

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 : "Toxicologie et Sécurité Alimentaire"

Présenté par :

BEKHEIRA Nour El Houda

LAKHAL Khadidja

MENARI Nour El Houda

Thème

Dosage de l'activité protéolytique chez les espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans les arachides commercialisées dans la région de Tiaret

Soutenu publiquement le : 02/07/2019

Jury:	Grade
Président: ALI NAHARI A.E.K.	MCB
Encadreur : Dr. YEZLI W.	MCB
Co-encadreur : Dr. KADDAR B.	MCB
Examinatrice : Dr. MEDJEBER N.	MCB

Année universitaire 2018/2019

Remerciements

Nous exprimons d'abord Dieu qui nous a donné le courage et la volonté d'achever 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 et sa gentillesse, qui nous ont permis de bien mener ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre très grande considération à notre **Co-promoteur Dr. KADDAR B.** pour les précieuses informations.*

*Nos vifs remerciements aux membres de jury pour avoir bien accepté d'examiner et de juger ce travail **Président: ALI NAHARI A.E.K et Examinatrice : Dr. MEDJEBER N.***

*Un remerciement spécial à notre responsable de spécialité **Dr. BOUBKEUR B.**, pour sa disponibilité et sa sympathie.*

*Un grand merci à l'équipe du laboratoire de Microbiologie **Mlles SORAIA, FOUZIA**, pour leur gentillesse et serviabilité*

Dédicaces

Du profonde de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers

A ma chère mère

Aucun dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vos avec consenti pour mon instruction et mon bien être

A mon père

Qui toujours disponible pour nous, et prêt a nous aider , je lui conforme mon attachement et mon profond respect

A mes frères, Ahmed , Yacine, Hicham

A mes chères sœur : f.Zohra ;Hakima ;Messaouda ;Sara

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

A ma chéerer binôme : Khadîdja et Houda

Ames chers amies : Imane ;Faurouz ;Fatiha ;Hafssa,Romissa ;Intissar

Pour les aides et supports dans les moments difficiles

A toute ma famille

A tous mes amis de ma promotion

Et à tous ceux que j'ai connus durant mon cycle d'étude

NOURELHOUDA

Dédicaces

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à Dieu qui nous à donner le courage et la volante d'achever ce travail.

Nous sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont Dr^o yezli wassim pour ces conseils ces encouragements.

Un grand merci, à mes parents qui m'ont beaucoup aide pour accomplir mon travail, et qui ont viellé pour que je mène à bien mes etude.

A mon frère <<Abd elkadr>> et mes sœurs << Zohra,Fadila,Nouria>>

A tous mes amis " Anoaur,Nour el houda ,Louiza,Mokhtaria"

Merci à toute ma famille lakehal et tous les personnes de sidi Bakhti.

Khadîdja

Dédicace

Grâce à Allah

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents pour l'amour, l'affection et la tendresse, pour leurs immenses sacrifices, leurs encouragements et surtout leurs patience.

J'espère pouvoir réaliser certains de vos rêves.

*A mes chères sœurs " **Malika** ", " **Hanane** " et A mon très chère frère " **Saad** " pour leurs aide et soutien durant toute les années de mes études*

*A tous la famille " **Bekheira** "*

*A " **Rachid** " et " **Nour** "*

A tous ceux qui m'ont enseignés un jour

A ceux qui sont proches de mon cœur

A tous mes amis et spécialement la promotion Master Toxicologie et Sécurité alimentaire.

NOURELHOUDA

Résumé

Les grains des arachides forment un excellent substrat pour les moisissures après les grains de céréales, où la flore fongique de stockage constitue un facteur important de détérioration et de sécrétion de mycotoxines. Selon l'analyse mycologique des échantillons d'arachides, collectés à partir de cinq (5) différentes régions de la commune de Tiaret (Ain D'heb, Frenda, Ksar Chellala, Rechaiga et Tiaret), nous avons pu isoler et identifier le genre *Rhizopus* dans les cinq échantillons analysés avec une fréquence et une abondance de 100%, sur milieu PDA. L'étude de la production des protéases par l'espèce mycotoxinogène *Aspergillus fumigatus* réalisée sur le milieu Czapeck-Dox, en utilisant séparément, deux sources de carbone (caséine et glucose), a montré que la source de carbone n'influence pas significativement la croissance mycélienne, avec un poids mycélien de 4,1 g avec le glucose et 3,53 g avec la caséine. Par contre, elle influence significativement la production de protéases, avec une activité protéolytique de 10 unités/ml avec le glucose et 44,6 unités/ml avec la caséine. Le dosage de l'activité protéolytique a montré que l'isolat *Aspergillus fumigatus* produit une protéase neutre dans un intervalle de pH allant de 6,8 à 7,3.

Mots clés : Arachides, Moisissures, protéases, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus*.

Abstract

Groundnut seeds form an excellent substrate for fungi after cereals, where the fungal storage flora is an important factor in mycotoxin degradation and secretion. According to the mycological analysis of peanut samples collected from five (5) regions of Tiaret commune (Ain D'heb, Frenda, Ksar Chellala, Rechaiga and Tiaret), we were able to isolate and identify the genus *Rhizopus* in the five samples analyzed, with a frequency and an abundance of 100% on PDA medium. The study of proteolytic activity of mycotoxinogen species *Aspergillus fumigatus* cultivated on Czapeck-Dox broth, prepared with two sources of carbon (casein and glucose) separately, showed that the carbon source does not significantly influence mycelia growth, with a mycelia weight of 4.1 g with glucose and 3.53 g with casein. On the other hand, it significantly influences the production of proteases, with a proteolytic activity of 10 units / ml with glucose, and 44.6 units / ml with casein. *Aspergillus fumigatus* produces a neutral protease, in pH from 6.8 to 7,3.

Key words: Peanuts, molds, proteases, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus*.

ملخص

تشكل بذور الفول السوداني ركيزة ممتازة للقالب بعد الحبوب ، حيث تعتبر نباتات تخزين الفطريات عاملاً مهماً في تدهور وإفراز السموم الفطرية. وفقاً للتحليل الفطري لعينات الفول السوداني ، التي تم جمعها من خمسة (5) مناطق مختلفة من بلدية تيارت (عين الذهب ، فرندة ، قصر الشلالة ، الرشايقة وتيارت) ، تمكنا من عزل وتحديد الجنس *Rhizopus* في العينات الخمس التي تم تحليلها بتكرار وبوفرة 100 ٪ ، على وسط المساعد PDA. أظهرت دراسة إنتاج البروتيناز بواسطة الأنواع الفطرية الفطرية *Aspergillus fumigatus* التي أجريت على وسط Czapeck-Dox ، باستخدام مصدرين منفصلين للكربون (caséine والجلوكوز) بشكل منفصل ، أن مصدر الكربون لا يؤثر بشكل كبير على نمو عضلي ، مع وزن عضلي 4.1 غرام مع الجلوكوز و 3.53 غرام مع caséine. من ناحية أخرى ، فإنه يؤثر بشكل كبير على إنتاج البروتيناز ، مع نشاط التحلل من 10 وحدات / مل مع الجلوكوز و 44.6 وحدة / مل مع caséine. أظهر اختبار نشاط التحلل البروتيني أن عزلة فطر *Aspergillus fumigatus* تنتج بروتينازاً محايداً في نطاق درجة الحموضة من 6.8 إلى 7.3.

الكلمات المفتاحية: الفول السوداني ، القوالب ، البروتيناز ، *Aspergillus fumigatus* ، *Rhizopus*

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux.....	01
Liste des figures.....	02
Liste des abréviations.....	03
Introduction	

CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Objectif du travail.....	04
I.2. Lieu et date du travail.....	04
I.3. Matériel utilisé.....	04
I.3.1. Matériel végétal.....	04
I.3.2. Milieux de culture.....	04
I.3.3. Autre matériel.....	05
I.4. Protocole expérimental.....	06
I.5. Isolement des moisissures.....	07
I.6. Purification.....	07
I.7. Identification des isolats fongiques.....	08
I.7.1. Identification macroscopique.....	08
I.7.2. Identification microscopique.....	08
I.8. Activité protéolytique.....	08
I.8.1. Étude de la croissance mycélienne et préparation des extraits enzymatiques.....	08
I.8.2. Dosage de l'activité protéolytique.....	08

I.8.3. Calcul et détermination des valeurs.....	10
I.9. Analyse statistique (ANOVA).....	11

CHAPITRE II : RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.1. Isolement et Purification d'isolat.....	13
II.2. Identification des isolats.....	14
II.2.1. Identification macroscopique.....	14
II.2.2. Identification microscopique.....	15
II.3. Détermination de l'activité protéolytique.....	15
II.3.1. Étude de la croissance mycélienne et influence des substrats.....	16
II.3.2. Dosage de l'activité protéolytique.....	17
Discussion générale.....	19
Conclusion.....	22
Références bibliographiques.....	24
Annexe.....	29

Liste des Tableaux

Tableau n° 1 :	Appareillages, verrerie et produits utilisés.....	05
Tableau n° 2 :	Examen macroscopique des moisissures sur le milieu PDA.....	14
Tableau n° 3 :	Examen microscopique dès la souche purifiée.....	15
Tableau n° 4 :	Pourcentage de la population fongique isolée.....	32

Liste des Figure

Figure n° 01 :	Gousses d'arachides.	04
Figure n° 02 :	Schéma du protocole expérimental.	06
Figure n° 03 :	Isolement des moisissures à partir des grains d'arachides sur le milieu PDA.	07
Figure n° 04 :	Isolement des champignons à partir des arachides	13
Figure n° 05 :	Influence de la source de carbone sur la croissance mycélienne.	06
Figure n° 06 :	Variation de l'activité protéolytique et de la masse fongique en fonction du pH.	18
Figure n° 07 :	Variation de l'activité protéolytique et de la masse fongique fonction du pH	18
Figure n° 08 :	Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	31

Liste des abréviations

A.F: *Aspergillus fumigatus*.

A : Ain D'heb

ATB : antibiotique

F : Frenda

K .ch : ksar chelalla

OEPP : organisation européenne et méditerranéenne pour des protections des plantes

TCA : acide trichloro acétique

PDA : potato dextrose agar

Réactif F-C : Réactif de Folin et Ciocalteu

R.ch : Rechaiga

T : Tiaret

Vc : volume utilisé pour la colorimétrie.

Ve : volume de la solution enzymatique utilisée

Vt : volume total de l'analyse

Introduction

Arachides (*Arachis hypogaea* L.), provient de « arachidna », une plante originaire, du Brésil et du Pérou, c'est une plante oléagineuse mesurant de 20 à 90 cm d'hauteur, et dont le cycle végétatif dure environ 3 mois (Ivanhoe, 2013). L'arachide est classée comme la 4^{ème} plante alimentaire mondiale après le riz, le maïs et le blé, pour son importance économique et nutritionnelle (Gaye, 2006 ; Ivanhoe, 2013).

L'arachide est historiquement le symbole de l'agriculture sénégalaise. Dès le 19^{ème} siècle, elle a été exportée vers l'Europe et notamment la France. Son usage multiple, de la cacahuète d'apéritif à l'aliment pour le bétail, en passant par l'huile, elle est aussi bien utilisée dans la cuisine que dans la composition du savon de Marseille à partir de 1820, en plus des effets induits sur d'autres secteurs, la filière arachide crée de petits emplois (triturateurs artisanaux, vendeurs d'arachides grillées, de pâtes d'arachides, etc.), qui contribuent à la lutte contre la pauvreté. De plus, pour le tissu économique local, la culture de l'arachide occupe 70% de la population active du bassin arachidier (DIAO, 2008).

Plus de cent mille moisissures différentes sont susceptibles de souiller les produits agricoles et alimentaires. Ce sont des espèces qui ont un mode de vie saprophyte, tirant leurs apports nutritionnels des matières organiques non vivantes (Leyral et Vierling, 2007).

Certains sols sont d'emblée contaminés (exemple : cas de l'arachide contaminée par *Aspergillus*). Les conditions de récoltes influencent fortement le niveau de colonisation des végétaux. Une saison humide induira le développement de *Fusarium* sur les céréales (Reboux, 2006). La contamination se fait par les spores douées d'une grande aptitude à la survie et souvent adaptées au transport par l'air ; certains ont de grandes propriétés d'adhésion et leur transport est favorisé par une ambiance chaude et humide (Leyral et Vierling, 2007).

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures, dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène, plus de 150 espèces de moisissures mycotoxiques sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*. Parmi ces genres, seules certaines espèces et parfois certaines souches au sein d'une espèce, sont capables de la sécrétion des mycotoxines. Les mycotoxines sont produites soit lors du développement de la plante, soit après la récolte (AFSSA, 2009).

Les mycotoxines sont des métabolites fongiques secondaires toxiques pour l'organisme qui s'en nourrit, qu'il s'agisse de l'Homme ou de l'animal. Ces substances toxiques sont des exotoxines sécrétées dans le substrat où le champignon se développe (Agag, 2004).

Les produits contaminés peuvent être traités par la détoxification, qui est un mécanisme qui va désactiver et éliminer les déchets des (molécules actives) de l'organisme, ainsi que les (xenobiotiques). Les réactions de détoxification ont pour substrat des molécules dont l'activité prend fin par destruction qui engendre des résidus au sein des cellules vivantes et on des molécules étrangères au métabolisme (dites xenobiotique) qui sont entrées inopinément dans l'organisme (Kvesitadze et Khatisashvili, 2006).

En plus de la production de mycotoxines, ces moisissures mycotoxinogènes produisent aussi des enzymes protéolytiques, qui dégradent la partie protéique de la plante, vu qu'elles sont des hydrolases formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidique. Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidique de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidique, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases, en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Fraize, 1967 ; Scriban, 1999).

Dans ce travail, nos objectifs se sont inscrits dans les axes suivants :

- Isolements et identification des moisissures mycotoxinogènes à partir des échantillons d'arachides commercialisées dans différentes communes de Tiaret et collectionnés aléatoirement ;
- dosage des protéases sécrétées par ces moisissures potentiellement mycotoxynogènes ;
- contribution à l'amélioration des conditions de stockages pour obtenir un produit sain et économique.

Chapitre I

Matériel & Méthodes

I.1. Objectif du travail

Dans ce travail, nos objectifs se sont inscrits dans les axes suivants :

- Isolements et identification des moisissures mycotoxinogènes à partir des arachides commercialisées et consommées par les habitants de différentes communes de Tiaret ;
- dosage des protéases sécrétées par ces moisissures potentiellement mycotoxinogènes ;
- contribution à l'amélioration des conditions de stockages pour obtenir un produit sain et économique.

I.2. Lieu et durée du travail

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie (2) de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ibn khaldoun- Tiaret, durant la période du 18 février jusqu'au 27 avril.

I.3. Matériel utilisé

I.3.1. Matériel végétal

Dans notre étude, nous avons utilisé comme échantillon les arachides commercialisées dans cinq différentes communes de Tiaret (Ain Dheb, ksar chellala, Rechaiga, Frenda et Tiaret) pour identifier les moisissures mycotoxinogènes présentes et doser leur activité protéolytique.



Figure n° 01 : Gousses d'arachides.

I.3.2. Milieux de culture

Deux milieux ont été utilisés pour l'isolement et l'identification des champignons PDA et agar 2% respectivement, ainsi que les deux milieux Czapeck-Dox caséine et Czapeck-Dox glucose qui ont été utilisés pour le dosage de l'activité protéolytique.

I.3.3. Autre matériel

Tableau n° 01 : Appareillages, verrerie et produits utilisés.

Appareillages	Produits	Autres
-Microscope optique «OPTIKA » -Vortex « TECHNO KARTELL » -Autoclave «WOLFWESKZEUG-VORRICHLUGSUN 7340 GEILINGEN » -Agitateur magnétique «IKAMAG » -Balance magnétique «KERN 440-45N » -Incubateur « MEMMERT 854 SCHWABACH W-GERMANY -Bain marie secoueur	-Alcool -Antibiotique (Céfazoline) -Bleu de méthyle -Eau distillée stérile -Hypochlorite de sodium (Eau de javel) -Caséine	-Barreau magnétique -Bec Bunsen -Béchers -Boîtes de Pétri -Éprouvettes -Flacons - Lames -Lance de platine -Pince de platine -Portoir de tube a essais -Tubes à essai -Ruban adhésif

1.4. Protocole expérimental

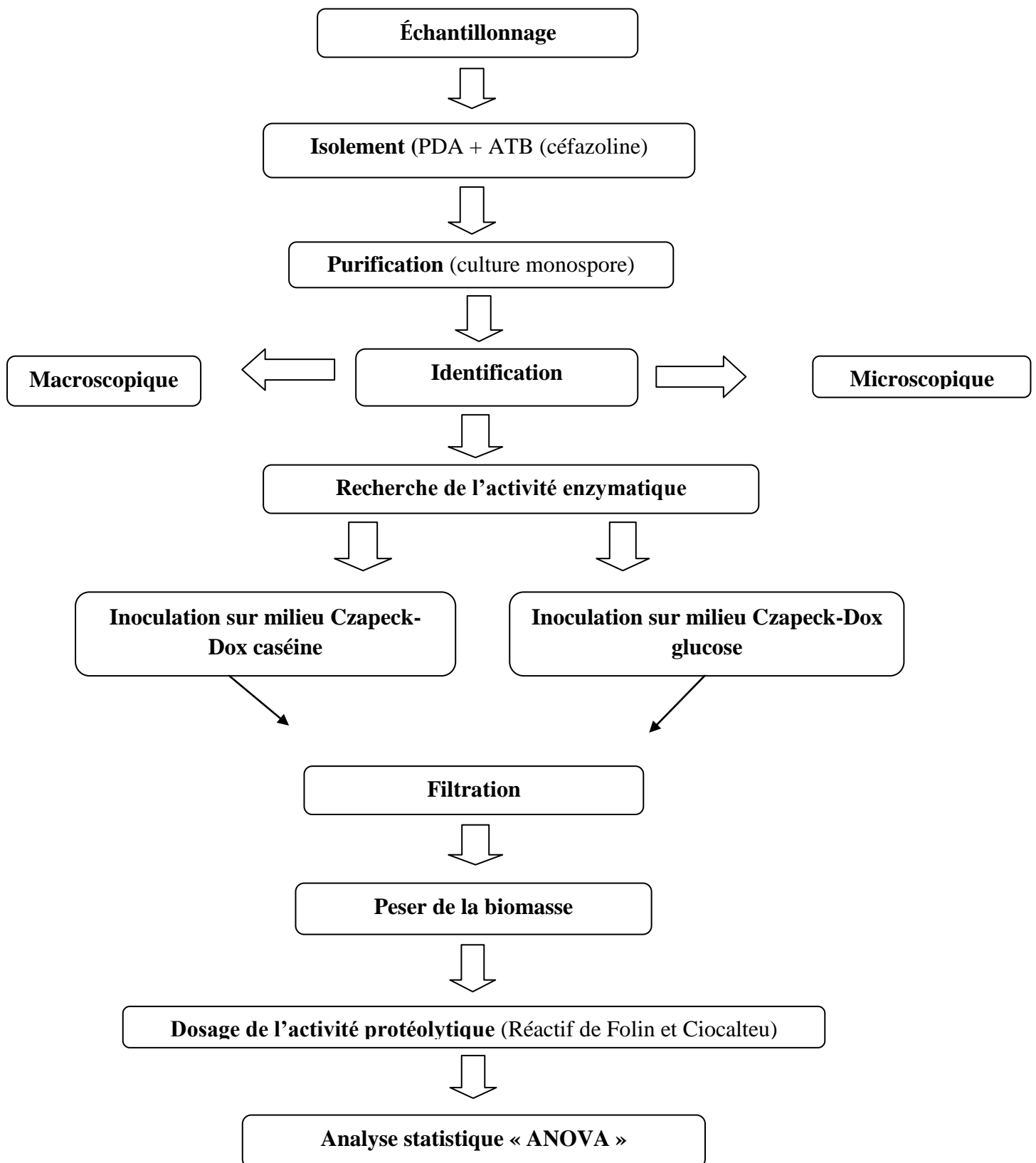


Figure n° 02 : Schéma du protocole expérimental.

I.5. Isolement des moisissures

Les isolements ont été réalisés suivant la technique décrite par Davet et Rouxel (1997) avec quelques modifications, à partir des grains d'arachides de cinq communes de la wilaya de Tiaret (Tiaret, ksar chellala, Rechaiga, Ain Dheb et Frenda).

Les deux cotylédons des grains d'arachides ont été séparés et désinfectés avec l'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 30 %, pendant 3 minutes, pour éliminer les bactéries, puis rincés trois fois, à l'eau distillée stérilisée, pour éliminer les traces de l'eau de Javel. Nous avons déposé deux cotylédons dans les boîtes de Pétri contenant le milieu PDA additionné d'antibiotique (céfazoline). Les boîtes ont été incubées pendant 3 jours à 28°C. Le travail a été réalisé dans des conditions d'asepsie.



Figure n° 03 : Isolement des moisissures à partir des grains d'arachides sur le milieu PDA.

I.6. Purification :

La purification a été réalisée par technique de culture monospore décrite par Henni *et al.* (1994) avec quelques modifications. Nous avons prélevé un fragment de chaque souche et nous l'avons disposé dans un tube contenant 9 ml de l'eau distillée stérilisée, en suite, le tube a été agité à l'aide d'un vortex pour réaliser des dilutions décimales jusqu'à 10^{-3} . Puis, nous avons prélevé 0.1 ml de la suspension conidiennne contenant 10^{-6} conidies/ml, qui a été étalé en stries sur le milieu agar 2 %. Après 24 à 48h d'incubation 28°C, nous avons repiqué les germinations issues d'une seule et unique conidie sur une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours.

I.7. Identification des isolats fongiques

I.7.1. Identification macroscopique

Pour l'identification macroscopique, nous avons utilisé la méthode décrite par (Booth, 1984 et Nelson *et al.* 1981) avec quelques modifications. Les caractères cultureux basés sur l'observation à l'œil nu. Les caractères d'étude sont : la pigmentation de la face, la vitesse de croissance, le contour des colonies et l'aspect du mycélium en prenant en considération le morphotype.

I.7.2. Identification microscopique

L'identification microscopique a été réalisée en utilisant la technique du drapeau décrite par Guezlane-Tebibel *et al.* (2011). Nous avons prélevé une empreinte fongique à l'aide d'un fragment de ruban adhésif. En suite, nous avons recollé le ruban sur une lame contenant une goutte de bleu de méthylène. Les observations ont été réalisées par microscope optique aux différents grossissements.

I.8. Activité protéolytique

I.8.1. Étude de la croissance mycélienne et préparation des extraits enzymatiques

Dans cette étude nous avons comparé l'influence de deux substrats organique (glucose et caséine), sur la croissance mycélienne. Pour cela, nous avons utilisé le milieu liquide Czapeck-Dox (Annexe 1), tout en changeant la source de carbone, ce qui implique l'obtention de deux milieux : Czapeck-Dox glucose 1% et Czapeck-Dox caséine 1%, avec un pH initial de 7,2. Les deux milieux, répartis à raison de 30ml et contenus dans des erlenmeyers, ont été inoculés avec trois disques mycéliens et incubés à 28°C dans un bain marie secoueur pendant 10 jours.

Après incubation, nous avons déterminé le rendement de la biomasse suite à une filtration, en utilisant des compresses stériles, et en mesurant le pH du filtrat (la solution enzymatique).

I.8.2. Dosage de l'activité protéolytique

Le protocole expérimental suivi est celui de Folin et Ciocalteu (1926). Nous avons préparé des tubes à essai stériles (test et blanc) pour lire les densités optiques à 660 nm de chaque filtrat. La préparation des tests et du blanc a été réalisée comme suite :

	<u>Test</u>	<u>Blanc</u>
Solution de caséine à 1 %	05ml	05ml
On équilibre à 37°C, puis on ajoute		
Solution enzymatique	01ml	/
On mélange bien et on incube à 37°C pendant 10 minutes puis on ajoute		
Le réactif TCA à 110Mm	05ml	05ml
Solution enzymatique	/	01ml

On mélangé bien et on incube à 37°C pendant 30 minutes, puis une filtration est réalisée à l'aide d'un filtre 0.45µm et les filtrats sont utilisés dans la mesure de la densité optique.

Après la préparation des filtrats, nous avons procédé à la mesure de la densité optique comme suite :

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

On mélange bien et on incube à 37°C pendant 30 minutes ; on laisse les tubes refroidir à la température ambiante du laboratoire. Une filtration est réalisée immédiatement avant la lecture à l'aide d'un filtre 0,45µm. En fin, on lit les densités optiques des tests et des blancs à 660 nm et on calcule les densités optiques des échantillons comme suite :

$$\Delta A_{660nm} \text{ Echantillon} = A_{660nm} \text{ Test} - A_{660nm} \text{ Blanc}$$

I.8.3. Calcul et détermination des valeurs

Nous avons déterminé les valeurs en μmole de Tyrosine équivalent en extrapolant les densités optiques des échantillons sur la courbe standard, c'est-à-dire, en utilisant l'équation de la ligne droite standard ($Y = aX + b$), en remplaçant le « Y » par les $\Delta A_{660\text{nm}}$ Échantillons pour obtenir les valeurs en μmole de Tyrosine (X).

Une unité de caséine sera hydrolysée pour produire 1 μmole (181,19 μg) équivalent de la Tyrosine par minute à pH 7,5 et à 37 °C.

$$\text{Unités/ml d'enzyme} = \frac{(\mu\text{mole de Tyrosine équivalent}) \times (Vt)}{(Ve) \times (Vc) \times (T)}$$

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

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

Ve : volume de la solution enzymatique utilisée (millilitres).

Vc : volume utilisé pour la colorimétrie.

$$\text{Unités/mg de solide} = \frac{\text{Unités/ml d'enzyme}}{\text{mg de solide/ ml d'enzyme}}$$

$$\text{Unités/mg de protéine} = \frac{\text{Unités/ml d'enzyme}}{\text{mg de protéine/ ml d'enzyme}}$$

I.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 II

Résultats & Discussion

II. Résultats et discussions :

II.1. Isolement et Purification d'isolat :

L'isolement des moisissures a été réalisé selon la méthode directe par Botton *et al.* (1990), qui repose sur le principe de stimulation du développement des moisissures par incubation des grains directement sur milieu PDA.

Après l'incubation pendant 3 à 7 jours, nous avons remarqué l'apparition des secteurs mycéliens de différents aspects fongiques autour des cotylédons des grains d'arachides comme indiqué sur la Figure n° 04, dont le pourcentage de la population fongique isolée est indiqué sur le (Annexe n° 3).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les trois répétitions utilisés sont contaminés par des moisissures et que la répartition fongique dans les différents échantillons est la même.

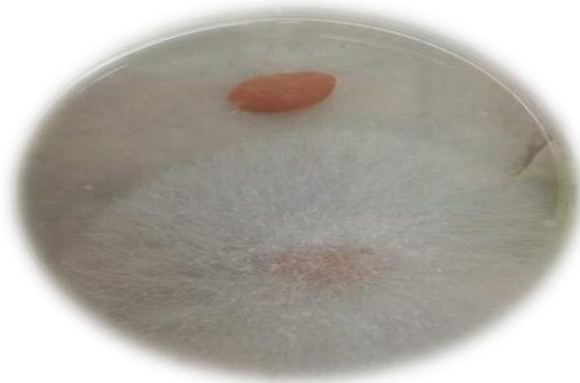


Figure n° 04 : Isolement des champignons à partir des arachides


II.2. Identification des isolats

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

II.2.1. Identification macroscopique

Les caractères macroscopiques des différents isolats sélectionnés ont été étudiés sur le milieu PDA. Cette identification macroscopique, nous a permis de mettre en évidence les caractères cultureux des 15 isolats fongiques que nous avons isolés et on a choisi 01 souche pour faire l'identification. La souche est illustrée dans le Tableau n° 3. En effet, pour les caractères cultureux qui sont: la pigmentation diffusant parfois dans la gélose, la vitesse de croissance, l'allure des contours des colonies et l'aspect du mycélium en prenant en considération le morphotype. Les résultats obtenus, ont été rassemblés dans le Tableau n° 2.

Tableau n° 2 : Examen macroscopique des moisissures sur le milieu PDA.

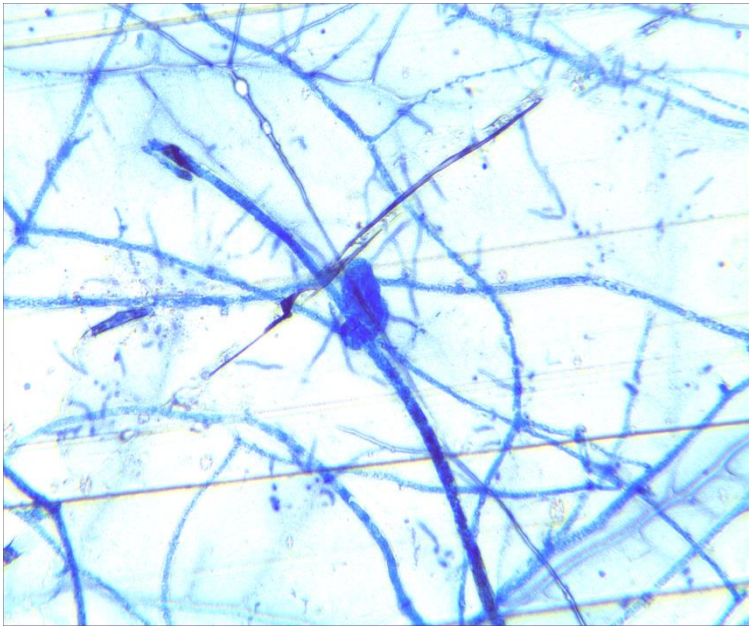
Région	Souche	Observation macroscopique	Caractères macroscopiques	Genre
Rechaiga Tiaret Frenda Ain Dehb Ksar challala	BF1		*Pigmentation verdâtre, contour blanchâtre. *Diamètre : 3.7cm *Croissance : rapide *Aspect : cotonneuse	<i>Rhizopus</i>

II.2.2. Identification microscopique

La souche sélectionnée a été étudiée sur milieu PDA. Les observations microscopiques sont fondées essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, pigmentation, différenciation) et des spores (forme, pigmentation, texture de parois).

Les résultats obtenus de seule souche des différents aspects microscopiques sont représentés dans le Tableau n° 3.

Tableau n° 03: Examen microscopique dès la souche purifiée.

Souche	Observation microscopique (Gr 400)	Caractères microscopiques	Espèce
BF1		<p>-</p> <p>Corôdiophore: long</p> <p>Vésicule : sphérique</p> <p>Le sporocyste : globulaire</p> <p>La paroi du sporocyste : n'ai pas persistante</p> <p>La tété : d'épingles</p>	<p><i>Rhizopus stolonifer</i></p>

II.3. Détermination de l'activité protéolytique

Pour la recherche et le dosage de l'activité protéolytique, nous avons utilisé une seule souche d'*Aspergillus fumigatus*, productrice de mycotoxines, car la souche que nous avons obtenue n'est pas connue par la production de ces métabolites secondaires.

II.3.1. Étude de la croissance mycélienne et influence des substrats

Après dix jours d'incubation et suite à une filtration, les poids mycéliens de une seule souche ont été pesés. L'influence des deux substrats (glucose et caséine) sur la croissance mycélienne a apparu clairement avec un taux de croissance plus élevé sur le glucose.

Les résultats représentés sur la Figure n° 05 montrent qu'il y a une différente influence des substrats (glucose et caséine) sur la croissance mycélienne, avec une masse plus élevée sur le glucose (4,07 g), par rapport à la croissance sur la caséine, avec une masse de (3,53 g). Selon l'étude statistique, la différence entre l'influence des deux substrats sur la croissance fongique n'est pas significative ($P > 0.05$).

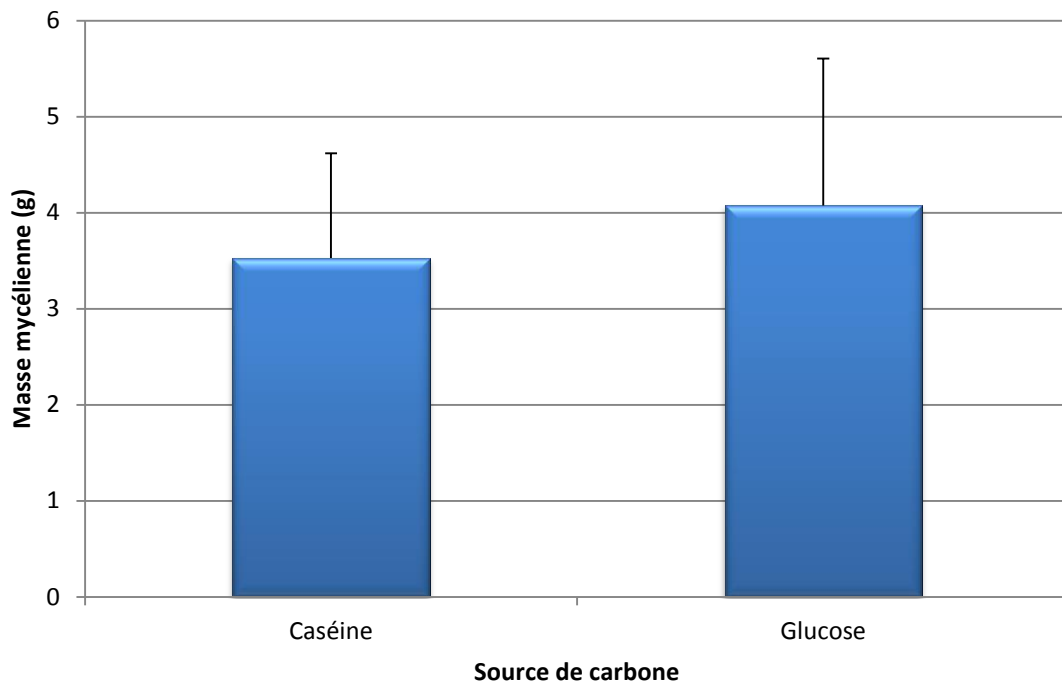


Figure n° 05 : Influence de la source de carbone sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus fumigatus*.

II.3.2. Dosage de l'activité protéolytique

Le rendement de la biomasse a été déterminé après incubation pendant dix jours, et qui a été suivi par une filtration. Les pH des filtrats de cultures (la solution enzymatique) ont été mesurés.

Les résultats de la filtration ont montré que le pH initial a varié d'une façon non significative ($P > 0.05$), et ils ont tendu vers un pH \pm neutre, avec une valeur de 6,83 pour le glucose et 7,30 pour la caséine.

La Figure n° 06 représente l'activité protéolytique en fonction de la source de carbone. On peut voir que l'activité protéolytique augmente selon la source de carbone. Dans le cas de la caséine, nous avons obtenu une activité protéolytique de 44.6 unités/ml, et qui significativement plus importante ($P < 0.05$), que l'activité protéolytique obtenue avec le glucose et qui est de 10 unités/ml.

La Figure n° 07 représente la variation du poids mycélien et de l'activité protéolytique en fonction du pH pour les deux substrats. On peut voir que l'activité protéolytique augmente dans un pH \pm neutre pour les deux substrats. Cela signifie que la souche utilisée sécrète une protéase \pm neutre.

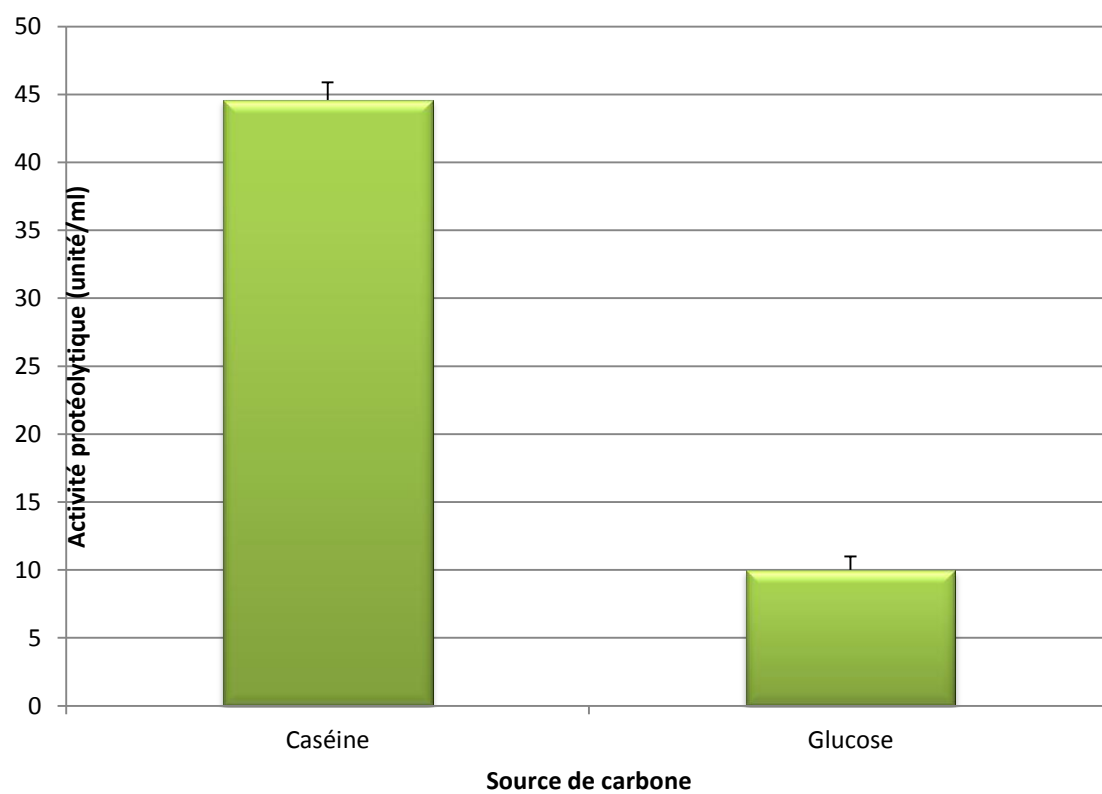


Figure n°6 : Influence de la source de carbone sur l'activité protéolytique d'*Aspergillus fumigatus*.

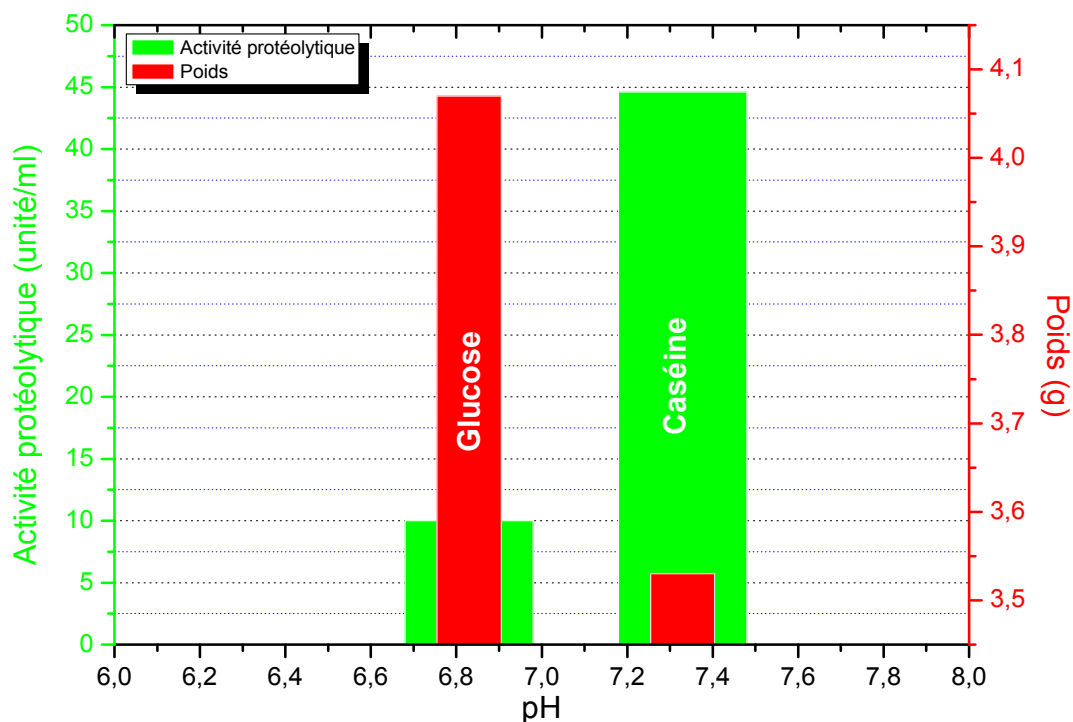


Figure n°7: Variation de l'activité protéolytique et de la masse fongique en fonction du pH

II.4. Discussion

Les arachides sont des légumineuses annuelles et des denrées alimentaires fréquemment contaminées par les moisissures (Abdoulaye, 2006). La contamination fongique peut avoir lieu avant la récolte aux champs, au cours du séchage ou au cours du stockage des grains. Les variations dans les paramètres technologiques expliquent que ce phénomène est compté parmi les principales causes de détérioration de grain d'arachide (Atala *et al*, 2003 ; Molinie *et al*, 2005).

Lors de la contamination des grains d'arachides, ces paramètres régulant la croissance fongique et permettant la production des nombreux toxines. On cite principalement, la présence de grains brisés, le taux d'humidité relative élevé, le pH et la température de stockage des grains d'arachides (Zia- Ur –Rahman, 2006).

Les résultats de l'analyse mycologique des grains d'arachides n'ont pas révélé une contamination par les moisissures mycotoxinogène. Ces résultats peuvent être expliqués par l'utilisation des produits chimiques (fongicides), qui ont permis la réduction et la diminution du taux de cette contamination (Le Bars *et al*, 1987 ; Miller, 2002). Wilson *et al*. (2002)

rappellent que la contamination fongique des arachides aux champs, ou pendant le stockage, est liée aux conditions hydro-thermiques.

Nous avons utilisé au cours de cette étude, le milieu de culture PDA recommandé pour l'isolement des moisissures contaminant les aliments (Botton *et al.*, 1990), ce milieu de culture a donné une croissance variable. La composition du milieu PDA est rapportée par L'OEPP (2003), que ce milieu est préparé à base d'éléments organiques. La flore fongique totale de grain d'arachides est constituée des moisissures filamenteuses, très sporulantes, dont les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus rencontrés.

Dans cette étude, nous avons isolé le genre *Rhizopus* à partir des 5 régions : Ain D'heb, Frenda, Ksar Chellala, Rechaiga et Tiaret. Le genre *Rhizopus* est naturellement présent sur les cultures au niveau des champs et dans le sol, et par fois la plupart des arachides sont déjà contaminé par ce genre de moisissures (Withlow *et al.*, 2001). *Rhizopus* est un genre de moisissures communes, qui se développent sous forme de filaments dans les sols, les fruits, les végétaux et les céréales.

Pour faire le dosage de l'activité protéolytique, nous avons utilisé une souche d'*Aspergillus fumigatus* purifiée et identifiée, potentiellement toxigène (Lemke *et al.*, 1988).

L'*Aspergillus fumigatus* est une espèce de moisissures de stockage, qui se développe sur les arachides et le blé stockés. Comme chaque espèce mycotoxinogène *Aspergillus fumigatus* possède des conditions de développement (Christensen *et al.*, 1969). Du point de vue mycotoxicologique, et pour étudier la production des mycotoxines par l'espèce *Aspergillus fumigatus*, cette souche a été cultivée sur le milieu liquide Czapek-Dox à 1% de caséine ou de glucose. Ce milieu donne une production optimale des mycotoxines, nous avons observé qu'*Aspergillus fumigatus* possède une croissance très lente.

Les résultats de l'activité protéolytique sont très proches du pH optimal de la protéase neutre produite par plusieurs moisissures. En effet, les protéases neutres d'*Aspergillus fumigatus* présentent des pH optimums de 7 (Sekine, 1972 ; Benkahoul, 2002 ; Sumantha *et al.*, 2005) ; entre 6,0 et 7,0 (Battaglino *et al.*, 1991) et de 7,2 (Boukhalifa, 2003). En outre, les protéases neutres microbiennes sont généralement actives dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 (Ferrero, 2000).

Les expériences réalisées, nous ont montré que notre isolat *Aspergillus fumigatus*, produit une protéase neutre, lorsqu'elle est cultivée dans des milieux contenant de la caséine et pourrait être d'une valeur industrielle.

La mise en évidence de l'activité protéolytique chez divers micro-organismes nécessite un milieu de culture protéiné, ou les protéines jouent un rôle d'une source azoté et même d'une source de carbone. Parfois, elles constituent un inducteur de la synthèse des protéases par les micro-organismes, donc le choix des milieux de cultures est déterminant dans l'isolement et le dénombrement de ces micro-organismes (Durand et Monson, 1998).

Les substrats simples, tel que la caséine et la gélatine, possèdent une faible solubilité et donnent des faibles rendements en activité enzymatique, au contraire, les substrats complexes entraînent des bons rendements en activité protéolytique (Sumantha *et al.* 2006).

Conclusion

En Algérie, les arachides sont un aliment de base, la consommation quotidienne est très élevée, ce qui fait que la consommation des mycotoxines contaminant les arachides est une question d'une très grande importance. Plusieurs auteurs ont rapporté des taux élevés de contamination par des mycotoxines dans les arachides ; cependant, les résultats de ce travail seraient peut être une initiation pour des recherches approfondies étudiant la contamination des arachides souillés par les mycotoxines dans la région de Tiaret.

Au cours de notre travail mené sur l'étude de l'activité protéolytique des espèces des moisissures potentiellement productrices des mycotoxines dans les arachides commercialisées de la région de Tiaret. Nous avons pu isoler et identifier des isolats appartenant à l'espèce *Rhizopus stolonifer* à partir de 15 échantillons d'arachide.

Le dosage de l'activité protéolytique de l'espèce mycotoxinogène *Aspergillus fumigatus* a montré que le substrat n'influence pas significativement la croissance mycélienne ; par contre, il influence significativement l'activité enzymatique protéolytique. Les résultats ont montré aussi que la souche *Aspergillus fumigatus* utilisée, en plus de la sécrétion des mycotoxines, elle sécrète aussi une protéase plus au moins neutre.

En fin, il est nécessaire de faire des études plus poussées pour l'identification des mycotoxines contaminant les arachides au cours du stockage, ainsi que la contamination avant et pendant la récolte et au cours du séchage. Des études consacrées à la désintoxication des grains d'arachides, ou encore à la prévention contre la contamination fongique et mycotoxinogène sont nécessaires, dans le but de la prévention contre la cumulation des mycotoxines dans le corps humain.

Références bibliographiques

- Abdoulaye S. (2006).** Methode physique de protection des stocks d'arachides Cary don Serratus (olivier) : Etude de faisabilité d' une technique de solarisation .
- AFSSA. (2009).** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale Rapport final. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Maison Alfort.p: 308.
- Agag B.I. (2004).** Mycotoxins in foods and feeds 3-Zearalenone.Ass. Uni. Bull. Environ. Res. (7):2.
- Atalla M.M., Mohamed-Hassanein N., Atef-Elbeih A., Youssef A. (2003).** Mycotoxin production in wheat grains by different Aspergillus in relation to defferent relative humidity and Storage periods. Food Nahrung. P 6-10.
- Battaglini R. A., Huergo M., Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B., (1991).** Culture requirement for the production of protéase by Aspergillus oryzae in solid state fermentation . Appl. Microbiol, 35; P 292- 296.
- Benkahoul M, (2002).** Production de la protéase neutre par Aspergillus oryzae sur déchets d'orange. Optimisation du milieu de culture, purification partielle et études des propriétés physico- chimique de l'enzyme. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine.
- Botton B., Breton A., Fever M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle.2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P 34-428.
- Boukhalfa H., (2003)** .Production de la protéase neutre par Aspergillus Oryzae cultivé sur milieu à base de déchet de tomates. Optimisation de milieu de culture et étude des caractéristiques de l'extrait enzymatique. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine.
- Christensen-Clyde M., Henry H.. (1969).** Grain Storage. The role of fungi in quality loss. Minnes ota archive Editions, P 153.
- Davet P., Rouxel F. (1997).**Détection et isolement des champignons du sol. Edition Quae
- Durand G., Monson P. (1982).** Les enzymes : production et utilisation industrielles. Bordas. Paris. P 36- 153.
- Ferrero M.A, (2000).** Protéine hydrolysis : Isolation and characterization of Microbiol protéases. Food Microbiol. Protocols, 14; P 227 – 232.
- Frazier W.C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.

- GAYE M. (2006).** Le secteur arachidier du Sénégal face à son destin: du mal de l'étatisation au remède de la privatisation. OXFAM Dakar 2006.
- Leyral G., Vierling E. (2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires, 4ème éd,-Rueil –Malmaison : Doin ; Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, (Biosciences et techniques : Sciences des aliments).
- Henni D.E., Boisson C., Geiger J.P. (1994).**Variabilité de la morphologie chez *fusarium oxyspoum* f .sp.*lycopersici*.*phytopathologia*,33 :51-58.
- Le Bars J., Le Bars P. (1987).** Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la " Section Midi-Pyrénées " à Toulouse, le 18 septembre 1987.
- Lemke P.A., Davis N.D., Iyer S.K., Creech G.W., Diener U.L. (1988).** Fluor metric Analysis of iodinated aflatoxin in minicultures of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. J. Indust. Microbiol, P 119- 125.
- Miller J. D. (2002).** Aspects of the ecology of *Fusarium* Toxins in cereals. Adv. Exp. Med. Biol. P 19- 27.
- Molinie A., Faucet V., Castegnaro M., Pfohl–Leszkowicz A. (2005).** Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Developement of a new methode for Simultaneous extraction of OTA and Citrinin. F. Chem .P 391- 400.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J. (1981).** *Fusarium : diseases ; biology, and taxonomyp*.457
- 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, France. 145 p.
- OEPP. (2003).**Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. Normes OEPP bulletin. P: 245- 247.
- Kvesitadze G., Khatisashvili P. (2006).** Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants p40.
- Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.
- Sekine H. (1972).** Neutral protéinases I and II of *Aspergillus Sojae*. Some enzymatic properties. Agric – Biol. Chem, 36 ; P 207 – 216.

- Sumantha A., Sundhya SZaKacs G., Sorcol C. R Pan Dey A. (2005).** Production and Partial Purification of a Neutral protase by fungal mixed substrate fermentation. Food Technol. Biotechnol, 43 (4) ; P 313-319.
- Sumantha A., L'arroche C., SZaKacs G., Pan Dey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of flood –grade proteases : a perspective. Food Technol. Biotechnol, P 244 ; 211 – 220.
- Withlow L.W., Hagler W.M. (2001).** Mycotoxin contamination of feed stuffs An additional Stress factor for Cattle. North Carolina State University. Raleigh, Symposium sur bovins laitiers. CRAAQ Québec.
- Yezli W. (2010).** Étude morphologiques, pouvoir pathogène et activité protéolytique chez *Fusarium Oxysporum* f.sp.*albedinis*. Mémoire de Magistère en Microbiologie Appliquée. Université d'Oran.
- Yezli W., Zebboudj N., Karkachi N., Kihal M., Henni J. (2015).** Influence of two substrates (caséine and glucos) on mycelia growth and dosage of proteolytic activity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa). International Journal of Biosciences
- Zia–Ur R. (2006).** Storage effect on nutritional quality of commonly consumed cereals. F. Chem. P 53- 57.

Annexes

Annexe n° 1

Composition des milieux de culture

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

Milieu PDA pH 6,5

Ce milieu est recommandé pour l'isolement et le dénombrement des moisissures et des levures des produits alimentaires (**Botton *et al.*, 1990**) 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 % (Downes et Ito, 2001).

Ce milieu de culture synthétique est recommandé pour l'isolement et le dénombrement des moisissures et des levures des produits alimentaires (**Botton *et al.*, 1990**). La composition du milieu en condition d'asepsie totale est la suivante :

Agar agar	20g
Eau Distillée q.s.p.	1000ml

Milieu Czapek caséine : pH 7,3

Na ₂ NO ₃	01g
KCL	0.025g
MgSO ₄	0.25g
FeSO ₄	0.005g
Eau distillée	500ml

KH₂PO₄.....0.5g

Milieu Czapek glucose :

Na ₂ NO ₃	01g
KCL	0.025g
MgSO ₄	0.25g
FeSO ₄	0.005g
Eau distillée	500ml

KH₂PO₄.....0.5g

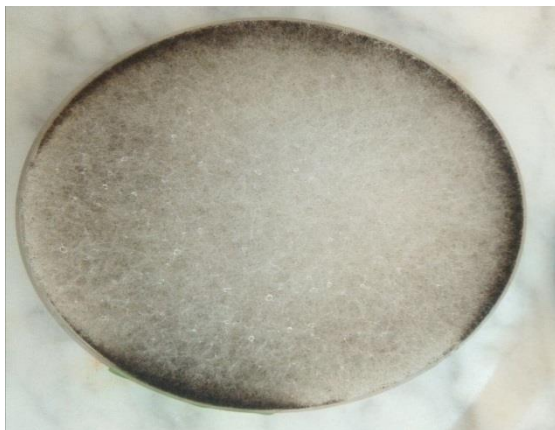
Annexe n° 2



Rhizopus (la region k .ch)



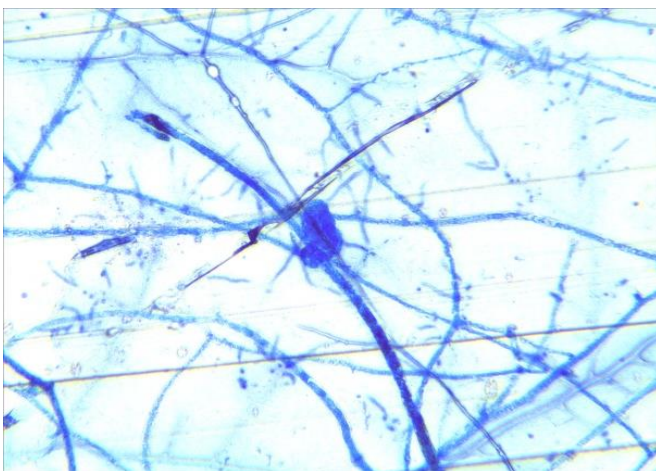
Rhizopus (la region T)



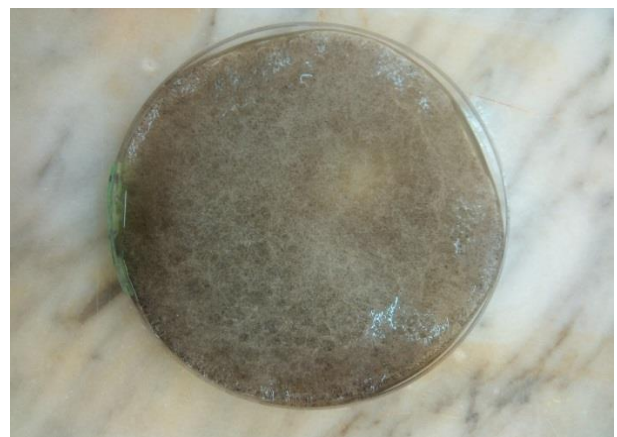
Rhizopus (la region A.)



Rhizopus (la region R .ch)



ASPECT MICEOSCOPIQUE DE *Rhizopus stolonifer*



Rhizopus (la region F)

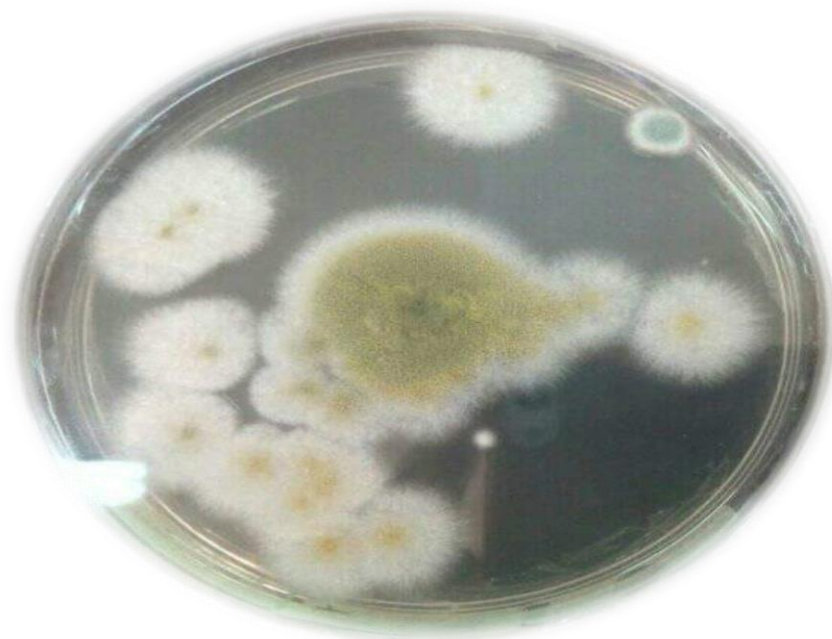


Figure n°8: Aspect macroscopique d'*Aspergillus fumigatus*

Annexe n° 3

Tableaux n° 04: Pourcentage de la population fongique isolée.

Régions	Échantillons	Pourcentage
Tiaret	T1	100 %
	T2	100 %
	T 3	100 %
Ksar Chellala	K .ch1	100 %
	K .ch2	100 %
	K .ch3	100 %
Frenda	F1	100 %
	F2	100 %
	F3	100 %
Rechaiga	R .ch1	100 %
	R.ch2	100 %
	R.ch3	100 %
Ain dheb	A1	100 %
	A2	100 %
	A3	100 %