)s

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment

**HERGOUN Aicha**

# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iii
INTRODUCTION.....	3

## **CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

I.1. Généralités sur la fève ( <i>Vicia faba</i> L.).....	4
I.2. Généralités sur les moisissures.....	4
I.3. Moisissures mycotoxinogènes.....	5
I.3.1. Principales moisissures mycotoxinogènes.....	6
I.3.1.1. Genre <i>Alternaria</i> .....	6
A. Caractères cultureux généraux.....	6
B. Morphologie microscopique.....	6
I.3.1.2. Genre <i>Aspergillus</i> .....	6
A. Caractères cultureux généraux.....	7
B. Morphologie microscopique.....	7
I.3.1.3. Genre <i>Fusarium</i> .....	7
A. Caractères cultureux généraux.....	8

B. Morphologie microscopique.....	8
I.3.1.4. Genre <i>Penicillium</i> .....	8
A. Caractères culturels généraux.....	9
B. Morphologie microscopique.....	9
I.3.2. Problèmes liés aux moisissures mycotoxinogènes.....	9
I.4. Généralités sur les mycotoxines.....	10
I.4.1. Facteurs affectant la production des mycotoxines.....	11
I.4.1.1. Température.....	11
I.4.1.2. Potentiel d'Hydrogène.....	11
I.4.1.3. Activité de l'eau .....	12
I.4.1.4. Endommagement des grains.....	12
I.4.1.5. Composition du substrat.....	12
I.4.1.6. Présence d'oxygène.....	12
I.4.2. Éliminations des mycotoxines.....	13
I.5. Activité protéolytique chez les moisissures.....	13
I.5.1. Dosage de l'activité protéolytique.....	14

## **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES**

II.1. Objectif du travail .....	16
II.2. Lieu de travail.....	16
II.3. Matériel.....	16
II.3.1. Matériel végétal .....	16

II.3.2. Autres matériels.....	17
II.4. Protocole expérimental.....	18
II.4.1 Échantillonnage.....	19
II.4.2. Tri des grains.....	19
II.4.3. Isolement à partir des différents grains de fève sèche.....	19
II.4.4. Repiquage des isolats.....	20
II.4.5. Purification des isolats par culture monospore.....	20
II.4.6. Identification morphologique des moisissures.....	22
II.4.6.1. Identification macroscopique.....	22
II.4.6.2. Identification microscopique .....	22
II.4.7. Activité Protéolytique.....	22
II.4.7.1. Préparation d'extrait enzymatique.....	22
II.4.7.2. Protocole de dosage de l'activité protéolytique.....	23
II.4.7.3. Calcul et détermination des valeurs.....	24
II.4.8. Analyse statistique .....	24

### **CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

III.1 Résultats.....	26
III.1.1. Isolement et Purification d'isolat.....	26
III.1.2. Identification .....	27
III.1.3. Détermination de L'activité Protéolytique.....	29
III.1.3.1. Influence des substrats sur la croissance mycélienne .....	29

III.1.3.2. Influence des substrats sur le PH.....	30
III.1.3.3. Influence des substrats sur l'activité protéolytique.....	30
III.1.3.4. La relation entre le PH, la croissance mycélienne et l'activité protéolytique.	31
Discussion générale.....	33
Conclusion.....	36
Annexe.....	38
Références bibliographiques.....	46

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau n° 01 :</b>	Les principales mycotoxines produites par les moisissures mycotoxinogènes	11
<b>Tableau n°02 :</b>	Appareillage, verrerie et produits d'expérimentation	17
<b>Tableau n°03 :</b>	Préparation des échantillons (tests et blancs).	23
<b>Tableau n°04 :</b>	Mesurer la densité optique des échantillons (tests et blancs).	24
<b>Tableau n°05 :</b>	Pourcentage de la population fongique isolée de la fève sèche commercialisé dans la région de Tiaret	26
<b>Tableau n°06 :</b>	Observations macroscopiques et microscopiques des souches isolées des grains des fèves sèches.	27
<b>Tableau n°07 :</b>	Fréquence des genres fongique mycotoxinogènes dans les 5 régions.	28
<b>Tableau n°08 :</b>	Variation du pH en fonction de la source de carbone	29
<b>Tableau n°09 :</b>	Isolement des moisissures à partir des grains de fèves sèches	41
<b>Tableau n°10 :</b>	Etude macroscopique et microscopique des souches purifiées	42
<b>Tableau n°11 :</b>	Variation du PH, de l'activité proteomytique et de la masse fongique en fonction de la source de carbone.	45

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure n° 1 :</b>	Échantillon de grains de fève sèche	16
<b>Figure n° 2 :</b>	Schéma du protocole expérimental	18
<b>Figure n° 3 :</b>	Isolement des moisissures à partir des grains de fève sèche sur milieu PDA	20
<b>Figure n° 4 :</b>	Schéma démonstratif des étapes de purification du champignon par culture monospore	21
<b>Figure n° 5 :</b>	Moisissures isolées à partir des grains de fève sèche sur milieu PDA	26
<b>Figure n° 6 :</b>	Variation de la masse fongique en fonction de la source de carbone	30
<b>Figure n° 7 :</b>	Variation de l'activité protéolytique en fonction de la source de carbone	31
<b>Figure n° 8 :</b>	Variation de l'activité protéolytique et de la masse fongique en fonction du pH.	31
<b>Figure n° 9 :</b>	Courbe standard présentant la densité optique en fonction de l'équivalent en $\mu$ moles de tyrosine	45

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**AD:** Ain Dhab

**ATB:** Antibiotique

**FAO:** Food and Agriculture Organisation

**F-C :** Folin-Ciocalteu

**KE:** Ksar challala

**PDA:** Potato Dextrose Agar

**pH:** Potentiel d'Hydrogène

**R :** Rahouia

**SE :** Sidi hosni

**sp. :** espèce

**T :** Tiaret

**TCA :** TriChloro Acétique

**°C :** Celsius

# **Introduction**

Les légumineuses ou fabaceae présentent la troisième plus grande famille de plantes à fleurs, avec plus de 750 genres et 20.000 espèces, réparties dans le monde entier (Nasim et al. 2017). Les légumineuses sont d'importantes cultures vivrières fournissant des sources hautement nutritives de protéines et de micronutriments, qui peuvent grandement améliorer la santé et les moyens de subsistance, en particulier dans les pays en développement (Yahara et al. 2013). Les légumineuses à grains contribuent de manière significative à la production alimentaire mondiale totale et jouent un rôle fondamental dans le développement de l'agriculture moderne.

La fève (*Vicia faba* L.) est l'une des légumineuses les plus cultivées dans le monde et la principale légumineuse alimentaire cultivée en Algérie. Elle constitue une importante ressource socio-économique. Ce légume fournit non seulement une source importante de diète protéinée alimentaire, mais constitue également une bonne source pour le marché des aliments pour animaux (Zong et al. 2009; Duc et al. 2010). La fève est une espèce d'hiver qui peut être cultivée comme légume vert ou à l'état sec après la maturité des gousses.

Malgré leur bénéfice énergiques et leur forte teneur en protéines, les fèves sont propice à des contaminations par des microorganismes particulièrement les moisissures phytopathogènes (Reboux, 2006). Ces moisissures, parfois mycotoxinogènes, constituent un agent de détérioration très important et possèdent un arsenal enzymatique très varié, ce qui leur permet de croître sur divers substrats.

La contamination fongique d'un substrat ou d'un aliment provoque des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et des modifications chimiques (modification des qualités nutritives) (Gacem, 2012). La toxinogénèse d'une moisissure peut avoir lieu sur un substrat suivant certains paramètres écologiques (substrat, humidité, température), pendant la période de culture au champ, de traitements-conditionnements post récolte ou bien pendant la longue période de stockage et de transport (Le Bars et Le Bars, 2000).

La sécrétion des métabolites secondaires hautement toxiques, mycotoxines, par les champignons mycotoxinogènes au cours de leur prolifération sur les grains stockées, constitue un danger réel pour la sécurité sanitaire de l'Homme et de l'animal. (Andersen et Thrane, 1996). Ces Mycotoxines peuvent aussi être à la base d'énormes pertes économiques à l'agriculture et aux industries agroalimentaires. Mais malgré leurs pathogénécités, ces

moisissures peuvent produire des protéases extracellulaires ayant un intérêt économique sur le plan industriel.

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement, elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Ul-haq et al. 2003).

L'objectif de ce travail vise à caractériser la flore fongique potentiellement productrice de mycotoxines isolée à partir des grains de fèves sèches commercialisées dans la région de Tiaret, et l'évaluation de l'activité protéolytique de ces moisissures mycotoxinogènes.

# **Chapitre I**

## **Partie Bibliographique**

## I.1. Généralités sur la fève (*Vicia faba* L.)

La fève (*Vicia faba* L.), appartenant à la famille des Fabacées, est l'une des légumineuses les plus importantes et largement cultivée dans le monde (Hanafy et al. 2005 ; Gong et al. 2011). Produite pour la consommation humaine et pour l'alimentation animale (Duc, 1997), elle est parfois utilisée comme culture de couverture ou engrais vert.

La fève est une plante herbacée annuelle dressée et grossière, à croissance indéterminée. Elle est formée d'un appareil végétatif et d'un appareil reproducteur (Duc, 1997 ; Oualibou, 2013). Ses feuilles composées sont gris-vert, ses fleurs blanches, hermaphrodites, sont suivies de grosses gousses vertes noircissant à maturité. Ces gousses contiennent 4 à 8 graines (selon la variété). Elles sont riches en protéine, magnésium, potassium, calcium, vitamines C, B et E ainsi qu'en fibres. Les fèves sèches apportent des glucides lents, et sont cinq fois plus énergétiques que les fraîches (Katell et al. 2010).

Les graines peuvent être oblongues ou ovales, aplaties ou arrondies. La couleur des graines varie du blanc au brun rougeâtre en passant par le brun verdâtre au violet. La taille des graines varie considérablement en fonction de la variété (duc, 1997). Le mode de reproduction est partiellement allogame (Street et al. 2008).

## I.2. Généralités sur les moisissures

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons pluricellulaires microscopiques, saprophytes et parfois parasites, qui regroupent des milliers d'espèces (Azzoune, 2011). Le terme familier de « moisissures » fait généralement référence à leur texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse, qui peut être observée à divers endroits. En effet, ces champignons sont ubiquitaires et se trouvent partout dans la nature (Chabasse et al. 2002).

Ces microorganismes hétérotrophes, filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin et al. 2000), nécessitent une source de carbone et d'azote pour leur développement (Chabasse et al. 2002). Les nutriments nécessaires sont absorbés au travers de la paroi de son appareil végétatif. L'appareil végétatif est un thalle constitué par des filaments mycéliens longs, fins et ramifiés, à structure cellulaire et à croissance apicale, dénommés hyphes (Tabuc, 2007).

En fait, les moisissures produisent des structures de reproduction appelées spores ; celles-ci sont invisibles à l'œil nu. Ces spores sont issues de deux modalités de reproduction

sexuée ou asexuée. La germination des spores est à l'origine de la forme végétative (Chabasse et al. 2002).

Globalement peu exigeants sur les conditions environnementales du substrat, ces champignons peuvent contaminer les milieux les plus divers comme : les céréales, les produits d'origine animale (lait, viande), fruits, légumes, noix, matières grasses, etc. La contamination fongique d'un substrat ou d'un aliment provoque des modifications physiques (aspect, goût, odeur) et des modifications chimiques (modification des qualités nutritives). On peut distinguer deux grands types de moisissures :

- Les moisissures utiles qui présentent un intérêt considérable dans les différents domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé...) (Perry et al. 2004).
- Les moisissures nuisibles qui peuvent se développer sur différents substrats et entraîner une altération des qualités nutritionnelles et diététiques des produits. Ainsi, on estime que le développement incontrôlé de micromycètes est à l'origine de la perte de 5 à 10 % des récoltes mondiales (Filtenborg et al. 1996).

### **I.3. Moisissures mycotoxinogènes**

En se développant dans ou sur les denrées alimentaires, les moisissures mycotoxinogènes produisent un certain nombre de métabolites secondaires nocifs ayant des effets pathogènes tant chez l'Homme que chez l'animal. Ces métabolites persistent tout au long de la chaîne alimentaire du fait de leur résistance aux traitements physiques et chimiques (Zinedine, 2004).

Plus de 150 moisissures mycotoxinogènes sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Pamel et al. 2011). Parmi ces genres, seules certaines espèces et parfois, certaines souches au sein d'une espèce, sont capables d'excréter des mycotoxines (Bennett et Klich, 2003 ; Ruppol et al. 2004). Deux groupes de moisissures toxino-gènes peuvent être distingués :

- Les moisissures du champ : constituées de moisissures envahissant leur substrat et produisant la mycotoxine sur des plantes sénescents ou stressés.
- Les moisissures de stockage : ce groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après récolte et prolifèrent pendant le stockage (Miller, 1995 ; AFSSA, 2009).

### **I.3.1. Principales moisissures mycotoxinogènes**

#### **I.3.1.1. Genre *Alternaria***

Ce genre appartient à la classe des Deutéromycètes et à la famille des Pléosporacées. Les *Alternaria* sont des champignons très communs et cosmopolites. Ils peuvent se retrouver sur des substrats très variés : plantes, sols, textiles, graines (Linas et al. 1999). Ils ont des modes de vie des saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte et poste récolte (Lorgieco et al. 2009). Ce sont des champignons mésophiles, leurs activités prédominantes disparaissent lorsque la température s'élève (Botton et al. 1990).

#### **A. Caractères cultureux généraux**

Les colonies sont de croissance rapide sur milieu de Sabouraud entre 25°C et 30°C. La couleur de la colonie est blanc-gris au départ, devient rapidement foncée (vert foncé à noir) au recto comme au verso. La majorité des colonies ont un aspect duveteux ou cotonneux, le reverse de la colonie (Pusz et al. 2009 ; Rai et Kumari, 2009).

#### **B. Morphologie microscopique**

Les hyphes septés sont ramifiés et tardivement certains filaments sont pigmentés en brun. Les conidiophores sont cloisonnés, bruns, septés, simples ou ramifiés, plus au moins droits ou flexueux. Les conidies sont brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïdes, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important : ce sont des dictyospores. A maturité elles présentent à la fois des cloisons transversales, obliques ou longitudinales. Ces spores à paroi lisse ou verruqueuse et de taille importante, sont souvent disposées en chaîne. En l'absence du bec marqué, c'est la disposition en chaîne des dictyospores qui caractérise le genre d'*Alternaria* (Bessadat, 2014).

#### **I.3.1.2. Genre *Aspergillus***

Appartenant à la classe des Ascomycètes, la plupart des *Aspergillus* sont saprophytes. Ils ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, etc. Ces champignons peuvent devenir des parasites dans les mauvaises conditions de stockage (El Khoury, 2007).

Les *Aspergillus* sont capables de produire des mycotoxines toxiques à l'Homme et l'animal ; Cependant, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées en industrie pour la production des enzymes et des acides organiques (Schuster et al. 2002).

## A. Caractères culturels généraux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture nutritionnels additionnés d'antibiotiques. La majorité des *Aspergillus* poussent à une température de 22 à 25°C (Toffa, 2015).

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Morin, 1994).

## B. Morphologie microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle). Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné et ramifié portant de nombreux conidiophores dressés, qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (Badillet et al. 1987 ; Azzoune, 2004)

### I.3.1.3. Genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* est l'un des groupes les plus importants de champignons Ascomycetes. Il contient plus de 300 espèces phylogénétiquement distinctes qui occupent un large éventail de niches écologiques à travers le monde (Aoki et al. 2014). Un grand nombre de ces espèces sont des agents phytopathogènes responsables de maladies graves (fusarioses) affectant plus de cent plantes différentes (Dean et al. 2012). La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont responsables d'intoxication chez les êtres humains et les animaux d'élevage (O'Donnell et al. 2016).

## A. Caractères culturels généraux

Les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA. Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37°C. Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet. Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chabasse et al. 2002 ; Chermette et Bussieras, 1993).

## B. Morphologie microscopique

Du thalle végétatif, naissent des conidiophores courts et souvent ramifiés. Ils portent des phialides qui peuvent avoir un ou plusieurs sites de bourgeonnement pour la production des conidies. Les phialides produisent deux types de conidies :

-Micronidies: conidies uni (ou bi) cellulaires, de 4 à 8  $\mu\text{m}$  de long, allongées, ovales ou cylindriques, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticilles ou plus rarement en chaînettes.

-Macroconidies: conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Elles sont fusiformes, courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant un sort de talon plus ou moins visible (Roquebert, 1998).

### I.3.1.4. Genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des Ascomycètes. Il est saprophyte et peut devenir parasite en présence d'humidité lors du stockage (Lahouar, 2016).

*Penicillium* est un genre diversifié présent dans le monde entier. Sa principale fonction dans la nature est la décomposition des matières organiques, où les espèces provoquent des pourritures dévastatrices en tant qu'agents pathogènes avant et après récolte sur les cultures vivrières (Frisvad et Samson, 2004 ; Pitt et Hocking, 2009), ainsi que gamme de mycotoxines (Frisvad et al. 2004 ).

## A. Caractères cultureux généraux

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud, PDA...). Ils croissent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. La colonie est habituellement duveteuse, poudreuse, de couleur variable. On distingue des colonies de couleur vert-gris, vert-jaune, vert sombre, blanche et chamois. Le revers des colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture (Chermette et Bussieras 1993).

## B. Morphologie microscopique

En microscopie, les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores isolés ou groupés en faisceaux, hyalins, lisses ou granuleux, simples ou ramifiés et terminés par un pénicille (El Khoury, 2007). Les pénicilles sont constitués soit d'un simple verticille de phialides (*Penicillium* monoverticillé), d'un verticille de métules portant les phialides (*Penicillium* biverticillé) ou de plusieurs verticilles successifs comportant des ramifications, de métules et des phialides (*Penicillium* terverticillé, quadriverticillé, etc.). Les phialides donnent naissance à des conidies qui sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres. Les caractères des pénicilles servent à la distinction des groupes et des espèces (Botton et al. 1990).

### I.3.2. Problèmes liés aux moisissures mycotoxinogènes

Les moisissures mycotoxinogènes constituent un danger imminent qui tire le signal d'alarme, en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'Homme, sur la productivité animale et sur le commerce national et international. La FAO estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines produites par des champignons (FAO, 2019).

Ces moisissures représentent un risque dans le domaine de l'industrie agroalimentaire sous forme de contamination des denrées alimentaires. En effet, elles peuvent être à l'origine d'importantes dégradations des propriétés physicochimiques entraînant une altération de la qualité des denrées alimentaires. Le premier type d'altération de la qualité des aliments concerne la qualité dite « marchande ». Cette altération entraîne des modifications défavorables des caractéristiques diététiques et organoleptiques, tel l'aspect, la texture,

l'odeur et la saveur des aliments, avec des conséquences économiques importantes dans l'industrie agroalimentaire. Le deuxième type d'altération de la qualité des aliments concerne la qualité dite « sanitaire ». La prolifération des moisissures pathogènes entraîne une diminution de l'innocuité des aliments et représentent un risque pour la santé du consommateur (Lecellier, 2013).

Les effets des mycotoxines sur la santé humaine et animale sont variés : effets cancérogènes, mutagènes, tératogène immunosuppresseurs, œstrogéniques, nécrosants, neurotoxiques, néphrotoxique (Untermann, 1998 ; Gelderblom et al. 2002 ; Wangikar et al. 2005).

#### **I.4. Généralités sur les mycotoxines**

Le terme mycotoxine vient du grec *mycos*, signifiant champignon et du latin *toxicum* signifiant poison (Steyn, 1995). Les mycotoxines sont des molécules capables, à de faibles concentrations, d'induire un effet toxique en pénétrant par des orifices naturels «bouche, système respiratoire, peau». Ce sont des métabolites secondaires produits à la fin de la phase stationnaires et phase de déclin (Reboux, 2006). Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (Ruppel et al. 2004).

Il existe environ 300 à 400 mycotoxines (Pamel et al. 2010). Les céréales, les fruits secs, les grains oléagineuses, les légumineuses, les grains de café et les noix sont des produits agricoles bruts très sensibles à l'infestation par les mycètes avant, pendant ou après la récolte et donc souvent contaminés par les mycotoxines (D'Mello et McDonald, 1997 ; Keith et al. 1998)

Une même espèce fongique peut produire plusieurs sortes de mycotoxines selon les conditions de culture et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes (Steyn, 1995).

Les principales mycotoxines produites par les moisissures mycotoxinogènes sont représentées sur le tableau 1.

**Tableau n° 1** : les principales mycotoxines produites par les moisissures mycotoxinogènes (Nguyen, 2007).

<b>Moisissures</b>	<b>Mycotoxines</b>
<i>Alternaria</i>	<i>Alternariol, Acide ténuazonique</i>
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxine, Acide cyclopiazonique, Citrinine, Ochratoxines A, Patuline, Stérigmatocystine.
<i>Fusarium</i>	Fumonisines, Trichotécènes, Zéaralénones, Fusarine C, Moniliformine
<i>Penicillium</i>	Ochratoxines A, Citrinine, Patuline, Acide cyclopiazonique, Acide pénicillique, la roquefortine C.

#### **I.4.1. Facteurs affectant la production des mycotoxines.**

La production de mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse (Moreau, 1994).

##### **I.4.1.1. Température**

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C. Quelques espèces sont thermo-tolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au-dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environs de 20 à 25°C. D'autres sont des psychrophiles ou psychro-tolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C). (Dendouga, 2006 ; Nyamwaka, 2009 ; Bouras, 2016 ; Yezli, 2017).

La température permettant une toxigénèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance. Par ailleurs, les mycotoxines peuvent être élaborées à des températures généralement inférieures à celle de la croissance (Samson et al. 2004).

### **I.4.1.2. Potentiel d'Hydrogène**

Le pH du milieu est un facteur important pour la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La plupart des moisissures croissent dans des pH acides et peuvent tolérer des valeurs de pH très basses. La gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique (Tabuc, 2007).

### **I.4.1.3. Activité de l'eau**

Quelle que soit la nature de l'aliment, aucun micro-organisme ne peut se développer à une  $A_w$  inférieure à 0.65. Il s'agit d'un paramètre dont l'influence est déterminante sur le développement des moisissures ainsi que sur la production de mycotoxines (Belli et al 2004). L'activité hydrique nécessaire à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Lahouar, 2016).

### **I.4.1.4. Endommagement des grains**

Les grains cassés, fissurés ou altérés par les insectes et les acariens constituent des foyers favorables pour le développement des moisissures qui, après leur envahissement libèrent les toxines (Zinedine, 2004 ; Bouras, 2016).

### **I.4.1.5. Composition du substrat**

La toxinogénèse dépend beaucoup plus étroitement de la denrée sur laquelle les moisissures se développent. La composition qualitative et quantitative des substances nutritives et la présence de certaines molécules dans le substrat peut influencer la production des mycotoxines. En effet, un taux élevé de sucres et/ou de lipides est favorable à la toxinogénèse (Bouras, 2016).

### **I.4.1.6. Présence d'oxygène**

Les moisissures sont des organismes aérobies qui ont donc besoins d'oxygène pour effectuer une croissance normale (Dendouga, 2006 ; Nyamwaka, 2009). La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en  $CO_2$  a un effet dépresseur important sur la toxinogénèse (Mahideb et Merrouche, 2015).

### **I.4.2. Éliminations des mycotoxines**

Comme la présence des moisissures dans les récoltes est un phénomène naturel, il serait impossible d'éliminer toute trace de mycotoxines des produits alimentaires. Cependant il est possible de minimiser la contamination (Huwig et al .2001). Un système de lutte intégré contre les mycotoxines doit se concevoir à trois niveaux de production:

- Lutte avant récolte : la prévention aux champs consiste en l'utilisation raisonnée d'insecticides et ce dans le but de diminuer les lésions des plantes et réduire l'envahissement par les moisissures ou l'utilisation de fongistatiques inhibant la croissance des moisissures et empêchant la toxinogénèse.
- Lutte au moment de la récolte : la période et le mode de récolte (manuelle ou mécanique) ont une grande influence sur la production des mycotoxines. Pendant cette période, deux facteurs sont à contrôler : le lavage et le séchage.
- Lutte et décontamination après récolte (durant le stockage) : les procédés de décontamination doivent être efficaces sans rendre impropres à la consommation les denrées traitées, elles doivent être simples à mettre en œuvre et peu coûteux puisque le traitement peut concerner des tonnages importants (Jouany, 2007).

### **I.5. L'activité protéolytique chez les moisissures**

Les champignons ont été largement utilisés en tant que producteurs de différentes substances ayant des intérêts économiques, tels que des enzymes, antibiotiques, vitamines, acides aminés et des stéroïdes (Abidi et al. 2008 ; Yezli, 2010).

Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues. Actuellement, elles sont de plus en plus utilisées en boulangerie, dans l'industrie alimentaire humaine et animale, dans les détergents pour lessives, dans l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique (Ul-haq et al. 2003 ; Dendouga, 2006).

La mise en évidence de l'activité protéolytique chez divers microorganismes nécessite un milieu de culture protéiné, où les protéines jouent le rôle d'une source azotée et même d'une source de carbone. Les différentes protéases peuvent présenter une spécificité vis-à-vis

de certaines protéines natives ou dénaturées telles que l'albumine, la caséine, la globuline, l'élastine, l'insuline, etc. La source d'azote dans les milieux de culture affecte à la fois la croissance et la production de protéases extracellulaires (Dendouga, 2006).

La production de protéases dépend aussi des facteurs physiques comme la température, le pH, le temps d'incubation, l'agitation et la densité de l'inoculum (Abidi et al. 2008 ; Yezli, 2010).

### **I.5.1. Dosage de l'activité protéolytique**

Le protocole utilisé est celui décrit par Cupp-Enyard (2008) et Yezli et al. (2015). Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et des polypeptides pour les transformer en fragments protéiques, en peptides simples et en acides aminés libres. Lorsque la caséine est digérée par la protéase, la tyrosine, un acide aminé, est libérée avec d'autres acides aminés et fragments peptidiques. La précipitation par le TCA permet de récupérer les fragments solubles dans le filtrat.

La présence des groupements tyrosine dans le filtrat est traduite en activité protéolytique (exprimé par heure d'hydrolyse et par ml de milieu) par un dosage colorimétrique à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Celui-ci réagit avec ces groupements pour produire un chromophore de couleur bleue, quantifiable et mesuré en tant que valeur d'absorbance sur le spectrophotomètre.

Les valeurs d'absorbance générées sont comparées à une courbe standard générée en faisant réagir des quantités connues de tyrosine avec le réactif F-C afin de corréliser les variations d'absorbance avec la quantité de tyrosine en micromoles. À partir de la courbe standard, l'activité des échantillons de protéases peut être déterminée en unités, ce qui correspond à la quantité en micromoles d'équivalentes tyrosines libérées par minute par la caséine.

# **Chapitre II**

## **Matériel et Méthodes**

## II.1. Objectif du travail

Le présent travail porte sur le dosage de l'activité protéolytique des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans les fèves sèches commercialisées dans la région de Tiaret.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est inscrit dans les axes suivants :

- Isolement et identification des différentes moisissures mycotoxinogènes à partir des grains des fèves sèches commercialisées dans la région de Tiaret.
- Dosage de l'activité protéolytique de ces moisissures pour mettre en relation les dommages liés à la dégradation de la paroi végétale aux sécrétions enzymatiques fongiques d'une part, et pour leur intérêt en industrie d'une autre part.

## II.2. Lieu de travail

Ce travail a été réalisé durant la période du 11 février jusqu'au 07 mai 2019 au niveau de l'Institut des Sciences Agricoles (ITMA) et au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université Ibn khaldoun-Tiaret).

## II.3. Matériel

### II.3.1. Matériel végétal

L'étude porte sur cinq (5) échantillons de fève sèche (Figure n°1) commercialisés dans différentes communes de la wilaya de Tiaret qui sont destinés pour l'alimentation humaine.



**Figure n° 1 :** Échantillon de grains de fève sèche

### II.3.2. Autres matériels

L'appareillage, la verrerie et les produits utilisés dans cette étude sont représentés sur le Tableau n° 2.

**Tableau n° 2 : Appareillage, verrerie et produits d'expérimentation.**

Appareillages	Verreries	produits	Milieux de culture	Autres
-Autoclave « <b>WOLFWESKZEUG VORRICHLUGSUN 7340 GEILINGEN</b> » -Agitateur magnétique « <b>IKAMAG AH</b> » - Bain marie « <b>MEMMERT</b> » - Balance analytique « <b>KERN 440-45N</b> » - Incubateur « <b>MEMMERT 854 SCHWABACH W-GERMANY</b> » - Four Pasteur « <b>HERAEUS</b> » - Microscope optique « <b>OPTIKA</b> » - pH mètre -Vortex « <b>TECHNO KARTELL</b> »	- Bêchers - Boites de Pétri - Éprouvettes - Erlenmeyers - Flacons - Lames - Pipettes Pasteur -Tubes à essai	-Alcool -Antibiotique (Céfazoline) -Bleu de méthylène -Eau distillée stérile -Hypochlorite de sodium (Eau de Javel 13°) -Réactif de l'acide TriChloro Acétique (TCA) 110 mM. - Solution caséine 1 % - Réactif de Folin et Ciocalteu (F-C). - Solution carbonate de sodium 500 mM - Solution de L-Tyrosine 1,1 mM.	- Agar 2% -Czapeck-Dox-caséine liquide. - Czapeck-Dox-glucose liquide - PDA	- Bec Bunsen - Ance de platine - Barreau magnétique - Pissettes

#### II.4. Protocole expérimental

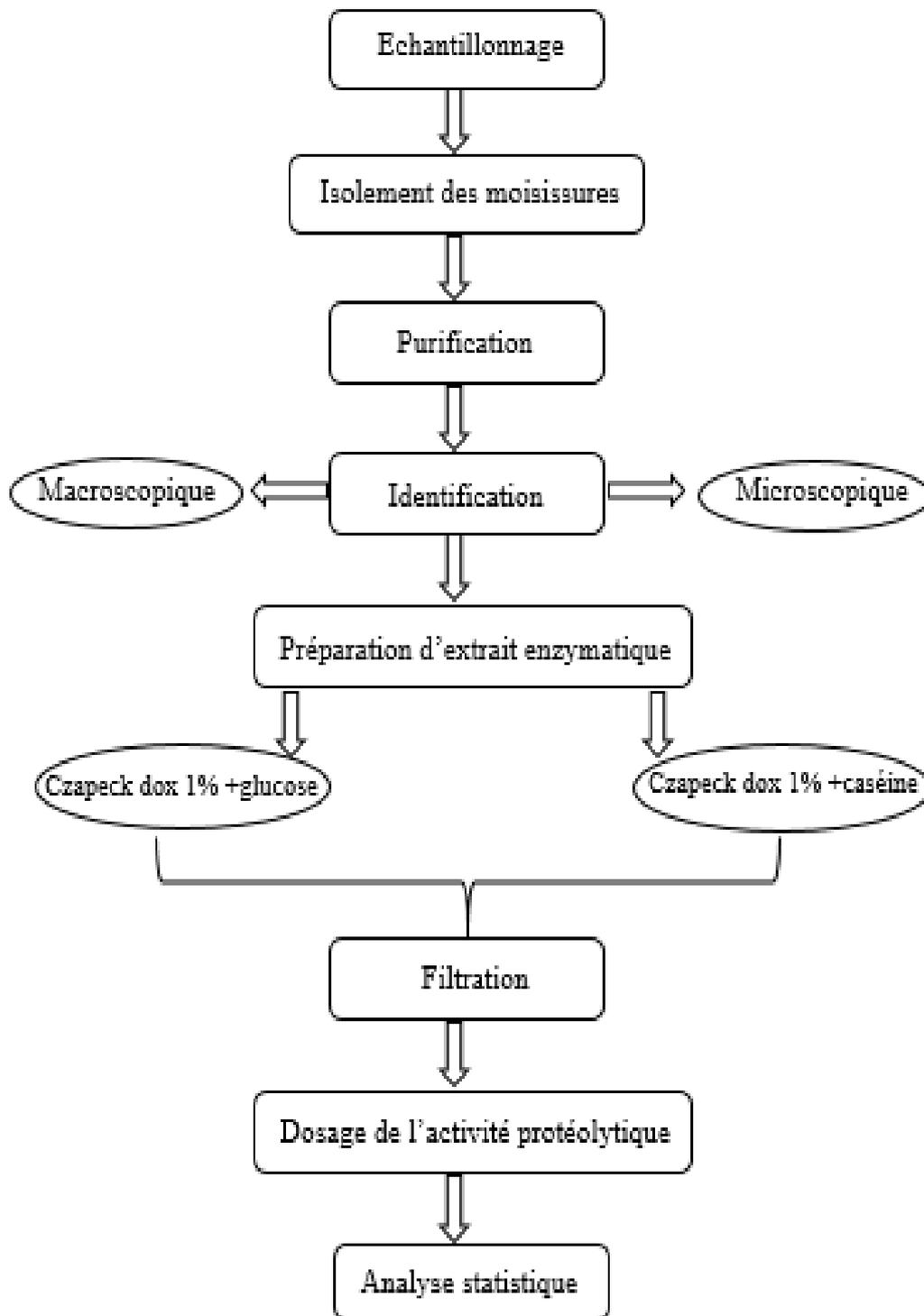


Figure n° 2 : Schéma du protocole expérimental.

### II.4.1 Échantillonnage

Pour rappel, cinq échantillons de fève sèche commercialisés ont été prélevés de façon aléatoire sans emballage adéquat. Les cinq régions à partir desquelles l'échantillonnage a été réalisé sont : Ain Dhab, Ksar Shellala, Rahouia, Sidi Hosni et Tiaret (centre).

L'échantillonnage a été effectué de telle sorte que les échantillons prélevés soient de différentes origines, et ce dans le but d'avoir une hétérogénéité des prélèvements.

### II.4.2. Tri des grains

Pour chaque échantillon, une séparation préalable des grains supposés contaminés et des grains supposés sains a été réalisée. La séparation s'effectue en se basant sur les critères suivants :

- Couleur des grains.
- État des grains (cicatrice, blessure...).

Tout changement d'état, de couleur, ou d'aspect général de grain permet de suspecter la contamination de cette dernière (Botton et al. 1990).

### II.4.3. Isolement des moisissures à partir des différents grains de fève sèche

La technique d'isolement utilisée est celle décrite par Davet et Rouxel (1997) avec quelques modifications. Nous avons prélevé 08 grains à partir de chaque échantillon. Dans des conditions aseptiques, la surface de ces grains est directement désinfectée avec l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) 12° dilué à 30 % pendant trois minutes, pour éliminer les bactéries. Ensuite, les grains de fève ont été rincés trois fois avec de l'eau distillée stérilisée pour éliminer les traces de l'eau de javel.

Après rinçage, 02 grains ont été placés avec une pince sur le milieu de culture PDA (Annexe n° 1) additionné d'un ATB en trois répétitions. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C pendant 3 à 7 jours. Durant cette période, un suivi quotidien a été effectué (Figure n° 3).



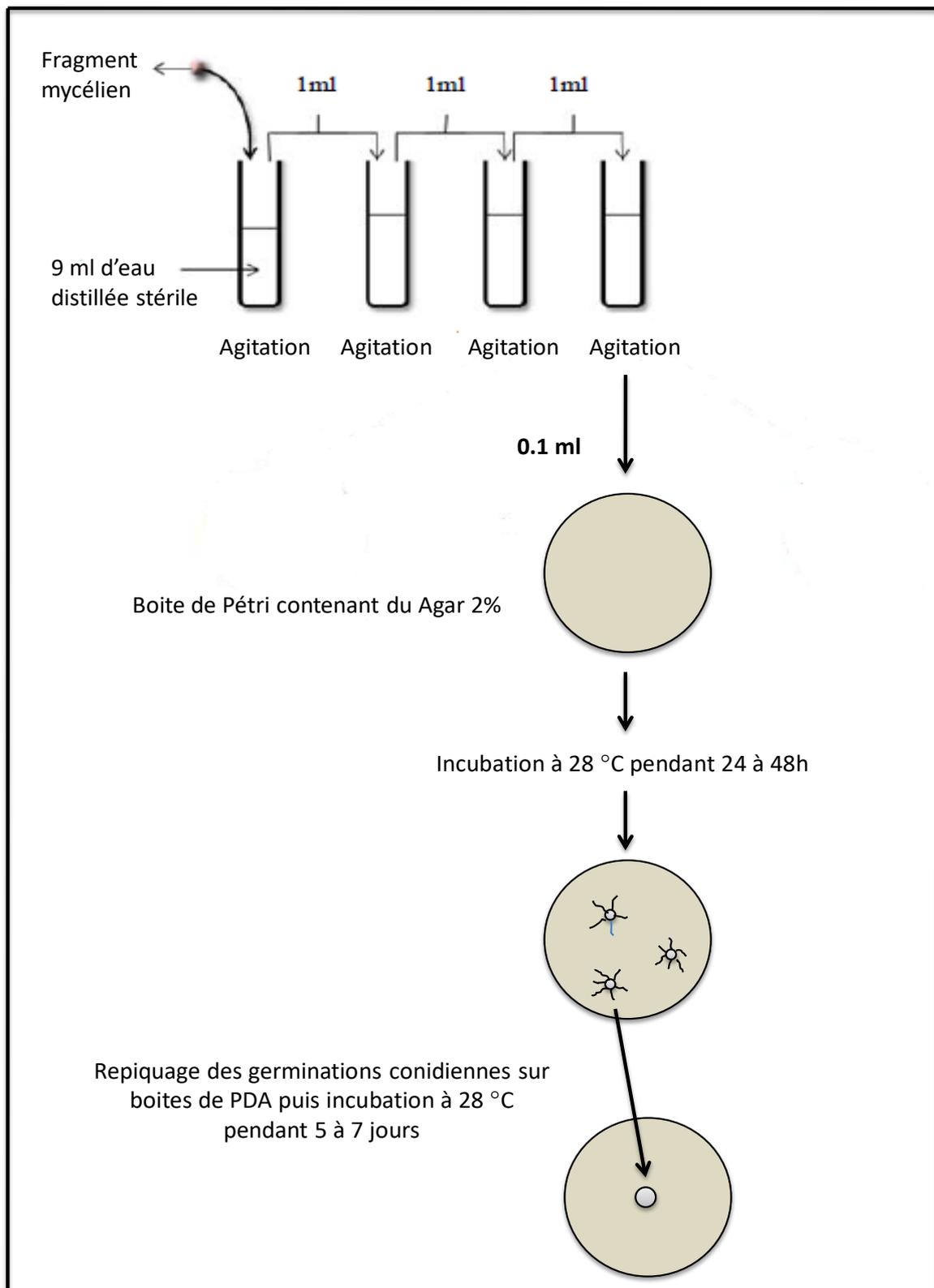
**Figure n° 3 :** Isolement des moisissures à partir des grains de fève sèche sur milieu PDA.

#### **II.4.4. Repiquage des isolats**

Après incubation à 28°C, des observations quotidiennes ont été effectuées au cours des trois premiers jours. Chaque mycélium développé a été repiqué, à l'aide d'une anse de platine stérile, quatre spots étaient inoculés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, puis incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours.

#### **II.4.5. Purification des isolats par culture monospore**

La technique de la culture monospore (Figure n° 4) permet d'obtenir une culture génétiquement homogène à partir d'une seule spore fongique. La purification a été faite selon la méthode de Henni et al. (1994) avec quelques modifications. Dans cette technique, un fragment mycélien, que nous avons prélevé à partir de la périphérie de la colonie fongique, a été introduit dans 9 ml d'eau distillée stérilisée. Après une agitation au vortex, des dilutions au dixième ont été effectuées à fin de décharger le nombre de conidies/ml. A partir de la dernière dilution ( $10^{-3}$ ), Un volume de 0.1 ml de la suspension a été déposé et étalé sur la surface du milieu Agar 2 % (Annexe n° 1) en boîte de Pétri. Après 24h à 48h d'incubation à 28 °C, sous loupe binoculaire, les spores en germination ont été repérées et délimitées. A l'aide d'une pipette Pasteur, les germinations conidiennes ont été prélevées, sous forme de disque, et déposées à l'envers au centre de différentes boîtes de Pétri contenant le milieu PDA + ATB. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours.



**Figure n°4 :** Schéma démonstratif des étapes de purification du champignon par culture monospore.

## **II.4.6. Identification morphologique des moisissures**

### **II.4.6.1. Identification macroscopique**

Pour procéder à l'identification macroscopique des champignons purifiés, on a suivi la méthode décrite par (Nelson et al. 1981 ; Booth, 1984). L'identification macroscopique se base sur des observations à l'œil nu des caractères culturaux qui sont : la vitesse de croissance, la pigmentation de la face et de l'envers des colonies, le contour des colonies et l'aspect du mycélium.

### **II.4.6.2. Identification microscopique par la technique de drapeau**

Toutes les moisissures isolées ont été soumises à une identification morphologique réalisée par une étude microscopique. Les caractères microscopiques ont été identifiés par la technique du drapeau décrite par Guezlane-Tebibel et al. (2011), qui permet d'examiner directement une culture mycélienne sur une lame et qui pourra être conservée par la suite. Ainsi, nous avons placé délicatement une empreinte fongique prélevée à l'aide d'un ruban adhésif sur une lame contenant une goutte de bleu de méthylène. Par la suite, nous sommes passés directement à l'observation par microscope optique aux grossissements (Gr 100 et Gr 400).

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,...) et des spores (Botton et al.1990).

## **II.4.7. L'activité Protéolytique**

L'activité protéolytique de l'isolat est dosée selon la méthode décrite par Yezli et al. (2015).

### **II.4.7.1. Préparation d'extrait enzymatique**

Dans cette étape, nous avons utilisé deux substrats organiques appartenant à des groupes chimiquement différents (glucose et caséine) à fin de comparer leurs influences sur la croissance mycélienne.

Le glucose et la caséine ont été utilisés séparément et comme seule source de carbone à 1% dans un milieu minéral (milieu Czapeck-Dox liquide) contenu dans des Erlenmeyers à raison de 50 ml, afin d'obtenir deux milieux de culture: Czapeck-Dox glucose 1 % et

Czapeck-Dox caséine 1 % (Annexe n°1) préparés et stérilisés avec un pH initial de 7.2. Les deux milieux ont été inoculés avec trois disques mycéliens de 6 mm de diamètre de l'isolat choisi (*Penicillium* sp.) dans chaque Erlenmeyer et ont été incubés à 28°C sous agitation continue pendant dix jours. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque substrat, dans le but d'évaluer l'évolution de la croissance mycélienne.

Après 10 jours, et suite à une filtration avec des compresses stériles, la biomasse et le pH des filtrats (solution enzymatique) ont été mesurés.

#### II.4.7.2. Protocole de l'activité protéolytique

Afin de procéder au dosage des protéases, nous avons préparé, dans des tubes à essais, des échantillons (tests et blancs) correspondants au filtrat enzymatique, pour lire les densités optiques à 660nm. La préparation des tests et du blanc est réalisée comme suit :

**Tableau n°3** : Préparation des échantillons (tests et blancs). ( / ) : l'absence

	<b>Test</b>	<b>Blanc</b>
Solution de caséine à 0.65 %	05ml	05ml
On équilibre à 37°C, puis on ajoute		
Solution enzymatique	01ml	/
On mélange bien et on incube à 37°C pendant 10 minutes puis on ajoute		
Le réactif TCA à 110Mm	05ml	05ml
Solution enzymatique	/	01ml

Après agitation et incubation à 37°C pendant 30 minutes, une filtration est réalisée à l'aide d'un filtre 0.45µm et les filtrats sont utilisés dans la mesure de la densité optique.

Après la préparation des filtrats, on procède à la mesure de la densité optique comme suite :

**Tableau n° 4** : Mesurer la densité optique des échantillons (tests et blancs). ( / ) : l'absence

	<b>Test</b>	<b>Blanc</b>
Filtrat du test	2 ml	/
Filtrat du blanc	/	2 ml
500 Mm Solution Sodium de Carbonate	5 ml	5 ml
Réactif F-C	1 ml	1 ml

On mélange bien et on incube à 37°C pendant 30 minutes ; après refroidissement des tubes à la température ambiante du laboratoire, une filtration est réalisée immédiatement avant la lecture à l'aide d'un filtre 0,45µm.

En fin, on lit les densités optiques des tests et des blancs à 660 nm et on calcule les densités optiques des échantillons comme suite : selon la formule suivante :

$$\Delta A_{660\text{nm}} \text{ Échantillon} = A_{660\text{nm}} \text{ Échantillon d'essai} - A_{660\text{nm}} \text{ Échantillon à blanc.}$$

#### II.4.7.3. Calcul et détermination des valeurs

Après, on détermine les valeurs en µmole de Tyrosine équivalent en extrapolant les densités optiques des échantillons sur la courbe standard l'aide de l'équation de la ligne droite standard ( $Y = aX + b$ ) en remplaçant le « Y » par les  $\Delta A_{660\text{nm}}$  Echantillons pour obtenir les valeurs en µmole de Tyrosine (X).

Pour obtenir l'activité de l'enzyme en unités par ml, nous avons effectué le calcul suivant:

$$\text{Unités/ml d'enzyme} = \frac{(\mu\text{mole de Tyrosine équivalent}) \times (V_t)}{(V_e) \times (V_c) \times (T)}$$

Vt : volume total de l'analyse (millilitres).

T : temps total de l'analyse (minutes).

$V_e$  : volume de la solution enzymatique utilisée (millilitres).

$V_c$  : volume utilisé pour la colorimétrie.

#### **II.4.8. Analyse statistique (ANOVA)**

L'analyse statistique des résultats expérimentaux et la représentation graphique ont été effectuées par le logiciel : Microsoft Office Excel 2010 et Origin 8. Pour étudier la signifiante de nos résultats expérimentaux, nous avons utilisé l'analyse de la variance (ANOVA). Dans ce contexte, le seuil de signification considéré est de 5 % ( $P < 0.05$ ).

# **Chapitre III**

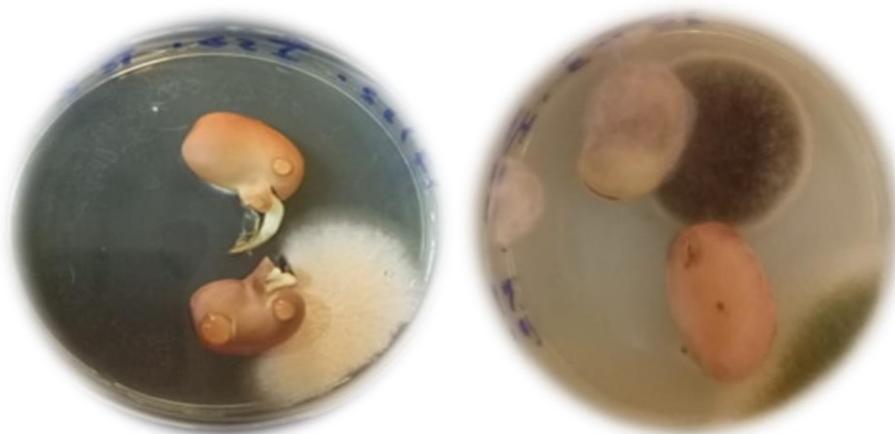
## **Résultats et Discussion**

### III.1 Résultats

#### III.1.1. Isolement et purification des moisissures

Après 7 jours d'incubation à 28°C, la croissance de différents aspects fongique au tour des grains de fève sèche a été observée (Figure n° 5) dans les 5 régions citées précédemment. L'estimation des pourcentages des échantillons contaminés par rapport à chaque région est illustrée dans le Tableau n° 3.

L'étude de la contamination révèle un taux de contamination très élevée de 75% des échantillons contaminés sur une population de 100% qui proviennent de la région de Rahouia. Par contre, une contamination relativement basse de 50% provient des régions de Ksar chellala et Tiaret. Le plus faible taux de contamination de 37.5% est relevé des régions de :Ain Dhab et Sidi Hosni.



**Figure n° 5 :** Moisissures isolées à partir des grains de fève sèche sur milieu PDA

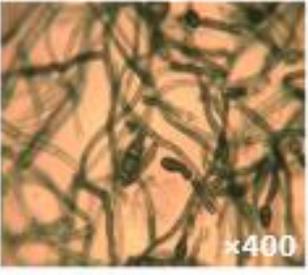
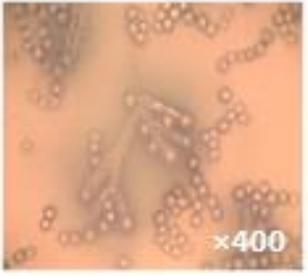
**Tableau n° 5 :** Pourcentage de la population fongique hétérogène isolée de la fève sèche commercialisée dans chaque région de Tiaret.

Région	Pourcentage de la population fongique
Ain Dhab	37.5%
Ksar chellala	50%
Rahouia	75%
Sidi Hosni	37.5 %
Tiaret (centre)	50 %

### III.1.2. Identification

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les principaux genres identifiés dans les échantillons analysés correspondent aux espèces : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* et *Penicillium*. Les observations macroscopiques et microscopiques sont illustrées dans le tableau suivant.

**Tableau n° 6 :** Observations macroscopiques et microscopiques des souches isolées des grains des fèves sèches

Genre	Observation macroscopique	Observation microscopique
<i>Aspergillus</i>		 ×400
<i>Alternaria</i>		 ×400
<i>Fusarium</i>		 ×400
<i>Penicillium</i>		 ×400

Les résultats obtenus montrent une nette dominance du genre *Aspergillus* dans les régions Ain Dhab et Ksar Echellala avec une fréquence de 100%. Par contre, le genre *Alternaria* est dominant dans la région Sidi El Hocni avec une fréquence de 100% et représente un taux de contamination de 33% dans la région Rahouia. Le taux de *Penicillium* dans les grains de Tiaret et Rahouia est de 75% et 67%, respectivement. Le genre le moins dominant est *Fusarium*, avec un pourcentage de 25% dans la région Tiaret.

**Tableau n°7 : Fréquence des genres fongiques mycotoxinogènes dans les 5 régions**

Région	Genre	Pourcentage
Ain Dhab	<i>Aspergillus</i>	100%
Ksar chellala	<i>Aspergillus</i>	100%
Rahouia	<i>Alternaria</i>	33%
	<i>Penicillium</i>	67%
Sidi Hosni	<i>Alternaria</i>	100%
Tiaret	<i>Fusarium</i>	25%
	<i>Penicillium</i>	75%

### III.1.3. Détermination de l'activité protéolytique

Dans cette étude, nous avons utilisé deux substrats différents : le glucose et la caséine.

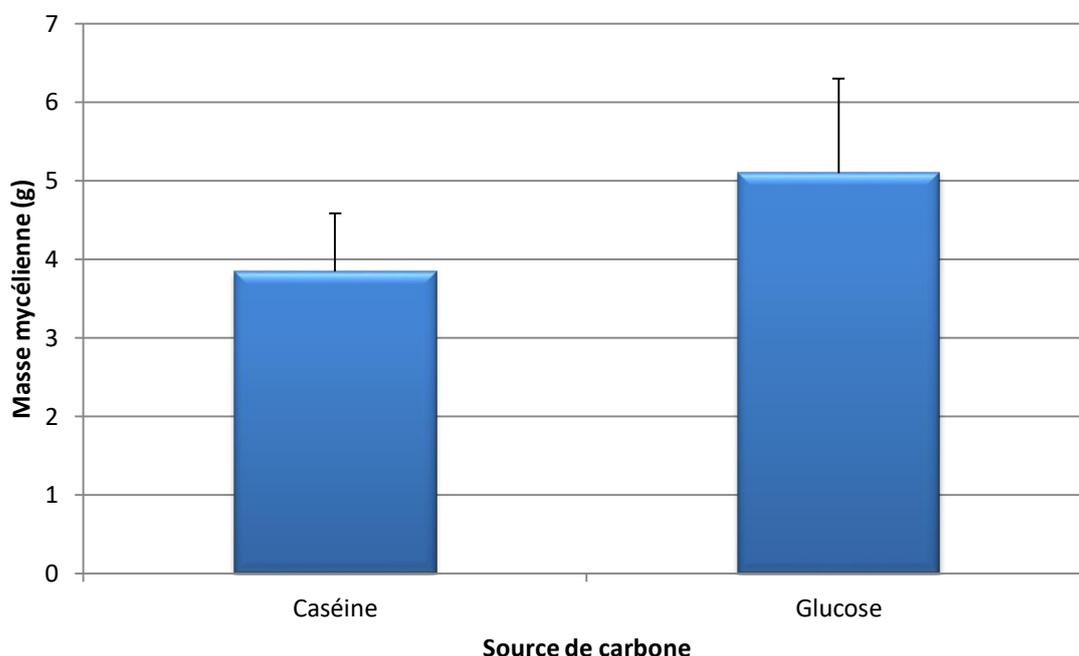
#### III.1.3.1. Influence des substrats sur la croissance mycélienne

Des extraits enzymatiques ont été préparés en utilisant des différentes sources de carbone. Après 10 jours d'incubation, et suite à une filtration, le rendement de la biomasse mycélienne a été pesé.

Les résultats illustrés sur la Figure n° 6 représentent l'influence des deux substrats (caséine et glucose) sur la croissance du mycélium.

On remarque que la croissance mycélienne sur le substrat de la caséine est faible avec une masse mycélienne de 3.8g par rapport à la croissance sur un substrat du glucose (5.1 g).

L'étude statistique a confirmé que l'influence de la source de carbone sur la masse mycélienne n'est pas significative ( $P > 0.05$ ).



**Figure n° 6 :** Variation de la masse fongique en fonction de la source de carbone.

### III.1.3.2. Influence des substrats sur le pH

Après la filtration, les pH des filtrats (extraits enzymatiques) ont été mesurés et notés sur le Tableau n° 6.

Les résultats de la filtration ont montré que le pH initial (7.2) du milieu utilisé a tendu vers un pH neutre (7) pour le substrat de la caséine et vers un pH basique (4) pour le substrat du glucose.

**Tableau n° 8 :** Variation du pH en fonction de la source de carbone.

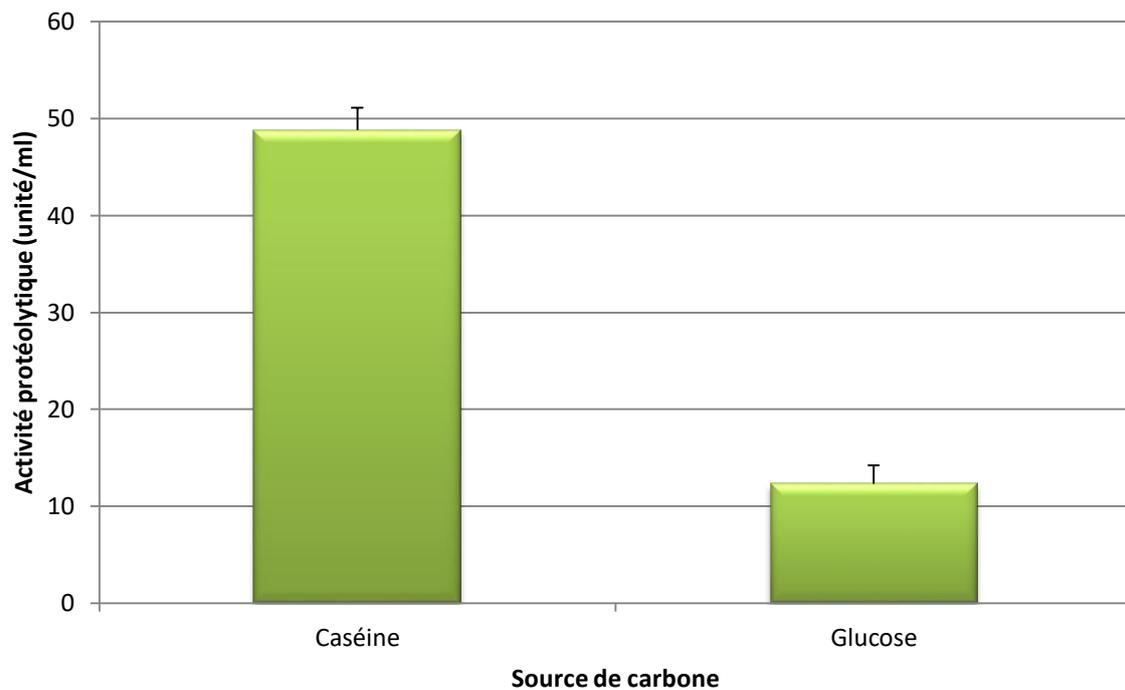
	Caséine	Glucose
<b>pH initial</b>	7,20	7,20
<b>pH obtenu</b>	7,00	4,00

### III.1.3.3. Influence des substrats sur l'activité protéolytique

Les résultats du dosage de l'activité protéolytique sont mentionnés sur la Figure n° 7.

D'après ces résultats, on trouve que l'utilisation de la caséine donne une activité protéolytique significativement importante avec une valeur de 48.8 unité/ml par rapport au glucose qui donne une faible activité protéolytique avec une valeur de 12.3 unité/ml.

L'étude statistique a confirmé que l'influence de la source de carbone sur l'activité protéolytique est significativement importante ( $P < 0.05$ ).

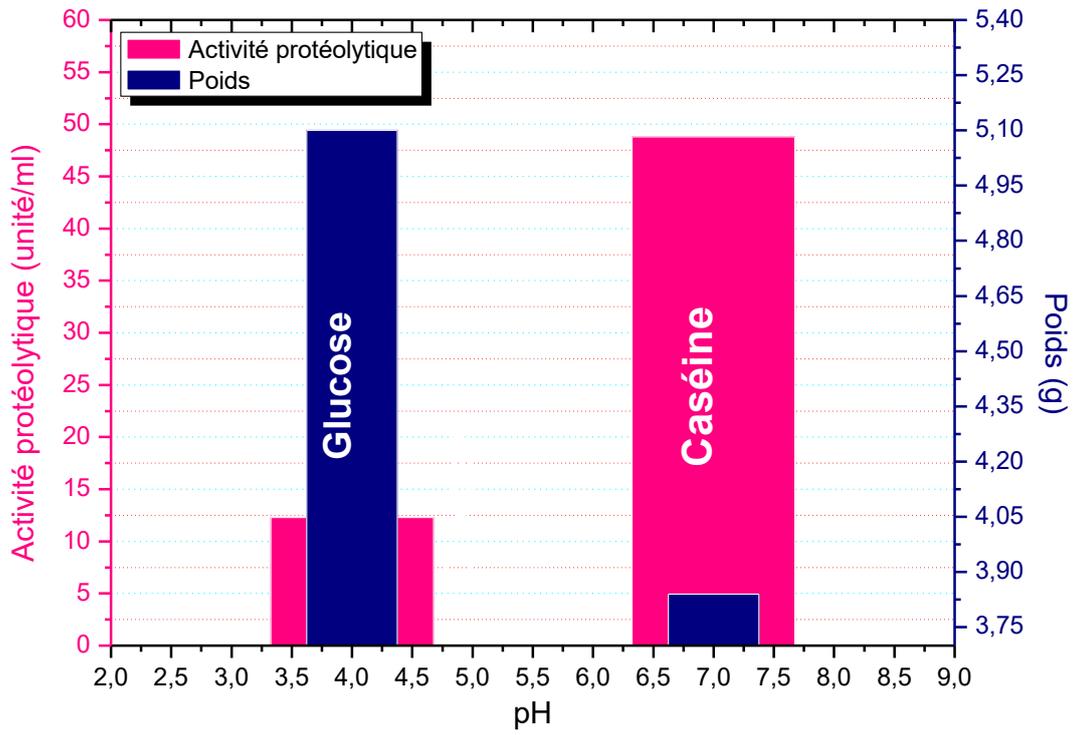


**Figure n° 7:** Variation de l'activité protéolytique en fonction de la source de carbone.

#### III.1.3.4. Variation de l'activité protéolytique et de la masse fongique en fonction du pH

Le pH initial de notre étude était 7.2. Dans le cas de la caséine, pour un pH 7, le poids du mycélium est 3.8g et l'activité protéolytique est 48.8 unité/ml. En revanche, avec le glucose, pour un pH 4, le poids mycéliens est 5.1 g et l'activité protéolytique est 12.3 unité/ml.

Par conséquent, on remarque que, lorsque le pH diminue, l'activité protéolytique diminue et la croissance mycélienne augmente.



**Figure n° 8 :** Variation de l'activité protéolytique et de la masse fongique en fonction du pH.

## Discussion générale

Cette étude a eu pour objectif l'isolement et l'identification des moisissures mycotoxinogènes à partir des fèves sèches commercialisées dans la région de Tiaret, et le dosage de l'activité protéolytique de l'une d'entre eux.

Nos résultats montrent que douze (12) souches ont été isolées et purifiées, dont onze (11) souches, ont été qualifiées comme étant des espèces productrices des mycotoxines. D'après ces résultats, nous avons constaté que les grains des fèves sèches sont fortement contaminés par les moisissures mycotoxinogènes.

L'identification phénotypique indique que ces onze (11) souches appartiennent aux genres : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* et *Penicillium*. L'observation de la pigmentation et le morphotype de la colonie, sur le milieu PDA, ainsi que les structures micromorphologiques permettent généralement de faire la distinction entre ces genres. (Botton et al. 1990).

L'étude macroscopique montre qu'*Alternaria* se caractérise par un morphotype duveteux à laineux. La pigmentation de la colonie varie du clair au foncé, à une teinte olivâtre verdâtre à brune ou grisâtre. Au microscope, *Alternaria* se présente sous la forme de longs filaments mycéliens (hyphes) cloisonnés. Les conidies, divisées par des cloisons transversales et/ou longitudinal, portent souvent à leur extrémité un bec conique à cylindrique, brun et court. Les conidiophores sont simples, lisses, parfois ramifiées, courts ou allongés. Ces observations sont en accord avec ceux de Bessadat (2014).

Les résultats de la caractérisation morphologique permettent de faire ressortir deux morphotypes différents pour le genre *Aspergillus*, la surface des colonies est souvent granuleuse ou poudreuse, d'une pigmentation variable : vert-gris, vert-noir. L'aspect microscopique montre la présence d'un mycélium cellulaire (cloisonné), tête aspergillaire avec conidiophore lisse et des phialides (Raper et Fennell, 1965 ; Ottaviani et al. 1988 ; Cahagnier et al. 1998 ; Guiraud, 1998 ; Botton et al. 1999 et Jernejc, 2001).

Les résultats obtenus sur le genre *Penicillium* permettent de démontrer quelques colonies, avec une surface duveteuse ou poudreuse, qui ont une pigmentation verte foncée à grise. Les observations microscopiques montrent la présence des hyphes septés et hyalins. L'organe fructifère a une organisation en pinceau, des phialides en forme de verticilles sur des conidiophores simples ou ramifiés en branche. Ces observations sont confirmées par les études de Chermette et Bussieras (1993) et Chabasse et al. (2002).

L'observation macroscopique et microscopique de la souche montre que les souches appartenant au genre *Fusarium* sont caractérisé par : des colonies avec une surface duveteuse ou cotonneuse de pigmentation blanche, avec présence d'un mycélium cloisonné, des macroconidies, des microconidies et des stromas globuleux. Ces résultats sont en concordance avec ceux décrits par Yezli (2017) dans son étude sur la biodiversité et l'écologie de *Fusarium*.

Le genre de moisissure contaminant les grains de fèves sèches varie d'une région à une autre. La différence entre la dominance des genres dans les cinq (5) régions est vraisemblablement liée aux conditions du développement des moisissures et du stockage des grains de ces régions.

Afin d'obtenir une production maximale de protéases, il est également important de fournir aux microorganismes une source de carbone adéquates, car les sources assimilables sont indispensable (Drouin, 2005).

L'étude de la croissance en fonction de la source de carbone montre que notre souche est capable de dégrader une variété de sources et présente une croissance importante sur le glucose par rapport à la caséine, car éventuellement, le glucose qu'est consommé directement par le champignon, est utilisé plus rapidement que n'importe autre source de carbone (Meunier, 1999). D'après Awad (2005), les substrats rapidement métabolisés peuvent souvent réaliser des taux de croissance cellulaire maximale.

Quant au pH, les résultats montre une propension du pH initial (7.2) vers un pH neutre à acide. Notre isolat produit donc au moins deux protéases, l'une ayant un pH optimum de 4 et l'autre un pH optimum de 7. Les résultats obtenus se rapprochent de ceux rapportés par Singh et al. (1994).

En outre, lorsqu'elle est cultivée dans des milieux contenant de la caséine, notre souche donne de meilleurs rendements en protéase neutre qui pourrait être d'une valeur industrielle. Ceci est en accord avec les études de Yezli et al. (2015). Par contre, le glucose inhibe la production de protéases par un mécanisme de répression catabolique (Frankena et al. 1985; Sinha et al. 1991 ; Kumar et al. 1999 ; Gupta et al. 2002 et Puri et al. 2002). Comme, Ferrero et al. (1996) ont observé une augmentation de la production de protéases en remplaçant dans leur milieu le glucose par la caséine.

Par ailleurs, de fortes concentrations de source de carbone conduisent à une production excessive d'acides organiques et mènent à une réduction du pH et conséquemment à une baisse de la production de protéases (Boiing, 1982).

D'autre part, Keay et al. (1972) ont montré que la production enzymatique peut être grandement augmentée quand la synthèse des protéases s'accompagne d'un accroissement du pH de la culture.

# **Conclusion**

Les plantes de la famille des fabaceae sont considérées comme l'une des principales ressources alimentaires et financières des populations à l'échelle mondiale. En Algérie, l'agriculture représente un secteur très important et diversifié surtout la culture de la fève. Cette dernière est exposée à la contamination fongique par des moisissures mycotoxinogènes. La conséquence possible d'un développement fongique incontrôlé est la production et l'accumulation des mycotoxines dans les aliments.

L'objectif de ce travail est d'isoler ces moisissures mycotoxinogènes à partir des fèves sèches et de les identifier à travers l'étude des caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats et puis d'effectuer un dosage de l'activité protéolytique d'un seul isolat choisi.

A l'issue de cette étude nous avons pu identifier 11 souches de moisissures productrices des mycotoxines appartenant principalement aux genres *Alternaria*(2 souches), *Aspergillus* (3 souches),*Fusarium*(1 souche)et *Penicillium* (5 souches).

L'étude du dosage de l'activité protéolytique exocellulaire a montré que le pH initial des milieux utilisés qu'étais légèrement basique a tendu vers un pH  $\pm$  neutre, la caséine est le substrat favorable à fin d'attirer une activité protéolytique significativement importante par le *Penicillium*.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire qu'il reste comme perspectives des études plus approfondies menant à mettre en évidence la phytopathogénicité du champignon en accordant les dommages liés à la dégradation de la paroi végétale aux sécrétions protéasiques fongiques.

En outre, Les résultats obtenus sont encourageants et méritent d'être poursuivis par des essais de production à grande échelle des protéases fongiques ayant un intérêt industriel.

# **Annexes**

## ANNEXE N° 1

Les milieux de culture ont été autoclaves à 121°C pendant 15 minutes sous une pression de 1 bar.

\* **Milieu PDA** (Bouhot et Billotte, 1964).

Pomme de terre .....	200 g
Glucose .....	20 g
Agar .....	20 g
Eau distillée .....	1000 ml
pH .....	6,5

\* **Milieu Agar 2 %** (Downes et Ito, 2001).

Agar.....	20 g
Eau distillée .....	1000 ml
pH .....	6,5

\* **Milieu Czapeck-Dox glucose liquide à 1 %** (Thom et Raper, 1945)

Glucose .....	10 g
NaNO <sub>3</sub> .....	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	10 mg
KCl.....	0,5 g
Eau distillée .....	1000 ml

\* **Milieu Czapeck-Dox caséine liquide à 1 %**

Caséine.....	10 g
NaNO <sub>3</sub> .....	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	10 mg
KCl.....	0,5 g
Eau distillée .....	1000 ml

**ANNEXE N°2**

\* **Solution A** : Solution caséine 0,65 % (p/v) (pH 7,5 ; 37 °C).

Caséine..... 0,8 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 Mm ..... 125 ml  
Chauffer au bain marie entre 80 et 90 °C (Ne pas bouillir)  
Ajuster le pH à 7,5 à 37 ° C avec HCl 1 M.

\* **Solution B** : Réactif de l'acide TriChloro acétique (TCA) 110 mM.

C<sub>2</sub>HCL<sub>3</sub>O<sub>2</sub>..... P.M = 163,39 M  
TCA 100 % (p/v) ..... 9 ml  
Eau distillée..... 500 ml

\* **Solution C** : Réactif de Folin et Ciocalteu (F-C).

F-C..... 10 ml  
Eau distillée ..... 40 ml

\* **Solution D** : Solution carbonate de sodium 500 mM.

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ..... P.M = 105,99 M  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>..... 26,49 g  
Eau distillée..... 500 ml

\* **Solution E** : Solution de L-Tyrosine 1,1 mM.

L-Tyrosine..... P.M = 181,19 M  
L-Tyrosine ..... 0,02 g  
Eau distillée..... 100 ml

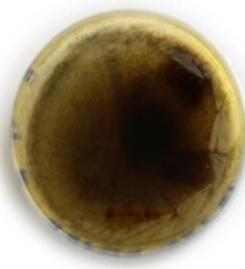
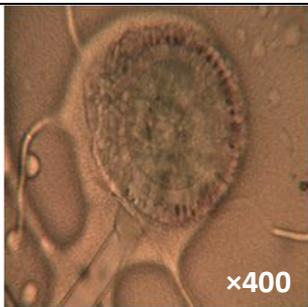
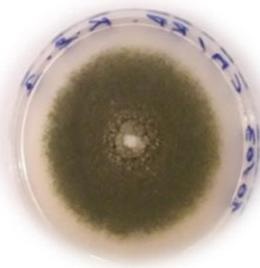
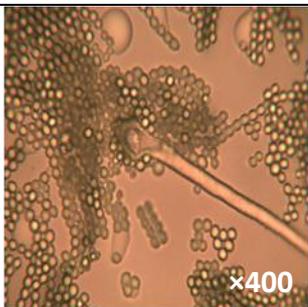
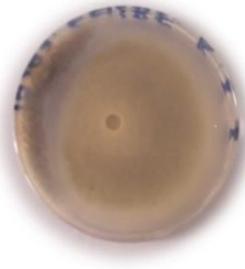
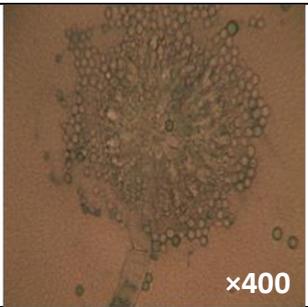
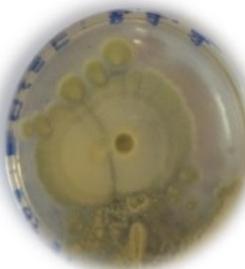
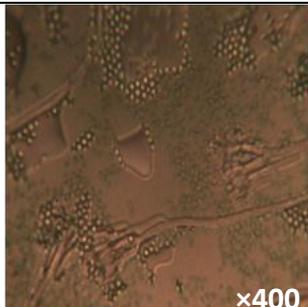
Chauffer au bain marie (Ne pas bouillir) jusqu'à ce que la tyrosine se dissoute et laisser refroidir dans la température du laboratoire.

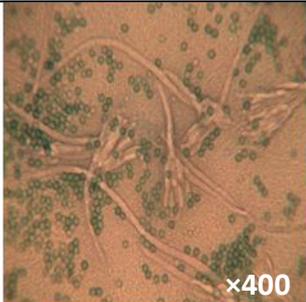
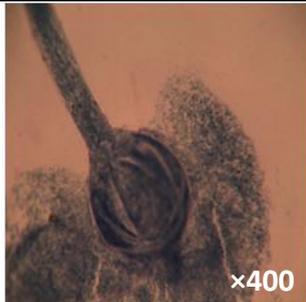
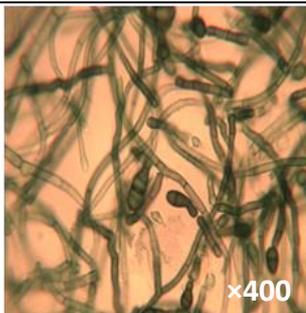
## ANNEX N° 03

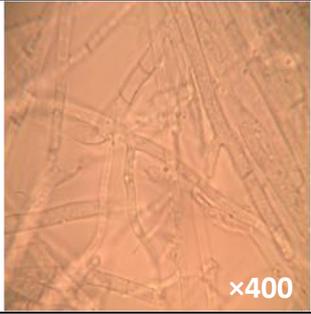
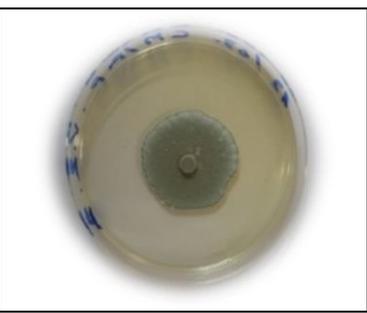
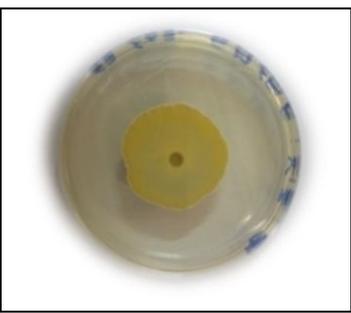
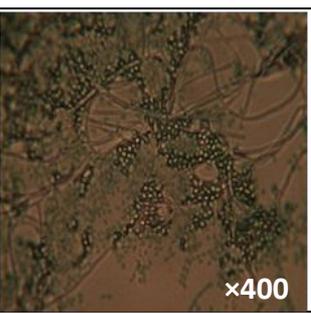
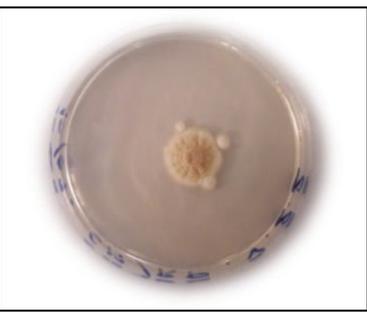
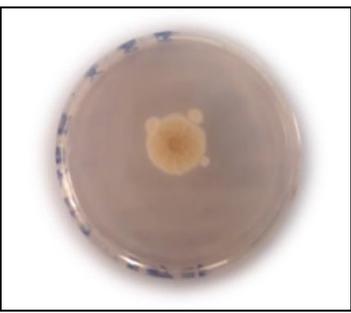
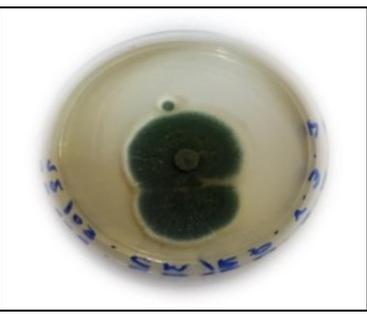
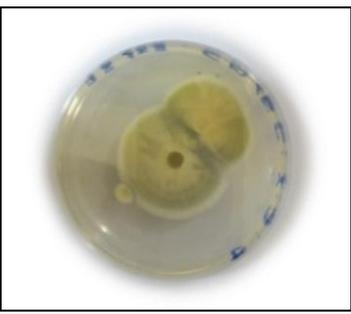
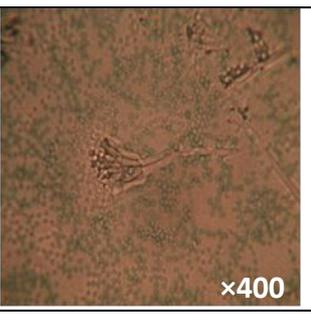
Tableau n° 09 : Isolement des moisissures à partir des grains de fèves sèches.

			
<b>AD. 1</b>	<b>AD. 3</b>	<b>AD. 4</b>	<b>KE. 1</b>
			
<b>KE. 2</b>	<b>KE. 3</b>	<b>R. 1</b>	<b>R. 2</b>
			
<b>R. 3</b>	<b>R. 4</b>	<b>SE. 3</b>	<b>SE. 4</b>
			
<b>T. 1</b>	<b>T. 2</b>	<b>T. 3</b>	

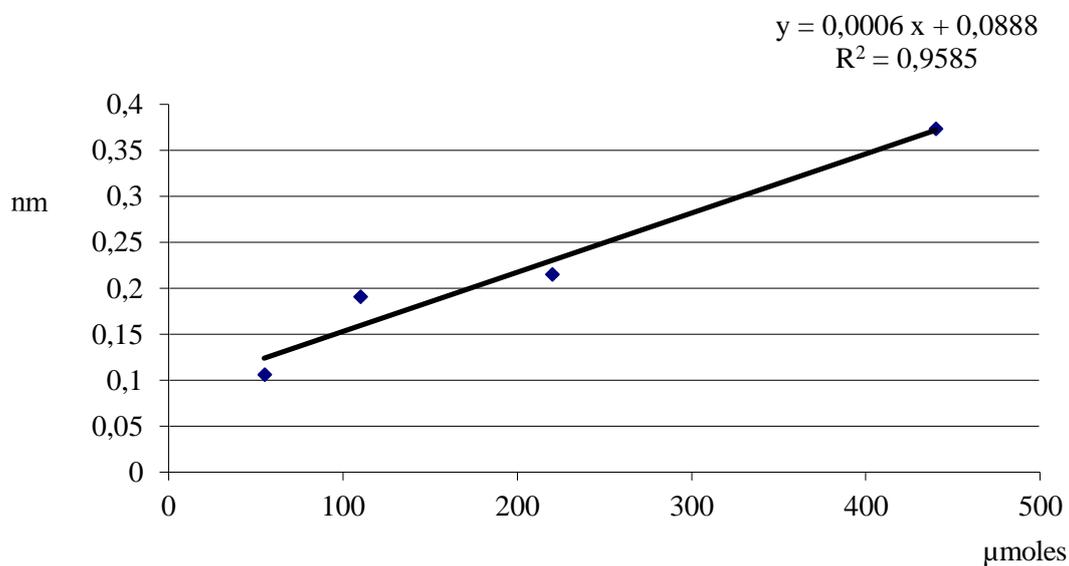
Tableau n° 10 :Etude macroscopique et microscopique des souches purifiées

Régions	Face de la colonie	Revers de la colonie	Sous microscope
AD.4.1			
<i>Aspergillus</i> sp.			
KE.2.1			
<i>Aspergillus</i> sp.			
KE.2.2			
<i>Aspergillus</i> sp.			
R.1.1			
<i>Penicillium</i> sp.			

R.4.1			
<i>Alternaria</i> sp.			
R.4.2			
<i>Penicillium</i> sp.			
SE.4.1			
<i>Rhizopus</i> sp.			
SE.4.2			
<i>Alternaria</i> sp.			

T.1.1			
<i>Fusarium</i> sp.			
T.2.1			
<i>Penicillium</i> sp.			
T.2.2			
<i>Penicillium</i> sp.			
T.3.1			
<i>Penicillium</i> sp.			

## ANNEX N° 04



**Figure n° 09 :** Courbe standard présentant la densité optique en fonction de l'équivalent en μmoles de tyrosine.

**Tableau n° 11 :** Variation du pH, de l'activité protéolytique et de la masse fongique en fonction de la source de carbone.

	<b>Caséine</b>	<b>Glucose</b>
<b>pH initial</b>	7,20	7,20
<b>pH obtenu</b>	7,00	4,00
<b>Masse (g)</b>	3,84	5,10
<b>Activité Protéolytique (unité/ml)</b>	48,80	12,30

# **Références Bibliographiques**

- Abidi F, Limam F. and Marzouki M. N. 2008. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as bio-detergent. *Process Biochemistry*, 43. (11): 1202-1208.
- AFSSA. 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique.
- Andersen B. and Thrane U. 1996. Secondary metabolites produced by *Alternaria infectoria* and their use as chemotaxonomic markers. *Mycotoxin Research.*, 12, 54–60.
- Aoki T., O'Donnell K. and Geiser D.M. 2014. Systematic of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80: 189–201.
- Awad G. 2005. Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A. Thèse de doctorat en génie des procédés. L'institut national polytechnique de Toulouse. Toulouse.
- Azzoune N. 2011. Etude des populations des genres *Aspergillus* et *Penicillium* et de leurs mycotoxines isolées des épices et des légumes secs. Mémoire de magister, Université de M'Hamed Bouguerra. Boumerdes. Algérie.
- Badillet G., De Briève C. et Guého E. 1987. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris.
- Belli N., Marin S., Sanchis V. and Ramos A. J., [2004], Influence Of Water Activity And Temperature On Growth Of Isolates Of *Aspergillus* Section *nigri* Obtained From Grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 96. (1): 19-27.
- Bennett J.W. and Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical microbiology*. Louisiana. Etats-Unis, Rev. 16, 497–516.
- Bessadat N. 2014. Isolement, identification et caractérisation des *Alternaria* sp. responsable de la détérioration des plantes maraichères par des systèmes enzymatiques et moléculaires. Thèse de doctorat, Université d'Oran es-senia. Oran. Algérie
- Boiing J.T.P. 1982. Enzyme production. Dans : Prescott et Dunn's industrial microbiology. Reed G. (éd.), AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, États-Unis, 883.p.
- Booth C. 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. In *The applied mycology of Fusarium*. Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College, London, September 1982. (pp. 1-13). Cambridge University Press.
- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J., Vayssier Y. et Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle, (edn) Masson, collection biotechnologie. Paris. P : 309-512.

- Bouhot D., et Billotte J. M. 1964. Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. II. Choix d'un milieu nutritif pour l'isolement sélectif des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* du sol. Ann. Epiphyties, 15(1), 57-72. In: Djerbi M. (1982). Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. Date Palm Journal, 1(2), 153-197.
- Bouras N., Guezlane-Tebibel N. et Ould El Hadj M. 2016. Les Mycotoxines : Un Danger De Santé Public. Algerian journal of arid environment, 6 (1) : 32-49.
- Cahagnier B., Dragacc S., Frayssinet C., Frémy J.M., Hennebert G.L., Lesage-meessen L., Multon, J.L., Richard-Molard, D. et Roquebert, M.F. 1998. Moisissures des aliments peu hydrates. Lavoisier Tec&Doc, France.
- Castegnaro M. et Pfohl-Leszkowicz, A. 2002. Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans La sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec&Doc. France.
- Chabasse D., Bouchara J-P., D gentile L., Brun S., Cimmon B. et Penn P. 2002. Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale, Cah. Form. Biol. Médicale 25, 46–123.
- Chermette R. et Bussieras J. 1993. Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Cupp-Enyard C. 2008. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. Journal of Visualized Experiments, 19: 1-2.
- D'Mello J.P.F. and Macdonald A.M.C. 1997. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Animal Feed Science and Technology, 78. (1-2): 21-37.
- Davet P. and Rouxel F. 1997. Detecting and isolating soil fungi. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de paris, France.
- Dean R., Van Kan JA., Pretorius ZA., Hammond-Kosack KE., Di Pietro A., Spanu PD. Rudd JJ., Dickman M., Kahmann R. and Ellis J. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 13: 414–430.
- Dendouga W. 2006. Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite. Mémoire de magister en Biochimie-Microbiologie appliquées, Université Mentouri Constantine. Constantine. Algerie.
- Downes P. and Ito F. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association. (No. 579.67).
- Drouin M. 2005. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Thèse de doctorat pour

- l'obtention du grade de Maître en sciences. Institut National de la Recherche Scientifique INRS - Centre Eau, Terre et Environnement.
- Duc G. 1997. Faba bean (*Vicia faba L.*). Field Crops Research. France. 53 : 99-109.
- Duc G., Bao S Y., Baum M., Redden B., Sadiki M., Suso M J., Vishniakova M. and Zong X. 2010. Diversity maintenance and use of *Vicia faba L.* genetic resource. Field Crops Research, 115, 270-278.
- El Khoury A. 2007. Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique De Toulouse. Toulouse.
- FAO. 2019. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/fr/>.
- Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D. and Sineriz F. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. Applied Microbiology and Biotechnology 45: 327-332.
- Filtenborg O., Frisvad J.C. and Thrane U. 1996. Moulds in food spoilage. international journal of Food Microbiology., 33. (1): 85-102.
- Frankena J., Van Verseveld H.W. and Stouthamer A.H. 1985. A continuous culture study of the bioenergetics aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. Applied Microbiology and Biotechnology 22: 169-176.
- Frisvad J.C and Samson R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. Studies in Mycology, 49:1-174.
- Frisvad J.C., Smedsgaard J. and Larsen T.O. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Studies in Mycology, 49 : 201-241.
- Gacem M.A., Ould El Hadj K.A. et Gacemi B. 2012. Étude de la qualité physicochimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). Alg. J. Env. p:67-76.
- Gelderblom W.C.A., Marasas W.F.O., Lebepe-Mazur S., Swanevelder S., Vessey C.J. and P. de la M Hall. 2002. Interaction of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in a short-term carcinogenesis model in rat liver. Toxicology, 171. (2-3): 161-173.
- Gong Y., Xu S., Mao W., Li Z., Hu Q., Zhang G. and Ding J. 2011. Genetic Diversity Analysis of Faba Bean (*Vicia faba L.*) Based on EST-SSR Markers. Agricultural Sciences in China., 10(6): 838-844.
- Guezlane-Tebibel N., Kahlouche B. et Athmani-Guemouri S. 2011. Microbiologie (Travaux pratiques). 4ème édition corrigée, OPU. Algérie.

- Guiraud J. P. 1998. Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.
- Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 15-32.
- Hanafy M., Pickardt T., Kiesecker H. and Jacobsen, H.-J., 2005. Agrobacterium-mediated transformation of faba bean (*Vicia faba L.*) using embryo axes. *Euphytica* 142, 227–236.
- Henni J., Boisson C., et Geiger J. P. 1994. Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathologia Mediterranea*, 33:51-58.
- Huwig A., Freimund S., Kappeli O. and Dutler H. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, 122. (2): 179-188.
- Jernejc K. and Cimerman A. 2001. Morphological characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus* species. *Food Technol. Biotechnol.* 39(4): 333-340.
- Jouany J.P. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 137. (3-4): 342-362.
- Katell C., Pascal M., Corinne P., Benoit C., Paolo A. and Gérard D. 2010. Nutritional value of faba bean (*Vicia faba L.*) seeds for feed and food. *Field Crops Research.*, 115: 329–339.
- Keay L., Moseley M.H., Andersori R.G., O'Connor R.J. and B.S. Wildi B.S. 1972. Production and isolation of microbial proteases. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 3: 63-92
- Keith A., Scudamore., Christopher T. and Livesey. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Science of food and agriculture*, 77: 1-17.
- Kumar C.G. and Takagi H. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bio-industrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17: 561-594.
- Lahouar A. 2016. Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysiologiques. Thèse De Doctorat, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir. Tunisien. Monastir.
- Le Bars J. and Le Bars P. 2000. Mycotoxigenesis in grains applications to mycotoxic prevention in coffee. In: *Coffee Biotechnology and Quality*, Sera T., Sochol C.R., Pandey A., and Roussos S. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 355-368.
- Lecellier A. 2013. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne. Reims.

- Linan M.D., Morassin. et Recco P. 1999. Actualités sur *Alternaria* : écologie, revue française d'allergologie., 349-355.
- Logrieco A., Bottalico A., Solfrizzo M. and Mule,G. 1990. Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia.*, 82. 501-505.
- Mahideb N. et Merrouche H. 2015. Etude des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines isolées à partir des grains de blé dur (traités et non traités). Mémoire de master en biotechnologie des mycètes, Université des Frères Mentouri Constantine. Constantine. Algérie.
- Meunier N. 1999. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir de boues d'épuration municipales. Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de Maître en sciences. Université du Québec INRS-Eau.
- Miller David J. 1995. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. *Journal of stored products research.*, 31 (1) : pp 1-16.
- Moreau C., Bourgeois C., M. et Leveau J. Y. 1994. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. *Food control*, 32 (2) : 234-235.
- Morin O. 1994. *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.
- Nasim A., Marielle B., Donovan B., Hannah B., Ariane R. and Rafael B. 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon.*, 66 (1) :44-47.
- Nelson P. E., Toussoun T. A. and Cook R. J. 1981. *Fusarium*: diseases, biology, and taxonomy (p. 457). University Park: Pennsylvania State University Press. In : Ma L. J., Van Der Does H. C., Borkovich K. A., Coleman J. J., Daboussi M. J., Di Pietro A., and Houterman P. M. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367-373.
- Nguyen M. T. 2007. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat en Génie des procédés et de l'environnement, Institut national polytechnique de Toulouse. France. 147p.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. et Killington R. 2000. L'essentiel en microbiologie. Edition Berti., P : 210-216.
- Nyamwaka I.S. 2009. Determination of fungi and factors associated with their growth on sun dried *Rastrineobola argentea* in gucha south, kisii county, Kenya. Thèse de doctorat en microbiologie, in the school of pure and applied sciences of Kenyatta university. Nairobi.

- O'Donnell K., Sutton DA., Wiederhold N., Robert VARG., Crous PW. and Geiser DM. 2016. Veterinary fusarioses within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 54: 2813–2819.
- Oualibou A. 2013. Analyse de la place tenue par la fève, ses modes de conduite et sa valorisation dans les exploitations agricoles du périmètre irrigué du Haouz. Projet de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en agronomie Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Royaume du Maroc
- Ottaviani F., Disegna L. and Spolaor D. 1988. Yeasts and identification in food industry. *Microbiologie- Aliments- Nutrition*. 6: 221-226.
- Pamel Els V., Geertrui V., Marc H., Lieve H., Annemieke V. and Els D. 2011. Mycotoxin production by pure fungal isolates analyzed by means of an uhplc-ms/ms multi-mycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox Res.*, 27 (1): 37–47.
- Perry, J.J., Staley, J.T. et Lory, S. 2004. *Microbiologie*. Dunod. France.
- Pitt J.I. and Hocking A.D. 2009. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International journal of food microbiology*, 132 (2-3): pp 100-108.
- Puri S., Beg Q.K. and Gupta R. 2002. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. *Current Microbiology* 44: 286-290.
- Pusz W. 2009. Morpho-physiological and molecular analyses of *Alternaria alternata* isolated from seeds of amaranthus. *Phytopathologia*, 54 :5-14.
- Raper K.B. and Fennell. 1965. The genus *Aspergillus*. *Food Microbiol* 5: 163-176.
- Rai PK. and Kumari L. 2009. Variability in *Alternaria alternata* infecting periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Progr. Agric.* 9: 296-272.
- Reboux G. 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46 (3) : P: 208–212.
- Roquebert M.F. 1998. Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification, in “Moisissures des aliments peu hydratés”, Ed. Tec & Doc, 39-95.
- Ruppol P., Delfosse Ph. et Hornick J.L. 2004. La contamination de la filière laitière par les mycotoxines: un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Mycotox Res.*, 148. 141-146.
- Samson, Jos A.M.P., Robert A., Houbraken, Angelina F.A. Kuijpers., Mick Frank J. and Jens Frisvad C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri, 50 : 45–61.

- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C. and van Dijck P.W.M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 59 (4-5) : Pp 426–435.
- Singh A., Ghosh V.K. and Ghosh P. 1994. Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiology*. 18 : 177-180.
- Sinha N. and Satyanarayana T. 1991. Alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian Journal of Microbiology* 31 (4) : 425-430.
- Steyn. and Pieter S. 1995. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters*, 82/83: 843-851.
- Street K., Ismail A. et Rukhkyan N. 2008. Directives pour la régénération: fève. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 10 pp.
- Tabuc C. 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse. Bucarest.
- Thom C. and Raper K. 1945. *A Manual of the Aspergilli*, Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- Toffa D.D. 2015. Étude de la contamination de certains aliments d'origine végétale de la République du Niger les moisissures toxigènes. Thèse de Doctorat d'état, Université Mohammed V. Morocco, 252 p.
- Ul-Haq Ikram., Hamid M., Sunila D., Sikander A. and Qadeer M.A. 2003. Production of Proteases by a Locally Isolated Mould Culture under Lab Conditions. *Biotechnology*, 2. (1): 30-36.
- Untermann F. 1998. Microbial hazards in food. *Food Control*, 9. (2-3): 119-126.
- Wangikar P B., Dwindedi P., Sinha N., Sharma A.K., and Telang A.G. 2005. effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food and chemical toxicology*, 43. (4): 607-615.
- Yahara T., Javadi F., Onoda Y., Quiroz L.P. and Prado. 2013. Global legume diversity assesment: Concepts, Key indicators, and strategies. *Taxon* 62: 249- 266.
- Yezli W. 2010. Étude morphologique, pouvoir pathogène et activité protéolytique chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *Albedinis*. Mémoire de Magister en Microbiologie Appliquée. Université d'Oran. Algérie.
- Yezli W., Zebboudj N., Karkachi N.E., Kihal M. and Henni J.E., 2015. Influence of two substrates (casein and glucose) on mycelia growth and dosage of proteolytic activity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa). *International journal of biosciences*, 6.(5): 115-125.

- Yezli W. 2017. Biodiversité et écologie de *Fusarium*. Thèse de doctorat en Microbiologie, Université Ahmed Ben Bella. Oran. 199 p.
- Zinedine A. 2004. Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de doctorat, Université de Sidi Mohammed Ben Abdellah. Maroc.
- Zong X., Liu X J., Guan J P., Wang S M., Liu Q C., Paull J G. and Redden R .2009. Molecular variation among Chinese and global winter faba bean germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 971-978.

## Résumé

En dépit de sa haute valeur nutritive, la fève *Vicia faba* L. est sujette à des contaminations par des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines qui causent des dégâts importants non seulement pendant la culture, mais aussi lors du stockage. Cependant, malgré leurs phyto-pathogénicités, ces moisissures peuvent produire des protéases extracellulaires ayant un intérêt économique. Dans ce contexte, l'objectif de la présente étude est l'isolement, l'identification et le dosage de l'activité protéolytique des moisissures mycotoxinogènes à partir des fèves sèches commercialisées dans 5 communes de la wilaya de Tiaret destinées pour l'alimentation humaine. Après l'isolement et la purification des moisissures sur milieu PDA, l'identification basée sur l'analyse des caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopiques) a révélée la présence de quatre genres différents : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*.

L'étude de la croissance mycélienne sur différents substrats montre que l'influence de la source de carbone sur la masse mycélienne n'est pas significative. Néanmoins, la source de carbone influe significativement sur l'activité protéolytique. Par conséquent, le dosage de l'activité protéolytique d'une souche *Penicillium* sp. Dévoile que cette dernière est dotée d'une importante capacité de production des protéases sur un substrat de caséine à un pH neutre.

**Mots clés :** Fève sèche, Moisissures, Mycotoxines, *Penicillium*, activité protéolytique.

## ملخص

على الرغم من قيمتها الغذائية العالية، فإن الفول (*Vicia faba* L.) عرضة للفساد عن طريق الفطريات التي من المحتمل أن تنتج السموم الفطرية والتي تسبب أضرارا ليس فقط أثناء، بل أثناء التخزين أيضا ولكن على الرغم من خطورتها، يمكن أن تنتج هذه الفطريات انزيمات بروتينية ذات أهمية اقتصادية. في هذا السياق، تهدف هذه الدراسة إلى عزل، تحديد و تقييم نشاط الانزيمات البروتينية لهذه الفطريات السامة في الفول الجاف الموجه إلى الاستهلاك البشري و الذي يتم تسويقه في 5 مناطق من ولاية تيارت. بعد عزل وتنقية هذه القوالب تم التعرف على الخصائص المورفولوجية والمجهريّة لأربعة أجناس مختلفة و هي : *Penicillium* و *Aspergillus* *Fusarium* *Alternaria*.

تبين الدراسة أن تأثير مصدر الكربون غير مهم على نمو الفطريات في حين أن له تأثير على نشاط الانزيمات البروتينية بشكل كبير. لذلك، يكشف اختبار نشاط التحلل البروتيني أن *Penicillium* sp. يتمتع بقدرة عالية على إنتاج البروتياز في درجة الحموضة المحايدة.

**الكلمات المفتاحية :** الفول الجاف، العفن، السموم الفطرية. البنسيليوم، نشاط التحلل.

## **Abstract**

Despite its high nutritional value, faba bean *Vicia faba* L. is subjected to contamination by molds producing potentially mycotoxins which cause damage not only during cultivation, but also during storage. These molds can produce extracellular proteases of economic interest. In this context, the objective of the present study is to isolate, identify and quantify the proteolytic activity of these mycotoxinogenic molds belonging from dry faba bean intended for human consumption and marketed in 5 communes of the wilaya of Tiaret. After isolation and purification of these molds on PDA medium, the identification based on the analysis of macroscopic and microscopic morphological features revealed the presence of four different genera: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*.

The study of mycelial growth on different substrates shows that the influence of the carbon source on the mycelial mass is not significant. While, the influence of the carbon source on proteolytic activity is significantly important. Therefore, the assay of the proteolytic activity of a *Penicillium sp.* strain reveals that the latter is endowed with a high ability to produce proteases on a casein substrate at a neutral pH.

**Key words:** Dry bean, Mold, Mycotoxins, *Penicillium*, proteolytic activity.