

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: Infectiologie

Présenté par :

BAGHANI Fatiha

LEMBARKI Fatiha

SAHRAOUI Khadra

Thème

Dosage de l'activité pectinolytique 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:	Grade
Président:	Dr. BENSAID M. O.	MCA
Encadreur:	Dr. YEZLI W.	MCB
Co-encadreur:	Dr. DOUKANI K.	MCA
Examinatrice:	Dr. TABAK S.	MCA

Année universitaire 2018/2019



REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant, qui en son nom et avec Sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.

*C'est avec beaucoup de reconnaissance que nous adressons nos sincères remerciements à l'égard de notre encadreur : **Dr. YEZLI W.** qui a bien voulu suivre et diriger ce travail, ses conseils précieux et ses critiques ont été pour nous un encouragement permanent. Nous le remercions pour sa gentillesse, son soutien et pour le fait de nous avoir fait partager son expérience. Nous lui adressons toute notre reconnaissance de nous avoir poussé pour atteindre nos buts et d'avoir identifié et stimulé nos potentiels.*

*Un remerciement spécial à notre Co-Promotrice et responsable de spécialité **Dr. DOUKANI K.** qui nous a donné l'opportunité de continuer, ainsi que de nous avoir aidé. Nous remercions sa compétence scientifique et sa disponibilité, pour ses efforts, son soutien et son assistance.*

Nous tenons aussi à présenter nos vifs remerciements et notre respect aux membres de jury.

Pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger ce mémoire :

***Dr. BENSAID M O.** en tant que président du jury*

***Dr. TABAK S.** en tant qu'examinatrice.*

*Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent monsieur **BENAISSA T.** pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'il nous a accordé.*

Nous tenons à remercier et à exprimer tous ceux qui nous ont aidé au sein du Laboratoire de Microbiologie



Dédicace

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : FOUZIA

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A MON TRÈS CHER PÈRE : KHALED

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, et te protège de tout mal

A mes cher frères Halim et Anas.

*A mes très chère sœurs **INAS BAKHTOUT** et ces filles **Frdouse et Raouan***

*Amon cher **oncle larbi***

Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, et pour toute la spontanéité Je vous dédie ce travail.

Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous vos vœux



FATIHA

Dédicace

*Grace à Allah et avec sa faveur
Avec un énorme plaisir. Un cœur ouvert et une immense joie.
Que je dédie ce modeste travail*

A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage. A celle qui attend chaleureusement ce jour:

*À ma grand-mère, Que Dieu le puissant, vous préserve et vous accorde santé,
longue vie*

*À mes très chers parents dont le soutien est inestimable «MABROUK et
MESSOUDA» en témoignage de mon affection illimitée qu'il me soit permis de leur
exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance éternelle pour tout ce qui m'ont
offert au cours de mes longues années d'études.*

*A mes frères : «NOUR DINE, YUCEF, SAAD» et ma petite sœur «KHOLUD»,
Merci pour tout l'amour que vous me portez et toute la confiance que vous
m'accordez*

A mes familles maternelles et paternelles « LEMBARKI ET MATTALLAH »

A mon binôme. Je vous souhaite du bonheur et du succès dans toute votre vie

*A mes meilleures amies : HAMIDA, IKRAM, KHADIDJA, RANIA,
WAFFA, WARDA. Vous encouragements étaient la bouffée d'oxygène qui me
ressourçait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance, où l'on a
terriblement besoin d'un petit mot, d'un petit geste, aussi humble soit-il, de soutien
moral.*



FATIHA

Dédicace

Je remercie DIEU a ce modeste travail

Je dédie ce travail à mes chères parents ADDA et MAAROUFE ZINEBE celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, et sont la source et joie de la bonheur, puisse Dieu le tout puissant t'accorder meilleure santé et bonheur .

je remercie mes frères « Khaled et Abdelwahabe » et mes sœurs « Chaima et Fatima » pour toute l'aide et la patience dont ils fait preuve et toute ma famille proche et mes cousins et cousines ou éloignée pour leur soutien moral.

A mes proche amis « Fatiha,Rania ,Wafa, Ikram,khadidja , warda » Vous encouragements dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance, et toute la confiance que vous m'accordez.

*Merci pour mon trinôme **Lembarki et Baghani** pour les moment merveilleux avec la souffrance qu'ils étaient inoubliables.*

Tout le respect à tous les personnes

Je dédie en fin à mes amies et tous mes collègues de 2 ème année master infectiologie promotion 2018-2019.



KHADRA

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iii
INTRODUCTION.....	01

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES MOISSURES

I.1. Moisissures.....	03
I.2. Moisissures mycotoxinogènes.....	04
I.3. Principaux genres fongiques.....	05
I.3.1. Genre <i>Aspergillus</i>	05
I.3.2. Genre <i>Fusarium</i>	05
I.3.3. Genre <i>Penicillium</i>	06
I.3.4. Genre <i>Alternaria</i>	07

CHAPITRE II : MYCOTOXINES

II.1. Généralités sur les mycotoxines.....	08
II.2. Principales mycotoxines.....	09
II.2.1. Aflatoxines.....	09
II.2.2. Citrinines.....	09
II.2.3. Fumonisines.....	09
II.2.4. Ochratoxines.....	10
II.2.5. Trichothécènes.....	10
II.2.6. Zéaralénones.....	10
II.3. Effets des mycotoxines sur la santé humaine.....	11

CHAPITRE III : PECTINASE

III.1. Généralités sur la pectine.....	12
III.2. Enzymes Pectinases ou pectinolytiques.....	13
III.2.1. Définition.....	13
III.2.2. Rôles et sources.....	13
III.2.3. Classification.....	13
III.2.3.1. Pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME).....	14
III.2.3.2. Dépolymérasés.....	15
III.2.3.2.1. polygalacturonases (PG).....	16
III.2.3.2.2. lyases ou transéliminases.....	17

III.2.4. Application.....	17
---------------------------	----

CHAPITRE IV : MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV.1. Objectifs du travail.....	19
IV.2. Lieu et période du travail.....	19
IV.3. Matériel utilisé.....	19
IV.3.1. Matériel végétal.....	19
IV.3.2. Milieux de culture.....	19
IV.3.3. Appareillage, produits, verrerie et matériel consommable.....	19
IV.4. Protocole expérimentale.....	21
IV.5. Isolement des champignons à partir des grains de fève sèche.....	22
IV.6. Purification des isolats fongique.....	22
IV.7. Identification des isolats fongiques.....	23
IV.7.1. Identification macroscopique.....	23
IV.7.2. Identification microscopique.....	23
IV.8. Recherche de l'activité pectinolytique des isolats.....	24
IV.8.1. Filtration.....	24
IV.8.2. Dosage de l'activité Pectine méthylestérase (PME).....	24
IV.8.3. Dosage de l'activité Polygalacturonase (PG).....	25
IV.9. Analyse statistique (ANOVA).....	27

CHAPITRE V : RÉSULTATS ET DISCUSSION

V.1. Résultats.....	28
V.1.1 Isolement des souches fongique à partir de différents grains de fève sèche.....	28
V.1.2. La Purification des isolats.....	29
V.1.3. Identification des isolats fongiques.....	30
V.1.3.1. Identification macroscopique.....	30
V.1.3.2. Identification microscopique.....	32
V.1.4. Recherche de l'activité pectinolytique des isolats.....	34
V.2. Discussion.....	36
Conclusion.....	39
Annexes	40
Références bibliographiques	45
Résumé	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 :	Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments	08
Tableau 02 :	Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement	11
Tableau 03 :	Les principales pectinases	14
Tableau 04 :	Appareillage, produits, verrerie et matériel consommable utilisés	20
Tableau 05 :	Pourcentage de la population fongique isolée à partir de la fève sèche commercialisé dans la région de Tiaret	28
Tableau 06 :	Représentation de la distribution des isolats fongique	30
Tableau 07 :	Caractères macroscopiques des souches purifiées cultivées sur le milieu PDA	31
Tableau 08 :	Caractères microscopiques des souches purifiées cultivées sur le milieu PDA	32
Tableau 09 :	Variation du pH, de l'activité pectinolytique et de la masse fongique en fonction de la source de carbone	43

LISTE DES FIGURES

Figure 01 :	Cycle de développement des moisissures	04
Figure 02 :	Structure de la tête aspergillaire du genre <i>Aspergillus</i>	05
Figure 03 :	Caractères morphologiques des <i>Fusarium</i>	06
Figure 04 :	Caractères morphologiques de <i>Penicillium</i>	07
Figure 05 :	Stades de développement des spores et des conidiophores d' <i>Alternaria</i>	07
Figure 06 :	Mode d'action des pectinases	16
Figure 07 :	Grains de fève sèche	19
Figure 08 :	Schéma du protocole expérimental	21
Figure 09 :	Isolement des moisissures à partir des grains de fève sèche	22
Figure 10 :	Schéma des différentes étapes de la purification du champignon par culture monospore	23
Figure 11 :	Schéma de la technique du drapeau utilisée pour l'observation microscopique d'une empreinte fongique	24
Figure 12 :	Schéma du dosage de l'activité PME	25
Figure 13 :	Dosage de l'activité polygalacturonase	27
Figure 14 :	Isolement des champignons à partir des grains de fève sèche	28
Figure 15 :	Purification par culture monospores des souches	29
Figure 16 :	Pourcentage de contamination de chaque région	29
Figure 17 :	Observation macroscopique des différents morphotypes	30
Figure 18 :	Observation microscopique de genre <i>Penicillium</i>	32
Figure 19 :	Influence de la source de carbone sur la masse mycélienne	34
Figure 20 :	Influence de la source de carbone sur l'activité pectinolytique	35

Figure 21 :	Variation de l'activité pectinolytique et de la masse fongique en fonction du pH	36
Figure 22:	Rinçage et isolement les grains de fève sèche	41
Figure 23 :	Isolement des champignons à partir des grains de fève de chaque commune	42
Figure 24:	Culture sur milieu Czapeck-Dox modifié, inoculé par la souche de <i>Penicillium</i>	43
Figure 25 :	Filtrat de culture	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	<i>Aspergillus</i>
AD	Ain Dhab
AF	Aflatoxine
ATB	Antibiotique
ATP	Adénosine tri phosphate
CTT	Citrinine
DM	Degré de méthylation
EDTA	Ethylène diamine tétra -acétique
F	<i>Fusarium</i>
FB	fumonisines
GS	Glutathion S
HM	Hamadia
HM	Hautement méthylées
LM	Faiblement méthylées
M	Mycélium
MS	Mechra Sfa
OL	Oued Lili
OTA	Ochratoxine
P	<i>Penicillium</i>
PDA	Potato Dextrose Agar
PE	Pectinestérases
PG	Polygalacturonases
PGL	Polygalacturonate lyases
PME	Pectine méthylestérases
PMG	Polyméthylgalacturonases
PMGL	Polyméthylgalacturonate
S	Spores
SH	Sidi Housni
ZEA	Zéaralénone

Introduction

La fève (*Vicia faba* L.) est considérée comme une plante légumineuse et sa superficie mondiale est estimée à 3 millions d'hectares, dont plus de 50% se situent en Chine, 20% en Afrique du nord et moins de 10% en Europe (Abu Amer *et al.*, 2011). Elle est la plus ancienne légumineuse cultivée dans le monde (Tanno et Willcox, 2006).

En Algérie la fève sèche est considérée parmi les légumineuses les plus consommées, vu sa valeur nutritionnelle, qui fournit beaucoup d'énergie et de principales ressources alimentaires. Elle couvre une surface de 58000 hectares avec un rendement total de 254000 tonnes (Laamari *et al.*, 2008). Selon Larralde et Martinez (1991), la fève est attribuée à sa teneur élevée en protéines (25 à 35%), elle est aussi une bonne source de glucides (50 à 60% d'amidon), de minéraux (leur teneur varie entre 1 et 3,5%, étant particulièrement riche en calcium et en fer), de fibres (7%) et de vitamines. Par contre, la proportion lipidique est faible environ (1 à 2,5%).

La paroi végétale, en plus de constituer un véritable bouclier pour la cellule face à son environnement, elle confère une structure rigide à la cellule, participant au port dressé de la plante. Elle se présente sous la forme d'un réseau très complexe principalement composé de chaînes polysaccharidiques (Carpita et Gibeaut 1993 ; Somerville *et al.*, 2004). Les pectines sont des substances d'origine végétale, ce sont des polysaccharides complexes que l'on retrouve principalement dans la lamelle moyenne et la paroi primaire des plantes supérieures (Alkorta *et al.*, 1998 ; Blanco *et al.*, 1999). Les pectines sont caractérisées par une forte teneur en acide galacturonique (Perrone *et al.*, 2002).

Parmi les agents qui peuvent contaminer les aliments, on trouve principalement les champignons mycotoxinogènes, qui constituent un énorme danger pour la santé de l'Homme et de l'animal, lorsqu'elles contaminent les différents produits alimentaires. La prolifération fongique et la contamination par les mycotoxines altèrent la qualité marchande des produits alimentaires impliquant d'énormes pertes économiques (Bhat et Vasanthi, 2003).

Cette source alimentaire représente aussi un milieu favorable à la croissance fongique et à la production de mycotoxines, qui sont reconnues pour leurs caractères cancérigènes, immunosuppresseurs, œstrogènes, tératogènes etc. Elles peuvent aussi être à la base d'énormes pertes économiques à l'agriculture et aux industries agroalimentaires (Boudra, 2009).

Par ailleurs, dans des conditions propices de température, d'humidité et de pH, favorisent la production des mycotoxines qui sont des métabolites secondaires toxiques

produites par certaines souches de moisissures, qui se développent principalement sur les matières premières d'origine végétales (céréales, légumes, fruits) (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002). Les mycotoxines sont de faible poids moléculaire (entre 200 et 10.000 daltons). Elles sont excrétées par de nombreuses moisissures, appartenant principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Reboux, 2006 ; Pamel *et al.*, 2010).

Les pectinases sécrétées par les moisissures mycotoxinogènes, génèrent la dégradation de la paroi cellulaire de la plante. D'où la problématique visant à mettre en exergue le degré de nocivité des moisissures toxigènes en se focalisant sur leur activité pectinolytique. La fève constitue un sujet d'étude intéressant, étant donné que, son importance dans notre pays et particulièrement dans la wilaya de Tiaret. Dans ce contexte, notre travail a pour objectifs, d'une part, l'isolement et l'identification des moisissures mycotoxinogènes et vise à faire le dosage des enzymes pectinolytiques produites par ces moisissures, et d'autre part, la contribution à l'amélioration des conditions de stockage.

Pour ce faire, une synthèse bibliographique représentant la première partie de notre étude a été réalisée afin de regrouper les informations essentielles sur les moisissures mycotoxinogènes et leurs métabolites (mycotoxines) et même les principaux caractères sur la pectine.

La deuxième partie, illustre le matériel et les méthodes utilisés et les résultats obtenus avec leur discussion.

L'étude est achevée par une conclusion qui résume l'ensemble des résultats de cette étude.

CHAPITRE I:

Généralités sur les moisissures

I.1. Moisissures

Plus de 60.000 espèces de champignons sont connues. Les documents sur les fossiles portent à croire que les champignons existent depuis 550 millions d'années ou plus. Ils sont compris entre des organismes monocellulaires microscopiques comme les levures, et les champignons qu'on peut voir pousser comme les moisissures et les champignons à chapeau (Yezli, 2018).

Les moisissures et les levures (champignons microscopiques) sont des deux grands groupes des organismes hétérotrophes non photosynthétiques (Dedi née *et al.*, 2016). Les moisissures sont un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et, parfois parasites. Ils constituent à ce jour un règne autonome : le règne fongique, appelé « Fungi » (Delahaye, 2011). Ce sont des organismes eucaryotes avec un appareil végétatif appelé « mycélium » constitué par de filaments appelés « hyphes » à croissance apicale, dans toutes les directions à la même vitesse (Guinberteau *et al.*, 2015). Chez les champignons supérieurs, les hyphes sont cloisonnés ou septés, tandis que chez les champignons inférieurs ou primitifs, les cloisons intercellulaires sont inexistant (Stevens *et al.*, 2006). Dépourvues de pigments assimilateurs, les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes dépendants d'une source de carbone organique. 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 (le lait et la viande) mais aussi le papier, les tissus, les matières organiques en décomposition, où ils trouvent une source de carbone et d'azote accessible (Pfohl-Leskowicz, 2001).

Le réservoir naturel des moisissures se situe à l'extérieur et varie (en concentration et diversité) dans les régions tempérées, principalement selon la saison et la présence de matières organiques dans l'environnement (Malloch, 1997). Les moisissures sont caractérisées par une paroi cellulaire qui contient des glucanes (α 1,3-glucane), cellulose, des mannanes et de la chitine. La membrane cellulaire des champignons est constituée de stérols (l'ergostérol principalement), et leur cytoplasme est dépourvu de chlorophylle (Toffa, 2005).

Ces champignons, dans des conditions favorables de développement, vont produire des spores (conidies), éléments microscopiques, qui restent dans la masse, collées entre elles par le mucus. Elles forment des amas lourds difficilement transportables par l'air. Les concentrations de spores dans l'air ambiant dépendent des conditions environnementales (Kozak *et al.*, 1979). Les moisissures s'attachent sur du matériel inorganique (notamment la cellulose) et dans des conditions de très forte humidité (> 90 %) (Boutin-Forzano *et al.*, 2004). La durée du cycle de développement de moisissures peut varier de 24 à 48 heures (Antoine et Rolande, 2009) (Figure 01).

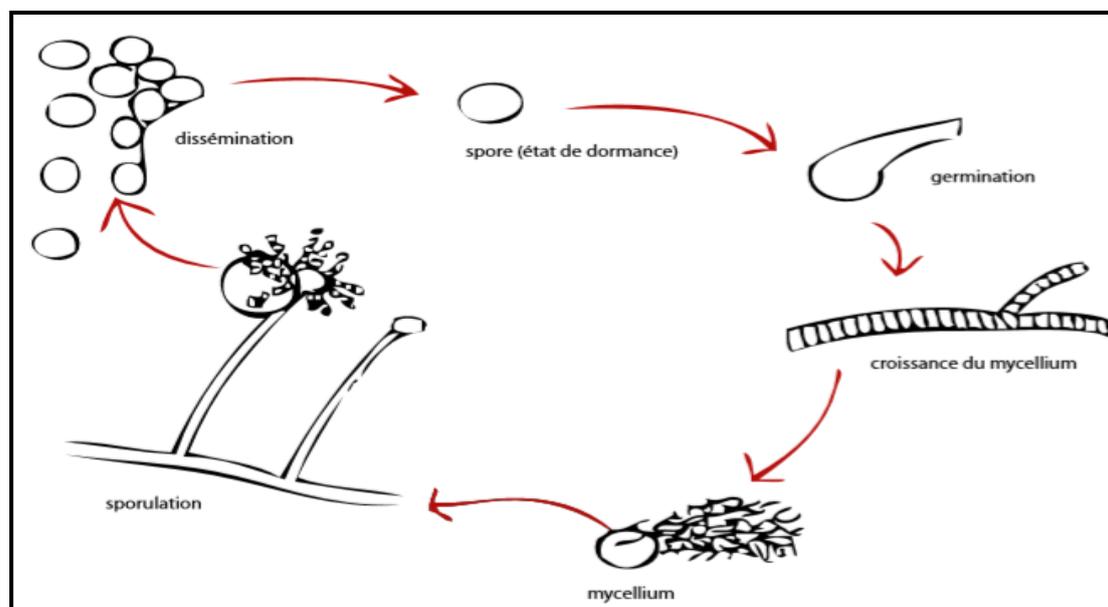


Figure 01 : Cycle de développement des moisissures D'après (Antoine et Rolande, 2009).

I.2. Moisissures mycotoxinogènes

Les moisissures peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques : les mycotoxines. La synthèse des mycotoxines et leur accumulation dans le milieu peut aussi avoir un effet inhibiteur sur le développement d'autres espèces fongiques (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Les toxines majeures sont produites par des souches fongiques appartenant aux genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (AFSSA, 2006). Toutefois, il n'existe pas de relation directe entre espèce fongique et mycotoxine. En effet, une molécule peut-être produite par plusieurs espèces fongiques et, au sein d'une espèce toxigène, toutes les souches n'ont pas forcément la capacité de produire la (les) mycotoxine(s) (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

La toxinogénèse dépend beaucoup plus de la composition chimique de la denrée sur laquelle les moisissures se développent (AFSSA, 2009). Ainsi, la présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu détermine des interactions entre les différentes espèces et entraîne une diminution de mycotoxines par chacun des microorganismes producteurs (Nguyen, 2007).

Selon Abdellah (2014), les moisissures responsables de l'altération des grains sont réparties en deux groupes écologiques :

- Les moisissures du champ : *Alternaria* et *Fusarium*.
- Les moisissures de stockage : *Aspergillus* et *Penicillium*.

I.2. Principaux genres fongiques

I.2.1. Genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des champignons microscopiques qui contaminent les récoltes dans les champs ou pendant la conservation dans les silos ou greniers (Barros *et al.*, 2005). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux par leur pouvoir d'envahir les tissus vivants et de provoquer des aspergilloses, particulièrement chez les personnes immunodéprimées (Bennett, 2010). Les membres du genre *Aspergillus* sont les mycètes les plus communs et tous se reproduisent asexuellement en formant de longues chaînes des conidiospores (ou des conidium). L'impact de diverses espèces d'*Aspergillus* sur des humains s'étend de salubre à nocif (Yu, 2010).

Les *Aspergillus* sont des moisissures à filaments cloisonnés hyalins. Près de 300 espèces composent ce genre, parmi lesquelles *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus souvent impliquée en pathologie humaine dans les pays tempérés (ANOFEL, 2014). Elle correspond aux conditions des habitats les plus fréquents des espèces et à leurs adaptations relatives, soit 30°C pour *A. flavus* (s'étalant jusqu'à 37°C) et 37°C pour *A. fumigatus* qui poussera encore à 45°C. Les deux espèces sont des pathogènes majeures (Jacquet et Boutibonnes, 1967). De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Tabuc, 2007).

Ce genre *Aspergillus* signifie « aspersoir », L'aspect microscopique est caractéristique avec la présence de têtes aspergillaires (Galinas, 1995) (Figure 02).

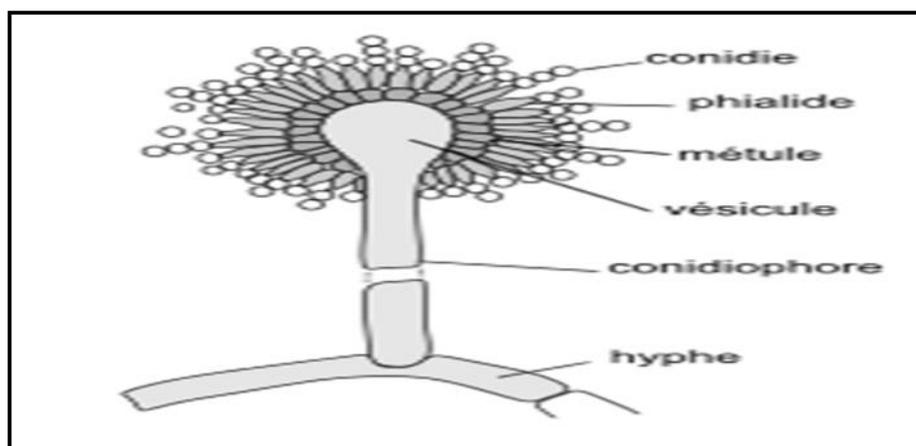


Figure 02 : Structure de la tête aspergillaire du genre *Aspergillus* D'après (HAS, 2017).

I.2.2. Genre *Fusarium*

Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées (Hibar *et al.*, 2005). En dépit des pertes économiques qu'ils entraînent, le contrôle de ces pathogènes reste

toujours limité à des mesures prophylactiques, la désinfection du sol n'est jamais complète en raison d'une part et de la difficulté de sa réalisation d'une autre part (Benhamou *et al.*, 1997).

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des Ascomycètes (Tabuc, 2007). Il contient plusieurs espèces du genre *Fusarium* comme : *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae* (Van Der Burgt et Timmermans, 2009). Il peut être responsable d'onyxis, de surinfection de plaie ou de brûlures, de kératite après effraction de la cornée. Il entraîne des infections disséminées gravissimes chez les immunodéprimés. Les colonies sur le milieu de culture Sabouraud sont duveteuses ou cotonneuses de couleur variable en fonction de l'espèce. L'aspect microscopique permet facilement de faire le diagnostic de genre grâce à la présence de conidies de grande taille, fusiformes avec plusieurs logettes (Foulet, 2007) (Figure 03).

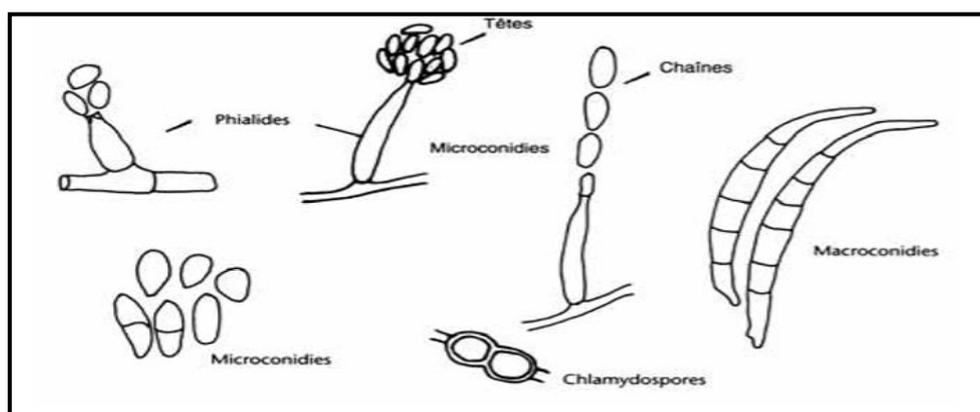


Figure 03 : Caractères morphologiques des *Fusarium* D'après (Tabuc, 2007).

I.2.3. Genre *Penicillium*

Les espèces de *Penicillium* sont de saprophytes très répandus dans l'environnement, à l'origine de la dégradation des denrées alimentaires (Chabasse *et al.*, 2002). Ce genre comporte plus de 200 espèces, qui sont ubiquistes (Reboux *et al.*, 2010). *Penicillium* se développe bien et rapidement dans tous les milieux employés. La température optimale des cultures se situe aux environs de 27°C. A 37°C, le développement est très faible (Talice et Mackinnon, 1929).

Les espèces de ce genre se reconnaissent par la partie fertile, portant les spores, qui se développe en forme de pinceau dense. Le conidiophore est simple ou ramifié, et se termine par des groupes de phialides en forme de bouteille (Malloch et Lecomte, 1997) (Figure 04).

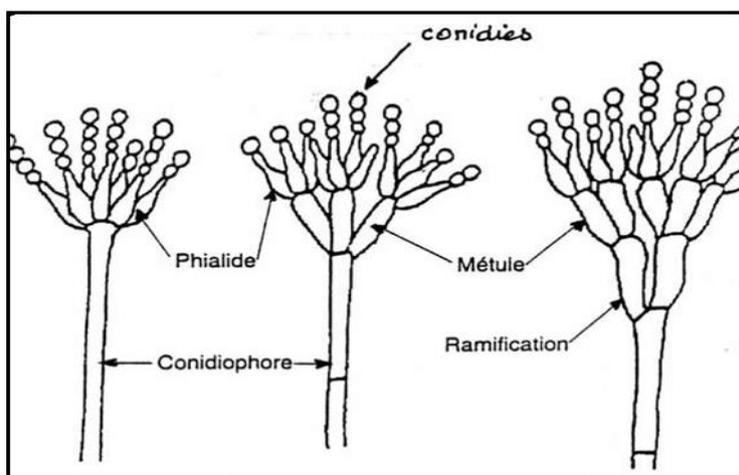


Figure 04 : Caractères morphologiques de *Penicillium* D'après (Cavalla, 2009).

I.2.4. Genre *Alternaria*

Le genre *Alternaria* est un saprophyte ou parasite des plantes, très répandu. Les colonies sont de croissance rapide (trois ou quatre jours) (DATABio, 2014). Les moisissures du genre *Alternaria* sont des champignons imparfaits, dont il existe 40 à 50 espèces, très cosmopolites. Les colonies sont de croissance rapide sur milieu Sabouraud entre 25 et 30°C (Chabasse *et al.*, 2002). Les spores sont de couleur brune foncée et naissent en chaînes simples ou ramifiées à l'extrémité de conidiophores simples et sombres ; elles sont divisées en plusieurs cellules par des parois transversales et verticales (Malloch et Lecomte, 1997) (Figure 05). Elles se développent principalement sur les végétaux en décomposition, notamment les céréales et les foin. Les spores d'*Alternaria* sont pluricellulaires, relativement grandes (20 à 80 µm), compartimentées par des cloisons ou septa, sont ovoïdes à la naissance, mais se prolongent à maturité par une sorte de bec qui leur confère peu à peu une forme en raquette ou en massue. Malgré leur grande taille, ces spores très aérodynamiques peuvent être transportées par le vent à des centaines de kilomètres de leur source (Besancenot *et al.*, 2011).

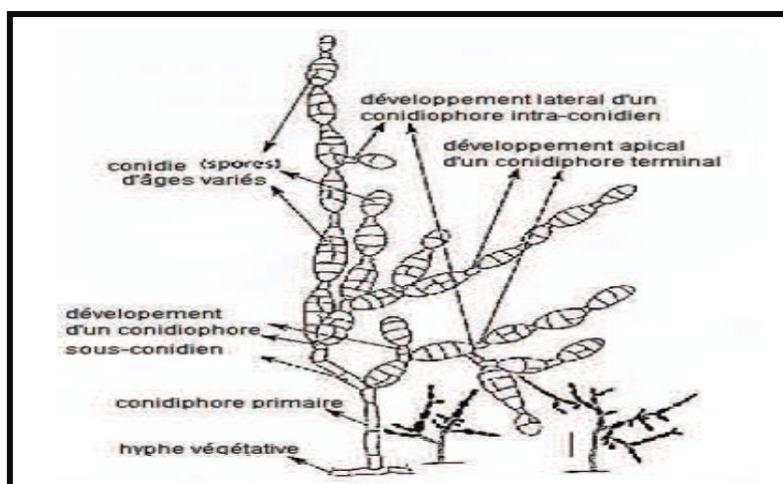


Figure 05 : Stades de développement des spores et des conidiophores d'*Alternaria* D'après (Simmons, 1999 Taralova *et al.*, 2011).

CHAPITRE II :
Mycotoxines

II.1. Généralités sur les mycotoxines

Le terme mycotoxine vient du grec *mycos* qui signifie champignon et du latin *toxicum* à cause des flèches empoisonnées donc poison (Steyn, 1995 ; Pitt *et al.*, 2000).

Selon Mannon et Johnson (1985), environ 25 % des denrées alimentaires sont contaminées par des mycotoxines, métabolites secondaires de diverses moisissures. La mycoflore est estimée entre 200 000 et 300 000 espèces. Les mycotoxines sont détectées dans une gamme variée de produits alimentaires tels que les oléagineux, les céréales, la viande, les épices et le lait des mammifères nourris aux aliments contaminés (Nikiéma, 1993 ; Sanou, 2000 ; Cho *et al.*, 2007). Les mycotoxines sont supposées être synergiques ou antagonistes. Toutefois, très peu d'écrits scientifiques traitent de cet aspect toxicologique (Quillien, 2002). Plusieurs sortes de mycotoxines sont retrouvées dans les aliments (Tableau 01), mais seulement certaines contaminent l'alimentation et sont toxiques pour la santé humaine et animale. Les mycotoxines les plus préoccupantes sont les aflatoxines (AF), la citrinine (CIT), les fumonisines (FB), l'ochratoxine A (OTA), les trichothécènes et la zéaralénone (ZEA). Elles sont responsables d'hépatotoxicité, néphrotoxicité, immunotoxicité, reprotoxicité et cancers (Pfohl-Leszkowicz, 2013).

Tableau 01 : Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments D'après (D'Mello & McDonald, 1997 ; Scudamore & Livesey, 1998 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999, CAST 2003).

Champignons	Toxines	Denrées
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines Ochratoxines A	Mais, cacahuète, graine de coton, riz, tissus, d'animaux (jambon, lard, saucisse), lait et dérivés
<i>Fusarium</i>	Zéaralénone, Fumonisines, Trichothécènes	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine
<i>Penicillium</i>	Patuline, Ochratoxine A, Citrinine	Fruit et jus de fruits, blé ; riz ; fromage, noix
<i>Alternaria</i>	Alternariol	Fruit, légumes et produits dérivés de pommes et tomates

II.2. Principales mycotoxines

II.2.1. Aflatoxines

Les aflatoxines représentent un groupe de dérivés structurellement apparentés au difurano-coumarine (Bhatnagar *et al.*, 2003). Ces substances sont produites par des espèces d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987).

Elles sont extrêmement toxiques et leurs effets secondaires incluent : la carcinogénicité, la mutagénicité, la tératogénicité et l'immunosuppression (Eaton et Gallagher, 1994). Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1. Parmi les aflatoxines, l'AFB1 est la plus fréquente et la plus toxique. Elle est considérée comme étant le plus puissant hépatocancérigène pour les mammifères et elle est classée en tant que cancérigène probable du groupe 1 par l'agence internationale de la recherche sur le cancer (IARC, 1993). Certaines souches du genre *Aspergillus* produisent des aflatoxines qui sont des métabolites secondaires reconnus cancérigènes, immunosuppressives et tératogènes (WHO, 2006).

II.2.2. Citrinines

En 1993, la citrinine (CIT) a été utilisée comme un antibiotique, mais finalement elle a été rejetée à cause de sa toxicité (Adams *et al.*, 2002). La CIT est produite principalement par *Penicillium citrinum* mais aussi par *Penicillium expansum* et *Penicillium verrucosum* et quelques espèces du genre *Aspergillus* et *Monascus* (Kurata, 1990 ; Liu *et al.*, 2003). La CIT est toxique pour l'Homme et l'animal (CAST, 2003). Plusieurs études ont montré que la CIT est cytotoxique, génotoxique, mutagène, immunotoxique et tératogène (Liu *et al.*, 2003 ; Bouslimi *et al.*, 2008).

II.2.3. Fumonisines

Les fumonisins sont un groupe de mycotoxines non fluorescentes (FB1, FB 2 et FB3 étant les entités principales) produit principalement par *F. verticillioides* et *F. proliferatum* (CAST, 2003).

Les fumonisines se concentrent dans les eaux de trempage. Pour du maïs faiblement contaminé (1,0 pg/kg), aucune toxine n'a pu être détectée dans les fractions traitées autres que l'eau de trempage (Bennett *et al.*, 1996). Pour du maïs fortement contaminé (13,9 mg/kg), une partie de la toxine est retrouvée dans les eaux de trempage et de traitement, les autres fractions contaminées étant par ordre décroissant : gluten > fibre > germe (Ross *et al.*, 1991).

II.2.4. Ochratoxines

L'ochratoxine est un métabolite secondaire élaboré par diverses moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. La production d'OTA est liée aux conditions de température, d'humidité ambiante, et de teneur en eau du support contaminé (Pitt, 1987).

L'ochratoxine A a été isolée pour la première fois en 1965, par un groupe de chercheurs sud-africains à partir d'un isolat d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Elle est également une mycotoxine toxique pour l'Homme et les animaux (O'callaghan *et al.*, 2003).

L'OTA possède des effets néphrotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérigènes (Kuiper-Goodman et Scott, 1989 ; Mantle et McHugh, 1993 ; Kuiper-Goodman, 1996 ; Höhler, 1998 ; Pfohl-Leszckowicz et Castegnaro, 1999).

II.2.5. Trichothécènes

Les trichothécènes sont sécrétés par certaines espèces de *Fusarium*, en premier lieu dans les champs sur les épis de céréales (blé, orge, maïs, avoine) dans certaines conditions atmosphériques propices à la croissance de ces *Fusarium* (printemps ou été froid et humide) (IARC, 2002).

On classe les trichothécènes en 4 groupes (A, B, C et D), les groupes A et B étant les plus importants en termes de prévalence naturelle (AFSSA, 2006).

II.2.6. Zéaralénones

La zéaralénone est produite par des *Fusarium* qui peuvent se retrouver dans les céréales notamment lorsque celles-ci ont été stockées dans de mauvaises conditions à des températures relativement basses et exposées à l'humidité. La ZEN induit des cancers hépatiques et de la glande pituitaire, mais à des doses nettement supérieures aux doses engendrant un effet hormonal (WHO, 2002). Pour cette raison, elle n'est pas considérée comme étant elle-même cancérigène. Les effets seraient dus à l'effet hormonal. Néanmoins, la zéaralénone est génotoxique et forme des adduits à l'ADN (Pfohl-Leszckowicz *et al.*, 1995). Le plus souvent cette mycotoxine est trouvée dans le maïs. Cependant, on la trouve également dans d'autres récoltes importantes telles que le blé, l'orge, le sorgho et le seigle dans divers pays du monde. (CAST, 2003).

II.3. Effets des mycotoxines sur la santé humain

Les moisissures sont secrétées des toxines qui donnent effets pour l'homme avec différentes mécanismes d'action cellulaires et moléculaires (tableau 02).

Tableau 02 : Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement D'après (Afssa, 2006).

Toxines	Effets	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B ₁ +M ₁	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN Peroxydation lipidique Bioactivation par cytochromes P ₄₅₀ Conjugaison aux GS-transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité immuomodulation	Impact sur la synthèse des protéines. Inhibition de la production d'ATP Détoxification par les peptidases
Patuline	Neurotoxicité Mutagenèse in vitro	Inhibition indirecte d'enzymes
Trichothécènes (Toxine T- ₂ , DON ,...)	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l'apoptose sur progéniture hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines Altération des immunoglobulines
Zéralénone	Fertilité et Reproduction	Liasion aux récepteurs ostrogéniques Bioactivation par des réductases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B ₁	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide Altération du rapport Sphinganine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

CHAPITRE III :

Pectinases

III.1. Généralités sur la pectine

Au cours des dernières années, on constate une recrudescence de ces maladies, que ça soit au champ avant récolte ou durant le stockage. La propagation de ces pathogènes est principalement due à la production d'un large panel d'enzymes extracellulaires de dégradation, notamment les pectinases, qui liquéfient les tissus en détruisant les parois végétales (Priou et Jouan, 1990).

La pectine est l'un des composants majeurs de la paroi cellulaire des plantes dicotylédones et probablement l'une des macromolécules les plus complexes de la nature. Elle est présente dans les lamelles moyennes, les parois primaire et secondaire et se dépose aux premiers stades de croissance pendant l'expansion cellulaire. Elle offre aux plantes de nombreuses fonctionnalités allant de la rigidité des tissus à la résistance aux agents pathogènes des plantes. Les substances pectiques ont également un impact important sur la qualité des aliments frais et transformés particulièrement les fruits et les légumes (Schols *et al.*, 2009).

La pectine extraite de sources végétales appropriées est utilisée comme ingrédient alimentaire pour ses fonctionnalités gélifiantes, stabilisantes et épaississantes. Les produits végétaux, frais, extraits ou transformés, constituent une part importante du régime alimentaire humain. Comme Fibre, naturellement présente dans ces produits alimentaires, les substances pectiques remplissent une fonction nutritionnelle et acquièrent un intérêt croissant en tant que polysaccharide bénéfique pour la santé (Schols *et al.*, 2009).

Selon Leroux et Schubert (1983), les pectines sont divisées en référence à leur degré de méthylation en deux catégories :

- Les pectines hautement méthylées ou H.M (High Methoxyl), ce sont les pectines dont plus de 50% des groupements carboxyles sont estérifiés avec le méthanol.
- Les pectines faiblement méthylées ou L.M (LowMethoxyl), ce sont les pectines dont moins de 50% de groupements carboxyles sont estérifiés.

III.2. Enzymes Pectinases ou pectinolytiques

III.2.1. Définition

Les enzymes pectinolytiques ou pectinases sont un groupe hétérogène d'enzymes qui hydrolysent les substances pectiques et qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et les micro-organismes. Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines. Le terme «enzyme pectinolytique» ne concerne que les enzymes qui agissent sur la partie galacturonique des substances pectiques et les enzymes capables de dégrader les chaînes latérales ne sont pas classées parmi les pectinases. La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique. *A. niger* est la source fongique la plus communément utilisée pour la production industrielle d'enzymes pectinolytiques (Jayani *et al.*, 2005).

III.2.2. Rôle et Source

Les enzymes pectiques sont largement répandues dans la nature et sont produites par des bactéries, des levures, des champignons et des plantes (Gummadi *et al.*, 2002). Elles sont très importantes car elles jouent un rôle dans l'allongement et la croissance cellulaire ainsi que dans la maturation des fruits (Whitaker, 1990 ; Sakai, 1992).

Les pectines méthylestérases (PME) et les polygalacturonases (PG), apparaissent jouer un rôle clef dans la régulation des phénomènes de croissance et développement de la plante (Donaghy *et al.*, 1994).

L'activité pectinolytique des micro-organismes joue un rôle important dans la pathogénèse des plantes, ces enzymes étant les premières à s'attaquer aux tissus (Collmer et Keen., 1986). En outre, elles sont également impliquées dans le processus de symbiose et la décomposition des résidus végétaux (Lang *et al.*, 2000 ; Hoondal *et al.*, 2002).

III.2.3. Classification

Les pectinases sont divisées en trois divisées : les pectines estérases, les dépolymérase (hydrolases, lyases) décomposent les liaisons α - (1- 4) glycosidiques entre les résidus galacturoniques via:

1. L'hydrolyse (polygalacturonases)
2. La transélimination (pectine lyases et pectate lyases). Ces sous-enzymes sont également subdivisées en endo si leur mode d'action est aléatoire ou exo-si leur modèle d'action se situe à l'extrémité du terminal (Rexová-Benková *et al.*, 1976 ; Fogarty *et al.*, 1983 ; Sakai, 1992). Et les protopectinases selon les critères suivants:

- 1- Si le substrat préféré est la pectine, l'acide pectique ou l'oligo-D-galacturonate

2- Si elles agissent par trans-élimination ou hydrolyse

3- Si le clivage est aléatoire (enzymes endo, liquéfiantes ou dépolymérisantes) ou ‘endwise’ (enzymes exo- ou saccharifiantes) (Alkorta *et al.*, 1998).

Les protopectinases solubilisent la protopectine en formant une pectine soluble. L'estérase (pectine méthylestérase et pectine acétyl estérase) élimine les résidus méthoxyle et acétyle de la pectine donnant naissance à l'acide polygalacturonique (Rexová *et al.*, 1976 ; Fogarty *et al.*, 1983 ; Sakai, 1992).

Les pectinases sont divisées en deux grands groupes : Les pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME) et les dépolyméras (polygalacturonases et lyases) (Rexová-Benková *et al.*, 1976).

Les principales pectinases sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau 03: Les principales pectinases D'après (Renard, 2010).

Nom	N°	Type	Substrat	Produits	Autres
Pectine méthylestérase	EC 3.1.1.11	Hydrolase	Haut DM	Méthanol + GalA	Fongique (pH 4.5) ou plantes (pH 7)
Polygalacturonase					
endo	EC 3.2.1.15	Hydrolase	Pectate	Chaînes plus courtes, oligos	Viscosité; pH 4-5
exo	EC 3.2.1.67	Hydrolase	Pectate	Mono OU dimère	Extrémité non-réductrice
Pectine-lyase	EC 4.2.2.10	Lyase; endo	Haut DM	Chaînes plus courtes	pH opt: 6
Pectate-lyase					
endo	EC 4.2.2.2	Lyase	DM bas		pH opt: 8-9
exo	EC 4.2.2.9	Lyase		Dimères	

II.2.3.1. Pectinestérases (PE) ou pectine-méthylestérases (PME)

Les PE catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques des pectines HM, entraînant la libération de méthanol et la formation d'acide polygalacturonique (Agnan *et al.*, 2010). L'activité de la PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyles libres ou encore en utilisant un régulateur de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variation du pH (Jayani *et al.*, 2005). Les PE sont présentes dans de nombreux végétaux supérieurs et elles peuvent être extraites de divers fruits tels que la banane, l'orange, la tomate, la papaye et la pomme (Denès *et al.*, 2000). Elles peuvent être aussi produites par des champignons, des bactéries et des levures. Les PE des végétaux, très spécifiques des esters méthyliques des acides pectiques (Sakai *et al.*, 1993).

Selon Jayani *et al.* (2005), le mécanisme d'action des PE varie en fonction de l'origine. Ainsi, les PE fongiques agissent au hasard suivant un mécanisme «multi-chaîne» par lequel l'enzyme forme un complexe enzyme substrat, se dissocie après la réaction et s'associe à nouveau avec une autre molécule du substrat pour enlever les groupes méthyles.

Les PE des végétaux tendent à agir à l'extrémité non réductrice ou à côté d'un groupe carboxyle libre le long de la molécule par un mécanisme «unichaine» où le substrat est progressivement déméthylé jusqu'à ce que l'enzyme atteigne l'extrémité de la chaîne ou un résidu qui bloque sa progression pour se dissocier du complexe enzyme-substrat (Cameron *et al.*, 2008). La PE est inhibée par l'augmentation du nombre des carboxyles libres le long des chaînes polygalacturoniques progressivement déméthylées. Cette inhibition est due à la répulsion exercée par la charge négative des carboxyles ionisés. La présence de cations (Ca^{2+} , Na^+) pourrait contrecarrer cette inhibition. Cette inhibition des PE serait également due aux chaînes latérales des sucres neutres dans la molécule de pectine (Sakai *et al.*, 1993).

III.2.3.2. Dépolymérases

Les dépolymérases sont des hydrolases (polygalacturonase et lyases) qui possèdent des activités endo-ou exo-galacturonases. Les dépolymérases peuvent être subdivisées, en fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, on distingue quatre catégories différentes :

1. Les polygalacturonases(PG),
2. Les polyméthylgalacturonases(PMG),
3. Les polygalacturonatélyases (PGL),
4. Les polyméthylgalacturonate lyases (PMGL) (Agnan *et al.*, 2010).

Les PG et PMG agissent respectivement sur les pectates et les pectines par un mécanisme d'hydrolyse, tandis que les PGL et PMGL agissent respectivement par β -élimination sur les pectates et les pectines (Alkorta *et al.*, 1998). Suivant leur mode d'action (Figure 06), la réaction peut se faire soit de manière aléatoire, soit à l'extrémité de la chaîne, ce qui permet de distinguer les endo- et les exo-dépolymérases (Jayani *et al.*, 2005).

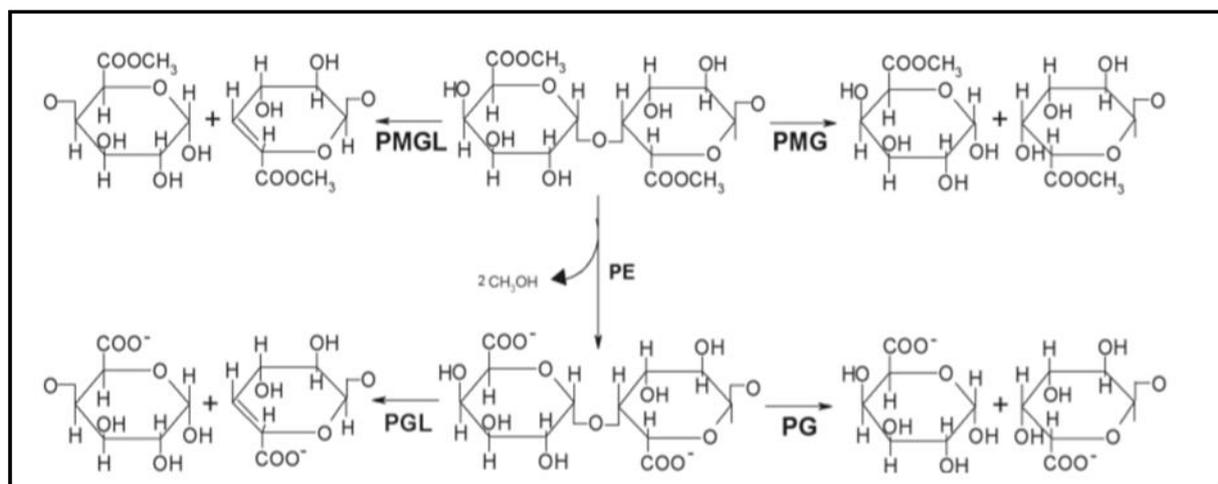


Figure 06 : Mode d'action des pectinases D après (Agnan *et al.*, 2010).

PMGL: Polyméthylgalacturonate lyase; PMG: Polyméthylgalacturonas; PE: Pectinestérase; PGL : Polygalacturonate lyase; PG: Polygalacturonase.

III.2.3.2.1. Polygalacturonases (PG)

Les PG sont des enzymes pectolytiques qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques α - (1-4) des pectines acides (acide polygalacturonique). Ces enzymes sont spécifiques des substances pectiques non ou partiellement estérifiées par du méthanol. Elles sont les plus étudiées parmi la famille des enzymes pectolytiques. Les PG impliquées dans l'hydrolyse des substances pectiques sont des endo-PG (EC3.2.1.15) et des exo-PG (EC3.2.1.67) (Jayani *et al.*, 2005). Deux méthodes ont été développées pour déterminer l'activité des PG et des PMG. On apprécie cette activité en mesurant la diminution de viscosité ou l'augmentation du pouvoir réducteur du substrat (acide pectique ou pectine) (Agnan *et al.*, 2010). La comparaison des mesures de viscosité et de pouvoir réducteur au cours de la dépolymérisation des pectines et des acides pectiques permet de faire la part des activités «endo» et «exo». Ainsi, avec une endo-PG, la viscosité diminue de moitié quand seulement 2 à 3% des liaisons glycosidiques sont rompues. Avec une exoPG, la même diminution de la viscosité n'est observée qu'après rupture de 20% des liaisons glycosidiques (Sakai *et al.*, 1993; Jayani *et al.*, 2005).

Les endo-PG sont produites par divers microorganismes tels que des bactéries, des levures et des moisissures. Elles sont aussi présentes chez certains végétaux et surtout dans les fruits. En général, l'action des endo-PG libère des mono-, di- et tri-acides galacturoniques par un mécanisme d'attaque multiple à chaîne unique ou par un mécanisme d'action «multi-chaîne», dans lequel les mono-, di- et trimères s'accumulent seulement après hydrolyse des produits initiaux de dépolymérisation. Pour les pectines HM, l'hydrolyse n'a lieu qu'au

niveau des résidus d'acide galacturoniques non méthylés. Toutefois, lors que le DM augmente, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme diminue (Sakai *et al.*, 1993).

Les exo-PG sont moins fréquentes. Elles sont produites par des moisissures et quelques bactéries. On distingue deux types: les exo-PG fongiques avec comme produit final l'acide galacturonique et les exo-PG bactériennes qui produisent principalement l'acide digalacturonique. Les PG isolées des différentes sources microbiennes diffèrent nettement entre elles par leurs propriétés physico-chimiques et leur mode d'action (Alkorta *et al.*, 1998).

III.2.3.2.2. Lyases ou transéliminases

Les lyases dégradent la pectine, les oligomères et les polymères d'acide galacturonique. Ce sont des enzymes qui rompent la liaison glycosidique C-O par un mécanisme de β -élimination (Figure 05). Leur action dépolymérisante entraîne la libération d'uronides insaturés et d'oligomères de petite taille. La méthode la plus commode pour suivre l'activité des lyases est la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 235 nm due à la double liaison produite à l'extrémité non réductrice des composés insaturés. De plus, les méthodes de détermination de l'activité des PG peuvent également être utilisées pour les lyases. Les lyases sont classées en différents types sur la base de leur mode d'action et en fonction du substrat sur lequel elles agissent. Comme pour les PG, selon que la réaction enzymatique se fait au hasard ou à l'extrémité de la chaîne, on distingue les endo- et les exo-lyases (Agnan *et al.*, 2010).

Les PGL sont produites par plusieurs bactéries et quelques moisissures pathogènes, avec les endo-PGL plus abondantes que les exo-PGL. Les PMGL sont produites par *A.japonicus*, *P.paxilli* et *Pichiapinus*. La plupart des lyases sont d'origine microbienne. Les lyases bactériennes constituent le plus grand groupe d'enzymes pectolytiques. Les PGL sont activées par les ions Ca^{2+} et, dans certains cas, par d'autres ions divalents tels que Mg^{2+} , Co^{2+} et Sr^{2+} . Elles sont, par contre, inhibées par l'agent chélateur EDTA. Les PMGL sont par contre actives en absence d'ions Ca^{2+} , mais la présence de Ca^{2+} ou celle d'autres cations les stimule. Les PMGL sont les seules dépolymérases capables de dégrader les pectines HM sans action préalable d'autres enzymes (Jayani *et al.*, 2005).

III.2.4. Application

La pectine additive naturelle utilisée intensivement dans l'industrie alimentaire est l'un des fruits de la valorisation des sous produits. Sa demande sur le marché mondial est au-dessus de 30.000 tonnes annuellement et se développe d'environ 4 – 5 % par an (Yeoh *et al.*, 2008).

Appartenant aux enzymes de la famille des hydrolases telles que, l' α -amylase, la cellulase, les pectinase sont parmi les plus importantes enzymes à l'échelle industrielle, ce qui les rendent l'un des outils-clés des biotechnologies (Multon, 1991).

Ces enzymes sont classées parmi les enzymes les plus importantes dans le secteur industriel (Kashyap, *et al.*, 2001), et les pectinases alcalines faisant l'objet d'une immense utilisation dans le dégommeage des fibres de ramie (Cao *et al.*, 1992), Pourtant en réponse à l'extrême usage biotechnologique de ces enzymes, ces dernières sont produites par plusieurs organismes comme les champignons (Aguilar et Huitron, 1990), les levures (Gainvors et Belarbi, 1995).

Les pectinases ont été utilisées, depuis plusieurs années, dans plusieurs industries, comme les textiles, le thé, le café, l'extraction des huiles, le traitement des eaux usées industrielles, etc. Ces enzymes pectolytiques sont employées par l'industrie de transformation des fruits pour augmenter le rendement et améliorer la liquéfaction et la clarification (depectinisation) (Be'laf-Bako *et al.*, 2007).

Le prétraitement par boues activées, des eaux usées contenant des pectines (provenant de rejets de sous produits d'unités d'industries de légumes) avec des enzymes pectinolytiques facilite ce traitement (Ranveer *et al.*, 2005).

Le traitement du thé par les pectinases accélère sa fermentation et inhibe aussi la formation des propriétés moussantes de sa poudre instantanée par destruction des pectines. Ces mêmes enzymes sont utilisées dans la fermentation du café pour enlever la couche mucilagineuse des grains de café (Ranveer *et al.*, 2005).

Les huiles d'agrumes, comme l'huile de citron peuvent être extraites par les pectinases. Celles-ci détruisent les propriétés émulsifiantes des pectines, ce qui interfère avec la collection d'huiles des extraits de peaux de citron (Ranveer *et al.*, 2005).

Les enzymes jouent un rôle essentiel dans la technologie des jus de fruits. Les préparations d'enzymes pectolytiques et amylolytiques interviennent depuis plus de 60 ans dans la production des jus de pommes et de baies. Ces enzymes pectolytiques sont employées par l'industrie de transformation des fruits pour augmenter le rendement et améliorer la liquéfaction et la clarification (de pectinisation) (Be'laf-Bako *et al.*, 2007).

CHAPITRE IV :

Matériel et méthodes

IV.1. Objectifs du travail

L'objectif essentiel de ce travail est le dosage des enzymes pectinolytiques pour pouvoir établir un lien entre la sécrétion enzymatique et le degré de la pathogénicité, ainsi, le travail consiste à isoler et identifier la microflore fongique mycotoxinogène des grains de fève sèche commercialisées dans la région de Tiaret ; et cela, a pour but de contribuer à l'amélioration de l'état et des conditions de stockage des grains secs.

IV.2. Lieu et période du travail

Notre travail a été réalisé au niveau des laboratoires de microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun, Tiaret, durant une période de deux mois, du 18 Février jusqu'au 19 Avril 2019.

IV.3. Matériel utilisé

IV.3.1. Matériel végétal

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé cinq (5) échantillons de grains de fève sèche, qui ont été collectés à partir de cinq communes différentes de la région de la wilaya de Tiaret (Ain Dhab, Hamadia, Sidi housni, Machraa sfa, Oued Lili), pendant de leur stockage 2 ans, achetée par un vendeur de magasin qui fait le stockage avec condition différante (ventilation, humidité, température,...) (Figure 07).



Figure 07: Grains de fève sèche.

IV.3.2. Milieux de culture

Deux milieux synthétiques ont été utilisés pour isolement et la purification des moisissures à partir des grains de fève sèche (PDA et Agar 2%). Le milieu Czapeck-Dox modifié a été utilisé pour faire le dosage de l'activité pectinolytique.

IV.3.3. Appareillage, produits, verrerie et matériel consommable

L'appareillage, les produits, la verrerie et le matériel consommable utilisés dans notre travail sont illustrés sur le Tableau 04.

Tableau 04: Appareillage, produits, verrerie et matériel consommable utilisés.

Appareillage et autres	Produits	Verrerie et matériel consommable
-Agitateur « IKAMAG AH)	-Amidon ($C_6H_{10}O_5$)	-Ance de platine
-Autoclave « WOLF, WESKZEUG VORRICGTUNGSBAU 7340 GEISLINGEN ».	-Acide chlorhydrique (HCl)	-Bécher
-Bain marie « MEMMERT ».	-Acide polygalacturonique (polygalacturonase)	-Boîtes de Pétri
-Balance analytique « KERN ».	-Acide sulfurique (H₂SO₄)	-Éprouvettes
-Balance ordinaire « KERN ».	-Alcool	-Flacons
-Bec Bunsen	-ATB (céfazoline)	-Lames
-Four Pasteur « HERAEUS ».	-Carbonate de Sodium (NaCO₃)	-Pipette Pasteur
-Incubateur « MEMMERT 854 SCHWABACH WGERMANY ».	-Eau distillé stérile	-Tube à essai
-Microscope optique « OPTIKA B-350 ».	-Hydrochlorique de Sodium (NaOH)	-Pipettes graduées
-pH mètre « LEYBOLD HERAEUS.62865 ».	-Hypochlorite de Sodium (Eau de Javel)	-Barreau magnétique
-Vortex « TECHNO KARTELL TK3S ».	-Iode (I₂)	-Portoir de tube à essais
	-Pectine	-fiole jaugée
	-Thiosulfate de Sodium (Na₂S₂O₃)	-Ruban adhésif
		-Erlenmeyers
		-Burette
		-Compresses stériles
		- film alimentaire
		- Aluminium
		- seringues
		-les gants médicaux et masques (bavette)
		-Papier absorbant

IV.4. Protocole expérimental

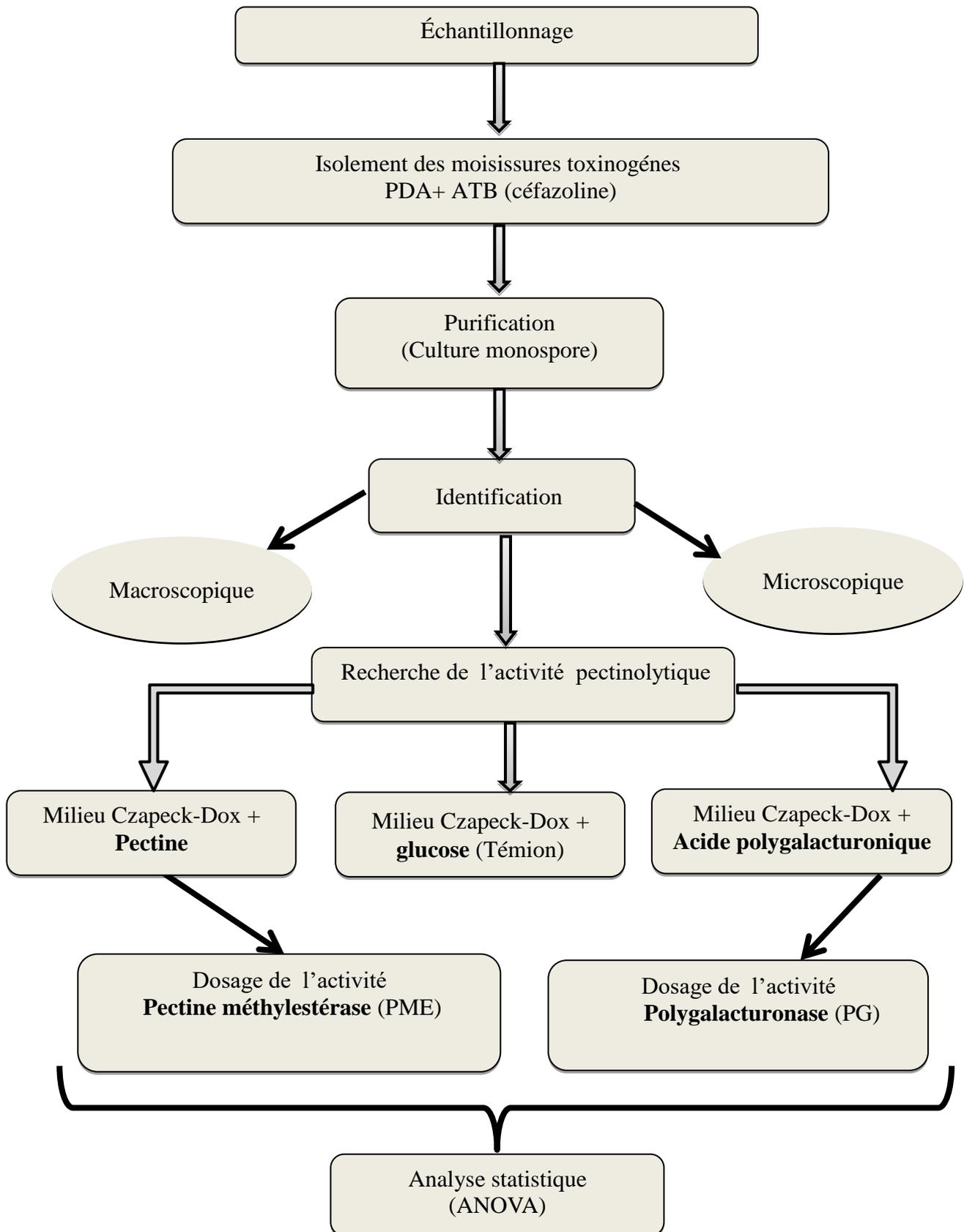


Figure 08: Schéma du protocole expérimental

IV.5. Isolement des champignons à partir des grains de fève sèche

L'isolement a été réalisé en se basant sur la technique, qui décrite par Davet et Rouxel (1997) avec quelques modifications. Nous avons désinfecté les grains de fève sèche avec l'hypochlorite de Sodium (Eau de Javel à 30%) pendant trois minutes, pour éliminer les bactéries, suivi de trois rinçage avec l'eau distillée stérilée pour éliminer les traces de l'eau javel. Après, nous avons déposé deux grains de fève sèche dans une boîte Pétri (de chaque région) contenant le milieu PDA plus ATB (cefazoline) (Figure 09). Le travail s'est déroulé dans la zone d'asepsie. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 72 heures.



Figure 09 : Isolement des moisissures à partir des grains de fève sèche

IV.6. Purification des isolats fongique

La purification des isolats a été réalisée selon la méthode décrite par Henni *et al.* (1994) par culture monospore avec quelques modifications. Cette technique basée sur la préparation de dilutions décimales à partir d'un fragment de mycélium. Nous avons agité vigoureusement au vortex pour libérer les conidies, puis réalisé des dilutions jusqu'à 10^{-2} conidies/ml. En suite, nous avons déposé et étalé à l'aide d'un râteau quelques gouttes sur la surface de la boîte de Pétri qui contient le milieu Agar 2 %. Après incubation à 28°C pendant 24 à 72 heures, une observation à l'œil nu a été réalisé pour repiquer les germinations et les déposées sur une boîte de Pétri contenant le milieu PDA et ATB (cefazoline). Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours. La Figure 10 représente les étapes de la purification.

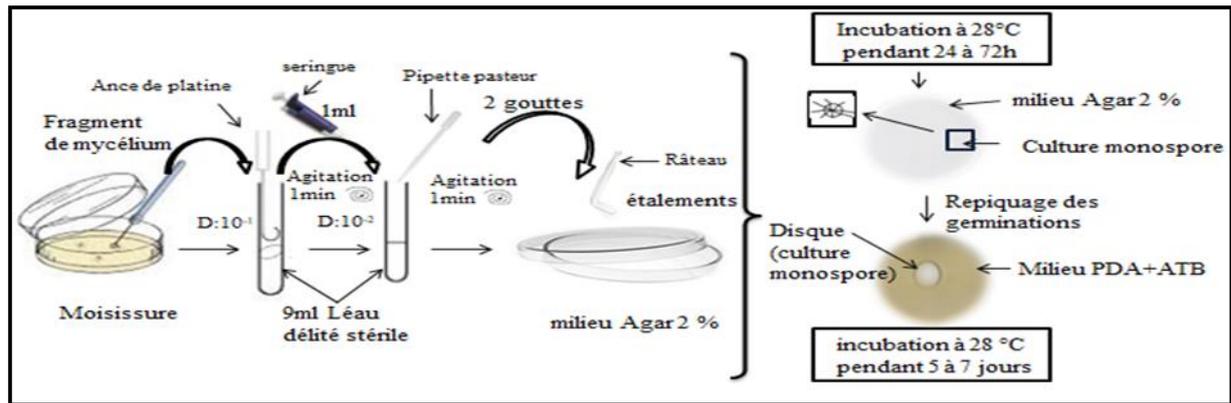


Figure 10: Schéma des différentes étapes de la purification du champignon par culture monospore

IV.7. Identification des isolats fongiques

L'approche classique d'identification des champignons filamenteux a été utilisée. Elle est basée sur les critères de classification observables macroscopiquement et microscopiquement (Carlotti, 2014).

IV.7.1. Identification macroscopique

L'identification macroscopique des champignons se base sur des observations à l'œil nu et repose sur l'étude des caractères culturaux (la pigmentation de la face et de l'envers des colonies, la vitesse de croissance, le contour des colonies et l'aspect du mycélium) (Booth, 1984 ; Nelson *et al.*, 1981).

IV.7.2. Identification microscopique

L'observation microscopique a été réalisée en utilisant la technique du drapeau décrite par Guezlane-Tebibel *et al.* (2011). A l'aide du ruban adhésif, nous avons prélevé une empreinte fongique des extrémités des colonies, puis nous avons déposé une goutte de bleu de méthylène sur lame et recollé le ruban. L'observation a été réalisée par microscope optique aux différents grossissements (Figure 1).

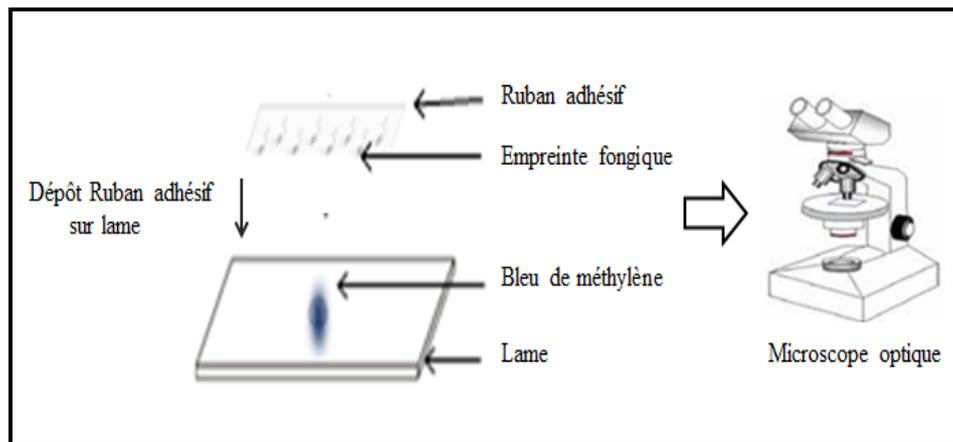


Figure 11 : Schéma de la technique du drapeau utilisée pour l'observation microscopique d'une empreinte fongique.

IV.8. Recherche de l'activité pectinolytique des isolats

Pour la recherche de l'activité pectinolytique, nous avons utilisé le milieu Czapeck-Dox modifié (Karkachi, 2013). Nous avons préparé un volume de ce milieu réparti sur trois (03) Erlenmeyers. Nous avons ajouté 1 % de chaque substrat (pectine, glucose et acide polygalacturonique) comme seule source de carbone au milieu. Le pH a été ajusté à 7.2. Les milieux obtenus ont été autoclavés à 121°C pendant 20 minutes. Chaque Erlenmeyer a été inoculé par trois (03) disques de la souche fongique mycotoxinigène *Penicillium* obtenue. Les Erlenmeyers ont été incubés à 28°C pendant 10 jours dans un bain marie secoueur. Le milieu où nous avons ajouté du glucose est utilisé comme témoin.

IV.8.1. Filtration

Après 10 jours d'incubation, nous avons procédé à une filtration à l'aide d'une compresse stérile, suivie de la mesure de la masse mycélienne, ainsi que du pH des filtrats de cultures. Ces derniers ont été mis dans des tubes à visse stérilisés (Karkachi, 2013).

IV.8.2. Dosage de l'activité Pectine méthylestérase (PME)

Selon Karkachi (2013), Pour procéder au dosage des PME, nous avons procédé au protocole expérimental ci-dessous. La préparation dans des tubes à essais (test et témoin), elle a été réalisée comme suite (Figure 12) :

La préparation des échantillons	Test	Témoin
Filtrat de culture	1 ml	1 ml
Solution de pectine 0,5%	10 ml	10 ml
Ajusté le pH avec NaOH	pH 7	/

Puis Incubé le témoin à 100°C pendant 15 min

Ajusté le pH avec NaOH	/	pH 7
------------------------	---	------

Fait Incubation (le test et le témoin) à 30°C pendant 3 heures

Puis titrés avec NaOH 0.05N jusqu'à le point équivalent

Ensuite la mesure de cette activité :

$$\text{Activité en U/mol} = \frac{\text{Volume du NaOH (ml)} \times \text{Normalité du NaOH (N)} \times 10^3}{\text{Temps (min)} \times \text{Volume du filtrat (ml)}}$$

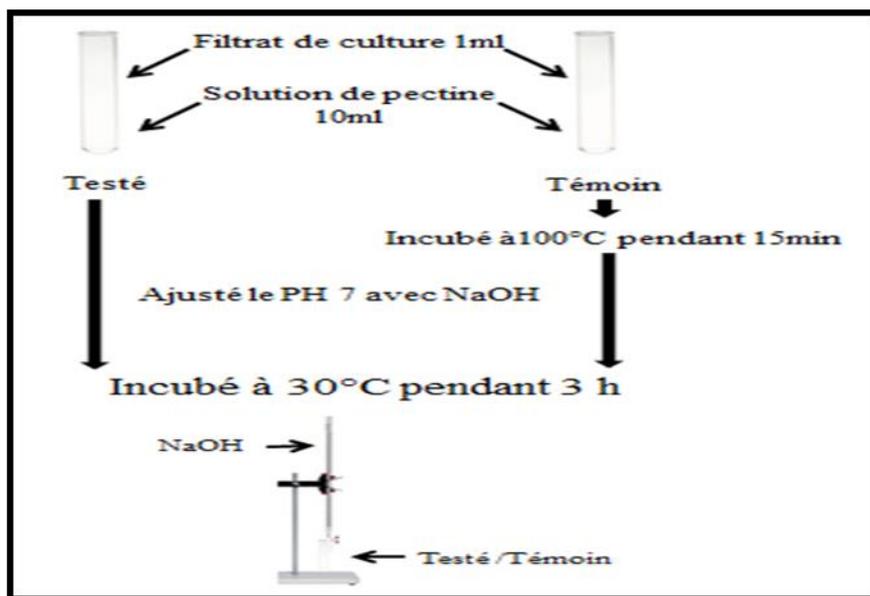


Figure 12: Schéma du dosage de l'activité PME.

IV.8.3. Dosage de l'activité Polygalacturonase (PG)

Selon Karkachi (2013), Pour procéder au dosage des PG, nous avons procédé à la préparation des tubes à essais (test et témoin) (Figure 13), elle s'effectue comme suite :

La préparation des échantillons	Test	Témoin
Filtrat de culture (ajusté au pH 7)	3ml	3ml
Solution de PG 0,6% (ajusté au pH 4)	12ml	12ml

Puis sont incubé à 30°C pendant 2 heures

On prélevé 5 ml de cette filtrat et détruire dans des erlenmeyer chaque erlenmeyer sont reçoit :

1ml de carbonates de sodium NaCO₃ (1M)

5ml d'iodure I₂ (0.05M)

Les erlenmeyer sont déposées pendants 20 min puis on ajoute :

Acide sulfurique H ₂ SO ₄ (2N)	2ml	2ml
Filtrat de la culture	37ml	37ml

Pour titrer on mélange :

Thiosulfate de sodium (Na ₂ S ₂ O ₃)	0.1N	0.1N
Amidon (C ₆ H ₁₀ O ₅)	1%	1%

Ensuite la mesure de cette activité :

$$\text{Activité} = \frac{(A) (B) (\text{Témoin (ml)} - \text{Test (ml)}) (Fd)}{\text{Temps (min)} \times \text{Volume (ml)} \times u_{eq}}$$

A : 1umole acide galacturonique oxydé par 1micro-équivalent de l'iode I₂

B : micro-équivalent de S₂O₂/ml de la solution thiosulfate de sodium

Fd : facteur de dilution

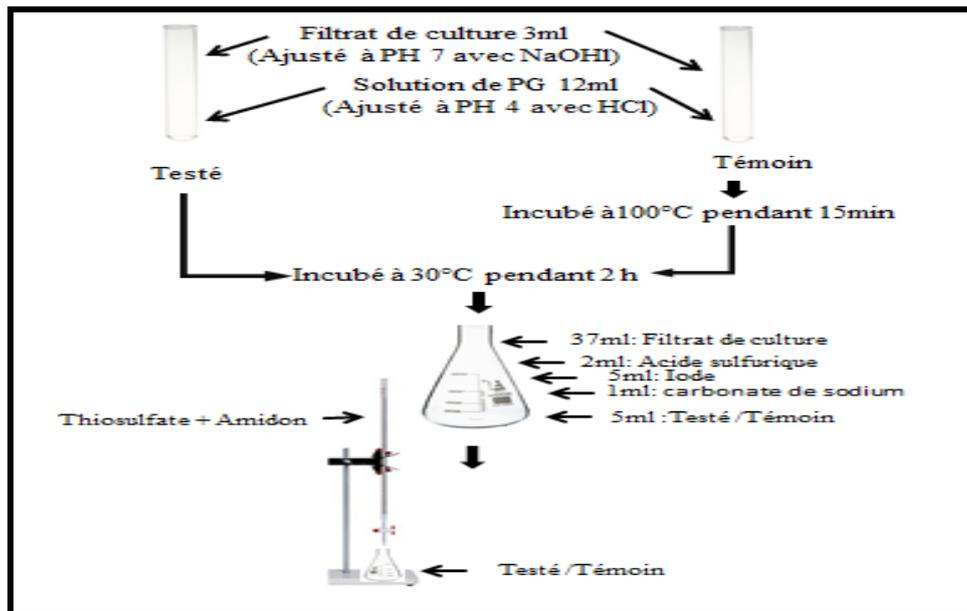


Figure 13: Dosage de l'activité polygalacturonase

IV.9. 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 V :

Résultat et discussion

V.1. Résultats

Nous avons isolé et identifié des moisissures mycotoxinogènes à partir des grains de fève sèche dans cinq communes de la wilaya de Tiaret.

V.1.1. Isolement des souches fongiques à partir de différents grains de fève sèche

Après 05 à 07 jours d'incubation à 28°C, nous avons remarqué la croissance fongique au tour des grains de fève sèche dans 05 communes de la wilaya de Tiaret (Figure 14), avec différents pourcentages (Tableau 05).



Figure 14: Isolement des champignons à partir des grains de fève sèche.

Tableau 05: Pourcentage de la population fongique isolée à partir de la fève sèche commercialisé dans la région de Tiaret.

Région	Pourcentage de la population fongique (%)
Ain Dhab	66,66
Hamadia	66,66
Machraa Sfa	33,33
Oued Lili	50,00
Sidi Hosni	50,00

Le pourcentage d'Ain Dhab et Hamadia est plus élevé, correspondant à 66,66%. Un pourcentage de 50,00% pour les échantillons des régions Oued Lili et Sidi Housni, et avec un faible pourcentage dans la région Machraa Sfa 33,33%.

V.1.2. La Purification des isolats

La purification par culture monospore (Figure 15), nous a permis d'obtenir 6 souches purifiées parmi un total de 16 souches fongiques. La région Ain Dhab comporte 4 souches, correspondant à 25% de la population fongique isolée. Le même résultat pour la région Hamadia a été observé. Les régions Oued Lili, Sidi Housni, comportent 3 souches correspondant à 19%. Un faible pourcentage de 12 %, correspondant à la région de Machraa Sfa représentée par deux souches (Figure 16).

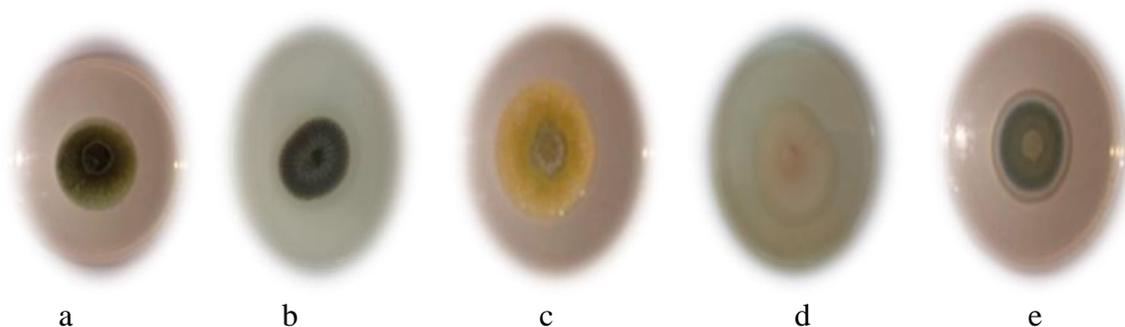


Figure 15: Purification par culture monospores des souches.
a: *Alternaria*, b et c : *Aspergillus*, d : *Fusarium*, e : *Penicillium*.

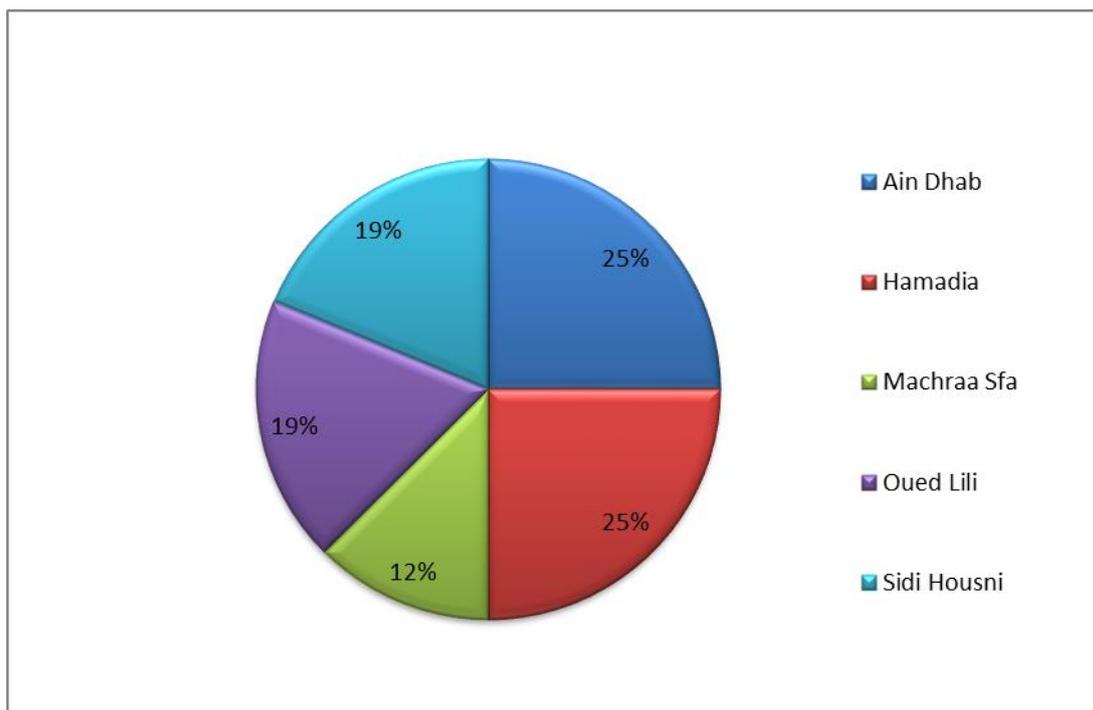


Figure 16: Pourcentage de contamination de chaque région après la purification.

V.1.3. Identification des isolats fongiques

Pour identifier des isolats fongiques, il a fallu se baser sur les caractères macroscopiques et microscopiques. Les principaux genres identifiés sont : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Rhizopus*, dont les quatre premiers sont connus pour leur activité mycotoxinogène (Tableau 06).

Tableau 06: Représentation de la distribution des isolats fongique

Région	Isolats
Ain Dhab	<i>Aspergillus</i> et <i>Rhizopus</i>
Hamadia	<i>Alternaria</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Rhizopus</i>
Machraa Sfa	<i>Rhizopus</i>
Oued Lili	<i>Fusarium</i> et <i>Penicillium</i>
Sidi Housni	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> et <i>Rhizopus</i>

V.1.3.1. Identification macroscopique

Dans cette identification macroscopique, nous avons étudiés les caractères des différents isolats qui vont sélectionnés sur le milieu PDA. Nous a permis de mettre en évidence trois morphotypes notamment : cotonneux, duveteux, et poudreux (Figure 17).

Ainsi que la vitesse de croissance, et l'aspect du mycélium, etc. Les résultats obtenus sont représenté dans le Tableau 06.

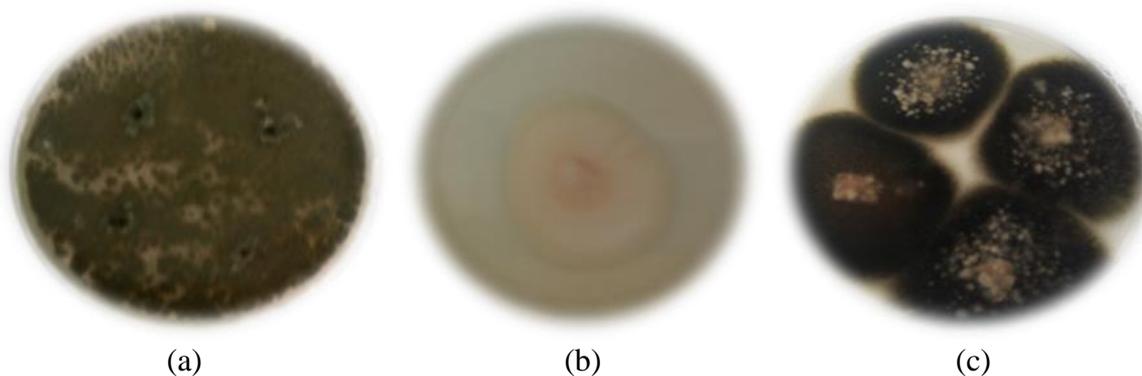
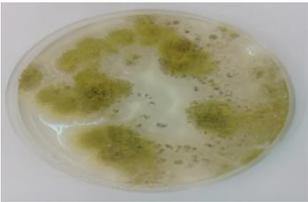


Figure 17: Observation macroscopique des différents morphotypes.
(a) *Aspergillus*; (b) *Fusarium* ; (c) *Alternaria*.

Tableau 07: Caractères macroscopiques des souches purifiées cultivées sur le milieu PDA.

Région	Code	Observation macroscopique	Aspect macroscopique	Genre
Ain Dhab	AD-3.1		colonies granuleuses, d'une pigmentation noire avec un contour blanc.	<i>Aspergillus</i>
Hamadia	HM-2.2		Colonies duveteux à granuleux Pigmentation : vert fance à noire	<i>Alternaria</i>
	HM-2.3		Colonies poudreuses, avec une pigmentation bleu-vert avec un contour blanc.	<i>Penicillium</i>
Mechra Sfa	MS-2.2		Colonies à croissances très rapide, cotonneuse, avec une pigmentation grise foncées	<i>Rhizopus</i>
Oued Lili	OL-2.2		Colonies duveteuses, d'une pigmentation blanche- rose saumon	<i>Fusarium</i>
Sidi Housni	SH-2.2		Pigmentation Jaune-verte brillante Croissance : rapide	<i>Aspergillus</i>

V.1.3.2. Identification microscopique

Après la technique de drapeau, on fait l'examen microscopique d'une colonie fongique pour réaliser l'aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophore (Figure 18). Les résultats sont illustrés dans le Tableau 07.

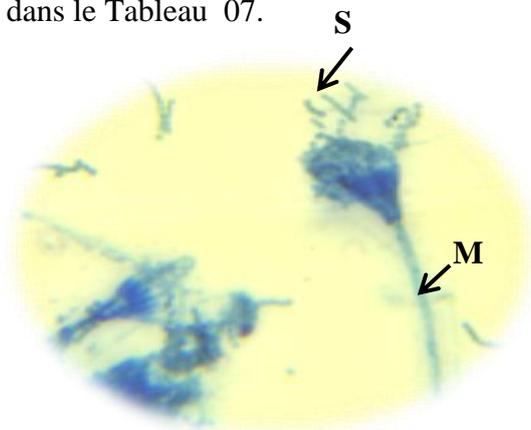
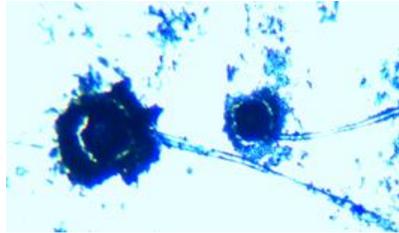
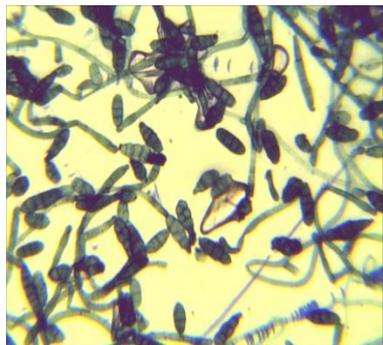
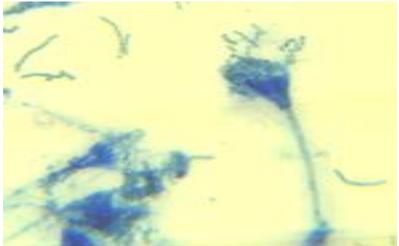
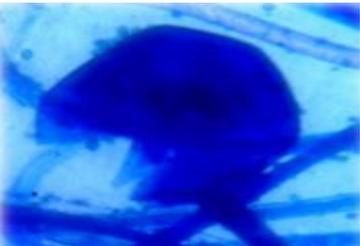
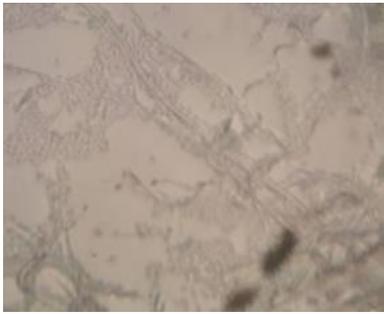
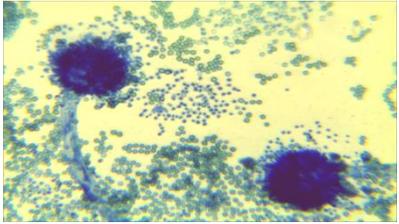


Figure 18 : Observation microscopique de genre *Penicillium* (Grossissement 40).
M : mycélium siphonné ; **S** : spores

Tableau 08: Caractères microscopiques des souches purifiées cultivées sur le milieu PDA.

Souches	Observation microscopique (Grossissement 400)	Aspect microscopique	Genre
AD-3.1		*Hyphes septés *tête aspergilliare : conidiophore qui se termine par une vésicule.	<i>Aspergillus</i>
HM-2.2		*Les hyphes, septés, sont ramifiés et tardivement certains filaments sont pigmentés en brun *Les conidiophores sont cloisonnés, * les conidies ou porospores sont brunes, pluricellulaires *Aspect piriforme ou ovoïde	<i>Alternaria</i>

HM-2.3		<ul style="list-style-type: none"> *Des conidies unicellulaires globuleuses * Des phialides en forme de quille, en verticilles sur des conidiophores ramifiés à angle droit ou sur leurs branches latérales. 	<i>Penicillium</i>
MS-2.2		<ul style="list-style-type: none"> *Hyphes non cloisonnées. Sporocyste globulaire. *Columelle persistante coiffe le sporocyste. *Spores dispersées par l'éclatement de la paroi du sporocyste. 	<i>Rhizopus</i>
OL-2.2		<ul style="list-style-type: none"> *Macroconidies sous forme de fuseau. * Microconidies sous forme d'une virgule. *Chlamydo-spores rondes, épaisses regroupées en chaîne ou isolées. 	<i>Fusarium</i>
SH-2.2		<ul style="list-style-type: none"> * Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille *Pénicille constitué de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.. 	<i>Aspergillus</i>

V.1.4. Recherche de l'activité pectinolytique d'isolat

Après incubation pendant 10 jours et filtration, nous avons mesuré le pH et le poids de mycélien dans chaque erlenmeyers. Les résultats sont représentés dans le Tableau 09 en Annexe 04.

L'étude de l'activité pectinolytique a été réalisée en évaluant la croissance mycélienne sur deux sources de carbone différentes (pectine et PG), et que nous avons comparé avec la croissance en présence de glucose, qui est une source de carbone simple et facile à assimilée par les champignons.

Les résultats obtenus sur les Figures 19 et 20, montrent qu'il y'a une grande différence de la moyenne de la croissance pour la souche *Penicillium*. On remarque une masse de croissance fongique maximale de (4,65 g) pour le glucose, (2,81 g) pour la pectine et (2,56 g) pour le PG.

L'activité pectinolytique avec différentes sources de carbone est variable. On observe que l'activité la plus faible est représentée pour la source témoin qui est le glucose avec (4,3 µeq). On observe des valeurs importantes pour la pectine et le PG de (63,8 µeq) et (56,7 µeq) respectivement.

L'analyse statistique a montré que la source de carbone influence significativement l'activité pectinolytique ($P < 0,05$).

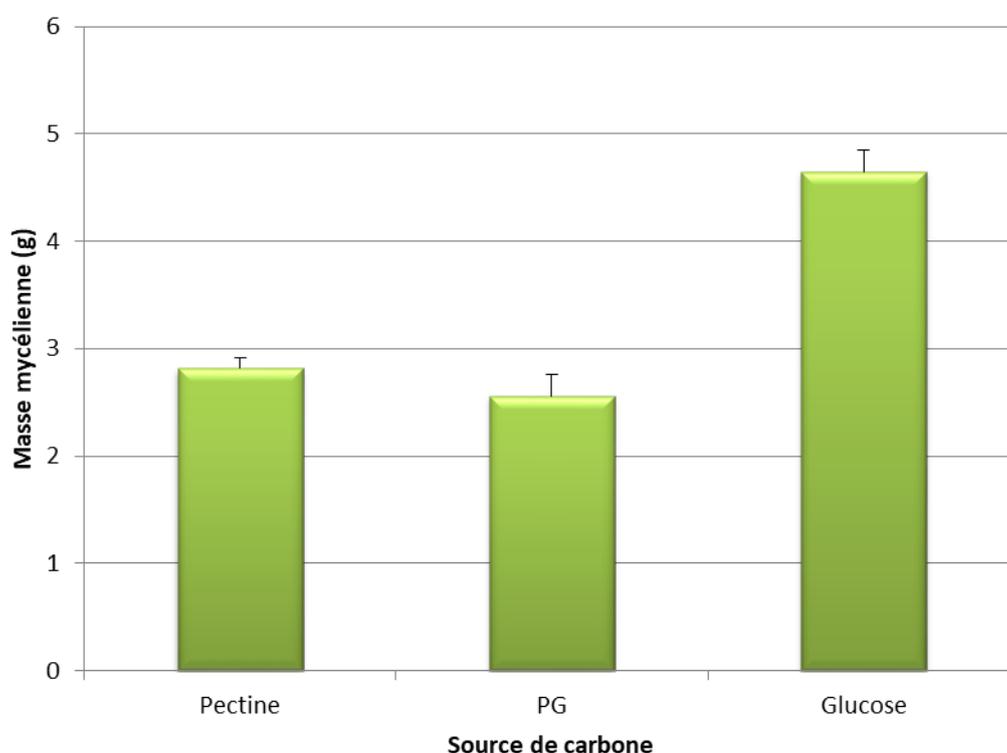


Figure 19 : Influence de la source de carbone sur la masse mycélienne.

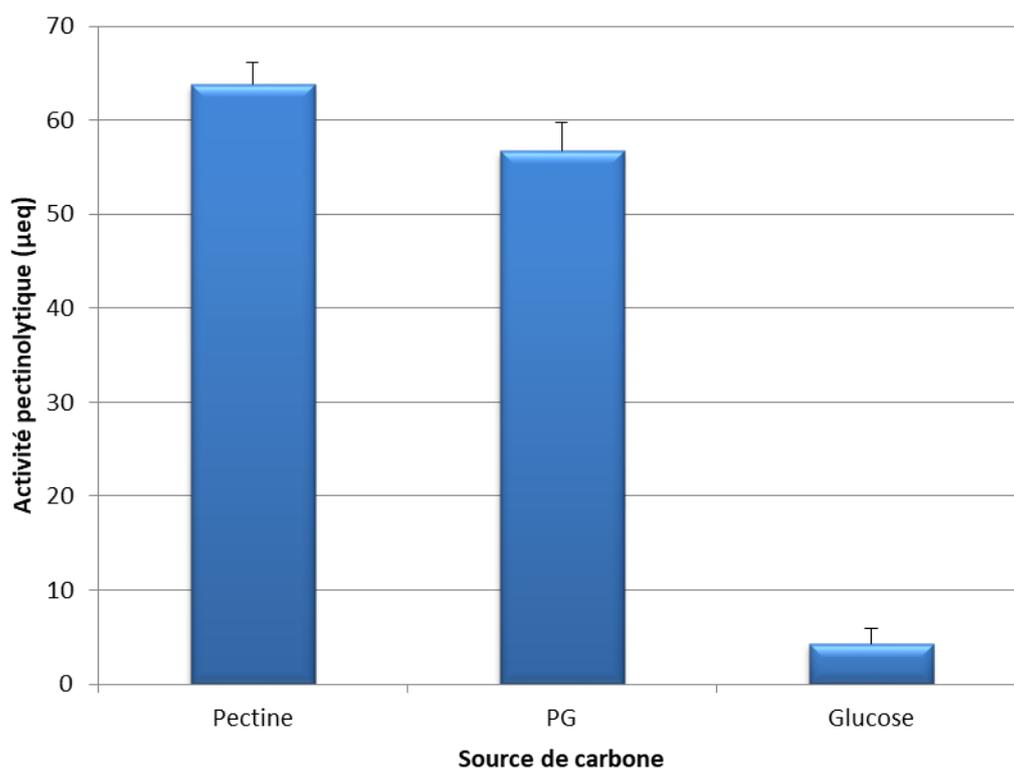


Figure 20 : Influence de la source de carbone sur l'activité pectinolytique.

La Figure 21 représente Variation de l'activité pectinolytique et de la masse fongique en fonction du pH.

L'activité pectinolytique a augmenté à pH 6 et diminuée à pH 5, contrairement au poids, qui est élevé à pH 5 et diminuée à pH 6.5. La forte activité est caractérisée par une augmentation maximale, qui est enregistrée après 10 jours, suivie dans le milieu à pH 6 en présence de la pectine et à pH 6.5 en présence de PG, et elle n'est pas détectable en présence de glucose.

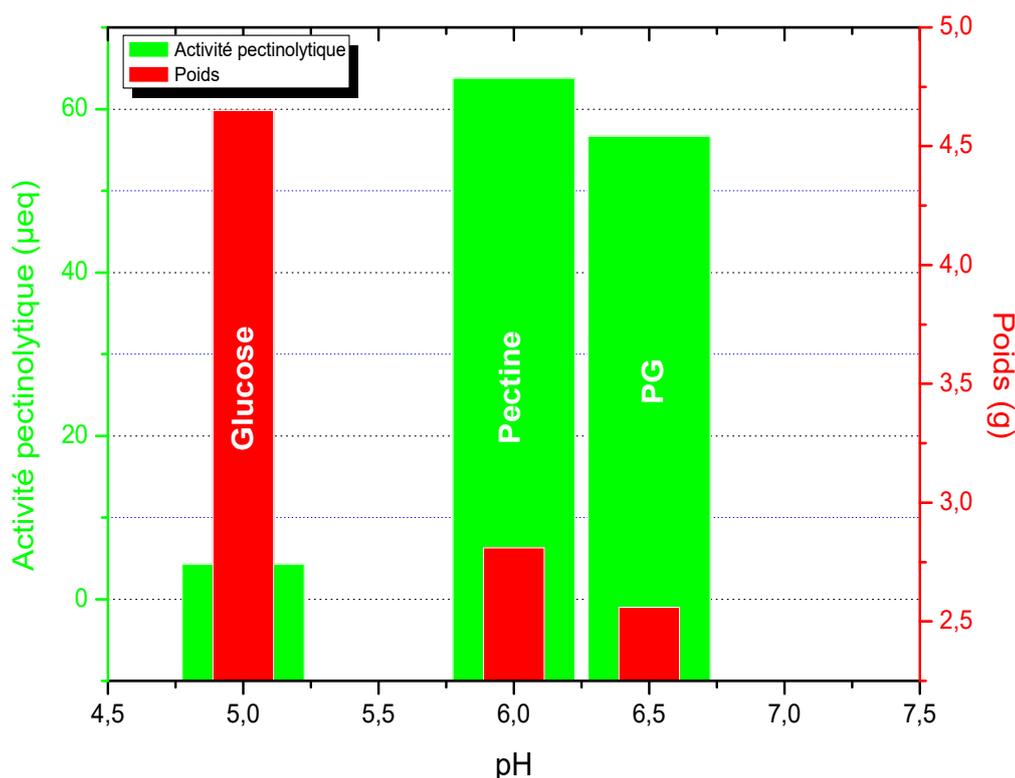


Figure 21 : Variation de l'activité pectinolytique et de la masse fongique en fonction du pH

V.2. Discussion

Ce travail est basé sur l'identification des moisissures productrices des mycotoxines et faire le lien avec leurs activités pectinolytiques dans la wilaya de Tiaret, dans le but de valorisé l'utilisation de ces enzymes dans industrie et éviter la contamination.

Les résultats obtenus par identification macroscopique à l'œil nu et microscopique par microscope optique montrent des morphologies différentes. Le caractère morphologique qui donnent quatre morphotypes différents : l'aspect cotonneux, granuleuse, duveteux, et poudreux avec pigmentation différentes (noirâtre, vert jaune, bleu-vert, rose saumon...).

Les observations de la souche *Aspergillus*, montre des colonies verts-jaunes pour *A.flavus*, jaunes puis noire pour *A. niger*, qui sont confirmées par Chabasse *et al.* (2002). Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif appelé thalle formé de filaments mycéliens hyalins, cloisonnés et ramifiés avec phialides (Raper et Fennell, 1965).

Pour le genre *Fusarium*, les phialides présentent, le plus souvent, une colonie avec pigmentation rosâtre, avec forme duveteuse ou cotonneuse. Des conidiophores courts et ramifiés, qui portent les phialides. On distingue deux types de conidies : des microconidies et les macroconidies. Ces résultats sont enregistrés par Leslie et Summerell (2006). La présence des macroconidies c'est le principal caractère morphologique des *Fusarium*.

L'identification de la souche *Penicillium* montre que les colonies ont une teinte grise-bleue, bleue-verte ou grise-verte. Leur thalle est formé d'un mycélium septé et hyalin. Il porte des conidophores simples ou ramifiés. Les phialides sont disposés en verticilles à l'extrémité des conidophores. Les phialides sont, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres qui sont décrit par les travaux de Botton *et al.* (1990).

L'identification macroscopique d'*Alternaria* montre des colonies, blanches-grises au départ, qui deviennent rapidement foncées (vertes foncées à noires) à la face comme à l'envers. Sur le plan microscopique, les hyphes, septés, sont ramifiés, et tardivement, certains filaments sont pigmentés en brun. Les conidiophores sont cloisonnés, bruns, simples ou ramifiés, plus ou moins droits ou flexueux (généculés). Les conidies ou porospores sont brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important (Chabasse *et al.*, 2002).

Plusieurs champignons sont capables de produire *in vitro* comme *in situ* les enzymes pectinolytiques. La pectine méthyl-estérase et la polygalacturonase sont produites *in vitro* par les champignons du genre *Penicillium*, ce qui est démontré par Gorlenko et Ordzhonikidze (1974).

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures. La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 à 8.0. Les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (Botton *et al.*, 1999).

La forte activité est caractérisée par une augmentation maximale à pH 6 et diminuée à pH 5. contrairement au poids qui augmente à pH 5 et diminue à pH 6.5, que nous avons comparé avec le travail de Gharbi (2014).

Les enzymes pectinolytiques sont classées selon la nature du substrat, le mécanisme de dégradation et le type de clivage (Favela-Torres *et al.*, 2006). L'activation de la PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libre soit par la détermination de l'augmentation du nombre de carboxyle libre, ou encore, en utilisant un régulateur de pH. En effet, l'ionisation du groupe carboxyle produit un proton dans le milieu, ce qui cause une variance du pH (Jayani *et al.*, 2005).

Les PG sont des enzymes qui interviennent dans la dépolymérisation des acides pectiques et des pectines très peu méthylées. Toutefois, lorsque le degré de méthylation augmente, la vitesse d'hydrolyse de l'enzyme diminue (Sakai *et al.*, 1982).

Les travaux de Yoshida *et al.* (2003) ont montré la présence de trois enzymes pectiques (pectate lyase polygalacturonase et pectine lyase) dans le filtrat de cultures de *Rhizopus oryzae* cultivé dans un milieu liquide contenant de la pectine et des racines macérées séparément. Par contre, El-hendawy *et al.* (2002) n'ont pas détectés l'activité pectine méthylestérase et polygalacturonique dans les filtrats de cultures, mais elle était présente dans des extraits de racines de carotte et de fruit de poivre infectées par *Erwinia*. D'autre part, les filtrats de culture et d'extraits de tissu végétal infectés contenaient l'activité pectine lyase. Des activités enzymatiques PME et PG ont été retrouvées dans les filtrats des isolats. Elles sont plus fortes et sont détectées plus précocement dans les filtrats. Mais ces résultats ne suffisent pas pour démontrer l'implication de ces enzymes dans la pathogénicité (Gharbi, 2014).

La polygalacturonase produite par *Penicillium italicum* et *P. digitatum* facilite la pénétration des hyphes dans la paroi cellulaire des fruits du citronnier durant le processus de dégradation (Barmore et Brown, 1980). Les polygalacturonases sécrétées seraient donc des polygalacturonases qui agissent par mécanisme d'hydrolyse. En effet, divers souches sont connues dans la production de ces enzymes selon Waksman *et al.* (1992) et Stotz *et al.* (1994).

Conclusion

Au cours de notre étude, menée sur l'étude de la flore fongique potentiellement productrice de mycotoxines, isolée à partir des grains de fève sèche commercialisés anse cinq communes de la région de Tiaret.

Cette analyse effectuée sur les échantillons des grains de fève sèche ont permis d'isoler 16 souches fongiques et nous avons identifié 6 isolats fongiques comme étant mycotoxinogènes, appartenant à 5 genres de moisissures: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Rhizopus*, avec une dominance du genre *Rhizopus* dans la région de Machraa Sfa on trouve à 100%. Les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria* ont été détectés dans les autres échantillons. Ces genres constituent un facteur important de détérioration et de sécrétion de mycotoxines dans les fèves sèches.

L'étude enzymatique montre une nette influence de la source de carbone (pectine, PG et glucose) sur l'activité enzymatique PME et PG dans les filtrats de culture de la souche *Penicillium*. D'après l'analyse statistique, nous avons constaté que l'activité pectinolytique et la masse fongique varient en fonction de la source de carbone, et que l'augmentation de la masse est inversement proportionnelle par rapport au pH.

A partir des résultats précédents, nous avons noté que l'isolat de *Penicillium* produit les deux types d'enzymes pectinolytiques (PME et PG).

Au terme de cette étude, nous pouvons dire qu'il reste comme perspectives de purifier et d'identifier et doser les mycotoxines sécrétées pas la souche utilisée, ainsi que la détermination du poids moléculaire, des enzymes pectinolytiques sécrétées, par électrophorèse

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de cultures

Tous les milieux de culture ont été autoclavés à 120 °C pendant 15 minutes sous une pression de 1 bar.

Milieu PDA (Potatos –Dextrose- Agar) (Bouhot et Billotte, 1964).

Pomme de terre.....200g
Dextrose.....20g
Agar agar.....20g
Eau Distillée1000ml

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

Eau Distillée.....1000ml
Agar agar.....20g

Milieu CDB (Czapek- Dextrose- Broth)

Eau Distillée.....500ml
FeSo₄.....0.005g
KCl.....0.025g
KH₂PO₄.....0.5g
MgSo₄.....0.25g
Na₂No₃.....1g

Annexe 2

Opération de rinçage et isolement les grains de fève sèche



(A)



(B)



(C)

Figure 22 : Rinçage et isolement à partir des grains de fèves sèches
A : Rinçage ; B : Isolement ; C : Incubation.

Annexe 3

Souches obtenues par isolement

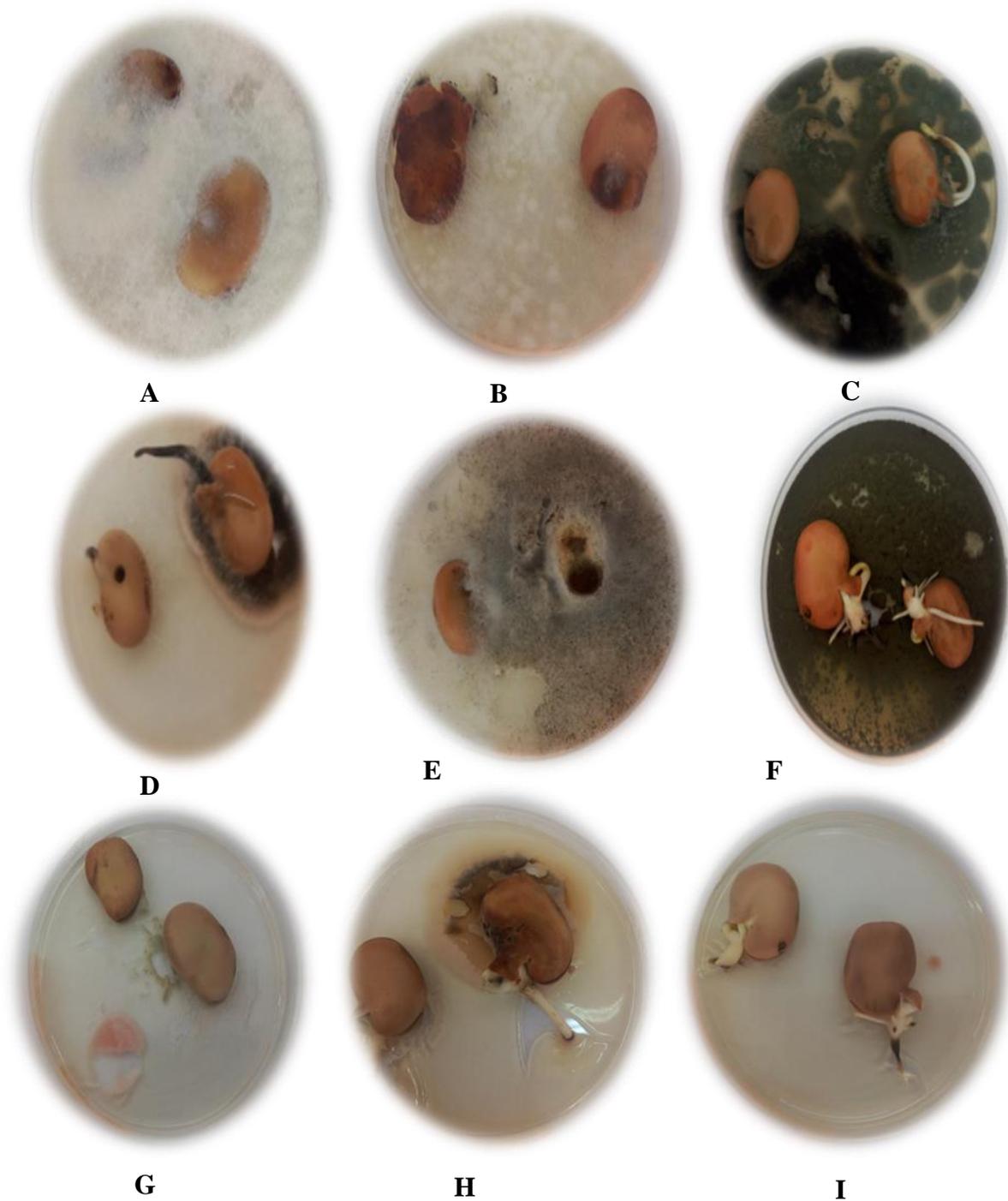


Figure 23: Isolement des champignons à partir des grains de fève sèche de chaque commune.

A: AD-1, **B:** AD-2, **C:** HM-2, **D:** HM-3, **E:** MS-2, **F:** OL-1, **G:** OL-2, **H:** SH-2, **I:** SH-3.

Annexe 4

Tableau 09: Variation du pH, de l'activité pectinolytique et de la masse fongique en fonction de la source de carbone.

	Pectine	PG	Glucose
pH initial	7,20	7,2	7,2
pH obtenu	6,00	6,50	5,00
Masse (g)	2,81	2,56	4,65
Activité pectinolytique (μeq)	63,80	56,70	4,30

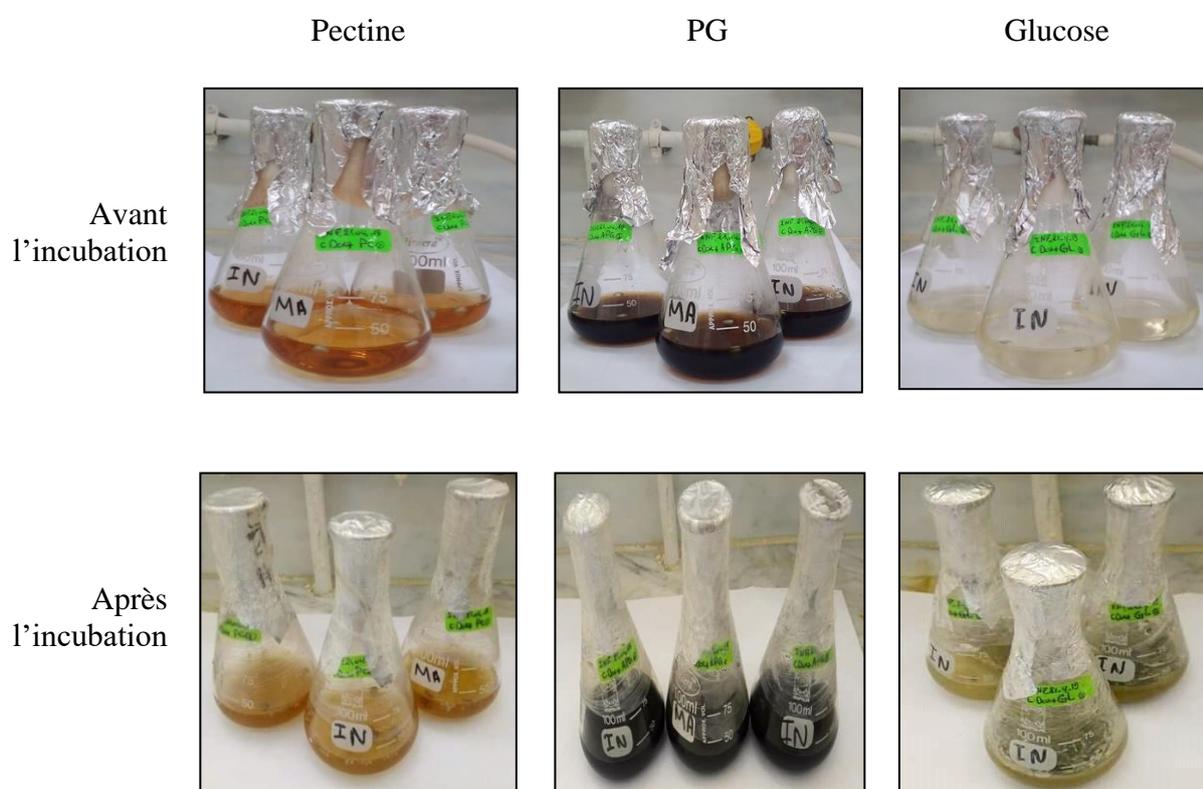
**Figure 24:** Culture sur milieu Czapeck-Dox modifié, inoculé par la souche de *Penicillium*



Figure 25 : Filtrats de cultures

Références Bibliographiques

- Abdellah Z. (2014). 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 d'état. Université de Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fes (Rabat), p 1.
- Abu-Amer JH., Saoub HM., Akash MW., Al-AbdallatAM. (2011). Genetic and phenotypic variation among faba bean landraces and cultivars. *International Journal of Vegetable Science*. 17: 45-59.
- Adams, M.R., Moss, M.O. (2002). Toxigenic fungi. In "Food microbiology". RSC, UK, 282-301.
- AFSSA. (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaines et animales. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Rapport final 13-45.
- Agnan M., Michel C, Mario A, Michel P, (2010). Les oligosaccharides pectiques: production et applications possibles. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15(1), 153-164.
- Aguillar G., Huitron C. (1990). Constitutive exopectinase produced by *Aspergillus sp.*
- Alkorta I., Garbisu C., Liama M.J., Serra J.L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process. Biochem.*, 33(1), 21-28.
- Alkorta I., Garbisu C., Liama M.J., Serra J.L., (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process. Biochem.*, 33(1), 21-28.
- and study on its potential application in degumming of rammie. *Enz. Microbiol. Technol.* 14,
- Antoine F et Rolande D. (2009). Brochures de recommandations et de conseil « Moisissures prévention et lutte ». Archives générales du Royaume et Archives de l'État dans les Provinces. P 6.
- ANOFEL. (2014). Aspergilloses et autres champignons filamenteux opportunistes. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie, p 6.
- Balanco P., Sieiro C., Villa G.T. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 175, 1-9.
- Baltimore. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms. Protopectinase: production, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 39, 213–294.
- Barmore C.R., Brown G.E. (1980). Polygalacturonase from Citrus fruit infected with *Penicillium italicum*. *Phytopathology*, 71: 328-331.

- Barros D., Torres A., Chulze S. (2005). *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *J. Sci. Food. Agric.*, 85:2349–2353.
- Belafi-Bako K., Eszterle M., Kiss K., Nemestothy N., Gubicza L., (2007). Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *Journal of Food Engineering*, 78 (2) : 438-442.
- Benhamou N., Rey P., Cherif M., Hockenull J., Tirilly Y. (1997). Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* *Phytopathology* 87, p.108–121.
- Bennett J. W. (2010). *Aspergillus*: a primer for the novice. *Medical Mycology*. 47 (S1): S5S12.
- Besancenot Jean-Pierre, Thibaudon Michel, Fonteyne Pierre-Alain, Nolard Nicole, Berger U. (2011). CONVENTION 2010 DGS / RNSA : relative au financement d'une étude sur les impacts attendus du changement climatique sur les moisissures aéroportées et les risques sanitaires associés. RNSA :(Réseau National de Surveillance Aérobiologique) ; Le Plat du Pin : 69690 BRUSSIEU.
- Bhat, R. V., Vasanthi, S. (2003). Mycotoxin food safety risks in developing countries. *Food Safety in Food Security and Food Trade. Vision 2020 for Food, Agriculture and Environment*, Focus 10, brief 3 of 17, 1-2.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., Cleveland, T. E. (2003). Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 8393.
- Blanco P, Sieiro C, Villa TG. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol Lett.*; 175: 1-9.
- Boonrod D., Reanma K., Niamsup H. (2006). Extraction Physicochemical Characteristics of Acid-Soluble Pectin from Raw Papaya (*Carica papaya*) Peel. *Chiang Mai J. Sci.*, 33 (1) : 129-135.
- 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., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1999) . Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P : 12-426.
- Boudra H. (2009). Les mycotoxines dans les fourrages : un facteur limitant insidieusement la qualité des fourrages et les performances des ruminants. *Fourrages*, 199, 265-280.
- Bouhot, D., Billotte, J. M. (1964). Recherches sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. II. Choix d'un milieu nutritif pour l'isolement selectif des *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* du sol. *Ann. Epiphyties*, 15(1), 57-72. In : Djerbi, M. (1982). Bayouddisease in NorthAfrica: history, distribution, diagnosis and control. *Date Palm Journal*, 1(2), 153-197.
- Boulimi, A., Bouaziz, C., Ayed-Boussema, I., Hassen, W., Bacha, H. (2008). Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Verocells and on chromosome aberrations in mice bonemarrow cells. *Toxicology* 251, 1-7.
- Boutin-Forzano S., Charpin-Kadouch C., Chabbi S., Bennedjai N., Dumon H., Charpin D. (2004). Wall relative humidity: a simple and reliable index for predicting *Stachybotrys chartarum* infestation in dwellings. *Indoor Air*; 14 : 196-9.
- Brett C., Waldron, K. (1996). *Physiology et biochemistry of plant cell walls* , second edition. Chapman et Hall ,New York .
- Cameron R.G., Luzio G.A., Goodner K., Williams M.A.K. (2008). Demethylation of a model homogalacturonan with a salt-independent pectin methylesterase from citrus: I. Effect of pH on demethylated block size, block number and enzyme mode of action. *Carbohydr. Polym.*, 71, 287-299.
- Cao J., Zheng L., Chen S. (1992). Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria
- Cara I., Dubois C., Armand M., Mekki N., Senft M., Portugal H., Lairon D. (1993). Pectins are the components responsible for the hypocholesterolemic effect of apple fiber. *Nutrition (Life Sci. Adv.)*, 12 : 69-77.
- Arnaud C. (2014). Identification des moisissures. 10 | La Vague #42.
- Carpita N.C., Gibeaut D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1–30.
- CAST, (2003). *Mycotoxins risks in plant, animal and human systems*, Task Force Report, No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, pp. 1–191.

- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002). Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans la sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec & Doc, p5.
- Castegnaro, M., 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 Dominique., Jean-Philippe Bouchara., Ludovic de Gentile., Sophie Brun., Bernard Cimon., Pascale Penn. (2002). Cahier de formation bioformat n° :25. Les moisissures d'intérêt médical .p47.
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., de Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. 2002. Les moisissures à intérêt médical. Cahier de formation N° 25. Bioforma 230 bd Raspail 75014 Paris.
- Cho SH, Lee CH, Jang MR, Son YW, Lee SM, Choi IS, Kim SH, Kim DB. (2007). Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. Korea Food and Drug Administration, Busan 608-829.
- CH-Y-1043 on different carbon sources. Biotechnology Letters 12, P: 655-660.
- Collmer A, Keen NT. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathology. 1986; 24: 383-409.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. (1997). Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology. 69, 155-166.
- DATABiO. (2014). *Alternaria* spp. biológicos. Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo : Fichas de agentes. p 1.
- Davet, P., Rouxel, F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. Editions Quae.
- Dedi J., Otchoumou A., Allou K. (2016). Effet des champignons sur le taux d'éclosion des œufs d'*Achatina fulica* et détection de mycotoxines. Agronomie Africaine 28 (2) : 1 - 12
- Delahaye A. (2011). Généralités sur les champignons microscopiques, p5.
- Denès J.M. (2000). Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. Carbohydr. Res., 327, 385-393.
- Donaghy J.A., Mc Kay A.M., (1994). Pectin extraction from citrus peel by polygalacturonase produced on whey. *Bioresource Technol*, 47 (1) : 25-28.
- Downes, P., Ito, F. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association. (No. 579.67).

- Eaton, D. L., Gallagher, E. P. (1994). Mechanisms of aflatoxins carcinogenesis. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 34, 135-172.
- El-Hendawy HH, Osman ME, Ramadan HA. (2002). Pectic Enzymes Produced In vitro and in vivo by *Erwinia* spp. Isolated from Carrot and Pepper in Egypt. J. Phytopathol. 150 :431-438.
- Favela-Torres E., Volke-Sepulveda T., Vniegra-Gonzalez G., (2006). Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technol. Biotechnol., 44(2 :221-227).
- Fogarty W.M., Kelly C.T. (1983). Pectic Enzymes. In: Fogarty, W.M. (ed.) Microbial Enzymes and Biotechnology Applied Science Publishers, London, 131-182.
- Françoise F. (2007). Service de Parasitologie-Mycologie du Pr Bretagne., Hôpital Henri Mondor 94000 Créteil. Les onychomycoses à moisissures. JIM : « Journal international de médecine ».france. <http://www.jim.fr/print/e-docs/00/01/DB/document-actu-med-phtml.response> to treatment of 59 cases. J Am Acad Dermatol 2000;42:217-24.
- Gainvors, A., Belarbi, A. (1995). Detection methods for polygalacturonase producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 10, P: 1311-1319.
- Gelinas P. (1995). Répertoire Des Micro-Organismes Pathogènes Transmis Par Les aliments, P 45.
- Gharbi S. (2014). Caractérisation phénotypique, moléculaire et l'étude des enzymes hydrolytiques chez *Ascochyta blight*. Thèse de doctorat. Université d'Oran. p 72-73.
- Gorlenko M.V., Ordzhonikidze B.G., (1974). Pectinolytic enzymes of fungi pathogen to citrus fruits. Soobhcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SRP, 73: 201-203. Summary in rev. Plant Pathol. 50: 536.
- Guezlane-Tebibel N., Kahlouche, B., Athmani-Guemouri, S. (2011). Microbiologie (Travaux Pratiques). 4ème Edition Corrigée, OPU. Algérie.
- Guinberteau J., Joly P., Nicot J., Olivier J. M. (2015). « Champignons », 5-6.
- Gummadi SN, Panda T. (2002). Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. Process Biochem.; 38: 987-996.
- HAS ,2017. Haute Autorité de santé, Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à *Aspergillus*- Argumentaire-p 8
- Henni, J., Boisson, C., Geiger, J. P. (1994). Variabilité De La Morphologie Chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Phytopathologia mediterranea, 51-58.

- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine H., El Mahjoub M. (2005). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ,9(3), 163–171. 4042 Sousse, Tunisie.
- Höhler, D., (1998). Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft, 37: 2–12.
- Hoondal G.S., Tiwari R.P., Tewari R., Dahiya N., Beg Q.K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology. 59: 409-418.
- IARC. (1993). Evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. In 'Some naturally-occurring substances: Food Items and Constituents'. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer. Vol 56 Lyon, France, 359-362.
- IARC. (2002). Monograph on the Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation, Vol. 82 Lyon, France, 171-175.
- Jacquet J., Boutibonnes P. (1967). Recherches sur les caractères des *Aspergillus* pathogènes. Les espèces majeures, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, 169_174 p.
- Jayani R.S., Saxena S. Gupta R., (2005). Microbial pectinolytic enzymes : a review. Process Biochem., 40,2931-2944.
- Jourdain J.R., Dublineau I., Phan G., (2005). Évaluation de l'emploi de la pectine chez les enfants vivant sur les territoires contaminés par le césium. Rapport de Direction de la Radioprotection de l'Homme. Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN). 36p
- Karkachi N. (2013). Évaluation de l'effet de triazoles vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Thèse de doctorat. Université Ahmed ben Bella, D'Oran. P53-54.
- Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. (2001). Applications of pectinase in the commercial sector: a review. Bioresources Technol., 77,p: 215-227.
- Kozak P.P., Gallup J., Cummins L.H., Gillman S.A. (1979). Factors of importance in determining the prevalence of indoor molds. Ann Allergy. 43 : 88-94.
- Kuiper-Goodman, T. (1996). Risk assessment of ochratoxin A: an update. Food Additives and Contaminants, 13: 535–557.

- Kuiper-Goodman T., Scott, P.M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin Ochratoxin A. *Biometrics Biomedical and Environmental Sciences*, 2: 179–248.
- Kurata H. (1990). Mycotoxins and mycotoxicoses. In: Pohland A. E., Dowell V.R., Richards J.L., (EDs.), *Microbialtoxins in foods and feeds*. New York, USA: Plenum Press, 249-259.
- Kurtzman C.D., Horn B.W., Hesseltine C.W.(1987). *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarisii*. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 53, 158-174.
- Laamari M., Khelfa L. (2008). Resistance source to cowpeaaphid (*Aphis craccivora* Koch) in broadbean (*Vicia faba* L.) Algerian landrace collection. *African Journal of Biotechnology*. 7 (14): 2486-2490.
- Lang C, Dornenburg H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl Microbiol Biotechnol.*; 53: 366-375.
- Larralde J., Martinez J.A. (1991). Nutritional value of fababean: effects on nutrient utilization, protein turnover and immunity. *Options Méditerranéennes*. No. 10: 111-117.
- Leroux J., Langendorff V., Schick G., Vaishnav V., Mazoyer J., (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydro colloids*, 17 (4) : 455–462.
- Liu B.H., Yu F.Y., Wu T.S., Li S.Y., Su M.C., Wang M.C., Shih S.M. (2003). Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191, 255-263.
- Malloch D., Lecomte M. (1997). La détermination des moisissures (Deutéromycètes). Ltd. pp 1-5.
- Malloch D. (1997). *Moulds: their isolation, cultivation and identification*. Toronto: Department of Botany, University of Toronto, 14(3):142-146.
- Mannon J., Johnson E. (1985). Fungi down on the farm, *New Sci.* 28, 12-16.
- Mantle P.G., McHugh K.M. (1993). Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. *Mycological Research*, 97 : 205–212.
- Marath R.M., Annapure U.S., Singhal R.S., Kulkarni P.R. (2002). Gelling behavior of polyose from tamarind kernel polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, 16 (5) : 423-426.
- Multon J.L., (1991). *Techniques d'analyses et de contrôles dans les Industries AgroAlimentaires*. Volume 4 : analyse des constituants alimentaires. Édition Lavoisier-Tech & Doc APRIA. Paris. 476p.
- N'BeMiller J., (2001). Plant Gums. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons,

- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., 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., & Houterman, P. M. (2010). Comparative Genomics Reveals Mobile Pathogenicity Chromosomes In *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367-373.
- Nguyen M.T. (2007). Identification des espèces des moisissures potentiellement productrices des mycotoxines dans les riz commercialisés dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, p 147.
- Nikiéma P.A, Traoré AS, Singh B. (1995). Étude de la contamination de graines d'arachide par des aflatoxines produites au cours du stockage. *J.A.R.C.B.*, 1: 2-16.
- O'callaghan J., Caddick H. X., Dobson A. D. W. (2003). A polyketid synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiologie*, 149: 345-349.
- Pamel E.V., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A., Daeseleire E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc/ms, multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox. Res.* p: 1-11.
- Perrone P. (2002). Patterns of methyl and O-acetylation in spinach pectins: new complexity. *Phytochemistry*, 60, 67-77.
- Pfohl-Leskowicz A. (2001). Définition et origines des mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Tec & Doc, PP. 3-14.
- Pfohl-Leskowicz A. (2013). Mycotoxines dans l'aliment : effet sur la santé humaine dans 'mycologie médicale' Christian Rippert (ed), Tec & Doc, Lavoisier; pp 160-214.
- Pfohl-Leskowicz A., Chekir-Ghedira L., Bacha H. (1995). Genotoxicity of zearalenone, and oestrogenic mycotoxin : DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis* 16, 2315-2320.
- Pfohl-Leskowicz, A. (1999). Métabolisation des mycotoxines- Effets biologiques et pathologies- Ecotoxicogénèse. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Technique et Documentation, Paris, pp. 18- 35.
- Pitt J. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 266-269.

- Pitt J.I., Basilico, J.C., Abarca, M.L., Lopez, C. (2000). Mycotoxins and toxigenicfungi. *MedicalMycology*. 38, 41-46.
- Priou, S., Jouan, B. (1990): Introduction des maladies de la pomme de terre provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. La pomme de Terre française. N°456 P57-60.
- Quillien J.F. (2002). Les mycotoxines. Flair Flow Europe 4. INRA France. PME 3 : 24 p.
- Ranveer S.J., Shivalika S. Reena G., (2005). Microbialpectinolytic enzymes: A review. *ProcessBiochemistry*, 40 (9) : 2931–2944.
- Raper K., Fennell D.J. (1965). The genus *Aspergillus*”, Williams and Wilkins editors., baltemore.
- Reboux G., Bellanger A., Roussel S., Grenouillet F., Et Million L., (2010)- Pollution. *Revue Française D’allergologie* 50 : 611–620.
- Reboux, G. (2006). Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d’autres composants organiques. *Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique*. p: 208–212.
- Renard. C (2010). Les pectines en tant qu'additifs: sources, méthodes d'extraction, propriétés et réactivité. P: 1013-1016.
- Rexová-Benková L, Marcovic O. (1976). Pectic enzymes. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. 33: 323-385.
- Ross P.F., Rice L.G., Platter R.D., Osweiler G.D., Wilson T.M., Owens D.L., Nelson H.A., Richard J.L. (1991). Concentrations of fumonisin B1 in feedsassociatedwith animal healthproblems. *Mycopathologia*, ,114, 129-35.
- Sakai T, Sakamoto T, Hallaert E, Vandamme E.J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *AdvApplMicrobiol.*; 39: 213-294.
- Sakai T. (1992). Degradation of Pectins. In: *Microbial degradation of natural products*, G Winkelmann (Ed), Weinheim& New York, Germany & USA, 1992, 57-81.
- Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J., Vandamme E.J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 39, 213-279.
- Sakai R., Mind, Yand-Hosoi E. (1982). Effect of Coronatine on the Induction of cell wall Degrading Enzymes in Potato Tuber Discs. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 48 :52-57

- Sanou D. (2000). Étude de la prévalence des mycotoxines dans les produits agricoles du Burkina Faso : Cas de la contamination du maïs (*zeamays L.*) par les aflatoxines et les fumonisines dans l'Ouest du Burkina. Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, p.59.
- Schols HA, Visser R.G.F, Voragen A.G.J. (2009). Pectin and pectinases. Wageningen Academic publisher Wageningen, Netherlands.
- Scudamore K.A., Livesey C.T. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage, a review. *Journal of Science of Food and Agriculture* 77, 1-7.
- Simmons E.G. (1999). Alternaria themes and variations (236-243). Host-specific toxin producers. *Mycotaxon*. 70 : 325-69.
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T. (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science Signaling* 306: 2206–2211.
- Stevens N. J., Schmitt D. O., Cole T. M., Chan, L. K. (2006). Technical note: Out-of-plane angular correction based on a trigonometric function for use in two-dimensional kinematic studies, *American Journal of Physical Anthropology*, 129: 399-402.
- Steyn P.S. (1995). Mycotoxins, general view, chemistry and structure. p93.
- Stotz H.U., Contos J.J., Powell A.L., Bennett A.B., Labavitch J.M. (1994). Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from Tomato – *Plant molecular biology*, 25, 607-617.
- Tabuc C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat d'état. Université de Bucarest et de l'institut national polytechnique de France .p 27,38.39.
- Talice R.V., Mackinnon J.E. (1929). *Annales de parasitologie humaine et comparée : Penicilium bertain*. Agent d'une mycose broncho-pulmonaire de l'homme, Tome VII, N°2. p. 97-106.
- Tanno K., Willcox G. (2006). The origins of cultivation of *Cicer arietinum L.* and *Vicia faba L.*: early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th millennium B.P. *Veget. Hist. Archaeobot.* 15, 197–204.
- Taralova E.H., Schlecht J., Kobus B., Barry MP. (2011). Modelling and visualizing morphology in the fungus *Alternaria*. *Fungal pathology*. 155 : 1163-1173.

- TOFFA D.D. (2005). Étude de la contamination de certains aliments d'origine végétale de la République du Niger les moisissures toxigènes. Université Mohammed V. Thèse de doctorat, Rabat, Maroc.
- Van Der Burgt, G.J.H.M., Timmermans B.G.H. (2009). *Fusarium* In Wheat.p 5.
- Van Der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L. (1965). Mycotoxins, Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. Journal of chemical Society 5, 7083-7088.
- Waksman G., Turner G., Walmsley A.R. (1992) . Kineticstudies of the polygalacturonase enzyme from *Colletotrichum lindemuthianum* – Biochemical Journal. 285; 551-556.
- Whitaker JR. (1990). Microbial Pectinolytic enzymes. Microbial enzymes and biotechnology (2nd Edition), Elsevier Science Ltd, England, pp. 133-176.
- WHO. (2006). AFRO Food Saf. Newsl., World HealthOrganization. Issue No 2. July. Food Safety (FOS).
- Yezli .W. (2018). Manuel de Cours : Mycologie Fondamentale et Appliquée. P 2.
- Yokoi H., Obita T., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y. (2002). Flocculation properties of pectin in various suspensions. Bioresource Technology, 84 (3) : 287–290.
- Yoshida S., Tsuyumu S., Tsukiboshi T. (2003). Macerating Enzymes Produced by *Rhizopus oryzae* in Infected Mulberry Roots .J. Phytopathol. 151 :346-441.

Résumé

La fève sèche est parmi les légumineuses les plus touchées par les moisissures qui synthétisent des mycotoxines lors du stockage. La pectinase est aussi sécrétées par ces moisissures mycotoxinogènes, et génère la dégradation de la paroi cellulaire de la plante. L'identification de la flore fongique basée sur l'analyse des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques, nous a permis d'obtenir 16 souches fongiques appartenant à cinq (5) genres différents, dont quatre (4) sont connus par leur production de mycotoxines : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*, ainsi que le genre *Rhizopus* qui est considéré comme agent d'altération. L'étude de l'activité enzymatique pectine méthylestérase et polygalacturonase par dosage, et l'influence du pH dans les filtrats de culture de la souche *Penicillium* ont montré une variation de l'activité enzymatique, avec une grande influence du pH sur la production enzymatique, et qui a donné une activité plus faible à pH 5 pour le témoin (glucose) avec (4,3 µeq) et une croissance fongique maximale (4,65 g), par rapport aux pectines et PG avec une masse de croissance faible (2,81 g) et (2,56 g), et l'augmentation de l'activité (63,8 µeq) et (56,7 µeq) respectivement à pH 6.

Mots clés : Fève sèche, moisissures, mycotoxines, *Penicillium* et activité pectinolytique.

الملخص

يعتبر الفول الجاف من بين الحبوب الأكثر عرضة للفطريات ويؤدي هذا التخزين الغير ملائم الى انتاج جملة من السمومة, البكتيناز المفرز من قبل الفطريات السامة يقوم الى تكسير الجدار الخلوي للنبته. بالتركيز على نشاط pectinolytique في هذا السياق فان الهدف من هذا العمل هو التعرف على هذه الفطريات السامة الموجودة في الفول الجاف المتداول في عدة اسواق في ولاية تيارت وتقييم الكمية المفرزة ونشاط الانزيم . التعرف على الفطريات يعتمد على الخصائص المورفولوجية حيث اظهرت التحاليل العينية والمجهريه وجود 16 سلالة فطرية متمثلة في 5 أجناس مختلفة, 4 منها معروفة بانتاجها للسموم الفطرية : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* وايضا الجنس *Rhizopus* الذي يعتبر وكيل التغيير. دراسة النشاط الانزيمي بكتين methylestérase و polygalacturonase بواسطة المعايرة وتأثير pH في فترة و الترشيح *Penicillium* اظهر تباين في النشاط الانزيمي مع تأثير كبير من pH على الانتاج الانزيمية و التي اعطت نشاط اقل في pH 5 من اجل الشاهد الغليكويز (4,3 µeq) ونمو فطري عالي (4,65 g) مقارنة ب pectines و PG مع كتلة نمو منخفضة (2,81 g) و(2,56 g) وزيادة نشاط الانزيمي (63,8 µeq) و(56,7 µeq) على التوالي في pH 6

الكلمات المفتاحية : الفول الجاف, الفطريات, السموم الفطرية و نشاط pectinolytique

Abstract

The dry bean is leguminous plant affected by fungal species which synthesize mycotoxins during storage. The pectinase is also secreted by these mycotoxigenic fungi, and generates the degradation of plant cell wall. The identification of the fungal isolates based on macroscopic and microscopic morphological characteristics, enabled us to identify 16 fungal isolates belonging to five (5) different genera, of which four (4) are known by their production of mycotoxins: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*, as well as *Rhizopus*, which is considered as deterioration agent. The study of the enzymatic activity pectin methylesterase and polygalacturonase of *Penicillium* sp. shows a variation of the enzymatic activity, with a great influence of the pH on enzymatic production, and which gave a weaker activity to pH 5 for the witness (glucose) with (4,3 µeq) and a maximum fungial growth (4,65 g), compared to pectins and PG (2,81 g) and (2,56 g), and the increase in the enzymatic activity (63,8 µeq) and (56,7 µeq) respectively in pH 6.

Key words: Dry bean, fungi, mycotoxins, *Penicillium* and pectinolytic activity