



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Microbiologie

N°ordre:60/D3C/2021
N°serie:01/Micb/2021

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle
En Biotechnologies, Biologie et Environnement/Option: Bioprocédés et Biotechnologies,
Applications Mycologiques

Par: KROUMA Hamida

Thème

**Evaluation de la contamination fongique et
mycotoxique de la chaîne de production de fruits dans
l'Est Algérien : Utilisation de biomarqueurs d'effet**

Jury d'évaluation :

Soutenu le: 08/07/2021

Président de jury : Mr. DEHIMAT L

Prof.Univ. Frères Mentouri Constantine 1

Directeur de thèse : Mr. KACEM CHAOUCHE N

Prof.Univ. Frères Mentouri Constantine 1

Examineurs : Mme BAHRI F

MCA.INATAA. Univ.Frères Mentouri
Constantine1

Mme AIT KAKI A

MCA.Univ.Boumerdes

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

*Mes remerciements, avant tout, à **DIEU** tout puissant et miséricordieux pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a données durant toutes ces longues années d'études afin que je puisse arriver à ce stade.*

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri Constantine1.

*Mes remerciements particuliers à mon Directeur de thèse, Professeur **KACEM CHAOUCHE** Noredine, à qui j'exprime ma gratitude et ma reconnaissance. Monsieur **KACEM CHAOUCHE** m'a toujours soutenu et poussé pour réussir. Les conseils qu'il m'a prodigués durant toutes ces années, ainsi que l'autonomie qu'il m'a laissée, m'ont permis d'accomplir cette thèse dans les meilleures conditions. Je vous remercie pour votre entière disponibilité et surtout d'avoir cru en moi jusqu'au bout. Puisse-t-il trouver, à travers ces lignes, l'expression de mon profond respect et ma parfaite considération.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur, **DEHIMET L**, Doyen de la faculté SNV et Professeur à l'université Frères Mentouri (Constantine 1), pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Je tiens à remercier vivement les membres du jury, Madame **BAHRI F**, Maitre de conférences à l'I.N.A.T.A.A université frères Mentouri (Constantine 1) ainsi que Madame **AIT KAKI A**, Maitre de conférences à l'université de Boumerdès qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail et de l'évaluer.*

*Je remercie également Monsieur **HAMIDECHI MA** Professeur à l'université frères Mentouri (Constantine1) pour son aide précieuse et sa présence honorable dans mon jury.*

*Un grand merci à Monsieur **JAOUANI A**, Maitre de conférences à l'institut Supérieur des Sciences Biologiques (I.S.S.B.A.T) de Tunis, qui a amplement participé à la réalisation et au bon déroulement de ce travail. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire avec son aimable équipe et de suivre de très près la partie de biologie moléculaire de ma thèse.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **Mosbah A**, Professeur à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet (I.S.B.S.T), Tunisie, qui a suivi de très près la partie identification des mycotoxines.*

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité microbienne (LaMyBAM) : Asma, Radia, Mounira, Imène, Hadjer, Mounia, wafa, Sana, Kamelya, Insaf et Amina. Pour leur collaboration et serviabilité qu'elles m'ont témoignées durant ces dernières années.

Un remerciement spécial, profond et reconnaissant de tous les efforts fournis par mes chères amies Asma, Radia et Mounira pendant toute la période de préparation de ma thèse. Je n'oublierai jamais tous ce que vous avez fais pour moi.

J'exprime mes plus profonds remerciements et ma reconnaissance à mes parents qui m'ont toujours soutenu pendant les moments difficiles. Je remercie mon adorable maman pour sa patience infinie, ses prières et son aide immense surtout durant les mois de rédaction de la thèse.

Un grand merci à mon cher papa, pour son soutien, sa patience et sa disponibilité. Merci de m'avoir accompagné dans tous mes déplacements et pour les aventures qu'on a vécues durant notre séjour en Tunisie. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourrez-vous papa, maman trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et de tous vos efforts.

Je remercie profondément mon mari pour sa patience, ses concessions et ses encouragements sans cesse. Merci pour le confort qu'il m'a offert afin de travailler dans les meilleures conditions. Merci pour ton soutien qui m'a aidé à supporter les moments difficiles...

Je remercie très sincèrement mes chères sœurs Sofia, Sonia, Soussou et Bicha pour leur soutien moral incessant, leurs encouragements et leur aide. Merci chère Sofi de m'avoir beaucoup aidé durant les mois de rédaction de ma thèse.

Une pensée particulière à mon amie et sœur, Karima pour toutes les années d'amitié, de soutien et surtout de fidélité. Merci de faire partie de ma vie.

Je voudrais adresser de Sincères remerciements à ma tante Assia, à son mari et ses filles pour m'avoir accueillie tout au long de mes années de thèse. Merci d'avoir été ma deuxième famille à Constantine.

Merci à ma belle famille, pour le soutien et les encouragements

Enfin, je remercie profondément mamie Aarjouna et son fils Judy pour leur aide précieuse

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : mes parents.

*Quoi que je fasse, je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là
c'est bien grâce à eux que dieu tout puissant, les préserve et leur accorde santé, longue vie
et Bonheur*

A mon cher mari

A mes anges Fadi, Idris et Wassim

A mon cher frère et mes chères sœurs

A la mémoire de mes grands parents

Tables des matières

1- Introduction.....	1
2- Synthèse Bibliographique.....	4
2.1- Moisissures toxigènes.....	4
2.1.1- Généralités sur les moisissures.....	4
2.2.2- Moisissures et mycotoxines.....	5
2.2- Mycotoxines	6
2.2.1- Historique, définition et généralités.....	6
2.2.2- Principales mycotoxines.....	8
2.2.3- Structure des mycotoxines.....	9
2.2.4- Toxicité des mycotoxines.....	9
2.2.5- Biogénèse des mycotoxines	10
2.2.6- Mycotoxinogénèse	11
2.2.6.1- <i>Facteurs extrinsèques de la mycotoxinogénèse</i>	12
2.2.6.2- <i>Facteurs intrinsèques de la mycotoxinogénèse</i>	14
2.2.7- Moisissures et mycotoxines dans la chaîne alimentaire	15
2.2.8- Evaluation du risque de contamination et réglementation des mycotoxines	16
2.3- Patuline : principale mycotoxine des fruits	20
2.3.1- Aperçu historique	20
2.3.2- Propriétés physicochimiques.....	21
2.3.3- Espèces fongiques productrices de Patuline.....	21
2.3.4- Voies de biosynthèses.....	22
2.3.4.1- <i>Voie chimique de biosynthèse de la patuline</i>	22
2.3.4.2- <i>Voie moléculaire de biosynthèse de la patuline</i>	23

2.3.5- Régulation de la voie de biosynthèse de la patuline.....	26
2.3.6- Occurrence de la patuline dans les aliments	27
2.3.7- Transfert de la patuline dans la chaine alimentaire humaine et animale.....	28
2.3.8- Toxicité de la patuline.....	29
2.3.8.1- Toxicité aiguë	29
2.3.8.2- Toxicité chronique	30
2.3.8.3- Divers effets toxiques	30
2.3.8.4- Valeurs toxicologiques de référence	31
2.3.9- Réglementation de la patuline	31
2.4- <i>Penicillium expansum</i> : Le champignon et le pathogène commun des pommes.....	32
2.4.1- Classification et description morphologique.....	32
2.4.2- Habitat et niche écologique.....	33
2.4.3- Principaux métabolites secondaires élaborés par <i>P. expansum</i>	33
2.5- Pomme.....	34
2.5.1- Généralités.....	34
2.5.2- Structure de la pomme.....	34
2.5.3- Aptitude de la pomme à être contaminée par <i>Penicillium expansum</i>	35
3- Matériel et méthodes	
3.1- Echantillonnage.....	36
3.2- Isolement des mycètes.....	37
3.3- Purification et conservation des isolats.....	37
3.4- Sélection des isolats producteurs de mycotoxines.....	38
3.5- Identification des isolats sélectionnés.....	38
3.5.1- Etude des caractères cultureux.....	38
3.5.2- Etude des caractères morphologiques microscopiques.....	39

3.5.3-Etude moléculaire.....	39
3.5.3.1- <i>Extraction d'ADN</i>	39
3.5.3.2- <i>Amplification de la région ITS et β-tubuline par PCR</i>	40
3.5.3.3- <i>Electrophorèse des acides nucléiques</i>	42
3.5.3.4- <i>Séquençage de l'ADN</i>	42
3.5.3.5- <i>Aanalyse bioinformatique des résultats de séquençage</i>	43
3.5.3.6- <i>Aanalyse phylogénétique</i>	43
3.6- Production des mycotoxines	43
3.6.1- Fermentation sur milieu liquide.....	44
3.6.2- Extraction.....	44
3.6.3- Analyse chromatographique.....	44
3.6.4- Identification de la Patuline contenue dans l'extrait brute de fermentation Par GC-MS.....	45
3.6.4.1. <i>Principe général</i>	45
3.6.4.2- <i>Conditions expérimentales</i>	45
3.7- Test <i>in vivo</i> de la pathogénicité des souches fongiques sélectionnées	46
3.7.1- Inoculation des pommes.....	46
3.7.2- Evaluation de la production de la patuline <i>in vivo</i>	47
3.7.3- Analyse de la patuline produite <i>in vivo</i> par CCM.....	47
3.7.4- Analyse de la patuline produite <i>in vivo</i> par UPLC.....	48
3.8- Evaluation de la contamination naturelle des pommes destinées à La consommation	48
3.8.1- Les fruits.....	49
3.8.2- Extraction de la patuline à partir des tissus de pommes infectées Naturellement.....	49

3.8.3-Détermination de la patuline contenue dans les pommes infectées naturellement par CCM.....	49
3.9- Etude de la diffusion de la patuline des tissus infectés aux tissus sains dans les pommes.....	49
3.9.1- Extraction de la patuline à partir des sections obtenues.....	50
3.9.2-Détermination de la patuline dans chaque section par CCM.....	50
4-Résultats.....	51
4.1- Isolement des mycètes.....	51
4.2- Sélection des isolats mycotoxinogènes.....	51
4.3- Identification des isolats sélectionnés.....	54
4.3.1- Etude des caractères cultureux.....	54
4.3.2- Etude des caractères morphologiques microscopiques.....	56
4.3.3- Etude moléculaire.....	57
4.3.3.1- Extraction d'ADN.....	57
4.3.3.2-Amplification de l'ADN (réaction PCR).....	57
4.3.3.3-Séquençage.....	57
4.3.3.4-Analyse phylogénétique.....	59
4.4- Production des mycotoxines.....	61
4.4.1- Fermentation.....	61
4.4.2- Extraction.....	61
4.4.3- Analyse chromatographique.....	62
4.4.4- Identification de la patuline par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	63
4.5- Test <i>in vivo</i> de la pathogénicité des souches sélectionnées.....	69
4.5.1- Evaluation de la production de patuline <i>in vivo</i>	70
4.5.2-Analyse de la patuline produite <i>in vivo</i> par CCM.....	75

4.5.3-Analyse de la patuline produite <i>in vivo</i> par UPLC.....	78
4.6- Evaluation de la contamination naturelle des pommes destinées à la consommation et le rôle de la patuline comme biomarqueur d'effet.....	82
4.7-Etude de la diffusion de la patuline des tissus infectés aux tissus sains dans les Pommes.....	84
4.7.1- Extraction de la patuline à partir des sections obtenues.....	84
4.7.2- Détermination de la patuline dans chaque section par CCM.....	84
5-Discussion.....	86
6-Conclusion et Perspectives.....	97
Références bibliographiques.....	99

Liste des figures

Figure 1	Structure d'un hyphe.....	4
Figure 2	Les trois voies de biosynthèse des mycotoxines.....	11
Figure 3	Transfert des mycotoxines tout au long de la chaîne alimentaire.....	17
Figure 4	Représentation des pays ayant une réglementation des mycotoxines.....	19
Figure 5	Structure chimique et modèle moléculaire de la patuline.....	21
Figure 6	Voie de biosynthèse de la patuline et cluster de gènes.....	25
Figure 7	Protéines régulatrices globales impliquées dans la régulation des clusters de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire fongique.....	27
Figure 8	Transfert de la patuline dans la chaîne alimentaire humaine et animale.....	29
Figure 9	Structures morphologiques de <i>Penicillium expansum</i>	32
Figure 10	Aspect du thalle de <i>Penicillium expansum</i>	33
Figure 11	Structure anatomique générale d'une pomme.....	34
Figure 12	Localisation géographique des sites d'échantillonnage.....	36
Figure 13	Séquences du gène de β -tubuline de l'isolat S3 après avoir été corrigé à l'aide du programme «Bioedit».....	57
Figure 14	Séquences du gène <i>ITS</i> de l'isolat S4 après correction par le programme « Bioedit ».....	58
Figure 15	Séquences du gène <i>ITS</i> de l'isolat S7 après correction par le programme « Bioedit ».....	58
Figure 16	Analyse phylogénétique moléculaire des séquences de bêta-tubuline de la souche <i>Penicillium expansum</i> MT023795 (S3).....	59
Figure 17	Analyse phylogénétique moléculaire des séquences <i>ITS</i> des souches <i>Penicillium expansum</i> MN904448 (S4) et <i>Penicillium expansum</i> MN904449 (S7).....	60

Figure 18	Développement morphologique des souches sur milieu de fermentation.....	61
Figure 19	Extraction des métabolites secondaires par : l'acétate d'éthyle pour les souches, <i>Penicillium expansum</i> S3, S4 et S7.....	62
Figure 20	Extraits bruts des souches S3, S4 et S7 après concentration.....	62
Figure 21	Détection de la PAT dans les extraits bruts des souches S3, S4 et S7 par CCM.....	63
Figure 22	Chromatogramme correspondant au standard de la patuline (100mg/ml).....	64
Figure 23	Chromatogrammes démontrant la présence de la patuline dans l'extrait brut de la souche <i>Penicillium expansum</i> MT023795 (S3).....	64
Figure 24	Chromatogramme démontrant la présence de la patuline dans l'extrait brut de la souche <i>Penicillium expansum</i> MN904449 (S4).....	65
Figure 25	Chromatogramme démontrant la présence de la patuline dans l'extrait brut de la souche <i>Penicillium expansum</i> MN904448 (S7).....	65
Figure 26	Spectre de masse obtenu par GC-MS pour le standard de la patuline.....	66
Figure 27	Spectre de masse de la molécule de patuline sécrétée par la souche <i>Penicillium expansum</i> MT023795 (S3).....	67
Figure 28	Spectre de masse de la molécule de patuline sécrétée par la souche <i>Penicillium expansum</i> MN904449 (S4).....	68
Figure 29	Spectre de masse de la molécule de patuline sécrétée par la souche <i>Penicillium expansum</i> MN904448 (S7).....	68
Figure 30	Aspect des lésions induites par les trois souches de <i>Penicillium expansum</i> sur des pommes de la variété <i>Golden delicious</i> et <i>Fuji</i>	70
Figure 31	Lésions causées par inoculation de la souche <i>P. expansum</i> MN904449 (S4) après 9 jours d'incubation à 25°C.....	70
Figure 32	Lésions causées par inoculation de la souche <i>P.expansum</i> MT023795 (S3) après 9 jours d'incubation à 25°C.....	71
Figure 33	lésions causées par inoculation de la souche <i>P.expansum</i> MN904448 (S7) après 9jours d'incubation à 25°C.....	71
Figure 34	Cinétique de développement des lésions causées par <i>Penicillium expansum</i> MT023795 (S3) sur des fruits de pommes.....	72

Figure 35	Cinétique de développement des lésions causées par <i>Penicillium expansum</i> MN904449 (S4) sur des fruits de pommes.....	72
Figure 36	Cinétique de développement des lésions causées par <i>Penicillium expansum</i> MN904448 (S7) sur des fruits de pommes à 25°C pendant 9 jours d'incubation.....	73
Figure 37	Evaluation de la différence de la vitesse de développement des lésions entre les 3 souches de <i>Penicillium expansum</i>	74
Figure 38	Différentes étapes de l'extraction de la patuline à partir des lésions induites par les trois pathogènes	74
Figure 39	Détection de la patuline produite <i>in vivo</i> par <i>Penicillium expansum</i> MN904448 (S7) par CCM à 366 nm.....	76
Figure 40	Détection de la patuline produite <i>in vivo</i> par <i>Penicillium expansum</i> MT023795 (S3) par CCM à 366nm.....	77
Figure 41	Détection de la patuline produite <i>in vivo</i> par <i>Penicillium expansum</i> MN904449 (S4) par CCM à 366nm.....	78
Figure 42	Chromatogramme correspondant au standard de la patuline (1mg/ml).....	79
Figure 43	Chromatogrammes représentant la présence de patuline dans les tissus de pommes infectées <i>in vivo</i> par les trois souches	81
Figure 44	Courbe d'étalonnage des concentrations des solutions de standard de la patuline.....	82
Figure 45	Révélation par CCM de la présence naturelle de patuline dans les pommes...	83
Figure 46	Différents extraits obtenus à partir des sections réalisées sur les 3 pommes inoculées par <i>Penicillium expansum</i> MN904448 (S7).....	84
Figure 47	Analyse CCM de différentes sections des pommes inoculées par <i>Penicillium expansum</i> MN904448 (S7).....	85

Liste des tableaux

Tableau 1	Mycotoxines et les genres de moisissures responsables de leur production	6
Tableau 2	Principales mycotoxines et moisissures productrices sur diverses matrices alimentaires.....	8
Tableau 3	Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement sur l'homme et l'animal	10
Tableau 4	Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire.....	15
Tableau 5	Réglementation des teneurs maximales des principales mycotoxines dans l'alimentation humaine dans les pays de l'union européenne.....	19
Tableau 6	Isolats fongiques obtenus des différents échantillons utilisés.....	51
Tableau 7	Isolats fongique développant une activité antibactérienne	52
Tableau 8	Zone d'inhibition de croissance bactérienne développée par les isolats testés	53
Tableau 9	Aspect macroscopiques des isolats sélectionnées.....	55
Tableau 10	Aspect microscopique des isolats sélectionnés.....	56
Tableau 11	Affiliation phylogénétique des trois isolats	59
Tableau 12	Différentes caractéristiques de la molécule de Patuline.....	67

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF : Aflatoxines

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AOAC: Association of Official Analytical Chemistry

ARN: Acide ribonucléique

Aw: Activité de l'eau

BLAST: Basic Local Aligement Search Tool

BLASTn : BLAST Nucleotide

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CYA : Czapek Yeast Agar

dNTP : Mélange des quatre désoxyribonucléotides

D.O : Densité Optique

EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EI : Electronic impact

FAO: Food and Agriculture Organisation

GC-MS: Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

IARC (CIRC) : Centre International de Recherche sur le Cancer

ITS : Internal Transcribed Spacer

MBTH : 3-Methyl-2-BenzoThiazoline hydrazone hydrochloride

MEA: Malt Extract Agar

m/z : Rapport masse sur charge

MS : Spectrométrie de Masse

Na₂ CO₃ : Carbonate de Sodium

Na₂ SO₄: Sulfate de Sodium anhydre

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

OTA: Ochratoxine A

PAT : Patuline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA: Potato Dextrose Agar

R_f : Rapport frontal

Rpm: Rotation par minute

SAB: Potato Dextrose Agar

TBE: Tris-Borate-EDTA

t_r: temps de retention

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

UV: Ultra-violet

YES: Yeast Extract Sucrose

Introduction

1- Introduction

La salubrité des aliments est une préoccupation, de plus en plus, importante en santé publique. En réaction à un nombre croissant de crises et pour répondre aux inquiétudes des consommateurs, les gouvernements redoublent d'efforts pour améliorer la sécurité des aliments et par la suite prévenir ou réduire les maladies d'origine alimentaire (Soubra, 2008). Ces maladies sont causées par divers agents en particulier les microorganismes pathogènes. En plus des virus et des bactéries pathogènes, les champignons toxinogènes constituent un danger réel pour la santé de l'homme et de l'animal par la sécrétion de substances hautement toxiques au cours de leur prolifération sur ou dans les aliments d'origine végétale ou animale (Zinedine, 2004). Mise à part l'aspect bénéfique des moisissures, agents importants dans le secteur agroalimentaire et pharmaceutique, certaines moisissures peuvent devenir nuisibles en altérant non seulement les qualités organoleptiques et nutritionnelles des denrées alimentaires mais, aussi leurs qualités sanitaires en synthétisant des métabolites toxiques connus sous le nom de « mycotoxines » (Puel, 2007). Ce sont des métabolites secondaires de composition chimique très variable et par conséquent, leurs propriétés physico-chimiques et toxicologiques sont extrêmement diverses (Zain, 2011). Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, environ 25% des denrées alimentaires sont contaminées par les mycotoxines, entraînant des pertes économiques considérables. Ce problème est de plus en plus courant notamment en raison des changements climatiques importants (Saint Cyr, 2013). Ces changements facilitent la contamination et élargissent le terrain d'affection des denrées alimentaires par les mycotoxines. En effet, cette contamination peut avoir lieu au champ, à la récolte et lors du stockage.

Malgré toutes les précautions prises pour prévenir la présence de la flore fongique et ses toxines *via* les aliments, les contaminations surviennent encore car il est impossible en matière de sécurité alimentaire de garantir un risque zéro surtout que les mycotoxines peuvent subsister dans l'environnement malgré la disparition des moisissures qui les ont produites (Ammrouche, 2013). La contamination par ces métabolites toxiques est un problème de sécurité alimentaire mondiale, qui a attiré l'attention des différents pays à travers le monde en raison des pertes significatives associées à son impact sur la santé humaine et animale, par conséquent, les implications socio-économiques.

La plupart de ces toxines sont thermostables à haute température et peuvent, par conséquent, contaminer les aliments transformés et entrer dans la chaîne alimentaire humaine à travers les produits dérivés (Sharma *et al.*, 2015).

Parmi les denrées alimentaires contaminées par les moisissures toxigènes ; les fruits. On estime que 25 à 30% des fruits récoltés sont décomposés par des agents pathogènes pendant la manutention après récolte, et ce, même dans les pays développés (FAO, 2018).

Les fruits contiennent des niveaux élevés de sucres et éléments nutritifs et leurs faibles valeurs de pH les rendent, particulièrement, favorables pour les champignons filamenteux (Singh et Sharma, 2007). L'infection fongique des fruits peut survenir pendant la saison de croissance, récolte, manutention, transport et stockage après récolte pendant les conditions de commercialisation (Spadaro *et al.*, 2013; Abass *et al.*, 2014). Généralement, pendant la conservation des fruits certaines moisissures élaborent des mycotoxines, parmi lesquelles ; la Patuline, une mycotoxine produite par les genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Byssochlamys*. Elle est associée aux fruits à pépins entreposés en général, et spécifiquement aux pommes et produits à base de pommes (Saladino *et al.*, 2016).

En Algérie, il existe très peu de données sur la patuline, la contamination des produits à base de pommes par cette mycotoxine ainsi que sa réglementation. En outre, la plus grande attention dans ce domaine est, constamment, dirigée vers les Aflatoxines et les Ochratoxines (Guezlane *et al.*, 2016). A présent, il est primordial de se soucier de l'impact socio-économique et sanitaire des mycotoxines en général et particulièrement la patuline en établissant des réglementations et des normes pour préserver la santé du consommateur en limitant les maladies d'origines alimentaires, dues la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires.

De ce fait, l'objectif de cette thèse est l'évaluation de la contamination de quelques fruits produits dans l'Est algérien par la flore fongique mycotoxinogène ; d'un autre point mettre en évidence la pathogénicité des souches et leur pouvoir à produire la patuline *in vivo*. Pour ce faire, la thèse comporte une synthèse bibliographique approfondie contenant des informations sur la description des mycètes en général et particulièrement les moisissures toxigènes, les diverses mycotoxines produites par ces moisissures, pour enfin se focaliser sur la patuline et ses diverses caractéristiques et le champignon majeur producteur de cette mycotoxine en l'occurrence, le *Penicillium expansum*. Quant à la partie expérimentale, elle repose sur quatre grands volets : l'isolement et la sélection de souches fongiques mycotoxinogènes; la production de la patuline *in vitro* et *in vivo* ; l'évaluation de la contamination naturelle des pommes par la patuline qui constitue la traçabilité de la mycotoxine, considéré ici comme biomarqueur d'effet; enfin étude de la diffusion de la patuline dans les fruits de pommes *in vivo*. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une discussion approfondie afin de comparer nos

résultats à ceux, déjà, développés par des travaux antérieurs. La thèse se termine par une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

Synthèse
Bibliographique

2- Synthèse bibliographique

2.1- Moisissures toxigènes

2.1.1- Généralités sur les moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux qui font partie du règne des Fungi, eucaryotes d'aspect microscopique (micromycètes), dépourvus de chlorophylle ce qui les condamne à une hétérotrophie totale (Bouchet *et al.*, 2005). L'appareil végétatif des moisissures est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium (Nguyen, 2007). En Général, les hyphes sont divisés par des cloisons, ou Septa contenant un seul noyau, on les appelle des hyphes segmentés ou septés.

Chez d'autres classes, les hyphes sont dépourvus de cloisons et ont l'aspect d'une longue cellule continue à noyaux multiples ; ils sont donc appelés cénocytes (Figure 1) (Tortora *et al.*, 2003). Les cloisons, appelées septa sont des perforations assurant la communication entre les cellules (Justa-Schuch *et al.*, 2010). Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur mode de nutrition d'où l'épuisement du substrat est réalisé par extension et ramification des hyphes (Chabasse *et al.*, 2002).

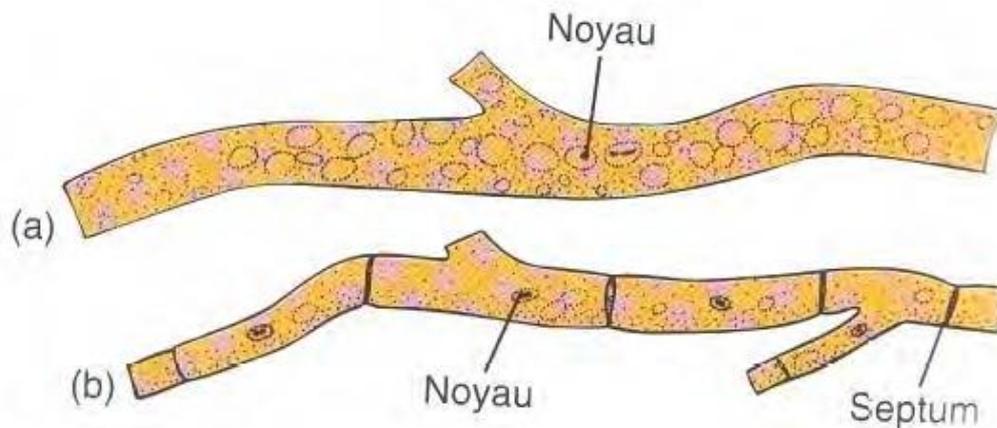


Figure 1 Structure d'un hyphe : (A) hyphe coenocytique ; (B) hyphe cloisonné (Prescott *et al.*, 2007).

La reproduction de ces microorganismes est assurée soit par voie sexuée (moisissures téléomorphe) ou une multiplication asexuée (moisissures anamorphe). Chez certains, les deux formes de reproduction peuvent coexister et ils sont appelés dans ce cas holomorphes (Nguyen, 2007). La reproduction sexuée peut se faire de plusieurs façons mais la voie asexuée la plus répandue est la production des spores.

Ces organes sont de petites cellules ovales ou sphériques qui ont la capacité à se développer. Elles sont très résistantes à la chaleur, les rayons UV, la dessiccation et présentent un potentiel de dissémination qui confère aux moisissures le caractère ubiquitaire (Ammrouche, 2013). Les moisissures sont omniprésentes, dans le sol, dans l'air, sur les vêtements, les plantes, et surtout sur les aliments. Ces derniers sont généralement des milieux très favorables à leur développement (DAO, 2005). Sur le plan biochimique, elles sont caractérisées par la présence d'une paroi constituée essentiellement de polysaccharides notamment la chitine, l'ergostérol constitue le principal stérol de leur membrane (Chabasse, 2002).

Il existe divers groupes de champignons filamenteux : les zygomycètes, les ascomycètes et les deutéromycètes. Ces derniers regroupent les différents contaminants post-récolte (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*), qui sont des champignons imparfaits car seulement leur forme anamorphe (asexuée) est connue. On va pouvoir trouver dans ce groupe de nombreux contaminants des matières premières alimentaires telles que les céréales, le café ou les fruits (Samson *et al.*, 1996).

Bien que les moisissures soient relativement peu exigeantes, un certain nombre de facteurs nutritifs et environnementaux doivent être réunis afin qu'elles puissent assurer leur développement. Parmi les éléments nutritifs, les plus importants sont le carbone et l'azote utilisés sous forme de composés organiques ainsi que des ions minéraux tels que le potassium, magnésium et phosphore sous forme de traces. Les facteurs environnementaux comme la température, le pH et la lumière influencent fortement aussi la croissance des moisissures. Néanmoins, la disponibilité en eau reste le facteur le plus essentiel. En effet, en dessous d'une A_w de 0,65 aucune moisissure ne peut se développer (Brock *et al.*, 1994; Dix et Webster, 1995).

2.1.2- Moisissures et mycotoxines

Jusqu'à récemment, les moisissures étaient généralement considérées comme une simple détérioration inesthétique des aliments, à l'exception de *Claviceps purpurea* relié à une maladie de l'homme depuis 200 ans. C'est réellement à partir de 1960, qu'on a pris conscience que les moisissures pouvaient élaborer des toxines significatives (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

Les moisissures productrices de mycotoxines appartiennent essentiellement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et d'*Alternaria* (Tableau 1). Ces moisissures et

leurs mycotoxines secrétées sont susceptibles de contaminer l'aliment, du champ jusqu'à l'assiette des consommateurs (El khoury, 2007).

Sur 11.000 espèces, plus d'une centaine sont potentiellement productrices de mycotoxines et plus d'une cinquantaine sont capables d'infecter les humains.

Tableau 1 Mycotoxines et les genres de moisissures responsables de leur production

Champignons	Mycotoxines
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxine Stéigmatocytine Ochratoxine A
<i>Penicillium</i>	Patuline, Citrinine, Pénitrem A, Acide cyclopiazonique, ochratoxine A
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes (DON, NIV, Toxine T-2, DAS) Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine
<i>Alternaria</i>	Alternariol, Acide Ténuazonique

2.2- Mycotoxines

2.2.1- Historique, définition et généralités

Longtemps confiné aux pathologies provoquées par l'ergot de seigle et par des champignons macroscopiques, le problème des mycotoxines n'a pris une importance considérable que dans les années 1960. En effet, dans cette année, une crise vétérinaire inhabituelle en Angleterre est apparue et dans laquelle près de 100 000 dindons ont été décimé d'une nécrose hépatique sévère et d'une hyperplasie biliaire (Yiannikouris et Jouany, 2002; Bennett et Klich, 2003). La cause de cette maladie a été attribuée à l'aflatoxine, une mycotoxine produite par le champignon *Aspergillus flavus* ayant foisonné sur les arachides contenus dans la nourriture de ces volailles (Medeiros *et al.*, 2012).

Le terme « mycotoxine » vient de la combinaison entre le mot grec « *mycos* » qui signifie Champignon, et le latin "*toxicum*" qui veut dire poison (Jouany *et al.*, 2009 ; Rai *et al.*, 2012). Il désigne les substances chimiques toxiques produites par certaines moisissures se développant sur certaines denrées alimentaires (Quillien, 2002). Ce sont des métabolites secondaires bioactifs produits sous des conditions environnementales particulières par la

structure mycélienne de certains champignons filamenteux microscopiques (Ritieni, 2003; Negedu *et al.*, 2011).

Ces métabolites sont qualifiés de secondaires car ils sont normalement synthétisés par le champignon à la fin de sa phase exponentielle de croissance et ne possèdent, à ce titre-là, aucun rôle physiologique distinct (Whitlow, 2005; Paterson, 2006; Puel, 2007). Mais ces molécules pourraient constituer un système de défense "force défensive chimique" pour les champignons producteurs contre les autres organismes compétitifs présents dans l'environnement de la moisissure, y compris, de manière non exhaustive, les nématodes, les protozoaires, les insectes antagonistes ou d'autres champignons. Un second rôle a été conféré aux mycotoxines, en tant que facteurs de virulence ou de pathogénicité, qui agissent en désactivant les réactions de défense de l'hôte (Snini, 2014).

Sur le plan chimique, il s'agit de composés peu volatils, généralement de faible poids moléculaire (<1000 Daltons), peu solubles dans l'eau et chimiquement très stables (Reboux, 2006). Elles résistent à l'acidité et aux hautes températures, de ce fait, les procédés d'élimination des micro-organismes (chauffage, stérilisation ...) sont inefficaces sur l'élimination de la plupart des mycotoxines (Dragacci *et al.*, 2005). Par ailleurs, ce groupe se compose d'un ensemble très hétérogène de substances chimiques caractérisées par une grande diversité de structure allant de molécules simples (C4) à des composés hautement polymérisés formés de 6 à 8 chaînes carbonées (Pitt, 2000; Mollea et Bosco, 2012).

De ce fait, les mycotoxines constituent, un groupe très hétérogène en raison de leurs diverses structures chimiques, origines biosynthétiques, de leurs différents effets biologiques et leur production par un grand nombre d'espèces fongiques différentes (Bennett et Klich, 2003). Actuellement, plus de 500 mycotoxines différentes ont été découvertes, et ce nombre ne cesse d'accroître (Medeiros *et al.*, 2012).

La synthèse des mycotoxines peut avoir lieu avant, pendant ou après la récolte, durant l'entreposage, le transport ou la transformation du produit (FAO, 1997 ; PFOHL-LESZKOWICZ, 1999).

De ce fait, on peut distinguer deux principales catégories de moisissures mycotoxinogènes :

- Les champignons de champs qui contaminent les produits agricoles avant ou pendant la récolte, on trouve ces espèces dans principalement le genre *Fusarium* et *Alternaria*

- Les champignons de stockage qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage. Les principaux genres inclus dans cette catégorie sont : *Aspergillus* et *Penicillium* (Atoui, 2006).

2.2.2- Principales mycotoxines

Les mycotoxines couvrent une classe très vaste de familles chimiques, qui diffèrent les unes des autres par leur origine, nature chimique, voie de biosynthèse et propriétés toxiques. Il y aurait, selon les auteurs des centaines de mycotoxines répertoriées. Seule une vingtaine parmi ces molécules sont étudiées, alors, que beaucoup restent inconnues (Bryden, 2016). Les mycotoxines les plus importantes et les plus étudiées sont les aflatoxines produites par le genre *Aspergillus*, l'ochratoxine A produite par certaines espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*, les fumonisines, les trichothécènes, la zéaralénone, produites par les espèces du genre *Fusarium* et la patuline produite par plusieurs espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Paecilomyces* (Tableau 2) (Marin *et al.*, 2013).

Tableau 2 Principales mycotoxines et moisissures productrices sur diverses matrices alimentaires.

Mycotoxines	Principales moisissures productrices	Denrées alimentaires
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> et <i>A. nomius</i>	Céréales (maïs, blé, riz, orge, seigle, avoine) (soja), les fruits secs (noix, cacahuètes, pistaches, arachides), certaines épices+Lait (Tabuc, 2007 ; Lamrani, 2009).
Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , et <i>Aspergillus carbonarius</i>	Grains de café, de cacao, des céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine...), cacahuètes, des épices et des fruits secs, dans la bière, le vin et les jus de raisin (Frisvad <i>et al.</i> , 2004; Iamanaka <i>et al.</i> , 2005).
Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> et <i>F.nygamai</i>	Le maïs et les produits à base de maïs (les biscuits, pain, céréales de petit déjeuner et pâtes, le riz, le sorgho et aliments à base de céréales destinés aux enfants (Tabuc, 2007 ; Tozlovanu, 2008).
Trichothécènes (DON)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>	Céréales (maïs et blé) (Boenisch et Schafer, 2011).

Zéaralène (toxine F-2)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. ceealis</i> , <i>F. incarnatum</i> <i>F. crookwellense</i>	Les céréales particulièrement le maïs mais aussi le soja, le blé, l'orge, le sorgho et l'avoine (Zineddine 2004 ; Snini, 2014).
Citrinine	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> et <i>Monascus ruber</i>	Les céréales (le riz, le maïs, l'orge, blé, seigle et avoine en cours de stockage), les noix, les arachides, les graines de tournesol, les fruits secs, la tomate, les pommes et le jus de pomme, produits secs de salaisonnerie et les fromages (AFSSA, 2006 ; Tozlovanu, 2008).
Patuline	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> et <i>Bysochlamys nivea</i>	Pommes et produits à base de pommes, fruits à pépins (raisins, myrtilles, abricots, pêches) (Riteni <i>et al.</i> , 2010).

2.2.3- Structure des mycotoxines

Les mycotoxines sont des composés de structure très diverse ; polycyclique ou aliphatique, aromatique ou non. Elles sont acides ou basiques, neutres, en général peu hydrosolubles (Barkai Golan et Paster, 2008). La variabilité des voies de synthèse et des espèces productrices fait qu'il existe une panoplie de molécules, de structure relativement différentes les unes des autres.

En général, les mycotoxines sont des molécules de faible poids moléculaire : allant de 154 Da pour la patuline qui est l'une des plus petites molécules, à 466 Da pour la toxine T2, qui est l'une des plus grosses molécules. Les mycotoxines sont, pour la majorité, des composés hétérocycliques insaturés. L'existence de doubles liaisons C=C joue souvent un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérigènes des mycotoxines (Tabuc, 2007).

2.2.4- Toxicité des mycotoxines

Lorsque des mycotoxines sont ingérées, ou parfois inhalées, divers effets toxiques peuvent être causés en fonction de la toxine (combinaison), de la dose, de la durée d'exposition et de la personne elle-même. Ils peuvent provoquer une toxicité dans différents organes et avoir divers mécanismes d'action moléculaires (Tableau3). Il résulte de cette exposition une toxicité aiguë ou chronique. Bien que, l'exposition chronique aux mycotoxines est considérée comme le principal souci pour la santé humaine et animale (par exemple, toxicité rénale, induction du cancer, suppression immunitaire), les incidents de mycotoxines les plus marqués étaient dus à des effets aigus profonds (ergotisme humain, maladie de la Turquie X, stachybotryotoxicose) (Bennet et Klich, 2003; Cano *et al.*, 2016).

Tableau 3 Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement sur l'homme et l'animal (AFSSA, 2006).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B1 + M1	-Hépatotoxicité -Génotoxicité -Cancérogénicité -Immunomodulation	-Formation d'adduit à l'ADN -Peroxydation lipidique -Bioactivation par cytochromes P450 -Conjugaison aux GS-transférases
Ochratoxine A	-Néphrotoxicité -Génotoxicité -Immunomodulation	-Impact sur la synthèse des protéines. -Inhibition de la production d'ATP -Détoxification par les peptidases
Patuline	-Neurotoxicité -Mutagenèse <i>in vitro</i>	-Inhibition indirecte d'enzymes
Trichothécènes (Toxine T-2, DON, ...)	-Hématotoxicité -Immunomodulation -Toxicité cutanée	-Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires -Impact sur la synthèse des protéines -Altération des immunoglobulines
Zéaralène	-Fertilité et Reproduction	-Liaison aux récepteurs oestrogéniques -Bioactivation par des réductases -Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	-Lésion du système nerveux central -Hépatotoxicité -Génotoxicité -Immunomodulation	-Inhibition de la synthèse de céramide -Altération du rapport sphinganine/sphingosine -Altération du cycle cellulaire

2.2.5- Biogénèse des mycotoxines

Les mycotoxines sont des molécules issues du métabolisme secondaire des moisissures, qui ne jouent pas de rôle évident dans le métabolisme du microorganisme (Adams, 2002). Elles sont synthétisées pendant la phase stationnaire après les stades de multiplication et de

croissance de la moisissure, à partir des précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'Acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques (Steyn, 1998).

L'hétérogénéité structurale des mycotoxines résulte de la diversité des réactions chimiques (cyclisation, aromatisation, glycosylation, hydroxylation et époxydation) impliquées dans leur biosynthèse (Boettger et Hertweck, 2013). Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificité différente de celle du métabolisme primaire (Steyn, 1980). De ce fait, les mycotoxines ont trois origines biosynthétiques : la voie des polyacétates, celle des terpènes et celle des acides aminés (Tabuc, 2007) (Figure2).

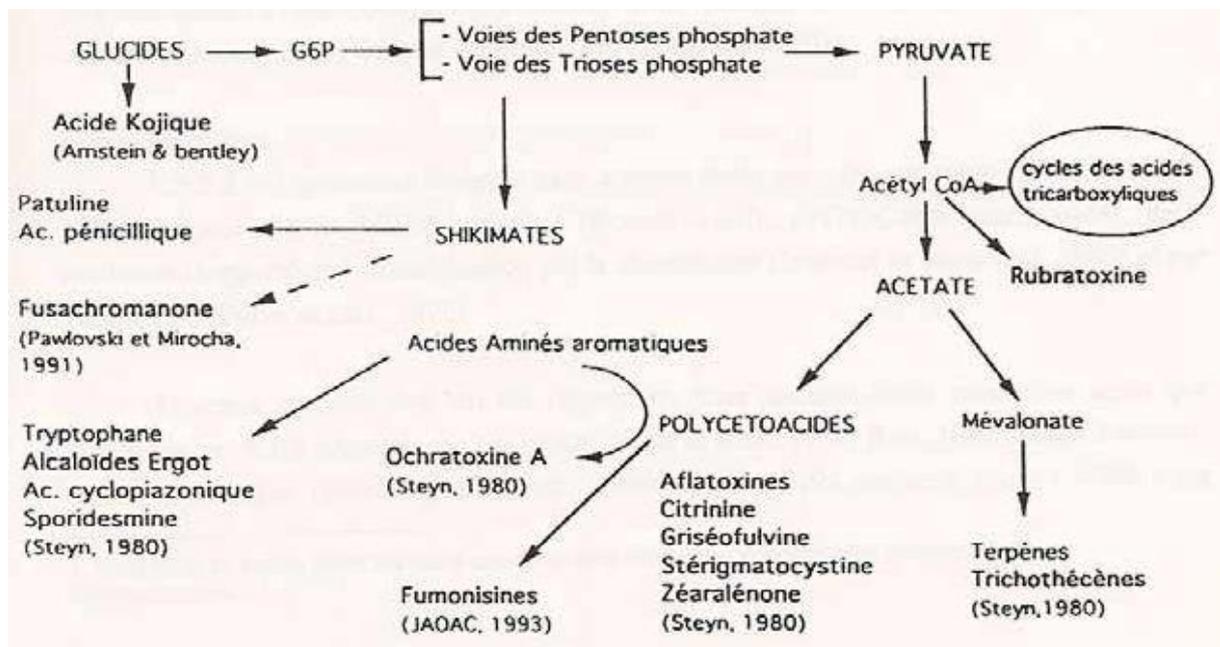


Figure 2 Les trois voies de biosynthèse des mycotoxines (Tabuc, 2007).

2.2.6- Mycotoxinogénèse

La synthèse des mycotoxines est un phénomène de grande complexité qui dépend d'une combinaison de facteurs physicochimiques et biologiques qui favorisent la colonisation des denrées et par la suite la production de mycotoxines (Ammrouche, 2013). Cette contamination peut survenir à tous les stades de la chaîne alimentaire, depuis le champ jusqu'au stockage et transformation des aliments (Pfohl-Leskowicz, 1999). Ainsi, une même denrée peut être sujette à de multiples contaminations. De plus, une moisissure toxigène peut produire plusieurs mycotoxines simultanément, et des mycotoxines identiques peuvent être produites par des champignons de genres et d'espèces différentes (Nguyen, 2007).

Cependant, la présence de moisissures toxigènes sur une denrée ne signifie pas obligatoirement la présence de mycotoxines, car leur production par le champignon n'aura lieu sauf si les conditions environnementales favorables à cette contamination sont réunies (Le Bars, 2002). Ainsi, la production, le type et la quantité de mycotoxines sont une conséquence combinée des caractéristiques génétiques de la souche et des facteurs environnementaux (Olsen *et al.*, 2003; Blumenthal, 2004).

2.2.6.1- Facteurs extrinsèques de la mycotoxinogénèse

Les facteurs environnementaux ou extrinsèques influençant la production de mycotoxines sont d'origine physique (température et humidité) ou chimique (Oxygénation et pH du milieu), ou biologique (interaction entre microorganismes). Cependant, ces facteurs agissent rarement d'une façon indépendante et leurs interactions sont habituellement plus importantes que l'effet d'un facteur simple (Lacey, 1986).

➤ Activité de l'eau (Aw)

Il s'agit d'un paramètre dont l'influence est déterminante sur la toxino-génèse. En général, l'Aw nécessaire à la production de mycotoxines est supérieure à celle favorisant la croissance fongique. Par exemple, *Penicillium expansum* possède un optimum de croissance lorsque l'Aw est entre 0.82-0.83 ; par contre la production de PAT n'aura lieu que lorsque l'Aw est de 0.95 (Pitt et Hocking, 2009).

En effet, les champignons de champs exigent essentiellement une haute teneur en humidité dans le substrat (22-25 %) comparant aux champignons de stockage (13-18 %) (Samson *et al.*, 2004).

De ce fait, Chaque espèce ou isolat possède son niveau optimal d'humidité (ou activité de l'eau, Aw) pour l'élaboration de mycotoxine.

➤ Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance et la physiologie de la moisissure, voir l'élaboration des mycotoxines par la suite. La température favorisant une toxino-génèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance, pour la plupart des mycotoxines ; tout en demeurant légèrement inférieure (Pfohl-Leszkowicz, 1999). La température optimale pour la production de Fumonisine B1 dans le maïs est 30°C pour *F.moniliforme* et 15°C pour *F. proliferatum*. Ainsi, *P.expansum* peut croître à de très basses température (-6°C) avec un optimum de 25°C mais la production de PAT n'est produite que dans la gamme 0-25°C (Pitt et Hocking, 2009).

De plus, une même espèce fongique peut sécréter différentes mycotoxines selon la température. C'est le cas d'*A.ochraceus* qui produira principalement de l'OTA à des températures situées entre 25 et 30°C, alors qu'à 15-20°C il produira plutôt de l'acide pénicillique (Lamrani, 2009).

➤ **Acidité du milieu (pH)**

Le pH peut jouer un rôle critique sur la production des mycotoxines. Mais comme pour l'activité de l'eau (A_w), les valeurs de pH favorisant la toxinogénèse sont plus réduites que celle permettant la croissance fongique (Atoui, 2006).

➤ **Présence d'oxygène**

La grande majorité des moisissures sont aérobies et généralement, l'élaboration des mycotoxines est plus sensible à la fluctuation de la composition de l'air que la croissance fongique. La réduction de la pression partielle en oxygène (jusqu'à moins de 1%) et surtout l'augmentation de la teneur en CO₂ ont un effet inhibiteur important sur la toxinogénèse (Cairns-Fuller *et al.*, 2005; Nguyen, 2007). La production de patuline dans une atmosphère modifiée de 3% CO₂ et 2% O₂ est pratiquement inhibée même à un optimum de 25°C. Par contre, la production de PAT a eu lieu dans des atmosphères de 2% CO₂ et une teneur en O₂ de 10 à 20% (Pitt et Hocking, 2009).

➤ **Composition de substrat**

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, se développant exclusivement sur des substrats organiques contenus dans les produits alimentaires de base. Les glucides constituent la source de carbone la plus exploitée par les moisissures, et leur présence avec les acides aminés stimule la croissance fongique (Zinedine, 2007).

Par ailleurs, la composition chimique et la présence de certaines molécules dans le substrat peuvent aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'Aflatoxine alors que la proline stimule sa production par *A.parasiticus* et *A. flavus*. Un autre exemple, est celui de *Penicillium roqueforti*, qui est incapable de produire une toxine sur le fromage de Roquefort, alors qu'*in vitro* il est en mesure de sécréter un métabolite très toxique ; la roquefortine C. Ces différences dans l'expression du pouvoir mycotoxinogène peuvent être observées au sein des souches d'une même espèce. Cela est dû, du fait qu'elles ne disposent pas toutes du système enzymatique requis pour la production des mycotoxines (Nicholson *et al.*, 2003).

➤ *Interaction entre microorganismes*

La présence synchrone de plusieurs microorganismes, que se soit bactéries ou d'autres moisissures (en concurrence) dans le même milieu, agit sur la croissance et l'élaboration des mycotoxines en modifiant le métabolisme de l'organisme producteur, en sécrétant des molécules inhibitrices ou en changeant les conditions environnementales les rendant défavorables pour la production de mycotoxine (Lacey, 1986; Atoui, 2006). Ainsi, la production d'aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus* est moins importante, lorsqu'il est dans le même milieu de culture avec *A. parasiticus*, et ce, même si la souche *A. parasiticus* est non toxigène (Pfohl-Leszkowicz, 2001). La présence de *F. moniliforme* dans les épis de maïs, les protège d'une contamination par *A. flavus* et réduit le taux d'AF produit (Nguyen, 2007).

De même, la quantité de trichothécènes et de zéaralénone produite par *F. culmorum* sur des grains de maïs stérilisés par la chaleur ou une irradiation, est supérieure à celle présente dans des grains non-stérilisés (O'Neill et al., 1996). Cette différence est due au fait que dans le premier cas le substrat est exempt de micro-organismes alors que la flore spontanée est présente dans le second cas.

D'autres facteurs d'ordre biologique s'avèrent aussi très importants, il s'agit des insectes et des acariens qui sont considérés comme des vecteurs de spores de moisissures, qu'ils les font pénétrer à l'intérieur du grain par le biais des lésions qu'ils occasionnent (Lamrani, 2009).

2.2.6.2- Facteurs intrinsèques de la mycotoxinogénèse

L'existence d'une souche toxigène au sein d'une espèce donnée ne signifie pas que toutes les souches appartenant à cette espèce sont capables de produire des mycotoxines (Zinedine, 2007). De plus, on trouve au sein d'une espèce réputée toxigène, certaines souches qui sont extrêmement productrices de mycotoxines alors que d'autres le sont, mais à des niveaux mineurs. Le Bars (1988) a utilisé des souches d'une même espèce dont certaines produisaient 1000 mg/kg de toxines alors que d'autres n'en produisaient pas à des niveaux détectables. Toutes les souches d'*Aspergillus parasiticus* élaborent les aflatoxines, en revanche, chez *Aspergillus flavus* la production est variable (Redouane, 2016). La toxinogénèse d'une moisissure peut dépendre des espèces productrices qui se différencient dans leur caractère morphologique, génétique et dans leur niche écologique (Cast, 2003).

Tableau 4 Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différentes étapes de la chaîne alimentaire.

Facteurs	Au champ	A la récolte	Pendant le stockage
Physique			
- Humidité	+	+	+
- Température	-	+	+
-Humidité relative	-	+	+
-Ré humidification	+	+	+
-Rapidité de séchage	+	+	+
- damage mécanique	+	+	+
- mélange de grains	-	+	+
- temps	+	+	+
Chimique			
- O ₂	-	-	+
- CO ₂	-	-	+
- nature du substrat	+	-	+
- nutrition minérale	+	-	+
- traitement chimique	-	-	+
Biologique			
- stress de plante	+	-	+
- vecteurs invertébrés	+	-	+
- infection fongique	+	-	+
- différences entre les variétés des plantes	+	-	+
- différences entre les souches fongiques	+	-	+
- charge en spores	+	+	+
- système microbiologique	+	-	+

(+) : effet

(-) : pas d'effet

2.2.7- Moisissures et mycotoxines dans la chaîne alimentaire

Possédant un arsenal enzymatique puissant et varié, leur capacité d'adaptation peu exigeante aux facteurs physicochimiques font des moisissures d'excellents contaminants de produits alimentaires. Leur croissance strictement apicale et la ramification subapicale des hyphes, permettent l'avancement continu sur et dans le substrat vers des régions nutritives neuves, occupant grâce aux hyphes mycéliens latérales toute la surface comestible (Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016).

Le développement de ces microorganismes sur les aliments modifie l'aspect des produits alimentaires et peut leur donner des odeurs de moisi. Les métabolites élaborés par les moisissures lors de leur croissance sur l'aliment sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires. Des changements dans la qualité organoleptique (modification de goût de la denrée par exemple) mais aussi de sérieux problèmes sanitaires surgissent, c'est le risque d'intoxication due à la présence de mycotoxines. Il y a donc une réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée et une baisse du rendement des récoltes (Atoui, 2006).

L'introduction des mycotoxines dans la chaîne alimentaire de l'homme s'effectue soit par des denrées consommées directement (arachide, pistache) ou indirectement par des produits dérivés à partir desquels sont élaborés des produits finis (par ex. produits issus de la panification, jus de fruits) (Figure 3). Comme elles sont peu métabolisées par les organismes vivants, les mycotoxines peuvent également se transmettre par des produits d'origine animale (lait et produits laitiers, abats, charcuterie...) si l'animal a consommé une alimentation elle-même contaminée par des mycotoxines (Dragacci *et al.*, 2005). Les procédés de conservation (pasteurisation, stérilisation, lyophilisation, séchage, salage, congélation, etc.) peuvent agir sur les moisissures mais ne détruisent pas ou très peu la plupart des mycotoxines.

2.2.8- Evaluation du risque de contamination et réglementation des mycotoxines

Les mycotoxines sont le résultat d'un phénomène naturel, le métabolisme secondaire fongique. Et comme la présence des moisissures dans les récoltes est un fait incontournable, il est donc parfois impossible d'éviter la production des mycotoxines, qui est parfois imprévisible, ce qui rend impossible d'éliminer toute trace de ces molécules des produits alimentaires (Redouane, 2016).

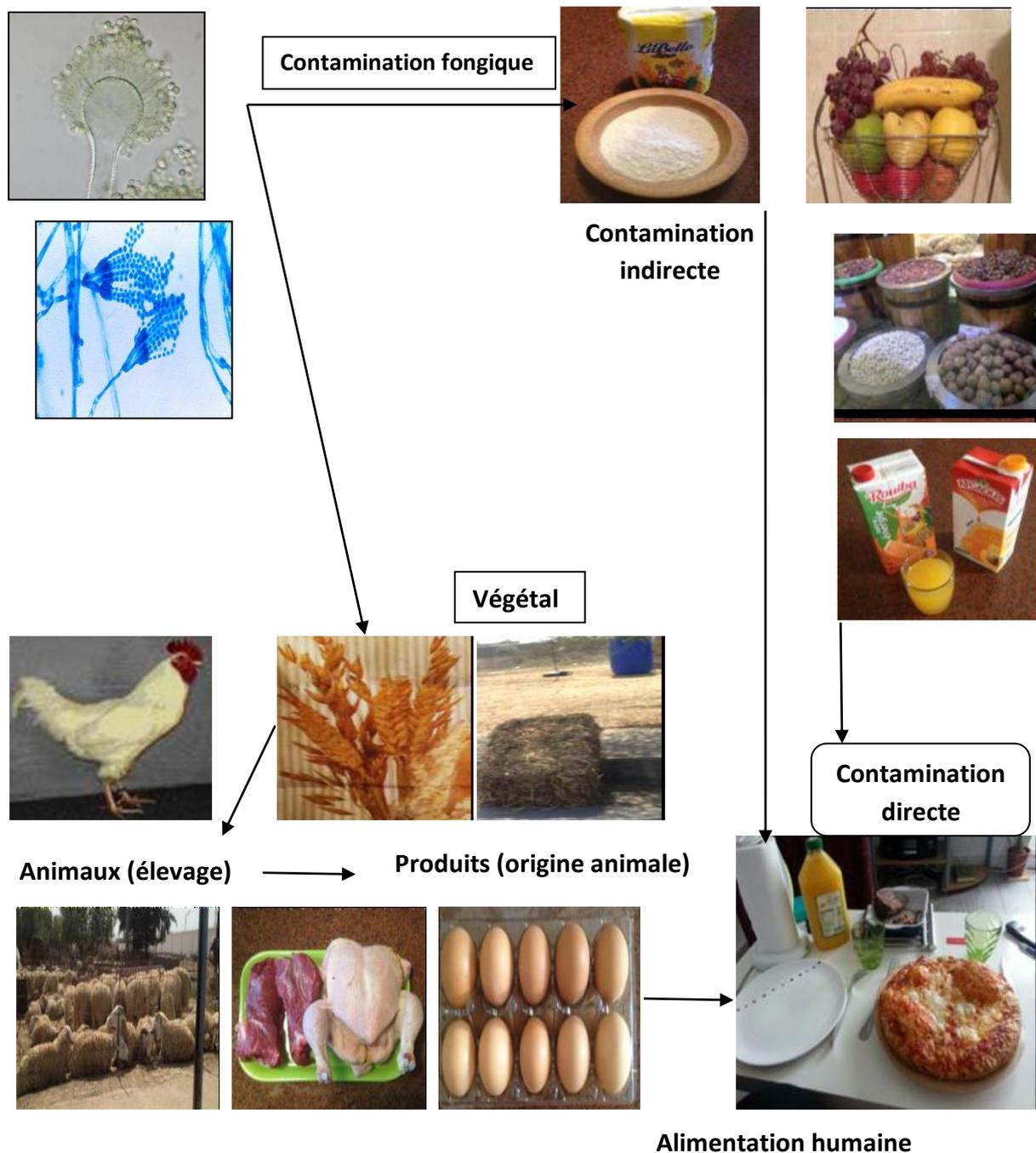


Figure 3 Transfert des mycotoxines tout au long de la chaîne alimentaire (Guezlane, 2016).

Il est difficile d'évaluer le risque de contamination mycotoxique car ce risque est un phénomène d'origine naturelle, difficilement contrôlable (contamination fongique liée aux conditions environnementales), et il peut être multiple par le fait qu'une moisissure peut produire plusieurs mycotoxines simultanément (Jard, 2009).

De plus, la contamination mycotoxique peut avoir lieu avant ou après récolte et pendant le stockage des aliments et ainsi toute la chaîne alimentaire sera affectée ce qui rendra la gestion du risque difficile. Selon l'AFSSA, l'évaluation du risque est l'évaluation de la possibilité

qu'un effet indésirable sur la santé survienne suite à l'absorption d'une denrée alimentaire présentant un danger, dans une population donnée, après exposition au danger. Pour caractériser ce dernier, une Dose Journalière Tolérée (DJT) est fixée grâce aux études toxicologiques. Pour qu'il n'y ait pas de risque pour la santé, il faut que la quantité à laquelle un individu est exposé par jour (l'exposition) soit inférieure à la DJT (AFSSA, 2009).

Par ailleurs, la prise de conscience du risque sanitaire associé à la présence de mycotoxines dans les aliments se généralise et les mycotoxines sont systématiquement recherchées de plus en plus et font l'objet d'une norme. Les premiers règlements visant à limiter la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires ont été élaborés en 1960, après la découverte de l'AFB1. Actuellement, environ 100 pays (couvrant environ 85% des habitants du monde) ont des réglementations concernant les mycotoxines (Figure 4) (Van Egmond *et al.*, 2007).

En Algérie actuellement, à notre connaissance, on ne possède pas encore de normes ou des limites réglementaires, fixant les teneurs réglementaires des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale. En effet, la réglementation fixe pour les principales mycotoxines, les concentrations maximales admises en alimentation humaine et animales (Tableau 5). Ces maxima admissibles sont très différents d'un pays à l'autre, par exemple, en alimentation humaine les teneurs admissibles d'aflatoxine B1 sont généralement de 2 µg/kg (2 ppb). Cependant, la Suisse et l'Autriche ont des tolérances plus faibles, 1 µg/kg, alors que la République de Chine a les tolérances les plus fortes avec 50 µg/kg (Guezlane *et al.*, 2016).

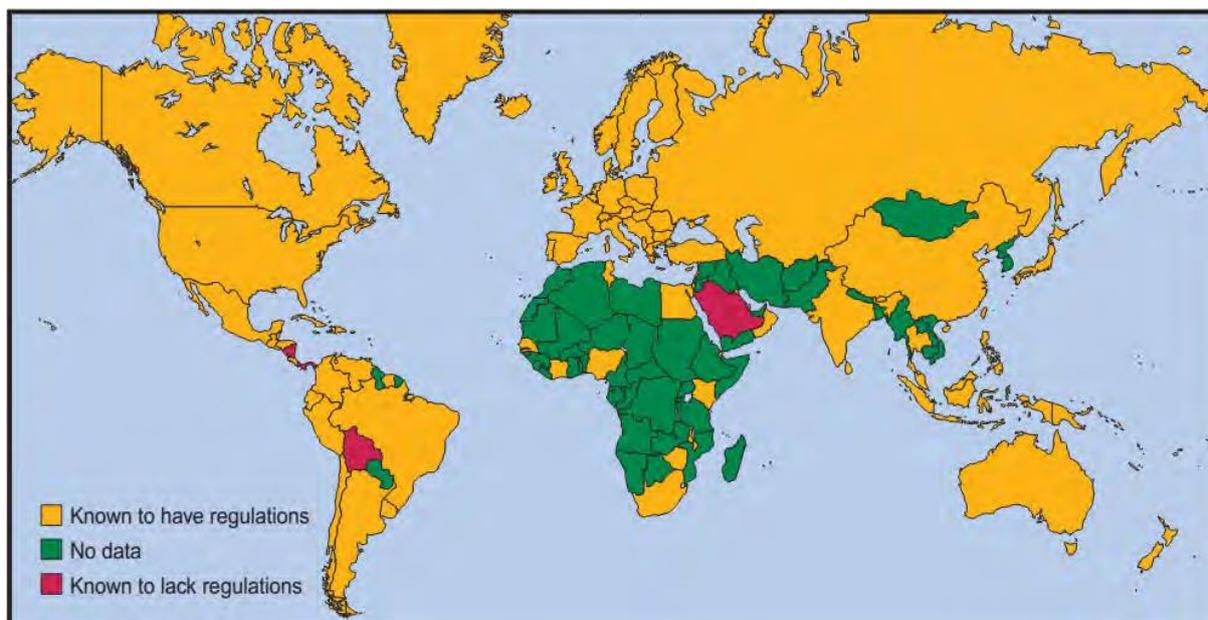


Figure 4 Représentation des pays ayant une réglementation des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale (en jaune), pays où on ne sait pas si la réglementation existe (en vert) et pays qui n'ont aucune réglementation spécifique (en rouge) (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture 1997 in Richard *et al.*, 2003).

Tableau 5 Réglementations des teneurs maximales des principales mycotoxines dans l'alimentation humaine dans les pays de l'union européenne

Mycotoxines	Denrée	Teneurs maximales admissibles ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aflatoxine B1	Arachides, Fruits à coques et séchés, et produits dérivés	2
	Arachides soumises à un traitement physique avant consommation ou ingrédients	8
	Fruits à coque et séché soumises à un traitement physique avant consommation ou ingrédients	5
	Céréales et dérivées, consommation directe ou ingrédients	
	Céréales soumises à un traitement physique avant consommation ou ingrédients	2
	Epices (poivre, piment, paprika, noix de muscade, gingembre, safran)	2
	5	
Aflatoxine M1	Lait	0.05

Ochratoxine A	Céréales (dont le riz et sarrasin) et produits dérivés, grains bruts	5
	Vin (rouge, blanc et rosé) et autres boissons à base de vin et ou de mout de raisin	2
	Raisins secs	10
Patuline	Jus de fruits (pommes) et nectar de fruits	50
	Spiritueux, cidres et boissons fermentées	50
	Produits à base de morceaux de pommes (compote et purée)	25
	Jus de pommes et produits à base de morceaux de pommes (purée et compote) pour nourrissons et enfants en bas âge	10

2.3- Patuline : principale mycotoxine des fruits

2.3.1- Aperçu historique

La patuline possède une longue histoire, elle a été découverte dans l'enthousiasme général lors de la recherche de nouvelles molécules fongiques à effet antibiotique. Sa présence a été détectée pour la première fois dans des filtrats de culture d'*Aspergillus clavatus* par Waksman et Horning (1943) et elle a été isolée pour la première fois chez *Penicillium griseofulvum* et *Penicillium expansum* en 1943 par Birkinshaw et al (Snini, 2014). Après sa découverte, la patuline a été identifiée par la suite comme étant un antibiotique ayant un effet antibactérien contre plus de 75 bactéries à Gram+ et à Gram-, ce qui conduit à son introduction en médecine thérapeutique vétérinaire et humaine (Moake *et al.*, 2005). Cependant, en 1959, suite à une épidémie du bétail due à une intoxication alimentaire causée par la patuline, les différentes recherches concernant cette molécule en tant qu'antibiotique potentiel furent abandonnées. De ce fait, la patuline a été reclassée définitivement dans le groupe de composés connu sous le nom de « mycotoxines » (Özdemir *et al.*, 2009).

Suite à sa co-découverte par plusieurs groupes de chercheurs, la patuline a porté plusieurs appellations au fil du temps suivant l'espèce productrice telles que : clavacine, expansine, claviformine, mycocine C et gigante. Cependant, à ce jour seul le nom « patuline » a perduré (Tannous, 2015).

2.3.2- Propriétés physico-chimiques

La patuline est un contaminant chimique hautement toxique. Son nom chimique suivant la nomenclature de l'Union internationale de la chimie pure et appliquée (UICPA) est 4-hydroxy-4H-furo [3,2c] pyran-2(6H) one (Khorrami et Taherkhani, 2011). C'est une lactone insaturée de petite taille (Figure 5), son poids moléculaire est 154,12g/mol et de formule empirique C₇H₆O₄ (Singh, 1967). La patuline forme des cristaux incolores à section losangique ou prismatique et présente un point de fusion de 111°C (Trucksess et Tang, 1999; Ionescu *et al.*, 2010). Son maximum d'absorbance se situe à 275nm (λ max) avec un coefficient d'absorption moléculaire (ϵ) de 16 600. C'est une substance neutre, soluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'éther et le chloroforme, par contre elle est insoluble dans les pentanes-hexanes comme le benzène ou l'éther de pétrole (Ciegler, 1977).

Elle est stable en milieu acide quelque soit la température (même en haute température), mais devient instable et perd son activité en milieu alcalin. La patuline s'est montrée stable vis-à-vis certains traitements chimiques de conservation, cependant, il s'est avéré qu'elle devient instable et progressivement détruite pendant le stockage en présence du dioxyde de soufre, des protéines contenant du soufre tel que le glutathion, la cystéine et thioglycolate ainsi que les acides organiques principalement l'acide ascorbique (Drusch *et al.*, 2007; Tabatabaie *et al.*, 2010).

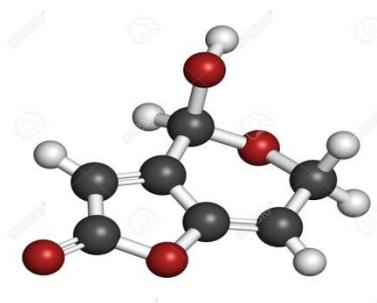
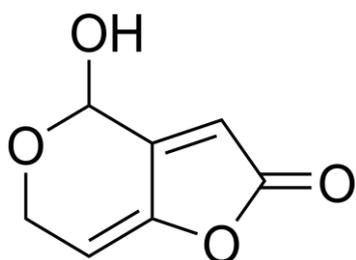


Figure 5 Structure chimique et modèle moléculaire de la patuline (Tannous, 2015).

2.3.3-Espèces fongiques productrices de Patuline

Jusqu'à ce jour, la patuline a été décrite comme métabolite secondaire produit par de diverses espèces. Selon la bibliographie, on compte à plus de 60 espèces fongiques productrices appartenant principalement au genre *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* et *Byssochlamys* (Puel, 2007). Parmi ces derniers, le genre *Penicillium* s'avère le plus dominant concernant la production de patuline, dont l'espèce *P.expansum* est la plus souvent associée à l'occurrence

de cette mycotoxine et par conséquent la plus préoccupante a l'égard de la santé publique et de l'économie (Morales *et al.*, 2008).

D'après une étude concernant l'élaboration des métabolites secondaires des *Penicillium* on compte aujourd'hui 14 espèces productrices de patuline : *Penicillium carneum*, *Penicillium clavigerum*, *Penicillium concentricum*, *Penicillium coprobium*, *Penicillium dipodomycola*, *Penicillium expansum*, *Penicillium glandicola*, *Penicillium gladiocoli*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium marinum*, *Penicillium paneum*, *Penicillium sclerotigenum*, *Penicillium vulpinum* (Frisvad *et al.*, 2004) ainsi que *Penicillium antarcticum* espèce isolée dans les fond marins (Vansteelandt *et al.*, 2012).

Contrairement au genre *Penicillium*, le genre *Aspergillus* semble moins prolifique en termes d'espèces productrices de patuline. On dénombre seulement cinq espèces réputées productrices de la mycotoxine, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus longivesica*, *A. pallidus* et *Aspergillus terreus* (Kent et Heatley, 1946; Varga *et al.*, 2007).

Dans le genre *Byssochlamys*, l'espèce *Byssochlamys nivea* est le seul producteur de patuline. Par contre l'espèce *Byssochlamys fulva*, longtemps considérée comme espèce productrice a été retiré du groupe, suite à la mise en évidence de son incapacité de production après les travaux de Puel *et al.* (2007). Enfin, au sein du genre *Paecilomyces*, il semblerait que seules quelques souches de *Paecilomyces saturatus* et *Paecilomyces niveus* soient capables de produire de la patuline (Bokhari *et al.*, 2009).

2.3.4- Voies de biosynthèse

2.3.4.1- Voie chimique de la biosynthèse de la Patuline

L'élucidation de la voie de biosynthèse de la patuline a débuté dans les années 1950, où elle était le premier polycétide dont la voie de biosynthèse a été étudiée *in vitro* (Puel *et al.*, 2010). Sa biosynthèse a attiré une attention considérable sachant qu'elle inclut comme précurseur le prototype des composés aromatiques issus du métabolisme des polycétides et de l'acide 6-méthylsalicylique (6-MSA) (Bentley et Bennett, 1999).

Dans un premier temps, la mise en évidence de la voie chimique a fait appel à l'utilisation d'acétate radio marqué au ^{14}C et l'étude de son incorporation ont permis de mettre en œuvre six précurseurs : l'acétate, l'acide 6-méthylsalicylique, le *m*-cresol, le *m*-hydroxybenzylalcool et le gentisaldehyde (Bassett et Tanenbaum, 1958; Birch *et al.*, 1958; Bassett et Tanenbaum 1960; Bu'Lock *et al.*, 1965).

Par la suite, plusieurs recherches fondées en même temps sur le marquage isotopique des molécules biologiques et sur la fragmentation d'extraits cellulaires ont permis de mettre le point sur cette voie (Tannous, 2015). Puis, dans un second temps, les études poursuivies faisant appel à l'utilisation de mutants bloqués à différents niveaux de la voie de biosynthèse, ont permis de découvrir une panoplie de métabolites intermédiaires tels que la phyllostine (Sekiguchi et Gaucher, 1978), l'isoepoxydon (Sekiguchi and Gaucher 1979a), l'isopatuline (Sekiguchi et Gaucher, 1979b), et l'ascladiol (Sekiguchi *et al.*, 1983).

La mise en évidence de ces divers composés, a permis d'affirmer que la voie chimique de biosynthèse de la Patuline se composerait de 10 étapes au minimum de réactions d'oxydoréduction et de condensation, dont la majorité est catalysée par des enzymes (Figure 6).

La patuline comme les aflatoxines ou les fumonisines, est un polycétide nécessitant dès la première étape de sa biosynthèse une polycétide synthase (6MAS) permettant la formation de l'acide 6-méthylsalicylique ; le premier intermédiaire stable de cette voie, formé par la condensation d'une unité d'acétyl-CoA avec trois unités de malonyl-CoA.

La seconde étape de la biosynthèse de la patuline consiste à la décarboxylation de l'acide 6-méthylsalicylique en *m*-crésol par l'acide 6-méthylsalicylique décarboxylase. Ensuite, une fois le gentisaldehyde formé, d'autres étapes telles que l'époxydation permettent la formation de l'isoépoxydon, de la phyllostine, de la neopatuline, de l'E-ascladiol et enfin de la patuline (Tannous *et al.*, 2017).

2.3.4.2- Voie moléculaire de la biosynthèse de la Patuline

Généralement, chez les champignons filamenteux, les gènes codant pour des facteurs de transcription, transporteurs et enzymes catalysant la synthèse des métabolites secondaires sont souvent regroupés de manière contiguë sur les chromosomes ; on surnomme cet assemblage de gènes « cluster » (Yu *et al.*, 2004 ; Puel *et al.*, 2010).

Les clusters de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire fongique sont souvent situés dans les régions sub-téломériques des chromosomes ce qui a créé du polymorphisme entre les différentes espèces productrices (Keller et Hohn, 1997). En effet, jusqu'à présent les clusters de gènes biosynthétiques ont été identifiés pour les mycotoxines majeurs ; les 25 gènes apparentés de la voie de biosynthèse des Aflatoxines ont été entièrement caractérisés pour les plus importantes espèces aflatoxinogènes ; *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Yu *et al.*, 2004).

De même, une partie de cluster de gènes synthétisant l'Ochratoxine A a été aussi caractérisée chez *Penicillium nordicum* (Karolewicz et Geisen, 2005), quatre gènes codant pour la biosynthèse des Zéaralenones identifiés chez *Fusarium graminearum* (Lee *et al.*, 2011) et plus récemment, 16 gènes de la voie biosynthétique des Fumonisines ont été décrits chez *Fusarium verticillioide* (Proctor *et al.*, 2013).

Contrairement à ces mycotoxines, la génétique de la patuline n'est pas encore entièrement élucidée. L'étude menée par Artigot *et al.* (2009) a été la première à décrire l'intégralité du cluster de la patuline chez une souche non-productrice de patuline d'*Aspergillus clavatus* NRRL1, ce cluster regroupe 15 gènes (*patA-patO*) occupant une région d'environ 40 Kb.

Par la suite, d'autres travaux élaborés sur le pathogène *Penicillium expansum* (Tannous *et al.*, 2014 ; Ballester *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015) ont caractérisés ces 15 gènes métaboliques co-régulés, dont les positions diffèrent entre les deux espèces productrices de patuline (Figure 6) (Tannous *et al.*, 2017).

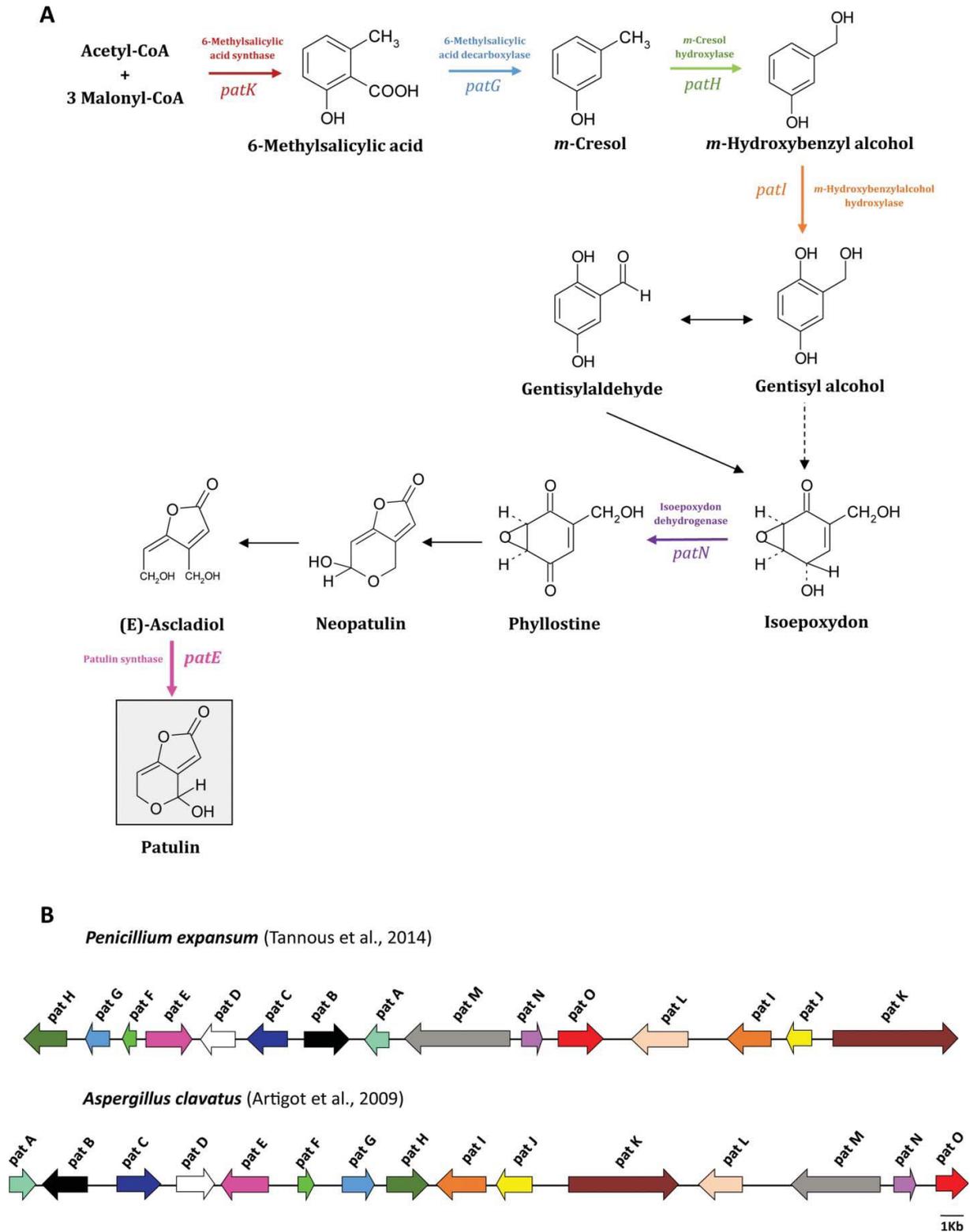


Figure 6 (A) la voie de biosynthèse de la patuline ; (B) Cluster de gènes de la voie de biosynthèse chez *Aspergillus clavatus* et *Penicillium expansum* (Tannous et al., 2017).

Parmi les espèces *Penicillium* séquencées, *Penicillium expansum* possède le plus grand nombre des clusters de gènes du métabolisme secondaire. Son cluster de patuline code pour 15 protéines (*PatA – PatO*), dont un facteur de transcription putatif (*PePatL*), trois transporteurs (*PePatA, PePatC et PePatM*), neufs codent pour des enzymes biosynthétiques et enfin deux ont une fonction inconnue (Ballester *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). Ces protéines se trouvent dans divers emplacements subcellulaires, y compris le cytosol, noyau, vacuole, réticulum endoplasmique, plasma membrane et paroi cellulaire.

Sur le plan moléculaire, la voie de biosynthèse de la patuline implique l'expression de tout les gènes a savoir ; *PePatK, PePatG, PePatH, PePatI et PePatN* codent pour 6-MSAS, 6-méthylsalicylique décarboxylase, m-crésol méthyl hydroxylase, m-hydroxybenzyl alcool hydroxylase et IDH, respectivement, enzymes catalysant les étapes 1 à 4 et 7 (Li *et al.*, 2019).

Par ailleurs, *PatJ* (fonction inconnue) et *PatO* codant pour l'alcool isoamylique oxydase peuvent être impliqués dans l'étape 6, catalysant la conversion de la gentisaldéhyde à la phyllostine. Cependant, l'enzyme impliquée dans l'étape 5 demeure inconnue.

Enfin, peu de données sont disponibles sur les enzymes responsables des trois dernières étapes de biosynthèse et qui supposent que *PePatF* (néopatuline synthase), *PePatD* (alcool déshydrogénase), et *PatE* (glucose-méthanol-choline oxydoréductase) sont responsable des étapes 8 à 10, respectivement (Li *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2020).

2.3.5- Régulation de la biosynthèse de la patuline

Comme il a été décrit précédemment, les mycotoxines sont le produit final d'une cascade enzymatique durant laquelle les enzymes sont activées en même temps et les nouveaux produits intermédiaires synthétisés sont immédiatement métabolisés par les enzymes suivantes (El Hajj Assaf, 2018). Ce phénomène est rendu possible au moyen de l'organisation des gènes sous forme de cluster.

En général, au sein du cluster est présent un gène codant pour un facteur de régulation spécifique a la voie de biosynthèse du métabolite ; c'est les facteurs de transcription spécifiques aux voies et les facteurs globaux de régulation (Tannous, 2015).

Chez *Penicillium expansum*, dans le cluster de la patuline, tous les gènes sont impliqués dans la biosynthèse de la patuline et hautement régulés lorsque les conditions sont favorables à la production de la mycotoxine (Li *et al.*, 2019).

Le gène *PePatL* code pour le facteur de transcription C6, qui régule l'expression des gènes impliqués en se liant spécifiquement à leur promoteur. La délétion presque complète de

PePatL bloque l'expression des autres gènes du cluster de patuline et ainsi sa production (Li *et al.*, 2015; Snini *et al.*, 2016).

De ce fait, *PePatL* est considéré comme étant le facteur spécifique de transcription de la voie de biosynthèse de la patuline (Li *et al.*, 2017; El Hajj Assaf *et al.*, 2018).

De plus, il existe des régulateurs globaux jouant un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes du cluster de patuline affectant sa biosynthèse comme le *LaeA* (Figure 7).

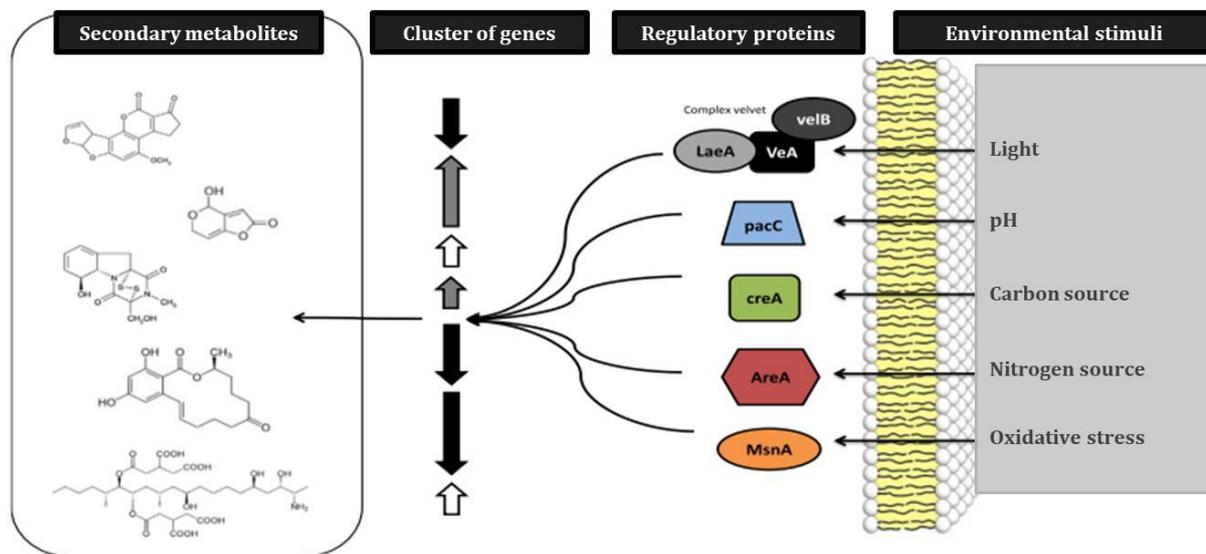


Figure 7 Protéines régulatrices globales impliquées dans la régulation des clusters de gènes impliqués dans la production de divers métabolites secondaires fongiques Brakhage (2013).

2.3.6- Occurrence de la patuline dans les aliments

Les espèces fongiques reconnues producteurs de patuline ont été isolées à partir d'une large gamme de denrées alimentaires. Fruits et légumes, incluant les pommes, les poires, les raisins, les myrtilles, les abricots, les pêches, les tomates, les bananes, les amandes, les noix et les noisettes (Puel *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2013). La filière " fruits " en général et " pomme " en particulier représente le segment de l'industrie agro-alimentaire le plus touché par les espèces toxigènes produisant la patuline.

Réputé comme étant saprophyte de la pomme, *Penicillium expansum* est le champignon générant le plus grand souci. En effet il est le responsable majeur de la pourriture bleue ou pourriture molle des pommes, une grave maladie post-récolte survenant principalement pendant le stockage (Chen *et al.*, 2004; Baert *et al.*, 2007; Menniti *et al.*, 2010).

Les céréales, les malts et d'autres aliments d'origine céréalière ont fait l'objet de multiples recherches. L'étude de Lopez-Diaz et Flannigan (1997) a démontré la production de patuline

par une souche d'*Aspergillus clavatus* durant le maltage de l'orge et du blé. De plus, Rychlik et Schieberle (2001) ont démontré la présence en moyenne de 45µg/kg de patuline dans du pain moisi. De façon plus surprenante, la patuline a été aussi retrouvée dans des fromages de type Cheddar (Bullerman et Olivigni, 1974) contaminés par une souche identifiée comme *Penicillium roqueforti*, productrice à la fois de patuline et d'acide pénicillique. Cependant, diverses études ont démontré que les produits laitiers et plus particulièrement les fromages ne sont pas des substrats favorisant l'élaboration de patuline. Ce phénomène a pu être expliqué par la pauvreté des fromages en sucres et la forte concentration en protéines, favorisant la formation d'adduits avec la patuline. De plus, la patuline a été détectée dans les poivrons doux, dans les petits fruits rouges, dans les tomates et ses produits dérivés comme les concentrés de tomates et le gaspacho (Van de Perre *et al.*, 2013).

De même, de nombreuses études rapportent la présence naturelle de patuline dans différents produits de transformation des fruits tels que les jus ou nectars de pommes, raisins, cerises, poires, ananas et fruits de la passion, les compotes de pommes, de prunes, les confitures de fraises, cassis et myrtilles.

Enfin, pour clôturer la liste des aliments susceptibles de renfermer de la patuline, il faut noter que l'alimentation animale telle que les ensilages et les fourrages n'ont pas échappé à cette contamination. En 1974, Escoula a démontré la double contamination des ensilages de maïs par la patuline et l'acide byssochlamique élaborés par *Byssochlamys nivea*. Bien que la patuline soit présente dans les aliments cités ci-dessus, mais en quantités moins inquiétantes que celle retrouvées dans les pommes et leurs produits dérivés (Tannous, 2015).

2.3.7- Transfert de la patuline dans la chaîne alimentaire humaine et animale

La présence de la patuline en tant que contaminant naturel des fruits, est un indicateur de qualité des produits de transformation des fruits et constitue un problème de sécurité alimentaire mondial (Funes et Reznik, 2009).

De ce fait, la patuline est introduite dans la chaîne alimentaire via les fruits contaminés par cette mycotoxine. Elle est facilement transférée dans les produits dérivés pendant le traitement, en raison de sa solubilité dans l'eau et de sa stabilité à des hautes températures en milieu acide comme dans le jus de fruit (Figure 8) (Anderson de Souza *et al.*, 2008; Zaied *et al.*, 2013).

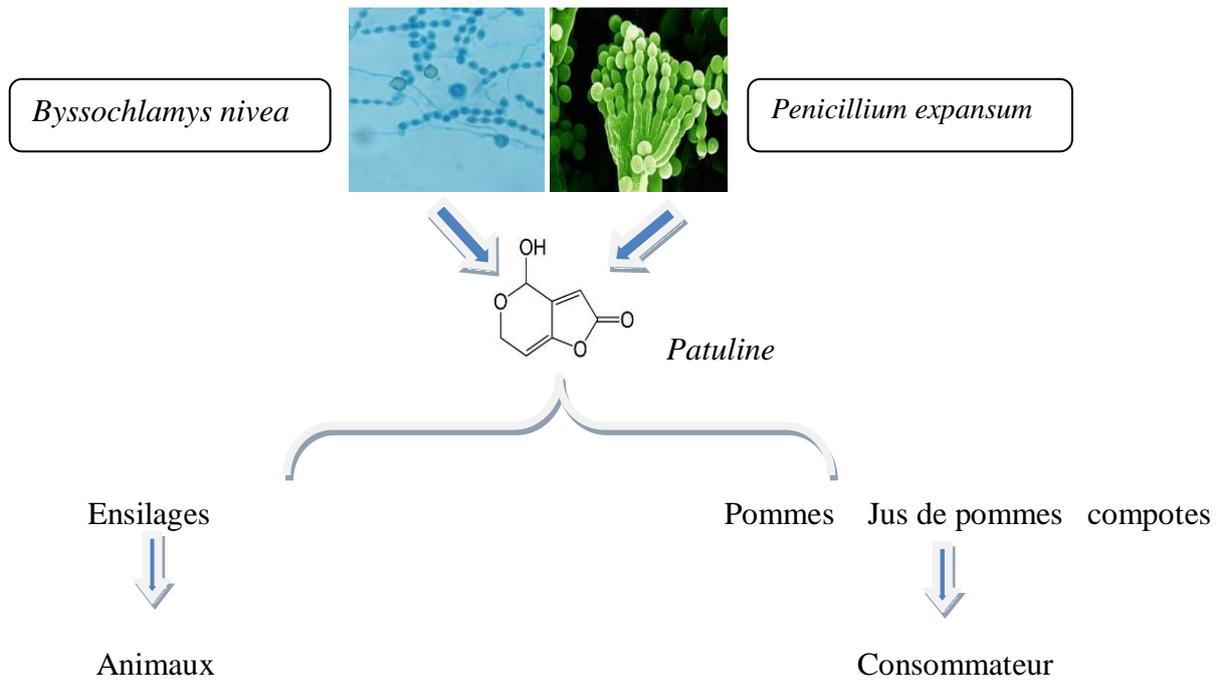


Figure 8 Transfert de la patuline dans la chaîne alimentaire humaine et animale.

2.3.8- Toxicité de la patuline

Comme les autres mycotoxines, la patuline a montré une toxicité aiguë et une toxicité subaiguë très marquées, ainsi qu'une toxicité chronique se manifestant principalement par une génotoxicité, une cytotoxicité, une mutagénicité et une immunotoxicité (Puel *et al.*, 2010).

2.3.8.1- Toxicité aiguë

La toxicité aiguë de la patuline a été investiguée par plusieurs chercheurs, sur différents groupes d'animaux. L'administration par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée de la patuline, s'avère 3 à 6 fois plus toxique. Chez toutes les espèces, les signes toxiques correspondent à une neurotoxicité (agitation, convulsions) associée à une congestion pulmonaire avec ulcération et inflammation intestinales (Pfohl-Leszkowicz, 1999; Puel *et al.*, 2010).

La toxicité subaiguë de la patuline a principalement été étudiée chez le rat, conduisant à une perte pondérale, des désordres gastriques et intestinaux avec une perturbation de la fonction rénale. L'administration de doses répétées conduit à une neurotoxicité se traduisant par des tremblements et des convulsions, ainsi qu'une inhibition de nombreuses enzymes dans l'intestin et le cerveau (Devaraj et Devaraj, 1987).

Certains composés modulent ces propriétés, ainsi les inhibiteurs de cytochrome P450 comme le SKF 525A augmentent fortement la toxicité de la patuline (Hayes *et al.*, 1979). En revanche, la cystéine associée à la patuline parvient à annuler ses effets toxiques et à augmenter de 100 fois la DL50 (Ciegler *et al.*, 1976; Lindroth et Von Wright, 1978).

2.3.8.2- Toxicité chronique

Concernant l'effet toxique à long terme de la patuline, peu d'études ont été menées dans cet axe. Les rares publications disponibles ont mis en évidence l'absence de tumeurs chez des rats exposés à des doses orales trihebdomadaires de 0,1 à 2,5 mg/kg pendant 74 à 104 semaines.

2.3.8.3- Divers effets toxiques

➤ Génotoxicité

En raison de sa forte réactivité vis-à-vis des nucléophiles cellulaires, la patuline a été suspectée être génotoxique. elle réagit rapidement avec les groupes sulfhydriles et d'une manière moins rapide avec les fonctions amines des protéines et du glutathion (Schebb *et al.*, 2009). Les rares travaux réalisés dans ce sens, ont révélé que la patuline est reconnue clastogène car elle induit des micronoyaux et peut provoquer des dommages oxydatifs sur l'ADN (Pfeiffer *et al.*, 1998). Par ailleurs, Alves *et al.* (2000) ont montré l'induction de dommages à l'ADN par la patuline sur des cellules humaines.

➤ Cytotoxicité

La cytotoxicité de la patuline a été étudiée sur des hépatocytes de rat (Barhoumi et Burghardt, 1996). Il a été démontré que la patuline provoquait une génération de radicaux oxygénés, suppression des communications intercellulaires (gap junctions) et une dépolarisation de la membrane cellulaire. Des recherches récentes, ont permis de mettre en évidence la relation de la patuline dans l'augmentation dose-dépendante de la fréquence des cellules apoptotiques et nécrotiques dans les lymphocytes humaines (Donmez-Altuntas *et al.*, 2013).

➤ Embryotoxicité et tératogénèse

Des anomalies des membres, principalement des rotations anormales de la cheville et des pieds écartés, ont été observées chez la majorité des embryons de poulet âgés de 4 jours (Ciegler *et al.*, 1976). De même, Smith *et al.* (1993) ont montré l'effet délétère de patuline sur la croissance embryonnaire et la différenciation *in vitro* chez le rat. Une diminution du poids des foetus sans apparition de malformations ont été observés par Reddy *et al.* (1978) chez des

rats recevant 1,5 mg/kg par voie intrapéritonéale ; la dose de 2 mg/kg provoque l'avortement de tous les embryons.

➤ **Immunotoxicité**

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* conduites sur des cellules du système immunitaire décrivent l'extrême toxicité de la patuline. *In vitro*, la patuline s'est révélée toxique pour les macrophages alvéolaires chez le rat, en induisant une augmentation du volume cellulaire moyen, une diminution de l'ATP cellulaire, ainsi qu'une inhibition de la synthèse des protéines et des ARN (Sorenson *et al.*, 1985). Chez la souris, il a été prouvé que la toxine diminuait significativement la production de radicaux oxygénés (O₂), la fusion phagosome-lysosome et l'activité des lysosomes sur le même type de cellules (Bourdiol *et al.*, 1990).

2.3.8.4- Valeurs toxicologiques de référence

Concernant la cancérogénicité éventuelle de la patuline, elle a été classifiée dans le groupe C (agents inclassables quant à leur cancérogénicité pour l'homme) par le Centre international de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer 1985). En raison de sa toxicité potentielle, une dose journalière maximale tolérable provisoire (DJMTP) de 0,4 µg / kg de poids corporel / jour a été établie par le Comité mixte d'experts sur les additifs alimentaires (JECFA) de l'Organisation mondiale pour l'alimentation et l'agriculture (OMS, 1995).

2.3.9- Réglementation de la patuline

Suite à ses effets toxiques différents, la patuline est la mycotoxine la plus réglementée après les aflatoxines et l'ochratoxine A. Dans le cadre du règlement portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires destinées à l'homme, des teneurs maximales ont été fixées pour la patuline. Les teneurs maximales de patuline autorisées varient en fonction des denrées considérées. Elles ont été fixées à 50 µg/kg dans les jus de fruits, nectars de fruits, spiritueux, cidres et autres boissons produites à base de pommes ou contenant du jus de pommes ; à 25 µg/kg pour les produits solides à base de pommes et à 10 µg/kg pour les jus et autres produits à base de morceaux de pommes destinés aux nourrissons et enfants en bas âge. La teneur maximale de patuline autorisée est en effet plus stricte pour les préparations destinées au nourrisson et à l'enfant en bas âge.

2.4- *Penicillium expansum* : Le champignon et le pathogène commun des pommes

2.4.1- Classification et description morphologique

Penicillium expansum est connu en tant que producteur de la pourriture poste-récolte des pommes et poires, ainsi que le producteur majeur de la patuline dans ces fruits et leurs produits dérivés (Correia, 2011). *Penicillium expansum* est le champignon typique du genre *Penicillium* et est donc aussi l'une des espèces les plus étudiées du genre (Pitt, 1979).

Ce champignon appartient à la division *Ascomycota*, classe des *Eurotiomycetes*, sous-classe des *Eurotiomycetidae*, ordre des *Eurotiales* et famille des *Trichocomaceae*. Sa classification et sa taxonomie sont basées sur plusieurs critères morphologiques, physiologiques et mycotoxicologiques (Cardoso *et al.*, 2007).

Sur le plan morphologique, cette espèce est caractérisée par des conidiophores terverticillés (présentant des phialides sur des métules portées par des rameaux), regroupés généralement en corémies. Au microscope, cette espèce est caractérisée par des stipes droits à paroi lisse, des phialides allongées ampouliformes à cylindriques et des conidies à paroi lisse de couleur vert terne, présentant une forme ellipsoïdale (figure 9) (Frisvad et Samson, 2004; Pitt et Hocking, 2009). *P. expansum* comme la majorité des espèces appartenant au sous-genre *Penicillium* ne présente pas de sclérotes (Frisvad et Samson, 2004).

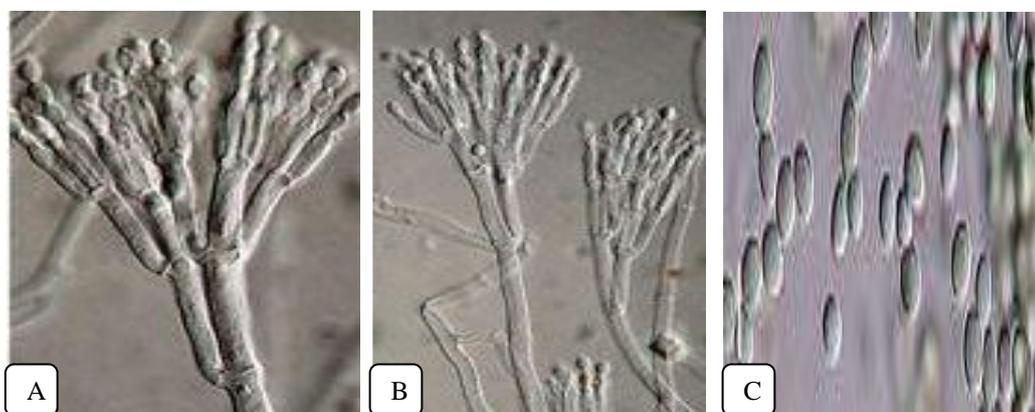


Figure 9 Structures morphologiques de *Penicillium expansum*
(A) Phialides ; (B) Conidiophore ; (C) conidies

De plus, *P. expansum* se distingue par ses aspects macro-morphologiques. Cette espèce est connue pour la tendance de ses conidiophores à fasciculer, c'est à dire se regrouper en formant des touffes sur les marges des colonies. Le mycélium plissé est de couleur blanche et les spores produites sont de couleur vert foncé à gris (Figure 10) (Frisvad et Samson, 2004).

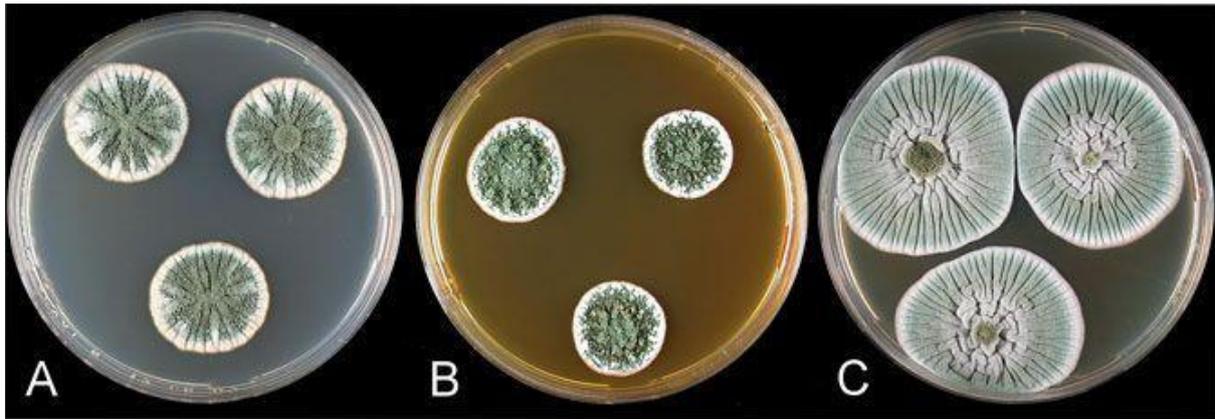


Figure 10 Aspect du thalle de *Penicillium expansum* à 25°C pendant 7 jours
(A) sur milieu CYA ; (B) sur milieu GN25 ; (C) sur milieu MEA

2.4.2-Habitat et niche écologique

Penicillium expansum est une espèce répandue cosmopolite, pouvant se retrouver dans l'environnement naturel, en particulier dans le sol (Colakoğlu, 2002; Demirel *et al.*, 2013) et l'air intérieur (Gutarowska *et al.*, 2012). De plus, ce champignon colonise une gamme très large de denrées alimentaires qu'il est capable d'infecter pour puiser les nutriments dont il a besoin dans la matière organique (Siddique, 2012), tout particulièrement les fruits à pépins (tels que pommes, poires, raisins, etc.) et les fruits à noyaux (cerises, pêches, prunes, etc.). A ces denrées s'ajoutent les noix, les légumineuses (arachides et fèves) et les céréales secondaires (tels que maïs, orge, soja et sorgho) (Nguyen, 2007).

P. expansum est aussi bien apte à proliférer sur des substrats non utilisables pour l'alimentation comme les matériaux de construction contenant de la cellulose (papier-peint, plaques de plâtre (Gutarowska *et al.*, 2012), copeaux et blocs de bois humides (Land et Hult, 1987).

2.4.3-Principaux métabolites secondaires élaborés par *P. expansum*

Dans des cultures pures de *P. expansum*, la citrinine, la roquefortine C (Frisvad et Filtenborg, 1983), l'acide penicillique, l'acide cyclopiazonique, les chaetoglobosines A et C outre la patuline, ont été comptés comme métabolites de *P. expansum*. A ces molécules s'additionnent les expansolides A et B, les communesines A et B (Larsen *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2004), la cytochalasine et la penitrem A (Lugauskas, 2005) qui ont été, aussi révélés comme métabolites secondaires élaborés par *P. expansum*. Mattheis et Roberts. (1992) ont identifié la géosmine comme métabolite volatil de *P. expansum* et ont démontré qu'elle était responsable de l'odeur terreuse et piquante associée à cette espèce. Certains de ces métabolites ont

naturellement été retrouvés dans l'alimentation ; c'est particulièrement le cas de la patuline et la citrinine dont la cooccurrence a été décrite dans les pommes (Martins *et al.*, 2002) et les tomates (Harwig *et al.*, 1979).

2.5- Pomme

2.5.1- Généralités

Avec une superficie cultivée de près de 5 millions d'hectares et une production de 81 millions de tonne, la pomiculture occupe une part importante dans les filières fruitières à travers le monde (El Alami et El Attari, 2019). En Algérie, la culture du pommier (*Malus domestica*) occupe une place très importante et s'étend sur une superficie estimée à 46.000 ha. Sa production a franchi 558830 tonnes durant la saison agricole 2018/2019, la wilaya de Khenchela s'est placée en tête de la filière pomiculture (FAO, 2019).

2.5.2- Structure de la pomme

La pomme (*Malus domestica*) est considérée généralement comme une baie contenant des pépins. A maturité, ce fruit est constitué extérieurement de trois zones:

Le pédoncule et la cuvette pédonculaire, la cuvette oculaire et l'œil et la partie globuleuse qui s'étend entre les deux zones précédentes (Bourles, 2010) (Figure 11).

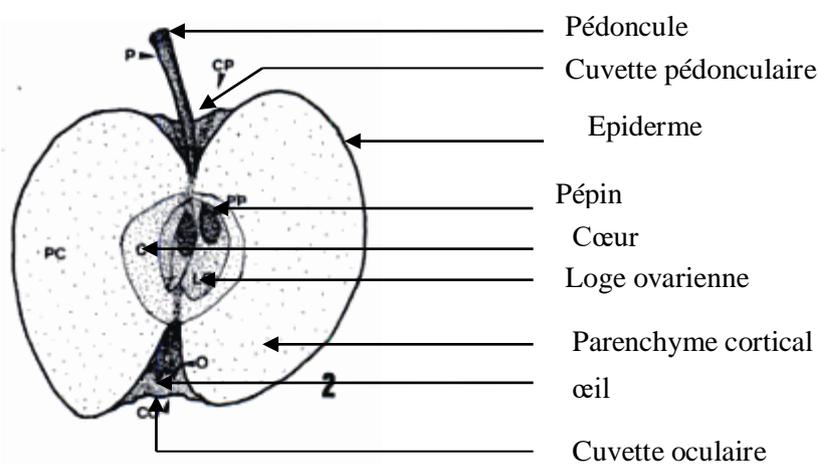


Figure 11 Structure anatomique générale d'une pomme (Bondoux, 1992).

2.5.3- Aptitude de la pomme à être contaminée par *Penicillium expansum*

En raison de sa riche composition en sucres, la pomme est sujette aux attaques de divers pathogènes parmi lesquels; *Penicillium expansum*, principal agent de la pourriture bleue des pommes en post-récolte. L'infection des pommes débute via les blessures qui constituent la porte d'entrée du pathogène, causées par des perforations de la tige ou par des piqures d'insectes survenant pendant la récolte ou après la récolte (Vilanova *et al.*, 2017 ; Gong *et al.*, 2019a). Les conidies de *Penicillium expansum* colonisent rapidement les blessures engendrées sur la surface du fruit, ensuite, elles germent en épuisant les nutriments présents pour terminer la pénétration et la colonisation des tissus. Enfin, une macération visible peut être observée en peu de temps en raison de la production abondante d'enzymes dégradant la paroi cellulaire et du changement de pH de l'hôte (Zhou *et al.*, 2018).

Matériel et Méthodes

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'évaluation de la contamination de quelques fruits produits dans l'Est Algérien par la flore fongique mycotoxinogène, et la caractérisation des isolats sélectionnés ainsi que la mise en évidence de la capacité de ces isolats à produire des mycotoxines *in vitro* et *in vivo*. Cette partie a été réalisée au sein du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne « **LaMyBAM** », Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1.

3.1- Echantillonnage

Les échantillons de fruits utilisés dans ce travail proviennent de la wilaya de BATNA située dans l'Est Algérien. Les fruits d'abricots ainsi que leurs produits de transformation (jus et pulpe) ont été fournis par le complexe E.N.A.J.U.C (Entreprise Nationale des Jus et Conserves) de la région de Ngaous (figure 12) située à l'Ouest de la wilaya de Batna, récoltés pendant la saison de Juin 2012.

Les fruits de pommes utilisés dans cette étude proviennent de la région d'Ariss située au Sud-Est de Batna et appartenant à la variété *Golden Delicious* récoltés en octobre 2013. Les échantillons ont été mis dans des sacs en plastique stériles, puis, emmenés au laboratoire, gardés au frais (+4°C) et analysés dans les 24h qui suivent l'échantillonnage.

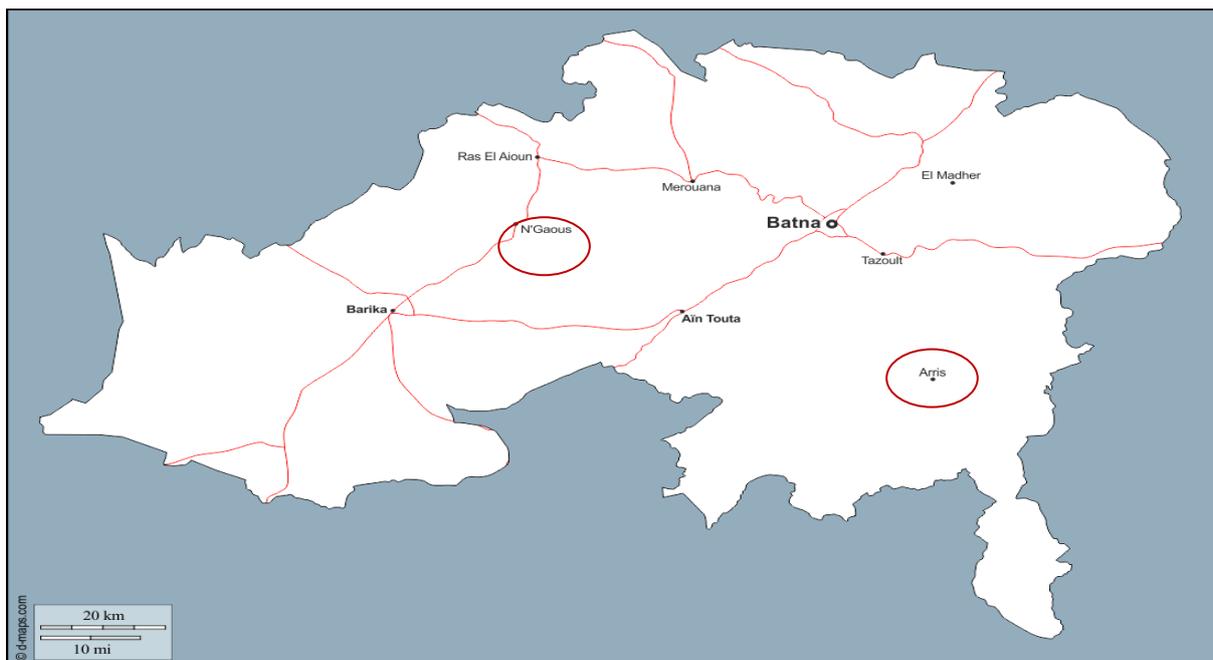


Figure 12 Localisation géographique des sites d'échantillonnage (<https://d-maps.com/m/africa/algeria/batna/batna25.gif>).

3.2- Isolement des mycètes

Cette étape a été réalisée sur milieux gélosés PDA (Potato dextrose Agar) et MEA (Malt Extract Agar) (Annexe 1) supplémentés de Streptomycine (5 mg/L), afin d'inhiber toute croissance bactérienne. L'isolement des mycètes à partir des fruits de pommes et d'abricots a été effectué selon la méthode d'El Hariry *et al.* (2011), qui consiste à prélever des petits morceaux (1cm × 1cm) à partir du bord des lésions infectées à l'aide d'une pince stérile, ensuite, chaque pièce a été désinfectée dans la solution d'hypochlorite de sodium 10% pendant 30 secondes, puis, rincée, à trois reprises, avec de l'eau distillée stérile. Après séchage à l'air libre, les morceaux ont été placés, aseptiquement, dans des boîtes de Pétri à raison de 3 pièces par boîtes, ces dernières ont été incubées à 28°C pendant 5 jours.

En revanche, l'isolement à partir des produits de transformation des fruits d'abricots a été réalisé selon la méthode des suspensions-dilutions. Pour ce faire, 1 mL du jus de fruits a été ajouté à 9 mL d'eau distillée stérile, puis, une série de dilutions décimales a été effectuée jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-4} . Après agitation au vortex, un volume de 0.1 mL de chacune des dilutions indiquées a été déposé sur des boîtes de Pétri contenant les milieux PDA et SAB (Sabouraud) (Annexe 1), puis étalé uniformément avec un étaloir stérile sur l'ensemble de la surface de la gélose, les boîtes ont été, ensuite, incubées à 28°C jusqu'à développement apparent de colonies (Nazim *et al.*, 2008).

Par ailleurs, l'isolement à partir de la pulpe d'abricot (pasteurisée et non pasteurisée) a été effectué selon la technique de *direct plating* ; ou la pulpe et directementensemencée sur la gélose (PDA et SAB) puis les boîtes ont été incubées dans les mêmes conditions précédentes.

3.3- Purification et conservation des isolats

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, cette étape consiste à repiquer une bouture mycélienne (hyphal type) coupée à la marge du thalle ou de spores (single spore), issus des boîtes de l'isolement et les ensemençer par pique centrale sur milieu MEA. L'incubation des boîtes a été effectuée à 28 °C pendant 7 jours. Des repiquages successifs suivis d'observations microscopiques ont été réalisés pour confirmer la pureté de l'isolat (Michael et John, 2006).

Les isolats ainsi obtenus ont été conservés selon deux méthodes : la méthode de gélose inclinée et la méthode de congélation ;

➤ **Conservation sur gélose inclinée**

Les isolats fongiques purifiés ont été repiqués sur milieu PDA incliné. Après incubation à 28°C pendant 6 jours, ils ont été stockés à 4°C et un repiquage est réalisé tout les deux mois.

➤ **Conservation par congélation**

Les isolats fongiques ont été ensemencés sur milieu MEA, puis incubés jusqu'à la sporulation. Une suspension de spores a été préparée par raclage de la surface des cultures puis conservée à -20°C dans de l'eau physiologique additionnée de 20% de glycérol pour une durée de conservation plus longue.

3.4- Sélection des isolats producteurs de mycotoxines

Les isolats fongiques obtenus ont été sélectionnés en fonction de leur activité antibactérienne. Ce test a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose selon la méthode de Bramki *et al.* (2019) avec quelques modifications. Pour ce faire, les souches *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) ont été réactivées dans un bouillon nutritif et incubées à 37 °C pendant 24h.

Une fois la période d'incubation écoulée, un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne a servi à ensemencer uniformément toute la surface de la boîte contenant la gélose nutritive GN (Annexe 1). Après un séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 5mm de colonies des isolats purs et jeunes ont été déposés au centre de la gélose GN. Après un deuxième séchage, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48 h. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés au millimètre près.

3.5- Identification des isolats sélectionnés

Dans le but d'identifier les isolats sélectionnés, plusieurs caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques ont été pris en considération, en utilisant des clés d'identification (Botton *et al.*, 1990; Samson, 2004). Pour une identification approfondie, une étude moléculaire (analyse des séquences d'ADN *ITS* et *β tubuline*) a été effectuée.

3.5.1- Etude des caractères cultureux

Cette étape se repose essentiellement sur l'étude des caractères morphologiques macroscopique. A savoir, la vitesse de croissance, l'aspect des colonies, leur couleur et sa variation au cours du temps, couleur du revers de la boîte, présence ou absence d'exsudats et production de pigment diffusible (Tabuc, 2007).

Les critères cités ci-dessus ont été observés après 7 jours d'incubation à 28° C sur les milieux de culture MEA et CYA. Les milieux ont été ensemencés par suspension de spores ou une petite bouture mycélienne prélevée auparavant à l'aide d'une anse de platine stérile, et déposée au centre de la boîte de Petri contenant le milieu.

3.5.2- Etude des caractères morphologiques microscopiques

L'examen microscopique a été effectué à l'état frais aux objectifs x10 et x40. La technique consistait à la réalisation d'une coloration au bleu coton lactophénol, en déposant une goutte du liquide de montage sur une lame propre, ensuite, un petit fragment mycélien issu d'une colonie jeune (7 jours) a été mis dans le colorant précédent sur la lame avec une anse.

La préparation a été chauffée légèrement à la flamme du bec bunsen, puis la lame a été délicatement recouverte avec une lamelle en évitant de créer des bulles d'air ou des débordements (Botton, 1990). Cette technique permet la mise en œuvre de la nature du filament (siphonné, cloisonné, épais, coloré...) la morphologie des spores et la présence de structures particulières (chlamydo-spores).

3.5.3- Identification moléculaire

L'analyse directe de séquences de l'ADN a permis le développement de méthodes d'identification fiables et spécifiques. Ces méthodes sont, universellement, applicables et permettent d'explorer le polymorphisme aux différents niveaux (genre, espèce, souche). Ces techniques sont rapides et présentent une bonne reproductibilité.

Dans ce contexte, la région ITS (Internal Transcribed Spacer) est préférentiellement utilisée par les taxonomistes pour l'identification des espèces fongiques (Bruns *et al.*, 1991 ; Hibbett *et al.*, 2005). Les amorces *ITS1* et *ITS4* décrites comme amorces universelles par White *et al.* (1990) ont été utilisées pour cette étude ainsi que le gène de la β tubuline.

L'identification des isolats fongiques a été effectuée au niveau du Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives (LMBA), Tunisie, selon un protocole comprenant les étapes suivantes :

3.5.3.1- Extraction d'ADN

Le mycélium de moisissure (culture jeune de 3 à 7 jours) a été prélevé en grattant superficiellement de manière à éviter le risque de prendre de la gélose. Ensuite, 500 μ l de tampon de lyse (400 Mm Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% SDS, 60 Mm EDTA, 2 mL H₂O ultra

pure) (Annexe2) ont été ajoutés au mycélium et le tout est bien homogénéiser manuellement. Après homogénéisation du mélange, ce dernier a été mis en incubation pendant 1h à température ambiante.

Ensuite, le mélange a été additionné de 150 μ L d'acétate de potassium (pH 4.8, solution composée de 11.5 mL acide acétique glacial, 60 mL solution d'acétate de potassium 5 M et 28.5 mL d'eau milliQ) et homogénéisé au vortex puis centrifugé à 12000 rpm pendant 8min. le surnageant a été transféré dans un nouvel eppendorf sur lequel 600 μ L d'isopropanol ont été ajoutés.

Les eppendorfs ont été agités par inversion (environ 10 fois) et conservés à -20°C pendant tout une nuit pour précipiter l'ADN.

Après l'incubation, une centrifugation de 12000 rpm à 4°C a été effectuée pendant 5 min, le surnageant a été éliminé et le culot d'ADN est rincé deux fois avec 300 μ L d'éthanol à 70% puis centrifugé à 12000 rpm à 4°C (répéter 2 fois). L'éthanol a été jeté et le culot contenu dans les tubes a été séché au «speed vac » à 40°C pendant 30 min.

Enfin, l'ADN est repris dans 50 μ L de tampon TE (Tris-EDTA), puis stocké à -20°C (El Khoury, 2007).

Le dosage et le contrôle de la qualité des ADN extraits ont été estimés par rapport aux concentrations d'ADN obtenues à partir des rapports de DO déterminées par Nanodrop (Thermo scientific NanoDrop 2000) à 260 nm, la longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques et à 280 nm, la longueur d'onde d'absorption des protéines. Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN double brin.

La pureté des échantillons est donnée par le rapport des DO ($\text{DO}_{260\text{ nm}}/\text{DO}_{280\text{ nm}}$). Si le rapport est inférieur à 1.6, il y a une contamination par des protéines et s'il est supérieur à 1.9, il y a une contamination par des ARN (Atoui, 2006 ; Smaoui, 2010).

3.5.3.2- Amplification de la région ITS et β -tubuline par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie par action d'une ADN polymérase thermostable (Taq DNA polymérase) isolée à l'origine d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus*. Cette enzyme a un optimum d'activité pour une température se situant entre 70°C et 80°C , et peut supporter des températures allant jusqu'à 96°C (Saiki *et al.*, 1985; Mullis et Faloona, 1987). Pour l'amplification des gènes recherchés, les trois étapes

d'un cycle de PCR se déroulent à des températures précises dans un thermocycleur (Biometra, Germany).

Le thermocycleur est un système programmable qui permet le passage d'une température à l'autre et la répétition du cycle automatiquement. La paire d'amorces universelles ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') (sens), ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (antisens), β -tubuline Bt2a (5' -GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') et Bt2B (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') ont été utilisées pour l'amplification des régions correspondantes.

La réaction d'amplification nécessite, outre la présence de l'ADN utilisé comme matrice et la Taq polymérase, l'utilisation de deux oligonucléotides (amorces) qui s'hybrident avec les séquences situées aux extrémités 5' de la zone à amplifier, et des déoxynucléotides triphosphates (dCTP, dGTP, dATP, dTTP) nécessaires à la synthèse de nouveaux brins d'ADN.

Un cycle d'amplification est composé de trois étapes :

- Dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le compose ;
- Hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée ;
- Extension ou polymérisation à partir des amorces des brins d'ADN.

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible.

➤ **Protocol de la réaction PCR**

La réaction d'amplification a été faite dans un volume final de 24 μ L du mélange réactionnel suivant :

- Tampon de la réaction IX 2.5 μ L
- Tampon Mg 1.5 μ L
- Une solution des différents désoxyribonucléotides triphosphates se composant de :
 - dNTPs (10 mM) 0.5 μ L
 - ITS1 (20 pmoles/ μ l) 0.3 μ L
 - ITS4 (20 pmoles/ μ l) 0.3 μ L
 - Taq polymérase 0.22 μ L
 - H₂O ultra pure 17.8 μ L
 - ADN 1 μ L

Le mélange réactionnel ou mix réactionnel a été réalisé pour le nombre total des isolats, puis réparti à raison de 24 μL /tube, ensuite 1 μL de l'ADN est ajouté en dernier au mélange réactionnel.

Pour l'amplification du gène de *β -tubuline*, la même composition du mélange réactionnel a été adoptée avec l'utilisation de 0.3 μl des amorces Bt2a et Bt2b (50pmole/ μl).

La réaction d'amplification a été programmée comme suit :

Un premier cycle consiste à dénaturer l'ADN: 95°C pendant 5 minutes, puis suit une série de 30 cycles, chaque cycle se déroulant de la manière suivante:

95°C pendant 30 secondes, Dénaturation.

55°C pendant 30 secondes, Hybridation des amorces.

72°C pendant 1 minute, Extension ou polymérisation.

Enfin, un dernier cycle à 72°C pendant 15 minutes pour terminer la polymérisation.

3.5.3.3- Electrophorèse des acides nucléiques

La qualité de la réaction de PCR a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% préparé dans du tampon TBE (80 mM Tris-HCl pH 8 ; 2.5 mM EDTA ; 89 mM acide borique) additionné de 3 μL de Bromure d'éthidium.

Après solidification, le gel a été immergé dans le tampon TBE et le système d'électrophorèse a été mis sous une tension de 120 volts pendant 30 min à 1h. Les bandes amplifiées ont été visualisées par fluorescence du BET sous les rayons ultraviolets (312 nm). Le marqueur de taille: 1Kb ADN Ladder sert de référence pour estimer la taille des fragments d'acides nucléiques (Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2008 ; Smaoui, 2010).

Les produits d'amplification par PCR ne sont pas suffisamment purs pour être utilisés directement dans les réactions enzymatiques telles que le séquençage ou le clonage, et nécessitent une purification préalable. L'excès d'oligonucléotides et de dNTP non-incorporés a été éliminé par le Kit « QLAquick PCR Purification Kit » (QLAGENTM GmbH. Hilden. Germany).

3.5.3.4- Séquençage de l'ADN

Un séquençage enzymatique de fragments d'ADN a été effectué selon la méthode d'incorporation de système de terminateurs di-désoxynucléotidiques (Sanger *et al.*, 1977). Après purification et quantification, une aliquote précise de l'ADN a été utilisée comme un modèle d'une réaction d'amplification enzymatique en présence des di-désoxynucléotides (ddNTP) marqués au Big Dye.

La réaction s'est déroulée dans un volume final de 20 µL, contenant 4 µL du mélange Big-Dye contenant l'AmpliTaq DNA polymérase FS, 4 µL du tampon de réaction 2.5X (5 X : 400 mM TrisHCl [pH9], 10 mM MgCl₂) et 3.2 pmol de l'amorce choisie.

Les produits de marquage par la Big-Dye ont été ensuite précipités avec de l'isopropanol 75 %, séchés et repris dans 18 µL du tampon TSR (template suppression reagent).

Après dénaturation, les fragments d'ADN ont été résolus par séquenceur automatique "ABI Prism TM 310" et le programme "Sequence Analysis" (Perkin Elmer Applied Biosystems). Le programme de la réaction comporte 25 cycles : 10 sec de dénaturation à 95 °C, 0.5 sec d'hybridation à 50 °C, 4 min d'élongation à 60 °C.

3.5.3.5- Analyse bioinformatique des résultats de séquençage

Les séquences obtenues ont été corrigées par le programme « Chromas Pro » et déposées au niveau de la banque de donnée « Genbank ». L'identification de chaque souche de moisissure est déterminée par comparaison des séquences de gènes étudiés avec les séquences précédemment publiées dans Genbank, en utilisant le programme BlastN.

3.5.3.6- Analyse phylogénétique

A partir des séquences obtenues après amplification, une étude phylogénétique a été réalisée et qui consistait à évaluer les divergences entre plusieurs séquences. Les alignements de séquences ont été réalisés par le programme «MUSCLE» et les arbres ont été construits avec le logiciel MEGA7, selon la méthode statistique du Maximum de Vraisemblance (ML). De plus, des corrections de distance ont été apportées par le modèle d'évolution TAMMURA et NEI.

3.6- Production des mycotoxines

Cette étape a pour but de mettre en évidence la mycotoxinogénèse *in vitro* des isolats fongiques sélectionnés.

Afin d'évaluer la capacité des souches sélectionnées à produire de la Patuline, des analyses mycotoxicologiques ont été effectuées après fermentation en milieu liquide.

Pour ce faire, les souches sélectionnées ont été ensemencées sur le milieu MEA puis incubées à 28°C pendant 7 jours. Les suspensions conidiennes correspondantes à chaque souche ont été préparées dans de l'eau distillée contenant du Tween 80 (0.005% V/V) puis ajustées pour obtenir une suspension d'environ 10⁶ spore/ mL (Laarous *et al.*,2007).

3.6.1- Fermentation sur milieu liquide

Le milieu Yeast Extract Sucrose (YES) (Annexe 1) a été choisi comme un milieu spécifique ; riche en vitamines du groupe B complexes, ce milieu favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes conduisant à la production optimale des mycotoxines (Amrouche, 2013). La fermentation a été réalisée dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL du milieu de fermentation. Chaque Erlenmeyer a été inoculé par 1 mL de la suspension sporale de chaque isolat identifié (S3, S4 et S7) puis incubé en statique à 28°C pendant 16 jours et à l'obscurité. Les expérimentations ont été réalisées en double.

3.6.2- Extraction

Une fois la durée d'incubation terminée, un volume de 100 mL d'acétate d'éthyle est ajouté à chaque Erlenmeyer. L'extraction est accélérée par agitation magnétique pendant 30 minutes. Le mélange est filtré à travers un papier filtre Wattman n°1, après une agitation manuelle de 10 minutes, le mélange est transvasé dans une ampoule à décanter et la phase organique (supposée contenir les substances actives) est récupérée après une vingtaine de minutes. L'opération est répétée deux fois pour s'assurer de la récupération de tous les métabolites. La phase organique est récupérée dans un ballon à col rodé pour être ensuite, concentrée à l'aide d'un Rotavapeur à 40°C sous une légère rotation (150 rpm). L'extrait est, enfin, repris dans un volume de 1 à 2 mL de méthanol (Youcef Ali, 2014).

3.6.3- Analyse chromatographique

La séparation des métabolites a été effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM). C'est une méthode physique classique de base, qui permet la séparation des composés constituants d'un échantillon entre deux phases solide et mobile, en fonction de leurs affinités pour l'une ou l'autre phase. Pour ce faire, des plaques de type Merk prêtes à l'emploi et de dimension 20×20 cm, revêtue par gel de silice (G-60) qui constitue la phase stationnaire, ont été utilisées.

Par ailleurs, l'éluant (phase mobile) est composée du mélange toluène, acétate d'éthyle et acide formique (5: 4: 1/ V: V: V). 10 µL de chaque extrait méthanolique, ont été déposés à l'aide d'une micropipette sur la plaque à 1 cm du bord inférieur sur la ligne de base. 5 µL de la solution standard de la patuline, ont été déposés sur la même ligne de dépôt et la plaque a été, ensuite, placée dans une cuve chromatographique contenant la phase mobile. Après migration et évaporation du produit d'éluant, la révélation des tâches est effectuée en exposant la plaque sous lumière UV (Amrouche, 2013).

Après pulvérisation de la plaque avec le révélateur MBTH 5% (3-méthyl-2-benzothiazoline hydrazone hydrochloride) et séchage à 130°C pendant 15 minutes, la patuline est apparue comme un spot jaune sous la lumière visible et donne une fluorescence jaune-orangée sous lumière UV à 366 nm (Welke *et al.*, 2011).

3.6.4- Identification de la Patuline contenue dans l'extrait brute de fermentation par GC-MS

Cette étape a pour objectif de confirmer la capacité des souches sélectionnées à produire la Patuline et sa détection dans les extraits issus de la fermentation. Cette étape a été réalisée au sein de la plateforme Pédagogique Commune des Techniques d'Analyses à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi-Thabet (ISBST, Tunisie).

3.6.4.1- Principe général

La CPG couplée à la SM est une technique sensible et rapide introduite dans l'analyse des peptides toxiques dans les années 1970 (Betina, 1989), et qui est couramment utilisée de nos jours.

La GC est une technique analytique séparative fréquemment utilisée pour la caractérisation et l'identification des composés organiques volatils et semi-volatils. Le principe fondamental de la séparation GC se repose sur le partage des composés entre une phase mobile qui est un gaz vecteur inerte et une phase stationnaire solide ou liquide, qui est immobilisée à l'intérieur de la colonne chromatographique. Le mécanisme de séparation est dynamique; les molécules passent continuellement d'une phase à l'autre, ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier.

La spectrométrie de masse (MS) est une méthode d'analyse destructive donnant accès à des informations utiles des molécules d'un échantillon. Elle permet de déterminer la masse moléculaire d'une substance et/ou d'obtenir des données structurales.

Grace à la MS, l'identification et la quantification des analytes peuvent être obtenues. Cette technique mesure les rapports masse-sur-charge (m/z) de molécules ou de fragments de molécules ionisés à l'état gazeux (Perez Vasquez, 2015).

3.6.4.2- Conditions expérimentales

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé dans notre travail pour l'identification de la patuline est de type Agilent Technologies (USA) 7890B équipé d'un port d'injection Split /Splitless a commande électronique, interfacé avec un détecteur sélectif de masse de piège à ions (Agilent 240). Le spectromètre de masse a été soumis à une ionisation par impact

électronique (EI, 70eV) et la température de la ligne de transfert MS a été maintenue à 280°C en mode balayage complet (Full scan mode). La colonne chromatographique utilisée est de type Agilent HP-5MS (5% Phényle méthyle polysiloxane) de 30 mm de longueur × 0.25 mm de diamètre interne et de 0.25 µm d'épaisseur de film. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit constant de 1 mL /min et l'injection a été faite en mode Splitless à 280°C.

Le programme de température du four appliqué est le suivant :

- 50°C pendant une minute
- Pente à 10 °C/min jusqu'à 200°C et maintenir pendant 1min
- Deuxième pente à 5°C/min jusqu'à 325°C maintenir une minute et le temps total d'analyse est de 43min pour chaque échantillon (Kharandi *et al.*, 2013).

3.7- Test *in vivo* de la pathogénicité des souches fongiques sélectionnées

Le but de cette étape est de mettre en évidence la pathogénicité des souches fongiques sélectionnées sur des pommes (*in vivo*), et leur pouvoir à causer la maladie de la pourriture bleue des pommes.

Pour cela, les souches fongiques sélectionnées ont été cultivées sur milieu gélosé à l'extrait de Malt (MEA) durant 7 jours à 28°C. Les spores ont été récoltées en ajoutant 10 mL d'eau distillée additionnée de Tween 80 (0.005%, v / v), et la concentration finale de la suspension sporale a été ajustée à l'aide d'une cellule de Thoma à raison de 10⁶ conidies/ mL (Reddy *et al.*, 2010).

Les fruits de pommes utilisés appartiennent à la variété *Golden Delicious* et *Fuji* sans défaut et sans blessures, ont été achetés au marché local de la wilaya de Constantine. Ces pommes proviennent de la région d'Aris et ont été récoltées en mois de septembre-octobre 2014.

3.7.1- Inoculation des pommes

La surface des pommes a été désinfectée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 2%, puis rincées à trois reprises avec de l'eau distillée stérile et laissées sécher à l'air libre. Après séchage, les pommes ont été blessées à l'aide d'une aiguille stérile en un seul point central et 30µL des suspensions sporales des trois isolats fongiques (S3, S4 et S7) ont été injectées avec une seringue stérile à une profondeur de 1cm. Les pommes ont été ensuite, incubées dans des boîtes en plastique stériles fermées à 25°C dans l'obscurité pendant 9 jours. Les diamètres des lésions formées ont été mesurés régulièrement le long de la durée d'incubation (Reddy *et al.*, 2010).

3.7.2- Evaluation de la production de la patuline *in vivo*

Cette étape consiste à tester la capacité des souches sélectionnées à produire la patuline *in vivo*. Dans ce but, le test réalisé dans la section (3.7.1) a été effectué sur des pommes *Golden delicious*. Afin de déterminer la quantité de PAT produite au terme de l'incubation, les parties de pommes présentant les lésions causées par les trois isolats (S3, S4 et S7) ont été préparées selon la méthode décrite par l'AOAC (2000) avec de mineures modifications.

Les tissus visiblement nécrosés de chaque fruit ont été retirés de la pomme. Les échantillons ont été pesés, broyés et homogénéisés à l'aide d'un mortier et d'un pilon, puis analysés immédiatement. Pour ce faire, 10g de la pulpe ont été soumis à l'extraction de la PAT avec 10 mL d'acétate d'éthyle, en mélangeant vigoureusement pendant 3min au vortex. L'extraction a été répétée 3 fois, afin d'obtenir le maximum de la mycotoxine recherchée.

Une fois les trois phases organiques combinées, ont été ensuite lavée avec 10 mL de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (1.5%, w/v). Après une agitation de 2 min, le mélange a été introduit dans une ampoule à décanter et encore une fois la phase organique a été récupérée et séchée avec 10 g de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), à travers un entonnoir filtrant. Les extraits issus de l'extraction liquide ont été purifiés par chromatographie sur colonne, préparée dans une burette (200×10 mm). La colonne a été nettoyée, en premier lieu, avec l'éluant afin d'éliminer toute impureté.

Ensuite, un bout de coton a été placé au fond de la colonne comme étant un support qui empêchera le gel de silice de s'y échapper. Une fois le coton a été bien placé, une quantité de 8 g de gel de silice (gel de silice 60 0.063-0.200 mm) (Merk KGaA, Allemagne) a été mélangée avec un peu d'éluant (acétate d'éthyle) et puis, introduite doucement à l'intérieur de la colonne jusqu'à ce que tout le gel sera en bas de colonne et avec un niveau bien horizontal. Les extraits ont été introduits un par un, la patuline a été éluée avec un volume de 10 mL d'acétate d'éthyle et les fractions obtenues ont été recueillies dans des tubes stériles. Après évaporation du solvant, l'extrait a été dissout dans 100µl de chloroforme pour analyse par CCM et dans du méthanol pour analyse par HPLC.

3.7.3- Analyse de la patuline produite *in vivo* par CCM

Après extraction et purification des échantillons prélevés des pommes infectées artificiellement par les souches sélectionnées, les extraits ont été analysés en premier lieu par CCM selon la méthode de Welke *et al.* (2011) comme était décrite dans la section (3.6.3).

3.7.4- Analyse de la patuline produite *in vivo* par UPLC

Cette partie du travail a été réalisée au sein de la plateforme Pédagogique Commune des Techniques d'Analyses à l'institut supérieur de biotechnologie de Sidi-Thabet (ISBST), Tunisie. L'analyse chromatographique utilisée dans le présent travail, est la chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC), réalisée sur un chromatographe de type Dionex ultimate 3000 équipé d'un auto-injecteur, d'un détecteur UV, et également d'une pompe permettant d'obtenir un gradient d'élution. Les différents éléments sont reliés à un micro-ordinateur permettant de piloter automatiquement les différents composants du système chromatographique.

Une colonne analytique de type C18 (Inertsil ODS-4) 5 μm , 4.6 \times 250 mm a été utilisée comme phase stationnaire. La phase mobile est composée d'un mélange de deux solvants : le solvant A (Eau H₂O) et le solvant B (Acétonitrile CH₃CN) tout deux, supplémentés par l'acide trifluoroacétique à un débit de 1 mL /min.

Le gradient d'élution (eau/ acétonitrile) commence à 5% d'acétonitrile pour augmenter de façon linéaire pendant 20 minutes jusqu'à atteindre 95% , appliqué sur une durée de 24 minutes. Le volume d'injection est de 10 μL et la température de la colonne a été réglée à 30°C. La lecture est enregistrée à une longueur d'ondes de 276 nm utilisant un détecteur UV/V (Chen *et al.*, 2017).

La quantification de la patuline a été effectuée par mesure de l'air de pic, au temps de rétention de la patuline et la comparaison avec la courbe d'étalonnage.

Le standard de la patuline a été fourni par NOVAKITS (Nantes, France), les solutions de dilutions de patuline ont été préparées en dissolvant 1mg de patuline dans 1 mL de méthanol et stockées à +4°C.

3.8- Evaluation de la contamination naturelle des pommes destinées à la consommation

Afin de déterminer une éventuelle contamination des pommes produites dans l'Est Algérien par la patuline et sa traçabilité comme biomarqueur d'effet, une étude a été menée sur des pommes destinées à la consommation directe de la population. Dans ce but, des pommes présentant des taches circulaires, de couleur marron avec différents diamètres ont été collectées à partir des marchés publics de la wilaya de Constantine.

3.8.1- Les fruits

Les fruits de pommes utilisés dans cette partie appartiennent à la variété *Golden delicious*. Une quantité de 20 pommes a été utilisée et les parties présentant les lésions marron de diamètre allant de 0.6 à 2 cm, ont été enlevées du fruit à l'aide d'un couteau désinfecté à l'hypochlorite de sodium puis flambé au bec bunsen. La quantité de 100 g de tissus infectés a été pesée et broyée à l'aide d'un blender électrique, pour être analysée par la suite.

3.8.2- Extraction de la patuline à partir des tissus de pommes infectées naturellement

L'extraction de la patuline a été effectuée selon la méthode de l'AOAC (2000) décrite précédemment. Pour ce faire, les 100 g de la pulpe ont été soumises à l'extraction de la PAT avec 100 mL d'acétate d'éthyle, en mélangeant vigoureusement pendant 5 min au vortex. L'extraction a été répétée 3 fois, avec le même volume d'acétate d'éthyle afin d'extraire le maximum de mycotoxine recherchée.

Les phases organiques obtenues ont été combinées ensuite, lavées avec 100 mL de la solution de carbonate de sodium (1.5%, w/v). Après une agitation de 2 min, le mélange a été introduit

dans une ampoule à décanter et encore une fois la phase organique a été récupérée et séchée avec 100 g de sulfate de sodium anhydre, à travers du papier Wattman n°1. Enfin, le mélange a été concentrée à l'aide d'un Rotavapeur à 40°C et l'extrait recueilli a été dissous dans un volume de méthanol et a été conservé à +4°C en obscurité.

3.8.3- Détermination de la patuline contenue dans les pommes infectées naturellement par CCM

Les extraits ont été analysés par CCM, pour ce faire, la même phase mobile utilisée précédemment a été adoptée (Toluène ; acétate d'éthyle ; acide formique) (5 :4 :1/ V: V: V).

Le standard de la PAT et le révélateur MBTH 5% ont été utilisés (Welke *et al*, 2011).

3.9- Etude de la diffusion de la patuline des tissus infectés aux tissus sains dans les pommes

Cette étape a pour objectif de mettre en œuvre la capacité de la mycotoxine de migrer à partir des parties infectées de la pomme aux parties non infectées visuellement. Pour ce faire, la méthode de Wei *et al* (2017) a été employée avec quelques modifications. Pour ce test, nous avons utilisé un seul isolat (S7) des trois sélectionnés ; comme étant le plus pathogène. La souche a été cultivée sur milieu MEA à 28°C jusqu'à apparition de spores et une suspension sporale d'une concentration de 10^6 spores/ mL a été obtenue à partir de cette culture.

Les mêmes étapes de l'inoculation artificielle des pommes effectuées dans la section (3.7.1) ont été réalisées. Après la période d'incubation des fruits, les pommes ont été analysées comme suit :

La lésion visible marron causée par le pathogène et qui constitue la section S0 a été enlevée. Ensuite des sections de 1cm ont été coupées radialement en expansion de la lésion. Chaque fruit a été divisé en 5 sections (S0, S1, S2, S3 et S4) ou à partir du site de lésion (S0) une distance de 1cm sépare chaque section (3 pommes ont été utilisées pour la même souche).

3.9.1- Extraction de la patuline à partir des sections obtenues

L'extraction de la patuline à partir de chaque section a été effectuée selon la méthode de l'AOAC (2000) avec quelques modifications. Pour ce faire, 4 g de chaque section ont été broyés puis 4mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés et le mélange a été bien homogénéisé au vortex pendant 3 min (l'extraction a été réalisée 3 fois).

Les phases organiques ont été combinées et lavées avec 4 mL de la solution de carbonate de sodium (1.5%, v/w) puis, la phase organique a été encore une fois récupérée et séchée avec 4g de sulfate de sodium anhydre. Après évaporation, chaque extrait a été dissous dans 500 µL de méthanol et conservé à + 4°C en obscurité.

3.9.2- Détermination de la patuline dans chaque section par CCM

Les extraits obtenus à partir de l'extraction de la patuline contenue dans chaque section ont été analysés par CCM selon la méthode de Welke *et al.* (2011) comme il a été décrit dans le paragraphe de la section (3.6.3).

Résultats

4-Résultats

Le présent travail porte sur l'isolement et la sélection de souches fongiques mycotoxinogènes contaminant certains fruits produits dans l'Est Algérien, et sur l'évaluation de la capacité des souches sélectionnées à produire des mycotoxines *in vitro* et de tester leur pathogénicité *in vivo*.

Pour rappel, les fruits utilisés dans ce travail sont : les pommes produites dans la région d'Aris située au Sud-est de la wilaya de Batna (localisée à 900 m d'altitude, avec 35 ° 33 ' 0 " Nord, et 6 ° 10 ' 12 " Est), les fruits d'abricots produits dans la région de N'Gaous, située au centre de la wilaya de Batna et les produits de transformation des abricots (pulpe et jus) ont été fournis gentiment par l'entreprise E.N.A.J.U.C en saison de juin 2012.

4.1- Isolement des mycètes

L'isolement effectué sur milieu MEA (Malt Extract Agar) et PDA (Potato Dextrose Agar) a permis de collectionner 23 isolats fongiques répartis comme suit ; 6 isolats obtenus à partir des fruits d'abricots, 17 autres à partir des fruits de pommes, alors que l'isolement à partir des produits de transformation n'a donné aucun isolat fongique. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 6.

Tableau 6 Isolats fongiques obtenus des différents échantillons utilisés

Echantillons	Provenance des échantillons	Nombre d'isolats fongiques obtenus
Abricots	N'Gaous	6
Pommes	Aris	17
Produits de transformation des fruits (jus de pommes et d'abricots) la pulpe d'abricot	N'Gaous	Absence d'isolat fongique
		Total : 23

4.2- Sélection des isolats mycotoxinogènes

Ce test tend à sélectionner, parmi les isolats, les microorganismes producteurs de substances à activité antimicrobienne. Parmi les vingt trois isolats fongiques testés seuls, deux isolats obtenus à partir des fruits de pommes (S3 et S7) possèdent un effet antibactérien contre les

deux bactéries test utilisées en l'occurrence, *Bacillus subtilis* et *E. coli*, en développant une zone d'inhibition mesurée au millimètre près.

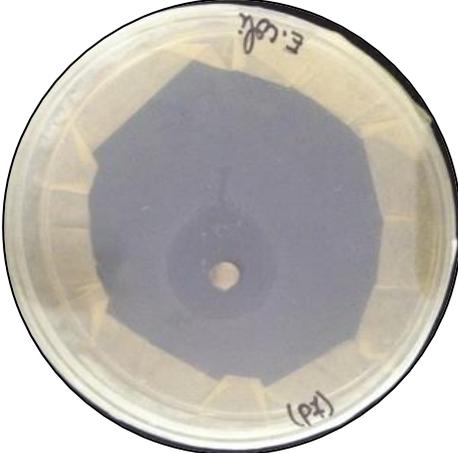
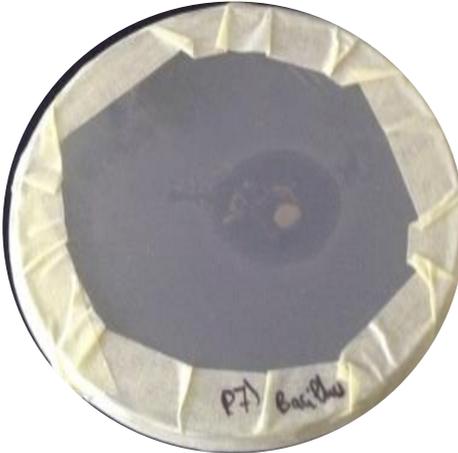
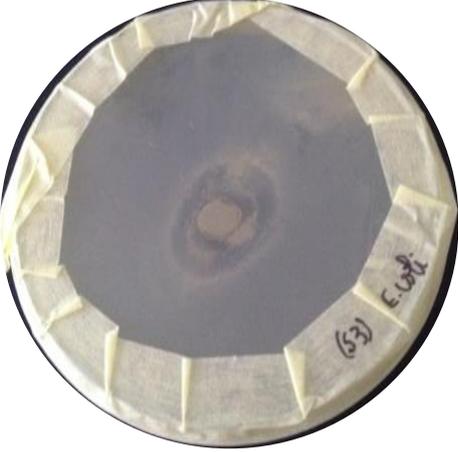
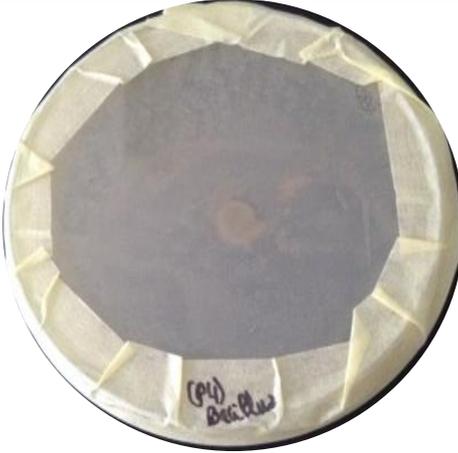
Les résultats illustrés dans le tableau (7) montre que l'isolat S7 a développé la plus importante zone de lyse estimée à 18 mm sur les deux bactéries test, suivi par l'isolat S3 (10 et 11 mm) et enfin l'isolat S4, qui n'a montré aucune zone d'inhibition vis-à-vis les bactéries test.

Tableau 7 Isolats fongiques développant une activité antibactérienne

Code d'isolat	Source d'échantillons	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>E. coli</i>
S7	Fruits de pommes	18	18
S3	Fruits de pommes	10	11
S4	Fruits de pommes	0	0

L'aspect des zones de lyses développées par chaque isolat fongique testé est représenté dans le tableau 8.

Tableau 8 Zones d'inhibition de croissance bactérienne développée par les isolats testés

Isolat fongique	Bactéries test	
	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
S7		
S3		
S4		

4.3- Identification des isolats sélectionnés

4.3.1- Etude des caractères cultureux

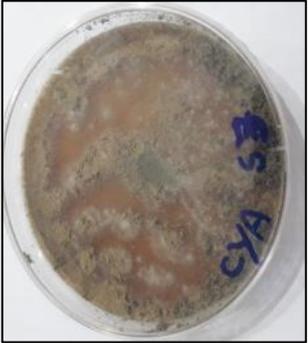
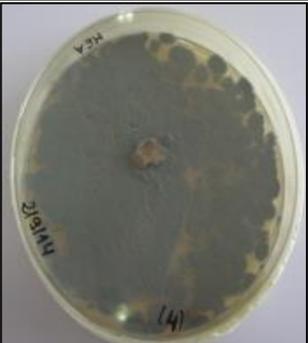
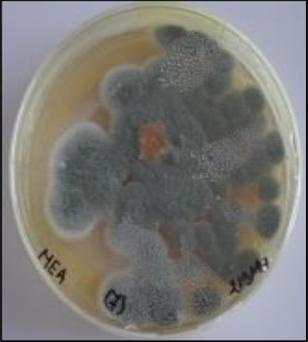
L'aspect macroscopique de chaque isolat sélectionné a été étudié après 7 jours d'incubation sur milieux MEA et CYA. En effet, les résultats montrent que les isolats **S3**, **S4** et **S7** sont des mycètes filamenteux (moisissures). Quelques caractéristiques des colonies fongiques ont été prises en considération, notamment ; la couleur, l'aspect, et le relief des colonies (Tableau 9).

L'étude des caractères macroscopiques des isolats S3, S4 et S7 a permis de révéler les caractéristiques suivantes :

Sur le milieu MEA, la croissance des isolats S3, S4 et S7 est plus au moins rapide et peut atteindre de 20 à 40 mm. Les colonies ont une texture lisse, une couleur vert foncé à grise et un revers pâle coloré parfois par le pigment soluble brun orangé.

Sur le milieu CYA, les colonies atteignent un diamètre allant de 30-40 mm, de couleur vert foncé et blanche en extrémités, plissées radialement avec des aires adjacentes floconneuses à veloutées et ont un revers brun foncé à pâle. Sur ce milieu, les isolats S3, S4 et S7 ont montré une production d'exsudat brun-orangé pâle et d'un pigment soluble de couleur caramel. Ces isolats ont la spécificité de former des touffes sur les marges de leurs colonies, autrement dit, leurs conidiophores ont tendance à fasciculer.

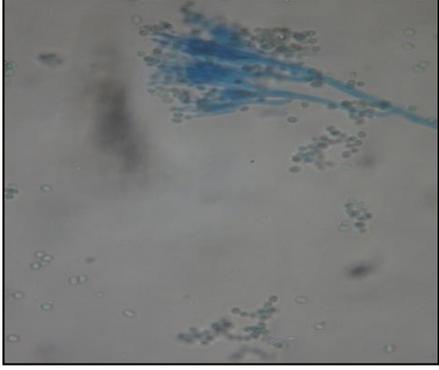
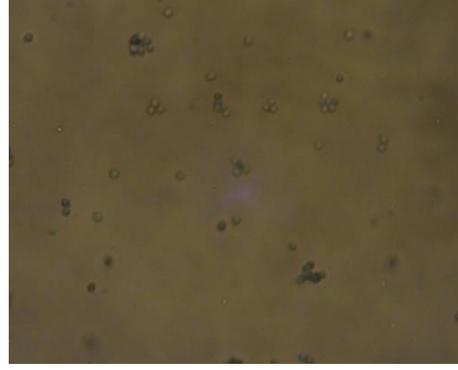
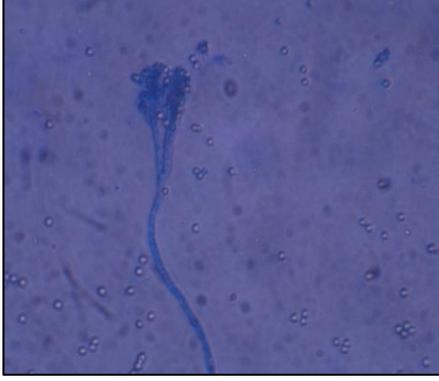
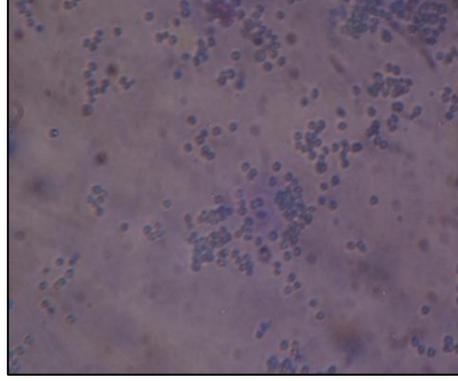
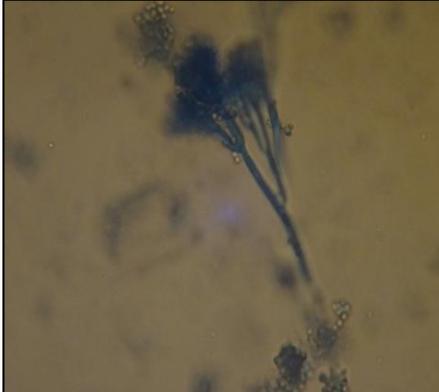
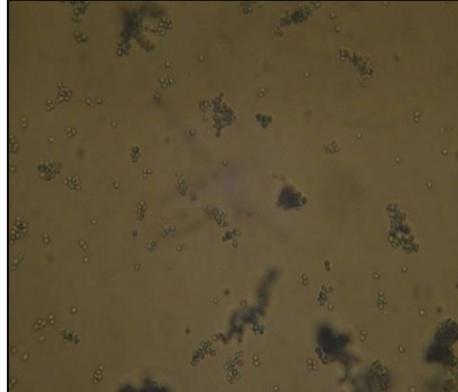
Tableau 9 Aspect macroscopique des isolats sélectionnés

		Milieux			
		MEA		CYA	
		Colonie	Revers	Colonie	Revers
Isolats	S3				
	S4				
	S7				

4.3.2- Etude des caractères morphologiques microscopiques

L'observation microscopique des isolats (S3, S4 et S7), a permis de révéler que ces derniers ont un thalle sépté, hyalin et ramifié. Les conidiophores qui se sont formés sur le mycélium porte des têtes penicillaires terverticillaires. Les stipes ont des parois lisses, des phialides allongées ampouliformes à cylindriques et des conidies à paroi lisse de couleur vert terne, présentant une forme ellipsoïdale. Les résultats de cette étude préliminaire (aspect macroscopique et microscopique) confirment que les isolats appartiennent au genre *Penicillium* (Tableau 10).

Tableau 10 Aspect microscopiques des isolats sélectionnés

Isolats	Tête conidienne	conidies
Isolat S3		
Isolat S4		
Isolat S7		

4.3.3- Etude moléculaire

4.3.3.1- Extraction d'ADN

L'identification des isolats fongiques a été réalisée au sein de laboratoire de Microorganismes et Biomolécules Actives (LMBA). Le bon déroulement de l'extraction d'ADN des isolats fongiques a été vérifié par Nanodrop 2000. Les résultats obtenus ont révélé une bonne concentration de l'ADN, $R = (DO260/DO280) = 2$ pour les trois isolats (S3, S4 et S7), résultat largement satisfaisant ce qui a permis de passer à leur amplification.

4.3.3.2- Amplification de l'ADN (réaction PCR)

Les ADN codants pour les ARN ribosomiaux 18S des trois isolats ont d'abord été amplifiés par la technique de la PCR. Les produits PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Une bonne migration et visualisation des bandes, a été notée pour tous les isolats.

4.3.3.3- Séquençage

Les produits PCR obtenus ont été séquencés et comparés, par la suite, aux séquences, des autres microorganismes, enregistrées au niveau de la base de données Genbank. L'analyse des séquences de la région ITS et du gène β -tubuline des souches fongiques a permis d'affilier les trois souches à l'espèce *Penicillium expansum* (Tableau 11). Le blast des séquences corrigées est illustré dans les figures (13, 14 et 15).

```
TGGTAACCAAACGGTGCTGCTTTCTGGTAAGTGCCGAGCTTTTTTTTCGCGTTGGGTATCAATTGACAATTTACT
AACTGGATTGCAGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGTCTCGATGGTGATGGACAGTAAGTTCAACGGTGAT
GGGTTTCTAGTAGATCACACGTCTGATATCTTGCTAGGTACAATGGTACCTCCGACCTCCAGCTCGAGCGTATG
AACGTCTACTTCAACCATGTGAGTACACCGACTGTTTACCGAATAATCGTGCATCATCTGATCGGATCTTTTTCT
TTGATAATCTAGGCCAGCGGTGACAAGTACGTTCCCGTGCCGTTCTCGTCGATTTGGAGCCCGGTACCATGG
ACGCTGTCCGCTCCGGTCCCTTCGGCAAGCTTTCGCCCCGACAACCTCGTC
```

Figure 13 Séquences du gène de β -tubuline de l'isolat S3 après correction par le programme «Bioedit»

TTGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGAC
 GCGGTGCCCGCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGGGCTT
 GAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTC
 GATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGA
 GATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACGACAATCTTCAGGCAGAGTTCGGGGGTGT
 CTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTGAGCCCCCGGCGGCCAGTTAAGGCGGGCCCCGCGAAGCAACGA
 GGTAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAAAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTCCGCAGGTAGGCA
 CTACACAAGTGAGGG

Figure 14 Séquences du gène *ITS* de l'isolat *S4* après correction par le programme
 « Bioedit »

ATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACG
 CCGTGCCCGCGCTGCCTTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGAATCGGAGGACGGGGCCCAACACACAAGCCG
 GGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGC
 GTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCAT
 CGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACGACAAT
 CTTCAGGCAGAGTTCGGGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGGCGTGAGCCCCCGGCGGGC
 CAGTTAAGGCGGGCCCCGCGCAAGCAACGAAGGTAAAATAAACACGGGGTGGGGAGGTTGGACCCA
 AAGGGGCCCTCCACTCCGGTAATGG

Figure 15 Séquences du gène *ITS* de l'isolat *S7* après correction par le programme
 « Bioedit »

- ✓ **L'isolat S3** : la séquence de la région β -tubuline de la souche S3 présente 99% d'identité avec celle de *Penicillium expansum* (LN896427.1).
- ✓ **L'isolat S4** : l'isolat S4 présente des homologies de 100% avec l'espèce *Penicillium expansum* (gil135522019) et 100% avec *Penicillium expansum* (KX243329.1).
- ✓ **L'isolat S7** : un pourcentage d'identité de 99% a été obtenu entre les séquences de la région ITS de la souche S7 et celle de *Penicillium expansum* (KP903574).

Tableau 11 Affiliation phylogénétique des trois isolats (paires d’amorces universelles)

Souches	Genre	Identité	Espèces proches	Numéro d’accession
S3	<i>Penicillium</i>	99%	<i>Penicillium expansum</i>	LN896427.1
S4	<i>Penicillium</i>	100%	<i>Penicillium expansum</i>	gi1135522019
		100%	<i>Penicillium expansum</i>	KX243329.1
S7	<i>Penicillium</i>	99%	<i>Penicillium expansum</i>	KP903574

Les séquences obtenues des trois souches ont été enregistrées au niveau de Genbank sous les numéros d’accession : MN904448, MT023795, MN904449 respectivement.

4.3.3.4- Analyse phylogénétique

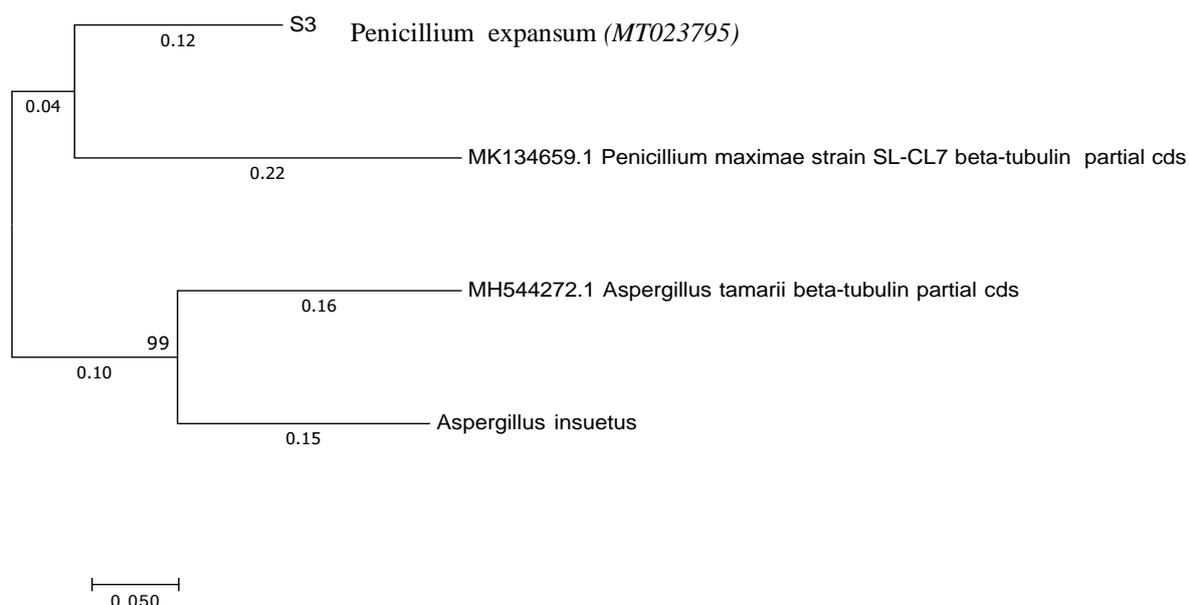


Figure 16 Analyse phylogénétique moléculaire des séquences de bêta-tubuline de la souche *Penicillium expansum* MT023795 (S3) par la méthode du maximum de vraisemblance.

La valeur 0.05 indique l'échelle (nombre ou pourcentage de mutations entre les séquences) de l'arbre

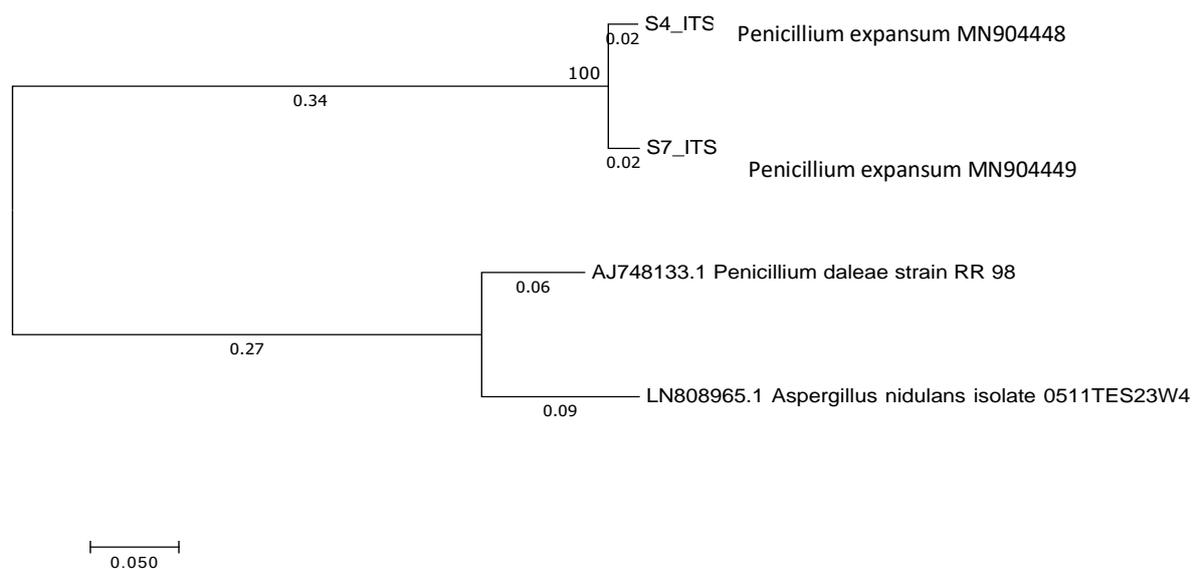


Figure 17 Analyse phylogénétique moléculaire des séquences ITS des souches *Penicillium expansum* MN904448 (S4) et *Penicillium expansum* MN904449 (S7) par la méthode Maximum Likelihood.

Selon la figure 16, les séquences sont conservées à l'intérieur de l'espèce: les séquences des deux *Penicillium* diffèrent de celles des deux *Aspergillus*. Le clad comprenant les deux *Aspergillus* a une valeur Bootstrap égale à 99% ce qui correspond à une très forte robustesse de notre arbre. Outre, il existe une forte similitude des séquences d'*Aspergillus* d'une part et entre celles du *Penicillium* d'autre part, ce qui est synonyme d'homologie entre les séquences de chaque clad. L'arbre 1 (figure 16) n'a pas été construit en utilisant un outgroup car les deux clads sont suffisamment éloignées génétiquement.

Dans l'arbre représenté par la figure 17, nous avons utilisé un outgroup qui est représenté par la souche *Aspergillus nidulans* (LN808965.1). Les souches *Penicillium expansum* MN904448 (S4) et *Penicillium expansum* MN904449 (S7) ont été placées dans la même branche avec une valeur Bootstrap = 100%. Après 1000 Bootstrap, les deux souches se retrouvent toujours sur le même clad.

4.4- Production des mycotoxines

Cette partie a pour objectif de mettre en évidence la capacité des souches sélectionnées à produire les mycotoxines *in vitro*.

4.4.1- Fermentation

Après inoculation de milieu de fermentation (YES), les erlens ont été incubés à 28°C pendant 16 jours pour les souches *Penicillium expansum* MT023795, MN904448 et MN904449 (S3, S4 et S7 respectivement). Une croissance est constatée à la fin de la durée de fermentation, caractérisée par le développement hétérogène (en filaments) du mycélium des trois souches dans le milieu de culture (Figure 18).

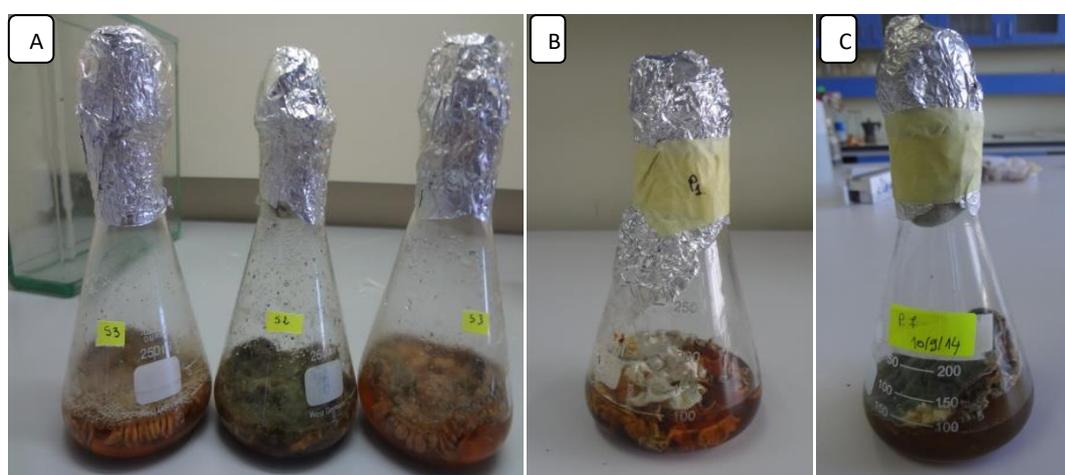


Figure 18 Développement morphologique des souches sur milieu de fermentation : (A) souche S3 ; (B) souche S4 ; (C) souche S7.

4.4.2- Extraction

Après 16 jours d'incubation des trois souches de *Penicillium expansum* (S3, S4 et S7) en milieu YES, les surnageants des trois cultures ont été séparés de la biomasse par filtration sur papier Wattman n°1. Une double extraction par l'acétate d'éthyle a été réalisée sur chacun des trois filtrats obtenus. La séparation des phases est obtenue après décantation.



Figure 19 Extraction des métabolites secondaires par : l'acétate d'éthyle pour les souches, *Penicillium expansum* S3, S4 et S7.

Les phases organiques contenant les métabolites secondaires (mycotoxines), ont été concentrées par évaporation. Les extraits obtenus à partir des cultures des souches de *Penicillium expansum* S3, S4 et S7 sont de couleur jaune.

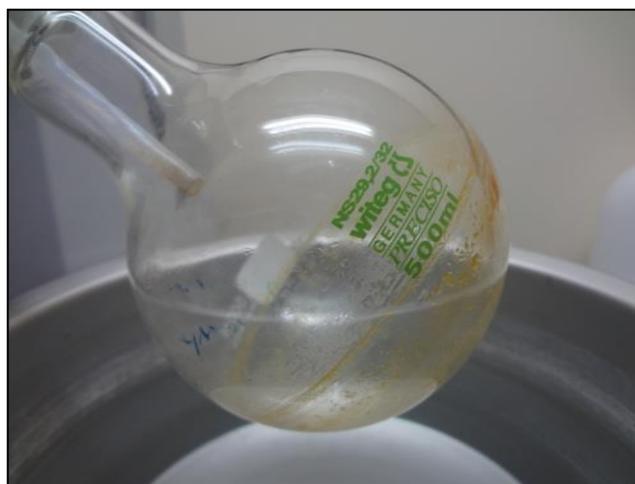


Figure 20 Extraits bruts des souches S3, S4 et S7 après concentration.

4.4.3- Analyse chromatographique

La chromatographie sur couche mince a permis de séparer les différents métabolites secondaires sécrétés par nos souches, contenus dans les extraits bruts (Figure 21).

Après révélation sous lumière UV aux deux longueurs d'ondes (276 et 366nm), 6 spots sont apparus dans les extraits provenant des souches S3 et S7, et 5 spots concernant la souche S4.

Le nombre de spots apparus diffère d'une souche à une autre, cela peut être expliqué par le fait que, le nombre de métabolites secondaires produit est propre à l'espèce en elle-même. La couleur des spots ne se visualise qu'après la pulvérisation des plaques par le révélateur MBTH 0.5% (3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone hydrochloride) suivi de séchage à 130°C pendant 15min. La Patuline apparait au visible comme étant un spot jaune, avec un R_f estimé à 0.4 et donne un spot fluorescent jaune-orangé à 366nm (Figure 21).

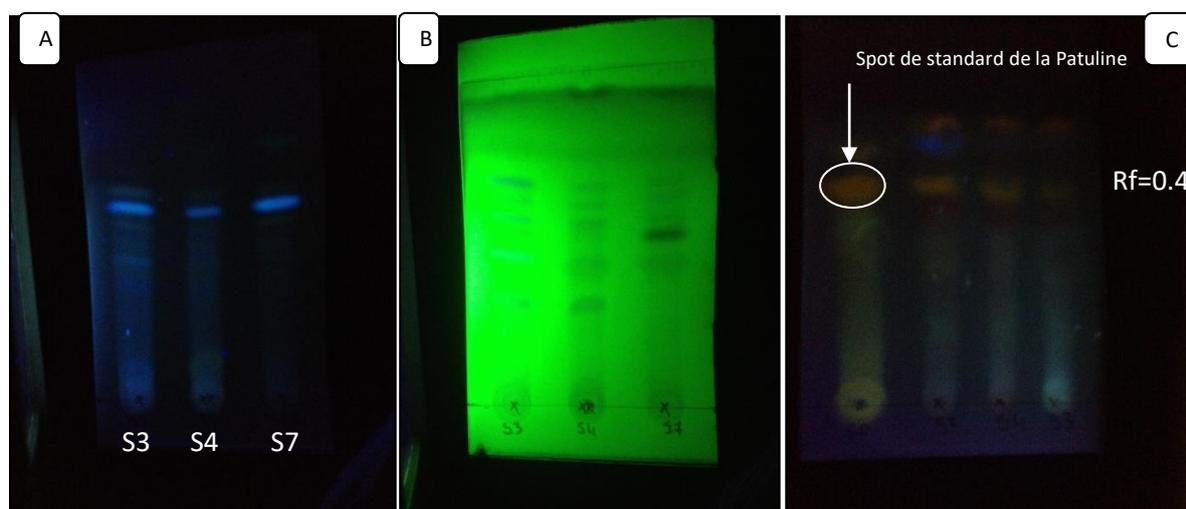


Figure 21 Détection de la PAT dans les extraits bruts des souches S3, S4 et S7 par CCM
(A) Aspect des plaques à 366nm ; (B) aspect à 276nm ; (C) aspect à 366nm après traitement au MBTH 5%.

La CCM a été adoptée comme méthode préliminaire de mise en évidence de la capacité des souches sélectionnées à produire la patuline. Cette technique a permis de séparer les différentes molécules contenues dans les trois filtrats, dont la patuline apparue sous la forme d'un spot jaune orangé qui a migré avec la même distance parcourue par son standard (0.4).

4.4.4- Identification de la patuline par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Cette étape a pour but de confirmer la capacité des 3 souches de *Penicillium* à produire la Patuline et son identification dans l'extrait brut issu de la fermentation. De ce fait, le système GC-MS a été adopté.

La séparation des différents composés présents dans chaque échantillon est traduite par l'obtention de divers chromatogrammes après un temps d'analyse de 43min, les résultats sont présentés dans les figures 22, 23, 24 et 25.

Les chromatogrammes ont révélés la présence de plusieurs molécules différentes dans les extraits bruts de fermentation et ce, en se basant sur leurs temps de rétention. Le composant apparu au temps de rétention de **13.85min** correspond à la molécule de la **Patuline** en comparaison avec le temps de rétention du standard de la patuline utilisée (Figure 22).

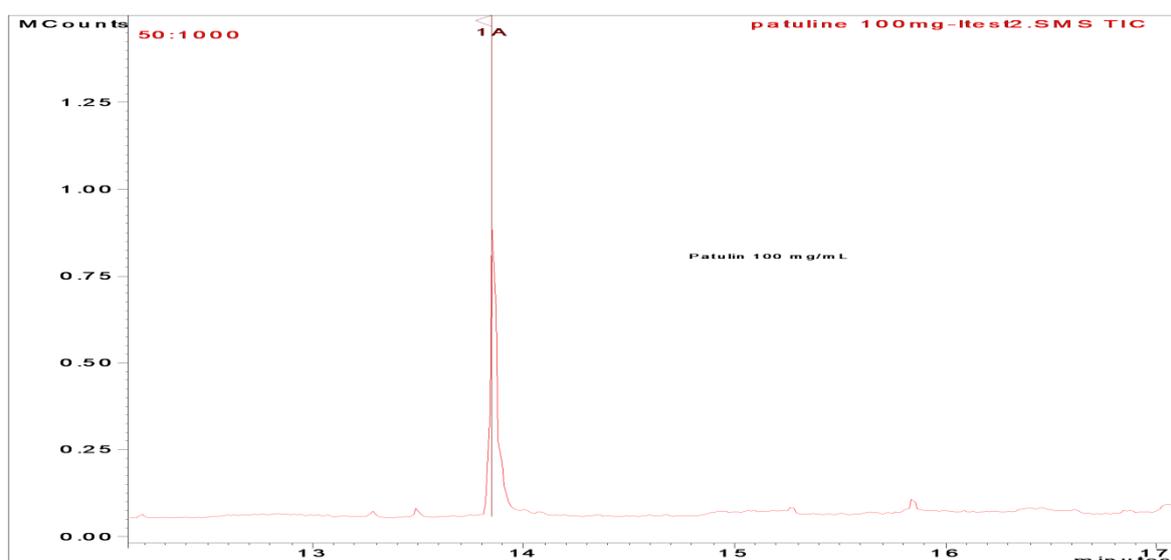


Figure 22 Chromatogramme correspondant au standard de la patuline (100mg/ml).

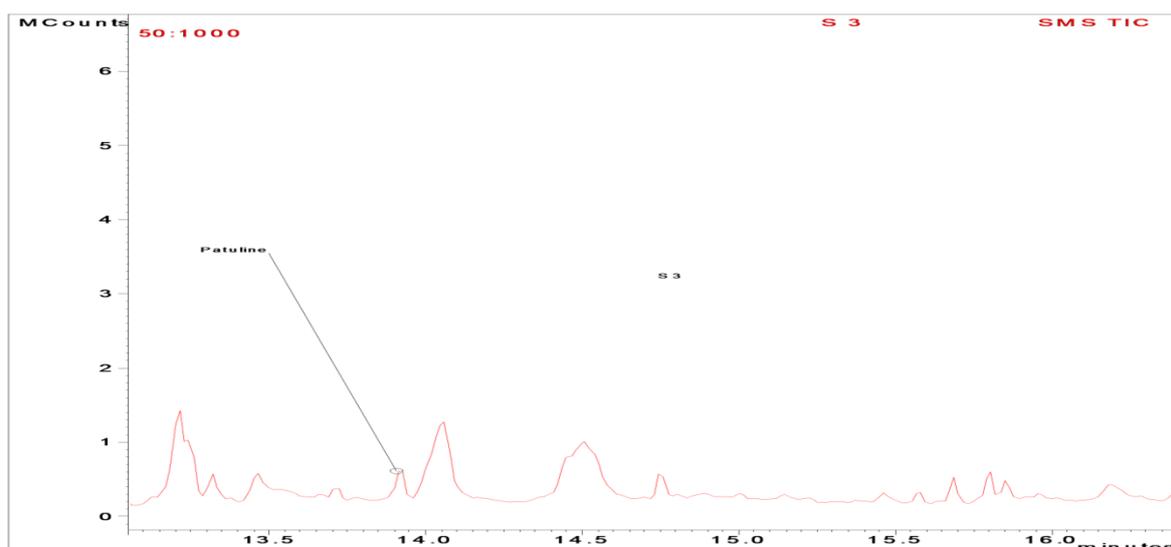


Figure 23 Chromatogrammes démontrant la présence de la patuline dans l'extrait brut de la souche *Penicillium expansum* MT023795 (S3).

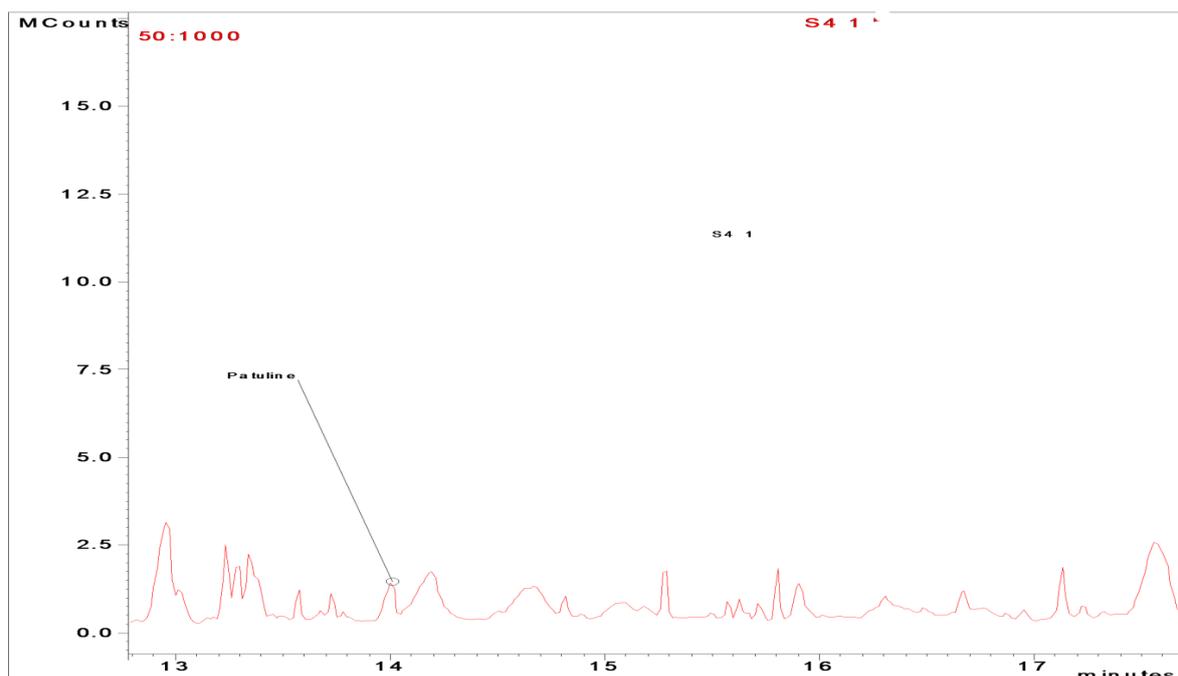


Figure 24 Chromatogramme démontrant la présence de la patuline dans l'extrait brut de la souche *Penicillium expansum* MN904449 (S4)

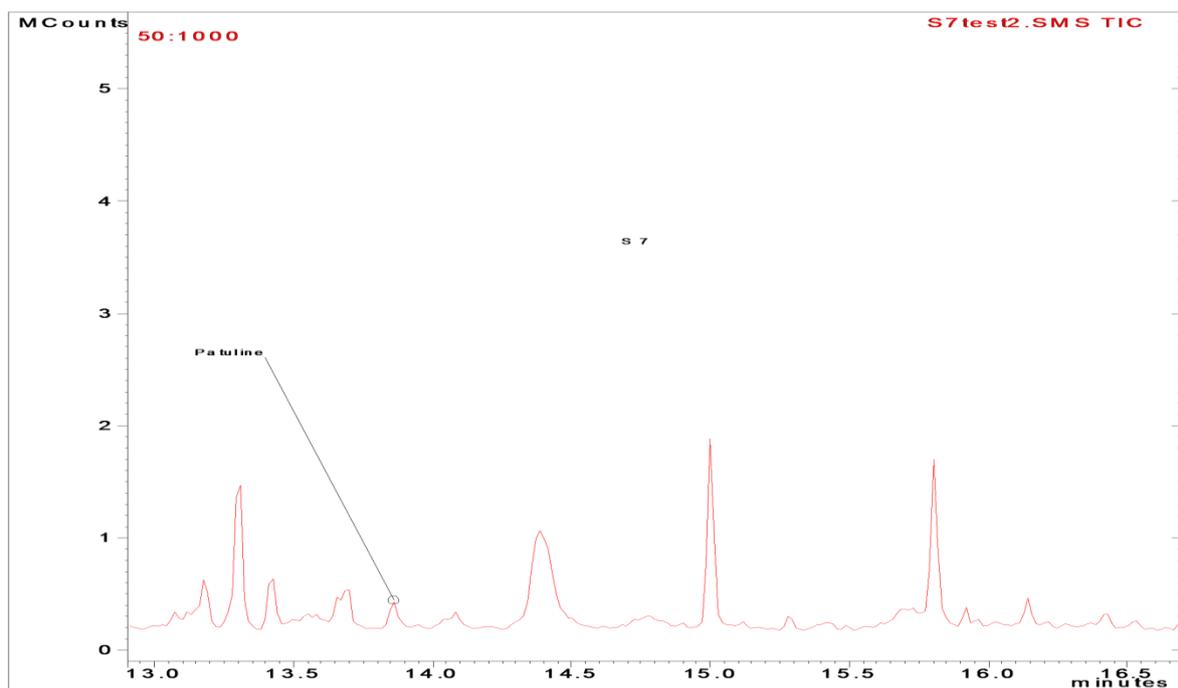


Figure 25 Chromatogramme démontrant la présence de la patuline dans l'extrait brut de la souche *Penicillium expansum* MN904448 (S7).

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis l'obtention d'informations structurales sur la molécule de patuline. En effet, après séparation, les molécules sont ionisées par impact électronique EI ensuite, elles passent vers l'analyseur de masse enregistre l'intensité du signal associé à cette espèce (de rapport m/z) en fonction du temps. On obtient alors un spectre de masse caractérisé par m/z dans l'axe des X et l'intensité dans l'axe des Y. Les résultats d'analyses GC-MS ont confirmé la capacité des trois souches de *Penicillium expansum* à produire la patuline en milieu de culture liquide YES. L'ionisation par EI du standard de la patuline a permis de générer 10 ions moléculaires majoritaires de rapport m/z 110, 55, 53, 126, 27, 154, 82, 54, 43 et 29 (figure 26).

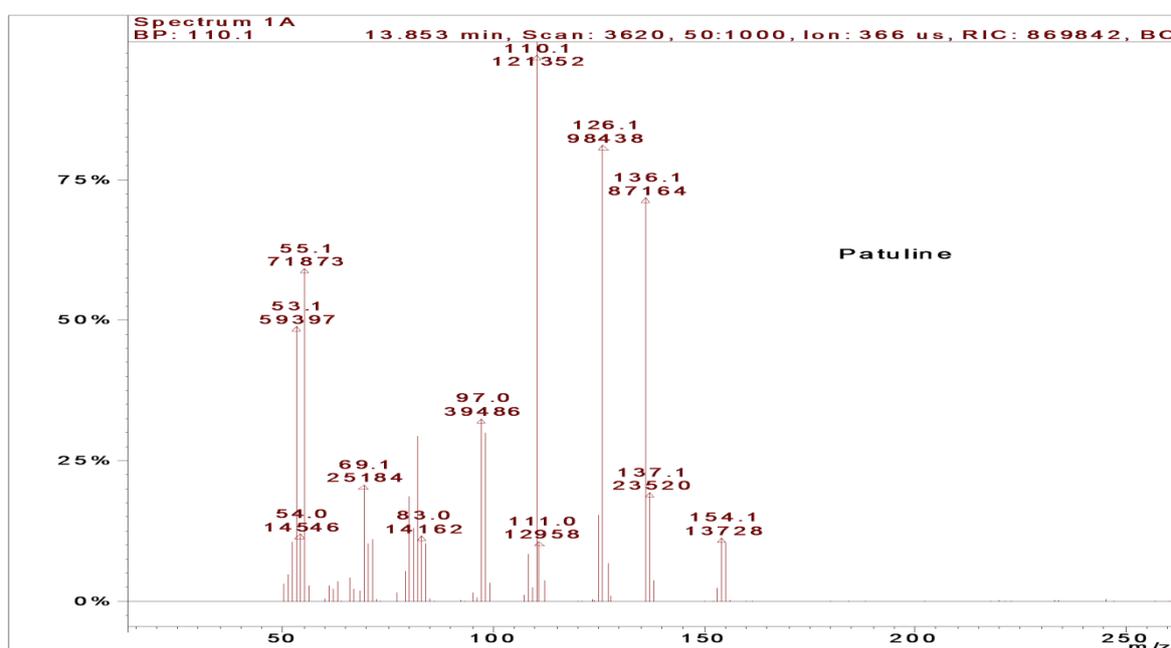
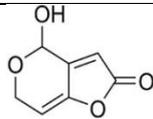


Figure 26 Spectre de masse obtenu par GC-MS pour le standard de la patuline

Le spectre de masse obtenu correspond à une composition élémentaire $C_7H_6O_4$ et les différentes caractéristiques de la molécule de cette patuline sont récapitulées dans le tableau 12.

Tableau 12 Différentes caractéristiques de la molécule de Patuline

Composé	RT(min)	Formule	Poids moléculaire	Masse exact	structure Chimique	Les ions Fragments
Patuline	13.856	C ₇ H ₆ O ₄	154	154.026608		27,29,43,53,54 55,82,110,126, 154

De plus, l'analyse des spectres de masse de la PAT contenue dans les extraits bruts de chaque souche de *Penicillium expansum*, a permis l'obtention de multiples ions fragments qui sont a peu près similaires à ceux obtenus après fragmentation du standard de la patuline (Figure 27,28, et 30). Les ions moléculaires majoritaires générés pour le standard, sont les mêmes apparus dans les spectres de masse des extraits de nos trois souches.

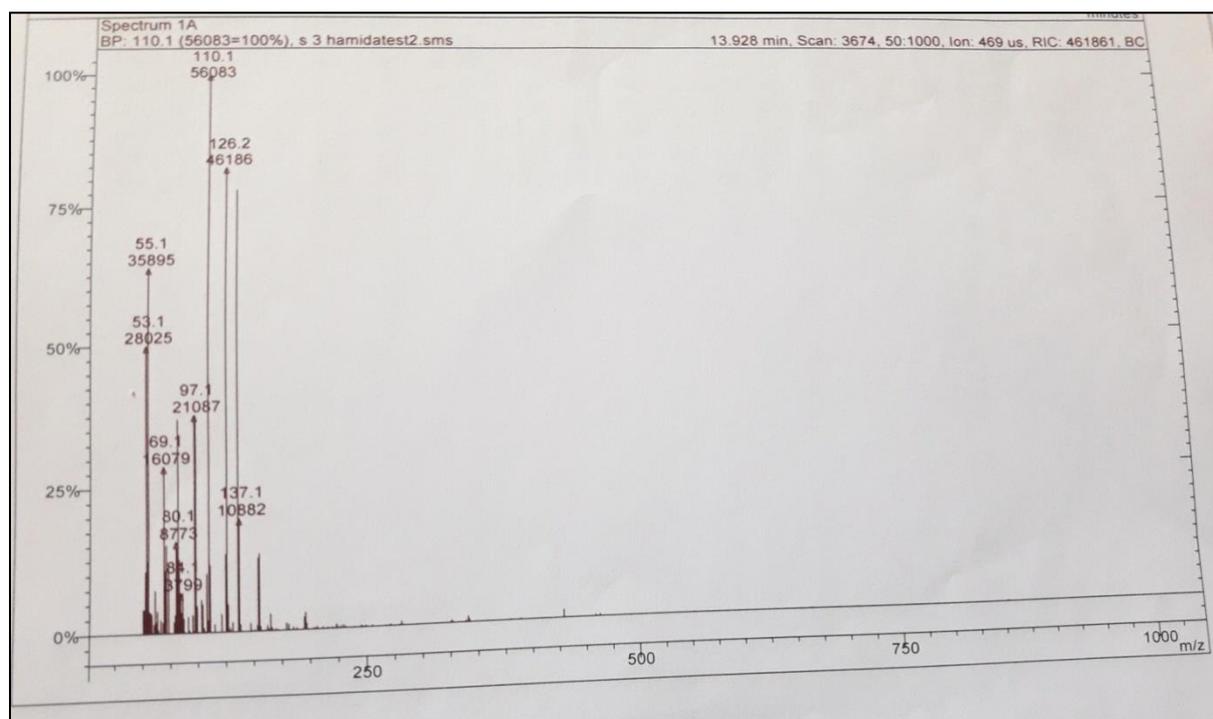


Figure 27 Spectre de masse de la molécule de patuline sécrétée par la souche *Penicillium expansum* MT023795 (S3)

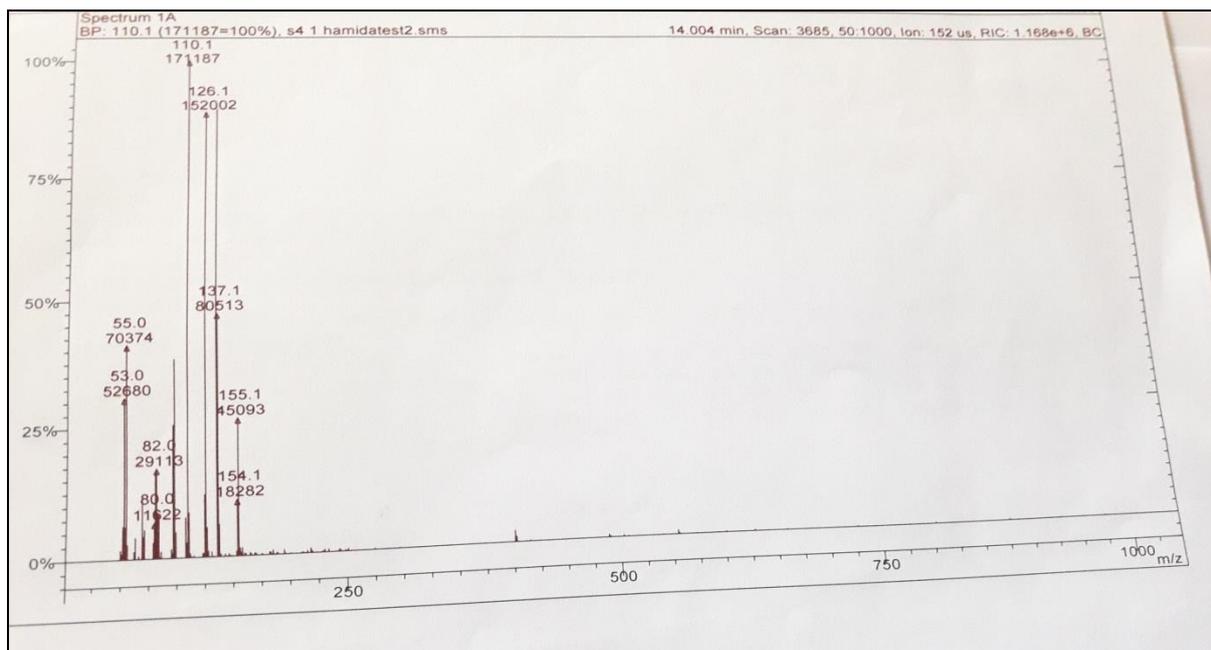


Figure 28 Spectre de masse de la molécule de patuline secrétée par la souche *Penicillium expansum* MN904449 (S4)

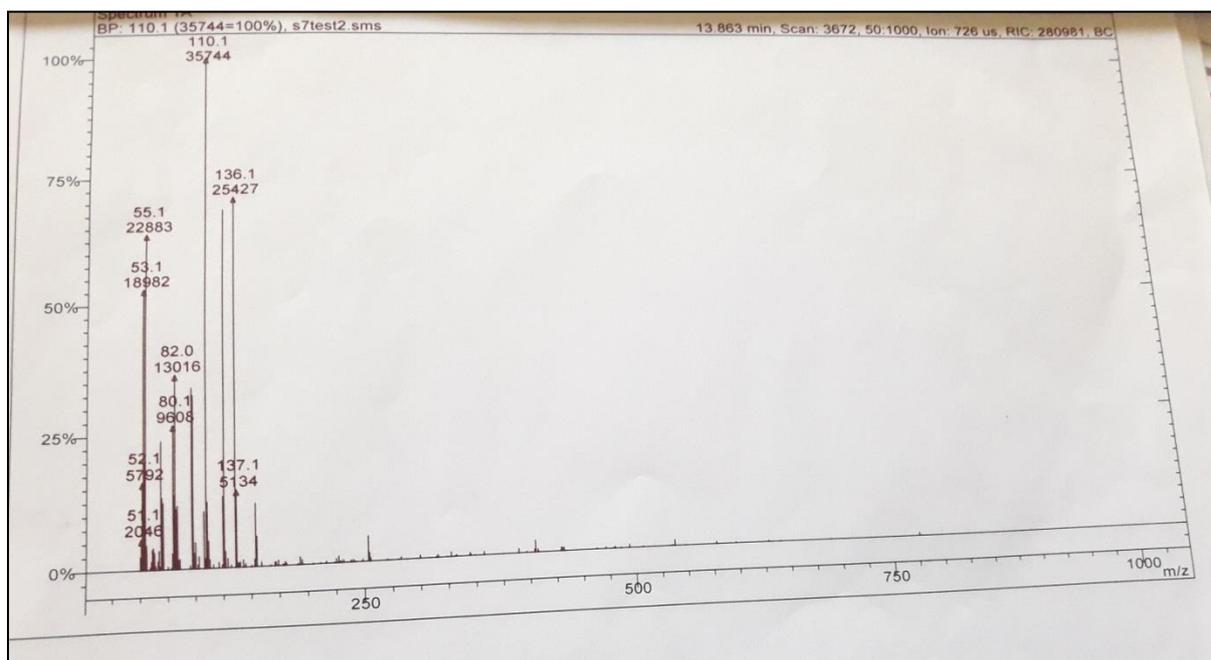
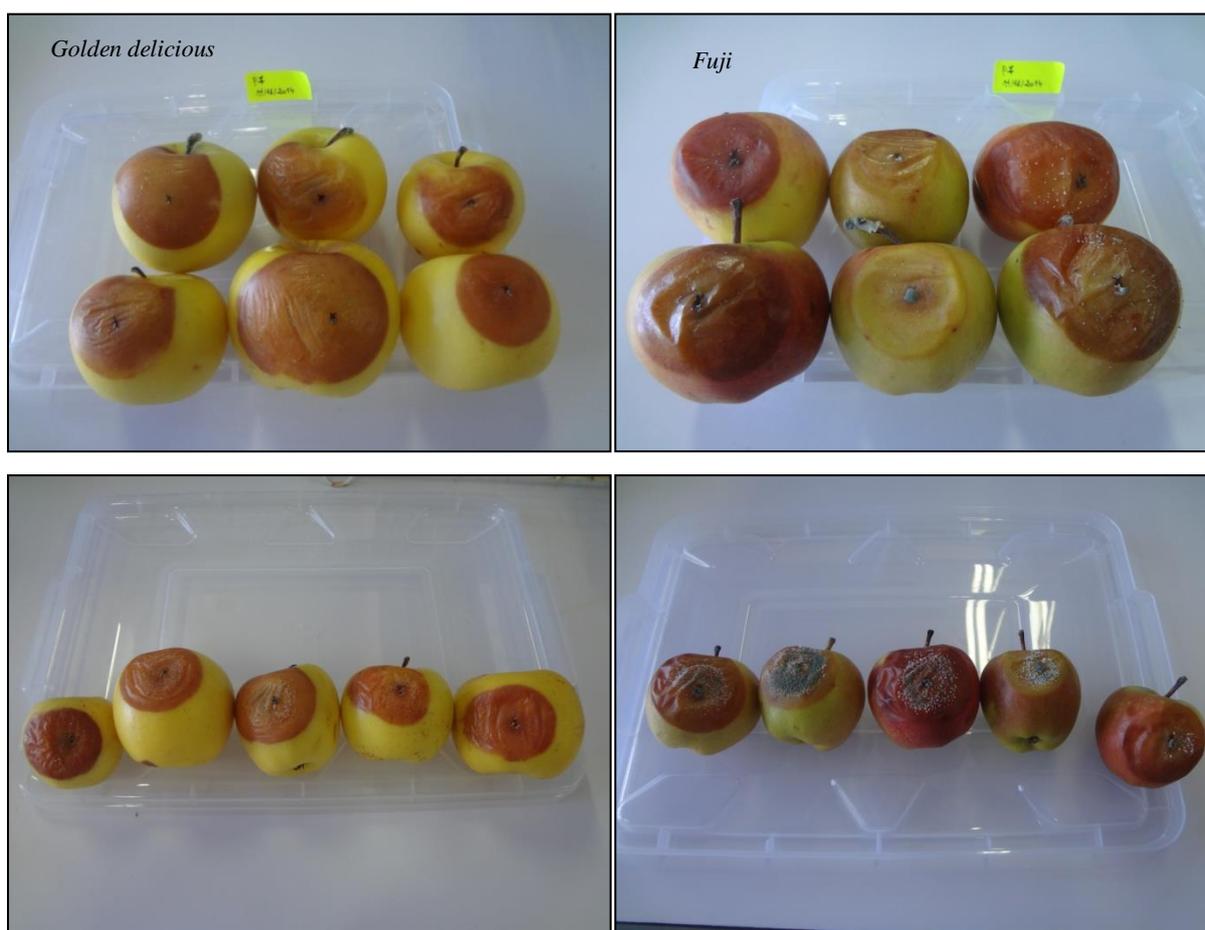


Figure 29 Spectre de masse de la molécule de patuline secrétée par la souche *Penicillium expansum* MN904448 (S7)

4.5 – Test *in vivo* de la pathogénicité des souches sélectionnées

Cette étape a pour but de tester la capacité des souches sélectionnées à provoquer l'infection de la pourriture bleue sur des pommes saines de la variété *Golden delicious* et *Fuji*.

L'inoculation des pommes avec les suspensions sporales (10^6 conidies/ml) des souches ; *Penicillium expansum* MN904449 (S4), *P. expansum* MT023795 (S3) et *P. expansum* (S7) a provoqué l'apparition de lésions brunes après 9 jours d'incubation à 25°C. En effet, les trois souches testées ont pu provoquer des symptômes typiques à celles de **la pourriture bleue en post-récolte**. Ces symptômes se manifestent par des lésions molles, aqueuses, de couleur brune à marron et se développant en forme circulaire pour les deux variétés de pommes. Lorsque les lésions atteignent un certain diamètre, une formation de spores bleu-verte près du site d'inoculation a été observée (figure 30) et les fruits, à la fin d'incubation, dégageaient une odeur moisie-terreuse.



A

B



C

Figure 30 Aspect des lésions induites par les trois souches de *Penicillium expansum* sur des pommes de la variété *Golden delicious* et *Fuji* : (A) la souche S7 ; (B) la souche S4 ; (C) la souche S3

4.5.1-- Evaluation de la production de patuline *in vivo*

Cette étape a pour but de quantifier la patuline produite *in vivo* dans les fruits de pommes par les trois souches pathogènes. Dans ce contexte, le même test réalisé dans la section précédente a été reproduit sur, seulement, des pommes de la variété *Golden delicious*. Après la durée d'incubation, l'inoculation des pommes par la suspension sporale des trois souches a induit **les mêmes symptômes** décrits dans le précédent test *in vivo*, typique aux symptômes décrits pour l'infection de la pourriture bleus des pommes en post-récolte (Figures 31, 32 et 33).



Figure 31 lésions causées par inoculation de la souche *P. expansum* MN904449 (S4) après 9 jours d'incubation à 25°C



Figure 32 Lésions causées par inoculation de la souche *P.expansum* MT023795 (S3) après 9 jours d'incubation à 25°C



Figure 33 lésions causées par inoculation de la souche *P. expansum* MN904448 (S7) après 9 jours d'incubation à 25°C

D'une autre part, le suivi du développement des lésions formées sur les pommes inoculées par les trois souches pathogènes a été vérifié chaque 3 jour depuis le jour de l'inoculation jusqu'à la fin d'incubation. L'infection augmentait progressivement jusqu'à atteindre un diamètre de **48mm** pour la souche **S4**, **50mm** pour la souche **S3** et **52mm** pour la souche **S7**. La souche **S4** induisait les lésions de diamètre moins remarquable par rapport aux 2 autres souches. Le développement radial de ces lésions s'est avéré linéaire entre le 3^{em} et le 9^{em} jour (Figure 34) et augmente de façon graduelle en fonction du temps, et le même profil a été observé pour toutes les souches. Après la période d'incubation, la taille des lésions était supérieure à la moitié de la pomme.

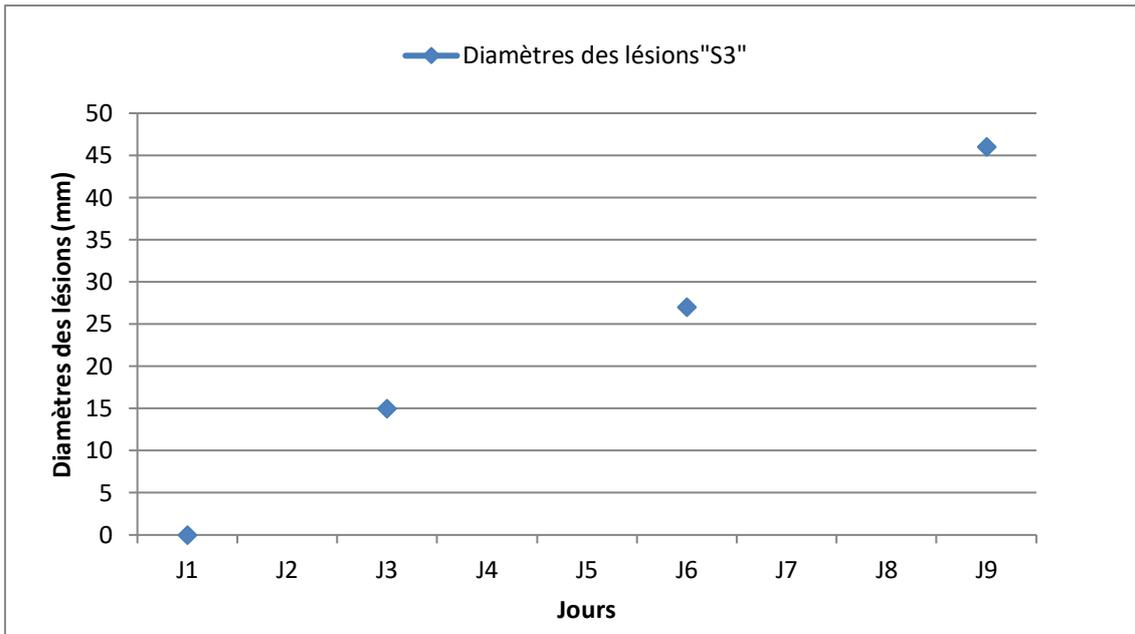


Figure 34 Cinétique de développement des lésions causées par *Penicillium expansum* MT023795 (S3) sur des fruits de pommes

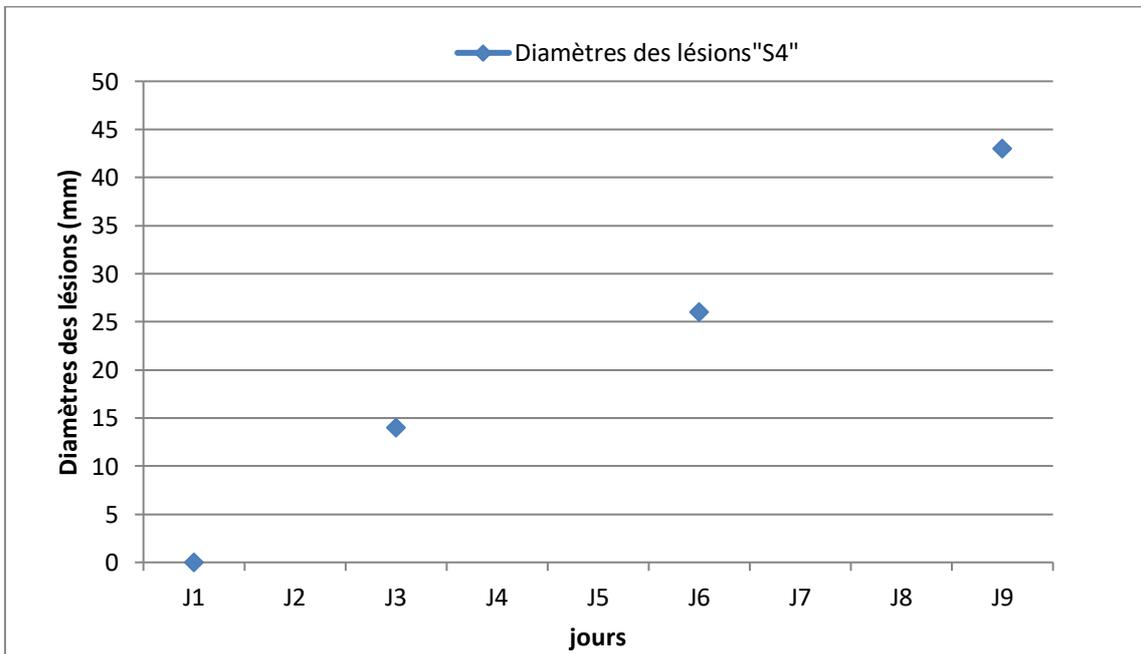


Figure 35 Cinétique de développement des lésions causées par *Penicillium expansum* MN904449 (S4) sur des fruits de pommes

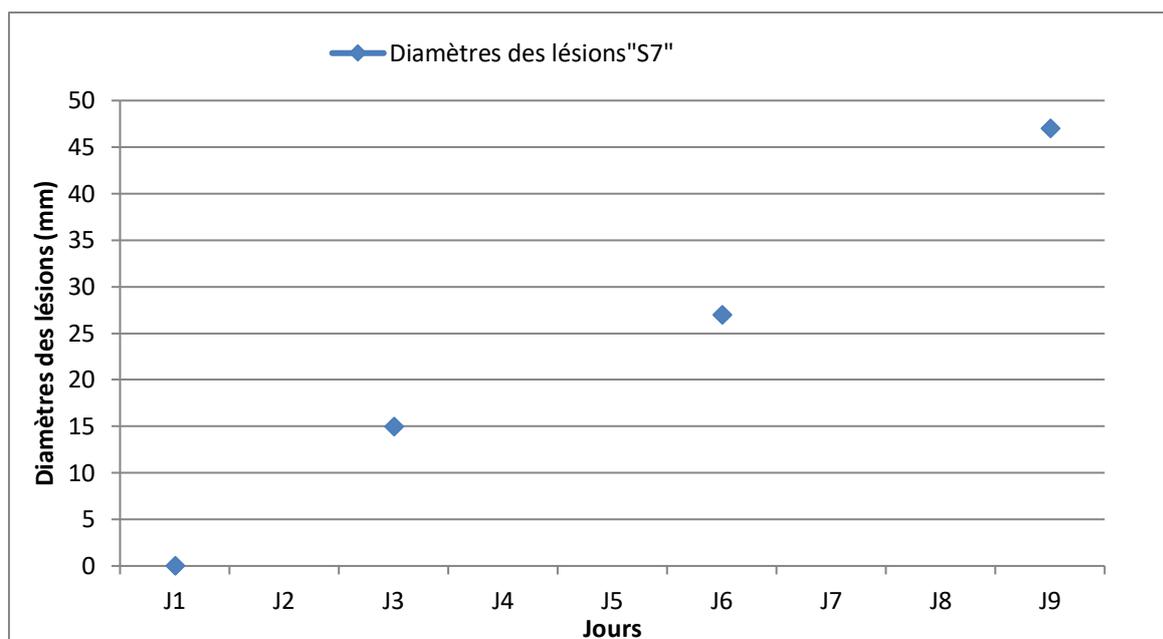


Figure 36 Cinétique de développement des lésions causées par *Penicillium expansum* MN904448 (S7) sur des fruits de pommes à 25°C pendant 9 jours d'incubation

Les résultats des vitesses avec lesquelles se propagent les lésions causées par les 3 souches sur le fruit, révèlent que la souche *Penicillium expansum* MN904448 (S7) est le pathogène qui a montré le diamètre de lésions le plus important en fin d'incubation par rapport aux deux autres pathogènes, en revanche, la souche S4 a montré significativement le diamètre et la vitesse de développement de lésions la moins importante par rapport à la souche *Penicillium expansum* S3 et S7.

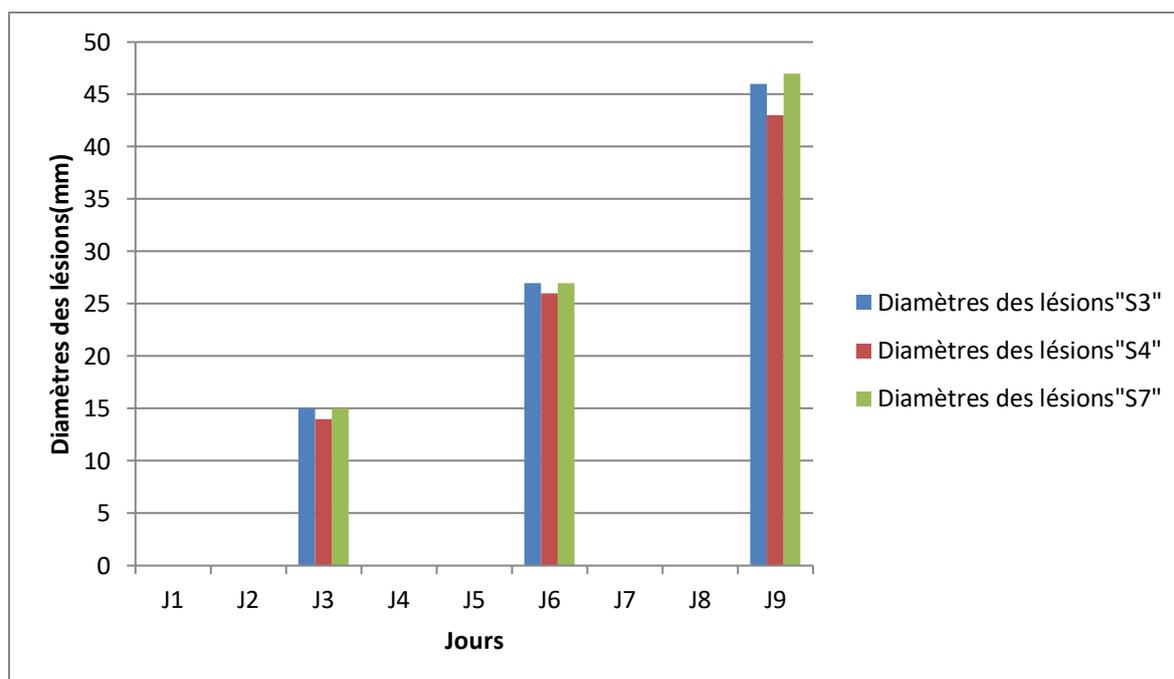


Figure 37 Evaluation de la différence de la vitesse de développement des lésions entre les 3 souches de *Penicillium expansum*

Les parties infectées (lésions brunes) ont été soumises à des extractions liquides à l'acétate d'éthyle, et les extraits obtenus ont été purifiés par chromatographie sur colonne (Figure 38).

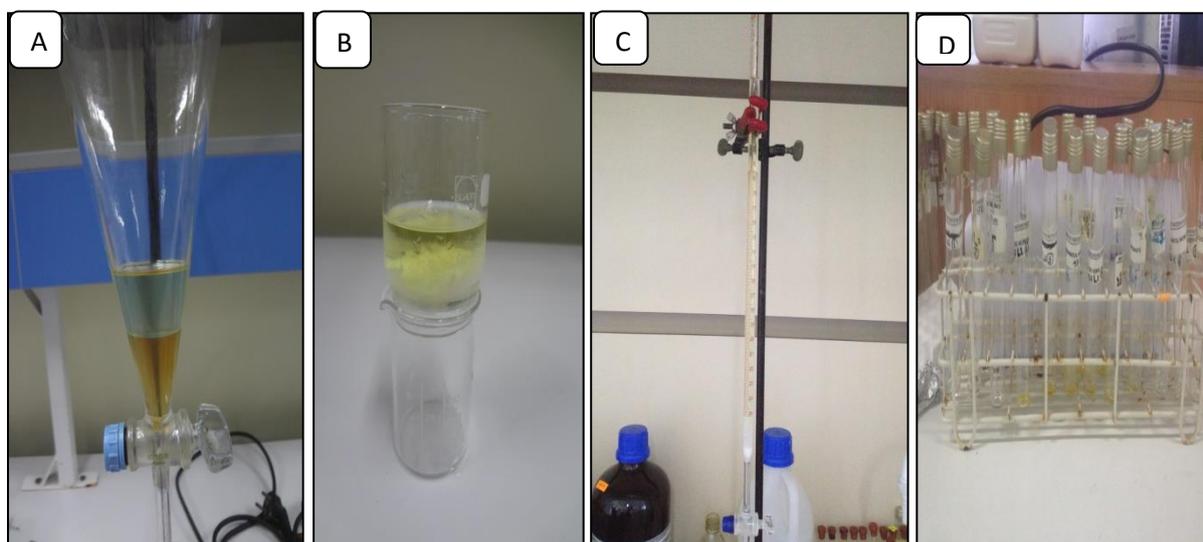
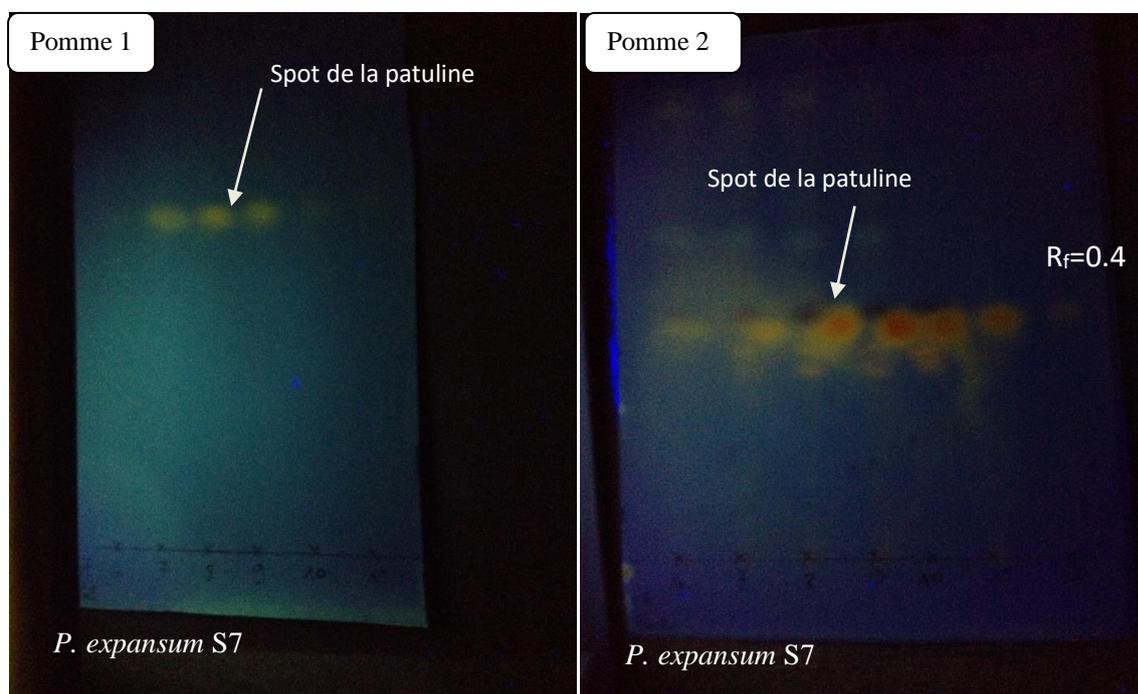


Figure 38 Différentes étapes de l'extraction de la patuline à partir des lésions induites par les trois pathogènes ; (A) séparation de la phase organique, (B) séchage de la phase organique par le Na_2SO_4 , (C) purification des extraits par CC, (D) différentes fractions obtenues.

4.5.2- Analyse de la patuline produite *in vivo* par CCM

L'analyse de chaque fraction sortant de la colonne a été effectuée en premier lieu par CCM. Les résultats obtenus pour les pommes inoculées par la souche pathogène S7 (*Penicillium expansum* MN904448), ont révélé la capacité de cette souche à produire de la patuline *in vivo* à 25°C. La production de cette mycotoxine se caractérise par l'apparition de spot jaune au visible et jaune orangé à 366nm après traitement à l'MBTH 0.5%. L'intensité des spots était importante et diffère d'une fraction à une autre. Pour la pomme n°1 11 fractions ont été obtenues, de la fraction 1 à 5 on remarque l'absence de patuline, en revanche, à partir de la fraction 7 à 9 la présence de la patuline a été caractérisée par un spot jaune et un $R_f=0.5$. Les fractions 10 et 11 montraient des spots jaunes avec une intensité moins importante que les autres spots. La production de la patuline a été notée dans les trois fruits de pommes infectées par la même souche (Figure 39). L'absence de spots jaune dans quelques fractions, est due à l'affinité des différents composés présents dans le mélange pour le solvant d'extraction.

D'après les résultats de l'analyse des différentes fractions par CCM, on remarque que la production de la patuline au niveau de la pomme n°2 été remarquable suite à l'intensité importante des spots obtenus où le R_f des spots est estimé à 0.4.



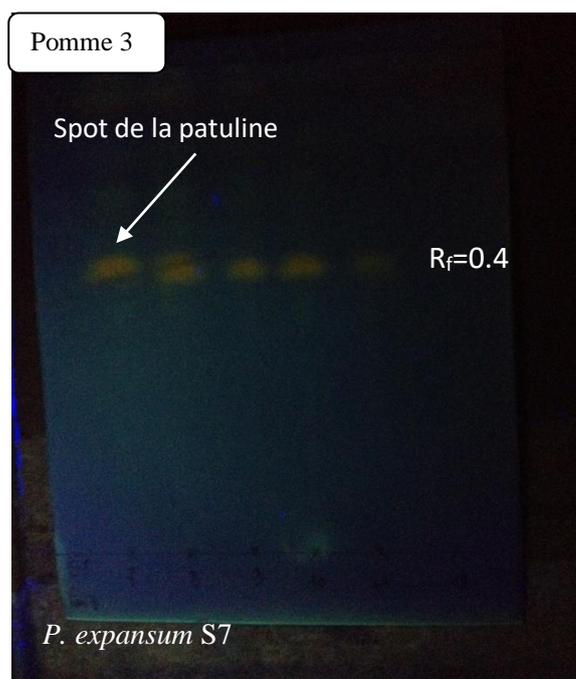
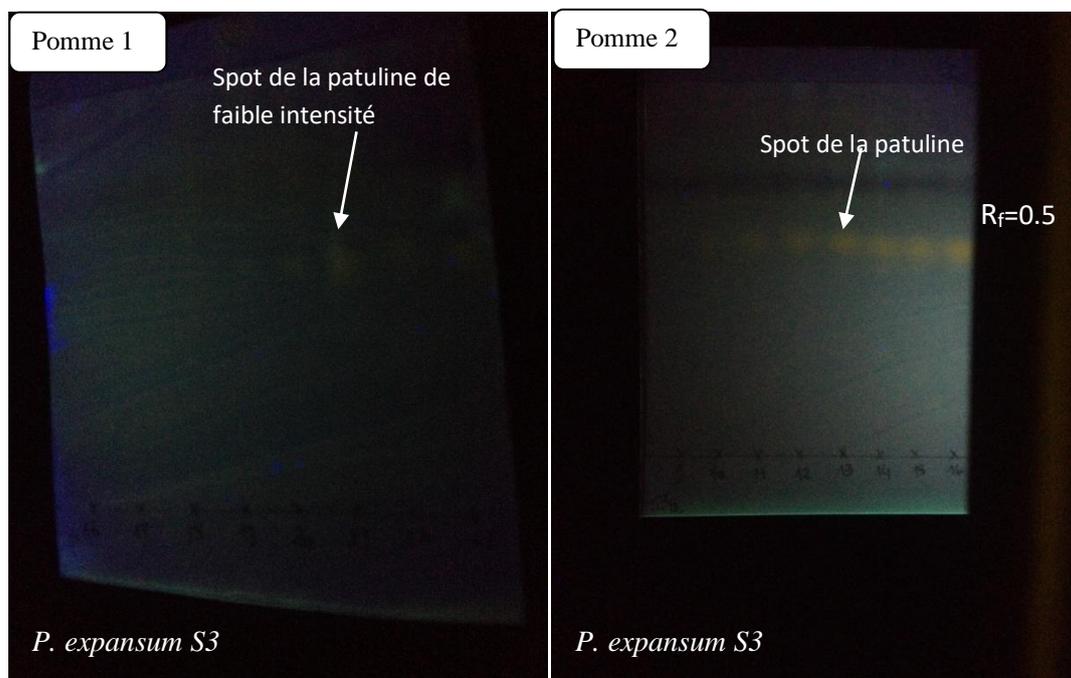


Figure 39 Détection de la patuline produite *in vivo* par *Penicillium expansum* MN904448 (S7) par CCM à 366 nm

La patuline produite par la souche S3 *Penicillium expansum* MT023795 (S3) *in vivo*, a été également déterminée par CCM. Les résultats ont démontré la capacité de cette souche à produire la patuline dans les pommes utilisées à 25°C. Les spots obtenus avaient des $R_f=0.4$ et 0.5 (Figure 40).



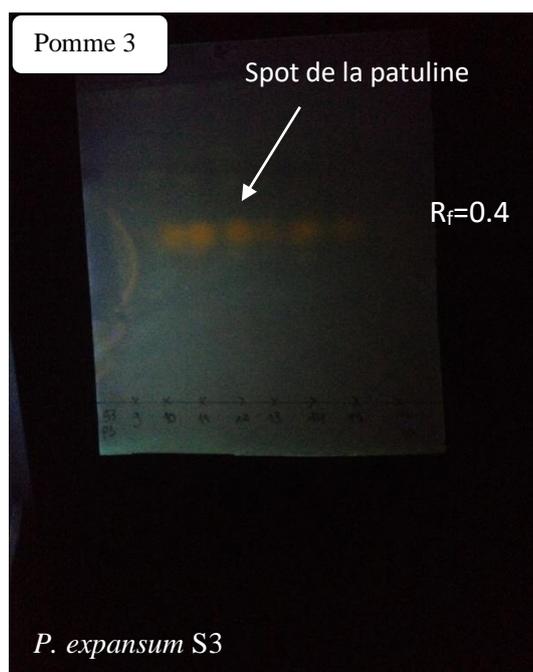
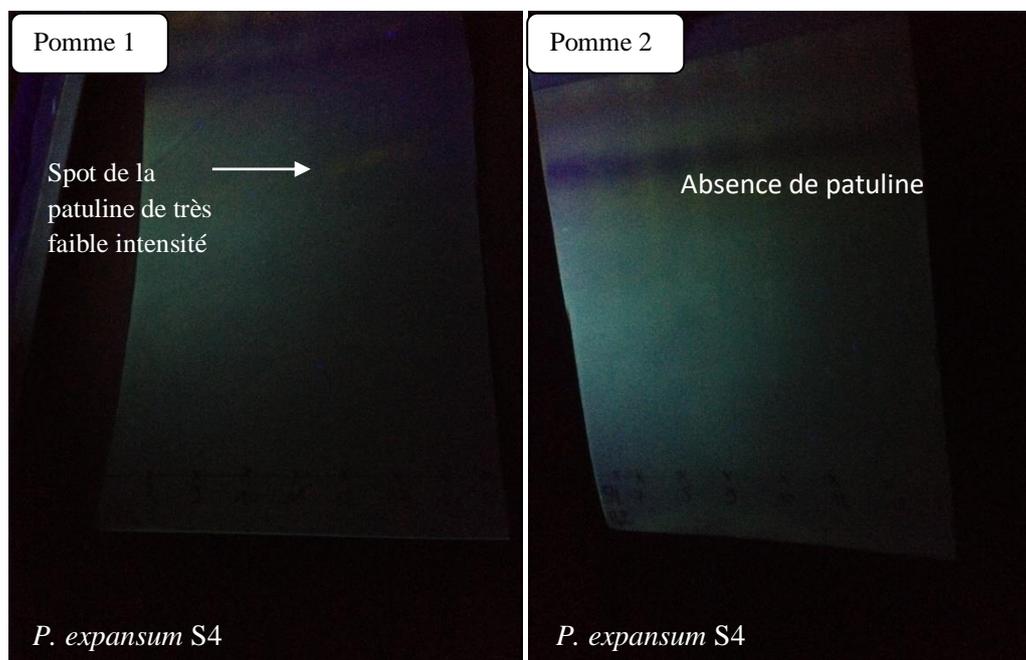


Figure 40 Détection de la patuline produite *in vivo* par *Penicillium expansum* MT023795 (S3) par CCM à 366nm

Malgré l'inoculation de la même souche S3 dans les trois pommes, on remarque que la patuline produite dans les pommes n°2 et 3 était importante par rapport à la pomme n°1 suite à l'intensité des spots correspondant à la patuline (Figure 40).



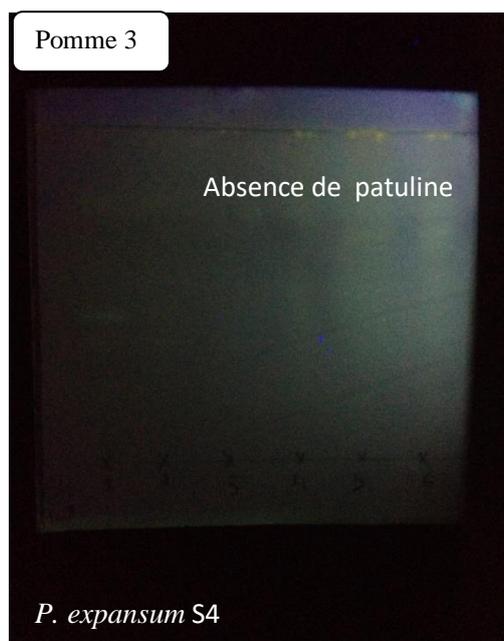


Figure 41 Détection de la patuline produite *in vivo* par *Penicillium expansum* MN904449 (S4) par CCM à 366nm

Les résultats des analyses CCM des fractions obtenus à partir de l'extraction des tissus de pommes, infectés par la souche S4 (*Penicillium expansum* MN904449), *in vivo* ont révélé qu'on effet, cette souche produit la patuline mais d'une façon moins importante que les autres deux souches. De plus, la production a été marquée uniquement dans un seul fruit (pomme n°1) (Figure 41) et avec une intensité de spot très faible par rapport aux deux autres pathogènes. Malgré la capacité de la souche S4 à induire des lésions identiques à ceux décrites pour la pourriture bleue des pommes en post-récolte, elle ne produit pas en revanche, la mycotoxine de façon significative par rapport à la maladie qu'elle cause. Ceci peut être expliqué par le fait que la production de métabolites secondaires varie au sein de la même espèce voir au sein de la même souche.

4.5.3-Analyse de la patuline produite *in vivo* par UPLC

Cette étape a pour but de confirmer encore une fois la production de la patuline élaborée *in vivo* par nos 3 souches pathogènes de *Penicillium expansum*, considéré comme le principal pathogène des pommes en post-récolte et ainsi la quantification de la patuline produite par chaque souche. De ce fait, le système UPLC a été utilisé. Les analyses ont été réalisées conjointement et en utilisant le standard de la patuline (pure à 99.99%) et les fractions résultantes de l'extraction liquide des tissus infectés par les 3 souches. La phase mobile utilisée, est composée d'eau et d'acétonitrile (ACN) avec un gradient d'élution.

L'identification est basée sur la comparaison des temps de rétention de la patuline contenue dans les différentes fractions avec celui du standard dans les mêmes conditions opératoires. Le résultat illustré dans la figure 42 représente le profil chromatographique de standard de patuline. On remarque la présence d'un seul pic majoritaire, qui a un temps de rétention ($t_R=9.35\text{min}$).

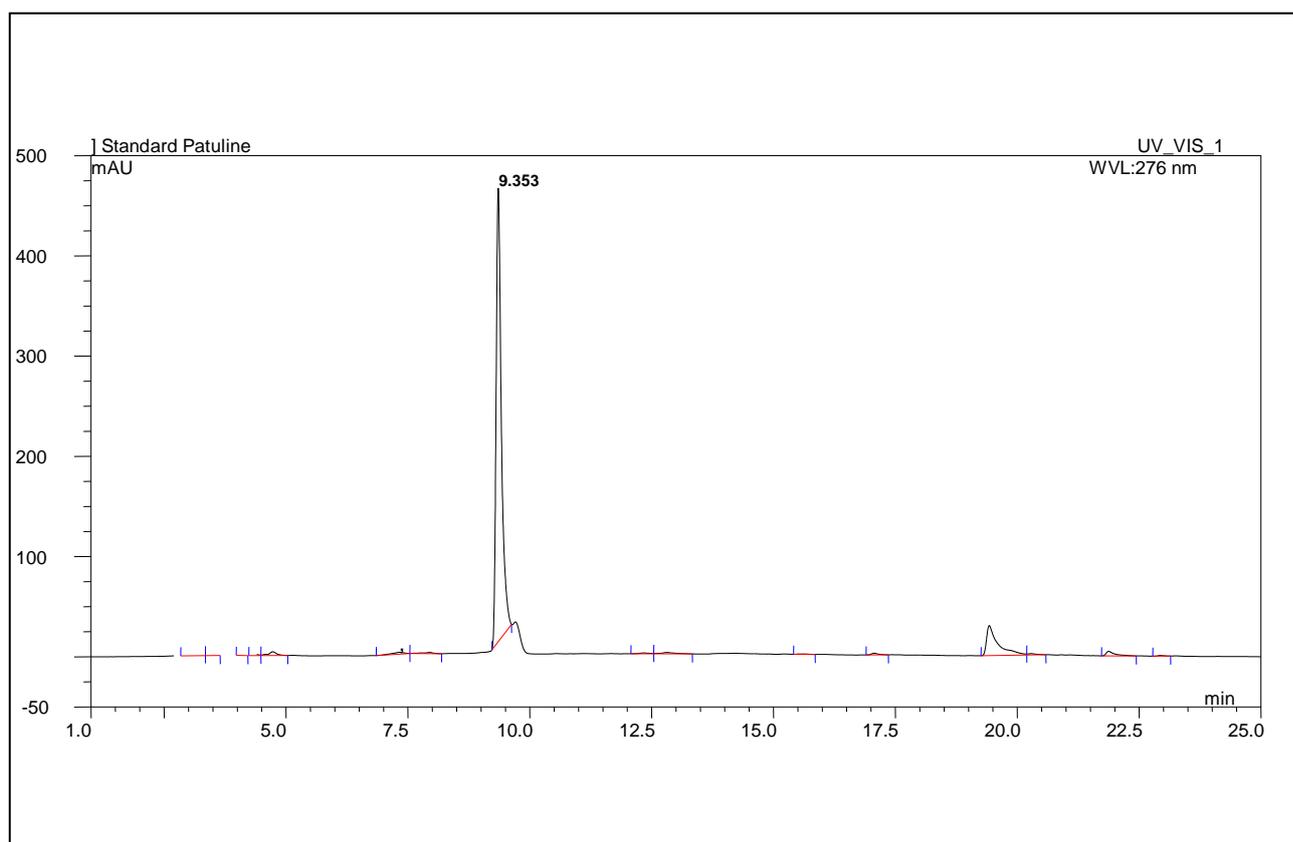
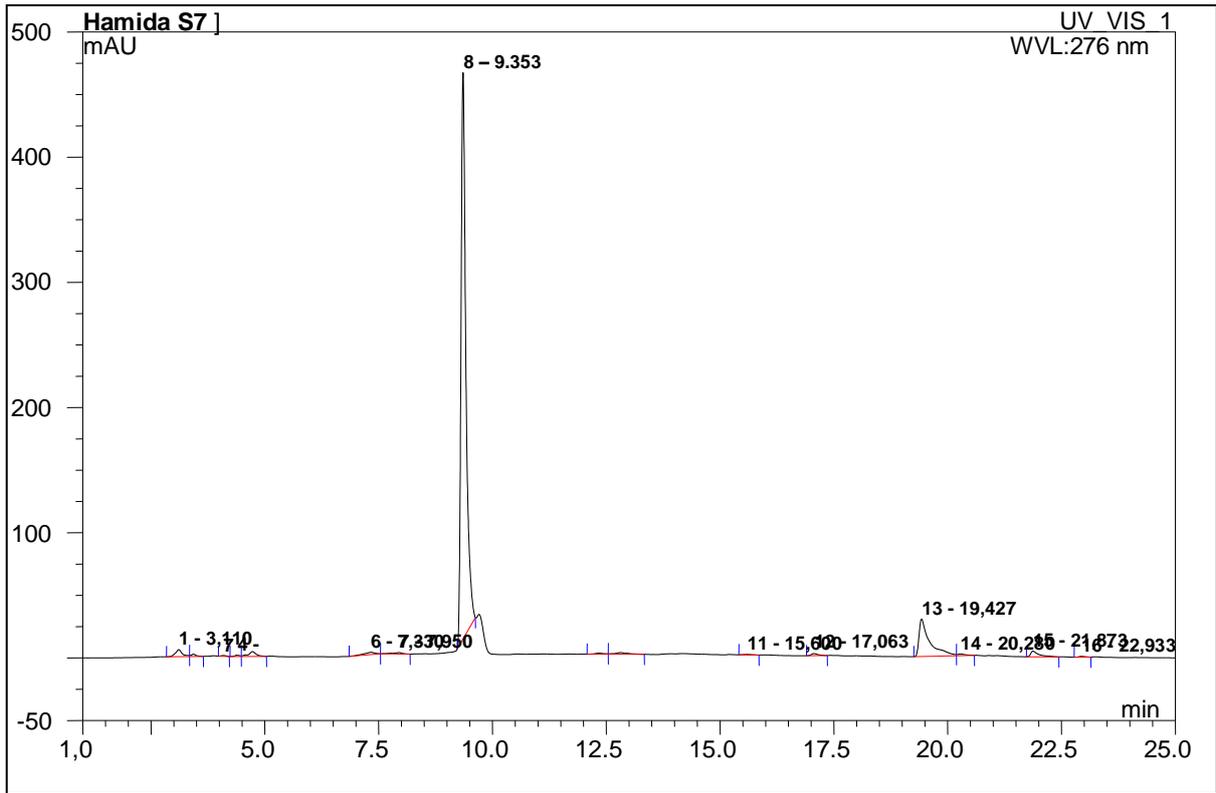
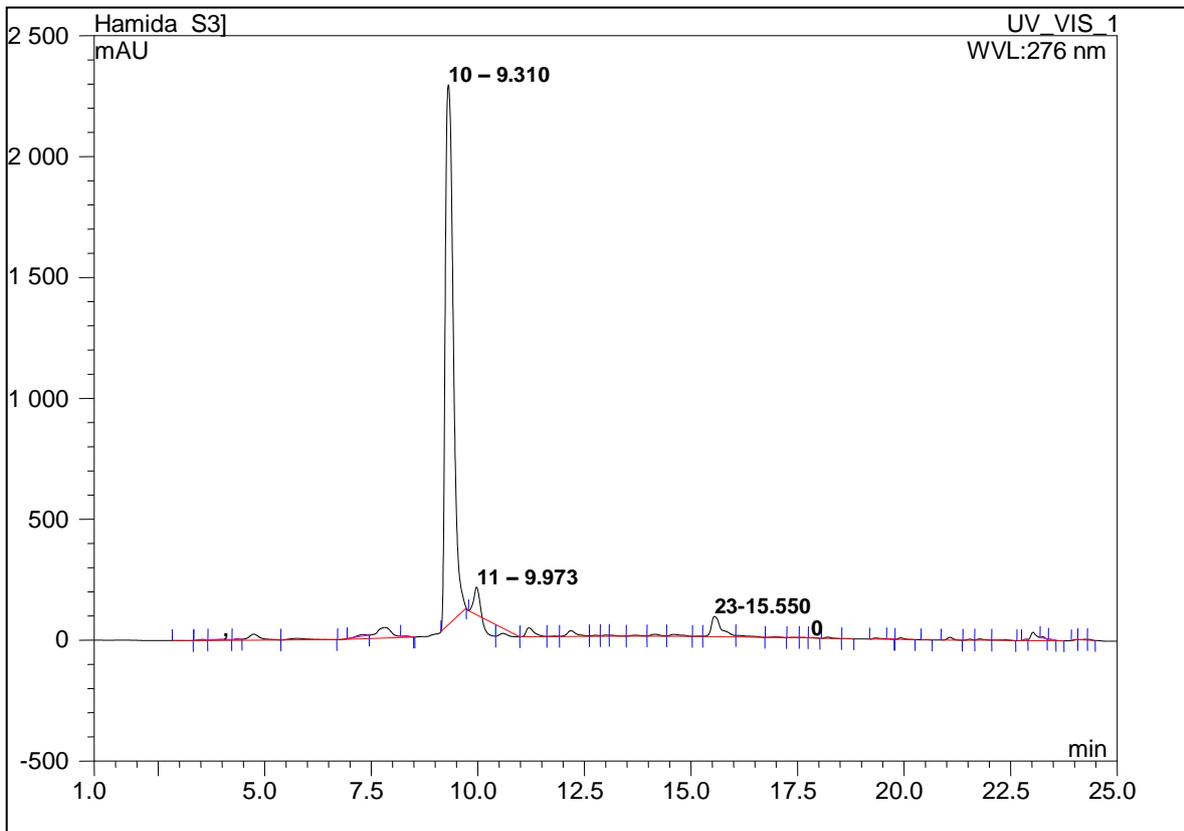


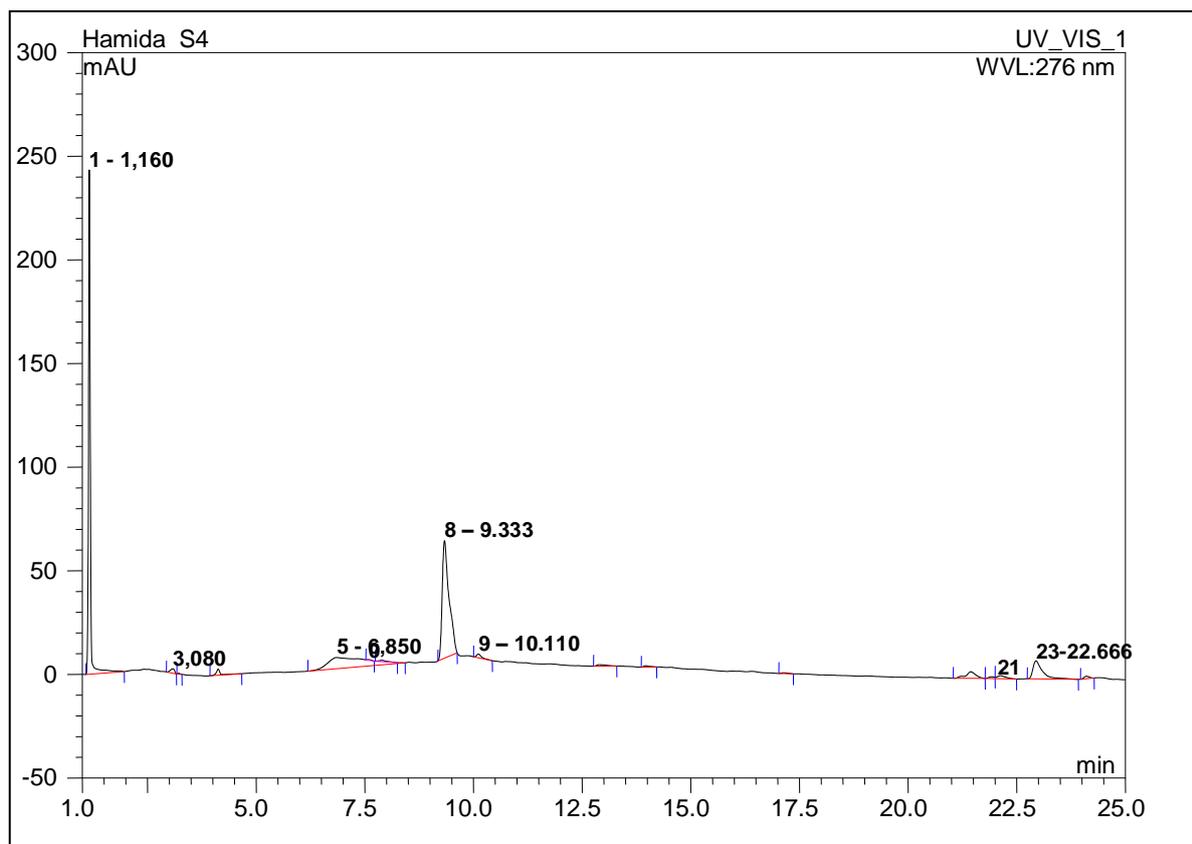
Figure 42 Chromatogramme correspondant au standard de la patuline (1mg/ml)



A



B



C

Figure 43 Chromatogrammes représentant la présence de patuline dans les tissus de pommes infectées *in vivo* par les trois souches ; (A) **S7** *P. expansum* MN904448, (B) **S3** *P. expansum* MT023795, (C) **S4** *P. expansum* MN904449

Ainsi, les résultats de l'analyse des fractions issues de l'extraction de la patuline produite dans les tissus de pommes infectées *in vivo*, a permis l'obtention des chromatogrammes présentés dans la figure 43. Il ressort de cette expérience que les fractions analysées contenaient la mycotoxine recherchée, qui est caractérisée par l'apparition dans les trois échantillons d'un pic majoritaire ayant le même temps de rétention (9.35, 9.31 et 9.33min) de standard de la patuline ($t_R=9.35$ min). Ce qui permet de confirmer que le métabolite produit par les 3 pathogènes correspond précisément à la molécule de patuline.

Par ailleurs, la quantification de la patuline produite par les trois pathogènes, a été effectuée par mesure des aires de pics obtenus des échantillons au même temps de rétention du standard, et les comparants à ceux établis dans la courbe d'étalonnage.

La courbe a été réalisée à partir des solutions de dilution obtenues à partir de 1mg de standard dissous dans 1ml de méthanol. La courbe d'étalonnage est linéaire dans la gamme de

concentration allant de 3.9 à 500 μ g/ml de patuline avec un coefficient de corrélation=0.996 ce qui traduit une bonne calibration (Figure 44).

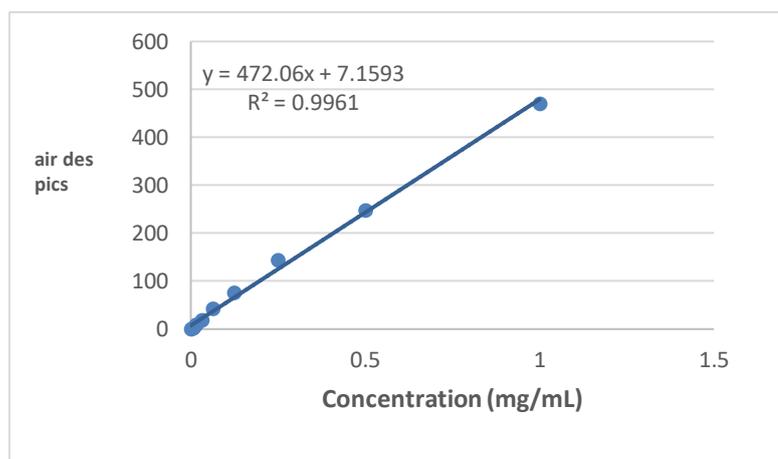


Figure 44 Courbe d'étalonnage des concentrations des solutions de standard de la patuline

La patuline a été détecté dans les fragments des tissus de pommes infectés par la souche S7 *P.expansum* MN904448, avec des concentrations de 403.5 et 469.4 μ g/ml. Par ailleurs, la souche S3 *P.expansum* MT023795 accumule dans les tissus de pommes des concentrations en patuline de 339.5 et 360 μ g/ml. En revanche, la souche S4 *P.expansum* MN904449 produit une quantité moins importante de patuline estimée à 0.57 et 3 μ g/ml. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus en CCM, où les fractions issues de l'extraction de patuline à partir des tissus de pommes inoculés par les souches S3 et S7 présentaient des spots de patuline d'intensité importante. Par contre, la souche S4 et malgré qu'elle induit l'infection de pourriture bleue, elle ne produit pas de quantités importantes de patuline *in vivo*.

4.6- Evaluation de la contamination naturelle des pommes destinées à la consommation et le rôle de patuline comme biomarqueur d'effet

Cette étape a pour but d'estimer l'occurrence de la patuline dans les fruits de pommes exposés à la consommation directe des consommateurs en suivant, la patuline comme biomarqueur d'effet. Après une extraction liquide à l'acétate d'éthyle et une concentration au rotavapor, l'échantillon a été purifié sur colonne de gel de silice puis les fractions obtenues ont été analysées par CCM (comme il a été décrit dans la section 4.5.2). En effet, les résultats représentés dans la figure 45 mettent en évidence la contamination naturelle des pommes par la patuline et sa présence dans les tissus infestés. Selon l'intensité des spots (révélés après traitement au MBTH 0.5%), la quantité de patuline présente dans les tissus s'avère plus au

moins importante. D'après ces résultats, la patuline contaminant les fruits de pommes est considérée comme biomarqueur d'effet par son omniprésence dans les fruits et le changement physiologique (pourriture bleue) au niveau des tissus de pommes, révélant ainsi, l'exposition des pommes à l'organisme producteur *Penicillium expansum*.

Il est à mettre en exergue que la présence de la patuline dans les lots de fruit destiné à la consommation est un excellent biomarqueur, car sa détection précoce par une analyse de routine prédit le pourrissement et le développement de la moisissure avant son apparition sous forme d'amas de spores. En revanche, la présence de la moisissure ne signifie pas automatiquement la sécrétion de la patuline.

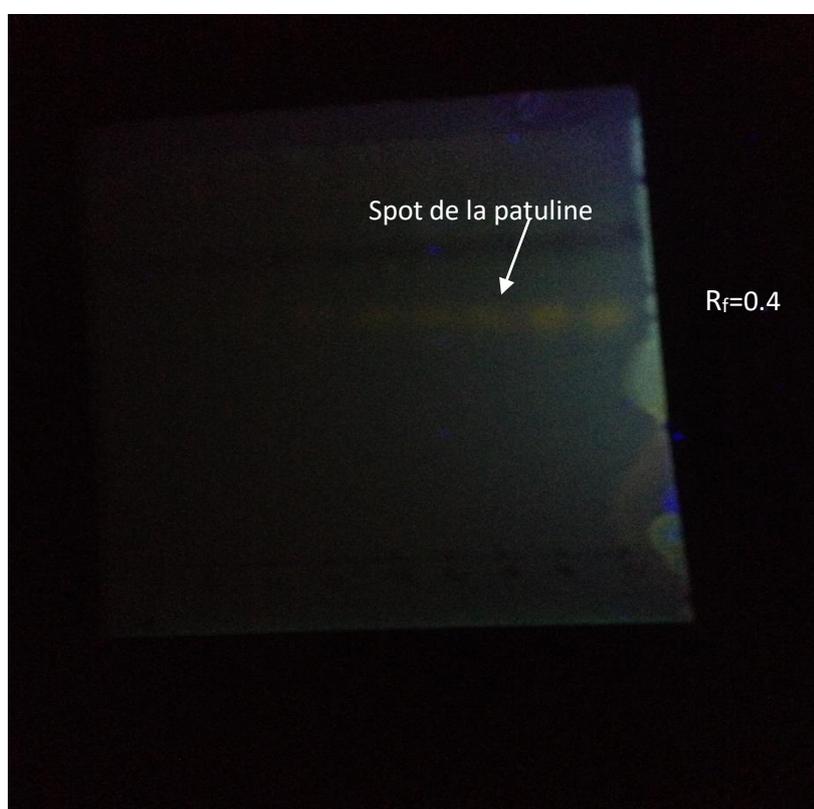


Figure 45 Révélation par CCM de la présence naturelle de patuline dans les pommes

4.7-Etude de la diffusion de la patuline des tissus infectés aux tissus sains dans les pommes

Cette partie de travail a pour but de mettre en œuvre la capacité de la patuline produite *in vivo* de migrer à partir des sites infectés aux parties saines du fruit. Pour ce faire, la souche S7 *P. expansum* MN904448 a été sélectionnée pour ce test, vu son pouvoir mycotoxinogène décrit dans les parties antérieures comme étant la souche la plus virulente.

4.7.1- Extraction de la patuline à partir des sections obtenues

Les sections obtenues, ont été soumises à des extractions liquides à l'acétate d'éthyle, les extraits obtenus (figure 46) ont été destinés pour l'identification de la patuline par CCM.



Figure 46 Différents extraits obtenus à partir des sections réalisées sur les 3 pommes inoculées par *Penicillium expansum* MN904448 (S7)

4.7.2- Détermination de la patuline dans chaque section par CCM

Les résultats des analyses CCM effectuées sur les différentes sections ont permis d'obtenir les profils illustrés dans la figure 47. En effet, l'analyse des spots apparus à 276nm et en les comparant au standard de la patuline, permet de confirmer la diffusion de la patuline au-delà de la zone d'inoculation (section 0). C'est-à-dire, la molécule de la patuline même en éliminant la zone pourrie, elle est présente dans la section (S1) et la section (S2) mais apparemment sous forme de trace et cela par rapport à l'intensité des spots (figure 47). Ces

résultats confirment la capacité de la mycotoxine à migrer à travers les tissus des pommes infectés aux parties saines du fruit.

Ce résultat peut servir également comme marqueur d'effet, pour le contrôle de qualité d'hygiène et de sécurité alimentaire et permet par conséquent, de déduire que le danger de la patuline est présent même dans les parties qui apparaissent saines dans le fruit révélant des spots de pourriture brunes.

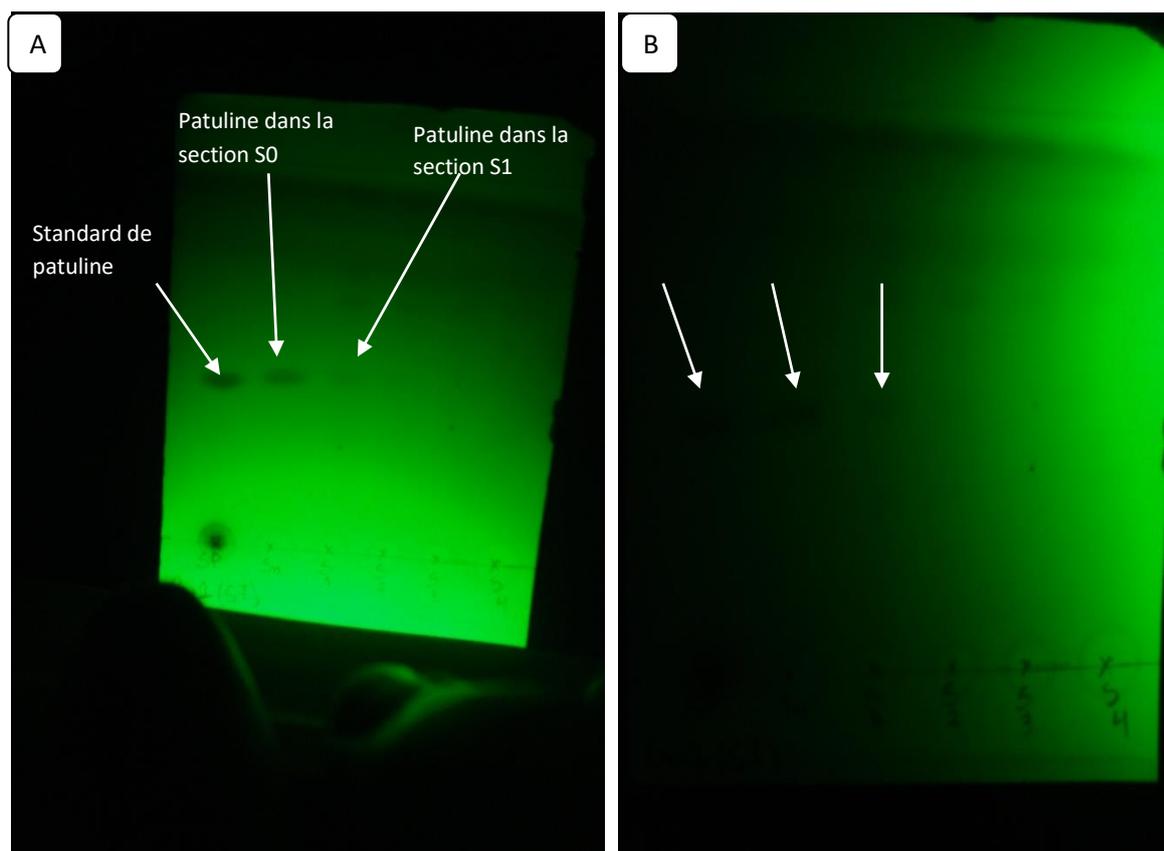


Figure 47 Analyse CCM de différentes sections des pommes inoculées par *Penicillium expansum* MN904448 (S7) (A) Pomme n°1 ; (B) pomme n°2

Discussion

5- Discussion

De nos jours, la sécurité alimentaire est la préoccupation majeure de l'homme car, les produits chimiques, sont de plus en plus, présents dans notre environnement (Carvalho, 2017). Les produits alimentaires sont une importante voie d'exposition aux contaminants tels que les dioxines, les mycotoxines, les métaux lourds, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les médicaments et les hormones (Traag *et al.*, 2013; Pose-Juan *et al.*, 2016). En outre, les denrées alimentaires représentent une source de contamination par divers microorganismes, parmi lesquels ; les moisissures. Le risque microbiologique survenant de « l'attaque » des aliments par ces champignons saprophytes ne se réduit pas simplement à l'occurrence de ces êtres minuscules qui altèrent les qualités organoleptiques et nutritionnelles des denrées alimentaires, mais réside aussi dans la présence de métabolites toxiques appelés « mycotoxines » qu'ils élaborent dans l'aliment envahi (Tannous, 2015). Ces composés de structures chimiques très variées et de toxicités différentes, sont responsables de mycotoxicoses. La production de mycotoxines par ces champignons dans les cultures peut se dérouler à différentes étapes de la chaîne de production : avant la récolte, durant la récolte, le séchage ou encore lors du stockage. Les conditions climatiques, les mauvaises pratiques culturales ou de stockage peuvent permettre le développement de ces champignons filamenteux et augmentent ainsi, le risque de présence de mycotoxines (Snini, 2014). Elles contaminent les matières premières, pénètrent la chaîne alimentaire et grâce à leur forte stabilité aux différents traitements appliqués (cuisson, stérilisation, etc.) elles perdurent tout le long de celle-ci même après l'élimination des organismes producteurs (AFSSA, 2009).

Parmi les denrées alimentaires touchées par les moisissures et leurs mycotoxines ; les fruits. Ces aliments riches en sucre et en nutriments, constituent des substrats acides favorables au développement de ces contaminants qui, parfois, leurs attaques sont accompagnées par la production de la Patuline, mycotoxine la plus répondeuse dans les fruits et leurs produits dérivés (El Hindi *et al.*, 2011). L'Algérie, attentif au danger des moisissures toxigènes mais, dispo sant, malheureusement, de très peu de laboratoires utilisant en routine le dosage des mycotoxines, ce qui engendre l'absence de l'application régulière des diverses mesures préventives ou procédures de surveillance pour palier au danger sur la santé du consommateur. En outre, la plus grande attention dans ce domaine est, constamment, réservée à la présence des Aflatoxines et des Ochratoxines dans les matières alimentaires premières susceptibles d'en contenir (Guezlane *et al.*, 2016).

De ce fait, C'est dans cette optique que l'objectif de ce travail trouve son évolution en traitant les points suivants :

- Isolement de moisissures contaminants quelques fruits produits dans l'Est Algérien ;
- Sélection des isolats fongiques toxigènes ;
- Identification des isolats producteurs de mycotoxines ;
- Production de la patuline par les isolats sélectionnés *in vitro* ;
- Evaluation de la capacité des souches toxigènes à produire la patuline *in vivo* ;
- Evaluation de la contamination naturelle des pommes par la patuline ;
- Etude de la diffusion de la patuline dans les fruits de pommes *in vivo*.

La patuline est une mycotoxine de faible poids moléculaire, couramment rencontrée dans les fruits en général et plus particulièrement les pommes et les produits à base de pommes (Piqué *et al.*, 2013). A cause de sa grande résistance aux traitements chimiques en haute température et sa stabilité en milieu acide, la patuline persiste tout au long de la chaîne de production jusqu'au produit fini (Dragacci *et al.*, 2005). C'est pourquoi, l'échantillonnage pour ce travail a été effectué à partir des fruits de pommes (variété *Golden delicious*) produits dans la région d'Ariss, et des fruits d'abricots produits dans la région de N'gaoues situés, tous les deux, dans la wilaya de Batna à l'Est Algérien. Le choix de ce site de production, est dû à la place qu'occupe la wilaya dans la production de ces deux fruits (FAO, 2009). De plus, la région de N'gaous comporte le complexe de l'E.N.A.J.U ce qui a permis l'obtention des produits de transformation des abricots utilisés dans ce travail.

Aussi, l'isolement des mycètes réalisé sur milieu PDA et MEA additionné de Streptomycine, qui permet l'inhibition de la croissance bactérienne, a abouti à l'obtention de 23 isolats fongiques, dont six ont été isolés à partir des abricots, dix-sept à partir des pommes et aucun isolat fongique n'a été obtenu des produits de transformation de l'abricot. En effet, la présence de ces mycètes dans les fruits est influencée par plusieurs facteurs tel que : les conditions climatiques, la localisation géographique, les traitements agronomiques, la présence de microorganismes compétitifs, la récolte et les traitements post-récolte (Jackson et Al-Taher, 2008 ; Alegbeleye *et al.*, 2018). Par ailleurs, la répartition disproportionnée des isolats obtenus peut être expliquée par le fait que chaque type de fruit a une flore microbienne spécifique, dont le nombre et l'activité changent d'une variété de fruit à une autre sous l'influence de différents éléments: la composition en sucres et nutriments, l'acidité (pH), la consistance de la chair et la composition en eau (Jackson et Al-Taher,2008).

Les cultivars de fruits varient en charge microbienne. Cette différence est due aux caractéristiques chimiques de chaque cultivar telles que l'épaisseur et la résistance de la peau, fermeté de la chair, pH de la chair, taux de sucre, blessures à la surface du fruit, taux de composés antimicrobiens, et autres composants de fruit (zhong *et al.*, 2018; Hussain *et al.*, 2020).

En revanche, aucun isolat fongique n'a été obtenu à partir des produits de transformation des fruits d'abricots (pulpe et jus). Cela est dû au traitement physique appliqué par pasteurisation des produits finis qui élimine une grande quantité de microorganismes. En effet, l'absence totale de germes résulte de l'application de traitement thermique qui inhibe directement la germination des spores et la croissance mycélienne des champignons (Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2019).

Les différents isolats obtenus sont des moisissures appartenant aux différents genres, la plupart appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* et quelques levures. Seuls les isolats des *Penicillium* et *Aspergillus* ont été retenus pour le reste de ce travail, car les genres *Rhizopus* et *Mucor* sont considérés comme des contaminants banals et fréquents, et les levures ne sont pas réputées pour leur capacité à produire les mycotoxines (Botton, 1990 ; Guiraud, 1998).

L'un des paramètres largement utilisé pour la détection des espèces mycotoxinogènes est la réalisation de test antimicrobien (Mosbah, 2017). En effet, l'activité antibactérienne des isolats fongiques a été mise en évidence sur milieu GN en utilisant comme bactéries test : *E. coli* et *Bacillus Subtilis*. Ce test a permis la sélection de trois isolats comme étant producteurs de métabolites à effet antibactérien et ce, grâce à l'apparition d'un halo transparent (zone d'inhibition) entourant les disques des colonies fongiques : deux isolats obtenus des pommes (isolats **S3** et **S7**) et un seul isolat obtenu à partir des fruits d'abricot (**S2**). Ce résultat est considéré comme une réaction positive résultant de l'inhibition de développement des souches bactériennes par la diffusion de métabolites à effet antibactérien secrétés par les isolats fongiques dans le milieu. Ces métabolites biologiquement actifs ont la capacité d'induire des dysfonctionnements physiologiques chez les bactéries test menant à l'inhibition de leur croissance (Zinedine, 2004). Laarous *et al.* (2007) ont eux aussi adopté ce test pour sélectionner les espèces fongiques toxigènes contaminants les pommes.

L'étude de l'aspect macroscopique des isolats sélectionnés sur les milieux d'identification CYA et MEA, a permis de détecter la croissance plus au moins rapide sur les deux milieux,

des colonies d'aspect lisse et de couleur vert foncé à gris, la présence d'exsudats et de pigment soluble brun-orangé. Ces isolats ont démontré leur capacité de former des touffes sur les marges de leurs colonies. Par ailleurs, l'étude microscopique des isolats S3, S4 et S7 a permis de les identifier comme des isolats appartenant au genre *Penicillium*.

La morphologie microscopique a révélé la présence d'un thalle sépté, hyalin et ramifié. Les conidiophores qui se sont formés sur le mycélium portent des têtes penicillaires terverticillaires d'où ressortent des conidies à paroi lisse de couleur vert terne, présentant une forme ellipsoïdale. Selon ces caractères macroscopiques et microscopiques les isolats ont été identifiés, en présomptive, comme *Penicillium expansum* (Andersen *et al.*, 2004; Frisvad et Samson, 2004; Pitt et Hocking, 2009). Les résultats de l'étude macroscopique et microscopique sont en accord avec ceux de Vico *et al.* (2014), qui ont isolé et identifié des souches de *Penicillium expansum* à partir des fruits de pommes.

Lorsque les caractéristiques morphologiques sont insuffisantes pour identifier un champignon, on utilise les techniques physiologiques et biochimiques. Cependant, pour des mycètes filamenteux ces méthodes sont laborieuses, longues et quelques fois incomplètes (Frisvad *et al.*, 1998 ; Guarro *et al.*, 1999). De plus, *Penicillium* est un grand genre, et de nombreuses espèces ont des propriétés macroscopiques et microscopiques très similaires, et en même temps il y a une variabilité au sein des espèces. Ce qui explique pourquoi d'autres identifications non ambiguës ont nécessité souvent d'autres approches telles que l'identification moléculaire (Sanzani *et al.*, 2013; Vico *et al.*, 2014).

Les méthodes moléculaires sont universellement applicables et permettent d'explorer le polymorphisme à différents niveaux (comparaison entre des souches, des espèces, des genres, etc.). Ces dernières sont basées sur l'étude d'un gène (locus), d'un fragment d'ADN défini (espaceur, intron, etc.), et de plusieurs gènes (multiloci) ou encore de l'ADN total dépendant du but poursuivi (Henson et French, 1993). Dans notre étude, la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique a été amplifiée avec des amorces universelles ITS1 et ITS4 ainsi que le gène de la β -tubuline. ITS est le marqueur le plus largement séquencé pour les champignons, et universellement utilisé. Le gène de la β -tubuline riche en introns ou le taux de variabilité semble approprié permet une discrimination au sein de genres tels que *Penicillium* ou *Aspergillus* (Samson *et al.*, 2004 ; Schoch *et al.*, 2012). Le blast des séquences dans Genbank, a montré que les souches S3, S4 et S7 sont des souches de *Penicillium expansum* avec des numéros d'accèsion des souches homologues publiées à

Genbank en l'occurrence ; *Penicillium expansum* [LN896427.1](#)(S3), *Penicillium expansum* [KX243329.1](#) (S4) et *Penicillium expansum* [KP903574](#).

Plusieurs travaux ont montré l'utilisation des gènes *ITS* et *β -tubuline* pour déterminer les espèces du genre *Penicillium*. Vico *et al.* (2014) ont identifié des souches de *Penicillium spp* isolées de la pourriture bleue de la pomme comme étant *Penicillium expansum*, en amplifiant les régions ITS. De même, Hammami *et al.* (2016) ont pu identifier 23 souches de *Penicillium expansum* provenant de pommes infectées et de pommes non infectées, avec les mêmes amorces. De plus, des souches de *Penicillium expansum* causant la pourriture bleue sur des raisins ont été identifiées par séquençage du gène de *β -tubuline* (Correia, 2011).

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires. Les toxines, métabolites secondaires sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'Acétyl CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques. Les toxines fongiques sont souvent supposées être des armes chimiques, soit pour la défense des champignons, soit pour l'attaque de l'hôte (Vey *et al.*, 1986; Ignoffo, 1988 ;Ravallec *et al.*, 1989). Plusieurs milieux ont été décrits dans la littérature pour la production de la patuline (Andersen *et al.*, 2004), cependant, le milieu YES (Yeast Extract Sucroe) a été considéré comme sélectif pour la production de patuline. Riche en vitamines du groupe B complexes, ce milieu favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes conduisant à la production optimale des mycotoxines (Ammrouche, 2013). La croissance de *Penicillium expansum* dans le milieu liquide s'accompagne par l'excrétion de métabolites secondaires. Cette excrétion débute lorsque la culture fongique entre en phase stationnaire.

La capacité de produire la patuline *in vitro* par les trois souches de *Penicillium expansum* isolées dans cette étude a été réalisée sur milieu YES à 28 ° C pendant 16 jours. Ce même milieu liquide et a été utilisé dans des travaux antérieurs (Andersen *et al.*, 2004, Laarous *et al.*, 2007, Elhariry *et al.*, 2010, Vansteelandt *et al.*, 2012, Gillot *et al.*, 2017). Les souches de *Penicillium expansum* secrètent dans le milieu de culture des substances actives particulièrement la patuline qui est généralement extraite par l'éthyle acétate. D'autres mycotoxines telles que la citrinine, la requefortine C, les communesines B et les expansolides A et B ont été produites par *Penicillium expansum* dans YES (Larsen *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2004). Dans le but de mettre en évidence, la capacité des souches de *Penicillium expansum* à produire la patuline *in vitro* sur milieu YES, la patuline a été détectée en premier lieu par la technique de CCM. C'est la technique traditionnelle pour la détermination des

mycotoxines. Son faible coût et sa simplicité sont les principaux avantages de cette procédure analytique (Cabrera de Oliveira *et al.*, 2008). La patuline est détectable par sa fluorescence jaune-orangé à 366 nm après traitement au MBTH qui joue le rôle de chromogène, et qui rend la couleur jaune au visible de la patuline, en couleur jaune-orangé sous UV. Les mêmes résultats ont été obtenus par Martins *et al.* (2002) et Welke *et al.* (2011). Mais comme la technique de CCM reste une technique moins concluante, par rapport aux techniques moderne de séparation, nous avons eu recours à la GC-MS pour identifier et caractériser la molécule de patuline présente dans les extraits bruts issus de la fermentation liquide des souches utilisées. Cette technique est fournie avec précision et reproductibilité dans le domaine de la séparation et de l'identification des biomolécules.

Des études antérieures, ont adopté cette technique. Kharandi *et al.* (2013) ont déterminé la présence de patuline dans le jus de pomme par GC-MS. De même, Rodríguez-Carrasco *et al.* (2012) ont démontré la présence de patuline et d'autres mycotoxines dans la semoule de blé avec la même technique et Hamza *et al.* (2015) ont analysé les divers métabolites produits par *Penicillium expansum* en culture liquide en identifiant vingt-huit composés par GC-MS. Au cours de notre étude, l'analyse des extraits bruts des cultures liquides des trois souches de *Penicillium expansum* par GC-MS, a permis de déceler la présence de patuline dans les trois échantillons. La patuline est apparue au même temps de rétention de son standard. De plus, la caractérisation structurale de cette molécule a été effectuée par la technique d'ionisation par impact électronique EI, qui a permis de générer 10 ions moléculaires majoritaires de rapport m/z 110, 55, 53, 126, 27, 154, 82, 54, 43 et 29. Les mêmes spectres de masse ont été obtenus pour la patuline contenue dans les trois échantillons, Nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Roach *et al.* (2002).

P. expansum est l'agent responsable de la pourriture bleue des pommes en post-récolte entraînant des pertes économiques importantes dans l'industrie fruitière (Siddique, 2012).

L'utilisation des trois souches de *Penicillium expansum* pour réaliser le test de pathogénicité sur des pommes saines ne présentant aucune blessure, et appartenant aux variétés *Golden delicious* et *Fuji* a donné des résultats positives. En effet, l'inoculation des suspensions conidiennes des trois souches dans les fruits de pommes a provoqué l'apparition de taches brunes circulaire due à la macération des tissus par la polygalacturonase, une enzyme qui joue un rôle important dans la pathogénicité de *Pencillium expansum*. Ce résultat est auparavant signalé dans les travaux précédents (Marin *et al.*, 2006; Louw et Korsten, 2014; Baviskar et Dekate, 2016).

L'infection en effet, progresse lentement au début, mais s'accélère au fur et mesure en fonction du temps d'incubation. Ce test de pathogénicité *in vivo* a montré que les trois souches étaient capables de provoquer des symptômes typiques à la pourriture bleue après 9 jours d'incubation à 25 ° C. Ces symptômes se manifestent par des lésions molles, aqueuses, de couleur brune à marron et se développant en forme circulaire pour les deux variétés de pommes. Lorsque les lésions atteignent un certain diamètre, une formation de spores bleu-verte près du site d'inoculation a été observée et les fruits à la fin d'incubation dégageaient une odeur moisie-terreuse. En effet, ces symptômes résultent du fait que le microenvironnement de la pomme peut être modifié par la sécrétion de *Penicillium expansum* de composés tels que l'acide D-gluconique, l'acide fumarique et la polygalacturonase qui augmentent sa pathogénicité et favorisent sa colonisation à la surface des pommes (Barad *et al.*, 2014). Nos résultats sont plus au moins identiques avec ceux décrits par Vico *et al.* (2014) et Snini *et al.* (2016).

Etant donné que les trois souches sont révélées pathogènes pour les fruits de pommes, un second test *in vivo* a été réalisé pour mettre en évidence la capacité des souches pathogènes à produire la patuline *in vivo*. En effet, les trois pathogène induisaient les mêmes symptômes décrits précédemment à 25°C pendant 9 jours sur des pommes de la variété *Golden delicious*, mais qui diffèrent d'une souche à l'autre. Le pathogène *Penicillium expansum* **MN904448 (S7)** provoquait des lésions de diamètre plus important (52mm), suivi de la souche *P. expansum* MT023795 (S3) (50mm), tandis que la souche *P. expansum* MN904449 (S4) causait les lésions les moins importantes par rapport aux premières (48mm). De même, la souche S7 présentait la plus grande vitesse de développement par rapport toujours aux deux autres souches. Le suivi de l'évolution du diamètre des lésions induites en test *in vivo* à été décrite dans les travaux de Welke *et al.* (2011).

Le diamètre des lésions induites par les pathogènes diffère d'une étude à l'autre. Reddy *et al.* (2010) ont obtenu le plus grand diamètre de lésion (39,1 mm) après 9 jours d'incubation à 25 ° C. De plus, Marin *et al.* (2006) ont obtenu un diamètre de 40mm entre 7-8 jours à 20 ° C, bien que Tannous (2015) a obtenu différents diamètres sur diverses variétés de pommes. Aussi, Gong *et al.* (2019b) ont marqué un développement exponentiel des diamètres de lésion (38 et 40 mm) pour la *fuji* et la *Golden* après 8 jours d'incubation. Cela peut être expliqué par le fait que différents facteurs étaient probablement impliqués dans l'agressivité de chaque isolat vis-à-vis son hôte. En effet, le niveau de maturité du fruit hôte (immature, mature ou

trop mures) ainsi que le type de l'espèce hôte (souches) affectent l'étendue de l'invasion de *Penicillium expansum* (Buron-Moles *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2020).

L'étape de production de patuline *in vivo* par les trois souches sélectionnées a pour but la mise en évidence de la virulence et l'agressivité de ces souches. En effet l'extraction liquide à l'acétate d'éthyle, une concentration au rotavapor et une purification par chromatographie sur colonne ont permis d'obtenir diverses fractions qui ont été analysées par CCM. Ces étapes d'extraction de la patuline ont été établies par l'AOAC et ont été adoptées par plusieurs auteurs (Oliveira *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2011; Welke *et al.*, 2011). La détection de la patuline produites dans les pommes inoculées par les trois souches de *Penicillium expansum* a été réalisée en premier lieu par CCM. Les profils chromatographiques des diverses fractions ont révélé des spots d'intensité importante correspondant à la patuline élaborée par la souche *Penicillium expansum* MN904448 (S7). De même, la souche (S3) *Penicillium expansum* MT023795 produit la patuline mais d'une façon moins remarquable que la première souche. Cependant, la souche (S4) *Penicillium expansum* MN904449 semble être la moins performante et cela est traduit par la présence des spots de patuline marqués par une très faible fluorescence.

Pour une meilleure quantification de patuline produite *in vivo*, les technique de séparation moderne sont les plus fiables et reproductibles. Beltran *et al.* (2014) ont identifié et quantifié la patuline dans les pommes et leurs produits dérivés par UPLC. De même, Karakose *et al.* (2015) ont utilisé l'HPLC à détection PDA pour la quantification de patuline dans les produits à base de pommes destinés aux enfants en bas âge. Dans notre étude les analyses UHPLC effectuées sur des fractions issues des tissus de pommes inoculées par nos trois souches pathogènes ont révélé que les résultats CCM du test *in vivo* sont en parfait accord avec celles de UHPLC.

En effet, la souche S7 s'est montrée performante en sécrétant une quantité de patuline très importante (469.4 µg/mL) qui dépasse les normes établies, suivie de la souche S3 qui produit aussi une bonne concentration (360 µg/mL) en 9 jours à 25°C. En revanche, la souche S4 produit des quantités très inférieures par rapport aux deux autres souches (3µg/mL). Ces quantités de patuline diffèrent d'une étude à une autre. Celli *et al.* (2009) ont montré la contamination naturelle des pommes par la patuline avec des concentrations allant à 120mg/kg. Par conséquent, Abramson *et al.* (2009) ont obtenu une concentration de patuline de 100 µg / mL dans une culture YES. De plus, Reddy *et al.* (2010) ont testé la pathogénicité de plusieurs souches de *Penicillium expansum* sur des pommes et d'autres fruits (abricots,

kiwis, pêches et prunes) et ont obtenu une production de patuline de 800 µg / kg sur les pommes. Aussi, Coton *et al.* (2020) ont enregistré une concentration en patuline estimée à 40000ng/g de pommes. La quantité de patuline produite varie d'une souche à l'autre et c'est spécifique à la souche elle même. Garcia *et al.* (2011) ont suggéré que la production de mycotoxines est influencée par différents facteurs tels que la température, l'aération du substrat, l'activité de l'eau, la concentration d'inoculum, l'état physiologique de la moisissure, l'information génétique, l'âge de l'isolat, etc. Dans notre étude, les tests de pathogénicité réalisés avec les trois pathogènes sont en parfaite accord avec les résultats des tests de production de patuline *in vivo*.

En effet, la souche *Penicillium expansum* MN904448 (S7) produit les plus grandes lésions. Elle est pathogène pour les pommes car elle a induit la maladie de pourriture bleue, et elle est la plus virulente car elle a produit la quantité la plus importante de patuline *in vivo*. De même, la souche *Penicillium expansum* MT023795 (S3) mais de façon moins remarquable que la souche S7. En revanche, la souche *Penicillium expansum* MN904449 (S4) cause l'infection de pourriture bleue mais avec un degré inférieur par rapport aux deux autres souches et produit par ailleurs, une très petite quantité de patuline ce qui fait qu'elle soit la moins virulente parmi ces trois pathogènes. Selon la définition de Yoder (1980), la pathogénicité est un terme qualitatif qui fait référence à la capacité d'un champignon à provoquer une maladie; tandis que la virulence est un terme quantitatif qui se réfère à la quantité ou l'étendue de la maladie. En se basant sur l'importance des mycotoxines dans la pathogenèse des plantes, certaines études ont porté sur le rôle de la patuline dans l'agressivité de *Penicillium expansum*. Sanzani *et al.* (2012) ont montré que la patuline pourrait être impliquée dans la pathogénicité et la virulence de *Penicillium expansum*, et ce en testant des souches mutantes et des souches sauvages de *P. expansum in vivo*. Ils ont pu démontrer que les souches de type mutantes ont pu produire la patuline mais de manière minime par rapport aux souches sauvages.

De plus, l'incidence et la gravité de l'infection induites sur les pommes inoculées par les souches mutantes étaient plus faibles que celles inoculées avec les souches de type sauvage. Selon Snini *et al.* (2014), la patuline peut être considéré comme un facteur de virulence et non de pathogénicité. Ce qui peut expliquer le fait que la souche S4 et pathogène car elle se développe et a provoqué la macération des tissus de pommes. Par contre, la présence de faible quantité en patuline produite par cette souche a diminué la vitesse de développement des symptômes. Nos résultats vont dans le même sens de ceux obtenus par Snini *et al.* (2016).

D'autres paramètres sont à prendre en considération. La composition des pommes en sucres ou en composés phénoliques peut aussi être un facteur influençant l'infection et la production de patuline par *Penicillium expansum*. Des études portant sur l'incidence des composés phénoliques sur la production de mycotoxines ont été réalisées chez différentes espèces fongiques. Une étude a démontré l'inhibition *in vitro* de la biosynthèse d'Aflatoxine B1 par trois acides phénoliques (Hua *et al.*, 1999). D'autres travaux ont mis en évidence l'inhibition de la production d'Ochratoxine A et la croissance de diverses espèces du genre *Aspergillus* par des composés phénoliques (Palumbo *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2009).

Actuellement, une seule étude rapporte l'effet de plusieurs composés phénoliques sur la croissance et la production de patuline par *Penicillium expansum*. La quercétine et l'umbélliférone semblent être les plus efficaces face à une attaque par ce pathogène (Sanzani *et al.*, 2009). Cependant, aucune corrélation entre la croissance de *Penicillium expansum* et l'accumulation de patuline n'a été démontrée.

Par ailleurs, la recherche de la patuline dans les fruits de pommes infectés naturellement et destinés à la consommation directe a été réalisée. Des pommes de la variété *Golden delicious* présentant des symptômes de la pourriture bleue ont fait l'objet d'extraction liquide à l'acétate d'éthyle et l'identification de la patuline a été effectuée par CCM.

Les résultats obtenus montrent l'apparition de spots jaune-orangé qui correspondent à la patuline, en se basant sur le spot de standard et au R_f . En effet, une quantité de patuline a été détectée dans les tissus de ces pommes, cette présence peut être expliquée par une contamination par *Penicillium expansum*.

Ces résultats corroborent à ceux rapportés par Al saree *et al.* (2010) qui ont déterminé la présence naturelle de patuline dans les pommes par la technique de CCM. Plusieurs études dans ce sens ont été effectuées. Celli *et al.* (2009) ont analysé 35 pommes de la variété *Fuji* naturellement infectées par des quantités variables de patuline. De même, Marin *et al.* (2011) et Zouaoui *et al.* (2015) ont mis en évidence la contamination des fruits de pommes, des produits à base de pommes (confiture, jus, et aliments pour bébé) par la patuline. Hussain *et al.* (2020) ont enregistré de différentes concentrations en patuline dans les pommes destinées à la consommation directe. Le risque de contamination par cette mycotoxine est très élevé malgré les pratiques d'hygiène et les bonnes conditions de conservation adoptées (AFSSA, 2009).

De plus, l'existence naturelle de la patuline dans des pommes destinées à la consommation est considérée comme biomarqueur d'effet. Cette caractéristique indique les changements physico-chimiques (pourriture bleue et macération des tissus) induits dans les pommes et révèle ainsi, leur exposition au pathogène *Penicillium expansum*.

En effet, à notre connaissance, il n'existe pas dans la bibliographie des recherches s'orientant dans ce volet d'étude caractérisant la patuline comme biomarqueur d'effet dans les pommes et, de même l'étude de ses caractéristiques de biomarqueur d'effet dans les fluides biologiques (Vidal *et al.*, 2019).

Après avoir testé la capacité des souches sélectionnées à produire la patuline *in vivo*, l'objectif s'oriente vers la mise en évidence de la capacité de cette mycotoxine à diffuser à partir de la zone infectée aux parties non infectées. D'après Marin *et al.* (2006), il est très important d'enlever toute partie de pommes qui semble être contaminée par la patuline avant transformation. Toutefois, parce que la patuline est un composé hydrosoluble de faible poids moléculaire, elle est potentiellement capable de diffuser de la partie décomposée vers les zones visiblement non affectées.

De plus, sa stabilité thermique à des niveaux de pH bas la mycotoxine ne peut pas être éliminée des produits contaminés par pasteurisation. Afin de tester cette spécificité de la patuline, la souche S7 étant la plus virulente, a été utilisée pour cet objectif. En effet la souche a été inoculée dans des pommes saines incubées à 25°C jusqu'à apparition des lésions. Des sections à partir de la zone d'inoculation (S0) de 1cm d'épaisseur (S1 à S4) ont été analysées.

Les résultats obtenus dans cette section ont permis de conclure que la patuline produite par la souche S7 *in vivo* est capable de migrer de la zone S0 (partie infectée) à la zone S1 et S2 (parties non infectées). En effet, une diffusion de patuline depuis le site d'inoculation aux tissus sains a été observée par Rychlik *et al.* (2001), de même pour Bandoh *et al.* (2009) et Coton *et al.* (2020). Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Wei *et al.* (2017).

La présence de patuline en dehors de la lésion démontre le risque de contamination par la patuline dans le tissu sain, et ainsi nous ne pouvons pas exclure sa présence dans apparemment des pommes non infectées.

Conclusion et
perspectives

6- Conclusion et perspectives

Dans cette étude, l'exploration des échantillons de pommes et d'abricots provenant de la wilaya de Batna, a permis d'isoler 23 isolats fongique. Afin de sélectionner les isolats à potentiel mycotoxinogène, un test d'antibiose de diffusion sur agar a été réalisé, ce qui a permis de sélectionner deux isolats comme producteur de mycotoxines et le troisième isolat a été sélectionné suivant sa pathogénicité *in vivo*. L'identification morphologique et moléculaire de ces isolats a montré qu'il s'agit de trois souches de *Penicillium expansum* en l'occurrence; *Penicillium expansum* S3 (MT023795), *Penicillium expansum* S4 (MN904449) et *Penicillium expansum* S7 (MN904448). Il a été conclu que les fruits produits dans l'Est Algérien sont contaminés par des souches fongiques mycotoxinogènes.

D'autre part, la culture des trois souches dans le milieu de fermentation liquide (YES) a permis de mettre en évidence la capacité des souches à produire des métabolites secondaires toxiques diverses. De plus, elle a permis de conclure la présence de patuline dans les cultures des trois souches de *Penicillium expansum*.

La séparation des différents métabolites issus des trois cultures a été effectuée par GC-MS. Cela a permis de caractériser et d'identifier la molécule de patuline et de confirmer sa présence dans les trois cultures de *Penicillium expansum*.

Le test de pathogénicité *in vivo* réalisé sur des pommes saines de la variété *Golden deliciou* et *Fuji* a permis de démontrer que les trois souches, ont le pouvoir d'induire des lésions brunes, molles et aqueuses dans les pommes. Il a été conclu de cette partie, que les trois souches de *Penicillium expansum* sont des agents causals des symptômes typiques de pourriture bleue des pommes en post-récolte.

Un second test *in vivo* sur les pommes de la variété *Golden delicious* effectué à 25°C pendant 9 jours, a permis de conclure que *Penicillium expansum* S7 (MN904448) provoque les lésions de diamètre le plus important suivi de *Penicillium expansum* S3 (MT023795). En revanche, *Penicillium expansum* S4 (MN904449) induit les lésions les moins remarquables par rapport aux deux autres. D'un autre côté, il a été montré dans le même test que la production de la patuline *in vivo* varie d'une souche à l'autre.

La patuline produite par *Penicillium expansum* S7 (MN904448) atteint 469.4µg/ml, 360µg/ml produite par *Penicillium expansum* S3 (MT023795) et 3µg/ml par *Penicillium expansum* S4 (MN904449).

Il a été conclu de cette partie que *Penicillium expansum* (MN904448) est un pathogène potentiel, et que la patuline joue le rôle d'un facteur de virulence qui induit la vitesse de développement de la maladie.

La recherche de la patuline dans les pommes présentant des lésions naturellement, a permis de mettre en évidence la contamination naturelle des pommes destinées à la consommation directe. Ce qui permet de se prononcer sur les dangers engendré par l'ingestion d'aliments contaminés par cette mycotoxine sur le consommateur.

Enfin, l'étude de la capacité de la patuline à diffuser des tissus infectés aux parties non infectées a permis de conclure que, la mycotoxine est capable de diffuser dans le fruit même après avoir enlevé tout la partie infectée, et cela par sa présence dans les sections adjacentes. Cette constatation permet de conclure que cette caractéristique est suffisante pour l'utiliser comme marqueur d'effet de la présence de la mycotoxine dans les différentes parties saines de la pomme.

Au terme de cette recherche, de nombreuses perspectives peuvent en découler. En effet, des études plus approfondies sont nécessaires concernant plusieurs points, à savoir :

- L'évaluation en amont, de la contamination par la patuline des produits à base de pommes commercialisés en Algérie et destinés directement à la consommation ;
- La recherche de microorganismes de grade '**Generally Recognized As Safe**' (SAFT) antagonistes vis-à-vis *Penicillium expansum*, afin de réduire sa prolifération en post-récolte et qui inhibe, par conséquent, la production de la patuline dans le fruit.

Références
bibliographiques

Références Bibliographiques

Abass AB, Ndunguru G, Mamiro P, Alenkhe B, Mlingi N, Bekunda M (2014). Post-harvest food losses in a maize-based farming system of semi-arid savannah area of Tanzania. *J. Stored. Prod. Res.* 57: 49-57.

Abramson D, Lombeart G, Clear RM, Sholberg P, Trelka R, Rosin E (2009). Production of patulin and citrinin by *Penicillium expansum* from British Columbia (Canada) apples. *Mycotoxin.Res.* 25: 85-88.

Adams MR (2002). Toxigenic fungi. *Food Microbiology*. RSC, UK, 282-301.

AFSSA (2006). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique”. AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines.pdf>

AFSSA (2009) Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Rapport final : <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf>.

Alegbeleye OO, Singleton I, Sant’Ana AS (2018). Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. *Food.Microbiol.* 73:177–208.

Al saree OJ, Jassim KN, Hassen Ahmed D (2010). Determination of Patulin by TLC from Mouldy Apples. *Iraqi J.Med.Veteri.* 34(1): 210-220.

Alves I, Oliveira NG, Laires A, Rodrigues AS, Rueff J (2000). Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis.* 15: 229–234.

Ammrouche AI (2013). Etude *in vitro* de l’effet antifongique des huiles extraites de plantes médicinales et leurs effets chez des rats Wistar contaminés par les mycotoxines. Thèse de doctorat. Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen.

Andersen B, Smedsgaard J, Frisvad JC (2004). *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *J. Agric. Food. Chem.* 52: 2421-2428.

Anderson de Souza SR, Osenthal A, Rodriguez de Massaguer P (2008). The fate of patulin in apple juice processing: a review. *Food.Res.Inter.* 41: 441-453.

AOAC (2000). Official Methods on Analysis of AOAC International Method 974.18 Patulin in apple juice Thin layer Chromatography Method, Natural Toxins. Chapter 49.

Artigot MP, Loiseau N, Laffitte J, Mas-Reguieg L, Tadrict S, Oswald IP, Puel O (2009). Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. *Microbiology.* 155(5): 1738-1747.

Atoui AK (2006). Approche de mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius* : étude moléculaire et physiologique. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

Baert K, Devlieghere F, Flyps H, Oosterlinck M, Ahmed M, Rajkovic´ A, Verlinden B, Nicolai B, Debevere J, De Meulenaer B (2007). Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *Int.J.Food.Microbiol.* 119: 170–181.

Ballester, AR, Marcet-Houben M, Levin E, Sela N, Selma-Lazaro C, Carmona L, Gabaldon, T (2015). Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe.Inter.* 28 :232–248.

Bandoh S, Takeuchi M, Ohsawa K, Higashihara K, Kwamoto Y, Goto T (2009). Patulin diffusion in decayed apple and its reduction. *Inter.Biodeter.Biodeg.* 63: 379-382.

Barad S, Brown Horowitz S, Kobilier I, Sherman A, Prusky D (2014). Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*. *Mol. Plant-Microb.Interac.* 27(1): 66-77.

Barhoumi R, Burghardt RC (1996). Kinetic analysis of the chronology of patulin- and gossypol-induced cytotoxicity *in vitro*. *Fundamental.Appl.Toxicol.* 30: 290-297.

Bassett EW, Tanenbaum SW (1958). The biosynthesis of patulin: II. The general physiology of several strains of *Penicillium patulum*. *Biochimica. Biophysica. Acta* 28: 247-260.

- Bassett** EW, Tanenbaum SW (1960). Acetyl-coenzyme A in patulin biosynthesis. *Biochimica. Biophysica. acta.* 40: 535-537.
- Baviskar** RN, Dekate HM (2016). *Penicillium expansum* toxins correlate with post-harvest fruit rot of apple (*Pyrus malus* L.). *Int. J. Life. Scie.* 4(1): 148-150.
- Beltrán** E, Ibáñez M, Sancho JV, Hernández F (2014). Determination of patulin in apple and derived products by UHPLC–MS/MS. Study of matrix effects with atmospheric pressure ionisation sources. *Food.Chem.* 142: 400-407.
- Bennett** JW, Klich M (2003). "Mycotoxins" *Clinical.Microbiol.Reviews.* 16(3): 497-516.
- Bentley** R, Bennett JW (1999). Constructing polyketides: from Collie to combinatorial biosynthesis. *Ann.Rev. Microbio.* 53(1): 411-446.
- Betina** A, V (1989). Chromatographic methods as tools in the field of mycotoxins. *Chromatogr.* 477 (2): 187-233.
- Birch** AJ, Blance GE, Smith H (1958). 924. Studies in relation to biosynthesis. Part XVIII. Penicillic acid. *J. the Chemical Society* 4582-4583.
- Birkinshaw** JH, Bracken A, Raistrick H (1943). Studies in the biochemistry of microorganisms: 2. Gentisyl alcohol (2: 5-dihydroxybenzyl alcohol), a metabolic product of *Penicillium patulum* Bainier. *Biochem.J.* 37(6): 726.
- Blumenthal CZ (2004)**. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory.Toxicol.Pharmacol.* 39: 214- 228.
- Boenisch** MJ, Schafer W (2011). *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC.plant.biology.* 11(1): 110.
- Boettger** D, Hertweck C (2013). Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids. *Chem.BioChem.* 14(1): 28-42.
- Bondou** P (1992). Maladies de conservation des fruits à pépins. Pommes et poires, Editions INRA.

- Botton** B, Bretton A, Fever M, Gautier S, Guy Ph, Larpent JP, Reymond P, Sanglier J J, Vayssier Y, Veau P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, (edn) Masson, Paris.
- Bokhari** FM, Aly MM (2009). Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. *Adv.Biol.Res.* 3: 71-78.
- Bouchet** P, Guignard J.L, Pouchus Y.F, Villard J (2005). *Les champignons*. Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson. 2ème édition.
- Bourdiol** D, Escoula L, Salvayre R (1990). Effect of patulin on microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages. *Food.Chem .Toxicol.* 28(1): 29-33.
- Bourles** E (2010). Aptitude variétale des pommes à la transformation : Recherche d'indicateurs biochimiques de l'évolution de la texture et de marqueurs d'intérêt nutritionnel. Thèse de doctorat. Université d'Angers.FRANCE.
- Bramki** A, Frahtia Me, Jaouani A, Dehimat L, Kacem Chaouche N (2019). Extraction and preliminary Study of antibacterial compounds of three species of *Aspergillus* genus. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 27 (2) : 26-34.
- Brakhage** AA (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature.Revi.Microbiol.* 11(1): 21-32.
- Brock** TD , Madingan MT, Martingo JM (1994). Metabolism, biosynthesis and nutrition. In "Biology of microorganisms". Prentice-Hall international Inc. New Jersey, pp: 89-124.
- Bryden** W L (2016). Mycotoxins in the food chain: human health implications. *AsPac. J.Clinical.Nutri.* 16(1): 95-101.
- Bruns** TD, White TJ, Taylor JW (1991). Fungal molecular systematics. *Annual review of Ecology, Evolution and Systematics*, 22: 525–564.
- Bullerman** LB, Olivigni FJ (1974). Mycotoxin producing potential of molds isolated from cheddar cheese. *J.Food.Scie.* 39(6): 1166-1168.
- Bu'Lock** , J D, Hamilton D, Hulme MA, Powell AJ, Smalley HM, Shepherd D Smith GN (1965). Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*.

Canad.J. microbiology. 11(5): 765-778.

Buron-Moles G, Torres R, Teixidó N, Usall J, Vilanova L, Viñas I (2015). Characterisation of H₂O₂ production to study compatible and non-host pathogen interactions in orange and apple fruit at different maturity stages. *Postharv.Biol. Technol.* 99: 27-36.

Cabrera de Oliveira R, Bando E, Machinski Junior M (2007). Intralaboratory optimization and validation of a method for Patulin determination in grapes by thin-layer chromatography. *Braz.J.Microbiol.* 38: 304-308.

Cairns-Fuller V, Aldred D, Magan N (2005). Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *J. Appli.Microbiol.* 99: 1215-1221.

Cano P, Puel O, Oswald IP (2016). Mycotoxins: Fungal secondary metabolites with toxic properties. In , *Fungi. Applications and management strategies.* p. 496

Cardoso PG, Queiroz MVd, Pereira OL, Araújo EFd (2007). Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. *Braz.J. Microbiol.* 38(1): 71-77.

Carvalho FP (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food. Ener. Secu.* 6(2): 48–60.

CAST (Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA) 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems, Task force report No. 139/January 2003.

Celli MG, Coelho AR, Wosiacki G, Boscolo M, Garcia Cruz CH (2009). Patulin determination in apples with rotten areas. *World.Mycotox.J.* 2(3): 279-283.

Ciegler A, Beckwith AC, Jackson LK (1976). Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl.Enviro.Microbiol.* 31: 664-667.

Ciegler A (1977). Patulin." *Mycotoxins in human and animal health.* Pathotox Publishers, Inc.: 609-624.

Chabasse D, Bouchara J.P, De gentile L, Brun S, Cimmon B, Penn P (2002). Cahier de Formation, les moisissures d'intérêt médicale.

Chapeland- Leclerc F, Papon N, Noël T, Villard J (2005) Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoles). *Revue Française des Laboratoires*, 373.

Chen L, Ingham BH, Ingham SC (2004). Survival of *Penicillium expansum* and patulin production on stored apples after wash treatments. *J. Food. Sci.* 69(8): 669-675.

Chen Y, Li B, Zhang Z, Tian S (2017). Induction and quantification of patulin production in *Penicillium* species. *Bio. Protoc.* 7(11): e2324. DOI: [10.21769/BioProtoc.2324](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2324).

Colakoğlu, G (2002). Extractions of *Rhizopus nigricans* Ehrenberg and *Penicillium expansum* (Link) Thom from allergenic microfungi and application of toxicity tests. *Turk. Electronic. J. Biotechnol.* : 1-5.

Correia D (2011). Le gout moisi-terreux du vin : contribution a la caractérisation cinétique et métabolique des moisissures associées à ce défaut organoleptique. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.

Coton M, Bregier T, Poirier E, Debaets S, Arnich N, Coton E, Dan-tigny P (2020) Production and migration of Patulin in *Penicillium expansum* molded apples during cold and ambient storage. *Int. J. Food. Microbiol.* 313: 1-7.

Dao HP (2005). Caractérisation de certains gènes polycétones synthases chez *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide pénicillique. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT.

Demirel R, Sariozlu NY, İlhan S (2013). Polymerase chain reaction (PCR) identification of terverticillate *Penicillium* species isolated from agricultural soils in eskişehir province. *Braz. Archives. Biology.Technol.* 56(6): 980-984.

Devaraj H, Devaraj N (1987). Rat intestinal lipid changes in patulin toxicity. *Indi.J.experim. biology.* 25(9): 637.

Dix NJ, Webster J (1995). Fungi of Extreme Environments. In: Fungal Ecology. Springer, pp 322-340.

Donmez-Altuntas H, Gokalp-Yildiz P, Bitgen N, Hamurcu Z (2013). Evaluation of genotoxicity, cytotoxicity and cytostasis in human lymphocytes exposed to patulin by using the cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN cyt) assay. *Mycotoxin.Res.* 29(2): 63-70.

Dragacci S, Grosso F, Fremy J (2005). Analyse et détection des mycotoxines. Editions TI Sciences et Techniques, p 3330

Drusch S, Kopka S, Kaeding J (2007). Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food.Chem.* 100(1): 192-197.

El Alami N, EL Attari S (2019). Use of Plant Extracts in the Control of Post-Harvest Fungal Rots in Apples. *J.Bot.Res.* 1(3):27-41.

EL Hajj Assaf C (2018) Patulin, main mycotoxin of the apple industry: regulation of its biosynthetic pathway and influence of processing factors in cloudy apple juice production. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

El Hajj Assaf C, Snini SP, Tadriss S, Bailly S, Naylies C, Oswald IP (2018). Impact of veA on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. *Mol.Plant.Pathol.* 19: 1971–1983.

El hariry H, Bahobial AA, Gherbawy Y (2011). Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. *Food.Chem.Tox.* 49: 941-946.

El HINDI R, Al Najada AR, Mohamed SA (2011). Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: Screening of plant cell wall degrading enzymes. *Afr.J.Microbiol.* 5(4): 443-448.

El khoury A (2007). Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

Escoula L, Henry G (1974). Moisissures toxigènes des fourrages ensilés. I - présence de patuline dans les fronts de coupe d'ensilages. *Annales de Recherches Veterinaires* 5: 423-432.

F.A.O (2003) Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation

humaine et animale à l'échelle mondiale en 2003. ISSN 1014-2908. Etude FAO alimentation et nutrition 81.

FAO (2009). Manuel sur l'application du Système de l'analyse des risques - points critiques pour leur maîtrise (HACCP) pour la prévention et le contrôle des mycotoxines. Étude Alimentation et Nutrition. N°73.

FAO (2018). Case studies on managing quality, assuring safety and reducing post-harvest losses in fruit and vegetable supply chains in South Asian Countries.

FAO (2019). Production des pommes en Algérie en 2019. FAOSTAT : www.fao.org/faostat/en/#data/QC/

Frisvad JC, Filtenborg O (1983). Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Envir.Microbiol.* 46(6): 1301-1310.

Frisvad JC, Bridge PD, Arora DK (1998). Chemical Fungal Taxonomy. Marcel Dekker Inc. New York, 398p.

Frisvad CJ, Samson AR (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Stud .Mycol.* 49: 1-174.

Frisvad JC, Frank JM, Houbraken J, Kuijpers AFA, Samson RA (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology.* 50(1): 23-43.

Funes GJ, Resnik SL (2009). Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food.Cont.* 20: 277-280.

Garcia D, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S (2011). Intraspecific variability of growth and patulin production of 79 *Penicillium expansum* isolates at two temperatures. *Int. J.Food. Microbiol.* 151: 195-200.

Gillot G, Jany J L, Poirier E, Maillard MB, Debaets S, Thierry A, Coton E, Coton M (2017). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *Int. J. Food. Microbiol.* 241 : 141-150.

Golan RB, Paster N (2008). Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Ed.Elsevier.first.edition.

- Gong D**, Bi Y, Li Y, Zong Y, Han Y, Prusky D (2019a). Both *Penicillium expansum* and *Trichothecium roseum* Infections Promote the Ripening of Apples and Release Specific Volatile Compounds. *Front.Plant.Sci.* 10: 1-14.
- Gong D**, Bi Y, Jiang H, Xue S, Wang Z, Li Y, Zong Y (2019b). A comparison of postharvest physiology, quality and volatile compounds of ‘Fuji’ and ‘Delicious’ apples inoculated with *Penicillium expansum*. *Postharv.Biol.Technol.* 150: 95-104.
- Guarro J**, Gené J, Stchigel AM (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinic. Microbiol.Rev.* 12 (3): 454–500.
- Guezlane-Tebibel N**, Bouras N, Oueld El haj MD (2016). LES MYCOTOXINES: UN DANGER DE SANTÉ PUBLIC. *Alg.J.Arid.Envi.* 6(1): 32-49.
- Guiraud JP**. (1998). Microbiologie alimentaire, (edn) Dunod. Paris.
- Guo Y**, Zhou Z, Yuan Y, Yu T (2013). Survey of patulin in apple juice concentrates in Shaanxi (China) and its dietary intake. *Food.Control.* 34: 570-573.
- Gutarowska B**, Kosmowska M, Wiszniewska M, Palczyński C, Walusiak-Skorupa J (2012). An investigation of allergenic proteins produced by moulds on building materials. *Indoor.Built.Environ.* 21(2): 253-263.
- Hammami W**, Al Tahani R, Fiori S, Al Meer S, Atia FA, Rabah D, Migheli Q, Jaoua S (2016). Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. occurrence in apples and apple-based products including baby food. *J. Infect. Dev. Ctries.* 11(4): 343-349.
- Hamza LF**, Kamal SA, Hameed IH (2015). Determination of metabolites products by *Penicillium expansum* and evaluating antimicrobial activity. *J. Pharmaco. Phyto.* 7 (9): 194-220.
- Harwig JP**, Scott MD, Stoltz R, Blanchfield BJ (1979). Toxins of molds from decaying tomato fruit. *Appl.Environ.Microbiol.* 38(2): 267-274.
- Hayes AW**, Phillips TD, Williams WL, Ciegler A (1979). Acute toxicity of patulin in mice and rats. *Toxicology.* 13: 91-100.
- Henson J**, French R (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.

Hibbett DS, Nilsson RH, Snyder M, Fonseca M, Constanzo J, Shonfeld M (2005).

Automated phylogenetic taxonomy: an exemple in the homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi). *Systemic.Biology*. 54 : 660-668.

Hua SS, Grosjean OK, Baker JL (1999). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in appl. Microbiol.* 29(5): 289-291.

Hussain S, Asi MR, Iqbal M, Akhtar M, Imran M, Arino A (2020). Surveillance of Patulin in Apple, Grapes, Juices and Value-Added Products for Sale in Pakistan. *Foods*. 1744(9): 1-12.

Iamanaka BT, Taniwaki MH, Menezes HC, Vicente EM, Fungaro HP (2005). Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food.Addt.Contam.* 22(12): 1258-1263.

IARC (1997). Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 56.

Ignoffo CM (1988). CRC handbook of natural pesticides. Volume V. Mlcrobial insecticides. Part A. Entomogenous protozoa and fungi. Editeur Ignoffo, C.M. CRC Press.Inc. Florida, 272 p.

Ionescu VM, Catana L, Catana M, Negoita E, Iorga A, Balea Campeanu G (2010). Evaluation of patulin contamination of apple juice, using high performance liquid chromatography. Chemical Bulletin of POLITEHNICA. University of Timisoara. 55: 186-8.

Jackson L, AL Taher F (2007). Factors affecting mycotoxin production in fruits (Chap 4) In Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Elseivier, USA, pp:75-81.

Jard G (2009). Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Justa-Schuch D, Heilig Y, Richthammer C, Seiler S (2010). Septum formation is regulated by the RHO4-specific exchange factors BUD3 and RGF3 and by the landmark protein BUD4 in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 76:220-235.

Jouany JPA, Yiannikouris G, Bertin, TG, Papachristou ZM, Parissi H, Ben Salem P, Morand-Fehr (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. Nutritional and foraging ecology of sheep and goats. Proceedings of the 12th Seminar of the Sub-Network on Nutrition of the FAO-CIHEAM Cooperative Research and Development Network on Sheep and Goats, Thessaloniki, Greece, 11-13 October 2007. Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes.

Karakose A, Sanli S, Sanli N, Bulduk I (2015). Evaluation of Patulin in commercial baby Foods by solid phase extraction and Liquid Chromatography PDA detection. *Czech J. Food.Sci.* 33 (1): 52-57.

Karolewicz A, Geisen R (2005). Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Syst.Appl.Microbiol.* 28(7): 588-595.

Keller NP, Hohn TM (1997). Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal.Genet.Biol.* 21(1): 17-29.

Kent J, Heatley NG (1946). Antibiotics from moulds. *Nature.* 156: 295-296.

Kharandi N, Babri M, Azad J (2013). A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS. *Food.Chem.* 141: 1619-1623.

Khorrami AR, Taherkhani M (2011). Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for pre-concentration of patulin from apple juice. *Chromatographia.* 73(1): 151-156.

Laarous L, Hendel N, Aboud JK, Ghoul M (2007). The Growth and Production of Patulin Mycotoxin by *Penicillium expansum* on Apples Fruits and its Control by the Use of Propionic Acid and Sodium Benzoate. *Arab. J.Pl. Prot.* 25: 123-128.

Lacey J (1986). Factors affecting mycotoxin production. In: Mycotoxins and phycotoxins (edited by Steyn, P.S. and Vlegaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.

Lamrani K (2007). Etude de la biodiversité des moisissures nuisibles et utiles isolées à partir des Maàsra du Maroc. Thèse de doctorat. Université Mohamed V. Rabat. Maroc

Land C J, Hult K (1987). Mycotoxin production by some wood-associated *Penicillium spp.* *Letters in Appl. Microbiol.* 4(3): 41-44.

Larsen TO, Frisvad JC, Ravn G, Skaaning T (1998). Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food.Add.Contam.* 15(6): 671-675.

Le Bars J (2002). Toxicogenesis as a fonction of the ecological conditions of the grain/microorganims system. In "Preservation and storage of grains, seeds and their by products". J. L. Multon, Ed. Lavoisier pub. New-York, Paris, pp : 347-366.

Lee DB, Kim LH, Kim JP, Han KH, Han DM (2011). Isolation and characterization of self-fertile suppressors from the sterile nsdD deletion mutant of *Aspergillus nidulans*. *J.Microbiol* 49(6): 1054-7.

Leneveu-Jenvrin C, Charles F, Barba FJ, Remize (2019). Role of biological control agents and physical treatments in maintaining the quality of fresh and minimally-processed fruit and vegetables. *Critical.Rev.Food.Sci.Nutr.* 60(17) :1-19.

Li BQ , Zong YY, Du ZL, Chen Y , Zhang ZQ, Qin GZ (2015). Genomic characterization reveals insights into patulin biosynthesis and pathogenicity in *Penicillium* species. *Mol.Plant Microbe.Interact* 28: 635–647.

Li T, Jiang G, Qu H, Wang Y , Xiong Y, Jian Q, Wu Y, Duan X, Zhu X, Hu W, Wang J, Gong L, Jiang Y (2017). Comparative transcriptome analysis of *Penicillium citrinum* cultured with different carbon sources identifies genes involved in citrinin biosynthesis. *Toxins.* 9, 69.

Li B, Chen Y, Zong YY, Shang Y J, Zhang ZQ, Xu XD, Tian SP (2019). Dissection of patulin biosynthesis, spatial control and regulation mechanism in *Penicillium expansum*. *Environ.Microbiol.* 21: 1124–1139.

Li B, Chen Y, Zhang Z, Quin J, Chen T, Tian S (2020). Molecular basis and regulation of pathogenicity and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum*. *Compr.Rev.Food.Sci.Food. Saf.* 2020:1-23.

Lindroth S, Von Wright A (1987). Comparison of the toxicities of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl.Envir.Microbiol.* 35 :1003-1007.

- Lopez-diaz** TM, Flannigan B (1997). Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. *Inter.J. food.Microbiol.* 35(2): 129-136.
- Lugauskas A (2005). Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin. *Botanica.Lithuanica.* 7: 3-16.
- Low** JP, Korsten L (2014). Pathogenic *Penicillium* spp. on Apple and Pear. *Plant.Dis.* 98: 590-598.
- Marin** S, Morales H, Hasan AHH, Ramos AJ, Sanchis V (2006). Patulin distribution in the tissue of *Penicillium expansum*-contaminated Fuji and Golden apples. *Food. Add. Contam.* 23: 1316-1322.
- Marin S, Mateo EM, Sanchis V, Valle-Algara, Ramos AJ, Jiménez M (2011). Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. *Food.Chem.* 124: 563-568
- Marin** SA, Ramos J, Cano-Sancho G, Sanchis V (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food.Chem.Toxicol.* 60: 218-237.
- Martins** ML, Gimeno A, Martins HM, Bernardo F (2002). Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots. *Food. Add. Contam.* 19: 568-574.
- Mattheis** JP, Roberts RG (1992). Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Appl. Envir.Microbiol.* 58(9): 3170-3172.
- Medeiros** FHV, Martins SJ, Zucchi TD, Melo ISd, Batista LR, Machado JdC (2012). Biological control of mycotoxin-producing molds. *Ciência .Agrotecnolo.* 36(5): 483-497.
- Menniti** AM, Neri F, Gregori R, Maccaferri M (2010). Some factors influencing patulin production by *Penicillium expansum* in pome fruits. *J.Scie.Food.Agric.* 90(13): 2183-2187.
- Michael** M, John M (2006). *Broch Biology ofMicroorganisms*, (11th edn). Prentice Hall *sanitaire*. Edition Lavoisier. 128-129
- Moreira M, Mielgo I, Feijoo G, Lema J (2000). *Biotechnol.Lett.* 22:1499-1503.

Moake MM, Padillaa Zakour OI, Worobo RW (2005). Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Compr. Rev.Food .Sci.Food.Safety* 4(1): 8-21.

Mollea C, Bosco F (2012). Mycotoxins in food. *Food.Indus.Proces - Methods and Equipment*: 170-200.

Morales H, Sanchis V, Coromines J, Ramos AJ, Marin S (2008) Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Food.Microbiol.* 25: 378–385.

Mosbah (2017). Etude de l'effet antimycotoxinogène et antihépatotoxique des extraits d'une plante utilisée dans la thérapie traditionnelle. Thèse de doctorat. Université des frères Mentouri Constantine1.

Mullis KB, Faloona EA(1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods.Enzymol.* 155: 335-350.

Nazim S, Dawar S, Tariq M, Zaki Mj (2008). Quantitative estimation of mycoflora in drinking water and fruit juices of KARACHI. *Pak. J. Bot.* 40(3): 1263-1268.

Negedu A, Atawodi S, Ameh J, Umoh V, Tanko H (2011). Economic and Health Perspectives of Mycotoxins: A Review. *Conti. J. Biomed.Sci.* 5(1) : 5–26.

Nguyen MT (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.

Nicholson P, Chandler E, Simpson DR, Thomsett M, Wilson A (2003).Molecular methods for species and chemotype detection of toxigenic fungi. *Aspects.Appl.Biology.* 68: 11-20.

Oliveira RC, Bando E, Machinski Junior M (2007). Intralaboratory optimization and validation of a method for patulin determination in grapes by thin-layer chromatography. *Braz.J.Microbiol.* 38: 304-308.

Olsen M, Jonsson N, Magan N, Banks J, Fanelli C, Rizzo A, Haikar A, Dobson A, Frisvad J, Holmes S, Olkku J, Persson SJ, Börjesson T (2003). Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final report. Quality of Life and Management

of Living Ressources. Project No. QLK1-CT-1999-00433.

O'Neill K, Damoglou AP, Patterson MF (1996). The influence of gamma radiation and substrate on mycotoxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344. *J. appl. bacteriol.* 81(5): 518-524.

Ozdemir YS, Erdoğan E, Sayin O, Kurultay Ş (2009). Changes of Patulin Concentration in Apple Products During Processing Stages: A Review. *Tarım. Bilimleri. Araştırma. Dergisi.* 2(2): 47-52.

Palumbo JD, O'Keeffe TL, Mahoney NE (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathol.* 164(5): 241-248.

Paterson RRM (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process. Biochem.* 41(7): 1467-1474.

Perez-Vasquez N (2015). Contribution au profilage des acides organiques urinaires chez l'enfant. Thèse de doctorat de l'Université Paris-Sud.

Pfeiffer EK Gro Aÿ, Metzler M (1998). Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis.* 19(7): 1313-1318.

Pfohl-Leszkowicz A (1999). Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Edition : Tec&Doc (Paris).

Pfohl-Leszkowicz A (2001). Définition et origines des mycotoxines. In Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Ed. Tec & Doc(Paris). pp3-14.

Piqué E, Vargas-Murga L, Gómez-Catalán J, De Lapuente J, Llobet JM (2013). Occurrence of patulin in organic and conventional apple-based food marketed in Catalonia and exposure assessment. *Food.Chem. Toxicol.* 60: 199-204.

Pitt JI (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*, Academic Press, London.

Pitt JI (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149 (6) : 479-492.

- Pitt** JI (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British. Medical. Bulletin* 56(1): 184-192.
- Pitt** JI, Hocking AD (2009). Fungi and Food spoilage, Third ed. Blackie Academic and Professional. London, New York, pp.243-245.
- Prescott** LM, Harley JP, Klein DA (2007). Microbiologie, 2ème édition française. Edition : DE BOECK, Bruxelles p 553- 558.
- Proctor** RH, Van Hove F, Susca A, Stea G, Busman M, Lee T, Waalwijk C, Moretti A, Ward TJ (2013). Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Mol.Microbiol.* 90(2): 290-306.
- Puel** O (2007). Bases moléculaires de la voie de biosynthèse de la patuline, mycotoxine produite par *Byssoschlamys nivea* et *Penicillium griseofulvum*. Thèse doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).
- Puel** O, Tadriss S, Delaforge M, Oswald IP, Lebrihi A (2007). The inability of *Byssoschlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoeopoxydon dehydrogenase genes. *Int. J.Food. Microbiol.* 115(2): 131-9.
- Puel** O, Galtier P, Oswald IP (2010). Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* 2(4): 613-631.
- Pose-Juan** E, Fernández-Cruz T, Simal-Gándara J (2016). State of the art on public risk assessment of combined human exposure to multiple chemical contaminants. *Trends in. Food. Sci.Technol.* 55: 11-28.
- Quillien** J-F (2002). Les mycotoxines. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Centre de Réseaux pour l'Innovation en Agriculture et Agroalimentaire (CRIAA), Paris, France, 1-24.
- Rai** MK, Bonde SR, Ingle AP, Gade AK (2012). Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety. *J.Pharma .Edu. Rese.* 3(1): 22-34.
- Ravallec** M, Riba G, Vey A (1989). Sensibilité d' *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae à l'hyphomycète entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Entomophaga.* 34 :209-217.
- Reboux** G (2006). Mycotoxines: effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie.* 46: 208-212.

- Reddy** CS, Chan PK, Hayes AW (1978). Teratogenic and dominant lethal studies of patulin in mice. *Toxicology*. 11 : 219-223.
- Reddy** KRN, Spadaro D, Lore A (2010). Potential of Patulin Production by *Penicillium expansum* Strains on various fruits. *Mycotoxin. Res.* 26: 257-265.
- Redouane** Salah S (2016). Caractérisation des fourrages pour ruminants et recherche de l'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache : étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé. Thèse de doctorat. Université des frères Mentouri.Constantine1.
- Richard** J-L, Payne GA, Desjardins AE, Norred WP, Pestka JJ, Phillips TD, Van Egmond HP, Vardon PJ, Whitaker TB, Wood G (2003). Mycotoxins : Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Edition: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, Task Force Report No. 139. January 2003.
- Ritieni** A (2003). Patulin in Italian commercial apple products. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 6086–6090.
- Roach** JAG, Brause AR, Eseile TA, Rupp HS (2002). HPLC detection of Patulin in apple juice with GC-MS confirmation of Patulin identity. *Mycotox.Food.Saf.* pp.135-140.
- Rodriguez-Carrasco** Y, Berrada H, Font G, Manes J (2012). Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction procedure and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromato. Ana.* 1270: 28-40.
- Romero**, S. M., M. R. Alberto, M. C. Manca de Nadra and G. Vaamonde (2009). Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds. *Mycotoxin. Res.* 25(3): 165-170.
- Rychlik** M, Schieberle P (2001). Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread. *Eur.Food.Res.Technol.* 212 :274–278.
- Sadfi-Zouaoui** N, Rouaissi M, Essghaier B, Hajlaoui MR, Hermosa MR, Boudabous A (2008). Identification morphologique et moléculaire d'espèces du genre *Trichoderma* isolées de différents sols Tunisiens. *Microbiol. Hyg. Alim.* 20 (57): 9-15.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of 3-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-1354.

Saint-Cyr M (2013). Impact des mycotoxines sur le microbiote intestinal humain, cas particulier du Déoxynivalénol. Thèse de doctorat. Université de Rennes1.

Saladino F, Manyes L, Luciano FB, Manes J, Fernandez-Franzon M, Meca G (2016). Bioactive compounds from mustard flours for the control of patulin production in wheat tortillas. *Food.Sci.Technol*. 66: 101–107.

Samson R.A, Hoekstra E.S, Frisvad J.C (1996). Introduction to food borne fungi. 4e édition, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands, 1-232p.

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC (2004). *Introduction to Food-and airborne Fungi*. 7th edn. Centraalbureau Voor Schimmelcultures (Ed), Baarn, the Netherlands.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natn.Acad.Sci. USA* 74 : 5463-5467.

Sanzani SM, De Girolamo A, Schena L, Solfrizzo M, Ippolito A, Visconti A (2009). Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone. *Eur. Food. Res. Technol*. 228(3): 381-389.

Sanzani SM, Reverberi M, Punelli M, Ippolito A, Fanelli C (2012). Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. *Int. J. Food. Microbiol*. 153: 323–331.

Sanzani SM, Montemurro C, Di Rienzo V, Solfrizzo M, Ippolito A (2013). Genetic structure and natural variation associated with host of origin in *Penicillium expansum* strains causing blue mould. *Int. J. Food. Microbiol*. 165: 111-120.

Schebb NH, Faber H, Maul R, Heus F, Kool J, Irth H, Karst U (2009). Analysis of glutathione adducts of patulin by means of liquid chromatography (HPLC) with biochemical detection (BCD) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Analytical. Bioanalytical.Chem*. 394(5): 1361-1373.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque A, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012). PNAS.109 (16): 6241-6246.

Sharma S, Gupta D (2015) Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A, Patulin and Their Co-Occurrence in Chilgoza Pine Nuts Marketed in Jammu, India. *Sect. B Biol. Sci.* 85(1):45–50.

Sekiguchi J, Gaucher GM (1978). Identification of phyllostine as an intermediate of the patulin pathway in *Penicillium urticae*. *Biochemistry.* 17(9): 1785-1791.

Sekiguchi, J, Gaucher GM (1979a). Isoepoxydon, a new metabolite of the patulin pathway in *Penicillium urticae*. *Biochem.J.* 182(2): 445-53.

Sekiguchi J, Gaucher GM (1979b). Patulin biosynthesis: the metabolism of phyllostine and isoepoxydon by cell-free preparations from *Pencillium urticae*. *Canad.J.Microbiol.* 25(8):881-7.

Sekiguchi, J, Shimamoto T, Yamada Y, Gaucher GM (1983). Patulin biosynthesis: enzymatic and nonenzymatic transformations of the mycotoxin (E)-ascladiol. *App.Environ.Microbiol.* 45(6): 1939-42.

Siddique MH (2012). Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in *Penicillium expansum*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

Singh J (1967). Patulin. Mechanism of Action. Springer: 621-630.

Singh D, Sharma RR (2007). Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. In: Prasad, D. (Ed.), Sustainable Pest Management. Daya Publishing House, New Delhi, India.

Smaoui S (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. INP.Toulouse.

Smith EE, Duffus EA, Small MH (1993). Effects of patulin on postimplantation rat embryos. *Archives.Envir.Contam.Toxicol.* 25(2): 267-270.

Snini S (2014). Elucidation de la voie de biosynthèse d'une mycotoxine, la patuline : caractérisation du cluster de gènes et étude de la régulation. Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

Snini SP, Tadrast S, Laffitte J, Jamin EL, Oswald IP, Puel O (2014). The gene *PatG* involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. *Int. J. Food. Microbiol.* 171: 77-83.

Snini PS, Tannous J, Heuillard P, Bailly S, Lippi Y, Zerahoui E, C Barreau, I P.Oswald, Puel O (2016). Patulin is a cultivar-dependent aggressiveness factor favouring the colonization of apples by *Penicillium expansum*. *Molec.Plant.Pathol.* 17(6) : 920–930.

Sorenson WG, Simpson J, Castranova V (1985). Toxicity of the mycotoxin patulin for rat alveolar macrophages. *Environ.Res.* 38(2): 407-416.

Soubra L (2008). Evaluation scientifique des risques toxiques liés à certaines substances chimiques (additifs alimentaires) et contaminants (mycotoxines). Thèse de doctorat. AgroParisTech.

Spadaro D, Lorè A, Garibaldi A, Gullino ML (2013). A new strain of *Metschnikowia fructicola* for postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharv. Biol .technol.* 75: 1-8.

Steyn PS (1980). The biosynthesis of mycotoxins: a study of secondary metabolism. *Academic.Press.* INC

Steyn PS (1998). The biosynthesis of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149(6): 469-478.

Tabatabaie F, Mortazavi SA, Tabatabaee F, Ebadi AG (2010). Reduction of Patulin in Apple Juice after Treatment with SO₂ and Heat. *Ind.J. Scie.Technol.* 3(5): 596-597.

Tabuc C (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. L'institut National Polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucharest.

Tannous J, El Khoury R, Snini SP, Lippi Y, El Khoury A, Atoui A, Puel O (2014). Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *Inter. J. Food.Microbiol.* 189 : 51–60.

Tannous J (2015). Patuline, mycotoxine de *Penicillium expansum*, principal pathogène post-récolte des pommes : nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d’approches préventives. Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

Tannous J, Keller NP, Atoui A, Khoury AE, Lteif E, Oswald IP, Puel O (2017). Secondary metabolism in *Penicillium expansum*: Emphasis on recent advances in patulin research. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 58: 2082–2098.

Tortora J, Funk BF, Case CL (2003). *Introduction à la microbiologie*, (edn) ISBN.Canada.

Tozlovanu M (2008). Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l’ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d’exposition et d’effet. Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT).

Traag WA, Mol JGJ, Van der lee MK, Gerssen A, Noordam MY, Hoogenboom LAP (2013). Contaminant Annual report of the National Reference Laboratory.Wageningen, RIKILT.

Trucksess MW, Tang Y (1999). Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice. *JAOAC. Intern.* 82: 1109-1114.

Van de Perre E, Jacxsens L, Van Der Hauwaert W, Haesaert I, De Meulenaer B (2013). Screening for the Presence of Patulin in Molded Fresh Produce and Evaluation of Its Stability in the Production of Tomato Products. *J. Agri. Food.Chem.* 62(1): 304-309.

Van Egmond HP, Schothorst R.C, Jonker, M.A (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 147-157.

Vansteelandt M, Kerzaon I, Blanchet E, Fossi Tankoa O, Robiou du Pont T, Joubert Y, Monteau F, Le Bizec B, Frisvad JC, Pouchus YF, Grovel O (2012). Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. *Fungal.Biol.* 116: 954-960.

- Varga J**, Due M, Frisvad JC, Samson RA (2007). Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology*. 59: 89-106.
- Vey A**, Ouiot JM, Pais M (1986). Toxémie d'origine fongique chez les invertébrés et ses conséquences cytotoxiques : étude sur l'infection de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycète, Moniliales) chez les Lépidoptères et les Coléoptères . Pathologie comparée. *C. R. Soc. Biol.* 180 :105-112.
- Vico I**, Duduk N, Vasic M, Nolic M (2014). Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit. *Pestic. phytomed.* 29(4): 257-266.
- Vidal A**, Ouhibi S, Ghali O, Hedhili A, De Saeger, De Boevre M (2019). The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food. Chem.Toxicol.* 129: 249-256.
- Vilanova L**, Vallllaura N, Torres R, Usall, J, Teixidó N, Larrigaudière C (2017). *Penicillium expansum* (compatible) and *Penicillium digitatum* (nonhost) pathogen infection differentially alter ethylene biosynthesis in apple fruit. *Physiol.Biochem.* 120: 132–143.
- Waksman SA**, Horning ES (1943). Distribution of antagonistic fungi in nature and their antibiotic action. *Mycologia*: 47-65.
- Wei DM**, XU J, Dong FS, Liu XG, Wu XH, Zheng YQ (2017). *Penicillium* and patulin distribution in pears contaminated with *Penicillium expansum*. Determination of patulin in by UHPLC-MS/ MS. *J.Integ.Agric.* 16(7): 1645-1651.
- Welke JE**, Hoeltz M, Dottori HA, Noll IB (2011). Patulin accumulation in apples during storage by *Penicillium expansum* and *Penicillium Griseofulvum* strains. *Bra. J. Microbiol.* 42: 172-180.
- White TJ**, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic. Press.* San Diego: 315-322.
- Whitlow L W** (2005). Molds and mycotoxins in feedstuffs-Prevention and treatment. Proceedings-Florida Ruminant Nutrition Symposium.

Yiannikouris A, Jouany JP (2002). Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal.Research*. 51(2): 81-100.

Yoder OC (1980). Toxins in pathogenesis. *Ann.Rev. Phytopath.* 18(1): 103-129.

Youcef Ali M (2014). Etude de l'activité anti-*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides. Thèse de doctorat de l'Université des frères Mentouri Constantine 1.

Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 : 1253–1262.

Yu L, Quiao Z, Zhao J, Zhang H, Tian H, Zhai X, Chen W (2020). Postharvest control of *Penicillium expansum* in fruits: a review. *Food.Bioscie.* 36: 4-78.

Zaied C, Abid S, Hlel W, Bacha H (2013) Occurrence of patulin in apple-based-foods largely consumed in Tunisia. *Food.Control.* 31: 263-267.

Zain ME (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *J.Saudi .Chem. Soc.* 15:129-144.

Zinedine A (2004). Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Fes.

Zhong L, Carere J, Lu Z, Lu F, Zhou T (2018). Patulin in Apples and Apple-Based Food Products: The Burdens and the Mitigation Strategies. *Toxins.* 475(10): 1-30.

Zhou T, Wang X, Ye B, Shi L, Bai X, Lai T (2018). Effects of essential oil decanal on growth and transcriptome of the postharvest fungal pathogen *Penicillium expansum*. *J.PostharvBiol.Technol.* 145: 203-212.

Zouaoui N, Sbaili N, Bacha H, Abid-Essefi S (2015). Occurrence of patulin in various fruit juice marketed in Tunisia. *Food.Control.* 51: 356-360.

Résumés

Abstract

The exploration of apples and apricots fruit samples from the Wilaya of Batna located in eastern Algeria (Aris and N'gaous) yielded 23 fungal isolates; three of them were selected as potential producers of mycotoxins by the antagonism test against sensitive bacteria. Morphological and molecular identification (DNA-ITS / β -tubulin analysis) of the isolates showed that they were 3 strains of *Penicillium expansum*, registered at GenBank under accession numbers MT023795, MN904449 and MN904448.

The ability of these three strains to produce mycotoxins *in vitro* on YES liquid fermentation medium has made it possible to demonstrate the secretion of several secondary metabolites, including patulin. The use of the GC-MS technique for the identification of the various metabolites contained in the liquid cultures of the three strains revealed the presence of patulin in the three extracts, and those three isolates are known to be patulin-producing. The *in vivo* pathogenicity test by inoculation of spore suspensions of the three strains of *Penicillium expansum* in healthy apples belonging to the varieties Golden delicious and Fuji, revealed the appearance of typical symptoms of blue rot in apples in post-harvest. The ability to produce patulin *in vivo* by the three pathogens was performed by the same previous test, using the Golden delicious variety only. This test revealed that *Penicillium expansum* (MN904448) is the most virulent strain, inducing large diameter lesions and a remarkable rate of disease development compared to the other two strains. Furthermore, this strain is capable of producing a large quantity of patulin at 25 °C in 9 days reaching 469.4 $\mu\text{g} / \text{mL}$, the strain *Penicillium expansum* (MT023795) produces 360 $\mu\text{g} / \text{mL}$, while *Penicillium expansum* (MN04449) seems to produce the least important quantity estimated at 3 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Research for patulin in the tissues of apples naturally infected with blue rot, intended for direct consumption, has shown the contamination of locally produced apples by patulin and its role as a biomarker of effect has been developed and deemed reliable. .

Indeed, evaluation of the ability of patulin to diffuse into healthy apple tissue from the rotten area revealed the presence of patulin in visually healthy areas even after removing the entire infected area. This test is, moreover, supposed to be reliable as a biomarker of effect in the field of the diffusion of mycotoxins in fruits intended for consumption.

Keywords: Patulin, *Penicillium expansum*, apples, pathogenicity, effect biomarkers.

أسفر الكشف عن عينات فاكهة التفاح والمشمش من ولاية باتنة الواقعة شرقي الجزائر (أريس و نغواس) عن 23 عزلة فطرية ، تم اختيار ثلاثة منها كمنتجات محتملين للسموم الفطرية من خلال الاختبار المضاد للبكتيريا الحساسة. كما أظهر التحديد المورفولوجي والجزيئي (تحليل DNA-ITS / β -tubulin) للعزلات أنها كانت 3 سلالات من *Penicillium expansum* مسجلة في GenBank تحت أرقام الانضمام MT023795 و MN904449 و MN904448 .

إن قدرة هذه السلالات الثلاث على إنتاج السموم الفطرية في المختبر على وسط التخمر السائل YES جعلت من الممكن إثبات إفراز العديد من المستقلبات الثانوية ، بما في ذلك الباتولين. كما كشف استخدام تقنية GC-MS لتحديد المستقلبات المختلفة الموجودة في المزارع السائلة للسلالات الثلاثة عن وجود الباتولين في جميع المستخلصات الثلاثة ، وأن العزلات الثلاثة معروفة بأنها منتجة للباتولين. كشف اختبار الأمراض في الجسم الحي عن طريق تلقيح معلقات الأبواغ لسلالات البنسليوم الثلاثة في التفاح الصحي الذي ينتمي إلى الصنفين الذهبي اللذيذ والفوجي ، عن ظهور أعراض نموذجية للتغفن الأزرق في التفاح في مرحلة ما بعد الحصاد. تم إجراء القدرة على إنتاج الباتولين في الجسم الحي بواسطة مسيبات الأمراض الثلاثة بنفس الاختبار السابق ، باستخدام الصنف الذهبي اللذيذ فقط. أظهر هذا الاختبار أن *Penicillium expansum* (MN904448) هو أكثر السلالات ضراوة ، حيث تسبب في آفات ذات قطر كبير ومعدل تطور ملحوظ للمرض مقارنة بالسلالتين الأخريين. علاوة على ذلك ، فإن هذه السلالة قادرة على إنتاج كمية كبيرة من الباتولين عند 25 درجة مئوية في 9 أيام تصل إلى 469.4 ميكروغرام / مل ، وتنتج سلالة 360 *Penicillium expansum* (MT023795) ميكروغرام / مل ، بينما يبدو أن *Penicillium expansum* (MN04449) ينتج الكمية الأقل أهمية تقدر بـ 3 ميكروغرام / مل. أظهر البحث عن الباتولين في أنسجة التفاح المصاب بشكل طبيعي بالعفن الأزرق ، والمخصص للاستهلاك المباشر ، تلوث التفاح المنتج محليًا عن طريق الباتولين ودوره كمؤشر حيوي للتأثير قد تم تطويره واعتباره موثوقًا.

كشفت تقييم قدرة الباتولين على الانتشار في أنسجة التفاح السليمة من المنطقة الفاسدة عن وجود الباتولين في المناطق الصحية بصريًا حتى بعد إزالة المنطقة المصابة بالكامل. علاوة على ذلك، من المفترض أن يكون هذا الاختبار موثوقًا به كمؤشر حيوي للتأثير في مجال انتشار السموم الفطرية في الفاكهة المعدة للاستهلاك.

الكلمات المفتاحية: باتولين ، *Penicillium expansum* ، تفاح ، أمراضية ، تأثير المؤشرات الحيوية.

Annexes

Annexe 1 : Préparation des milieux de culture

- Gélose Sabouraud

La gélose Sabouraud est un milieu recommandé pour la culture des champignons.

La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :

Peptone de viande (bovin ou porcin)..... 3g

Peptone de caséine (bovin).....3g

Peptone de soja..... 3g

Extrait de levure..... 2g

Extrait de malt.....1g

Glucose..... 19g

Phosphate monopotassique.....0.5g

Phosphate disodique..... 0.5g

Agar.....15g

Le pH est de 6.4. La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures (Delarras, 2007).

- Milieu PDA

Laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelées. Les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant une heure. Ecraser, filtrer et compléter un litre.

Composition du milieu finale :

Extrait de pomme de terre..... 1000ml

Glucose..... 20g

Agar..... 15g

Stériliser 30 minutes à 110°C (Larpen, 1997).

Le milieu de conservation PDA incliné la même composition sauf qu'il est dépourvu d'agar

- Milieu MEA

Le milieu MEA est un milieu recommandé pour la culture des mycètes.

La composition chimique de ce milieu en g/L d'eau distillée est :

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose.....	15g
Peptone.....	5g
Agar.....	15g

Le pH du milieu est ajusté à 6. Stériliser 15 min à L'autoclave à 120°C (Guiraud, 1996).

- Milieu GN Gélose nutritive

Gélose nutritive (GN) ou gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est :

Peptone.....	10
Extrait de viande.....	5
Chlorure de sodium.....	5
Gélose.....	15

pH 7.2, autoclaver 15 minutes à 120°C (Guiraud, 1998).

- Milieu CYA

K ₂ HPO ₄	1g
Solution trace des métaux	1 ml
Czapek concentré	10ml
Extrait de levure	5g
Saccharose.....	30g
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

- Czapek concentré

NaNO ₃	30g
KCl.....	5g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	5g
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.1g
Eau distillée.....	1000ml

- Solution Traces de Métaux

- CuSO₄.5H₂O.....0.5g
- ZnSO₄.7H₂O.....1g
- Eau distillée.....1000ml

Stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min. pH final 6,7

-Milieu de fermentation liquide YES (yeast extract sucrose)

- Extrait de levure.....20g
- Saccharose.....150g
- MgSO₄.7H₂O.....0.1g
- ZnSO₄.7H₂O.....0.01g
- CuSO₄.5H₂O.....0.005g
- Eau distillée.....1000ml

Autoclavage à 121°C pendant 15min. pH final pH=5.5

Annexe 2 : Préparation des tampons

- Tampon de lyse

400mM Tris-HCL..... pH=8

60mM EDTA pH=8

150mM NaCl

Autoclaver seul puis 1% SDS est ajouté par filtration avec un filtre 0.2µm

-Tampon d'acétate de Potassium (pH=4.8)

-60ml 5Macétate de Potassium

-11.5 ml acide acétique galacial

-28.5ml eau distillée

Productions
scientifiques

Publications et Communications

Les travaux réalisés ont été valorisés par une publication dans une revue internationale impactée et indexée, et des communications dans différents congrès.

Publications

Krouma Hamida, Jaouani Atef, Hamidechi Mohamed Abdelhafid, Cherfia Radia, Amor Mosbah, Kara Ali Mounira and Noredine Kacem Chaouche. *In vivo* evaluation of Aggressiveness, pathogenicity and patulin accumulation by three *Penicillium expansum* strains isolated from Algerian apples (2020). *SouthAs.J.Exp.Biol.* 10(6):464-479.

Communications internationales

-KROUMA Hamida, TOUFOUTI Hadjer, KACEM CHAUCHE Noredine et DEHIMAT Laid. Détermination de la mycoflore toxigène de quelques fruits produits dans l'Est Algérien. Séminaire International des Biotechnologies, Octobre 2015, Constantine, Algérie.

-KROUMA Hamida, KACEM CHAUCHE Noredine and DEHIMAT Laid. Isolation and selection of mycotoxigenic fungal strains from apples produced in Eastern Algeria. The 1st International Conference Microbiol Ecology, December 2015, Sétif, Algeria.

-KROUMA Hamida, MILET Asma, JAOUANI A, DEHIMAT Laid et KACEM CHAUCHE Noredine. Evaluation du potentiel mycotoxinogène de *Penicillium expansum* isolé de pommes (*Golden Delicious*). IV^{ème} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (AT-BVBR), Mars 2016, Hammamet, Tunisie.

Nom et Prénom : KROUMA Hamida	Date de soutenance		
Thème : Evaluation de la contamination fongique et mycotoxique de la chaîne de production de fruits dans L'Est Algérien : Utilisation de biomarqueurs d'effet			
<p>Résumé :</p> <p>L'exploration des échantillons de fruits de pommes et d'abricots provenant de la Wilaya de Batna située à l'Est Algérien (Aris et N'gaous) a permis d'obtenir 23 isolats fongiques, dont trois ont été sélectionnés comme producteurs potentiels de mycotoxines par le test d'antagonisme vis-à-vis de bactéries sensibles. L'identification morphologique et moléculaire (analyse d'<i>ADN-ITS/β-tubuline</i>) des isolats a montré qu'il s'agit de 3 souches de <i>Penicillium expansum</i>, enregistrées à GenBank sous les numéros d'accèsion MT023795, MN904449 et MN904448.</p> <p>La capacité de ces trois souches à produire des mycotoxines <i>in vitro</i> sur milieu de fermentation liquide YES a permis de mettre en évidence la sécrétion de plusieurs métabolites secondaires, parmi lesquels la patuline. L'utilisation de la technique de GC-MS pour l'identification des différents métabolites contenus dans les cultures liquides des trois souches a révélé la présence de la patuline dans les trois extraits, et que les trois isolats sont réputés patuline-producteurs. Le test de pathogénicité <i>in vivo</i> par inoculation des suspensions sporales des trois souches de <i>Penicillium expansum</i> dans des pommes saines appartenant aux variétés <i>Golden delicious</i> et <i>Fuji</i>, a révélé l'apparition de symptômes typiques à la pourriture bleue des pommes en post-récolte. La capacité à produire la patuline <i>in vivo</i> par les trois pathogènes a été effectuée par le même test précédent, en utilisant la variété <i>Golden delicious</i> uniquement. Ce test a révélé que <i>Penicillium expansum</i> (MN904448) est la souche la plus virulente en induisant des lésions de diamètre important et une vitesse de développement de la maladie remarquable par rapport aux deux autres souches. Par ailleurs, cette souche est capable de produire une quantité importante de patuline à 25°C en 9 jours atteignant 469.4µg/ml, la souche <i>Penicillium expansum</i> (MT023795) produit 360µg/ml, alors que <i>Penicillium expansum</i> (MN04449) semble produire la quantité la moins importante estimée à 3µg/ml. La recherche de la patuline dans les tissus de pommes infectées naturellement par la pourriture bleue, destinées à la consommation directe, a mis en évidence la contamination des pommes produites localement par la patuline et son rôle comme biomarqueur d'effet a été développé et jugé fiable.</p> <p>L'évaluation de la capacité de la patuline à diffuser dans les tissus sains de la pomme depuis la zone pourrie a révélé effectivement, la présence de la patuline dans les zones visuellement saines même après avoir enlever toute la zone infectée. Ce test est, en outre, supposé fiable comme biomarqueur d'effet dans le domaine de la diffusion des mycotoxines dans les fruits destinés à la consommation.</p>			
<p>Mots clés : Patuline, <i>Penicillium expansum</i>, pommes, pathogénicité, biomarqueurs d'effet</p>			
<p>Laboratoire de Recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)</p>			
<p>Jury d'évaluation :</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>Président de jury : Mr. DEHIMAT L</p> <p>Directeur de thèse : Mr KACEM CHAUCHE N</p> <p>Examineurs :</p> <p style="padding-left: 40px;">Mme BAHRI F</p> <p style="padding-left: 40px;">Mme AIT KAKI A</p> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <p>Prof.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p>Prof.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p style="padding-left: 40px;">MCA.INATAA.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p style="padding-left: 40px;">MCA.Univ.Boumerdes</p> </td> </tr> </table>		<p>Président de jury : Mr. DEHIMAT L</p> <p>Directeur de thèse : Mr KACEM CHAUCHE N</p> <p>Examineurs :</p> <p style="padding-left: 40px;">Mme BAHRI F</p> <p style="padding-left: 40px;">Mme AIT KAKI A</p>	<p>Prof.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p>Prof.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p style="padding-left: 40px;">MCA.INATAA.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p style="padding-left: 40px;">MCA.Univ.Boumerdes</p>
<p>Président de jury : Mr. DEHIMAT L</p> <p>Directeur de thèse : Mr KACEM CHAUCHE N</p> <p>Examineurs :</p> <p style="padding-left: 40px;">Mme BAHRI F</p> <p style="padding-left: 40px;">Mme AIT KAKI A</p>	<p>Prof.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p>Prof.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p style="padding-left: 40px;">MCA.INATAA.Univ.Frères Mentouri Constantine 1</p> <p style="padding-left: 40px;">MCA.Univ.Boumerdes</p>		