

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة 08 ماي 1945 -قائمة-

UNIVERSITÉ 8 MAI 1945-GUELMA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Département : Biologie

Spécialité/Option : Qualité des produits et Sécurité Alimentaire

Thème

**Recherche des contaminants fongiques des fruits secs entreposés dans le
commerce de la ville de Guelma.**

Soutenu par : CHOUIBI Marwa FOUGHALI Soumia

Devant le jury composé de

Président	Benyounes A	Pr	Université 8 mai 1945 Guelma
Examineur	Laouabdia N	Pr	Université 8 mai 1945 Guelma
Encadreur	Chemmam M	Pr	Université 8 mai 1945 Guelma
Co- encadreur	Chemmam D. A	Doctorante	Université Mohamed Seddik Ben Yahia Jijel

Juillet 2021



Remerciements

Nous remercions en premier lieu, ALLAH le tout-puissant, de nous avoir donné le foie, le courage et la confiance en nous-mêmes pour pouvoir mener à terme ce présent travail.

Notre gratitude et notre profonde reconnaissance à notre promoteur: **le Pr CHEMMAM Mabrouk**, pour nous avoir fait l'honneur de nous confier la réalisation de ce sujet et nous avoir permis de travailler sous sa responsabilité en nous guidant et en nous encourageant durant la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions les membres du jury de l'université de Guelma **Pr Labdaoui N** et **Pr Benyounes A.**

Nos remerciements s'adressent très particulièrement et solennellement à la doctorante **CHEMMAM Dounya Achwak** pour avoir co-encadré et veillé à la réalisation de ce travail avec intérêt et attention.





Dédicaces



Je dédie ce travail à mes très chers parents « Rachid et Nassira »

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

Qu'Allah, le tout-puissant, vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

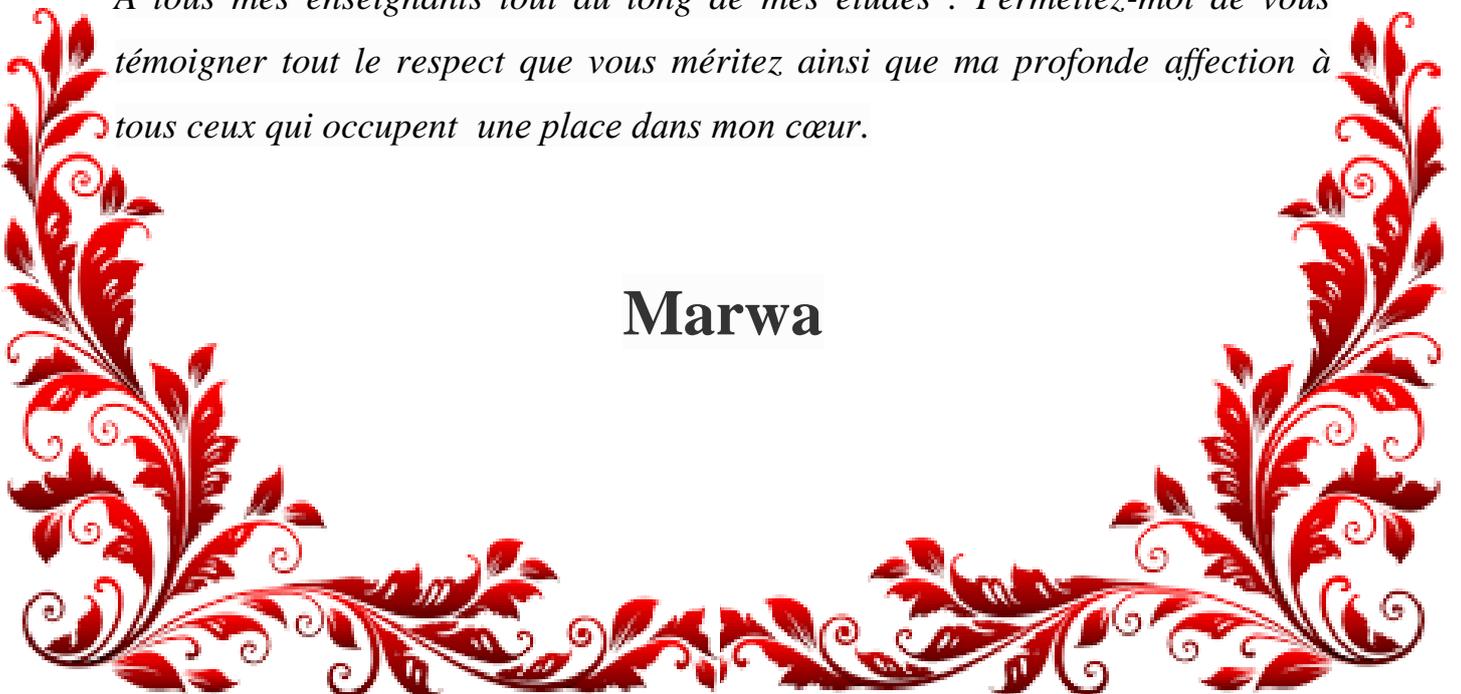
A mes chers frères « Youcef, Yaacoub, Mohamed ».

« Aness et Baraa » les petits anges qui font la joie de la famille.

A mes très chers amis « Soumia, Nabila, Sarra, Houda, Chaima, Asma, Intissar, Falah, Lina, Rima » pour tous les moments magnifiques et inoubliables que j'ai passé avec vous, pour tout l'amour, le soutien que vous m'avez offert et de votre affection dont je ne peux me passer, je vous remercie très fort et je ne vous oublierai jamais.

A tous mes enseignants tout au long de mes études : Permettez-moi de vous témoigner tout le respect que vous méritez ainsi que ma profonde affection à tous ceux qui occupent une place dans mon cœur.

Marwa





Dédicaces



Je dédie ce travail à mes très chers parents « Sebti et Zahia »

Autant de phrase et d'expressions aussi éloquentes soient elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir

A mon cher frère « Zino, Tarek »

A mes chères sœurs « Mariem et Imen »

Les petits anges qui font la joie de la famille « Rami, Sami »

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Puisse Allah vous garder et vous protéger et que l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.

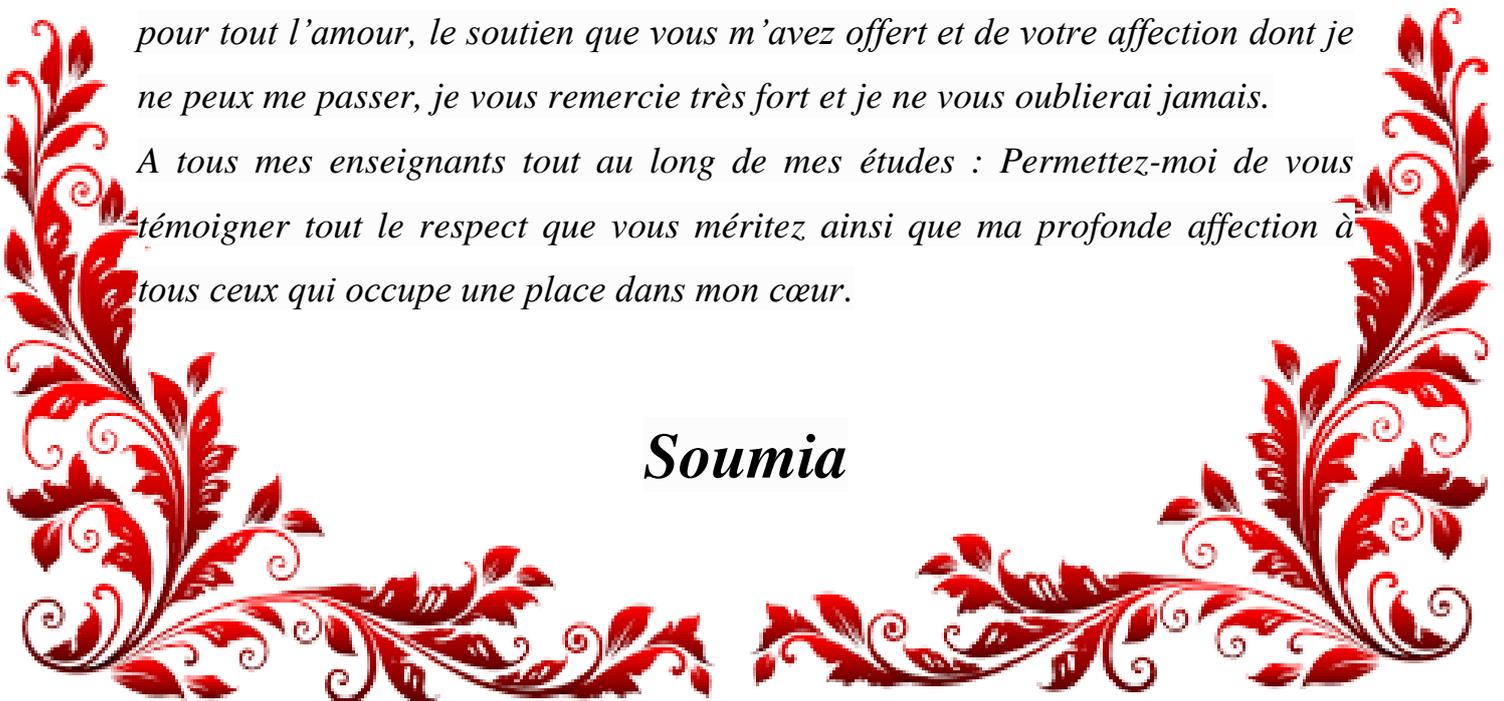
Ames tantes, mes oncles et à toute ma famille, je vous remercie pour vos encouragements.

A mon binôme Marwa et mes amies

Pour tous les moments magnifiques et inoubliables que j'ai passé avec vous, pour tout l'amour, le soutien que vous m'avez offert et de votre affection dont je ne peux me passer, je vous remercie très fort et je ne vous oublierai jamais.

A tous mes enseignants tout au long de mes études : Permettez-moi de vous témoigner tout le respect que vous méritez ainsi que ma profonde affection à tous ceux qui occupent une place dans mon cœur.

Soumia



Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des photos

Liste des abréviations

Résumé

ملخص

Abstract

Introduction

Chapitre I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 01

1. Les fruits secs 02

1.1. L'arachide

1.2. Les amandes

1.3. Les noix 03

2. Caractéristiques des fruits secs

3. Les allergènes des fruits à coques 04

Chapitre II. Les contaminants fongiques 06

1. Généralité sur les moisissures 07

1.1. Les moisissures

1.2 Classification des champignons 08

1.3. Identification des champignons

1.3.1. Identification macroscopique 09

1.3.2. Identification microscopique

1.3.3. Identification moléculaire 11

1.4. Généralités sur les mycotoxines	11
1.4.1. Les principales mycotoxines	12
2. Stockage des fruits à coque	13
3. Les principaux genres fongiques	14
3.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	
3.2. Le genre <i>Penicillium</i>	15
3.3. Le genre <i>Fusarium</i>	17
3.4. Le genre <i>Alternaria</i>	19
Chapitre III. ETUDE EXPERIMENTALE	20
1. Matériel et méthodes	21
Introduction	
1.1. Echantillonnage	
1.2. Matériel	22
1.3. Analyses	23
1.3.1. Isollements et dénombrement de la flore fongique	
1.3.1.1. Echantillon sans coque	
1.3.1.2. Echantillon avec coque	
1.4. Ensemencement	24
1.5. Identification des champignons	
1.5.1. Identification macroscopique	
1.5.2. Identification microscopique	
2. Résultats et discussion	26
2.1. Identification de la flore fongique présente	
2.1.1. <i>Aspergillus</i>	

2.1.1.1. <i>Aspergillus Niger</i> Sur MEA	26
2.1.1.2. <i>Aspergillus sp</i> Sur milieu PDA	27
2.1.1.3. <i>Aspergillus flavus</i> Sur Sabouraud chloramphénicol	28
2.1.2. <i>Penicillium</i>	29
2.1.2.1. <i>Penicillium sp 1</i> Sur milieu MEA	
2.1.2.2. <i>Penicillium sp 2</i> Sur milieu MEA	
2.1.2.3. <i>Penicillium sp 3 3</i> Sur milieu PDA	32
2.1.3. <i>Alternaria alternata</i> Sur milieu MEA	
2.1.4. <i>Rhizopus sp</i> Sur milieu PDA	33
2.1.5. <i>Mucor sp</i> Sur Sabouraud chloramphénicol	34
2.1.6. <i>Trichoderma sp</i> Sur milieu PDA	35
2.1.7. <i>Curvularia sp</i> Sur milieu PDA	36
2.1.8. <i>Ulocladium sp</i> Sur milieu MEA	37
2.1.9. <i>Cladosporium sp</i> Sur Sabouraud chloramphénicol	38
2.2. Importance des contaminations fongiques	39
2.2.1. L'arachide	
2.2.2. Amande	41
2.2.3 La noix	
2.3. Discussion	42
2.3.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	
2.3.2. Le genre <i>Penicillium</i>	
2.3.3. Le genre <i>Alternaria</i>	43
2.3.4. Les <i>Mucorales</i>	
2.3.5. Le genre <i>Trichoderma sp</i>	

2.3.6. Le genre *Curvularia* sp

43

2.3.7. Le genre *Cladosporium* sp

2.3.8. Le genre *Ulocladium* sp

Conclusion

Référence bibliographique

Annexe

Liste des figures

Figure 01 : L'arachide avec et sans coque	2
Figure 02 : L'amande avec et sans coque	3
Figure 03 : La noix avec et sans coque	
Figure 04 : Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	15
Figure 05 : Observation microscopique d'une <i>Aspergillus</i> .	
Figure 06 : Caractères morphologique du <i>Penicillium</i>	16
Figure 07 : Observation microscopique d'un <i>Penicillium</i>	17
Figure 08 : Caractères morphologiques du <i>Fusarium</i>	18
Figure 09 : Observation microscopique du genre <i>Fusarium</i>	
Figure 10 : Observation microscopique du genre <i>Alternaria</i>	19
Figure 11 : Étapes d'ensemencement (a) solution mère, (b) dépôt de 1ml d'échantillon, (c) coulage de la gélose	23
Figure 12 : Ensemencement en surface sur le milieu PDA	24
Figure 13 : Contaminants identifiés (avec et sans coque)	40
Figure 14 : Les différents contaminants fongiques de l'Arachide.	
Figure 15 : les différents contaminants fongiques de l'Amande	41
Figure 16 : les différents contaminants fongiques de la noix	42

Liste des tableaux

Tableau 01 : Les compositions nutritives des arachides, d'amandes, et noix	4
Tableau 02 : Les allergènes majeurs des arachides, d'amandes, et noix	5

Liste des photos

Photo 01 : Aspect des colonies d' <i>Aspergillus Niger</i> en face (a) et au revers (b) sur milieu MEA.	27
Photo 02 : Aspect microscopique de l' <i>Aspergillus niger</i> Grossissement $\times 10$ (a), $\times 40$ (b)	
Photo 03 : Aspect des colonies d' <i>Aspergillus sp</i> en face (a) et au revers (b) sur milieu PDA	28
Photo 04 : Aspect microscopique de l' <i>Aspergillus sp</i> Grossissement $\times 10$ (a), $\times 40$ (b).	
Photo 05 : Aspect des colonies d' <i>Aspergillus flavus</i> en face (a) et au revers (b) sur sabouraud chloramphénicol.	29
Photo 06 : Aspect microscopique de l' <i>Aspergillus flavus</i> Grossissement $\times 10$ (a), $\times 40$ (b)	
Photo 07 : Aspect des colonies de <i>Penicillium sp</i> en face (a) et au revers (b) sur MEA	30
Photo 08 : Aspect microscopique de <i>Penicillium sp</i> Grossissement $\times 40$.	
Photo 09 : Aspect des colonies de <i>Penicillium sp</i> en face (a) et au revers (b) sur MEA	31
Photo 10 : Aspect microscopique de <i>Penicillium sp</i> Grossissement $\times 40$	
Photo 11 : Aspect des colonies de <i>Penicillium sp3</i> en face (a) et au revers (b) sur milieu PDA	
Photo 12 : Aspect microscopique de <i>Penicillium sp 3</i> Grossissement $\times 40$	32
Photo 13 : Aspect macroscopique d' <i>Alternaria alternata</i> sur MEA.	
Photo 14 : Observation microscopique <i>Alternaria alternata</i> , Grossissement $\times 40$	33
Photo 15 : Aspect macroscopique de <i>Rhizopus sp</i> sur PDA	34
Photo 16 : Observation microscopique du <i>Rhizopus sp</i> , Grossissement $\times 40$.	
Photo 17 : Aspect macroscopique de <i>Mucor sp</i> sur Sabouraud Chloramphénicol	35
Photo 18 : Observation microscopique du <i>Mucor sp</i> , Grossissement $\times 40$	
Photo 19 : Aspect macroscopique de <i>Trichoderma sp</i> sur milieu PDA	36
Photo 20 : Observation microscopique du <i>Trichoderma sp</i> , Grossissement $\times 40$	
Photo 21 : Aspect macroscopique de <i>Curvularia sp</i> sur milieu PDA	37
Photo 22 : Observation microscopique du <i>Curvularia sp</i> , Grossissement $\times 40$	

- Photo 23 Aspect macroscopique d'*Ulacladium sp* sur milieu MEA 38
- Photo 24 : Observation microscopique du *Ulacladium sp*, Grossissement $\times 40$
- Photo 25 : Aspect macroscopique de *Cladosporium sp* sur Sabouraud Chloramphénicol 39
- Photo 26 : Observation microscopique du *Cladosporium sp*, Grossissement $\times 40$

Liste des abréviations

2S : Albumines

AF : Aflatoxines

As : Aspergillus

AGMI : Acide gras polyinsaturés

AGPI : Acide gras polyinsaturés

AGS : Acide gras saturé

Ca : Calcium

CIRC : Centre internationale de recherche sur le cancer

CHO : Hydrates de carbone

ED : Eau distillé

FAC : Fruit à coque

K : Potassium

LTP : Protéine de transfert

Mg : Magnésium

Na : Sodium

P : Phosphore

Pe : Penicillium

VIC : Vicillines

Leg : Légumineuses

Aw : Activité d'eau

PCR : Polymérase Chain réaction

Abstract

Our food can sometimes present health risks if the conditions of marketing, conservation, and storage are bad. Dried fruits are oleaginous fruits that are a preferable substrate for the growth and development of molds.

A total of nine samples of dried fruits (three samples of almonds, three samples of peanuts and three samples of nuts) were collected from different outlets in the city of Guelma.

After culture of samples on different media, the correlations between the microscopic and macroscopic characteristics of the isolates allowed us to identify different fungal strains on these dried fruits, with shell and without shell.

Keywords : Almonds, peanuts, nuts, molds.

ملخص

يمكن ان يشكل طعامنا أحيانا مخاطر صحية إذا كانت ظروف التسويق والحفظ والتخزين سيئة. الفواكه المجففة هي ثمار زيتية تعتبر ركيزة مفضلة لنمو وتطور الفطريات. تم جمع تسعة عينات من الفواكه المجففة (ثلاث عينات لوز ثلاث عينات من الفول السوداني وثلاث عينات من الجوز) من نقاط بيع مختلفة في مدينة قالمه. بعد زراعة العينات على أوساط مختلفة سمحت لنا العلاقات المتبادلة بين الخصائص الميكروسكوبية والعين المجردة للعزلات بتحديد السلالات الفطرية المختلفة على هذه الثمار المجففة ذات القشرة وبدون قشرة. كلمات البحث: لوز، فول سوداني، جوز، الفطريات.

Résumé

Les fruits secs sont des fruits oléagineux qui constituent un substrat préférable pour la croissance et le développement des moisissures. Nos aliments peuvent parfois présenter des risques sanitaires si les conditions de commercialisation, de conservation, et de stockage sont mauvaises.

Un totale de neuf échantillons de fruits secs (trois échantillons d'Amandes, trois échantillons d'Arachides et trois échantillons de noix) a été prélevé dans différents points de vente au niveau de la ville de Guelma.

Après culture de prélèvements sur différents milieux, les corrélations entre les caractéristiques microscopiques et macroscopiques des isolats nous ont permis d'identifier différentes souches fongiques sur ces fruits secs, avec coque et sans coque.

Mots clé : Amandes, Arachides, Noix, Moisissures

Introduction

La qualité microbiologique des aliments est une composante essentielle de la qualité et la sécurité sanitaire des aliments, elle représente un enjeu considérable, elle est très souvent invoquée pour renforcer les barrières à la commercialisation, à la consommation et aux importations.

Les fruits à coque sont riches en nutriments, donc ils sont très vulnérables et propices à des contaminations par des champignons toxigènes. L'allergie aux fruits secs oléagineux concerne de nombreux fruits à coque de familles botaniques différentes (Bourrier, Villeveille et al. 2001)

Les fruits secs ont une grande importance économique en raison de leurs énormes quantités de production. Ils sont considérés comme des produits appropriés pour la contamination et la croissance des moisissures produisant des mycotoxines. Dans le monde, il existe plusieurs espèces de moisissures qui sont capables de produire des mycotoxines (Galtier, Loiseau et al. 2006). Les moisissures sont des champignons microscopiques, eucaryotes, elles se caractérisent par un développement pluricellulaire et filamenteux, donnant naissance à un véritable mycélium (Bailly and Brugere 1999).

La contamination par les mycotoxines concerne surtout les produits de région à forte température et humidité relative qui favorisent la croissance de moisissures toxigènes tel que : le genre *Aspergillus*, *Penicillium*, et le genre *Fusarium* ; ces genres sont connus comme des contaminants des produits agricoles (Karaca, Velioglu et al. 2010, Herry 2003), *Claviceps*, et *Aspergillus* (Luttfullah and Hussain 2011). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire produites par les moisissures et peuvent causer de nombreuses maladies chez l'homme et l'animal.

Chapitre I :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les fruits secs

Les fruits à coque (FAC) sont des fruits qui possèdent une coque solide et imperméable appelé « fruits à écale ». Ils appartiennent à des familles botaniques plus ou moins proches. Ils font partie des aliments qui peuvent être contaminés par des aflatoxines. L'arachide est le fruit le plus étudié car, elle est un substrat favorable pour la croissance et la toxinogénèse (Chala, Mohammed et al. 2013). Ses fruits secs sont très divers parmi eux : les arachides, les amandes et les noix.

1.1. L'arachide

L'arachide ou « cacahuète » (**Figure 1**), est une légumineuse qui appartient à la famille des papilionacées (Fabacées). Elle est cultivée dans un climat tropical ou subtropical, et elle est originaire d'Amérique du Sud (Clement 1981).

L'arachide est une plante annuelle, son mode de reproduction est autogame. Elle ne dépasse pas 70 cm d'hauteur, érigée ou rampante, à croissance continue et dont le fruit mûrit en terre (Schilling, 1996). La cacahuète présente une composition en macronutriments plus proche de celle des fruits à coques (Basse 2020). La coque considérée comme une barrière naturelle de protection pour les graines d'arachides contre les agents d'altération (Cisse and Vachaud 1988)



Figure 1. L'arachide avec et sans coque

1.2. Les amandes

Les amandes (**Figure 2**) sont des fruits de saveur douce (*Prunus Amygdalusdulis*) et/ou amère (*Prunus Amygdalusamarus*); selon la nature d'arbre (Liger 1758). Elle est originaire d'Asie Occidentale, des régions d'Iran et d'Afghanistan (Yada, Lapsley et al. 2011).



Figure 2. L'amande avec et sans coque

1.3. Les noix

Les noix (**Figure 3**) sont les fruits du noyer du genre « Juglans L » et de la famille « juglandacées ». Ces arbres sont présents à l'origine en milieu tempéré sur le continent Eurasiatique et en Afrique.



Figure 3. La noix avec et sans coque

2. Caractéristiques des fruits secs

Les fruits secs tel que : les arachides, les amandes et les noix sont riches en nutriments, chacun à une composition spécifique (Souza, Gomes et al. 2015) comme reporté **au Tableau 1.**

Tableau 1: les composition nutritive des arachide, amandes et noix (Souza, Gomes et al. 2015)

	Arachide	Amande	Noix
Protéine	25.8	21.2	15.2
Matière grasse	49.2	49.9	65.2
Eau	6.5	4.4	4.1
AGMI	6.3	3.8	6.1
AGPI	24.4	31.6	9
AGS	15.6	12.3	47.2
CHO	16.1	21.6	13.7
Fibre	8.5	12.5	6.7
K	705	733	441
Ca	92	269	98
Mg	168	270	158
Na	18	1	2
P	376	481	346
β - carotène	0	1	12
α -carotène	0	0	0
Vitamine E	8.3	25.6	0.7

3. Les allergènes des fruits à coques

Les allergènes sont des antigènes qui provoquent l'allergie (Dutau and Rancé 2007). L'allergie alimentaire regroupe l'ensemble des symptômes dus à une exposition aux allergènes alimentaires par voie digestive, muqueuse et cutanée ou respiratoire. Ils correspondent à une réaction adverse aux protéines alimentaires (Fleurentin 2017).

Les allergènes des FAC (**Tableau 2**) sont des protéines de stockage et de défense contre les pathogènes ou des protéines homologues à des protéines de pollen. Ils peuvent être regroupés

en 3 groupes, ces derniers sont basés sur leurs caractéristiques structurales : les cupines, les prolamines et les homologues allergiques (Jacquenot and Moneret-Vautrin 2007).

L'arachide est responsable de problèmes allergiques chez les enfants et les adultes (Bouvier, Bensaid et al. 2009). L'allergie à l'arachide est une allergie alimentaire des plus violentes au niveau des symptômes, ces acides aminés sont thermostables (présents dans l'arachide crue et grillé) (Rancé and Dutau 2007). Elle peut devenir un caractère épidémique dans certaines régions du monde (Sicherer and Sampson 2007), la plupart des allergènes reliés aux protéines de réserve qui s'accumulent essentiellement dans des corpuscules protéiques (Rougé, Culerrier et al. 2009)

La noix est un fruit consommé généralement crue, mais au niveau de la préparation pâtissière elle doit être cuite. Les allergènes des noix sont définis comme des allergènes majeurs :

- Jug r1 : c'est un allergène majeur des noix. C'est une albumine 2S qui a été retrouvée positive chez 75 % des patients allergiques à la noix.
- Jug r2 : c'est une vicilline retrouvée positive chez 60 % des patients.
- Jug r3 : c'est une LTP (Juchet, Chevallier et al. 2013).

Tableau 2: Les allergènes majeurs des Arachides, Amandes et Noix (Rougé, Culerrier et al. 2009).

Espèce (nom commun)	Espèce (nom latin)	Allergènes majeur
Arachide (Peanut)	Arachis (hypogaea)	Ara h 1 (Vic)
		Ara h 2 (2S)
		Ara h 3 (Leg)
Amande (almond)	Prunus (dulcis)	Pru da (2S)
		Pru d b (2S)
Noix (walnut)	Juglans (regia)	Jug r 1 (2S)
		Jug r 2 (2S)

2S: albimine Vic:vicillines Leg :legumines

Chapitre II :
LES CONTAMINANTS FONGIQUES

4. Généralité sur les moisissures

4.1. Les moisissures

Les moisissures sont omniprésentes dans la nature, ceux sont les habitants naturels du sol et sont des contaminants de l'air, de l'eau et des aliments. La contamination par les moisissures cause des détériorations dans la qualité des denrées alimentaires et peut nuire à la santé humaine et animale par la production de mycotoxines (Reboux, Bellanger et al. 2010).

Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle, qui est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium (Bourgeois, 1989).

Les moisissures produisent un nombre important de substances qui possèdent une structure et une activité biologique variées. On peut distinguer deux grands types de moisissures :

- ✓ **Les moisissures utiles** : qui sont utilisées à la fabrication de produits de fermentation, transformation des matières premières dans les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques, dans la production d'enzymes, d'antibiotiques, d'arômes, et de vitamines, et dans l'affinage des fromages comme *penicillium camembertii*, ou *penicillium roquefortii* (Amalaradjou and Venkitanarayanan 2008).
- ✓ **Les moisissures nuisibles** : qui peuvent entraîner la détérioration des denrées alimentaires en provoquant des mycoses et des allergies, et la production de métabolites toxiques (mycotoxines) pour l'homme et l'animal. Le développement des moisissures sur ces produits aboutit à des modifications physiques (aspect, odeur, et gout) et chimiques (Bennett et al., 2003).

Les champignons toxigènes sont classés en quatre groupes selon le moment auquel ils se développent :

- pathogènes pour la plante.
- champignons poussant et produisant la mycotoxine sur des plantes sénescentes ou stressées.
- champignons qui colonisent la plante avant la récolte et favorisent la contamination par les mycotoxines après la récolte.
- champignons existant dans le sol et dans les débris de plantes et qui prolifèrent lors de l'entreposage (stockage)

4.2 Classification des champignons

La classification est basée sur la morphologie (structure de mycélium) et le mode de reproduction des moisissures (Davet, 1996). Ces derniers ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques à savoir les *Zygomycètes*, les *Ascomycètes*, les *Basidiomycètes* et les *Deutéromycètes* (Bourgeois, 1989).

Les principaux groupes de moisissures en microbiologie alimentaire

- | | |
|--|---|
| <i>Zygomycetes</i>
« <i>Mucorales</i> » | - Mycélium non cloisonné avec une reproduction sexuée (endogène)
- La famille la plus importante : Mucorales, qui comprend à un grand nombre de moisissure saprophytes, et quelques espèces parasites de champignons |
| <i>Ascomycètes</i>
« <i>Eurotiales</i> » | - Mycélium cloisonné avec une reproduction sexuée avec des spores pathogènes (exospore).
- Regroupe les parasites et les végétaux |
| <i>Basidiomycètes</i> | - Mycélium septé avec une reproduction sexuée des fragments des spores exogènes (Basidiospore)
- Regroupe les moisissures parasites. |
| <i>Deutéromycètes</i>
« <i>Hyphomycètes</i> » | - Champignons imparfait
- Mycélium cloisonné avec une reproduction végétative.
- contient un grand nombre de contaminants végétatifs :
<i>Penicillium – Aspergillus – Fusarium – Trichoderma</i> |

4.3. Identification des champignons

L'identification des espèces fongiques susceptibles de contaminer les différentes denrées alimentaires et d'en altérer leur qualité ou de produire des mycotoxines, est indispensable afin d'évaluer les risques mycotoxinogènes. L'identification des différents genres de moisissures se base généralement sur deux étapes, à savoir l'identification macroscopique du mycélium en

se basant sur la couleur, l'aspect des colonies et l'identification microscopique des structures reproductrices. Cependant, une identification moléculaire des souches pourrait être nécessaire pour l'identification de certaines espèces.

4.3.1. Identification macroscopique

L'aspect des colonies : Les colonies peuvent être duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien) (Tabuc 2007).

La couleur des colonies : La couleur constitue un critère d'identification très importante. Les moisissures sont généralement de couleur blanche, crème, jaune, orange, rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, verte, brune allant jusqu'à noire. La pigmentation peut être localisé au niveau du mycélium (*Aspergillus spp*, *Penicillium spp*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium spp*, *Alternaria spp*) (Houissa 2020).

La taille des colonies : Les colonies peuvent être très variable en fonction des genres fongiques : de petite taille (*Cladosporium spp*), étendues (*Aspergillus spp*, *penicillium spp*) ou envahissantes (*Botrytis spp*, *Fusarium spp*, *Alternaria spp*, *Trichoderma spp*) (Tabuc 2007).

Le relief des colonies : Les colonies peuvent avoir un aspect plat (*Cladosporium spp*) ou plissé (*Aspergillus spp*, *Penicillium spp*) et la consistance des colonies est variable (molle, friable, élastique ou dure) (Houissa 2020).

4.3.2. Identification microscopique

L'examen microscopique des espèces fongiques se fait par un prélèvement d'un ou plusieurs fragments de la culture et étalement de la préparation entre lame et lamelle.

Le thalle végétatif : L'appareil végétatif de tous les champignons est constitué principalement par des filaments dites aussi hyphes et dont l'ensemble est appelé thalle ou mycélium. On distingue deux types de thalle : Le thalle siphonné, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifiés, de diamètre large ou irrégulier et non cloisonnés. Ces filaments caractérisent les champignons inférieurs (*Zygomycètes*). Toutefois, le thalle septé ou cloisonné correspond aux champignons supérieurs tels que les ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes filamenteux. Ces filaments ont un diamètre large et irrégulier et non cloisonné. Ces filaments caractérisent les champignons inférieurs (*Zygomycètes*). Toutefois, le thalle septé ou cloisonné correspond aux champignons supérieurs tels que les *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* filamenteux. Ces filaments ont un diamètre étroit et

régulier et leurs bords sont parallèles. Ils sont divisés par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires (Houissa 2020)

L'origine endogène ou exogène des spores : On distingue deux modes de formation de spores asexuées, les spores endogènes et les spores exogènes. Chez les mucorales, les endospores sont produites à l'intérieur d'un sac fermé porté par un filament spécialisé. Ainsi, les spores asexuées seront libérées des sporocystes ou (sporange) par déchirement de la paroi du sporocyste à maturité. Cependant, chez *Basidiomycètes*, les *Ascomycètes* et les *Deutéromycètes*, les spores asexuées exogènes sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée appelée cellule conidogène d'où les spores produites sont dites des conidies (Houissa 2020).

L'aspect des spores : L'examen de l'aspect des spores et leur organisation constituent un critère primordial de l'identification microscopique des moisissures. Chez les *Deutéromycètes* la base de la classification s'appuie sur la forme des spores et leurs modalités éventuelles de septation.

De ce fait, on distingue l'existence de cinq groupes de spores :

- * Les amérospores : spores unicellulaire de petit taille (*Penicillium, Aspergillus*).
- * Les didymospores : spores bicellulaires (*Trichothecium*).
- * Les Fragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales.
- * Les dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*).
- * Les Scolécospores : spores étroites, effilées, incurvées cloisonnées transversalement (*Fusarium*) (Houissa 2020).

Le mode de groupement des conidies : Les conidies se situées à l'extrémité de la cellule conidiogène, représentent un critère d'identification. On distingue plusieurs types de groupement des conidies à savoir, le regroupement en grappes, en masse, en tête, en chaine.

Les clamydospores sont des spores de résistances présentes chez plusieurs espèces fongiques en présence des conditions défavorables. Cependant, elles peuvent constituer un critère de diagnostic important lorsqu'elles apparaissent précocement, notamment pour certaines espèces du genre *Fusarium* (Houissa 2020).

4.3.3. Identification moléculaire

La méthode traditionnelle de l'identification des moisissures est basée sur les caractéristiques microscopiques et macroscopiques, cette méthode est parfois laborieuse, longue et incomplète. Par conséquent, des méthodes d'identifications récentes reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Houissa 2020).

La méthode la plus intéressante est l'amplification par PCR (polymérase Chain réaction), cette technique assure une identification rapide, spécifique et plus fiable de certaines espèces fongiques tels que les *Aspergillus* et les *Penicillium* (Houissa 2020).

Dans les *Fusarium spp*, la méthode biologique demeure, en revanche l'examen morphologique semble une méthode indispensable à l'identification des espèces de ce genre fongique (Houissa 2020).

4.4. Généralités sur les mycotoxines

Le mot mycotoxine vient des termes (Mycos=Champignon) et (Toxicum=Poison) (Afssa, 2009). Les mycotoxines sont des produits des métabolites secondaires ; produites par cinq genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria*, et *Claviceps*, qui peuvent causer des maladies chez l'homme et l'animal, introduit par voie naturelle, ingéré, absorbé par la peau ou par inhalation (Lutfullah and Hussain 2011). En plus de la santé, les mycotoxines entraînent une perte économique importantes pour les aliments (Clavel, Da Sylva et al. 2013).

Les mycotoxines sont courantes dans différentes denrées alimentaires, notamment les céréales, les fruits et les fruits secs (Tolosa, Font et al. 2013). La production des mycotoxines se produit sur le terrain et pendant la distribution, la transformation, et le stockage des aliments en fonction des facteurs environnementaux et des conditions de stockage.

La croissance et la production de mycotoxines dépend de divers facteurs (l'activité de l'eau, ph, les ravageurs, la température, l'humidité relative, l'oxygène et les interactions microbiennes (Clavel, Da Sylva et al. 2013).

4.4.1. Les principales mycotoxines

Plus de 300 mycotoxines ont été identifiées dans le monde entier, avec de réelles propriétés toxiques pour la santé. Ces mycotoxines sont : l'Aflatoxine, l'Ochratoxine, la Fumonisines, la Zéaralénone, la Trichothécène, et la Patuline (Clavel, Da Sylva et al. 2013).

Les Aflatoxines Sont les mycotoxines les plus dangereuses par leur toxicité. Ils sont produits par les toxigènes souches d'*Aspergillus flavus* et *parasiticus* entre 25°C et 40°C et une forte humidité (0,84-0,86). Ils comportent quatre types d'Aflatoxines : B1, B2, G1, G2 (Karaca, Velioglu et al. 2010)

Les Ochratoxines Sont des métabolites secondaires produits par quatre espèces de moisissures : *Aspergillus Ochraceus*, *Penicillium Verrucosum*, *Aspergillus Niger* et *Aspergillus Carbonarius* ces derniers produits l'Ochratoxine à une température optimale entre 20°C et 25°C. Le CIRC (Centre internationale de recherche sur le cancer) a classé l'Ochratoxine comme un agent cancérigène chez l'homme (Karaca, Velioglu et al. 2010)

La Patuline Est une mycotoxine toxique tératogène et peut être cancérigène, produite par plusieurs genres *Penicillium* et *Aspergillus* qui produit la *patuline* entre 0°C et 30°C. Ces mycotoxines sont produites par plusieurs espèces de genre *Penicillium expansum* qui s'avère le plus important (Karaca, Velioglu et al. 2010)

Les Fumonisines Sont des mycotoxines produites par le genre *Fusarium*. Différents types de *Fumonisines* sont présent dans les aliments dont les principales formes sont les *FB1*, *FB2*, *FB3* (Houissa, 2020). Leur présence dans les aliments favorise la survenue de cancer (Karaca, Velioglu et al. 2010).

Les Trichothécènes Sont des mycotoxines produites par les espèces de genre *Fusarium* dans des conditions climatiques assez fraîches (Karaca, Velioglu et al. 2010). Elles regroupent une large famille de mycotoxines divisée en quatre groupes A, B, C et D. Les *Trichothécènes* ne semblent pas avoir d'effet cancérigène, mais leur ingestion se traduit par des vomissements, des diarrhées et des hémorragies (Houissa, 2020).

La Zéaralénone Sont des Fusariotoxines produites par les espèces de genre *Fusarium*. La production de zéaralénone est favorisée par de basse température entre 10 et 15°C (Houissa 2020)

5. Stockage des fruits à coque

Naturellement après la récolte, les fruits à coque contiennent des espèces pathogènes provenant de la nature. Ces espèces peuvent ou non survivre au séchage. Les FAC deviennent sujettes à la pétrification, de certains agents pathogènes fongiques (*Aspergillus xerophiles*), si l'activité de l'eau (A_w) dépasse 0.65. La présence de telles espèces pourrait compromettre la qualité des FAC et cause des maladies graves chez les consommateurs (Tournas, Niazi et al. 2015).

Les FAC sont des aliments susceptibles d'infections fongiques dans les champs et les conditions de stockage indépendamment. Les fruits endommagés par les charançons au moment de récolte et du transport sont particulièrement sujets à l'invasion fongique et à la pourriture (Nawar 2008).

Plusieurs champignons sont capables d'infecter les FAC en pleine croissance et les endommager (Sallam, 2007) comme *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* (Michailide, 2006). Les noix stockés dans les entrepôts sont contaminés par : *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Ochraceus* (Nawar 2008).

6. Les principaux genres fongiques

Les genres les plus importants présents au niveau des fruits secs sont : les *Aspergillus*, les *Penicilliums*, les *Fusarium* et l'*Alternaria*. Ces dernières représentent les contaminants les plus fréquents chez les aliments.

6.1. Le genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux saprophytes appartenant aux *Deutéromycètes*. Ils colonisent les végétaux déjà abimés par les blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons. Ils sont également présents sur les surfaces des grains et des fruits. En présence des conditions propices à leur développement, notamment au cours du stockage, ils peuvent devenir des parasites. Ils appartiennent au sous embranchement des Ascomycotina par leur mode de reproduction sexuée (Houissa 2020).

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif appelé thalle formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, cloisonnés et ramifiés portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (**Figure 4**). Sur cette vésicule de forme variable, les cellules conidiogènes ou phialides se sont disposées. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates. Les têtes conidiennes sont unisériées ou bisériées. Les conidies sont sèches, en chaînes divergentes ou associées en colonnes compacte, basipétales s'accroissant par la base unicellulaire, globuleuse, sub-globuleuse ou elliptique, lisse ou ornementée, hyaline ou pigmentée en jaune, brun, noir ou vert (Tabuc 2007)

L'ensemble vésicule, métule, phialides et conidies constitue la tête Aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*. En effets, le genre comprend près de 180 espèces réparties en 18 sections essentiellement définies d'après les caractères de l'appareil reproducteur. Le genre *Aspergillus* a une distribution ubiquitaire, mais il tend à prédominer dans les pays tropicaux. La majorité des *Aspergillus* se développent à une température entre 22°C à 25°C. Les espèces thermophiles comme les *A.Fumigatus* se développent à une température de 37°C à 40°C.

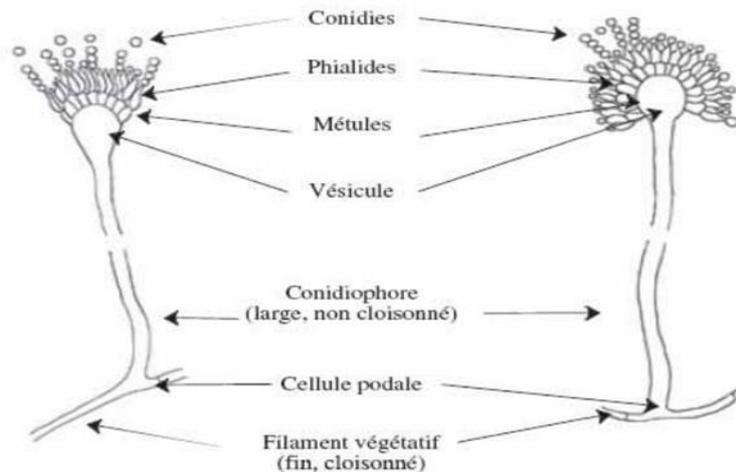


Figure 4. Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Tabuc 2007)

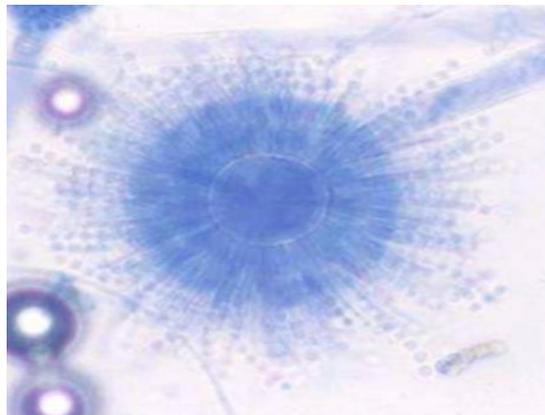


Figure 5. Observation microscopique d'une *Aspergillus* (Laifa, Adouani et al. 2020)

6.2. Le genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* fait partie des champignons filamenteux appartenant au phylum des Ascomycètes. Il est saprobe mais il peut devenir parasite en présence d'humidité au cours de stockage (Houissa 2020)

Les *Penicillium* sont ubiquistes et polyphages, pouvant être responsables de la dégradation de plusieurs substrats. Ils sont des contaminants répandus dans le sol ainsi que dans divers substrats organiques notamment les céréales, les arachides, les produits laitiers. Ils sont également des contaminants communs de laboratoires (Houissa 2020).

Le genre *Penicillium* se développe principalement dans des milieux humides avec une activité d'eau très élevée et des températures plus basses que celles favorisant la croissance des *Aspergillus*. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées. Ils croissent à des

températures modérées de l'ordre de 20°C à 27°C. Les *Penicillium* produisent un certain nombre de mycotoxines de la *Patuline*, l'*Ochratoxine*, l'acide *Penicillique* (Houissa 2020)

Les 227 espèces de *Penicillium* sont définies selon les caractères du thalle, des pénicilles et des spores. Ces champignons se distinguent par leur organisation en pinceau. Ils représentent un thalle vert ou plus rarement blanc dont la texture est souvent utilisée comme critère de différenciation. Le thalle formé d'un mycélium septé et hyalin, portant des conidiophores qui peuvent être isolés ou groupés en faisceaux, hyalins, lisses ou granuleux, simples ou ramifiés et terminés par un pénicille. Ce dernier est constitué de verticille de phialides disposées à l'extrémité des conidiophores. Les phialides peuvent être insérées directement (*Penicillium* mono verticillé) ou par l'intermédiaire d'une ou plusieurs rangées de métules (*Penicillium* bi verticillé, tri verticillé...). Les phialides donnent naissance à des conidies peuvent être disposées en longues chaînes, globuleuses, elliptiques, cylindriques, fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines ou de couleur grises ou verdâtres (Houissa 2020).

Les souches de *Penicillium* peuvent produire plusieurs mycotoxines, et contaminent couramment les céréales, les fruits secs et leurs sous-produits. On les trouve fréquemment dans les noix, les arachides et les amandes

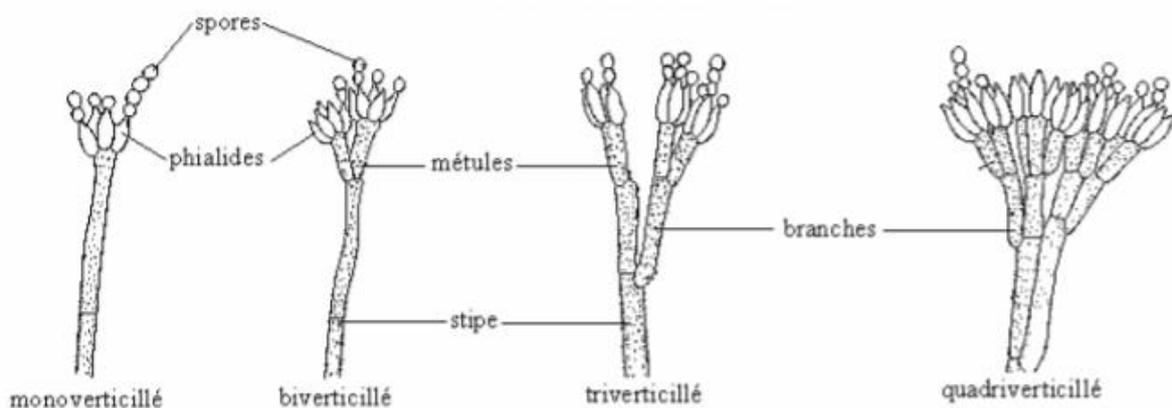


Figure 6. Caractères morphologiques du genre *Penicillium* (Laifa, Adouani et al. 2020)

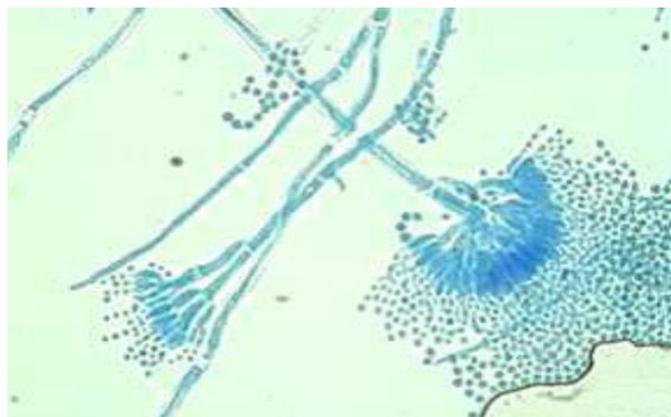


Figure 7. Observation microscopique d'un *Penicillium* (Laifa, Adouani et al. 2020)

6.3. Le genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* appartient à la classe de Deuteromycètes. Certaines espèces connues par les formes parfaites ou téléomorphes, appartiennent à la classe des ascomycètes (Houissa 2020). Le genre *Fusarium* comprend près de 40 espèces largement répandues. Il regroupe plusieurs espèces phytopathogènes capables d'induire des fusarioses chez de nombreuses plantes qui engendrent des pertes économiques très importantes. Il est considéré parmi les moisissures telluriques les plus agressives, causant des flétrissements et des pourritures sur de cultures végétales. En outre, il englobe également beaucoup d'espèces saprobes aptes de se proliférer sur des tissus végétaux sénescents en tant que pathogènes secondaires. Les espèces de *Fusarium* peuvent attaquer les céréales, les légumes, les plantes et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des *Fusarium* ont la capacité de produire les mycotoxines.

Les principales espèces de *Fusarium* présents dans les denrées alimentaires sont : *Fusarium Culmorum*, *Graminearum*, *Oxysporum* et *Verticilloides*. Le complexe *Fusarium Incarnatum-equiseti*, réparties uniformément en deux sous-groupes désignés d'une part par les *Fusarium Equiseti*, représente également un groupe extrêmement répondeu dans les régions tropicales et subtropicales, mais aussi dans le bassin méditerranéen et rarement dans les régions tempérées. La température optimale à la croissance des *Fusarium* est souvent comprise entre 22°C et 37°C. Ils forment généralement des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable selon les espèces (Houissa 2020).

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiforme et cloisonnées. Les conidiophores parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores. Les phialides présentent plusieurs sites de bourgeonnement, et produisent deux types de conidies ; les microconidies qui peuvent

être uni-ou bicellulaires, piriformes, fusiforme, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticille ou plus rarement en chainettes, d'autre part, les macroconidies qui sont des conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Les macro conidies sont fusiformes, souvent courbées avec une cellule basale pédicellée, formant une sorte de talon plus ou moins visible. Les chlamydospores sont parfois présentes en position terminale ou intercalaire (Houissa 2020).

Fusarium spp sont les principaux agents pathogènes du sol causant des maladies et entraînant d'énormes perte de rendement est une mauvaise qualité des récoltes. Des infections à *Fusarium* sont également signalées chez les hommes et les animaux

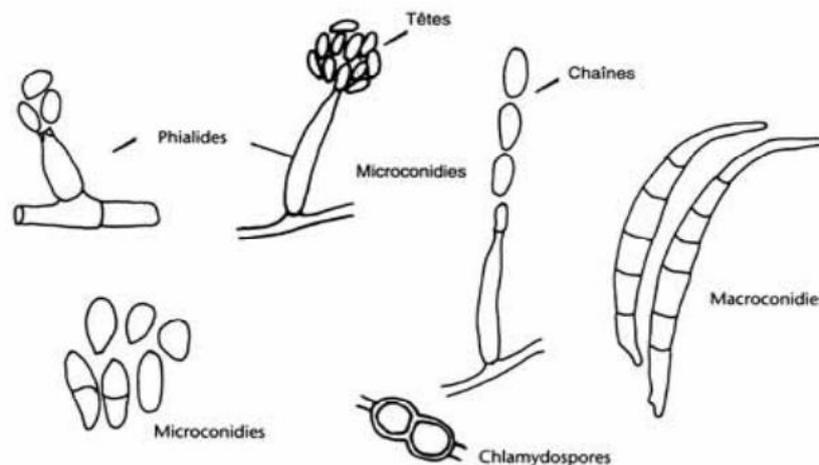


Figure 8. Caractères morphologiques du *Fusarium* (Laifa, Adouani et al. 2020)

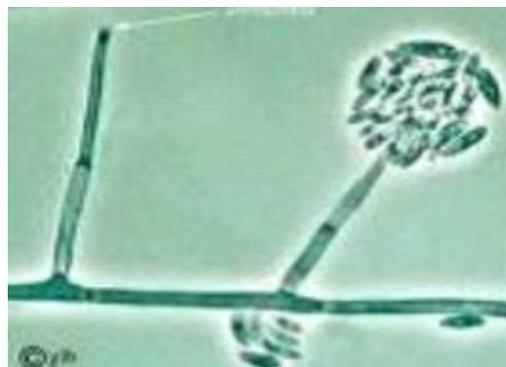


Figure 9. Observation microscopique du genre *Fusarium* (Laifa, Adouani et al. 2020)

6.4. Le genre *Alternaria*

Les *Alternaria* sont des champignons cosmopolites et extrêmement répandues dans le sol, l'air et les aliments. La majorité des espèces d'*Alternaria* sont phytopathogènes affectant les cultures sur champ à la récolte et post-récolte, cependant, certaines sont saprophytes pouvant occasionnellement être des agents pathogènes opportunistes incriminées de plusieurs maladies touchant les plantes et les insectes. Les espèces les plus fréquentes sont les *Alternaria Alternata*, les *Alternaria Tenuissima* et les *Alternaria Infectoria* (Houissa 2020). Les spores d'*Alternaria* sont des allergènes aéroportés particulièrement les *Alternaria Alternata* reconnue comme l'espèce aéro allergène, ainsi que leur capacité à produire les mycotoxines. Les espèces de genre *Alternaria* sont caractérisées par des conidies septées avec cloisons transversales et longitudinales, des cellules multi-nuclées de couleur foncée généralement piriformes ou ovotides.

En 1816, c'est la première découverte d'un champignon qu'il nomme *Alternaria*, après des études ultérieures menées ont bien décrit le genre *Alternaria*. Les *Alternaria* sont classées parmi les *Deutéromycètes* qui englobent toutes les champignons à mycélium cloisonné dont la forme de reproduction est souvent inconnue mais ils possèdent une multiplication asexuée par conidies. Des études ultérieures ont abouti au classement du genre *Alternaria* parmi les ascomycètes. Des travaux ultérieurs ont abouti à la classification des *Alternaria spp* selon le mode de sporulation (Houissa 2020).

Les *Alternaria* sont des espèces de contaminations toxiques importantes des aliments. *Alternaria* infecte les plantes et cause des dommages dans le champ et après la récolte, cette espèce infecte aussi divers fruits et légumes et peuvent causer la détérioration de ces fruits et légumes au réfrigérateur (Amalaradjou and Venkitanarayanan 2008)



Figure 10. Observation microscopique des genres *Alternaria* (Laifa, Adouani et al. 2020)

Chapitre III :
ETUDE EXPERIMENTALE

1. Matériel et méthodes

Introduction

La consommation des fruits secs en vrac pour la consommation directe est devenue une pratique courante. En effet en plus de leur utilisation dans la pâtisserie, certains fruits secs comme les arachides, les noix et les amandes sont couramment consommés. Cette demande en croissance a motivé l'installation de nombreux petits commerces au niveau des endroits à grande fréquentation publique. Ces fruits secs sont proposés à la consommation sans aucun conditionnement et sont entreposés à l'air libre et aux aléas de l'environnement naturel.

1.1. Echantillonnage

Sachant que ces fruits secs sont prédisposés aux contaminations fongiques, nous avons procédé à des prélèvements aléatoires dans divers points de vente. Les prélèvements effectués ont porté sur les arachides, les amandes et les noix. Les échantillons en vrac ont été mis dans des sacs de prélèvement et acheminés au laboratoire de microbiologie de la Faculté SNV&STU de l'université de Guelma.



Arachide

Amande

Noix

1.2. Matériel

Boite de pétri	Lame et lamelle	Tube à essai
		
Flacons stérile	Bécher	Erlenmeyer
		
Pipette gradué	Pipette pasteur	Micropipette
		
Anse de platine	Ecouvillon	Embouts
		

1.3. Analyses

1.3.1. Isolements et dénombrement de la flore fongique

1.3.1.1. Echantillon sans coque

Dans notre étude nous avons utilisés la méthode de dilution décimale, pour l'isolement des microflore fongiques. Pour chaque échantillon : Arachide, Amande et Noix.

- 10g d'échantillon a été analysé dans 90ml d'eau physiologie stérile, et on homogénéise tout avec un agitateur pendant 10min, ce qui correspond à la solution mère. A partir de ce dernier, on prélève 1ml dans un tube contenu 9ml d'eau physiologie stérile. On mélange soigneusement la prise d'essai et diluant (l'eau physiologie stérile), en utilisant un agitateur mécanique pendant 5 à 10s



(a)

(b)

(c)

Figure 11. Étapes d'ensemencement (a) solution mère, (b) dépôt de 1ml d'échantillon, (c) coulage de la gélose

1.3.1.2. Echantillon avec coque

Dans cette partie, nous avons utilisés la méthode de prélèvement par écouvillonnages à la surface de la coque, pour l'isolement de la flore fongique. Pour chaque échantillon : arachide, amande et noix.

- On a choisie pour notre isolement des milieux de routine en mycologie (PDA, MEA SDA) (Annexe).

- Premièrement ont coulent nos milieux, attendre jusqu'à leur solidification.

- nous passons l'écouvillon sur toute la partie supérieure de la coque pour prélever, puis on fait l'ensemencement en surface sur les milieux précédemment cités (**Figure 12**).



Figure 12. Ensemencement en surface sur le milieu PDA

1.4. Ensemencement

Un ensemencement en masse est réalisé avec un volume de 1ml d'inoculum puis dispersé dans le fond d'une boîte de pétri (les boîtes sont dans la zone stérile, autour du bec benzène), avec une micropipette dans le milieu de culture (PDA, MEA et Sabouraud chloramphénicol) (Annexe) est ensuite coulé par-dessus. Le mélange est homogénéisé par des mouvements circulaires et de va-et-vient en forme de 8 pour permettre le mélange entre l'échantillon et la gélose. L'incubation a été réalisée à 25°C pendant 5 à 7 jours.

1.5. Identification des champignons

1.5.1. Identification macroscopique

Les caractères cultureux sont déterminés après l'ensemencement des souches sur les trois milieux spécifiques, qu'on a utilisé PDA, MEA et Sabouraud chloramphénicol (Annexe).

- L'identification se fait à l'œil nue et elle se base sur les caractères suivants :
 - Les caractères cultureux (aspect de thalle).
 - La couleur des colonies (noire, verte, blanche).
 - Exsudat : présence ou absence.
 - Odeur : présence ou absence.

1.5.2. Identification microscopique

L'observation microscopique a été réalisé par la technique de scotch, qui consiste adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction de mycélium et de la collé sur une lame contenant une goutte d'eau distillé. L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope optique à grossissement (X10, X40).

- L'étude microscopique est basée sur :

- Les organes de fructifications.
- Détection de la présence de thalle.
- La couleur des spores.
- La forme des spores...

2. Résultats et discussion

2.1. Identification de la flore fongique présente

Les moisissures purifiées sont identifiées par la méthode de dilution classique des aliments. Après une incubation pendant cinq à sept jours à une température de 25 C° sur les trois milieux PDA, MEA et Sabouraud, un examen macroscopique a été réalisé par observation à l'œil nu des caractères culturels (aspect de la colonie, la couleur, le revers et la vitesse de croissance), ensuite un examen microscopique est réalisé par une observation entre lame et lamelle avec la technique du scotch, ce dernier étant fondé essentiellement sur l'étude de mycélium et de spores.

Sur les trois milieux de culture utilisés qui sont le Potato Dextrose Agar (PDA), Malt extract Agar (MEA) et Sabouraud Chloramphénicol, l'observation de ces isolats a permis l'identification de (9) genres fongiques : *Aspergillus*, *penicillium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Ulacladium*, *Cladosporium*.

2.1.1. *Aspergillus*

2.1.1.1. *Aspergillus Niger* Sur MEA

- les colonies d'*Aspergillus niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires.

-Le revers des colonies est d'un beige foncé au centre, à l'extrémité foncée.

-Les phialides sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses et sont brunes, échinulées à très verruqueuses, Cette description est en accord avec celle rapporté par (Kidd et al, 2016)

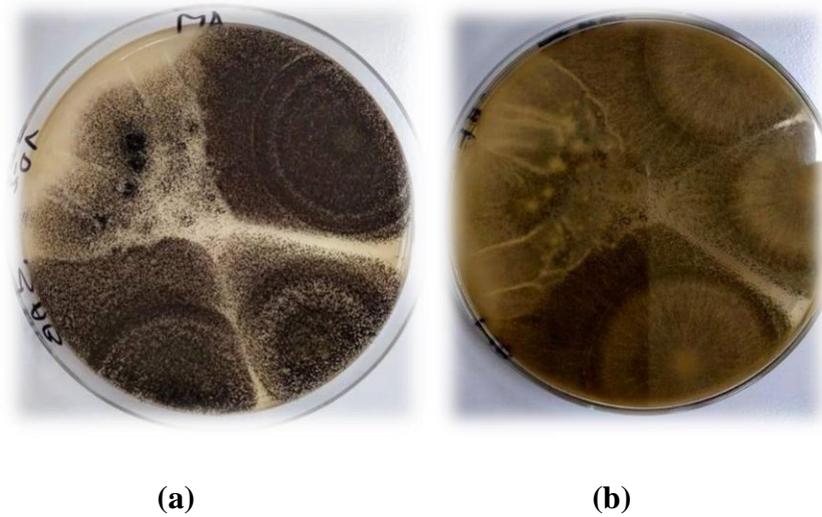


Photo 1. Aspect des colonies d'*Aspergillus niger* en face (a) et au revers (b) sur milieu MEA

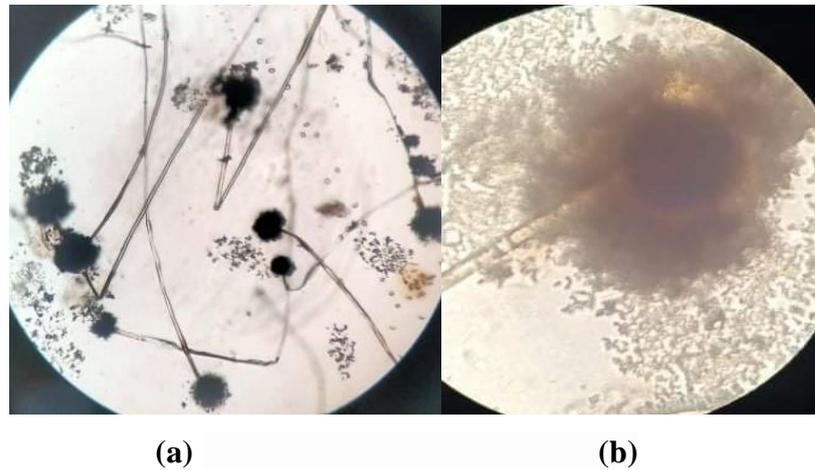


Photo 2. Aspect microscopique de l'*Aspergillus Niger* Grossissement $\times 10$ (a), $\times 40$ (b)

2.1.1.2. *Aspergillus spp* Sur milieu PDA

- Les colonies d'*Aspergillus spp* ont une pigmentation foncée avec des antennes blanches.
 - Le revers des colonies est incolore à jaune très pâle
 - Sous microscope, le mycélium apparait hyalin et septé, les conidiophores sont hyalins et non septés, les têtes conidiennes sont unisériées alors que les conidies sont globuleuses et hyalins.
- Cette description correspond au genre *Aspergillus* décrit par plusieurs auteurs (Badillet et al., 1987 ; Raper et Fennell, 1965).

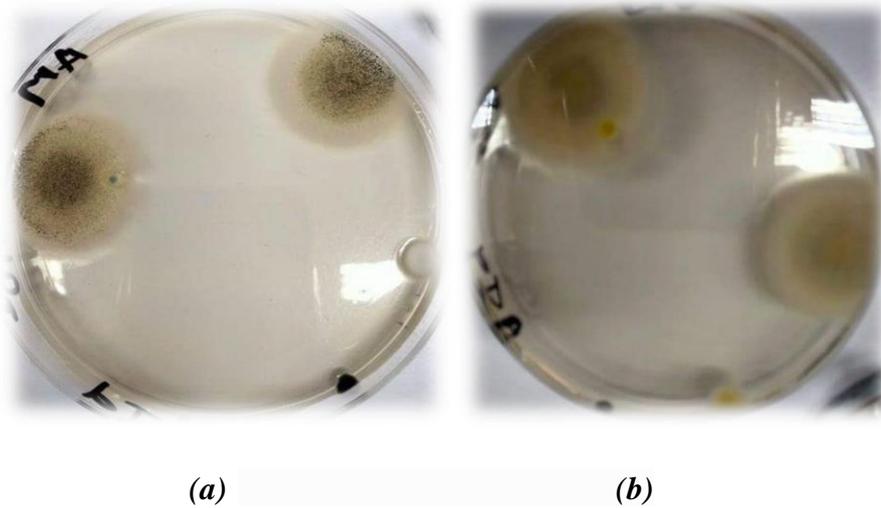


Photo 3. Aspect des colonies d'*Aspergillus sp* en face (a) et au revers (b) sur milieu PDA.

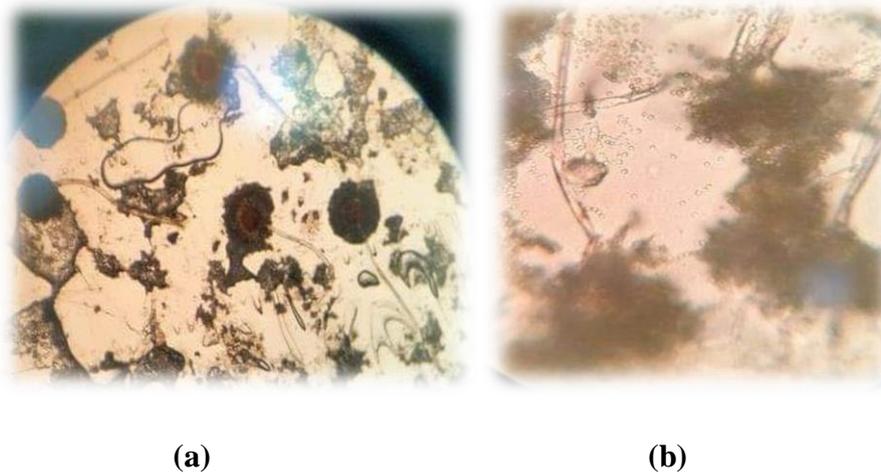


Photo 4. Aspect microscopique de l'*Aspergillus spp* Grossissement $\times 10$ (a), $\times 40$ (b)

2.1.1.3. *Aspergillus flavus* Sur Sabouraud chloramphénicol

- les colonies sont granuleuses, plates, souvent avec des rainures radiales, d'abord jaunes mais devenant rapidement jaune-vert clair à foncé avec l'âge.

Les têtes conidiennes sont généralement rayonnées, se fendant plus tard pour former des colonnes lâches, bisériées mais ayant quelques têtes avec des phialides portées directement sur la vésicule.

-Les conidies sont globuleuses à subglobuleuses

- revers de colonies est clair selon (Kidd et *al*, 2016).

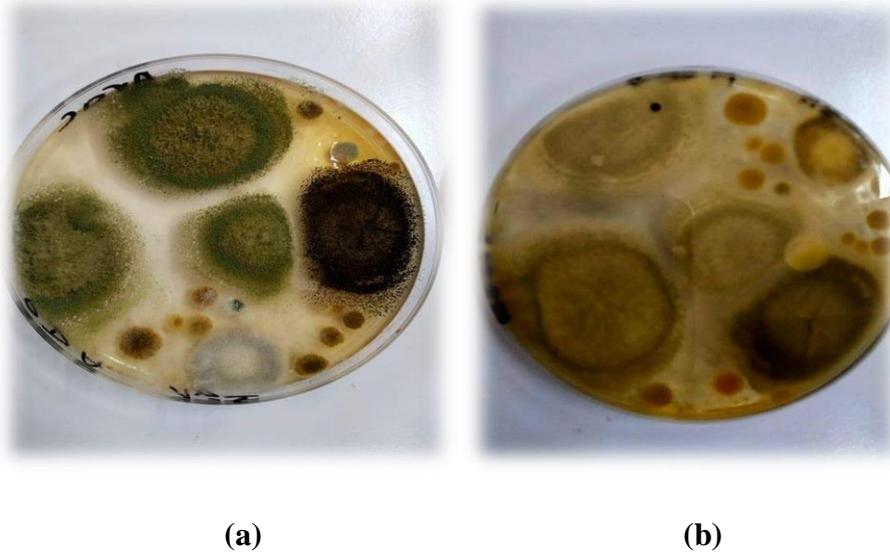


Photo 5. Aspect des colonies d'*Aspergillus flavus* en face (a) et au revers (b) sur sabouraud chloramphénicol

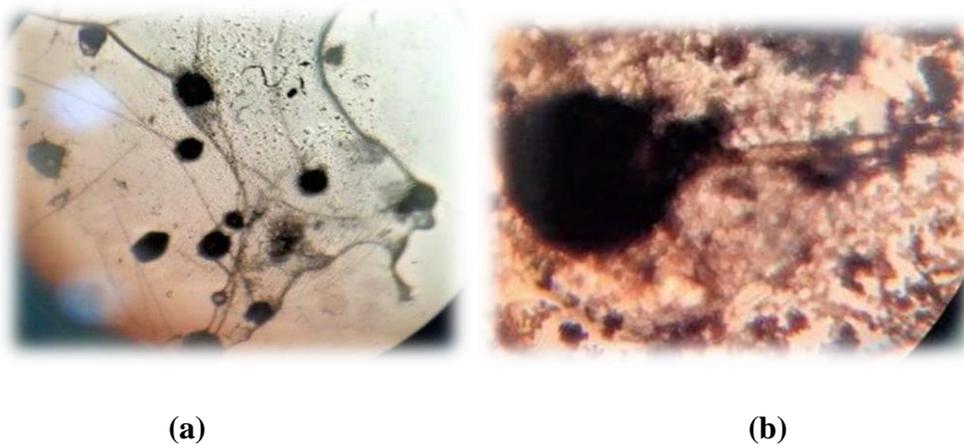
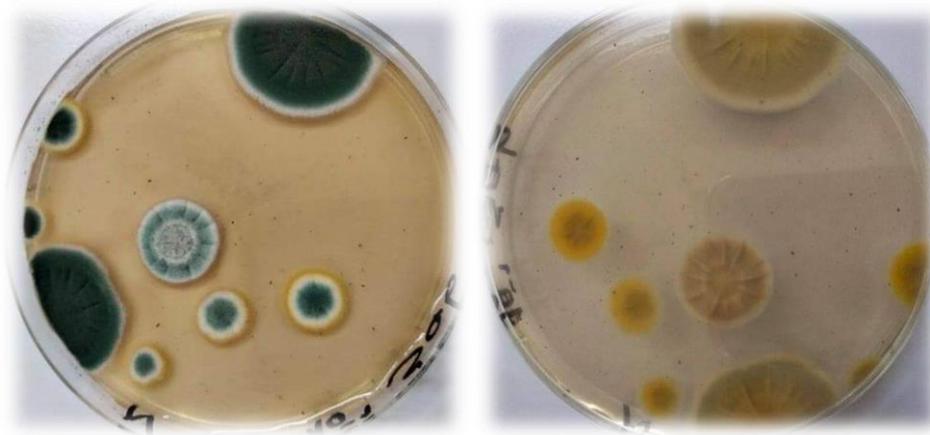


Photo 6. Aspect microscopique de l'*Aspergillus flavus* Grossissement $\times 10$ (a), $\times 40$ (b)

2.1.2. *Penicillium*

2.1.2.1. *Penicillium sp 1* Sur milieu MEA

- Les colonies de *Penicillium spp 1* est de couleur verte avec une marge blanche.
- le revers des colonies est clairs
- Le mycélium est septé hyalins, porte des conidiophores lisses. Le conidiophore est droit, ramifié, avec des verticilles au sommet (organisation en pinceau)
- Les conidies sont en chaînes, avec une forme globuleuse et sont à paroi lisse, cette description correspond au genre *Penicillium* (Tabuc,2007).



(a)

(b)

Photo7. Aspect des colonies de *Penicillium sp* en face (a) et au revers (b)
sur MEA



Photo 8. Aspect microscopique de *Penicillium sp* Grossissement $\times 40$.

2.1.2.2. *Penicillium sp 2* Sur milieu MEA

- Les colonies de *Penicillium sp* est de couleur verte avec une marge blanche, à croissance moyenne avec un aspect velouté
- le revers des colonies est de couleur brun jaune
- mycélium cloisonné avec des conidiophores isolé, ramifiés par un pénicille.
- Le pénicille est constitué de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore (Botton, 1990).

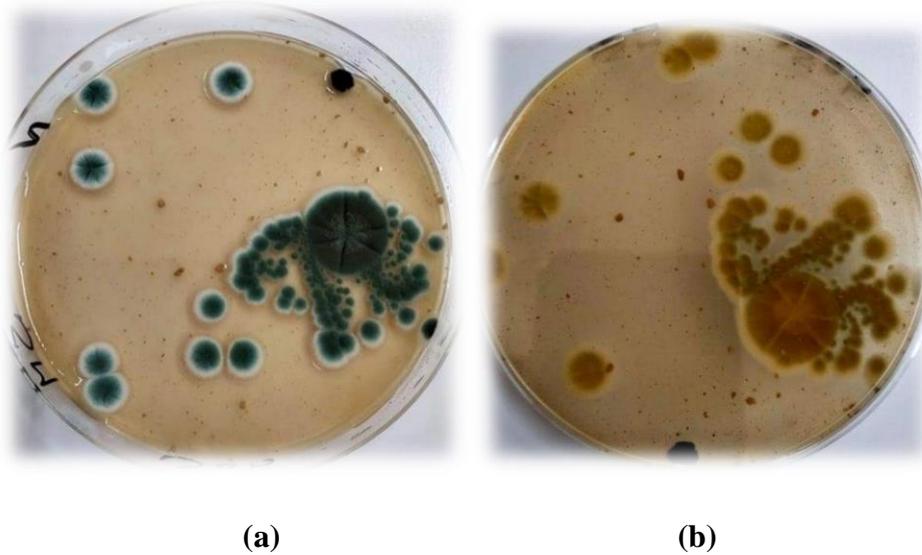


Photo 9. Aspect des colonies de *Penicillium sp* en face (a) et au revers (b) sur MEA



Photo 10. Aspect microscopique de *Penicillium sp* Grossissement $\times 40$

2.1.2.3. *Penicillium sp 3* Sur milieu PDA

- Les colonies de *Penicillium sp 3* sont de couleurs vertes poudreuses et duveteuses à croissance très lente, avec une dissémination sur toute la boîte.
- le revers des colonies est de couleur jaune foncé

- On peut voir la ramification du conidiophore suivie de plusieurs branches de métules qui, elles, portent les phialides (Botton, 1990).

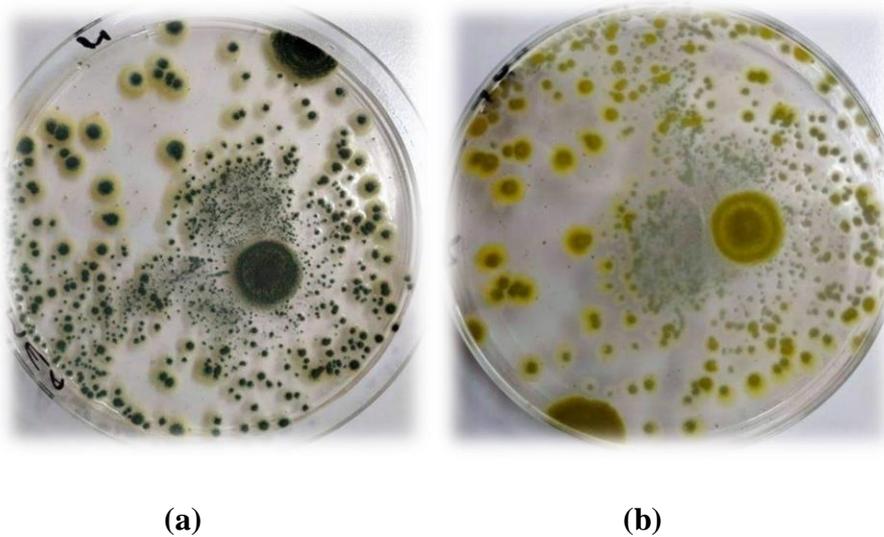


Photo 11. Aspect des colonies de *Penicillium sp 3* en face (a) et au revers (b) sur milieu PDA



Photo 12. Aspect microscopique de *Penicillium sp 3* Grossissement $\times 40$

2.1.3. *Alternaria alternata* Sur milieu MEA

-Les colonies d'*Alternaria alternata* sont noires à noires olivâtres ou grisâtres et ressemblent à du daim

-Les conidiophores bruns sont formés de plusieurs cellules, les conidies, de forme murale (dictyospores), isolées ou groupées prennent naissance à partir du conidiophore (Zillinsky, 1983).



Photo 13. Aspect macroscopique d' *Alternaria alternata* sur MEA



Photo 14. Observation microscopique *Alternaria alternata* , Grossissement $\times 40$

2.1.4. *Rhizopus sp* Sur milieu PDA

- le Mycélium du *Rhizopus sp* est à croissance rapide, on relève la présence de sporocystes marrons à noirs à la surface du mycélium.
- les colonies s'étendent rapidement et ont un aspect cotonneux blanc, puis gris lorsque la sporulation se produit.
- sous microscope, le sporocyste est globulaire, coiffé d'une columelle persistante et distincte. La paroi du sporocyste n'est pas persistante, il libère des conidies pouvant donner naissance à un autre mycélium
- Le revers de la colonie est également blanc (**Chabasse,2002**).



Photo 15. Aspect macroscopique de *Rhizopus sp* sur PDA

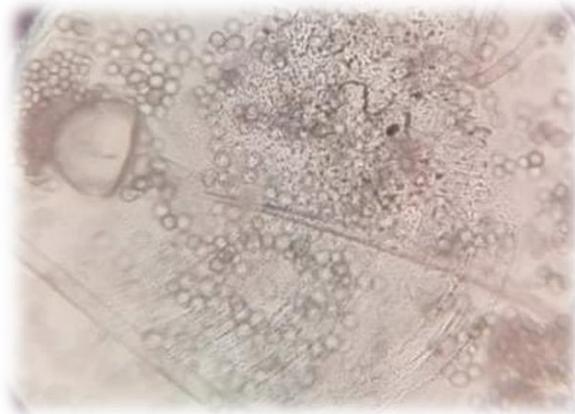


Photo 16. Observation microscopique du *Rhizopus sp* , Grossissement $\times 40$

2.1.5. *Mucor sp* Sur Sabouraud chloramphénicol

- le Mucor est un champignon à croissance rapide avec une croissance laineuse.
- Le revers reste d'un blanc pâle.
- les hyphes sont à peine ou non septés , les sporangiophores sont longs et se terminent par des sporanges ronds remplis de spores (Chabasse, 2002)

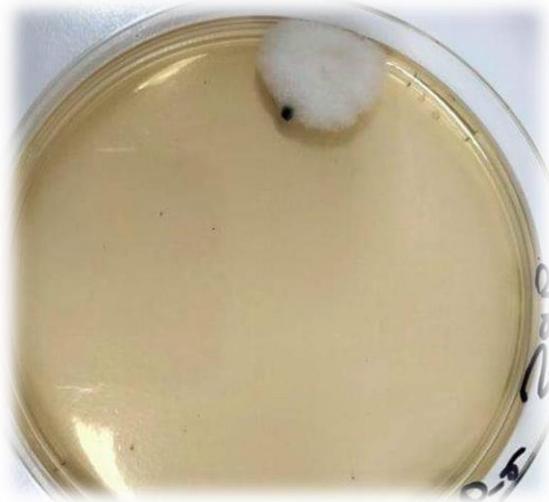


Photo 17. Aspect macroscopique de *Mucor sp* sur Sabouraud Chloramphénicol



Photo 18. Observation microscopique du *Mucor sp* , Grossissement $\times 40$

2.1.6. *Trichoderma sp* Sur milieu PDA

-l'aspect macroscopique des colonies de *Trichoderma sp* peuvent avoir un aspect floconneux ou bien compactées en touffes.

-Au microscope on observe un mycélium composé d'hyphes jaunes, septés, ramifiés à parois lisses. Les conidiophores ont une forme conique.

-Très ramifiés, ils portent des phialides en forme de quilles (Chabasse, 2002).



Photo 19. Aspect macroscopique de *Trichoderma sp* sur milieu PDA



Photo 20. Observation microscopique du *Trichoderma sp* , Grossissement $\times 40$

2.1.7. *Curvularia sp* Sur milieu PDA

-le *Curvularia sp* produit des colonies laineuses à croissance rapide. De face, la couleur de la colonie est initialement blanche à gris rosâtre et vire au brun olive ou au noir à mesure que la colonie mûrit. Du revers, il est brun foncé à noir

-hyphes septés, bruns, des conidiophores bruns et des conidies sont visualisés

-Les conidiophores sont simples ou ramifiés et sont courbés aux points d'origine des conidies (Chabasse, 2002).



Photo 21. Aspect macroscopique de *Curvularia sp* sur milieu PDA.

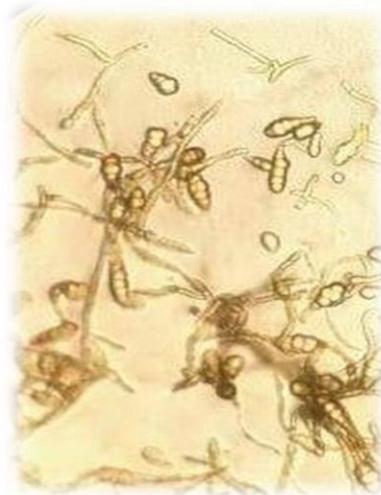


Photo 22. Observation microscopique du *Curvularia sp* , Grossissement $\times 40$

2.1.8. *Ulocladium sp* Sur milieu MEA

-Le mycélium de *Ulocladium sp* est de couleur verte poudreux avec une croissance moyenne, veloutée à laineuse, noire ou noir verdâtre à grise.

-sous microscope, on observe des filaments septés, fin et réguliers avec des conidies rondes et globuleuses portent plusieurs striations (Chabasse, 2002).



Photo 23. Aspect macroscopique d'*Ulacladium sp* sur milieu MEA

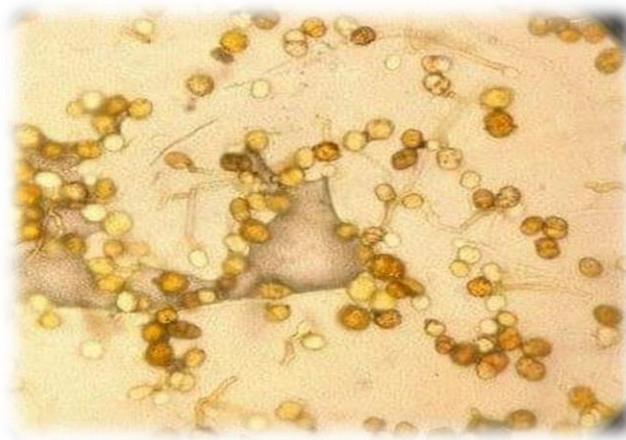


Photo 24. Observation microscopique du *Ulacladium sp* , Grossissement $\times 40$

2.1.9. *Cladosporium sp* Sur Sabouraud chloramphénicol

-L' espèce de *Cladosporium sp* produit des hyphes foncés septés, des conidiophores érigés et pigmentés et des conidies

- la texture des colonies varie également de veloutée à poudreuse. La couleur des colonies est de vert olivâtre à noire; le revers de la colonie est noir. Les conidies sont en général de forme elliptique unicellulaire, sont brun. . Les conidies sont produites en chaîne ramifiée qui se désarticule facilement à maturité. Les parois des conidies sont lisses

-ces observations sont en accord avec (Bensch et al., 2012).



Photo 25. Aspect macroscopique de *Cladosporium sp* sur Sabouraud Chloramphénicol.

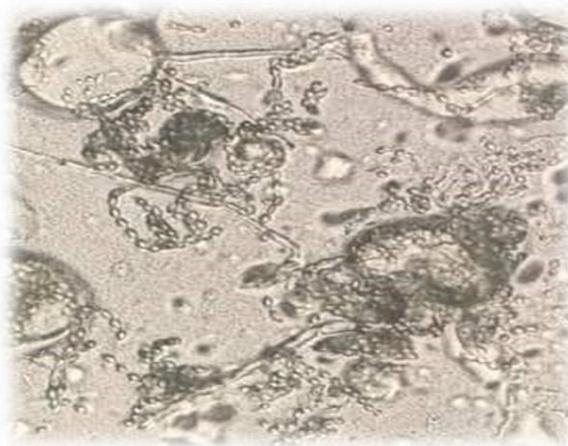


Photo 26. Observation microscopique du *Cladosporium sp* , Grossissement $\times 40$

2.2. Importance des contaminations fongiques

La plupart des genres *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium* et *Ulocladium*, sont naturellement présents sur les cultures en plein champs et dans le sol en tant que saprophytes ou phytopathogènes (Withlow et al. 2001, Zillinsky, 1983). Alors que d'autres genres tels que *Aspergillus* et *Penicillium* sont des moisissures de stockage. Ces derniers sont capables de se développer sur des substrats faiblement hydratés.

Dans l'ensemble et pour les 3 fruits étudiés, les contaminants majeurs sont *l'aspergillus* et le *penicillium* (**Figure 13**).

Sur l'ensemble des trois types de fruits à coque achetés du commerce à partir de différents points de vente de la ville de Guelma l'isolement de leur microflore fongique à fait ressortir une gamme variable dominée par la présence d'*Aspergillus* et *Penicillium* (**Figure 13**)

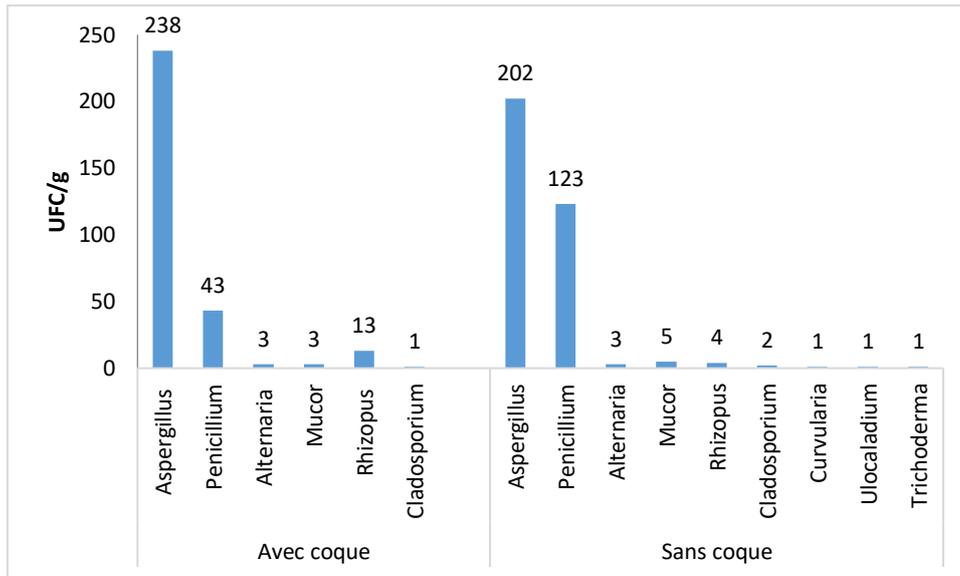


Figure 13. Contaminants identifiés (avec et sans coque)

2.2.1. Arachide

Pour l'arachide (Figure 14) ils sont surtout présents sur les échantillons sans coques avec une dominance de *Penicillium* par rapport à l'*Aspergillus* (95 vs 50 UFC/g).

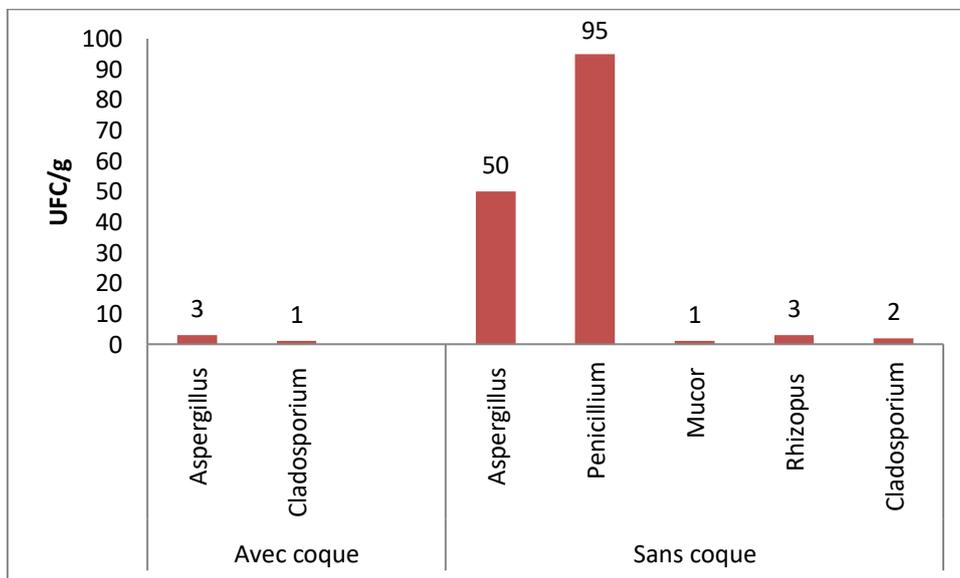


Figure 14. Les différents contaminants fongiques de l'Arachide

2.2.2. Amande

Pour l'amande (**Figure 15**) l'*Aspergillus* est présent en quantité importante sur le fruit avec et sans coque (134 vs 122 UFC/g, respectivement), par contre *penicillium* est peu présent dans le fruit sans coque (13 vs 1 UFC/g, respectivement).

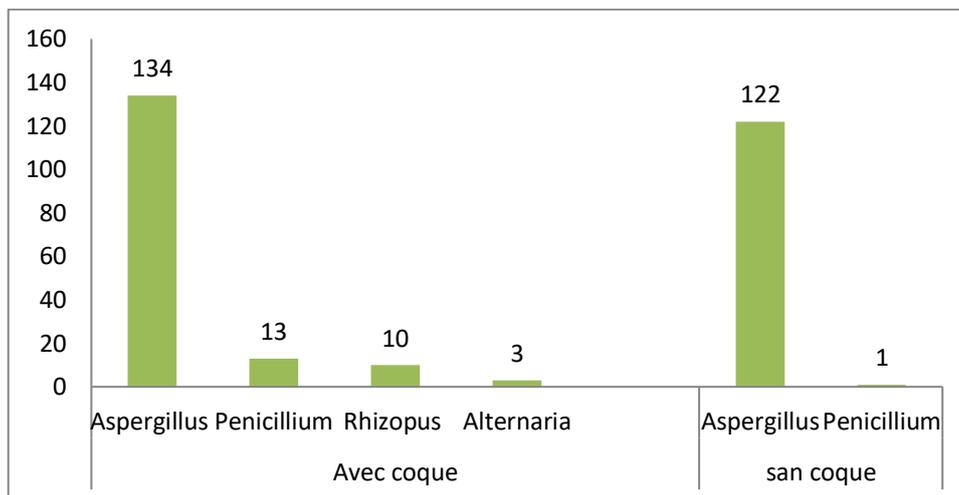


Figure 15. les différents contaminants fongiques de l'Amande

2.2.3. Noix

Il en est de même pour les noix (**Figure16**) on constate que l'*Aspergillus* est presque absent dans les échantillons sans coque (101 vs 1 UFC/g, respectivement). Alors que *Penicillium* est présent dans les fruits avec et sans coque (30 vs 27 UFC/g, respectivement)

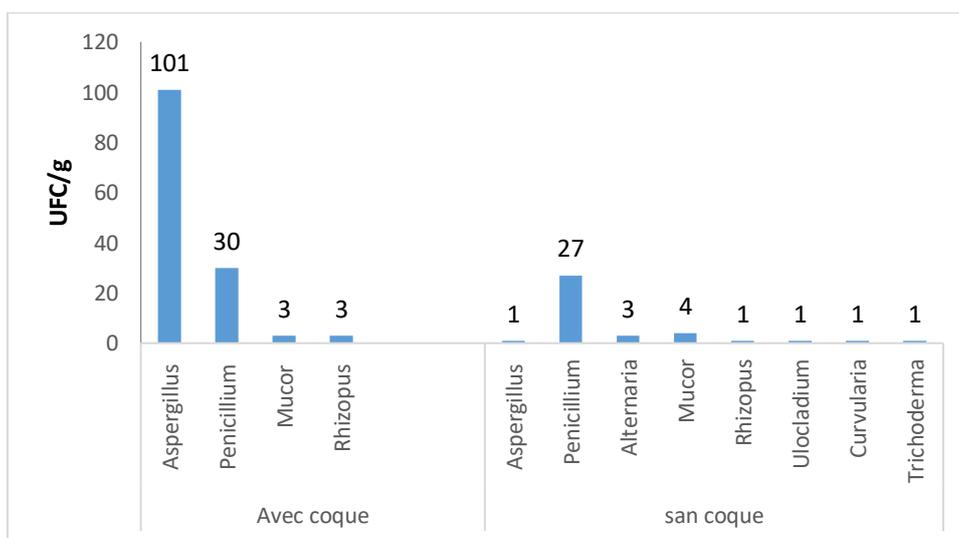


Figure 16. les différents contaminants fongiques de la noix

2.3. Discussion

Une présence importante des différentes espèces fongiques dans nos fruits avec et sans coque, est due probablement à la présence des conditions propices à leur croissance. Les valeurs moyennes obtenues concernant les moisissures sont dominées par *Aspergillus*, *Penicillium* suivies de *Mucor* et *Rhizopus*. Ces moisissures constituent généralement un danger réel pour la santé de l'homme par la sécrétion de substances hautement toxiques au cours de leur prolifération sur ou dans les aliments d'origine végétale notamment les fruits secs.

2.3.1. Le genre *Aspergillus*

Quelques espèces d'*Aspergillus* sont responsables d'infections opportunistes, connues sous le nom d'aspergilloses. Elles apparaissent préférentiellement chez les sujets fragiles contractant par exemple des broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO), des emphysèmes, des cancers broncho-pulmonaires (Badillet, 1987) ou chez les patients soumis à des traitements immunosuppresseurs (corticothérapie, chimiothérapie).

Aspergillus Niger est une espèce xérophile, pouvant vivre dans un milieu assez pauvre en eau. Elle peut germer dans un milieu ayant une activité de l'eau de $a_w = 0,77$ à la température de 35 °C. C'est pourquoi elle est fréquemment isolée dans les fruits secs et les noix. : Il est à l'origine d'otites, de sinusites et d'infections cutanées

Aspergillus Flavus : il est responsable d'aspergilloses pulmonaires ou généralisées (Morin, 1994)

2.3.2. Le genre *Penicillium*

Les espèces de *Penicillium* étant les moisissures les plus répandues dans le milieu intérieur, de nombreuses pathologies leurs sont associées. Elles peuvent être causées par le champignon lui-même ou par les toxines qu'il produit. Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation de spores et se rapportent donc le plus souvent aux voies respiratoires inférieures et supérieures.

Par ailleurs, les *Penicillium* peuvent être responsables d'inflammation de la cornée (kératomycose), d'onychomycose et d'infection de l'oreille externe (Hennequin, 1998). Chez les personnes immunodéprimées (par exemple, les personnes atteintes par le VIH), les *Penicillium* sont à l'origine d'infections systémiques touchant les organes profonds comme le foie, la rate, et les ganglions (Rosenthal, 2000)

2.3.3. Le genre *Alternaria*

Alternaria alternata

Certains *Alternaria spp* sont saprophytes. Toutefois, certaines espèces peuvent devenir des agents pathogènes opportunistes responsables de maladies atteignant plantes, insectes et êtres humains. De nombreuses espèces sont des phytopathogènes de plantes cultivées ou d'ornementation. Chez l'Homme, les *Alternaria spp* sont principalement responsables d'affections cutanées, d'otites, de kératites et d'allergies sévères. *Alternaria alternata* est connue pour être un puissant allergène, déclenchant d'importantes réactions (asthme ou rhinite) durant les mois d'été (Rotem, 1994).

2.3.4. Les *Mucorales*

La présence des *mucorales* (*Rhizopus*, *Mucor...*), dans nos échantillons, peuvent être expliquée par la durée de stockage, l'origine des grains oléagineux et la période de prélèvement. Leur impact négatif réside dans l'altération des substrats (qualité organoleptique : gout, couleur, saveur, texture).

2.3.5. Le genre *Trichoderma sp*

Les genres de *Trichoderma sp* sont des phytopathogènes de plantes et qui peuvent causer des maladies de cultures telles que le pommier et la luzerne, d'autres souches peuvent aussi produire des métabolites phytotoxiques en masse. Elle peut produire comme mycotoxines la gliotoxine.

2.3.6. Le genre *Curvularia sp*

Le genre *Curvularia sp* est la moisissure qui est considérée comme la souche la plus virulente responsable de la pourriture des fruits

2.3.7. Le genre *Cladosporium sp*

La présence de ce genre peut induire des pathologies respiratoires comme les réactions allergiques. La sévérité de la réaction dépend d'un grand nombre de facteurs par exemple (sujet âgé ou bien jeune) et n'est pas seulement proportionnelle à la dose d'exposition.

2.3.8. Le genre *Ulocladium sp*

Les espèces d'*Ulocladium* ressemblent étroitement à certaines espèces d'*Alternaria* et elles ont même été classées parfois comme telles dans le passé. Ces moisissures sont largement

distribuées dans le sol, sur le bois et sur des végétaux en décomposition. Quelques espèces sont des pathogènes s'attaquant aux plantes et des agents détériorant les aliments (surtout des noix, des haricots et des céréales)

Les corrélations entre les caractéristiques microscopiques et macroscopiques nous ont permis de faire une identification de différentes souches fongiques.

La présence importante de ces espèces fongiques dans nos fruits avec et sans coque, est due probablement à la présence des conditions propices à leur croissance. Les valeurs obtenues concernant les moisissures sont dominées par *Aspergillus*, *Penicillium* suivies de *Mucor* et *Rhizopus*. Ces moisissures constituent généralement un danger réel pour la santé de l'homme par la sécrétion de substances hautement toxiques au cours de leur prolifération sur ou dans les aliments d'origine végétale notamment les fruits secs.

Ils produisent un certain nombre de mycotoxines de l'Aflatoxines, la Patuline, l'Ochratoxine, l'acide Penicillique. Les niveaux de contamination sont assez inquiétants sachant que la majorité de ses souches sont toxigènes et sécrètent des mycotoxines. Ces mycotoxines sont dangereuses et perverses et donnent des effets génotoxiques, cancérigènes, néphrotoxiques, leurs effets chroniques peut s'avérer plus grave pour la santé humaine.

Nos résultats suggèrent des mesures préventives pour lutter contre les contaminations qui doivent être prises pour règlementer la commercialisation de ses produits, particulièrement lorsqu'ils sont destinés à la consommation directe, comme c'est le cas abordé dans la présente étude.

- Amalaradjou, M. A. R. and K. Venkitanarayanan (2008). Detection of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Alternaria* species in fruits and vegetables. *Mycotoxins in fruits and vegetables*, Elsevier: 225-247.
- Badillet G, de Briève C, Guého E (1987). Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, dans : Atlas clinique et biologique, volume II. Paris : Edition VARIA, 1987.
- Bailly, S. L. B.-B. J. and H. Brugere (1999). "Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie." *Revue Mdd. Vit5*: 413-430.
- Basse, B (2020). Valorisation de la graine d'arachide broyée: rôle des différentes fractions dans la structuration par gélification d'une suspension aqueuse, Université Paris-Saclay.
- Bennett J.W., Klich M., (2003), *Mycotoxins*, *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 497-516.
- Bensch.U; Braun, J.Z; Groenewald and P.W. Crous (2012). The genus *Cladosporium*; *Studies in Mycology* 72: 1–401.
- Botton B, B. A., Fév Amalaradjou, M. A. R. and K. Venkitanarayanan (1990). Detection of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Alternaria* species in fruits and vegetables. *Mycotoxins in fruits and vegetables*, Elsevier : 225-247.
- Bourgeois C.M., M. J. F., Zucca J (1989). *Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*
- Bourrier, T., L. Villevieille, et al. (2001). "Allergie alimentaire à la noix du Brésil : à propos de cinq cas chez l'enfant d'âge préscolaire." *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 41(4) : 401-406.
- Bouvier, M., B. Bensaid, et al. (2009). "Particularités de l'allergie à l'arachide chez l'adulte." *Revue Française d'Allergologie* 49(3) : 227-229.
- Chabasse.D (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologiemedicale, 25-27.
- Chala, A., A. Mohammed, et al. (2013). "Natural occurrence of aflatoxins in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) from eastern Ethiopia." *Food control* 30(2) : 602-605.
- Cisse, L. and G. Vachaud (1988). "Influence d'apports de matière organique sur la culture de mil et d'arachide sur un sol sableux du Nord-Sénégal. I.--Bilans de consommation, production et développement racinaire." *Agronomie* 8(4): 315-326.

- Clavel, D., A. Da Sylva, et al. (2013). "Amélioration de la qualité sanitaire de l'arachide au Sénégal: un challenge pour une opération de recherche-développement participative." *Cahiers Agricultures*22(3): 174-181 (171).
- Clement, J. M. (1981). "Larousse agricole " Edition LibraireLarouse. Paris.
- Davet P. (1996). *Vie microbienne du sol et production végétale*. INRA. Paris. P : 52-57.
- Dutau, G. and F. Rancé (2007). "Facteurs de risque de l'allergie alimentaire sévère." *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*47(3) : 102-109.
- Fleurentin, C (2017). *Facteurs prédictifs d'allergie sévère à la noix de cajou chez l'enfant*, Université de Lorraine.
- Galtier, P., N. Loiseau, et al. (2006). "Toxicologie des mycotoxines : dangers et risques en alimentation humaine et animale." *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Hennequin C, Lavarde V (1998). *Infections à Penicillium*, *Encycl. Méd. Chir.* Paris : Elsevier.
- Herry, M.-P. (2003). "Dosage des mycotoxines dans les produits oléagineux." *Oléagineux, Corps gras, Lipides*10(4): 306-308.
- Houissa, H. (2020). *Les Mycotoxines du mil: occurrence et flore fongique*, Université Montpellier; Université de Tunis El-Manar. Faculté des Sciences
- Jacquenet, S. and D.-A. Moneret-Vautrin (2007). "Les allergènes de l'arachide et des fruits à coque." *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*47(8): 487-491.
- Karaca, H., Y. S. Velioglu, et al. (2010). "Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone." *Toxin Reviews*29(2): 51-59.
- Kidd, S., et al, (2016). *Descriptions of medical fungi*. The National Library of Australia Cataloguing-in-Publication. Third edition. 57-77
- Laifa, B., S. Adouani, et al. (2020). *Production des substances antifongiques par les bactéries lactiques*, Université de Jijel.
- Liger, L. (1758). *Dictionnaire général des termes propres à l'agriculture avec leurs définitions et étymologies*.
- Luttfullah, G. and A. Hussain (2011). "Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan." *Food control*22(3-4): 426-429.
- Morin O (1994). *Aspergillus et aspergilloses : biologie*, Ed. Techniques, *Encyl. Méd. Chir.* Paris : Elsevier. Maladies infectieuses 8-600-A-10.

- Nawar, L. S (2008). "Prevention and control of fungi contaminated stored pistachio nuts imported to Saudi Arabia." *Saudi J. Biol. Sci*15(1) : 105-112.
- Rancé, F. and G. Dutaub (2007). "Panorama des allergènes alimentaires chez l'enfant en 2007." *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 47 : S41-S46.
- Rapper, K. B., and Fennell .D.I. (1965). *Maladies communes des céréales à paille. Guide d'identification.* Mexico, D.F.CIMMYT, 141 p.
- Reboux, G. (2006). *Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques.* *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* p : 208–212.
- Rosenthal E, Marty P, Ferrero C, et al. (2000) *Infections à Penicillium marneffeii chez un patient infecté par le HIV.* *Press Méd*, pp. 363-364.
- Rotem J (1994). *The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity.* APS Press, 344p.
- Rougé, P., R. Culerrier, et al. (2009). "Quoi de neuf dans la description des allergènes de l'arachide et des fruits à coque ?" *Revue Française d'Allergologie* 49(3) : 230-234.
- Sallam, M.N (2007). *Fungal contamination and production of mycotoxins.*
- Schilling., R. (1996). "L'arachide en Afrique tropicale." *Maisonneuve ET Larouse*171 : 15-30 142-146.
- Sicherer, S. H. and H. A. Sampson (2007). "Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120(3): 491-503.
- Souza, R. G., A. C. Gomes, et al. (2015). "Nuts and legume seeds for cardiovascular risk reduction: scientific evidence and mechanisms of action." *Nutrition reviews* 73(6) : 335-347.
- Tabuc, C. (2007). *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines.*
- Tolosa, J., G. Font, et al. (2013). "Nuts and dried fruits: Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins." *Food control* 33(1): 215-220.
- Tournas, V., N. Niazi, et al. (2015). "Fungal presence in selected tree nuts and dried fruits." *Microbiology insights* 8: MBI. S24308.
- Withlow. L.W; and Hagler. W. M (2001). *Mycotoxin contamination of feedstuffs-An additional stress factor for dairycattle.* North Carolina State University, Raleigh, NC. *Symposium sur les bovinslaitiers.* CRAAQ, Québec

Yada, S., K. Lapsley, et al. (2011). "A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients." *Journal of Food Composition and Analysis* 24(4-5) : 469-480.

Zillinsky, F. J (1983). *Maladies communes der cereales à paille: Guide d'identification.*

Annexes

Pour faire l'isolement et l'identification des champignons. On a utilisé 03 milieux de culture :

1. milieu PDA : « Potato dextrose agar »

Est un milieu de culture microbiologique. Milieu organique.

L'infusion de pomme de terre se prépare en faisant bouillir dans l'eau 200g de pomme de terre, tranchées (lavées mais non pelées), les mettre dans 1L d'eau et porter à ébullition pendant 1h, puis en laissant décanter le bouillon obtenu ou en filtrant à travers un coton à fromage.

Pour le milieu ensuite en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final d'un litre. Puis on ajoute 20g de glucose et 20g d'agar agar.

Dissoudre l'agar à chaud dans l'extrait puis ajouter le glucose.

Stériliser 110°pendant 30min



2. Milieu MEA : « Malt Extract Agar »

Extrait de malt	20g
Peptone	1g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau	1L

Stérilisation 120°C pendant 20min



3. Milieu Sabouraud

Glucose	2g
Peptone chapoteaut	10g
Agar	15g
Eau distillés	1L
Ph	5,6

Stérilisation 120°pendant 20min

Eau physiologique :

Nacl	9g
ED	1000ml

