

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 (D04)

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Boubtana Imene

Barkat Fatima Zohra

Bensaid Saliha

Thème

**Dosage de l'activité péctinolytique des espèces de moisissures
potentiellement productrices de mycotoxine dans les arachides
commercialisées dans la région de Tiaret**

Soutenu publiquement le

Jury:	Grade
Président: Dr .KADDAR B.	MCB
Encadreur: Dr. YEZLI W.	MCB
Co-encadreur: Dr. MANSOURI D.	MCB
Examinatrice 1: Dr. MOULAY M.	MCB

Année universitaire 2018-2019



Remerciement

Tous, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce travail.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont à notre Promoteur DR. YEZLI W. pour ses conseils, ses encouragements, sa patience, sa compétence, sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.

Nos remerciements les plus sincères vont également à notre Co-promoteur : DR. MANSOURI D. Veuillez trouver ici l'expression de nos profonds sentiments et de respect pour le soutien que vous n'aviez cessé de nous porter.


Nos remerciements vont au président de jury DR. KADDAR B. d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à DR. MOULAY M. d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement spécial à notre responsable de spécialité DR.HOUCINE L. pour sa disponibilité et sa sympathie.

Un grand merci à l'équipe du laboratoire de Microbiologie M^{LLES} SORAIA et FOUZIA, pour leur gentillesse et serviabilité.

Nous remercions les employés du département des Sciences de la Nature et de la Vie.



Dédicaces

Avant toute chose, je tiens à remercier «**ALLAH**» qui m'a donné la force et la volonté Pour terminer ce modeste travail.

A ma très cher Maman, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et de le respect tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Je T'aime Maman, que dieu te protège et te garde pour moi.

A mon très cher grand-père Ahmed : Celui qui ma accorder tant d'Attention, d'Amour, d'Aidée d'Encouragement tu es la Meilleure grande mère au monde, et le plu beau cadeau de ma vie.

A mes cher sœurs : Chaïma , Khadidjaet Zaineb de partager tous ces bons moments ensemble et à la joie d'être si proches.

A mes oncles :Hadj, Miloude, Karima et leur mari *Djilali* .

A ma cher grand-mère :Rouba .

A mes cher amies :Salha, fatimaZohra ,Imane et *fatima* .

IMENE

Dédicaces

Tout d'abord, je remercie *Allah*, le tout puissant de m'avoir accordé la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

A mon cher papa : qui m'a soutenu sans relâche et m'a donné la force et la volonté de faire des efforts et ne jamais baisser les bras.

A ma cher Maman : Celle qui m'a toujours aimé soutenue dans toutes les situations, forte et tendre et douce tu n'espères que nous voir réussir et nous ne souhaitons que te faire plaisir je souhaite être à la hauteur de tes espérances.

A mes chers frères : *Hocine, Oussama, Ahmed* pour leur encouragement.

A ma chère sœur : *Nada* ma joie, mon bonheur, je vous aime.

A Tous les membres de ma famille : *Houda, Houari, Abdelaziz*

Un grand merci à mon cher fiancé *Bensalem Khalid* pour son soutien moral.

A mes chères amies : *Imene, Fatima Zohra, Nour el Imane, Fatima, Khadidja, Fatima*

SALHA



Dédicaces



Je remercie avant tout *Allah* de m'avoir aidé à réaliser ce présent travail. Je tiens vivement, à dédier ce travail en signe de respect.

A Mon cher Papa : qui m'a soutenu sans relâche et m'a donné la force et la volonté de faire des efforts et ne jamais baisser les bras.

A Ma chers Maman : honorable aimable tu représente pour moi le symbole de bonté par excellence, Celle qui m'a toujours aimé soutenu dans toutes les situations.

A mes chères sœurs : Amína, Samíra, Hanan Que j'aime beaucoup.

A mes cher amies : Imene, Salíha, Malíka.

FATIMA ZOHRRA



TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iii
INTRODUCTION.....	1

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les arachides.....	5
I.2. Généralités sur les moisissures.....	5
I.2.1. Moisissures mycotoxinogènes.....	5
I.4. Mycotoxines.....	6
<hr/>	
I.4.1. Nature et origine des mycotoxines.....	6
I.4.2. Effets des mycotoxines.....	6
I.4.3. Importantes mycotoxines.....	7
I.4.3.1. Aflatoxines	7
I.4.3.2. Ochratoxines.....	7
I.4.3.3. Trichothécènes.....	7
I.4.3.4. Zéaralénone.....	7
I.4.3.5. Moniliformines.....	7
I.4.3.6. Patuline.....	8
I.4.3.7. Citrinine.....	8
I.5. Détoxification.....	8
I.6. Pectinases.....	9
I.6.1. Définition.....	9
I.6.2. Mode d'action.....	9
I.6.3. Utilisation industrielle de la pectinase.....	10

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Objectif du travail.....	12
II.2. Date et lieu de travail.....	12

II.3. Matériel et produits utilisés.....	12
II.3.1. Matériel végétal.....	12
II.3.2. Milieux de culture.....	13
II.3.3. Autre matériel.....	13
II.4. Protocole expérimental	14
II.4. Tri des grains.....	15
II.5. Isolement à partir des différents grains d'arachide.....	15
II.6. Purification des isolats.....	16
II.7. Identification des isolats.....	16
II.7.1. Identification macroscopique.....	16
II.7.2. Identification microscopique.....	17
II.8. Conservation.....	17
II.9. Activité pectinolytique.....	17
II.9.1. Étude de la croissance mycélienne et l'activité pectinolytique.....	17
II.9.2. Préparation des extraits enzymatiques.....	17
II.9.3. Dosage de l'activité pectine méthylestérase (PME)	18
II.10. Analyses statistiques.....	18

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats.....	20
III.1.1. Isolement et purification d'isolat.....	20
III.1.2. Identification des isolats.....	20
III.1.2.1. Identification macroscopique.....	20
III.1.2.2. Identification microscopique.....	22
III.1.3. Détermination de l'activité pectinolytique.....	24
III.1.3.1. Étude de la croissance mycélienne et l'influence des substrats.....	24
III.1.3.2. Dosage de l'activité des pectines méthyle estérase (PME)	24
III.2. Discussion.....	26
Conclusion.....	29
Références bibliographiques.....	31
Annexes.....	36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 1 :	Méthodes de la lutte contre la contamination	8
Tableau n° 2 :	Appareillages et verreries utilisés	13
Tableau n° 3 :	pourcentage de la population fongique isolée	20
Tableau n° 4 :	Examen macroscopique des moisissures sur le milieu PDA	21
Tableau n° 5 :	Examen microscopique des souches purifiées	22
Tableau n° 6 :	variation du pH, de l'activité pectinolytique et de la masse fongique en fonction de la source de carbone	40

LISTE DES FIGURES

Figure n° 01 :	Echantillons des grains d'arachides.	12
Figure n° 02 :	Schéma du protocole expérimental	14
Figure n° 03 :	Isolement à partir des grains des arachides sur le milieu PDA	15
Figure n° 04 :	L'influence des substrats sur la croissance mycélienne	24
Figure n° 05 :	Variation de l'activité pectinolytique en fonction de source de carbone	25
Figure n° 06 :	Variation de l'activité pectinolytique et la masse fongique en fonction du pH	25
Figure n° 07 :	Isolement des souches fongiques à partir des grains d'arachides collectés de différentes régions de Tiaret isolées	37
Figure n° 08 :	Représentation des souches fongiques purifiées	38
Figure n° 09 :	Prélèvement d'une empreinte fongique destinée à l'observation microscopique.	39
Figure n° 10 :	La croissance mycélienne dans le milieu Czapeck-Dox (pectine et glucose).	39

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Ain Dheb.

Actpect : Activité pectinolytique.

D : Dahmouni.

Fr : Frenda.

N : Normalité.

PDA : Potato Dextrose Agar.

PME : pectine méthylestérase.

sp. : espèce.

Ta : Takhmaret.

Ti : Tiaret centre.

Ueq : micro-équivalents.

INTRODUCTION

Introduction

Les arachides sont parmi les produits de nécessaires pour la nutrition humaine et animale. En revanche, ils présentent un risque élevé de contamination par des moisissures, selon des conditions spécifiques de la température, le temps de stockage, humidité, récolte aux champs et la composition du substrat, qui peuvent contribuer à la détérioration rapide, suite à la croissance fongique (**Nguyen, 2007**).

Les moisissures, ou les champignons filamenteux, sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. Ils présentent, en outre, un intérêt économique, en raison à la fois de leur utilité et de leurs activités néfastes multiples: altérations des produits alimentaires et détériorations dans de nombreux autres domaines : production de mycotoxines, vie parasitaire aux dépend de l'homme, des animaux et des plantes (**Pereira et al.,2013**).

Ainsi, leur présence indésirable donne aux aliments des odeurs moisissées et modifient leur aspect via la production de pigments.il ya donc une réduction quantitative et qualitative des valeurs alimentaires de la durée, accompagnée d'une baisse du rendement des récolts.les métabolites produits par ces champignons lors de croissance sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires. Donc les mycotoxines sont les plus grave en raison de risque intoxication (**Nguyen, 2007**).

Les mycotoxines, réduisant la valeur nutritionnelle, modifiant l'aspect organoleptique. Elles 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 (**Cahagnier et al. 1995; Mateo et al. 2002 ;Alborch et al. 2011**).

Par ailleurs, les moisissures synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes : acides organiques, antibiotiques, et enzymes (**Mehravari et Sardari, 2011; Pereira et al.,2013**).

Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. Parmi ces enzymes, les pectinases , qui sont largement distribuées dans les plantes supérieures et dans les microorganismes .Cette famille d'enzymes est capable d'attaquer une variété de liaisons chimiques des pectines .

Introduction

La plupart des préparations commerciales de pectinases sont d'origine fongique (Jayani *et al.*, 2005).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est d'isoler et identifier les moisissures mycotoxinogènes à partir des arachides commercialisées dans différentes régions de Tiaret et dosage de l'activité péctinolytique des moisissures mycotoxinogènes.

CHAPITRE I

ÉTUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les arachides

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.), également appelée cacahuète ou cacahouète, pois de terre, pistache de terre et pinotte (de l'anglais *peanut*), est originaire de l'Amérique du Sud précisément sur la côte nord-extrême du Pérou. L'arachide appartient à la famille des *Fabaceae*. Le genre *Arachis* comporte soixante neuf espèces dont, presque la totalité, sont des espèces diploïdes sauvages (**Krapovickas et Gregory, 1994**).

Au plan nutritionnel, l'arachide est une oléo protéagineuse. La graine d'arachide contient 45 à 52% d'huile qui est de meilleures qualités nutritionnelles comparativement aux autres oléagineux, et est riche également en protéines (12 à 36 %). Elle constitue une importante source de protéines faciles à digérer, de sucres, de vitamines E la vitamine A (**Dwividiset al., 2003**).

I.2. Généralités sur les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (**Nicklinet al., 2000**). Ces micro-organismes sont largement répandus dans la nature, et peuvent être observés à divers endroits (atmosphère, sol, eau, végétaux et déchets organiques, etc.), et tout particulièrement sur les denrées alimentaires entreposées, stockées depuis un certain temps (pain rassis, fromage ou fruits) (**Tabuc, 2007 ; Berthier et Valla, 2002 ; Marie et al., 2002**).

Les moisissures sont aérobies, en général, sont acidophiles (pH compris entre 3 et 7) (**Nicklin et al., 2000**) et mésophiles (température optimale entre 20 et 30°C) (**Botton et al., 1990**). Cependant, certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température (inférieure à 15°C ou même parfois inférieure à 0°C). Elles ont, en général, un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ($A_w = 0.65$) (**Boiron, 1996**). Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique...), qui en font des agents de dégradation dangereux, mais aussi parfois, des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes...).

I.3. Moisissures mycotoxinogènes

Les moisissures mycotoxinogènes sont un groupe de champignons capable de produire des mycotoxines dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène (**Reboux, 2006**). Plus de 150

moisissures mycotoxinogènes sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Pamelet *al.*, 2010). Il semblerait qu'il s'agit d'une réaction du champignon face à des conditions environnementales stressantes (température, humidité trop élevées ou trop basses).

La production des mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse. D'une manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique.

I.4. Mycotoxines

I.4.1. Nature et origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, toxiques, de faible poids moléculaire (entre 200 et 10.000 daltons), excrétées par certaines moisissures qui se développent sur divers produits agricoles sous des conditions environnementales particulières (Krska, 2009).

À ce jour, 300 à 400 mycotoxines sont connues (Pamelet *al.*, 2010). Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (Ruppolet *al.*, 2004). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse, certaines dérivent des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, stérigmatocystine) ; d'autres des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique) ; et les derniers sont des dérivés terpéniques (désoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, fusarénone) (Leclerc *et al.*, 2005).

I.4.2. Effets des mycotoxines

La FAO estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines (Krska, 2009). L'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës ou chroniques nommées mycotoxicoses. Cependant, les intoxications aiguës sont rares, spécifiquement chez l'Homme, en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés, mais l'intoxication chronique est souvent à craindre et ce, à cause de l'effet cumulatif des doses fixées sur des organes cibles, tels que le foie ou les reins (Leclerc *et al.*, 2005). Les mycotoxines peuvent aussi avoir des effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (Pamel *et al.*, 2010).

I.4.3. Importantes mycotoxines

I.4.3.1. Aflatoxines

Les aflatoxines (AFs) sont des métabolites secondaires hautement toxiques produites par différentes espèces fongiques toxigènes (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*...). Ce sont les Anglais qui ont isolé une des molécules responsables, l'AF (Adams *et al.* 2002 ; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005). Ces contaminants naturels de l'alimentation humaine et animale sont à la base de divers problèmes tels que les déficiences nutritionnelles, l'immunosuppression, le cancer du foie, les effets mutagènes et tératogènes (Wagacha et Muthomi., 2008).

I.4.3.2. Ochratoxines

L'ochratoxine est une mycotoxine d'importance mondiale produite par des champignons microscopiques qui sont des contaminants courants des produits alimentaires. L'ochratoxine A (OTA) a été découverte pour la première fois chez *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Elle est produite par deux genres fongiques : *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*...) et *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*...). Ce dernier genre produit l'ochratoxine A à une température optimale entre 20 et 25°C (Esteban *et al.*, 2004).

I.4.3.3. Trichothécènes

Les Trichothécènes sont un groupe de mycotoxines produites principalement par le genre *Fusarium* (Placinta *et al.*, 1999). Ce sont des métabolites fongiques connus pour contaminer les grains stockés et d'autres produits agricoles (Ueno, 1977). La production de trichothécènes dépend de la température et de l'activité de l'eau.

I.4.3.4. Zéaralénone

La zéaralénone est une autre fusariotoxine, de nature lactonemacrocyclique, dotée d'une forte affinité pour les récepteurs des oestrogènes (RILEY *et al.*, 1998). L'occurrence de ces toxines est favorisée par l'élévation de la teneur en eau et la diminution de température.

I.4.3.5. Moniliformines

Certaines espèces de *Fusarium* ont la capacité de production de ce groupe de mycotoxines dans le blé telle que *Fusarium moniliforme*. L'optimum de cette production est dans les températures ambiantes entre 25 et 30°C (Xu *et al.*, 2003).

I.4.3.6. Patuline

Cette mycotoxine est produite par plusieurs *Penicillium*, comme par exemple : *P. expansum*, qui produit la patuline entre 0 et 30°C (Sommer *et al.*, 1974).

I.4.3.7. Citrinine

La Citrinine (CIT) a été décrite en 1931 comme pouvant être utilisée comme un antibiotique, mais finalement, elle a été rejetée à cause de sa toxicité (Adams *et al.*, 2002). La CIT est un métabolite secondaire toxique, tout d'abord isolé de *P.citrinum* (Hetherington, 1931).

I.5. Détoxification

Les mycotoxines posent un problème important universel de santé publique, pour l'agriculture, et les sciences économiques. Pour pouvoir lutter contre les moisissures et les mycotoxines, il faut savoir à quel moment elles se développent. Ainsi, il est possible de définir six moments privilégiés au cours de l'élaboration d'un produit: lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation, de l'alimentation des animaux et enfin lors de la consommation par l'être humain (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Tableau n° 1: Méthodes de lutte contre la contamination (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Période définie	Solutions proposées
Au champ	<ul style="list-style-type: none"> - utiliser des plantes résistantes. - limiter le développement par l'emploi modéré de fongicides. - arrosage adapté. - apport en minéraux.
À la récolte	<ul style="list-style-type: none"> - veiller à la maturité du grain. - inspection visuelle pour éliminer les éléments abîmés. - éviter les récoltes par temps humide.
Au stockage	<ul style="list-style-type: none"> - contrôle et analyse périodique. - maintenir une bonne température. - contrôler l'humidité. - détruire les produits contaminés. - assurer une bonne aération des silos.
À la transformation	<ul style="list-style-type: none"> - contrôle et analyse, plus au niveau des mycotoxines que des moisissures.
Dans l'alimentation des animaux	<ul style="list-style-type: none"> - tests de contamination, puis décontamination si nécessaire.
À la consommation	<ul style="list-style-type: none"> - éliminer les aliments contaminés ; - adapter une bonne cuisson

I.6. Pectinases

I.6.1. Définition

Les enzymes pectinolytiques « pectinases » constituent un groupe unique, complexe et hétérogène de différentes enzymes agissant spécifiquement sur les substrats pectinolytiques, notamment les polymères de pectine qui représentent le polysaccharide majeur de la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de la paroi végétale. Cette action se résume dans l'escindement de l'acide polygalacturonique (PGA) en acide monogalacturonique, ouvrant ainsi les liaisons glycosidiques, réduisant l'adhésion intracellulaire et la rigidité tissulaire (**TatianaDacosta et Flevo, 2005 ; Fogarty et Kelly, 1980**).

I.6.2. Mode d'action

Il est important de mentionner que les pectinases peuvent être classées en se basant sur la nature du substrat (pectine, acide pectique et oligogalacturonate), le mécanisme de dégradation (trans-élimination ou hydrolyse) et le type de clivage (endo ou exo) (**Favela-Torres et al., 2006**) en deux groupes principaux d'enzymes dont les propriétés et le mode d'action sont les pectines estérases (PE) et dépolymérase (polygalacturonases et lyases)

➤ **Les pectines estérases (PE) ou pectine méthylestérase (PME)**

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons esters méthyliques adjacents à un groupe carboxyle libre des pectines, enlevant ainsi les groupes méthyles de la chaîne les uns après les autres dans une direction donnée. Le résultat est la libération du méthanol et la formation du PGA (**Sakai et al, 1993**). Leur mode d'action reste toujours mal élucidé. Selon (**Jayani et al. 2005**), le mécanisme d'attaque des PE varie en fonction de leur origine. L'activité des PE peut être suivie soit par le dosage du méthanol libéré, soit par la détermination de l'augmentation du nombre des carboxyles libres, ou encore en utilisant un régulateur du pH puisque, l'ionisation du groupe carboxyle produit dans le milieu un proton causant une variation du pH.

➤ **Dépolymérase (polygalacturonases et lyases)**

Sont des hydrolases qui possèdent des activités endo- ou exogalacturonases. En fonction du substrat et du mécanisme de clivage des liaisons glycosidiques, on distingue quatre catégories différentes : Les PG et les PMG: qui agissent respectivement sur les pectates et les pectines par hydrolyse. Les PGL et les PMGL: agissant par β -élimination sur les

pectates et les pectines respectivement. (Alkortaet *al*, 1998). Suivant le mode d'attaque, la réaction peut se faire soit de manière aléatoire ou bien de l'extrémité de la chaîne. Ce qui permet la distinction des endo- et des exo-dépolymérase (Jayani *et al*, 2005).

I.6.3. Utilisation industrielle de la pectinase

Ces enzymes sont classées parmi les enzymes les plus importantes dans le secteur industriel (Kashyap *et al.*, 2001), en raison de leurs fréquentes et multiples utilisations. Comme exemple, on cite les pectinases acides utilisées dans l'extraction et la clarification des jus de fruit (Saxena *et al.*, 2008) et les pectinases alcalines faisant l'objet d'une immense utilisation dans le dégomme des fibres de ramie, Portant 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).

CHAPITRE II

MATÉRIEL

&

MÉTHODES

II.1. Objectif du travail

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

- Isolement et identification des moisissures mycotoxinogènes, à partir des arachides commercialisées dans différentes régions de Tiaret.
- Dosage de l'activité pectinolytique des espèces de moisissures mycotoxinogènes.

II.2. Date et lieu de travail

Ce travail a été réalisé durant la période du 10 février jusqu'au 10 avril, au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun- Tiaret.

II.3. Matériel et produits utilisés

II.3.1. Matériel végétal

Au cours de cette étude, 05 échantillons d'arachides commercialisées à Tiaret (Figure 01) ont été collectés au niveau des marchés des différentes régions de Tiaret (Takhmaret, Frenda, Ain Dheb, Tiaret centre, Dahmouni), pour identifier les moisissures mycotoxinogènes présentes dans ces grains d'arachides.



Figure n°01 :Échantillon des grains d'arachide.

II.3.2. Milieux de culture

Les milieux des cultures synthétiques utilisés pour l'isolement et la purification des moisissures à partir des grains d'arachides sont PDA et Agar 2% (Annexe n°1).

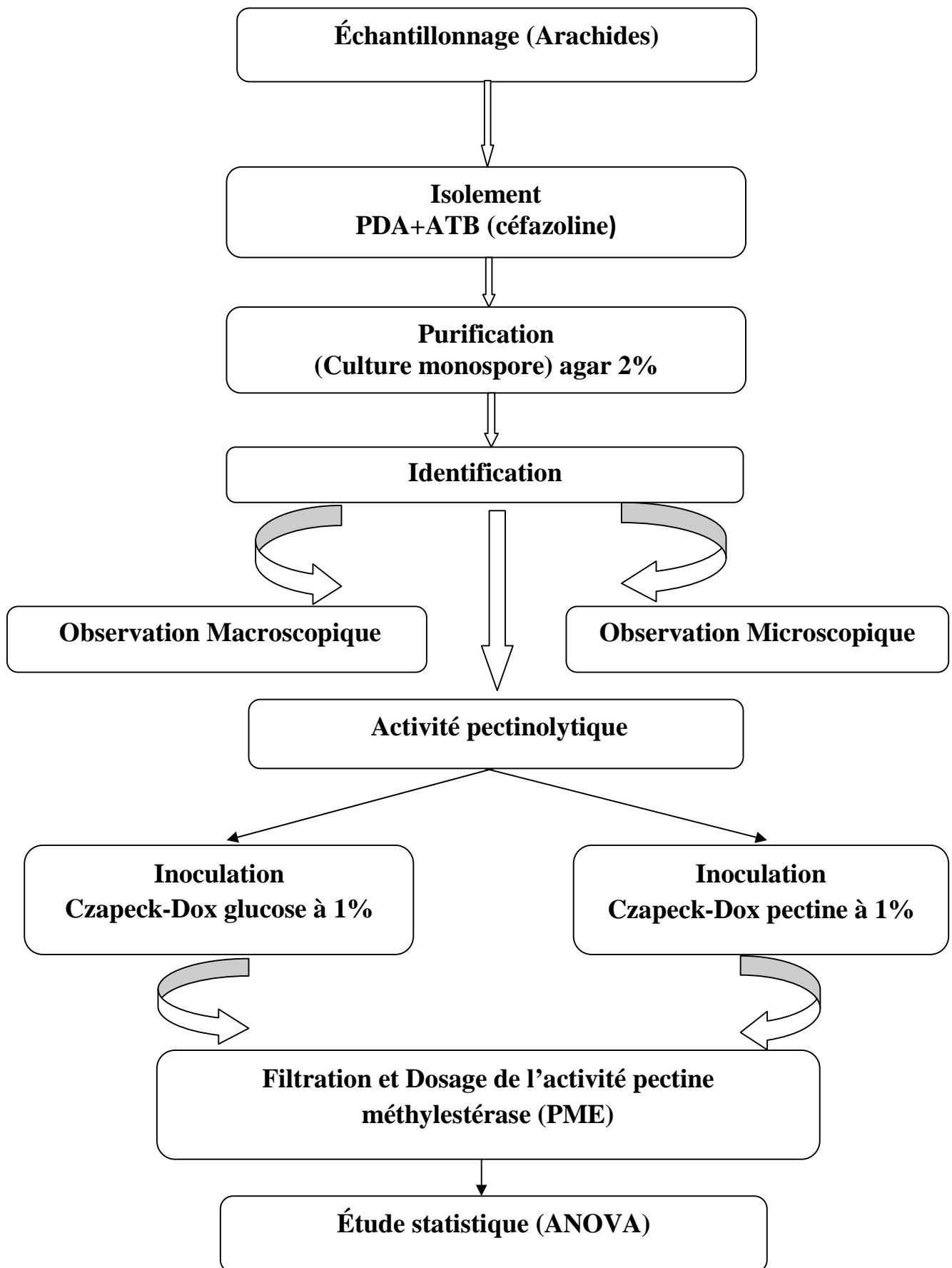
II.3.3. Autre matériel

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

Tableau n°2 :Appareillage, verrerie et produits utilisés.

Appareillages	Verrerie	Produits	Autres
-Microscope optique(OPTIKA) -Vortex(TECHNO KARTELL) Autoclave(WOLFVESKZEUG-VORRICHLUGSUN 7340 GEILINGEN) -Agitateur magnétique(IKAMAG) -Balance analytique (KERN 440-45N) -Incubateur(MEMMERT854 SCHWABACH W-GERMANY) -Four Pasteur(HERAEUS) -Bain marie(MEMMERT)	-Éprouvettes -Flacons - Lames -Tubes à essai	-Alcool Antibiotique (Céfazoline) -Bleu de méthylène -Eau distillée stérile -Hypochlorite de sodium (Eau de javel 30°) -Hydroxyde de Sodium	-Bec bunsen -Boîtes de pétri -portoir de tube a essais -pissettes -lance de platine -pince de platine -Barreau magnétique

I.4. Protocole expérimental

**Figure n° 02** : Schéma du protocole expérimental

II.4. Tri des grains

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

la taille, la couleur et l'aspect des grains: tout changement de ces critères des grains permet de suspecter leur contamination intérieure (**Botton *et al.*, 1990**).

II.5. Isolement des moisissures à partir des différents grains d'arachide

La technique d'isolement utilisée est celle décrite par **Davat et Rouxel (1997)**. Avant la mise en culture, les grains d'arachide ont été désinfectés superficiellement dans une solution diluée d'hypochlorite de sodium à 30% (Eau de Javel) pendant 3 min pour chaque échantillon. Les grains ont été ensuite rincés trois fois à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace d'hypochlorite de sodium. Nous avons prélevé 02 grains à partir de chaque échantillon qui ont été placés avec une pince Brucelle sur le milieu de culture PDA en triplicate. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C pendant 3 à 7 jours. Durant cette période, un suivi quotidien a été effectué (Figure n° 03).



Figure n°03: isolement à partir des grains des arachides sur milieu PDA

II.6. Purification des isolats

Après isolement, plusieurs repiquages des souches de moisissures ont été effectués sur milieu PDA et dans les mêmes conditions d'incubation à l'aide d'une anse de platine stérile. Après incubation, des repiquages de manière aseptique ont été effectués : des explants de culture ne présentant aucune contamination sont prélevés au niveau de la zone périphérique des colonies où la culture est encore jeune. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention de colonies morphologiquement homogènes.

Afin d'obtenir un matériel de la flore fongique génétiquement homogène nous avons procédé à la culture monospore. Elle s'effectue selon la méthode décrite par **Henni et al., (1994)**. Cette méthode repose sur la préparation de dilutions décimales. Nous avons prélevé un fragment de mycélium qui a été introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile. Après agitation du tube à l'aide d'un vortex, nous avons prélevé 1 ml de la suspension conidienne, que l'on a introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile. Un volume de 0.1 ml a été déposé et étalé à l'aide d'une pipette Pasteur sur la surface du milieu Agar 2 % dans les boîtes de Pétri. Après 48 heures d'incubation à 28°C, les germinations conidiennes ont été prélevées et déposées au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours .

II.7. Identification des isolats

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse des critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (**Cahagnier et Molard, 1998**).

II.7.1. Identification macroscopique

L'étude des caractères macroscopiques a porté sur tous les groupes de moisissures purifiées. Elle repose sur des observations à l'œil nu et nous avons utilisé la méthode décrite par (**Booth, 1984 et Nelson et al., 1981**). Les caractères étudiés sont la couleur et la texture du thalle ; la couleur du revers de la colonie ; le contour de la colonie et la vitesse de croissance apicale.

II.7.2. Identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique est fondé essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, mode de ramification, différenciation des thallospores...) et des spores (forme, couleur, texture des parois, groupement en chaînes, etc...) (**BOTTON *et al.*, 1990**). Généralement, un examen à l'objectif x40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnostic (**Chagnier et Mollard, 1989**).

Nous avons placé délicatement une empreinte fongique prélevée à l'aide d'un ruban adhésif sur une lame en lui ajoutant le bleu de méthylène. Cette opération est réalisée par la technique de drapeau (**Pitt et Hocking, 2009**). L'observation est effectuée au microscope optique aux différents grossissements.

II.8. Conservation

Les moisissures purifiées sont conservées à 0°C après être ensemencées sur milieu PDA inclinées et incubées à 28°C pendant 4 jours.

II.9. Activité pectinolytique

II.9.1. Étude de la croissance mycélienne et l'activité pectinolytique

Dans cette étude, nous avons essayé de comparer l'influence de deux substrats organiques appartenant à des groupes chimiquement différents (glucose, pectine) sur la croissance mycélienne. Ces deux substrats ont été utilisés comme seule source de carbone dans un milieu minérale (milieu liquide Czapeck-Dox modifié), ce qui implique l'obtention de deux milieux : Czapeck-Dox glucose à 1% et Czapeck-Dox pectine à 1 %, contenus dans des erlenmeyers à raison de 30 ml. Le pH initial était de 7.2. Chaque erlenmeyer a été inoculé avec trois disques mycéliens de l'isolat fongique *Aspergillus fumigatus*. Trois répétitions ont été préparées pour chaque milieu de culture. Nous avons réalisé une incubation à 28 °C pendant 10 jours avec une agitation permanente dans un bain marie secoueur.

II.9.2. Préparation des extraits enzymatiques

Après incubation, le mycélium a été récupéré par filtration en utilisant des compresses stériles, et le poids mycélien a été noté. Les filtrats de culture ont été répartis dans les tubes à essais à raison de 10ml par tube, le pH a été noté.

II.9.3. Dosage de l'activité pectine méthylestérase (PME)

La technique de dosage de l'activité de cette enzyme est basée sur l'augmentation de l'activité due à une déméthylation d'un substrat pectique. Elle s'est effectuée selon la méthode décrite par **Karkachi (2013)**. 1ml de filtrat de culture a été ajouté à 5ml d'une solution pectine, le milieu réactionnel a été ajusté à pH 7 avec du NaOH. Dans l'essai témoin, la préparation enzymatique a été portée à 100°C dans un bain marie pendant 15 min avant d'être ajusté à pH 7. Les filtrats de cultures testés et les témoins sont incubés à 30°C en agitation pendant 3h, puis titré avec du NaOH 0.05N. Durant le dosage, une homogénéisation constante doit être maintenue. L'activité est exprimée en unité /mol, ou en unité correspond au volume du filtrat nécessaire pour obtenir la libération d'un micro-équivalent de H⁺ par min, elle est ensuite rapportée au volume de filtrat de culture. La mesure de l'activité enzymatique de PME est calculée de la manière suivante :

$$\text{Activité en U/mol} = \frac{\text{VolumedeNaOH(ml)} \times \text{Normalisation du NaOH(N)} \times 10^3}{\text{Temps (mn)} \times \text{volume du filtrat(ml)}}$$

II.10. Analyses statistiques

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

CHAPITRE III

RÉSULTATS

&

DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Isolement et purification de moisissures

Après incubation pendant 3 à 7 jours, nous avons remarqué la croissance de différents aspects fongiques sur certains grains d'arachide. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les échantillons analysés sont contaminés par les moisissures.

Nous avons obtenus onze (11) isolats fongiques, répartis sur cinq régions à Tiaret dont les pourcentages de contaminations sont représentés sur le Tableau 3.

Tableau n°3 : pourcentage de la population fongique isolée.

Région	Pourcentage
Tiaret centre	100%
Ain Dheb	50%
Takhmaret	16.66%
Dahmouni	16.66%
Frenda	0%

L'isolement des grains a permis d'accéder à la purification par culture monospore. Nous avons purifié les onze (11) souches et ensuite nous avons choisi une souche d'*Aspergillus* pour le dosage de l'activité pectinolytique.




III.1.2. Identification des isolats


La purification des isolats par culture monospore, nous a permis d'identifier les caractères macroscopiques et microscopiques.

III.1.2.1. Identification macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés sur le milieu PDA. Cette identification macroscopique, nous a permis de mettre en évidence les caractères cultureux des 11 isolats. Les résultats obtenus, ont été rassemblés dans le Tableau 4.

Tableau n°4: Examen macroscopique des moisissures sur milieu PDA.

Régions	Souches	Observation macroscopique	Caractères macroscopiques	Genres
Ain Dheb	A3/2		-pigmentation jaune contour blanche -croissance moyenne. -Aspect : cotonneux.	<i>Aspergillus</i>
Dahmouni	D2/1		-pigmentation jaune-blanche. -contour blanche. -croissance : moyenne -Aspect : cotonneux.	<i>Aspergillus</i>
Dahmouni	D2/1'		-pigmentation blanche Croissance : rapide Aspect : cotonneux.	<i>Fusarium</i>

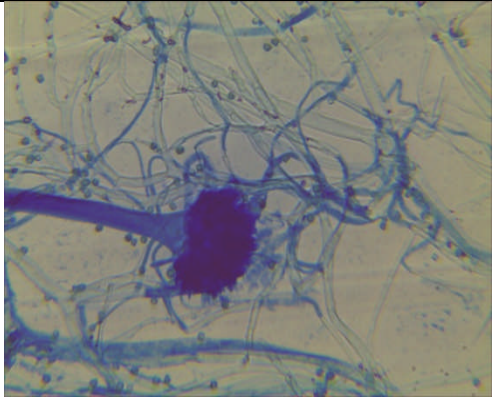
Takhmaret	TA 2/1'		Pigmentation marron foncé – noire Contour blanche Croissance : moyenne Aspect : poudreuse.	<i>Alternaria</i>
-----------	---------	---	--	-------------------

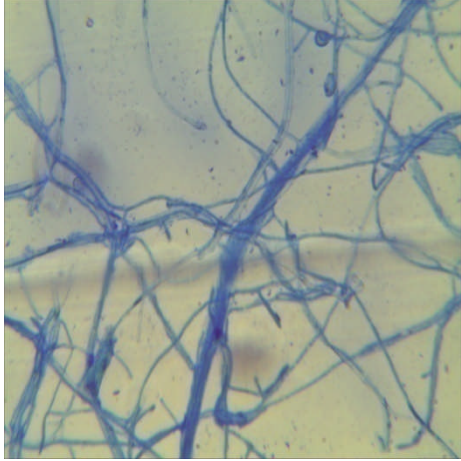
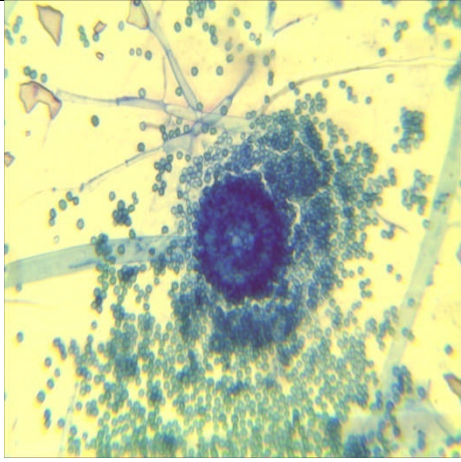
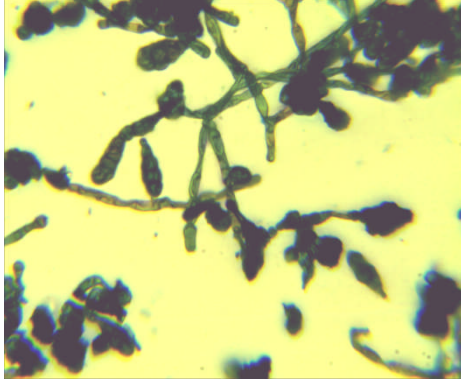
III.1.2.2. Identification microscopique

Les différentes souches sélectionnées ont été étudiés sur le milieu PDA. Les observations microscopiques sont fondées essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, pigmentation, différenciation) et des spores (forme, pigmentation, texture de parois).

Résultats obtenus de 07 souches des différents aspects microscopiques sont représentés dans le Tableau 5.

Tableau n°5: Examen microscopique des souches purifiées.

Souches	Observation microscopique (Gr 400)	Caractères microscopiques	Genres
A3/2		Hyphes septés -tête aspergilliare : conidiophore qui se termine par une vésicule.	<i>Aspergillus</i>

<p>D2/1</p>		<p>Hyphe septés -tête aspergilliare : conidiophore qui se termine par une vésicule.</p>	<p><i>Aspergillus</i></p>
<p>D2/1'</p>		<p>Hyphe septés. -Macroconidies fusiformes, - Microconidiesovoides. -Phialides cylindriques solitaires ou groupées.</p>	<p><i>Fusarium</i></p>
<p>Ta2-1'</p>		<p>Hyphe septés, long filaments mycéliens. -les filaments frais ont été colorés au bleu.</p>	<p><i>Alternaria</i></p>

III.1.3. Détermination de l'activité pectinolytique

III.1.3.1. Étude de la croissance mycélienne et l'influence des substrats

Après dix jours d'incubation et suite à une filtration, les poids du mycélium dans chaque erlenmeyer ont été pesés. L'influence des deux substrats (glucose et pectine) sur la croissance mycélienne a apparue clairement. Les résultats de la filtration sont illustrés sur la Figure. Ces résultats montrent qu'il y a une différente influence des substrats (glucose et pectine) sur la croissance mycélienne et on voit qu'il y a une bonne croissance sur le glucose, qui est utilisé comme seul substrat, avec une masse mycélienne de (1,72g) ; par contre, sur le milieu liquide Czapeck-Dox pectine à 1 %, on voit une masse de (1,39g). L'étude statistique à de montré que l'influence du substrat n'est pas significative ($P > 0,05$).

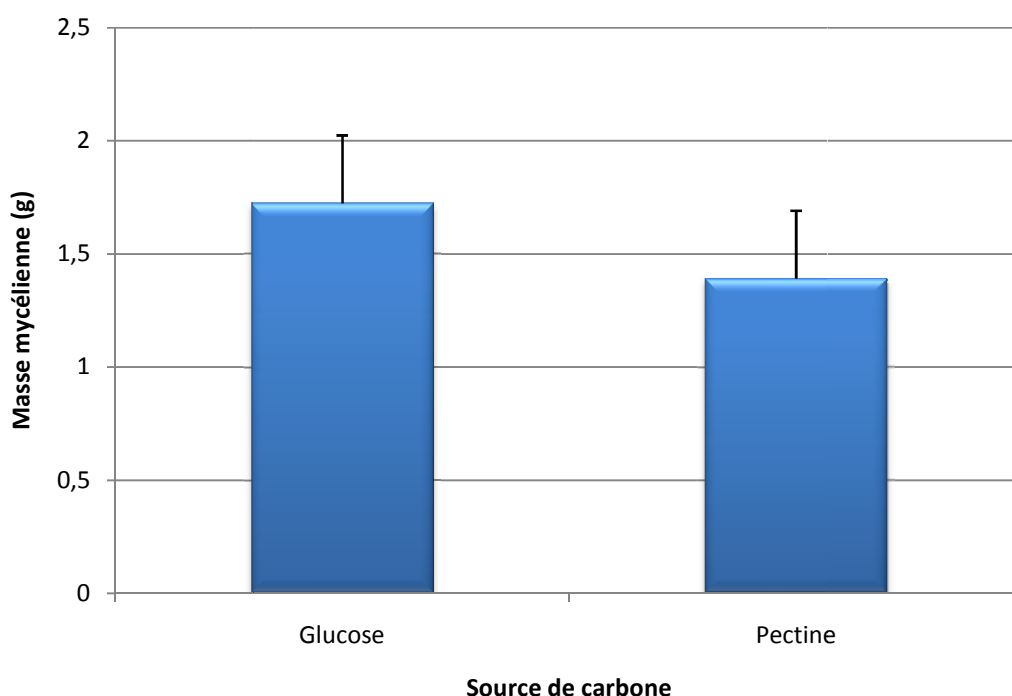


Figure n° 04: L'influence des substrats sur la croissance mycélienne.

III.1.3.2. Dosage de l'activité des pectines méthyle estérase (PME)

L'activité enzymatique des pectinases a été mise en évidence par la méthode du dosage (PME). L'activité PME dans les filtrats de culture a été mesurée de manière quantitative par titrage. Elle a révélé une importante activité PME chez l'isolat d'*Aspergillus fumigatus* dans le milieu liquide Czapeck pectine à 1 %. Les résultats sont mentionnés dans la Figure n° 05. L'analyse statistique à montre qu'il y une influence significative de la source de carbone sur l'activité enzymatique.

Les résultats montrent que le milieu liquide Czapeck-Dox pectine à 1 % permet une bonne activité pectinolytique (58,9µeq), par rapport au milieu liquide Czapeck-Dox glucose à 1 % (3,4 µeq). On remarque aussi, que plus la valeur du pH augmente (7,7), plus l'activité pectinolytique augmente, avec une diminution remarquable du poids de mycélium. Les résultats sont mentionnés sur la Figure n° 06.

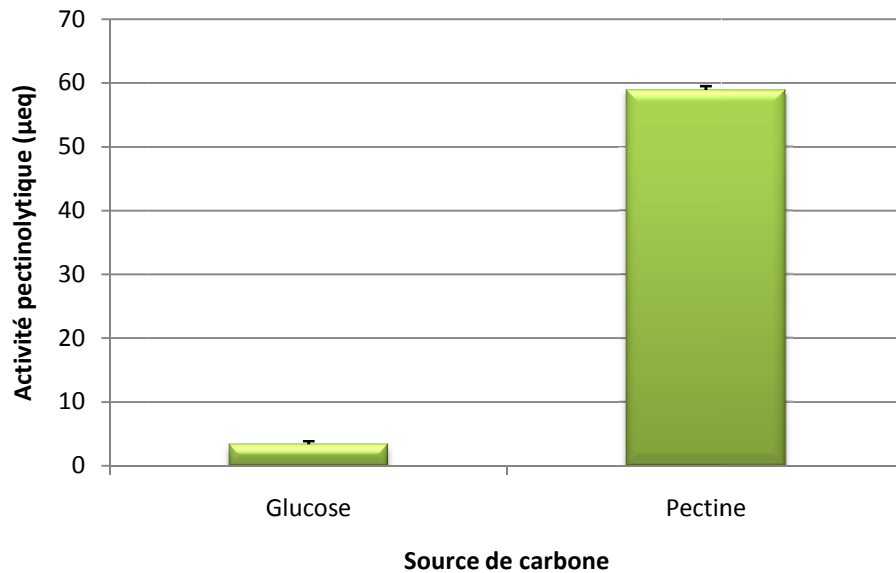


Figure n° 05: variation de l'activité pectinolytique en fonction de source de carbone.

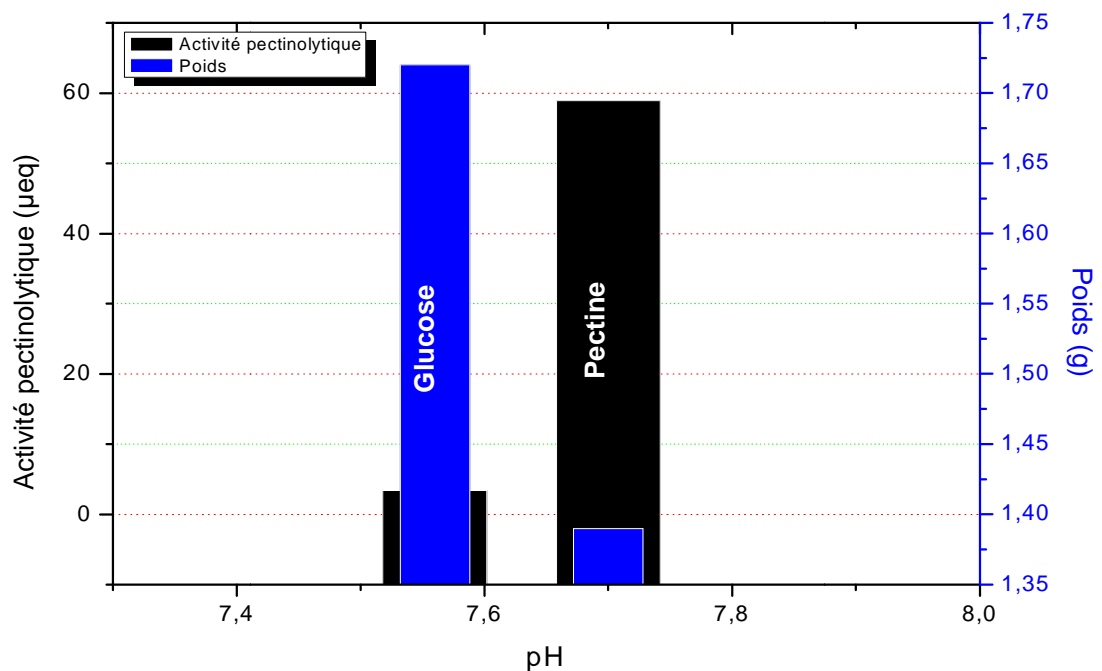


Figure n° 06 : Variation de l'activité pectinolytique et de la masse fongique en fonction du pH.

III.2. Discussion

L'arachide peut être sujette à diverses contaminations par des éléments chimiques toxiques, c'est le cas des mycotoxines, qui sont des contaminants naturels de la chaîne alimentaire (Davidet *al.*, 2018).

Un nombre total de 11 isolats des moisissures à été isolées à partir des 05 échantillons d'arachides. Les études macroscopiques et microscopiques ont parmi de mettre en évidence 05 genres fongiques (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Rhizopus*).

L'analyse mycologique des grains d'arachides à été effectuée et les résultats de cette analyse ont révélé une contamination par des moisissures mycotoxinogènes dans les 05 échantillons utilisés.

Les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont connues comme des moisissures de stockage (Moreno *etal.*, 2009 ; Makunetal., 2007). Selon (Ribaetal., 2008), le manque de ventilation couplé à une température élevée, favorise la croissance de ces espèces xérotolérantes. Cependant, la forte humidité défavorise, plutôt, la croissance des *Penicillium* en faveur de celle des *Aspergillus* qui les dominant. De plus, le taux de contamination par le genre *Penicillium* est inversement proportionnel à la durée de stockage ce qui explique la dominance du genre *Aspergillus*, vraisemblablement, favorisé par une humidité élevée du grain et un stockage de longue période (Tahanietal., 2008).

Parmi les espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, il faut souligner la grande dominance d'*Aspergillus fumigatus* suivi d'*Aspergillus flavus*. Cette fréquence de contamination importante est accompagnée par une production de mycotoxines. Si cette présence de flore fongique est surprenante, ce n'est pas la première fois qu'une telle contamination est observée. En effet, les enquêtes menées en Italie ont démontré la présence de flore productrice de mycotoxines dans les certaines matières premières et aliments (Pietrietal., 2004), ont isolé les espèces de *Fusarium* à partir des arachides. Les espèces de *Fusarium* sont, principalement, considérées comme des moisissures de champs qui exigent des teneurs d'eau et d'humidité relative élevés donc, elles ne sont pas compétitives dans des conditions de stockage (Makunetal., 2007).

Les autres souches isolées appartenant aux genres *Rhizopus*, *Alternaria* sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et du sol (Withlow et Hagler, 2001).

Les enzymes d'origine microbienne présentent des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire, les détergents pour lessives et l'industrie pharmaceutique. Environ 40% des enzymes industrielles sont d'origine fongique (**Botton et al., 1990**).

Les enzymes pectinolytiques occupent une position centrale avec 25% du marché global des enzymes. *Aspergillus niger*, le groupe dominant des *Aspergillus*, est largement utilisé comme producteur d'enzymes polygalacturonase (**Nazneen et al., 2011**).

Cette étude nous a permis de savoir la capacité d'isolat *Aspergillus fumigatus* de synthétiser des enzymes pectinolytiques particulièrement l'enzyme pectine méthylestérase (PME).

Plusieurs champignons sont capables de produire *in vitro* les enzymes pectinolytiques : la polygalacturonase et la pectine lysase. Cette production dépend de l'espèce fongique. En effet, la pectine lysase est importante chez l'isolat d'*Alternaria alternata* et *Trichothecium roseum*, moyenne chez l'isolat *Trichoderma* sp. et faible chez *Penicillium* sp. et *Fusarium avenaceum*. La polygalacturonase est importante chez *A. alternata* et *Penicillium* sp., moyenne chez *Trichoderma* sp., et très faible chez *Trichothecium roseum* et *Fusarium avenaceum*. (**Selmaoui et al., 2017**).

D'autres études ont montré que l'isolat *Fusarium oxysporum*, a la capacité de produire deux types d'enzymes pectine méthylestérase et polygalacturonase. La production de ces enzymes dépend principalement du substrat. En effet, elle est importante sur le milieu pectine et faible sur le milieu glucose (**Karkachi, 2013**). Plusieurs auteurs ont montré que les sources de carbones rapidement fermentescibles telles que les monosaccharides permettent une bonne croissance du mycélium fongique (**Awad, 2005**). La présence du glucose favorise la croissance du microorganisme et du mycélium (**Compaoré et al., 2016**).

CONCLUSION

Conclusion

Les analyses mycologiques effectuées sur 05 échantillons des grains d'arachides ont permis d'isoler 11 isolats fongiques dont nous avons identifié les quatre genres de moisissures mycotoxinogènes : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Penicillium*, ainsi que le genre d'altération *Rhizopus*, avec une dominance du genre *Aspergillus*.

Le genre *Aspergillus* représenté par l'espèce *Aspergillus fumigatus* a été détecté dans deux échantillons analysés avec une fréquence et une abondance élevée. Ces espèces ont été révélées productrices de mycotoxines.

L'étude enzymatique *in vitro* montre clairement l'influence de la source de carbone (pectine et glucose) sur la production enzymatique, lors du dosage de la pectine méthylestérase (PME) dans les filtrats de culture de l'isolat *Aspergillus fumigatus*.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire qu'il reste comme perspectives, de faire des études plus approfondies de la biodiversité de ces moisissures mycotoxinogènes et leur identification moléculaire, ainsi que l'identification des mycotoxines et des enzymes pectinolytiques sécrétées.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adams M.R., Moss M.O., 2002.** Toxingenic fungi. In "Food microbiology". RSC, UK, 282-301.
- Aguillar G., Huitron C., 1990.** Constitutive exopectinase produced by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnology Letters* 12, P: 655-660.
- Alborch L., Bragulat M.R., Abarca M.L., Cabañes F.J., 2011.** Temperature and incubation time effects on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus sclerotigenus* and *Aspergillus lacticoffeatus* on culture media. *Letters in Applied Microbiology*. 52, 208-212.
- Alkorta I., Garbisu C., Llama M.J., Serra J.L., 1998.** Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Proc. Biochem.* 33 (1), P: 21-28.
- Berthier J., Valla G., 2002.** Moisissures-Mycotoxines et Aliments : Du risque à la prévention. Université Claude Bernard Lyon I. Page web consultée le 13 Janvier 2008 <http://handy.univ-lyon2.fr/service/cours/mycot/mycot.html>.
- Boiron P., 1996.** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P : 13-19-69-79.
- 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., Beton A., Fever M., Gaithier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P. Sanglier J.J., Vayssie Y., Veau P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2eme edition. Masson .Collection Beotechnologies .P : 34-428.
- Cahagnier B., Melcion D., Richard-Molard D., 1995.** Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. *Letters 127 in Applied Microbiology* .,20, 247-251.
- Chagnier B., Richard-Molard., 1989.** Moisissures des aliments peu hydratés. Collection sciences et techniques agroalimentaires, 171-175.
- Chapeland- Leclerc F., Papon N., Noël T., Villard J., 2005.** Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoles). *Revue Française*.
- Compaore H., Sawadogo-lingani H., Samandoulougou S., Guira F., Savadogo A., Traore A.S., 2017.** aptitude de trois souches de moisissures à produire des enzymes extracellulaires en milieu solide au Burkina Faso. *Journal of Applied Biosciences* 110 :10776-10782. des Laboratoires, 373.
- Davet, P., Rouxel F., 1997.** Detecting and isolating soil fungi. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de paris, France.
- Dwevidi S., Crouch J.H., Nigam S.N., Ferguson M.E., Paterson A.H., 2003.** Molecular breeding of groundnut for enhanced productivity and food security in the semi-arid tropics: Opportunities and Challenges. *Adv. in Agronomy* 80, 221p.
- Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J., 2004.** Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. *Research in Microbiology* ,155, 861-866.

Références bibliographiques

- Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T., Vniegra-Gonzalez G., 2006.** Production of hydrolytic polymerizing pectinases. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), P: 221-227
- Fogarty W.M., Kelly C.T., 1980.** Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion.* London: Academic Press, Vol. 5, P: 115-170.
- Gainvors A., Belarbi A., 1995.** Detection methods for polygalacturonase producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, P: 1311-1319.
- Henni J., Boisson C., Geiger J. P., 1994.** Variabilité de la morphologie chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathologia Mediterranea*, 33, 51-58.
- Hetherington A.C., Raistrick H., 1931.** Studies in biochemistry of micro-organism XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B—Biological Sciences*, 220: 269–297.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R., 2005.** Microbial pectinolytic enzymes : a review. *Process Biochem.*, 40, 2931-2944.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R., 2005.** Microbial pectinolytic enzymes: a review. Protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39, P:213–294.
- Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R., 2001.** Applications of pectinase in the commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.*, 77, p: 215-227.
- Krapovickas, A., W. Gregory, 1994.** Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonpladia*, 8: 1-187.
- Krska R., 2009.** Mycotoxins. *Anal Bioanal Chem.* p:1203–1204.
- Leclerc F.C., Papon N., Noel T., Villard J., 2005.** Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires.* p : 61-66.
- Makun H.A., Gbodi T. A., Akanya O. H., Salako E. A., Ogbadu G. H., 2007.** Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza Sativa*) in Niger State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 6 (2) : 099-108.
- Manizan A.L., Akaki D., Piro-Metayer I., Montet D., Brabet C., Koffi-Nevry R., 2018.** Evaluation des pratiques post récolte favorables à la contamination de l'arachide par les mycotoxines dans trois régions de cote d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 124 :12446-12454.
- Marie A., Jean M-L., Norman K., Marcel B., Michel L. Yves F., 2002.** Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Institut National de Santé Publique Quebec. P : 3-19.
- Mateo J.J., Mateo R., Jimenez M., 2002.** Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 72, 115-123.

Références bibliographiques

- Mehravar M., Sardari S., 2011.** Screening of antimicrobial membrane-active metabolites of soil microfungi by using chromatic hospholipid/polydiacetylene vesicles. *Journal of Medical Mycology*, 21 (3): 188-197.
- Moreno E. C., Garcia G. T., Ono M. A., Vizoni É., Kawamura O., Hirooka E. Y., 2009.** Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Chemistry* 116:220–226.
- Nazneen A. M., Alam M., Azim U., Feroza B., Tipu S., Abul K., 2011.** Production of Pectinase by *Aspergillus niger* Cultured in Solid State Media. *International Journal of Biosciences (IJB)*. vol .1, p .33-42.
- 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 de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de Doctorat, *Institut National Polytechnique de Toulouse*, consulté en juin 2018, P 2/147.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T Killington R., 2000.** L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. p :210-217.
- 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.
- Pereira E., Santos A., Reis F., Tavares R.M., Baptista P., Lino-Neto T., Almeida-Aguiar C. 2013 .** A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological Research*, 168 (1): 1-5.
- Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L., Piva G., 2004.** Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. *Food Addit. Contam.* p: 479-487.
- Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L., Piva G., 2004.** Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. *Food Addit. Contam.* 21, 479-487.
- Pitt J.I., Hocking A.D., 2009.** Fungi and Food Spoilage, *Penicillium and Related Genera*, Chapter 7, 169-273.
- Placinta C.M., D'Mello J.P.F., Macdonald A.M.C., 1999.** A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal feed science and Technology*. p: 21-37.
- Riba A., Mokrane S., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N., 2008.** Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology*. 122:85–92.

Références bibliographiques

- Riley R T., Voss K.A., Norred W.P., Sharma R.P., Wang E., Merrill A.H., 1998.** Fumonisins : mechanism of mycotoxicity. *Rev. Med. Vétér.*, 149, 617- 626.
- Ruppel P., Delfosse P.H., Hornick J. L., 2004.**La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Ann. Méd. Vét.* 148: 141-146.
- Saxena, S., Shukla, S., Thakur, A.,Gupta, R.,2008.** Immobilization of polygalacturonase from *Aspergillusniger* onto activated polyethylene and its application in apple juice clarification. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*,55(1) :33-51.
- Selmaoui K., OuazzaniTouhami A., Mouria A., Benkirane R., Douira A., 2017.** Détection de l'activité enzymatique pectinolytique et cellulolytique des champignons responsables de la pourriture des pommes en conservation. *International Journal of Innovation and Scientific Research*.Vol.30,pp. 242-250.
- Sommer N.F., Buchanan J.R., Fortlage R.J., 1974.**Production of Patulin by *Penicilliumexpansum*.*AppliedMicrobiology*, 28, 589-593.
- Tabuc C., 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest.
- Tahani N., Elamrani A., Serghini-Caid H., Ouzouline M., Khalida., 2008.** Isolement et Identification de souches de moisissures réputées toxigènes. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* 2 (1): 81-91.
- Tatiana Da Costa R.P.,Flevo F., 2005.** Extraction and assay of pectic enzymesfromPeruviancarrot (*Arracaciaxanthrriza* Bancroft). *Food Chem.* 89, P: 85-92.
- Ueno Y., 1977.** Trichothecenes: review address.In:J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine, and M. A. Mehlman (ed.), *Mycotoxins in human and animal health*. Chem-Orbital, Park. Forest South, Ill. p:189-207.
- Van Der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., De Scott B.,Theron J.J., 1965.** Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillusochraceus*with.Nature, 205, 1112-1113.
- Withlow L.W., Hagler W.M., 2001.** Mycotoxin contamination of feedstuffs Anadditional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC.Symposium sur les bovinslaitiers.CRAAQ Québec.
- XuXiangming., Bailey J.A, Cooke B.M., 2003.** Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi.Springer, p: 129.

ANNEXES

Références bibliographiques

Annexe n°1

Composition des milieux de culture

Les milieux de culture ont été autoclavés à 120 pendant 20 minutes sous pression de 1 bar

Milieu PDA (Botton *et al.*,1990)

Ce milieu est recommandé pour l'isolement et le dénombrement des moisissures et des levures des produits alimentaires. Le milieu de culture PDA (potato Dextrose Agar) est composé de pomme de terre, de glucose, et d'Agar-agar. La composition du milieu en condition d'asepsie totale est la suivante:

Pomme de terre	200g
Dextrose	20g
Agar agar	20g
Eau Distillée q.s.p	1000ml

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

Ce milieu de culture synthétique est recommandé pour l'isolement et dénombrement des moisissures et des levures des produits alimentaires. La composition du milieu en condition d'asepsie totale est la suivante:

Agar agar	20g
Eau Distillée	1000ml

Milieu Czapeck-Dox pectine solide 1%

Pectine	1g
KH ₂ PO ₄	1g
KCL	0,5g
Na ₂ NO ₃	2g
MgSO ₄	0,5g
FeSO ₄	0,01g
Eau distillée	q.s.p 1L

Milieu Czapeck-Dox glucose solide 1%

Glucose	1g
KH ₂ PO ₄	1g
KCL	0,5g
Na ₂ NO ₃	2g

Références bibliographiques

MgSO ₄	0,5g
FeSO ₄	0,01g
Eau distillée	q.s.p 1L

Annexe n° 2



Tiaret centre 1



Tiaret centre 3



Dahmouni 2



Takhmaret 2



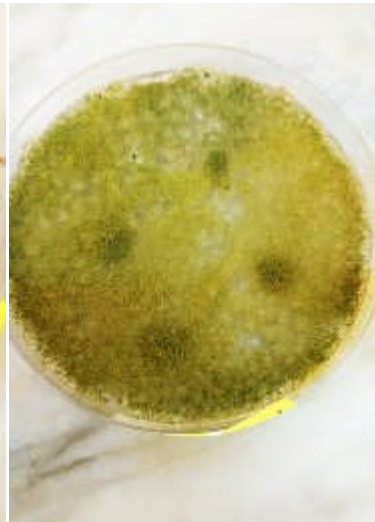
Ain Dheb 3

Figure n°07 : Isolement des souches fongiques à partir des grains d'arachides collectés de différentes régions de Tiaret.

Références bibliographiques



D2-1: *Alternaria* sp.



A3-2: *Aspergillus* sp.



Ta2-1: *Alternaria* sp.



Ti1-1: *Penicillium* sp.



Ti3-2: *Penicillium* sp.



A3-3: *Alternaria* sp.



A3-1: *Aspergillus* sp.

Figure n°08 : Représentation des souches fongiques purifiées.



Figure n°09 :Prélèvement d'une empreinte fongique destinée à l'observation Microscopique.



Figure n°10 :la croissance mycélienne dans le milieu Czapeck-Dox (pectine et glucose).

Annexe n° 3

Tableau n° 6 : Variation du pH, de l'activité pectinolytique et de la masse fongique en fonction de la source de carbone.

	Glucose	Pectine
pH initial	7,20	7,20
pH obtenu	7,56	7,70
Masse (g)	1,72	1,39
Activité Pect (μeq)	3,40	58,90

Résumé

L'arachide est une plante légumineuse produite à grande échelle et consommée dans de nombreux produits alimentaires. Un grand nombre d'espèces de moisissures, présentes dans l'air et sur le sol, sont capables de se développer et de contaminer ces produits alimentaires. Ce travail a été effectué dans le but d'isoler et d'identifier les espèces de moisissures capables de synthétiser et d'excréter des mycotoxines dans les grains d'arachides commercialisés dans 05 régions de Tiaret. Selon l'analyse mycologique qui a concerné 05 échantillons, onze (11) isolats fongiques ont été isolés et sept (07) d'entre eux ont été identifiés comme étant appartenant à quatre (04) genres de moisissures mycotoxinogènes (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Alternaria*), ainsi que le genre *Rhizopus*, qui est considéré comme un agent d'altération. La culture de la souche *A. fumigatus* pour le dosage de l'activité pectinéméthylestérase sur le milieu liquide Czapeck-Dox par utilisation des deux substrats (pectine et glucose) à 1% a montré que le milieu liquide Czapeck-Dox pectine à 1 % permet une bonne activité pectinolytique (58,9 µeq), par rapport au milieu liquide Czapeck-Dox glucose à 1 % (3,4 µeq). On remarque aussi, que plus la valeur du pH augmente (7,7), plus l'activité pectinolytique augmente, avec une diminution remarquable du poids de mycélium.

Mots clés : Arachides, moisissures, mycotoxines et activité pectinolytique.

ملخص

الفول السوداني هو نبات البقوليات المنتجة على نطاق واسع وتستهلك في العديد من المنتجات الغذائية. هناك عدد كبير من أنواع العفن، الموجودة في الهواء وعلى التربة، قادرة على تطوير وتلويث هذه المنتجات الغذائية، وقد تم تنفيذ هذا العمل من أجل عزل وتحديد أنواع الفطريات القادرة على تجميع وفرز السموم الفطرية في حبات الفول السوداني التي تم تسويقها في 05 مناطق من تيارت. بناءً على التحليل الفطري للعينات 05، تم عزل إحدى عشرة عذلة فطرية وتم تحديد سبعة (07) على أنها تنتمي إلى أربعة (04) أجناس من الفطريات السامة (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*).

وكذلك جنس *Rhizopus*، الذي يعتبر عامل تغيير. زرع سلالة *A. fumigatus* لفحص نشاط استيراز البكتين ميثيل على وسط السائل Czapeck-Dox باستخدام اثنين من الركائز (البكتين والغلوكوز) عند 1%، أظهرنا أن البكتين على وسط السائل Czapeck-Dox عند 1% يسمح بالنشاط البكتيني الجيد (58.9 µeq)، مقارنة بالجلوكوز السائل Czapeck-Dox عند 1% (3,4 µeq). ويلاحظ أيضاً أنه كلما ارتفعت قيمة الأس الهيدروجيني pH (7.7)، زاد نشاط التحلل البكتيني، مع انخفاض ملحوظ في الوزن الفطري.

الكلمات المفتاحية: الفول السوداني، الفطريات، السموم الفطرية والنشاط البكتيني.

Abstract

Groundnut is a leguminous plant produced on a large scale, and consumed in many food products. A large number of fungal species, present in the air and on the soil, are able to contaminate these food products. This work has been carried out in order to isolate and identify fungal species able to synthesize and excrete mycotoxins in peanut grains marketed in 05 regions of Tiaret. Based on the mycological analysis of 05 samples, eleven (11) fungal isolates were isolated and seven (07) were identified as belonging to four (04) mycotoxinogenic fungal genera (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Alternaria*), as well as the genus *Rhizopus*, which is considered as an alteration agent. The culture of the *A. fumigatus* strain for the assay of the pectin methyl esterase activity on the Czapeck-Doxbroth medium, using two substrates (pectin and glucose) at 1%, showed that the medium Czapeck-Dox pectin at 1% allows a good pectinolytic activity (58.9 μeq), compared with Czapeck-Dox glucose at 1% medium (3.4 μeq). It is also noted, that the pectinolytic activity increases when the pH value is (7.7), with a remarkable decrease in mycelia weight.

Keywords: Groundnut, peanut grains, mycotoxinogenic fungal, pectinolytic activity.