

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة 20 أوت 1955 - سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOÛT 1955-SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie Mémoire

Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Intitulé

**Etude Mycologique et Mycotoxicologique
Des Fruits Secs À Coque Commercialisés
Dans La Région de Skikda**

Présenté Par: - Chouit Maissa
- Draoui Oumayma
- Merdoul Amina
- Mihoub Rokia

Membres de Jury:

Boulechfar Safia	MCB	Présidente	Univ.20 août 1955-Skikda
Krouma Hamida	MCB	Directeur de mémoire	Univ. 20 août 1955-Skikda
Melouka Hadda	MCB	Examinatrice	Université 20 août 1955-Skikda

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

J'exprime toute ma reconnaissance envers mon Encadrante de mémoire, Krouma Hamida, MCB à la Faculté des Sciences Université 20 Aout 1955 Skikda. Quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde gratitude pour avoir dirigé ce travail. Ses encouragements, ses conseils et sa patience m'ont beaucoup aidé à surmonter toutes les difficultés. Nous remercions les ingénieurs de ui nous ont aidés dans la partie pratique de ce travail. Aussi nous remercions les membres de jury : Mme Boulechfar. S, maître de conférence B à l'université de SKIKDA. Nous remercions également Mme Melouka. H maître de conférence B à l'université de SKIKDA d'avoir accepter Examine ce travail. A toute personne qui a participé de près ou loin, directement ou indirectement à réaliser notre travail.

Dédicace

Avant toute chose, je tiens à remercier Allah, source de toute sagesse et force, sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour.

À mon père « nadir » pour ton amour, ton soutien, ta forme et ta confiance en moi.

À mon paradis « Souad », pour ta tendresse et les prières qui m'ont portée dans chaque étape.

À ma sœur « romaissa », merci d'avoir toujours été là pour moi tu es mon soutien.

Ma force. Celle qui croit toujours en moi.

À mon frère « Moustaphe » pour ta force tranquille, ton soutien silencieux.

À mon ami « Rania » pour ton énergie positive, ta gentillesse et ton écoute et ta lumière dans les moments difficiles.

À mon fiancé « Rachid » pour sa patience, son soutien et son implication, qui m'ont permis de poursuivre mes ambitions sereinement.

A tous les membres de ma grande famille, qui n'ont jamais cessé de me donner un coup de main, ce travail est le résultat de vos encouragements. A toutes les personnes qui j'aime et qui m'aiment.

À « Dr Krouma » le professeur encadrant de ce travail, j'adresse mes plus sincères remerciements pour ses conseils précieux et son accompagnement tout au long de la préparation de ce mémoire. Un chaleureux remerciement

à mes collègues de recherche « Oumayma, Amina et Maya » pour leur collaboration, leur entraide et les moments partagés .

Rokia





Dédicace

Par-dessus tout, je remercie et loue Dieu de m'avoir accordé la réussite et de m'avoir honorée par ce noble statut de savoir et de connaissances utiles.

À la plus grande femme de ma vie « ma mère » à qui je dois ma patience, ma force et ma confiance. Que Dieu te protège et te garde toujours comme une lumière qui éclaire mon chemin.

À « mon père » qui a été pour moi un soutien dans ma vie académique et sociale, qui n'a cessé de répondre à mes besoins avec générosité et amour. Que Dieu te garde comme une couronne sur nos têtes et t'accorde une longue vie remplie de santé et de bonheur.

Je dédie également cette réussite à ma chère sœur « Hadjer » et à mon cher frère « Mimou » merci du fond du cœur pour votre amour et votre soutien constants, depuis mes toutes premières secondes dans cette vie.

Une dédicace spéciale à ma petite nièce « Rawan » source de joie et de bonheur pour toute la famille.

Je tiens à remercier profondément « mes grands-parents » ainsi que mes tantes « Zahia, Nacira, Nadia, Amel, Sihem et Radia » et mes oncles « Mohamed, Fateh et Houcine » pour leur affection et leur soutien inestimable.

Un grand merci également à mes cousines « Batoul, Nour, Chaima, Loudjaine, Manar, Sirine, Djoumana » et à mes « Aya, Rayen, Malak et Amani » pour leur présence, leur soutien et leur amitié sincère.

À « Dr Krouma » le professeur encadrant de ce travail, j'adresse mes plus sincères remerciements pour ses conseils précieux et son accompagnement tout au long de la préparation de ce mémoire. Un chaleureux remerciement à mes collègues de recherche « Oumayma, Amina et Rokia » pour leur collaboration, leur entraide et les moments partagés.

Maya

Dédicace

Nous remercions avant tout Dieu Tout-Puissant pour nous avoir soutenus par Sa force, Sa patience et Sa guidance tout au long de la réalisation de ce travail.

À Ma Mère Affable, honorable, aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement. Tu n'as jamais cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour ses enfants, en me guidant sur le bon chemin dans ma vie et mes études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

À Ma Famille À mon grand frère Alla Eddine, Merci pour ton soutien constant et tes précieux conseils qui ont toujours éclairé mon chemin.

À mon petit frère Abdelmalek, Ton sourire innocent et ton âme pure ont toujours apporté de la joie à mon cœur.

À ma chère tante Samira et Zabida, Merci pour ta tendresse et ta présence rassurante. Tu as toujours été comme une seconde mère pour moi.

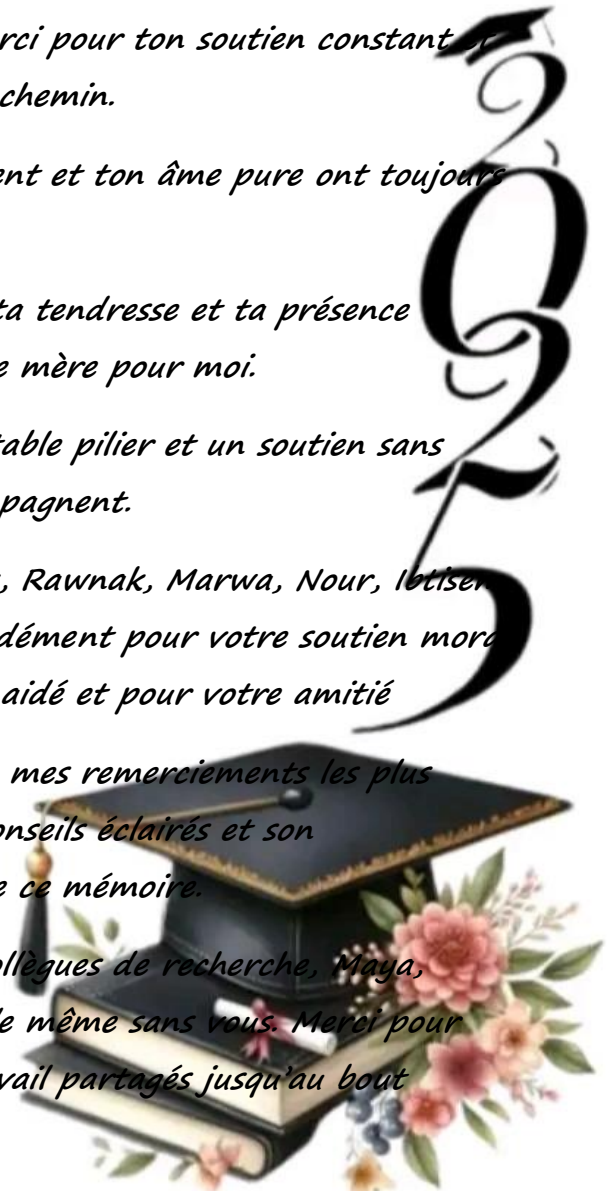
À mon oncle bien-aimé Bachir, Tu as été un véritable pilier et un soutien sans faille. Toute ma gratitude et mon respect t'accompagnent.

À mes chères amies : Ikram , Wafa , Hiba , Malek, Rawnak, Marwa, Nour, Lotisen Samah , Mariem, ,Sara . Je vous remercie profondément pour votre soutien moral et vos paroles réconfortantes qui m'ont beaucoup aidé et pour votre amitié

À Dr Krouma, Encadrante de ce travail, j'adresse mes remerciements les plus sincères pour son encadrement bienveillant, ses conseils éclairés et son accompagnement tout au long de la réalisation de ce mémoire.

J'exprime également toute ma gratitude à mes collègues de recherche, Maya, Oumayma et Rokia Ce mémoire n'aurait pas été le même sans vous. Merci pour l'esprit d'équipe, l'entraide et les moments de travail partagés jusqu'au bout

Amina



Dédicace

Nous remercions avant tout Dieu Tout-Puissant pour nous avoir soutenus par Sa force, Sa patience et Sa guidance tout au long de la réalisation de ce travail.

À la femme la plus exceptionnelle de ma vie, ma mère «Houria», qui m'a transmis patience, force et confiance. Que Dieu te protège et te garde, toi qui es la lumière qui éclaire mon existence.

À mon père «Reda», qui a toujours été là, veillant sur moi avec bonté, répondant à mes besoins avec amour et dévouement, dans chaque pas de ma vie académique et sociale. Que Dieu te protège, t'accorde une longue vie pleine de santé et de joie, et fasse de toi l'honneur et la fierté de notre famille.

À ma chère sœur «Aya» Je dédie cette réussite à ma précieuse sœur, Aya, dont l'amour sincère et le soutien indéfectible m'ont accompagné depuis mes tout premiers souffles. Ta présence bienveillante, ton écoute, tes encouragements et ta tendresse ont été pour moi une source inestimable de réconfort et de force. Merci, du plus profond de mon cœur, d'avoir toujours cru en moi et d'avoir été, chaque jour, un rayon de lumière sur mon chemin.

À mes chers frères : «Zakaria, Oussama et Akram» Merci pour votre affection sincère, vos paroles encourageantes et l'énergie positive que vous m'avez constamment transmise. Votre présence à mes côtés a été un véritable soutien tout au long de mon parcours.

À mes chères amies : Nardjes, Amira, Meriem, Dalel, Choubaila, Sirine et Youssra, Merci d'avoir été là, avec vos mots doux, votre bienveillance et cette complicité précieuse qui a rendu chaque étape plus légère et chaque moment plus beau. Votre présence a été un véritable refuge, un souffle d'amitié sincère dans les instants de doute comme dans ceux de joie. Je vous garde dans mon cœur avec une profonde gratitude et une affection infinie.

À Dr Krouma, encadrante de ce travail, j'adresse mes remerciements les plus sincères pour son encadrement bienveillant, ses conseils éclairés et son accompagnement tout au long de la réalisation de ce mémoire.

J'exprime également toute ma gratitude à mes collègues de recherche, Maya, Amina et Rokia, pour leur précieuse collaboration, leur esprit d'équipe et les nombreux moments de partage qui ont enrichi cette expérience.

Oumayma



Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Introduction1

I. Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les moisissures 3

1. Généralités	4
2. La production des moisissures	4
2.1. Reproduction sexuée	5
2.2. Reproduction asexuée	5
3. Classifications.....	6
4. Conditions de croissance des moisissures	7
4.1. Condition physicochimiques	7

Chapitre 2 : Les mycotoxines

1. Généralité	11
2. Biosynthèse des mycotoxines	11
3. Nature chimique des mycotoxines	12
4. Mycotoxinogénèses	13
5. Les facteurs influençant	13
5.1. Facteurs intrinsèques	13
5.2. Facteurs extrinsèques	13
6. Les principales mycotoxines	15
6.1. Les Aflatoxines	15
6.2. L'Ochratoxine A.....	15
6.3. Les Fumonisines	16
6.4. La Patuline	17
7. Les Champignons toxigènes	18
8. Les Moisissures et les mycotoxines dans la chaîne alimentaire	22

Chapitre 03 : Les fruits Secs à coque

1. Généralité	23
2. Caractéristiques des fruits secs	24
2.1. L'arachide	24
2.2. Les amandes	25
2.3. Les noix	26
3. Stockage des fruits à coque	27
4. Altération des fruits secs par les mycotoxines	28
II. Matériel et Méthodes.....	29
1. Étude mycologique	30
1.1. Échantillonnage	30
1.2. Désinfection des fruits secs (les grains et les coques	31
1.3. Isolement de la flore fongique	31
1.3.1 Méthode directe d'Ulster	33
1.3.2-Méthode indirect de dilution	32
1.4- Purification	33
1.5- Identificaion des isolats	33
1.5.1. Identification macroscopique	33
1.5.2. Identification microscopique	34
2. Étude mycotoxicologique	34

2.1.	Préparation de milieu de fermentation	35
2.2.	Ensemencement du milieu de fermentation	35
2.3.	Extraction	35
2.4.	Détection des mycotoxines par la chromatographie du couche mince	36
III.	Résultas et Discussion	38
1.	Étude mycologique des fruits secs	39
1.1.	Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons des fruits coque	39
1.2.	Identification des souches fongiques isolées	39
1.2.1.	Identification macroscopique	40
1.2.2.	Identification microscopique	47
2.	Étude mycotoxicologique	54
	Discussion	62
	Conclusion et Perspective	66
	Les références bibliographiques.....	69
	Annexe	76
	Résumé	79

Liste des figures

Figure 01	La reproduction sexuée et asexuée chez les champignons	5
Figure 02	La biosynthèse des mycotoxines Structure chimique	12
Figure 03	d'Aflatoxine B1	15
Figure 04	Structure chimique d'Ochratoxine A	
Figure 05	Structure chimique de Fumonisines	17
Figure 06	Structure chimique de Patuline	18
Figure 07	Caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	19
Figure 08	Caractères morphologiques du genre <i>Penicillium</i>	20
Figure 09	Caractères morphologiques du genre <i>Fusarium</i>	21
Figure 10	Observation microscopique de genre <i>Alternaria</i>	22
Figure 11	Fruits à coque (Noix)	24
Figure 12	L'arachide avec et sans coque	25
Figure 13	L'amande avec et sans coque	26
Figure 14	La noix avec et sans coque	26
Figure 15	Fruits secs contaminés	28
Figure 16	Désinfection des fruits secs. A) Eau de javel, B) Ethanol, C) Eau distillé.	31
Figure 17	Ensemencement des fruits secs sur milieu PDA.	32

Figure 18	Les étapes de l'isolement de la flore fongique à partir des fruits secs (Arachide, amande, noix). A) Echantillon, B) Echantillon moulu, C) Dilutions Décimales, D) Ensemencement.	33
Figure 19	Fermentation et extraction de mycotoxines. A) Culture fongique après Fermentation, B) Filtration du milieu de fermentation, C) Décantation, D) Evaporation de L'extrait.	36
Figure 20	Les extraits bruts	37
Figure 21	La migration de solvant	37
Figure 22	Pourcentage des isolats fongique obtenus de chaque type de fruits à coque.	39
Figure 23	Représentation graphique de différentes espèces <i>d'aspergillus, penicilium</i> et <i>fusarium</i> identifiées dans les échantillons (noix, amande) organiques au rotavapor	54
Figure 24	Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par les souches fongiques obtenues	55
Figure 25	Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus sp</i> 01	55

Figure 28	Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus sp3</i>	57
Figure 29	Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Penicillium sp 01</i>	57
Figure 30	Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Penicillium sp 2</i>	57
Figure 31	Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus sp4</i>	58
Figure 32	Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus sp5</i>	58
Figure 33	Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus sp 6</i>	59
Figure 34	Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus sp7</i>	59

Liste des abréviations

Am	Amande
Ar	Arachide
Aw	Activité de l'eau
B	Blanche
C	Carbone
Ca	Calcium
CCM	Chromatographie sur couche mince
COOH	Groupe Carboxyle / acide carboxylique
CPA	l'acide Cyclopiazonique
Cu So₄	Sulfate de cuivre
D1.D2.D3	Les dilutions
DON	Déoxynivalénol
Env	Enveloppé
g	Gramme
G	Grossissement
H	Hydrogène
L	Litre
mL	millilitre
Mg So₄	Sulfate de magnésium
N	Noix
N	Azote
N₂	Azote atmosphérique
NH₂	groupe aminé
NH₄⁺	Ammonium
NO₃⁻	Nitrate

O	Oxygène
OTA	Ochratoxine A
PAT	La patuline
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potentiel hydrogène
Rf	Rapport frontal
S	Souche
SAB	Sabouraud
Sc	Sans coque
Sm	Solution mère
Sp	Sporum
UV	Ultra Violet
V	Verte
YES	Yeast Extract Sucrose
Zn So₄	Sulfate de zinc
°C	degré celsius

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification des Eumycètes et leurs caractéristiques	06
Tableau 02	Les échantillons des fruits secs étudiés	30
Tableau 03	Observations macroscopiques des différents isolats obtenus à partir des fruits à coques analysés.	40
Tableau 04	Observation microscopique des différents isolats obtenus	47
Tableau 5 :	Les valeurs de coefficients Rf (rapport frontal) des spots séparées par CCM	60

Introduction

Introduction

La qualité microbiologique constitue un enjeu majeur de la sécurité alimentaire. Elle représente un défi considérable pour le commerce international et est fréquemment utilisée comme barrière non tarifaire à l'importation. Par ailleurs, elle joue un rôle crucial dans la prévention des maladies d'origine alimentaire (**Maniar et El Ouali Lalami, 2011**).

En Algérie, comme dans de nombreux pays, la population consomme une grande variété de fruits à coque, que ce soit directement ou intégrés dans des préparations traditionnelles, notamment lors de festivités (Ramadan, les mariages ou les cérémonies de circoncision) (**Matmoura et al., 2019**).

En plus d'être savoureuses et riches en nutriments, elles se révèlent être de puissants antioxydants et aideraient également à prévenir les maladies cardiovasculaires et certains cancers (**Marie-paule, 2003**).

Au cours de leur développement, ces champignons microscopiques peuvent devenir nuisibles en produisant des métabolites secondaires, dont certains sont toxiques. Ces substances, appelées « mycotoxines », peuvent se former sur les plantes aussi bien au champ qu'au cours des différentes étapes de manipulation post-récolte (récolte, transport, stockage) (**El Khoury, 2016**).

On les retrouve comme contaminants naturels dans une grande variété de produits alimentaires, notamment les céréales, les fruits, les noix, les amandes, les graines, ainsi que dans les produits dérivés destinés à l'alimentation humaine ou animale (**Huybrechts et al., 2013**).

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**).

Le climat chaud et humide des régions côtières algériennes, où vit environ 75 % de la population, favorise fortement le développement des moisissures et la production de mycotoxines (**Matmoura et al., 2019**).

Malgré les efforts déployés pour limiter la contamination fongique, les champignons toxigènes restent omniprésents dans l'environnement, 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**).

Leur présence dans les produits agricoles est souvent liée à des conditions propices de température et d'humidité, avant comme après la récolte (**Rahmani *et al.*, 2009**).

Pour cela , la prévention de la contamination des denrées alimentaires, notamment les fruits secs et à coque, représente aujourd'hui un véritable enjeu de santé publique (**Alwakeel *et al.*, 2011**).

De ce fait, l'objectif de ce travail est d'étudier la flore fongique potentiellement productrice de mycotoxines, isolée à partir des fruits à coques (Noix, Amandes et Arachides). Il repose sur quatre grands volets :

- Isolement des souches fongiques à partir de fruits à coque commercialisés à Skikda.
- Purification et identification des isolats obtenus.
- Évaluation de la capacité des isolats obtenus à produire des mycotoxines.
- Analyse des mycotoxines élaborées par chromatographie sur couche mince (CCM).

*Revue
bibliographique*

Chapitre 1 : Les moisissures

1- Généralités sur les moisissures

Le mot « champignon » vient du latin *fungus*. L'étude scientifique des champignons a débuté en 1836 avec Miles Joseph Berkeley. Auparavant, ils étaient associés aux plantes en raison de ressemblances morphologiques et écologiques. Leur identification repose sur des critères morphologiques, physiologiques, biochimiques ou chimiques (**Senanayake et al., 2020**).

Les champignons, également appelés Mycètes ou Fungi, sont des organismes eucaryotes, c'est-à-dire qu'ils possèdent un noyau bien défini. Ils peuvent être unicellulaires (levures) ou pluricellulaires (moisissures), et constituent l'un des groupes d'organismes les plus importants sur terre, jouant un rôle essentiel dans les écosystèmes. Les moisissures sont des champignons filamenteux d'aspect microscopique (micromycètes) et immobile, dépourvus de chlorophylle ce qui les condamne à une hétérotrophie totale. 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 (**Tortora et al., 2003**). Le mycélium produit des formes permettant non seulement la dissémination, mais contribuent aussi à la survie en conditions environnementales défavorables que l'on accorde l'appellation de spores (**Madelin, 1994**).

Selon leur mode de vie, elles peuvent être saprophytes (se nourrissant de matière morte), parasites (vivant sur des organismes vivants) ou symbiotiques (vivant en association avec d'autres organismes) (**Meheust, 2012**).

Par ailleurs, certaines moisissures peuvent être pathogènes, notamment par la production de toxines responsables d'intoxications alimentaires ou de mycotoxicoses (**Chabasse et al., 2002**).

2- La reproduction des moisissures :

Les moisissures se reproduisent grâce à des spores, produites soit par reproduction sexuée (on parle alors de champignons téléomorphes), soit par reproduction asexuée (champignons anamorphes). Lorsqu'un champignon filamenteux possède à la fois une forme sexuée et asexuée, on le désigne sous le terme d'holomorphe (**Chabasse et al., 2002**).

2.1. Reproduction sexuée :

La reproduction sexuée implique l'union de deux mycéliums de types sexuels opposés. Un mycélium haploïde (n chromosomes) entre en contact avec un autre mycélium de polarité complémentaire, entraînant la fusion de leurs cytoplasmes (plasmogamie) (Boudih, 2011). Il y a par la suite fusion des gamètes, par caryogamie, permettant l'obtention d'une cellule œuf diploïde contenant un nombre pair de chromosomes. Ce zygote va se diviser par méiose et donne des spores haploïdes, ne possédant qu'un seul exemplaire de chromosomes (Bouchet *et al.*, 2005).

2.2. Reproduction asexuée :

Ce type de reproduction concerne les formes imparfaites, ou anamorphes (Deuteromycota). La multiplication asexuée correspond au développement d'une spore ou d'un fragment de mycélium sur un substrat. Le noyau des spores est issu directement du noyau du thalle par simple mitose. Le mycélium produit alors des conidiophores, qui portent à leur extrémité des conidies. Celles-ci sont ensuite libérées et dispersées dans le milieu environnant (Figure 1) (Boudih, 2011).

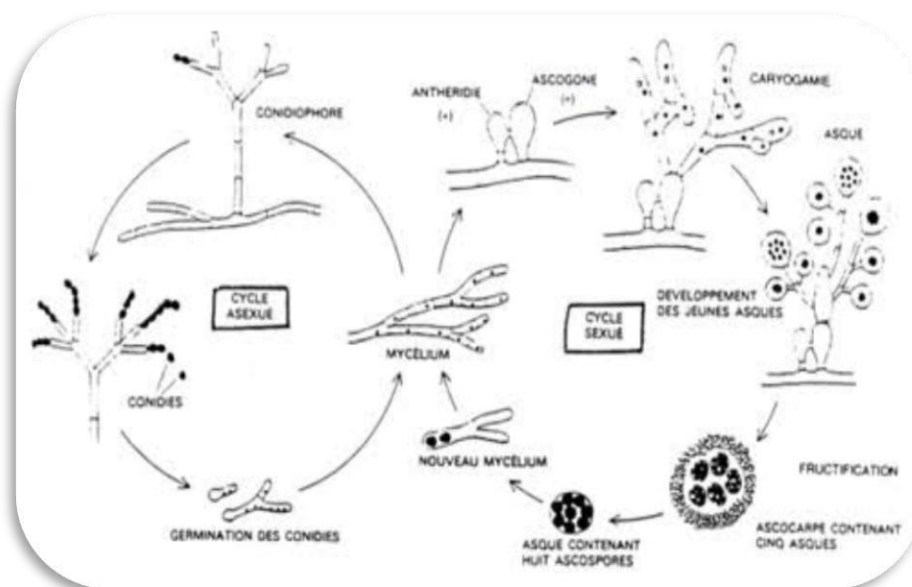


Figure 01: La reproduction sexuée et asexuée chez les champignons (Gauthier, 2016)

3- Classifications

La classification des moisissures repose sur leur mode de reproduction ainsi que la morphologie de leur mycélium (cloisonnement des hyphes) (Davet, 1996). Bien qu'elles ne forment pas un groupe systématique homogène, elles sont réparties en différentes familles de champignons microscopiques. Cependant, ces critères définissent quatre groupes principaux : les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes (Bourgeois, 1989). Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée, dit anamorphe et sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. Ces espèces sont classées dans le quatrième groupe, les Deutéromycètes ou *Fungi imperfecti*. Ces principaux groupes, sont les plus étudiés en microbiologie alimentaire.

Tableau 1 : Classification des Eumycètes et leurs caractéristiques

Nom du groupe	Principaux caractères	Exemples d'espèces
Zygomycètes (Mucorales)	-Mycélium sans cloisons avec une reproduction sexuée (Zygospores) - La famille la plus importante : Mucorales, qui comprend à un grand nombre de moisissure saprophytes, et quelques espèces parasites de champignons (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996)	<i>Rhizopus, Mucor, Absidia</i> (Guiraud, 1998)
Ascomycètes (Eurotiales)	-Thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores) -Regroupe de nombreux parasites des moisissures et	<i>Endothia et Neurospora</i> (Bourgeois, 1998).

	des végétaux(Guiraud, 1998).	
Basidiomycètes (Champignons à chapeau)	-Mycélium septé avec une reproduction sexuée aboutissant à la formation des spores exogènes (Basidiospore). Regroupe certaines moisissures parasites(Botton et al ; 1999).	<i>Agaricus et Coprinus</i>
Deutéromycètes (Champignons imparfaits)	-Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996) -Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires	<i>Trichoderma, Cephalosporium, Fusarium, Geotrichum, Penicillium et Aspergillus.</i> (Frazier, 1967 ; Punt et al., 2002)

4- Conditions de croissance des moisissures

4.1- Conditions physicochimiques

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination.

• Température

La température influence fortement la croissance, la sporulation et la germination des champignons. La majorité sont mésophiles, mais certains, comme *Aspergillus fischeri*, supportent des températures extrêmes allant jusqu'à 80 °C (Boudih, 2011 ; Monroy, 2020). Les moisissures s'adaptent à une large gamme thermique : elles commencent généralement à croître entre 0 et 10 °C, selon leur environnement. *Cladosporium herbarum* peut se développer à des températures inférieures à 0°C et *A. flavus* ou *A. fumigatus* jusqu'à 60°C (Nguyen, 2007). Par ailleurs, des températures trop basses inhibent leur développement sans affecter leur viabilité. La croissance optimale du mycélium se situe entre 22 et 35 °C, certaines espèces tolérant jusqu'à 52 °C (Boissier, 2003 ; Monroy, 2020).

• Le pH

Contrairement à la température, le pH intracellulaire n'est pas uniquement dicté par l'environnement externe. Les cellules fongiques disposent de mécanismes leur permettant de contrôler l'entrée et la sortie des ions, notamment des ions hydrogène, afin de maintenir leur équilibre interne.

Les moisissures ont également la capacité d'influencer le pH du milieu dans lequel elles se développent, en modifiant la concentration en ions du substrat par leur activité métabolique. La croissance fongique est généralement favorisée dans des milieux dont le pH varie entre 4 et 7, soit une plage allant de l'acide au neutre. Toutefois, certaines espèces peuvent se développer dans des conditions beaucoup plus extrêmes : la plupart tolèrent un pH compris entre 2.2 et 9.6, tant que *Penicillium variable* est capable de croître dans des environnements dont le pH varie de 1,6 à 11,1 (Boissier, 2003).

• Activité de l'eau (Aw)

La majorité des moisissures se développent dans une plage d'activité de l'eau (Aw) comprise entre 0,85 et 0,99. Les champignons qui se développent préférentiellement dans des milieux très humides sont appelés hygrophiles ; c'est le cas, par exemple, des genres *Cladosporium*, *Fusarium* et des *Mucorales*. À l'inverse, certaines espèces fongiques qualifiées de xérophiles sont capables de croître dans des conditions de faible humidité, à des valeurs d'Aw inférieures à 0,85. Parmi elles, *Aspergillus penicillioides* et *Eurotium herbariorum* se distinguent par leur capacité de se développer à des niveaux d'humidité très bas, avec une croissance possible dès une Aw de 0,747 (Boudih, 2011 ; Meheust, 2012).

- **Oxygène (O)**

La disponibilité en oxygène constitue un facteur déterminant pour le développement des moisissures. La plupart d'entre elles sont strictement aérobies. Les espèces les plus exigeantes en oxygène se développent principalement à la surface des substrats, où l'oxygène est abondant. En revanche, certaines espèces moins dépendantes, telles que *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*, sont capables de croître en profondeur, là où l'oxygène est moins accessible. Cependant, certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (**Bourgeois, 1989 ; Botton et al., 1999**).

- **La Lumière**

Les radiations du spectre visible (380 – 720 nm) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière ni pour leur croissance ni pour la germination de leurs spores (**Botton et al., 1999**).

- **Les nutriments**

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes (**Davet, 1996**).

- **Carbone (C)**

Les moisissures tirent leur carbone et leur énergie principalement de différentes sources glucidiques. Parmi les sucres les plus couramment utilisés figurent le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, ainsi que des polysaccharides comme l'amidon et la cellulose. Ces hydrates de carbone sont dégradés par la voie de la glycolyse, suivie du métabolisme aérobie (**Nicklin et al., 2000**).

- **Azote (N)**

Les moisissures assimilent l'azote par hétérotrophie. Incapables de fixer l'azote gazeux, elles utilisent à la place des formes assimilables telles que les nitrates, l'ammonium, l'urée ou certains

acides aminés, qu'elles absorbent directement à travers leur membrane. En revanche, les sources azotées complexes comme les peptides et les protéines ne peuvent être utilisées qu'après avoir été dégradées en acides aminés par l'action de protéases sécrétées par les hyphes (**Nicklin et al., 2000**).

• **Vitamines**

Les moisissures nécessitent l'apport de certaines vitamines préformées pour leur croissance, telles que la thiamine et la biotine. Elles ont également besoin d'autres composés essentiels comme les stérols, la riboflavine, ainsi que les acides nicotinique et folique (**Nicklin et al., 2000**).

• **Sources minérales**

La présence des ions minéraux dans le milieu de culture est important pour la croissance et la reproduction chez plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de potassium, de magnésium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (**Uchicoba et al., 2001**). Des éléments sous forme de traces tels que le fer, le manganèse, le zinc, le cuivre et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des acides organiques, des pigments ... (**Boiron, 1996**).

Chapitre 2 : Les mycotoxines

1- Généralités sur les mycotoxines

Le terme mycotoxine provient du grec *mycos* signifiant « champignon » et du latin *toxicum* qui désigne un « poison » (**Jagoda et Wioletta, 2021**). Les mycotoxines sont des composés naturels de faible poids moléculaire, produits en tant que métabolites secondaires par des champignons filamenteux (**Bennet et Klich, 2003**). Elles figurent parmi les contaminants alimentaires les plus préoccupants en raison de leur impact significatif sur la santé publique et l'économie mondiale. Cette menace est renforcée par la grande diversité chimique et toxigénique de ces substances (**Bennet et Klich, 2003**).

Des milliers d'espèces de moisissures productrices de toxines ont été identifiées, dont les principales appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (**Jouany et al., 2006**). Les mycotoxines contaminent fréquemment divers produits agricoles bruts comme les céréales, les fruits secs, les graines oléagineuses, les raisins, les grains de café. Ces denrées sont particulièrement vulnérables à l'infestation par les champignons avant, pendant et après la récolte, où les pratiques de manipulation et de stockage des aliments sont inadéquates (**Bennet et Klich, 2003**).

2- Biosynthèse des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits durant la phase stationnaire, suite aux phases de croissance et de multiplication. Selon leur provenance biologique, elles sont classifiées en polyacétoacides, terpènes et métabolites azotés. Selon Steyn (1998), les aflatoxines sont générées à partir des polyacétoacides par un processus complexe, tandis que l'ergotamine est produite à partir de peptides et d'acides aminés. La biosynthèse de l'ochratoxine A est réalisée à partir de la phénylalanine et du dihydroisocoumarine. Les thricothécènes sont générées à partir du mévalonate.

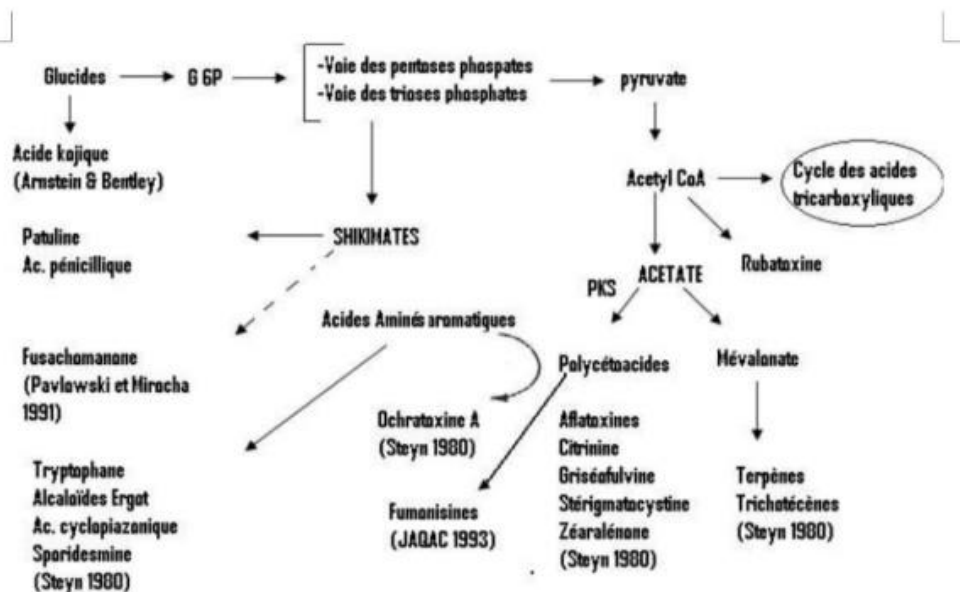


Figure 02 : La biosynthèse des mycotoxines (Tabuc C 2007)

3- Nature chimique des mycotoxines:

Les mycotoxines présentent une grande diversité sur le plan chimique et structural. Il s'agit de composés peu volatils, généralement de faible poids moléculaire (<1000 Daltons), peu solubles dans l'eau (Reboux, 2006). Elles sont généralement synthétisées par des réactions simples à partir de petites molécules de base telles que les pyruvates ou les acétates, ce qui explique la variété de leurs structures et de leurs effets toxiques (Turner *et al.*, 2009).

Ces toxines fongiques ne sont pas immunogènes et possèdent une grande stabilité face à la chaleur, ainsi qu'en milieu acide ou alcalin. Cette stabilité leur confère une résistance aux traitements thermiques classiques, ce qui complique leur élimination dans les denrées alimentaires (Gauthier, 2016).

D'un point de vue chimique, les mycotoxines se répartissent en plusieurs groupes :

➤ **Les dérivés d'acides aminés**, caractérisés par la présence de groupes fonctionnels -COOH et -NH₂, tels que l'acide Aspergillique, les alcaloïdes de l'Ergot du seigle, la Roquefortine, l'acide Cyclopiazanique, la Tryptoquivaline et la Gliotoxine.

➤ **Les polycétoacides**, impliqués dans les voies métaboliques énergétiques, parmi lesquels on trouve l'Ochratoxine, les Aflatoxines, la Patuline, l'Acide Pénicillique, la Citrinine, la Stérigmatocystine et la Zéaralénone.

➤ *Les dérivés terpéniques* d'origine végétale, comme les toxines T-2, le DON (Déoxynivalénol), la Fusarénone et les Roridines (Nguyen Minh Tri, 2007 ; Gauthier, 2016).

4- Mycotoxinogénèse:

La synthèse et la sécrétion des toxines fongiques, appelées mycotoxinogénèse, ont lieu dans des conditions environnementales bien particulières. Ce processus est étroitement lié au développement des champignons, bien que les conditions nécessaires à la production de mycotoxines soient généralement plus restreintes que celles requises pour la croissance fongique elle-même (Royer et TAP, 2003 ; Gauthier, 2016).

Il est essentiel de comprendre que la présence visible d'une moisissure sur une surface ne garantit pas nécessairement la présence de mycotoxines. Inversement, l'absence apparente de champignons ne signifie pas que l'aliment est exempt de ces toxines (Gauthier, 2016).

La production de toxines fongiques est un phénomène complexe et multifactoriel. Une même espèce de champignon peut produire différentes toxines selon les conditions de l'environnement (Gauthier, 2016). Par exemple, *Aspergillus flavus* peut synthétiser plusieurs toxines telles que les Aflatoxines, l'acide Cyclopiazonique (CPA) et l'acide Kojique. À l'inverse, des espèces différentes comme *Penicillium verrucosum* et *Aspergillus ochraceus* peuvent produire une toxine identique : l'Ochratoxine A (Gauthier, 2016).

5- Les Facteurs influençant la mycotoxinogénèse

5.1- Facteurs intrinsèques

En ce qui concerne le type de souche, certaines moisissures produisent des toxines alors que d'autres n'en produisent pas. Par ailleurs, au sein d'une même espèce produisant des toxines, certaines souches en génèrent une grande quantité tandis que d'autres en produisent, mais à des niveaux nettement inférieurs. Le stade de développement de la souche productrice peut influencer la capacité d'une moisissure à produire des toxines.

5.2- Facteurs extrinsèques

De nombreux facteurs environnementaux régissent le développement de la toxinogénèse des moisissures, notamment le niveau d'humidité, l'humidité relative, le pH, la température ambiante,

la composition du substrat en nutriments et sa teneur en graisses ou en azote, ainsi que la concurrence entre divers micro-organismes.

➤ **pH**

Les moisissures peuvent se développer dans une plage de pH comprise entre 3 et 8, avec un optimum situé entre 5 et 6. Plus précisément, *Fusarium proliferatum* se développe à un pH de 5,6 et produit de la Fumonisine B1 à un pH de 3,7 (**Gauthier, 2016**).

➤ **Température**

La plupart des moisissures se développent dans une plage de température allant de 0°C à 35°C. Toutefois, certaines espèces peuvent croître à des températures extrêmes, comme *Aspergillus fumigatus* à 60°C ou *Cladosporium herbarum* à des températures inférieures à 0°C (**Nguyen Minh Tri, 2007**).

La température optimale de production des mycotoxines est généralement proche, mais légèrement inférieure à celle de la croissance. C'est le cas, par exemple, des Aflatoxines produites par *Aspergillus flavus* (**Lahouar, 2016**).

➤ **Activité de l'eau (Aw)**

L'activité de l'eau (Aw) indique la quantité d'eau libre disponible dans une substance solide ou liquide, avec des valeurs comprises entre 0 et 1 (Gauthier, 2016). L'Aw optimal pour la croissance des moisissures se situe entre 0,85 et 0,99. Cependant, la majorité des champignons contaminant les céréales peuvent se développer même à une Aw de 0,7 (**Nguyen Minh Tri, 2007**).

➤ **Composition gazeuse**

Lorsque la concentration en oxygène diminue et que celle en dioxyde de carbone augmente, la production de mycotoxines (toxinogénèse) est réduite, comme c'est le cas pour l'Aflatoxine produite dans l'arachide (**Nguyen Minh Tri, 2007**).

➤ **Substrat**

Les moisissures se développent de préférence sur des substrats riches en sucres (source de carbone), ainsi que sur certaines substances comme les acides aminés et le saccharose, qui favorisent leur croissance et la production de mycotoxines. La composition du substrat peut

influencer cette production. Par exemple, l'acide phytique réduit la synthèse d'Aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* (Lahouar, 2016).

6- Les principales mycotoxines

6.1- Les Aflatoxines

Les principales aflatoxines sont les types B1, B2, G1 et G2 (Figure 3), produites par certains isolats spécifiques du champignon *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. L'aflatoxine M1, quant à elle, est un métabolite hydroxylé que l'on retrouve principalement dans les tissus et les fluides corporels des animaux, notamment le lait et l'urine (Richard, 2007). Elles ont été mises en évidence dans les denrées alimentaires telles que les noix (arachides, pistaches, noisettes...), les grains (maïs, millet, sorgho...), le coton, les épices ainsi que le lait (Brochard et le Bacle, 2009).

Les Aflatoxines sont avant tout hépatotoxiques, causant des dommages au foie chez les animaux. De plus, elles présentent des effets immunosuppresseurs, cancérigènes, tératogènes et mutagènes (Richard, 2007).

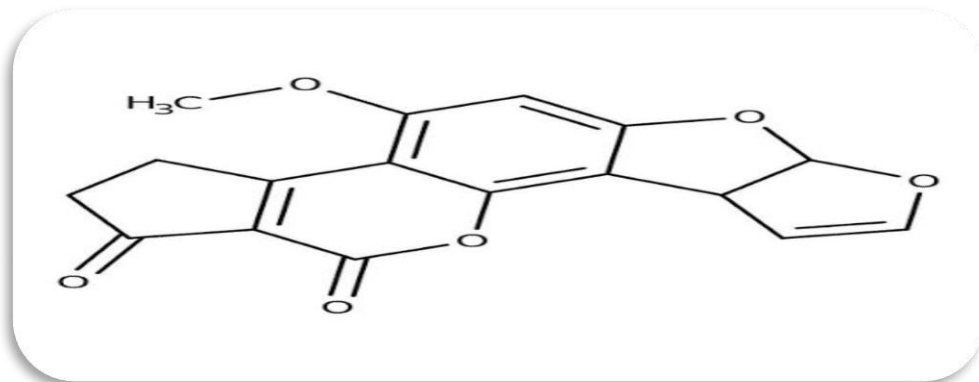


Figure 03 : Structure chimique d'Aflatoxine B1 (Gauthier, 2016)

6.2- L'Ochratoxine A

L'Ochratoxine A (OTA) est l'une des principales mycotoxines. Il s'agit d'un composé naturellement fluorescent, principalement produit par les champignons *Aspergillus ochraceus* et

Penicillium verrucosum (Figure 4). Une caractéristique notable de l'OTA est sa présence dans une grande variété d'aliments, notamment les raisins secs, l'orge, café et les produits à base de soja (Richard, 2007).

L'OTA est généralement produite lors du stockage, lorsque les conditions environnementales favorisent la croissance des moisissures et la synthèse de la toxine (Richard, 2007).

L'Ochratoxine A est principalement néphrotoxique, c'est-à-dire qu'elle cible les reins. Toutefois, à des concentrations élevées, elle peut également causer des lésions hépatiques. La néphropathie endémique des Balkans, souvent associée à l'apparition de tumeurs chez l'humain, est considérée par certains chercheurs comme étant liée à l'exposition chronique à l'OTA (Richard, 2007).

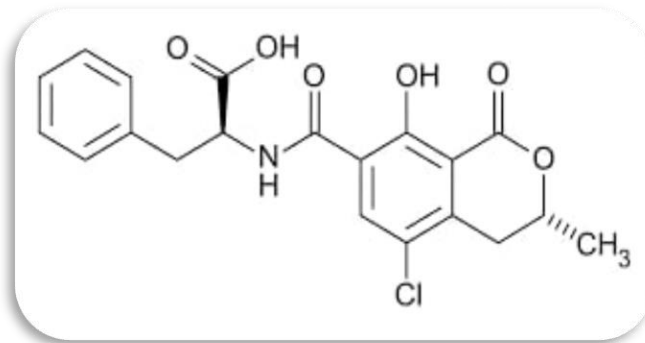


Figure 04 : Structure chimique d'Ochratoxine A (Lahouar ,2016)

6.3- Les Fumonisines

Les Fumonisines sont un groupe de mycotoxines produites principalement par plusieurs espèces du genre *Fusarium*, notamment *Fusarium verticillioides* et *Fusarium proliferatum* (Chen et al., 1992) (Figure 5). Il s'agit de toxines non fluorescentes, parmi lesquelles les types FB1, FB2 et FB3 sont les plus courants.

Le maïs constitue la principale culture contaminée par les Fumonisines, bien que des traces aient également été détectées dans le sorgho et le riz. Par ailleurs, des études expérimentales menées sur des rongeurs ont mis en évidence des atteintes hépatiques, notamment le développement de tumeurs au niveau du foie et des reins.

Chez l'être humain, les Fumonisines, en particulier le type FB1, sont soupçonnées d'être impliquées dans l'apparition de cancers de l'œsophage dans certaines populations (Richard, 2007).

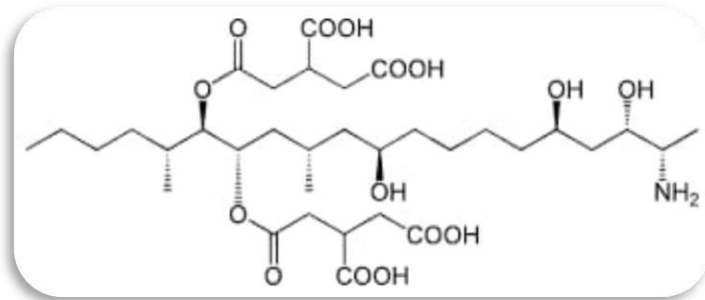


Figure 05 : Structure chimique de Fumonisines (Gauthier,2016)

6.4- La Patuline

La Patuline (PAT) est un métabolite toxique produit par près d'une trentaine de genres fongiques, principalement appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* et *Byssochlamys* (voir Figure 6).

Elle a d'abord été étudiée en médecine humaine sous le nom commercial Tercinin, en tant qu'antibiotique potentiel. Cependant, son développement a été abandonné en raison de sa toxicité avérée pour l'homme et les animaux.

En raison de ses effets nocifs présumés, la Patuline est désormais classée parmi les mycotoxines, et sa concentration dans les denrées alimentaires est strictement réglementée dans de nombreux pays. Elle est présente dans les produits à base de fruits, en particulier dans les pommes et les produits à base de pomme (Vidal *et al.*,2019) ,ainsi que dans les pêches, raisins, olives et les céréales (Patricia *et al.*,2006).Elle est connue pour provoquer des lésions gastro-intestinales telles que des ulcères, des inflammations et des hémorragies (Navale *et al.*, 2021).

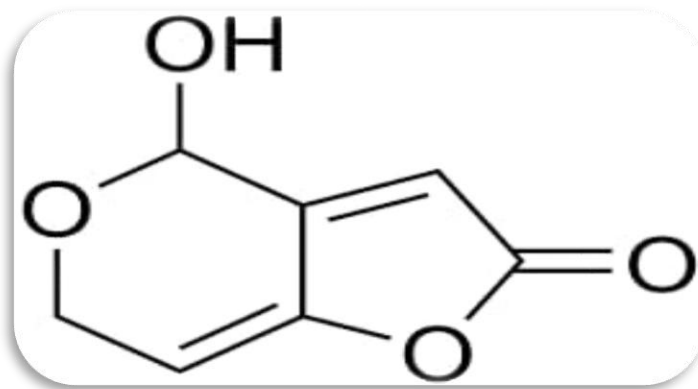


Figure 06 : Structure chimique de Patuline (Gauthier,2016)

7- Les Champignons toxinogènes

Les moisissures toxinogènes se répartissent en deux grandes catégories selon la source de contamination. On distingue ainsi les moisissures de champ, qui infectent les plantes durant leur croissance, et les moisissures de stockage, qui se développent après la récolte, lors de la conservation des produits végétaux, peuvent se répandre sur les cultures ou les céréales, puis se multiplier durant le stockage si les conditions sont propices (Afssa, 2006).

Le genre *Fusarium* est principalement associé aux contaminations survenues au champ, tandis que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont typiques des contaminations survenant durant le stockage. Dans les deux cas, la contamination est liée à la présence de spores de champignons dans les débris de végétation ou dans le sol, sur les cultures ou les céréales qui peuvent se développer sur les résidus végétaux ou les grains restés au sol après la récolte (Jouany *et al.*, 2006).

•Le genre *Aspergillus*:

Le genre *Aspergillus* appartient au groupe des Deutéromycètes, (Hocking, 2006 ; Tabuc, 2007). Il comprend des espèces filamenteuses, ubiquistes et cosmopolites. Ces moisissures sont généralement saprophytes et se rencontrent principalement dans le sol, sur les céréales, les denrées alimentaires et dans le compost en décomposition (Samson et Varga, 2009).

Les *Aspergillus* jouent un rôle majeur dans plusieurs domaines de recherche. Certaines de ses espèces sont exploitées de manière bénéfique dans les procédés de l'agroalimentaire et dans diverses applications biotechnologiques (Samson et Varga, 2009).

En revanche, d'autres, sont connues pour leur impact négatif en tant qu'agents pathogènes, dans la détérioration des aliments, ou encore pour leur capacité à produire des métabolites toxiques. Certaines espèces du genre *Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes chez l'homme et l'animal, en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* responsable d'aspergilliose du conduit auditif) (Tabuc, 2007).

L'appareil végétatif (thalle) des *Aspergillus* est formé de filaments mycéliens hyalins, cloisonnés et ramifiés portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure 7). La tête peut être unisériée lorsque les phialides sont insérées directement sur la vésicule, mais bisériées si les cellules conidiogènes sont précédées de métules (Samson et al., 2014).

Les espèces appartenant au genre *Aspergillus* produisent un certain nombre de mycotoxines, à savoir ; Aflatoxines B1 et B2, Ochratoxines, Acide aspergillique Acide cyclopiazonique, Acide kojique, Malformine, Xanthocilline et Gliotoxine...etc.

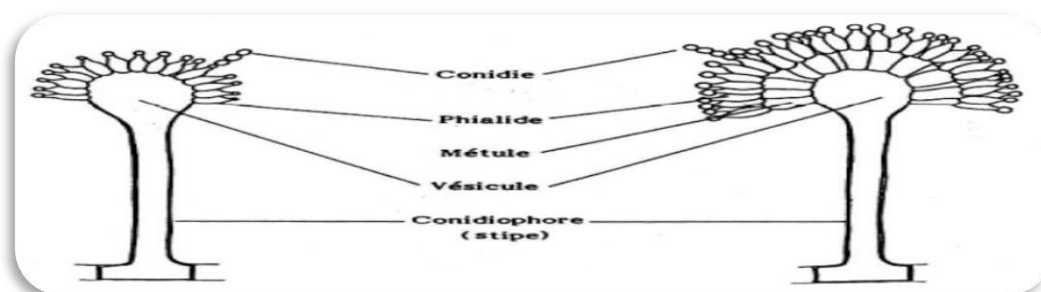


Figure 07 : Caractères morphologiques des *Aspergillus* (Chabasse et al, 2002).

•Le genre *Penicillium*

Les espèces du genre *Penicillium* appartiennent au groupe des Deutéromycètes. Les formes téléomorphes existantes appartiennent à l'embranchement des Ascomycètes dont les genres les plus représentatifs sont *Eupenicillium* et *Talaromyces* (Pitt, 1987). est un champignon très répandu dans divers environnements (sol, air, aliments, etc.) et joue un rôle important dans la dégradation de la

matière organique. Certaines espèces sont nuisibles, provoquant des pourritures post-récolte et produisant des mycotoxines, tandis que d'autres sont bénéfiques, notamment en agroalimentaire (fromages, saucisses) et dans la production d'enzymes (Visagie *et al.*, 2014). Bien que souvent présents comme contaminants en laboratoire, les *Penicillium* sont rarement pathogènes chez l'humain et les infections sont principalement respiratoires. Certaines espèces peuvent causer des affections comme la kératomycose, l'otomycose ou l'onychomycose et seule l'espèce *Penicillium marneffei* peut causer des infections graves chez les personnes immunodéprimées (Tabuc, 2007). Concernant la micromorphologie, les individus du genre *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau (Botton *et al.*, 1990). Ils possèdent des hyphes cloisonnées portant les conidiophores, ces derniers sont ramifiés ou simple se terminent par un pénicille (Chabasse *et al.*, 2002) 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...) (Figure 8) (Houissa 2020).

Les espèces du genre *Penicillium* produisent un certain nombre de mycotoxines comme la Patuline, l'Ochratoxine, Roqufortine C, Citrinine, l'acide cyclopiazonique et l'acide Penicillique (Gauthier, 2016).

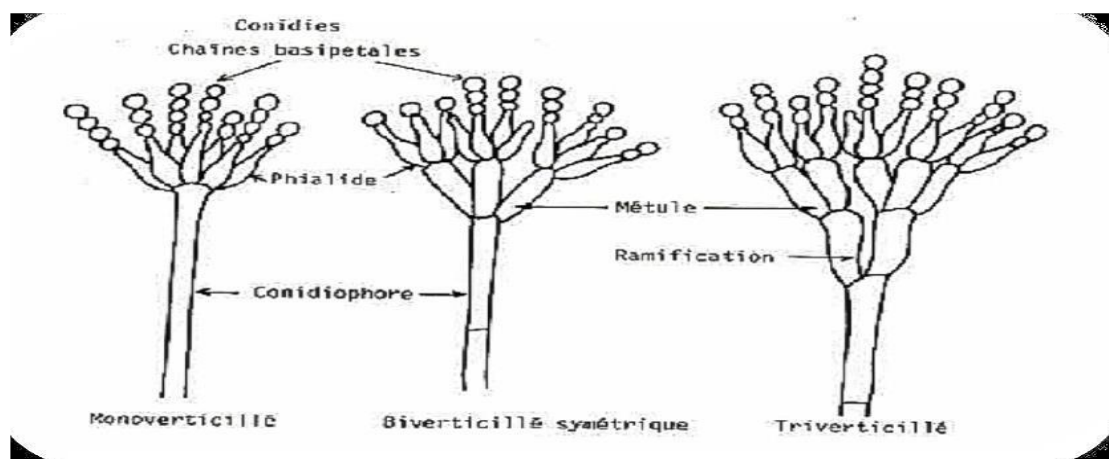


Figure 08 : Caractères morphologiques du genre *Penicillium*(Tabuc, 2007).

• Le genre *Fusarium*

Le genre *Fusarium* regroupe environ 40 espèces de champignons imparfaits, bien que certaines aient une forme parfaite rattachée aux *Ascomycètes* (famille des Nectriaceae) incluant les genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*. Ce genre comprend environ 40 espèces largement

répandues (Nelson *et al.*, 1983). Très répandu, ce genre comprend de nombreuses espèces phytopathogènes responsables de fusarioses, des maladies touchant céréales, légumes et arbres fruitiers, causant ainsi d'importantes pertes agricoles et économiques. La fusariose de l'épi (*Fusarium Head Blight*), notamment causée par *F. graminearum* et *F. culmorum*, affecte gravement le rendement et la qualité des récoltes. Certaines espèces, comme *F. solani*, peuvent également provoquer des infections humaines, telles que des kératites, tandis que d'autres, comme *F. Solani* et *F.moniliforme*, sont impliquées dans des infections systémiques (Tabuc, 2007 ; Heit, 2015). Les espèces appartenant au genre *Fusarium* produisent un certain nombre de mycotoxines comme : Zéaralénone, Trichothécènes B, Acide fusarique, Moniliformine, Oxysporine, Fusarine C, Naftoquinone, Gibberelines et Culmorine (Gauthier, 2016).(figure 9)

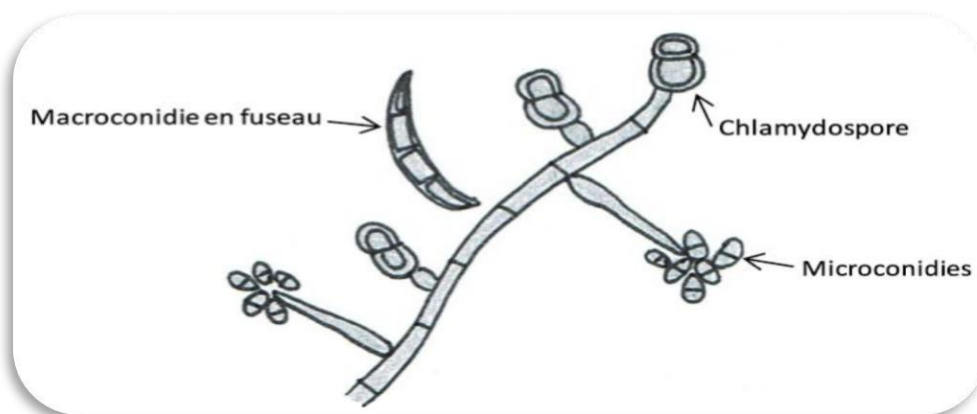


Figure 09 : Caractères morphologiques du genre *Fusarium*(Lahouar,2016)

•Le genre *Alternaria*:

Les *Alternaria* sont des champignons cosmopolites largement répandus dans le sol, l'air et les aliments. La plupart sont phytopathogènes, affectant les cultures aussi bien au champ qu'après la récolte. Certaines espèces, cependant, sont saprophytes et peuvent, agir comme pathogènes opportunistes, responsables de diverses maladies chez les plantes et certains insectes. *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* et *Alternaria infectoria* sont les espèces les plus couramment rencontrées (Houissa, 2020).Les *Alternaria* sont classées parmi les *Deutéromycètes*. Des études ultérieures ont abouti au classement du genre *Alternaria* parmi les *ascomyètes*.

Morphologiquement, les espèces du genre *Alternaria* se caractérisent par des conidies septées, présentant des cloisons transversales et longitudinales, des cellules multi nucléés de couleur sombre, et une forme généralement piriforme ou ovoïde.

Les *Alternaria* représentent des contaminants toxiques majeurs des denrées alimentaires, provoquant des dommages aussi bien sur le champ qu'en post-récolte. Ils peuvent également contaminer divers fruits et légumes, entraînant leur dégradation, y compris lors de leur conservation au réfrigérateur (Amalaradjou et Venkitanarayanan, 2008). Les principales mycotoxines produites par le genre *Alternaria* sont : les Alternariols, les Altenuenes, les Alvertoxines et l'Acide tenuazonique (figure 10).

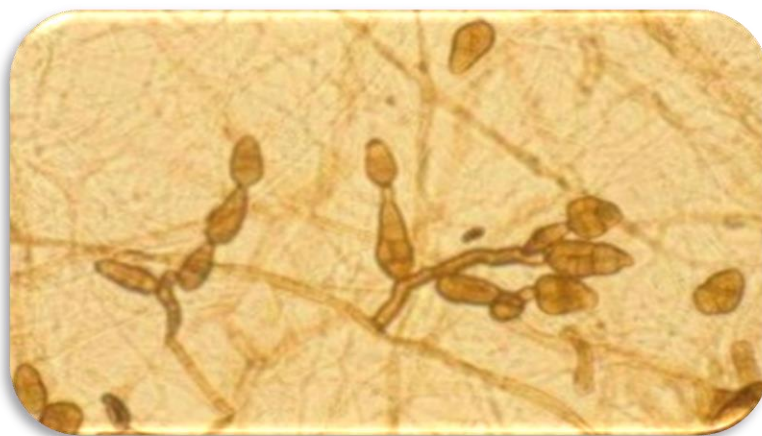


Figure 10 : Observation microscopique de genre *Alternaria* (Laifa, Adouani *et al.*, 2020)

8- Les moisissures et les mycotoxines dans la chaîne alimentaire

Certaines moisissures peuvent être utilisés dans l'alimentation exactement dans la fabrication des fromages (*Penicillium roqueforti* et *Penicillium camembreti*)

Dans la fabrication d'antibiotiques comme la pénicilline produite par *Penicillium chrysogenum*, la fabrication d'enzyme (protéase et pectinase par *Aspergillus niger*) (Atoui, 2006)

Mais lorsqu'ils existent d'une façon indésirable dans les aliments peuvent entraîner des changements des odeurs, d'apparence et d'une réduction de leur valeur nutritionnelle et leur rendement (Atoui, 2006)

L'évolution de ces métabolites dans l'alimentation peut engendrer des problèmes de santé pour le consommateur, en particulier un risque d'intoxication lié aux mycotoxines.

Les mycotoxines apparaissent dans la chaîne alimentaire suite à la contamination des récoltes par les moisissures, avant comme après la récolte. L'exposition aux mycotoxines peut être directe en ingérant des aliments contaminés ou indirecte par les animaux nourris avec des aliments infestés, notamment du lait.

Chapitre 03 : Les fruits secs à coque

1- Généralités

Les fruits à coque, aussi appelés noix, font partie de l'alimentation humaine depuis très longtemps. Ils forment un groupe alimentaire à part. D'un point de vue scientifique, une noix est un fruit sec avec une seule graine (ou parfois deux), entourée d'une coque dure à maturité (voir Figure 11). Mais dans la vie de tous les jours, le mot « noix » désigne souvent tout fruit sec avec une coque dure et une graine comestible à l'intérieur. Cela inclut les amandes, les noix du Brésil, les noix de cajou, les noisettes, les arachides, les pistaches et les noix classiques. (Rojas *et al.*, 2005 ; Juchet *et al.*, 2013).



Figure 11 : Fruits à coque (Noix)

2- Caractéristiques des fruits secs

2.1- L'arachide

L'arachide ou cacahuète (*Arachis hypogaea L*) est une plante annuelle de la famille des légumineuses, cultivée sur plus de 19 millions d'hectares dans les régions tropicales, subtropicales et les zones tempérées les plus chaudes du globe (Knoden *et al.*, 2003).

Bien qu'elle appartienne taxonomiquement aux légumineuses, l'arachide présente un profil nutritionnel en macronutriments plus proche de celui des fruits à coque.

Les graines d'arachide possèdent une composition chimique riche qui en fait un aliment à haute valeur nutritive. Elles contiennent entre 40 et 50 % de matières grasses, principalement des acides gras mono-insaturés, mais aussi des acides gras saturés, comme l'acide arachidique. Elles sont également une bonne source de protéines, représentant environ 25 % de leur teneur, et présentent des niveaux importants de phosphore. Cette riche composition fait de l'arachide un ingrédient particulièrement intéressant sur le plan nutritionnel.



Figure 12 : L'arachide avec et sans coque

2.2- Les amandes

Les amandes comptent parmi les fruits à coque les plus riches en nutriments. Elles sont une excellente source d'acides gras essentiels, de vitamines, de minéraux et, sous leur forme crue, figurent parmi les principales sources végétales de protéines (**Gmitter et al., 2009**). Originaires d'Asie occidentale, plus précisément des régions de l'Iran et de l'Afghanistan (**Yada, Lapsley et al., 2011**). Les amandes occupent une place importante dans la production mondiale de fruits à coque, dépassant les trois millions de tonnes par an (**Roncero et al., 2020**).

L'amande est très riche en protéines, glucide, et vitamines. Elle contient 50% de lipide avec en majorité des acides gras soit en moyenne 75% d'acides oléique, 18% d'acides linoléique et 7% d'acide palmique.

Son huile riche en vitamine E, elle joue un rôle important dans le domaine de cosmétologie et est également utilisée en confiserie, en raison de ses propriétés bénéfiques.



Figure 13 : L'amande avec et sans coque

2.3- Les noix

Les noix, issues du noyer appartenant au genre « *Juglans L* » et à la famille des Juglandacées (Bernard, 2020) constituent une source majeure d'huile comestible naturelle. Provenant généralement de plantes, elles sont enveloppées dans une coque externe robuste qui joue un rôle protecteur. Cette coquille préserve un noyau riche en nutriments essentiels tels que les protéines, les minéraux, les vitamines et les acides gras essentiels (Sheorey *et al.*, 2011).



Figure 14 : La noix avec et sans coque

La noix se singularise par une teneur exceptionnellement élevée en matière grasse, pouvant atteindre jusqu'à 57 % dans les noix sèches. Il s'agit d'un aliment très nutritif et particulièrement calorique. Son huile est riche en acides gras insaturés, notamment en acides alpha-linoléniques, qui sont des acides gras polyinsaturés essentiels. De plus, la noix présente des teneurs très élevées en vitamines E et B1, renforçant ainsi ses qualités nutritionnelles.

3- Stockage des fruits à coque

Après la récolte, les fruits séchés conservent naturellement des agents phytopathogènes issus du champ. Lorsque l'activité de l'eau (A_w) des fruits secs dépasse 0,65, ils deviennent vulnérables à des agents fongiques post-récolte, tels que les *Aspergillus* xérophiles, capables de se développer dans des environnements à faible humidité. Ces contaminations altèrent la qualité des fruits à coque et peuvent entraîner de graves risques pour la santé des consommateurs (**Tournas et al., 2015**).

Les fruits présentent des caractéristiques chimiques et physiques favorables à l'altération, notamment fongique. Leur forte activité en eau, leur richesse en sucres et la présence d'acides organiques abaissant le pH de leur pulpe les rendent particulièrement sensibles aux contaminations fongiques, plutôt qu'aux contaminations microbiennes (**Jackson, Altach, 2007**).

La présence des mycotoxines dans les fruits secs dépend de plusieurs facteurs comme : le type et la variété du fruit, la localisation géographique de la culture, les conditions climatiques, les pratiques culturales avant la récolte, les méthodes de récolte, ainsi que le traitement post-récolte et les conditions de stockage (**Jackson, Altach, 2007**).

Le fractionnement prématuré de la coquille facilite souvent ces infections, notamment en attirant des insectes hémiptères, qui se nourrissent des noix et agissent comme vecteurs de maladies (**Nawar, 2008**).

4- Altération des fruits secs par les mycotoxines :

Les champignons des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria* sont parmi les principaux agents responsables de la détérioration des fruits. Outre leur pouvoir de dégradation, ces micro-organismes

peuvent produire des mycotoxines présentant un risque important pour la santé humaine (**Jackson et Al-Taher, 2007**). La formation de ces toxines peut avoir lieu aussi bien avant qu'après la récolte, notamment durant le stockage, directement sur ou à l'intérieur des aliments, en particulier dans des conditions chaudes et humides (Figure15).

La plupart des mycotoxines sont très stables chimiquement, ce qui les rend résistantes aux traitements technologiques appliqués aux denrées alimentaires. Parmi les mycotoxines les plus fréquemment détectées dans les fruits et produits dérivés, on retrouve les Aflatoxines, l'Ochratoxine A, la Patuline, les Fumonisines, la Zéaralénone ainsi que le Nivalénol et le Déoxynivalénol (**OMS, 2018**).



(A) : Arachide

(A) : Arachide

Figure 15 : Fruits secs contaminés

***Matériel
et
Méthodes***

1- Étude mycologique

Le présent travail porte sur l'étude de la présence de moisissures mycotoxinogènes dans les fruits secs commercialisés dans la région de Skikda, et leurs capacités à produire des mycotoxines. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Technologie de l'Université 20 août 1955 Skikda.

1.1- Échantillonnage

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude est composé des Amandes, des Arachides Et de Noix.

Les échantillons ont été achetés chez un grossiste au centre de la wilaya de Skikda et transportés au laboratoire dans des flacons stériles. Ces échantillons ont été prélevés de façon



Aléatoire, en évitant les prélèvements systématiques. Le nombre total des échantillons est 12.


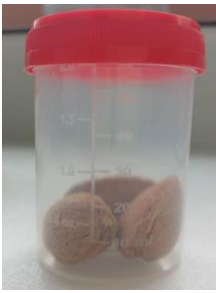
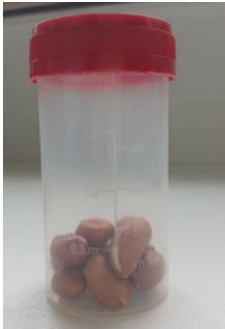

L'échantillon de chaque type de fruit se compose de :

- 2 échantillons d'arachide (décortiquée, avec enveloppe).
- 2 échantillons d'amande (décortiquée, avec enveloppe).
- 2 échantillons de noix (décortiqué, avec enveloppe).

Emmenés au laboratoire, les échantillons ont été gardés au frais (+4°C) et analysés dans les 24h qui suivent l'échantillonnage.

Tableau 02 : les échantillons des fruits secs étudiés

Les fruits à coques	Décortiqués (sans coques/ nus)	Non décortiqués (avec coques/enveloppés)
Noix		

Amandes		
Arachides		

1.2- Désinfection des fruits secs (les grains et les coques)

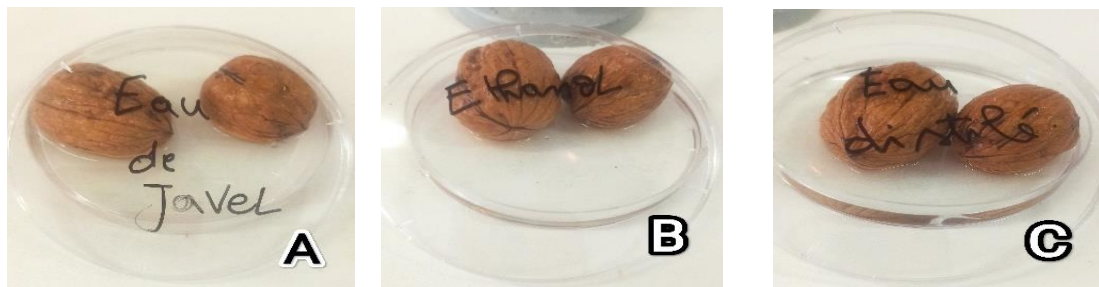


Figure16 : Désinfection des fruits secs. **A)** Eau de javel, **B)** Ethanol, **C)** Eau distillé.

1.3- Isolement de la flore fongique :

L'étude mycologique des fruits à coque en question, a été effectuée selon deux méthodes, la méthode d'ulster (ou méthode directe) et la méthode des dilutions (ou méthode indirect) (**Compaor et al.2016**).

1.3.1- Méthode directe d'Ulster :

Dans cette méthode, les échantillons ont été soumis à une désinfection. Chaque échantillon a été désinfecté superficiellement par trempage dans la solution d'hypochlorite de sodium à 10%, puis dans l'éthanol pendant une minute, suivie de deux rinçages à l'eau distillée stérile. Après séchage avec du papier filtre stérile, les échantillons désinfectés ont été placés aseptiquement à l'aide d'une pince stérile, dans des boîtes de Petri contenant les milieux PDA et Sabouraud (Annexe 1), (4 boîtes pour chaque échantillon) à raison de (le nombre d'échantillon par boîte). L'ensemble a été incubé à 28 C pendant 4 à 6 jours (Compaore *et al.*, 2016 ; Matmoura *et al.*, 2019 ; Moussaoui *et al.*, 2021).



Figure 17 : Ensemencement des fruits secs sur milieu PDA.

1.3.2- Méthode indirect de dilution

Après désinfection et broyage des fruits secs (les arachides, les amandes et les noix), un gramme de chaque broyat a été additionné à 9 mL d'eau distillée stérile. Après agitation de 2min pour obtenir la solution mère, une série de dilutions décimales a été effectuée jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-4} .

Pour chaque dilution indiquée, un volume de 0.1 mL a été déposé sur des boîtes de Pétri contenant les milieux PDA et SAB (Sabouraud) 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 (Atoui, 2006 ; Matmoura *et al.*, 2019 ; Bouricha, 2002).

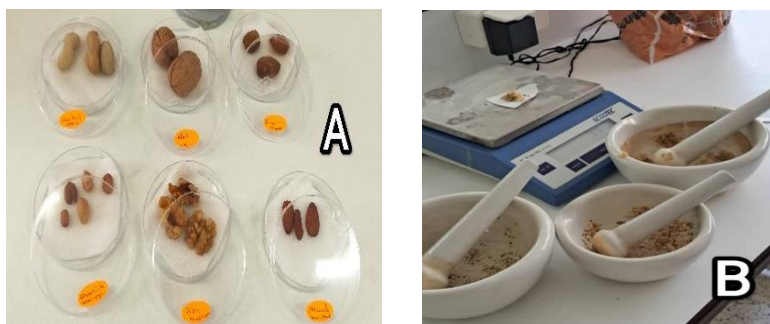




Figure 18 : Les étapes de l'isolement de la flore fongique à partir des fruits secs (Arachide, amande, noix). **A**) Echantillon, **B**) Echantillon moulu, **C**) Dilutions Décimales, **D**) Ensemencement.

1.4- Purification

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 ensemercer par piqure centrale sur milieu PDA et SAB, puis, incubés à 28 °C pendant une période de 6 jours. Des repiquages successives ont été réalisés jusqu'à l'obtention de souches pures (*Compaore et al., 2016 ; Abdoullahi et al., 2019 ; Moussaoui et al., 2021 ; Bouricha, 2022*).

1.5- Identification des isolats

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 ; Bandh et al., 2011*).

1.5.1- Identification macroscopique

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, forme générale des colonies, présence ou absence d'exsudats et production de pigment diffusible (*Chabasse et al., 2002 ; Compaoré et al., 2016*).

Les critères cités ci-dessus ont été observés après 7 jours d'incubation à 28° C sur les milieux de culture milieux PDA et SAB.

1.5.2- Identification microscopique

L'observation microscopique est une méthode complémentaire à l'identification morphologique (macroscopique), cet examen repose sur plusieurs techniques, les plus utilisées sont celles du ruban adhésif et la méthode de lactophénole bleu de coton.

1.5.2.1- La technique du scotch : consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune. Puis le coller sur une lame contenant une goutte de colorant

1.5.2.2- Lactophénol bleu de coton : La technique consiste 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, l'absence ou présence de cloisons, couleur des filaments mycéliens, morphologie des spores et la présence de structures particulières (chlamydospores) (**Chabasse et al., 2002 ; Compaore et al., 2016 ; Moussaoui et al., 2021**).

Les observations microscopiques ont été réalisées aux objectifs $\times 10$ et $\times 40$ en utilisant la microscopie optique.

2- Etude mycotoxologique

La production de métabolites secondaires (mycotoxines) par les souches isolées a été démontrée grâce à une extraction et une purification effectuées à partir d'une fermentation liquide, puis à une détection qualitative de ces mycotoxines par chromatographie sur couche mince (CCM).

2.1- Préparation de milieu de fermentation

Matériel et méthodes

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 (**Tuomi et al., 2001**).

2.2- Ensemencement du milieu de fermentation

Chaque Erlenmeyer a été inoculé par des disques de gélose des souches fongiques âgées de 7 jours (6 disques par erlen), ensuite, incubé à 28°C pendant 14 jours et à l'obscurité avec une agitation périodique (**Mohanta et al., 2007 ; Barik et al., 2010 ; Xiaoling et al., 2010**).

2.3- Extraction

Une fois la durée d'incubation terminée, la biomasse produite a été éliminée en filtrant le milieu YES à l'aide d'un papier filtre de type Whatman n°1 (**Barik et al., 2010; Mohanta et al., 2007**).

Les 50 ml du filtrat obtenu ont été additionnés à 50 ml d'acétate d'éthyle, le mélange a été rigoureusement agité pendant 1 à 2 min puis laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation (**Awad, 2005**).

La phase organique a été concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un Rotavapor dans des ballons à fond conique de 50 ml baignant dans un bain marie à 60°C. Une fois sèche, l'extrait a été remis en suspension dans 2mL de méthanol et placé dans un flacon en verre parafilmé pour des analyses ultérieures par CCM (**Awad, 2005**).

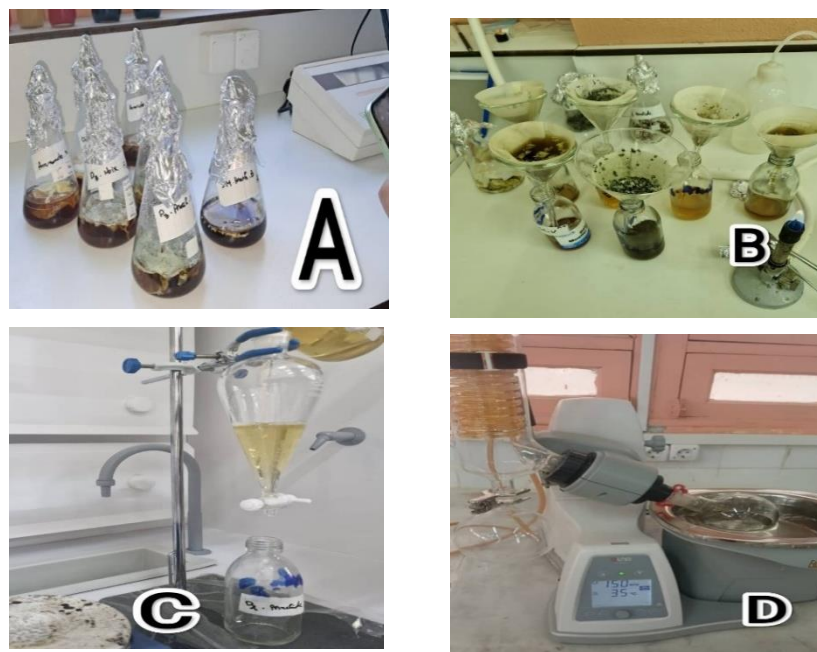


Figure 19 : Fermentation et extraction de mycotoxines. A) Culture fongique après

Fermentation, **B)** Filtration du milieu de fermentation, **C)** Décantation, **D)** Evaporation de
L'extrait.

2.4- Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode fréquemment utilisée pour séparer des composés entre deux phases solide et mobile, en fonction de leurs affinités pour l'une ou l'autre phase. Que ce soit à des fins d'analyse ou de purification. Elle permet une détection qualitative et semi-quantitative, notamment des mycotoxines. Cette technique présente plusieurs avantages : elle est rapide, économique et permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons. Cependant, ses résultats sont généralement moins fiables que ceux obtenus avec des techniques chromatographiques plus avancées, comme la chromatographie liquide ou gazeuse (**Gauthier, 2016 ; Huybrechts *et al.*, 2013**).

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. Un volume de 20µl de chaque extrait concentré a été déposé à l'aide d'une micropipette sur la plaque à 1 cm du bord inférieur sur la ligne de base. La plaque ensuite a été déposée verticalement dans une cuve qui contient 80 mL de l'éluant (phase mobile) constitué de toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique (40/32/8 v/v/v) respectivement (**Guechi et Girre, 2002**).



Figure 20 : Les extraits bruts



Figure 21 : La migration de solvant

Après migration et évaporation du produit d'élution, la plaque a été retirée de la cuve, séchée à l'air libre et la révélation des tâches est effectuée en exposant la plaque sous lumière UV à une longueur d'onde de 365 nm et 254nm.

La présence de mycotoxines a été révélée par l'apparition de fluorescences caractéristiques.

Résultats

1- Etude mycologique des fruits à coque

1.1- Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons des fruits à coque

L'isolement des moisissures à partir de six échantillons analysés (arachides décortiquées au laboratoire /enveloppées et noix décortiquées au laboratoire /enveloppées et amandes décortiquées au laboratoire /enveloppées) a abouti à la sélection de 12 isolats répartis comme suit : 04 isolats fongiques à partir de l'échantillon des Amandes (enveloppées et décortiquées au labo), qui représente 33% des isolats. 03 isolats fongiques à partir de l'échantillon des Noix (décortiquées, enveloppées et décortiquées au labo), qui représentent 25% des isolats et 05 isolats fongiques à partir de l'échantillon des Arachides (décortiquées, enveloppées et décortiquées au labo), qui représentent 42% des isolats. Le pourcentage des isolats obtenu selon chaque type de fruits à coque analysé, est représenté dans la figure mettre le numéro de la figure.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que les trois échantillons des fruits secs analysés sont contaminés par les moisissures.

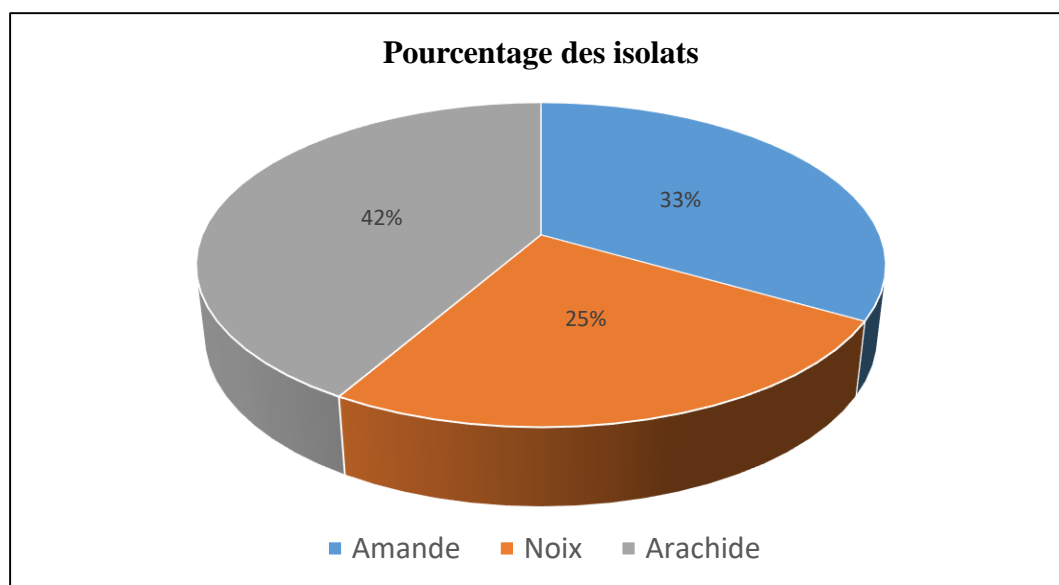


Figure 22 : Pourcentage des isolats fongique obtenus de chaque type de fruits à coque.


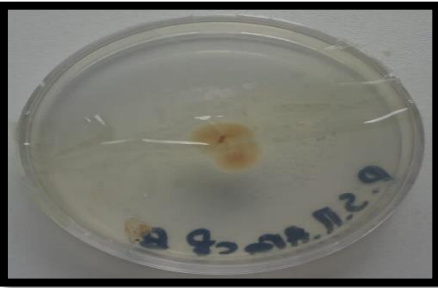


1.2- Identification des souches fongiques isolées

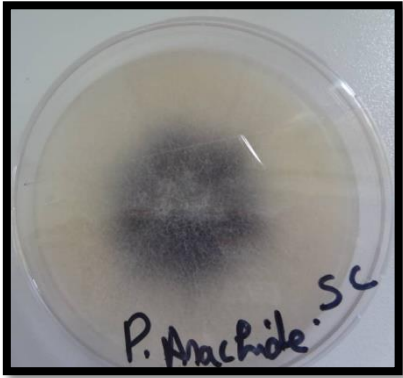
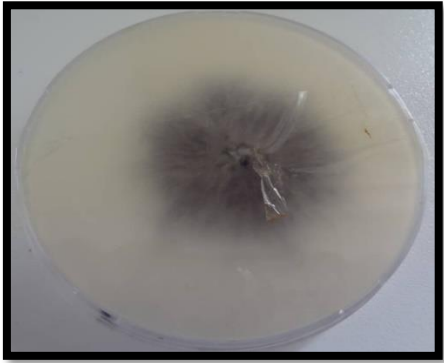

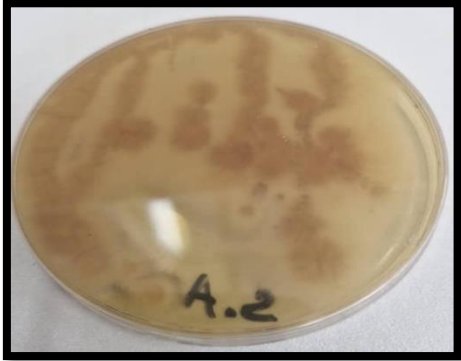
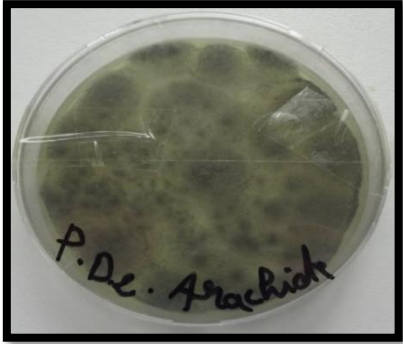



L'identification des genres fongiques isolés a été effectuée principalement à l'aide des clés de détermination proposées par **Chabasse et al. (2002)**, **Compaoré et al. (2016)** et **Moussaoui et al. (2021)**. Cette identification s'est appuyée sur l'observation des caractéristiques macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, bordure, etc.) ainsi que sur les caractéristiques microscopiques du mycélium et des spores ou conidies (cloisonnement du mycélium, morphologie des spores, types d'organes de fructification, etc.).






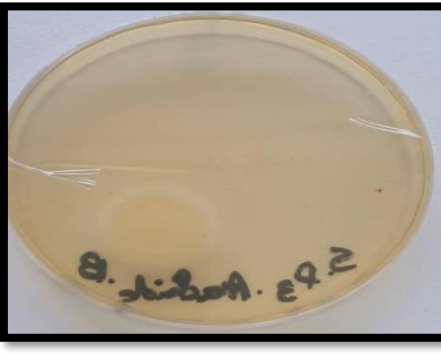


1.2.1- Identification macroscopique


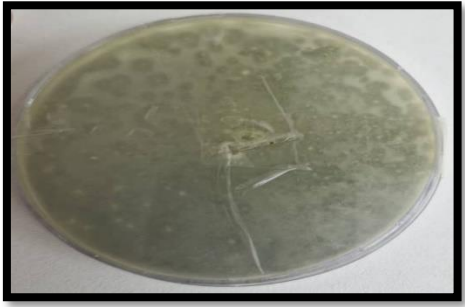


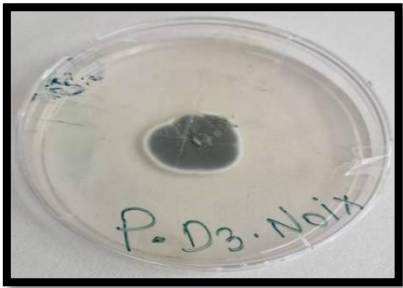
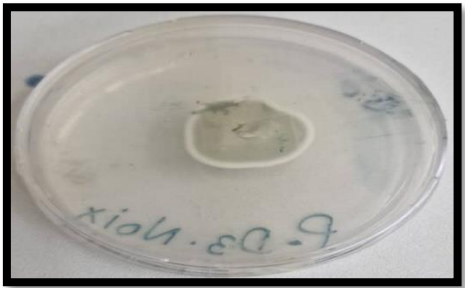



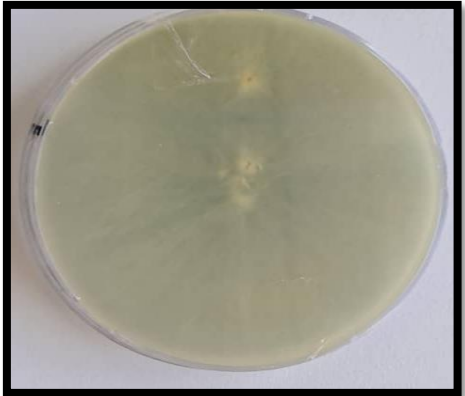
L'identification macroscopique a été réalisée par l'observation à l'œil nu des caractéristiques culturelles, telles que l'aspect des colonies, leur couleur (face et revers), ainsi que la vitesse de croissance. Les données obtenues sont présentées dans le tableau ci-dessous.



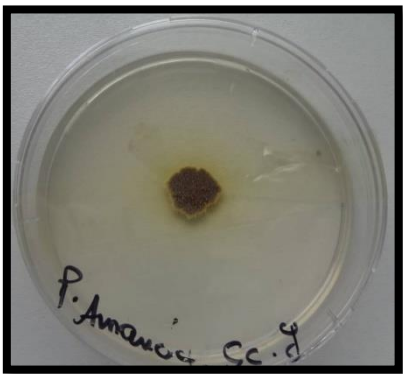
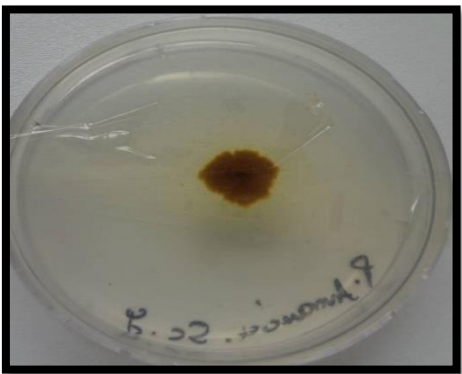




Tableau 03 : Observations macroscopiques des différents isolats obtenus à partir des fruits à coques analysés.

		Aspect macroscopique	
Isolat	Milieu	Surface	Revers
S 1	PDA		
	SAB		

S 2	PDA		
	SAB		
S 3	PDA		
	SAB		

S 4	PDA		
	SAB		
S 5	PDA		
	SAB		
S 6	PDA		
	SAB		

S 7	PDA		
	SAB		
S 8	PDA		
	SAB		
S 9	PDA		

	SAB		
S 10	PDA		
	SAB		
S 11	PDA		

	Milieu	La souche	La couleur	Revers	La taille	La croissance	La texture
Souche 1	PDA	SM Arachide B	Colonie blanche	Brun foncé plissé	Petite	Lente	Cotonneuse
	SAB	SM Arachide B	Colonie blanche	Marron clair	Petite	Lente	Cotonneuse
Souche 2	PDA	Arachide SC	Colonie vert foncé au centre et blanche aux extrémités	Foncé au centre et clair à l'extrémité	Grande	Rapide	Duveteuse à Cotonneuse
	SAB	Arachide SC	Colonie blanche	Beige foncé	Grande	Rapide	Cotonneuse
Souche 3	PDA	D2 Arachide	Colonie verte foncée	Clair	Moyenne	Rapide	Poudreuse
	SAB	D2 Arachide	Colonie au centre marron et extrémités en beige	Beige foncé	Moyenne	Rapide	Poudreuse
Souche 4	PDA	D3 Arachide V	Colonie vert	Beige à vert	Moyenne à petite	Rapide	Poudreuse
	SAB	D3 Arachide V	Colonie vert foncée (présence des stries)	Claire plissé	Moyenne	Rapide	Poudreuse
Souche 5	PDA	D3 Arachide B	Colonie blanche	Beige	Grande	Rapide	Cotonneuse
	SAB	D3 Arachide B	Colonie beige au centre et blanche aux extrémités	Beige clair au centre et blanc à l'extrémité	Petite	Lente	Cotonneuse
Souche 6	PDA	Noix SC	Colonie noire	Incolore	Grande	Rapide envahissante	Granuleuse
	SAB	Noix SC	Colonie noire	Incolore à jaune pâle	Grande	Rapide envahissante	Poudreuse

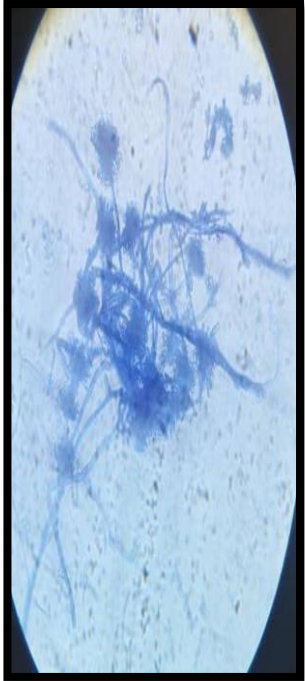

Souche 7	PDA	D2 Noix	Colonie vert foncé à grisâtre	Incolore	Grande	Rapide	Cotonneuse à l'extrémité Poudreuse au centre
	SAB	D2 Noix	Colonie Marron foncé au centre Blanche aux extrémités	Marron claire plissé	Grande	Rapide	Poudreuse
Souche 8	PDA	D3 Noix	Colonie vert foncé à fines extrémités blanches	Incolore à clair	Moyenne	Rapide	Duveteuse à poudreuse
	SAB	D3 Noix	Colonie vert grisâtre avec extrémités blanches	Clair plissé	Moyenne	Rapide	Duveteuse à poudreuse
Souche 9	PDA	D2 Amande	Colonie vert foncé à gris	Clair	Grande	Rapide	Poudreuse
	SAB	D2 Amande	Colonie vert foncé à extrémités blanches	Clair plissé	Grande	Rapide	Poudreuse
Souche 10	PDA	Amande SC J	Colonie marron foncé au centre et jaune à l'extrémité	Marron foncé au centre et jaune à l'extrémité	Petite	Lente	Duveteuse à consistance dure
	SAB	Amande SC J	Colonie marron foncé au centre et jaune à l'extrémité	Marron foncé	Petite	Lente	Duveteuse à consistance dure
Souche 11	PDA	Amande SC V	Colonie verte	Jaune Foncé	Grande	Rapide	Poudreuse



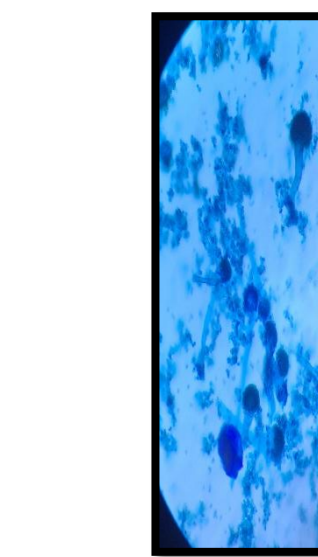
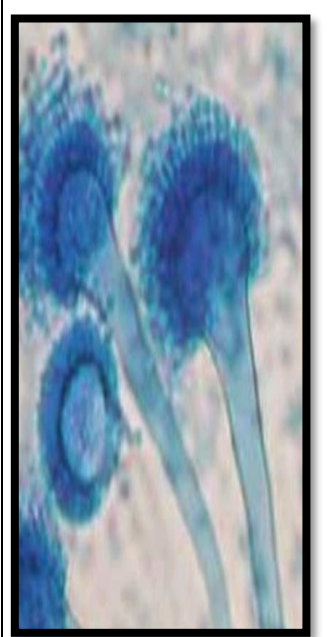
	SAB	Amande SC V	Colonie jaune à extrémités vert et blanche	foncé moins strié	Moyenne	Lente	Granuleuse
--	------------	----------------	--	----------------------	---------	-------	------------

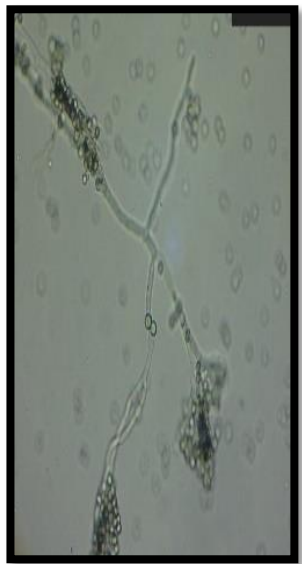
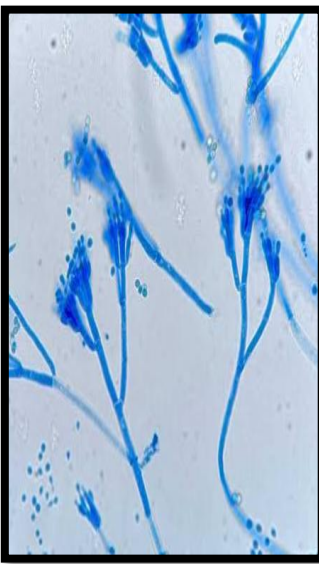


1.2.2- Identification microscopique

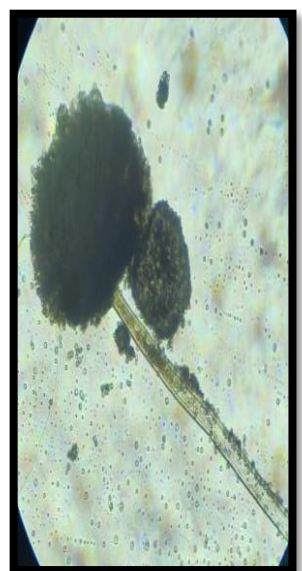
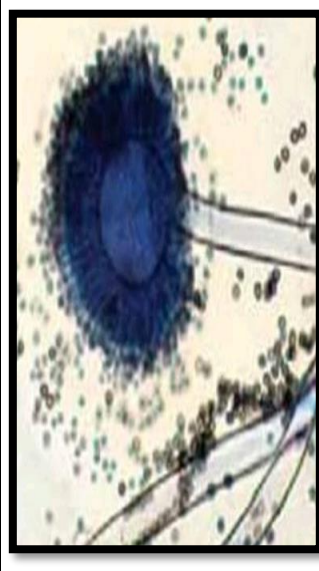
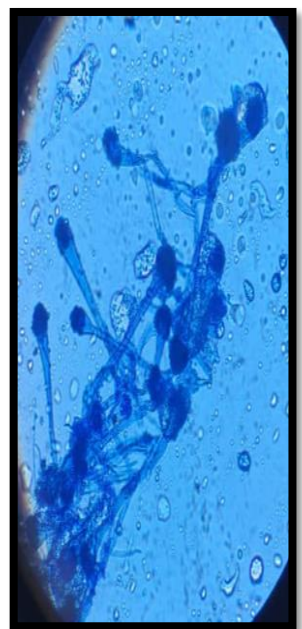

Une identification microscopique a été réalisée avec les grossissements X10 et X40. Cette identification était fondée essentiellement sur l'étude morphologique du mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois).

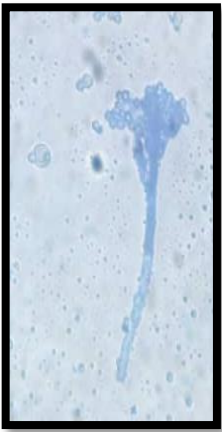
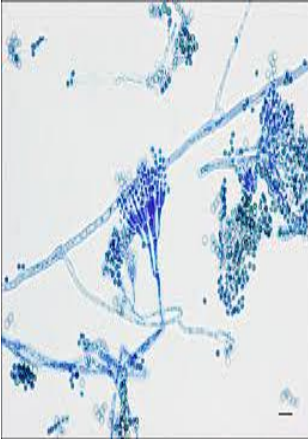
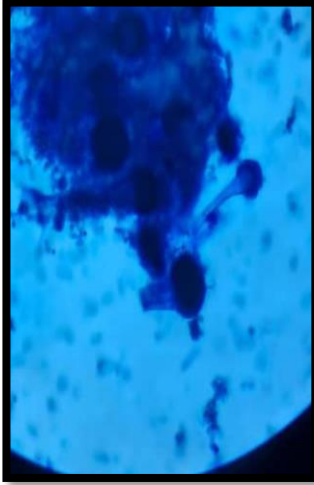
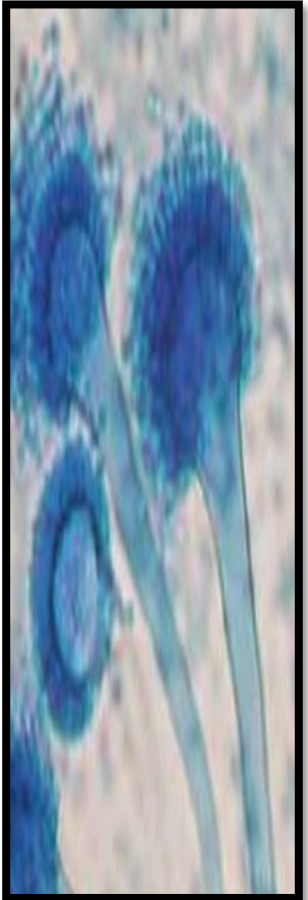
Tableau 4 : Observation microscopique des différents isolats obtenus


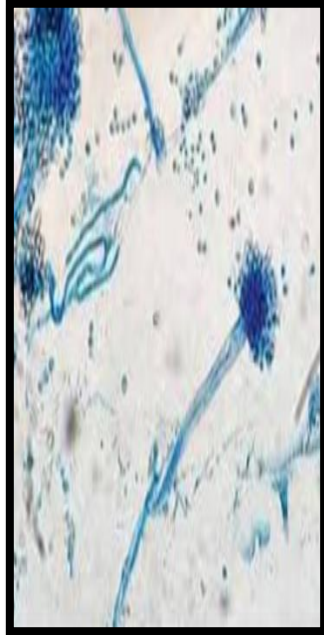
Photo microscopique	Aspect microscopique	Photo microscopique de référence	Identification de la souche
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ La tête : en colonne envasée, bisériées. ❖ Conidiophore : incolore lisse. ❖ Conidies : lisse, petites et globuleuse. ❖ Phialides : portés par des métules insérées sur la vésicule <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002).</p>		<i>Aspergillus terreus</i>



	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Conidiophore septé et très ramifié. ❖ Phialides plus au moins allongées ❖ Microconidies ovoïdes ou cylindrique (Tabuc, 2007). 		<p><i>Fusarium sp</i></p>
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Têtes conidiennes unisériées ou bisériées. ❖ Les conidiophores hyalins. ❖ Les vésicules sont subglobuleuses insérées par des phialides ces dernières portées par des métules. ❖ Les conidies sont globuleuses à subglobuleuses, de couleur verte pâle (Tabuc, 2007). 		<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Conidiophore hyalin, sépté et ramifié. ❖ Phialides disposé en verticilles et insérés sur des métules. ❖ Tête conidienne en forme de pinceau. ❖ Conidies lisses, globuleuses et verdâtres (Botton et al., 1990). 		<p><i>Penicillium</i> <i>sp1</i></p>
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Têtes conidiennes unisériées ou bisériées. ❖ Les conidiophores hyalins. ❖ Les vésicules sont subglobuleuses insérées par des phialides ces dernières portées par des métules. ❖ Les conidies sont globuleuses à subglobuleuses, de couleur verte pâle (Tabuc, 2007). 		<p><i>Aspergillus</i> <i>Fumigatus</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Mycélium siphonné. ❖ La tête porte de nombreux conidiophores long hyalin et lisses. ❖ Les phialides formées sur la vésicule (globuleuse) par l'intermédiaire de métules (Chabasse et al., 2002 ; Abdoullahi et al., 2019). 		<p><i>Aspergillus Niger</i></p>
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Les conidiophores hyalins, verruqueux ❖ Tête conidienne en colonne compacte, unisériées ou bisériées. ❖ .Une vésicule globuleuse ou sub-globuleuse, portant des phialides. ❖ Des petites conidies globuleuses de couleur verte pâle, (Tabuc, 2007). 		<p><i>Aspergillus Flavus</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Conidiophore fin, cloisoné et ramifié ❖ Phialides disposés en pinceaux (Triverticillé) ❖ Conidies vertes arrondies, à paroi lisse (Botton et al., 1990). 		<p><i>Penicillium sp</i> 2</p>
	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Têtes conidiennes unisériées ou bisériées. ❖ Les conidiophores hyalins. ❖ Les vésicules sont subglobuleuses insérées par des phialides ces dernières portées par des métules. ❖ Les conidies sont globuleuses à subglobuleuses, de couleur verte pâle (Tabuc,2007). 		<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Un mycélium cloisonné, ❖ une tête aspergillaire constituée de vésicule sphérique en colonne courte, sur laquelle sont formées les phialides portés sur des métules (tête bisériée), chaque phialide produit des conidies rondes, échinulées et de couleur verte. ❖ Vésicule hémisphérique. ❖ Les têtes aspergillaires sont portées sur des conidiophores brun, sinueux, non ramifié et courts (Pitt and Hooking, 2009). 		<p><i>Aspergillus</i> <i>Nidulans</i></p>
---	---	--	---

	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Un mycélium cloisonné, ❖ Une tête aspergillaire constituée de vésicule sphérique en colonne courte, sur laquelle sont formées les phialides portés sur des métules (tête bisériée), chaque phialide produit des conidies rondes, échinulées et de couleur verte. ❖ Vésicule hémisphérique. ❖ Les têtes aspergillaires sont portées sur des conidiophores brun, sinueux, non ramifié et courts (Pitt and Hooking, 2009). 		<p><i>Aspergillus</i> <i>Nidulans</i></p>
---	---	--	---

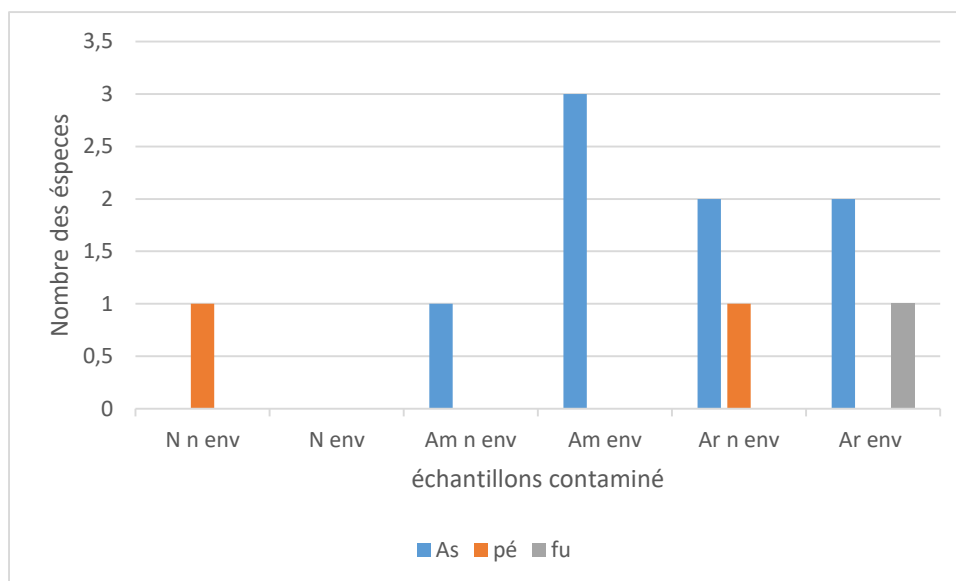


Figure 23 : Réprésentation graphique de différentes espèces d’Aspergillum, Penicilium et Fusarium identifiées dans les échantillons (noix, amande)

Ce graphique représente les différents espèces fongiques contaminants les fruits secs enveloppée ou non enveloppé . On remarque la dominance du genre aspergillus barre bleue dans 8 échantillons suivi par les *Penicillium* barre rouge dans 2 échantillons et *Fusarium* barre vert dans un seul échantillon . Ces résultats confirment que *L’Aspergillus* est le contaminant fongique le plus fréquent dans les fruits secs ,est dû a sa grande capacité a coloniser différents substrats et aux conditions physico-chimiques favorables a sa croissance.

2- Etude mycotoxique

Au cours des 14 jours d’incubation, un contrôle hebdomadaire des Erlens meyer a été effectué afin de vérifier l’absence de contamination par d’autres espèces fongiques. Une croissance est constatée à la fin de la durée de fermentation, caractérisée par le développement hétérogène (en filaments) du mycélium des souches fongiques.

En fin de la fermentation, les métabolites secondaires ont été extraits à l’acétate d’éthyle. La séparation des phases est obtenue après décantation et les extraits bruts ont été obtenus après concentration des phases organiques au rotavapor (Figure 24)

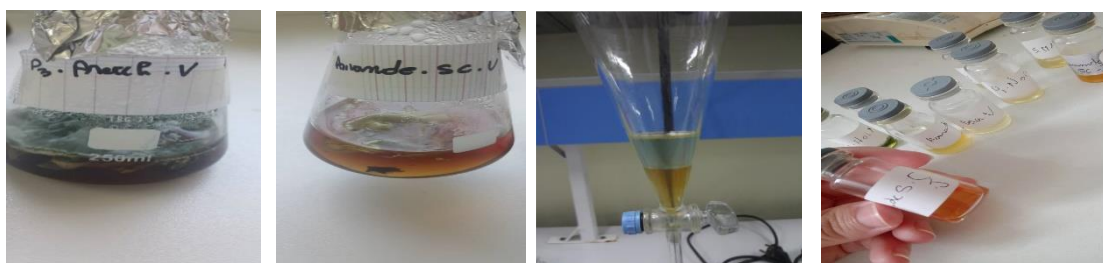


Figure 24 : L'extraction des métabolites secondaires

La chromatographie sur couche mince a permis de séparer les différents métabolites secondaires sécrétés par nos souches, contenus dans les extraits bruts sous lumière UV à une longueur d'onde =365 nm.



Figure 25 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par les souches fongiques obtenues

D'après la figure, la révélation par radiation UV a montré que l'extrait 01 correspondant à la souche (*Aspergillus sp1*) contient 6 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 25).

Ceci traduit la production des mycotoxines, cependant, les Rf obtenus ne correspondent pas aux mycotoxines connues ou nécessitent des révélateurs pour déterminer leurs identités.



Figure 26 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *Aspergillus sp 01*

Résultats

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait 02 (*Aspergillus sp 2*) compte 7 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 26).

Selon la couleur de la fluorescence des spots et le Rf, deux composants ont été identifiés : l'Aflatoxine G2 et l'Aflatoxine B1 qui donnent une fluorescence bleu vert et bleu ainsi que des Rf=0.49 et =0.54 respectivement.



Figure 27 : Chromatographie sur couche mince présentant les spots des mycotoxines produites par *Aspergillus sp 02*

La révélation par radiation UV a montré que la souche *Aspergillus sp 3* (extrait 03) produit à contient 5 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 27).



Figure 28 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus sp3*

Résultats

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait 04 (*Penicillium sp1*) contient 3 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 28).

La fluorescence verte et un Rf de l'ordre de 0.55, sont deux paramètres qui indiquent la production de l'Ochratoxine A par la souche *Penicillium sp 1*.



Figure 29 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Penicillium sp 01*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait 05 (*Penicillium sp 2*) contient 5 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 30).



Figure 30 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Penicillium sp 2*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait 06 (*Aspergillus sp 4*) contient 5 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 31).

Résultats

Selon la couleur bleu vert de la fluorescence du spot et un Rf égale à 0.57, le métabolite à été identifié comme étant l'Ochratoxine A.



Figure 31 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus sp4*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait 07 (*Aspergillus sp5*) contient 4 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 33).

La fluorescence bleu détectée par l'UV et un Rf de l'ordre de 0.66, sont deux paramètres qui indiquent la production de l'Aflatoxine B1 par la souche *Aspergillus sp 5*.



Figure 32 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus sp5*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait 08 (*Aspergillus sp 6*) renferme 4 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 34).

Résultats

Selon la couleur fluorescente des spots et le Rf, 1 seul composant à été identifié comme étant l'Ochratoxine A qui donnent une fluorescence verte et de Rf=0.55.



Figure 33 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus sp 6*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait 09 (*Aspergillus sp 07*) contient 1 seul composé qui apparaît sous forme de tache distincte (Figure 35).

La souche *Aspergillus sp 7* présente une production de mycotoxines, mais l'absence de données objectives, telles que la couleur de la fluorescence et le (Rf), ne permet pas d'en déterminer l'identité précise.



Figure 34 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus sp7*

Tableau 5 : Les valeurs de coefficients Rf (rapport frontal) des spots séparées par CCM .

Souches	N° de tache	Lumière UV	Rf	Mycotoxine
Amande SC V (<i>Aspergillus sp1</i>)	1	Bleu	0.44	/
	2	Brun	0.52	
	3	Bleu	0.59	
	4	Brun sombre	0.61	
	5	Brun sombre	0.69	
	6	Bleu	0.75	
D2 Noix (<i>Aspergillus sp 2</i>)	1	Bleu fluorescent	0.20	/
	2	Bleu fluorescent	0.26	
	3	Vert fluorescent	0.32	/
	4	Bleu fluorescent	0.39	/
	5	Bleu -Vert fluorescent	0.49	Aflatoxine G2
	6	Bleu fluorescent	0.54	Aflatoxine B1 (Scott et al., 1970)
	7	Bleu fluorescent	0.62	Aflatoxine B2 (scott et al., 1970)
Amande SC J	1	Bleu	0.44	
	2	Orange	0.49	
	3	Bleu foncé	0.50	/
	4	Bleu foncé	0.66	/
	5	Jaune	0.71	
D3 Arachide (<i>Penicillium sp1</i>)	1	Bleu fluorescent	0.49	/
	2	vert	0.55	Ochratoxine A
	3	Bleu foncé	0.67	/
D3 Noix (<i>Penicillium sp2</i>)	1	Verte	0.18	/
	2	Jaune-vert	0.51	/
	3	Jaune-vert	0.58	/
	4	Vert	0.67	/
	5	Vert	0.50	/
Amande SC J 2	1	Bleu-vert fluorescent	0.57	Ochratoxine A
	2	Bleu fluorescent	0.59	/
	3	Bleu foncé	0.66	/
	4	Jaune	0.71	/
	5	Vert	0.90	/
SM Arachide B	1	Bleu fluorescent	0.49	/
	2	Jaune	0.52	
	3	Bleu fluorescent	0.66	Aflatoxine B1
	4	vert	0.89	/
D3 Arachide	1	Bleu fluorescent	0.50	/
	2	Vert fluorescent	0.55	Ochratoxine A
	3	Bleu fluorescent	0.59	/
	4	Vert	0.89	/
D2 Arachide	1	Bleu fluorescent	0.57	/

Discussion

Les fruits à coque sont particulièrement vulnérables aux infections fongiques, tant au champ qu'en cas de conditions de stockage inadéquates. Cette sensibilité est accentuée chez les fruits secs ayant subi des dommages mécaniques ou causés par des charançons durant la récolte et le transport, les rendant plus exposés à l'invasion fongique et à la pourriture (**Nawar, 2008**).

De nombreux auteurs ont rapporté que les graines oléagineuses représentent un substrat particulièrement propice à la prolifération, à la maturation et à la multiplication des moisissures impliquées dans leur détérioration (**Riba et al., 2005 ; Abdoullahi et al., 2019**).

L'analyse de la flore fongique de fruits secs (arachides, noix, amandes) a montré la présence d'espèces du genre *Aspergillus*, ce qui est en accord avec les résultats de **Chapeland-Leclerc et al. (2005)**. L'arachide est l'un des oléagineux les plus souvent contaminés par des moisissures productrices de toxines, surtout pendant le stockage. Selon **Wagacha et al. (2013)**, certaines moisissures comme *Aspergillus* et *Penicillium* peuvent produire des métabolites secondaires appelées « mycotoxines » dans les graines d'arachide, ce qui peut constituer un danger réel pour la santé du consommateur.

Dans le présent travail, le genre *Aspergillus* est le plus dominant parmi les souches isolées, avec 8 espèces identifiées. Il est suivi du genre *Penicillium*, représenté par 2 espèces et enfin par le genre *Fusarium*, avec une seule espèce.

Comparativement aux résultats de **Benmansour-Brixi (2005)**, le taux de contamination par *Aspergillus* reste le plus élevé. Cette différence peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment la durée et les conditions de stockage, l'origine des grains, les conditions climatiques, les traitements agronomiques ainsi que la période de prélèvement. **Abdel-Gawad et Zoharii (1993)** ont identifié un large éventail de moisissures provenant de cinq types de graines de noix pour la consommation humaine en Arabie Saoudite.

Tandis que **Denizel et al. (2006)**, ont montré que la mycoflore externe dominante des pistaches immatures de trois régions de Turquie était composée d'*A. niger*, *A. flavus* et de *Penicillium spp.* Ils ajoutent également que les noix stockés dans les entrepôts ont été largement contaminés par *A. flavus*, *A. niger* et *A. ochraceus* (**Saleh Nawar, 2008**).

L'impact négatif de cette contamination se manifeste par l'altération des substrats (qualité organoleptique : goût, couleur, saveur, texture) et dans la sécrétion des Aflatoxines dont l'Aflatoxine B1 qui est la plus redoutable par son effet cancérigènes et toxique.

Afin de mettre en œuvre la capacité des souches obtenues à produire les mycotoxines, une fermentation liquide sur milieu YES a été réalisée. Ce milieu Riche en vitamines du groupe B complexes, favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes conduisant à la production optimale des mycotoxines (**Ammrouche, 2013**). Après l'extraction des surnageant des différentes souches à l'acétate d'éthyle, les extraits actifs ont ensuite été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM).

Des études antérieures, ont adopté cette technique pour la séparation et la détection des mycotoxines produites par les contaminants fongiques des denrées alimentaires. **Braicu et al. (2008)** ont mis en évidence la production de l'Aflatoxines et l'Ochratoxine A par des souches isolées à partir des échantillons de blé. De même, **Dehimat et al. (2009)** ont déterminé les métabolites secondaires d'*Aspergillus fumigatus* isolé des lentilles par CCM.

L'analyse des extraits bruts des *Aspergillus* et des *Penicillium* par (CCM), à révélé la présence de plusieurs bandes fluorescentes.

Notamment, la présence d'Aflatoxine B1 par *Aspergillus sp2* et *Aspergillus sp4* a été identifié par sa fluorescence bleue distincte et un Rf d'une valeur de 0.54. Ses résultats sont en corrélation avec les travaux de **Bennet et al. (2003)**.

De plus, la fluorescence bleue détectée sous la lumière UV et la valeur Rf de 0.62 servent d'indicateurs de la production de l'Aflatoxine B2 par l'*Aspergillus sp2*. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvées par **Scott et al. (1970)**.

La fluorescence bleue verte détectée et le $R_f = 0,49$ sont deux paramètres qui indiquent la production de l'Aflatoxine G2 par l'*Aspergillus* sp2. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par **Braicu et al.(2008)**.

L'analyse d'extraits de la souche *Penicillium* sp1, *Aspergillus* sp3 et *Aspergillus* sp5 par CCM a également montré la présence des tâches distinctes. Nos résultats sont identiques à ceux obtenus par **(Varga et al, 2007)** qui ont montré que les tâches ayant des fluorescences vertes et bleuesvertes avec des valeurs de $R_f = 0.55, 0.57$ et 0.55 correspondent respectivement à l'OchratoxineA.

En termes de mycotoxicologie, il est important de noter que les différentes souches d'*Aspergillus* et *Penicillium* isolées et caractérisées lors de notre travail possèdent le potentiel de produire des mycotoxines. Ce risque est d'autant plus courant, à cause de la grande stabilité chimique et la résistance de ces toxines aux traitements à haute température **(Moussaoui et al., 2021)**. Alors, l'élimination complète des mycotoxines dans les produits alimentaires s'avère quasi-impossible en raison de leur stabilité thermique et persistent même après avoir éliminer les moisissures productrices **(Boli et al ., 2018)**.

**Conclusion
et
perspective**

L'objectif de ce travail est d'effectuer un isolement des moisissures contaminant les fruits à coques commercialisées dans la Wilaya de Skikda et d'évaluer le pouvoir mycotoxinogène des isolats obtenus. Un total de 18 échantillons de fruits secs (six échantillons d'Amandes, six échantillons d'Arachides et six échantillons de noix) a été collecté dans différents points de vente de la ville de Skikda.

Sur les 18 échantillons analysés nous avons isolé 12 souches fongiques. En effet, les arachides étaient les plus contaminées avec 42 % des isolats, suivies par les amandes avec 33 % et les noix avec 25 %. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les trois échantillons des fruits à coques analysés sont effectivement contaminés par les moisissures.

L'étude macroscopique et microscopique a révélé une dominance remarquable du genre *Aspergillus* représenté par 7 espèces et l'infériorité du genre *Penicillium* représenté uniquement par 2 espèces. En revanche, une seule espèce du genre *Fusarium* a été obtenue.

L'étude du pouvoir producteur des mycotoxines a été mise en évidence par CCM. Effectuée dans une chambre noire sous lampe à UV à 365 nm, l'analyse des mycotoxines a révélé :

- La production de l'Aflatoxine G2 par l'*Aspergillus sp1* et l'*Aspergillus sp2*.
- La production de l'Aflatoxine B1 par l'*Aspergillus sp2*, l'*Aspergillus sp4* et l'*Aspergillus sp5*.
- La production de l'Aflatoxine B2 par l'*Aspergillus sp2* et l'*Aspergillus sp3*.
- La production de l'Ochratoxine A par le *Penicillium sp1*, *Penicillium sp 2*, l'*Aspergillus sp4*, l'*Aspergillus sp 6* et l'*Aspergillus sp 7*.

Du point de vu mycotoxicologique, tous les échantillons analysés sont contaminés par les Aflatoxines et les Ochratoxines.

Malheureusement, il n'est pas possible d'éliminer les mycotoxines lors de la préparation des aliments sans en altérer la qualité nutritionnelle. En attendant, certaines règles d'hygiène et de sécurité peuvent être appliquées :

- Vendre les fruits secs à coque dans des contenants opaques et hermétiquement fermés : cela limite leur exposition à l'humidité de l'air, réduisant ainsi le risque de contamination par les mycotoxines, même si des spores de moisissures sont présentes. De plus, cela protège les huiles essentielles de la lumière, évitant leur dégradation. Ces huiles ont un rôle important grâce à leurs propriétés fongicides et bactéricides.

Conclusion et perspective

- Respecter les règles d'hygiène, notamment en ce qui concerne l'emballage, le stockage et la conservation. Il est également essentiel d'intensifier les contrôles microbiologiques et toxicologiques sur les denrées alimentaires à risque de contamination par les mycotoxines.

Au terme de cette recherche, de nombreuses perspectives peuvent en découler, afin de répondre aux questions soulevées lors de cette étude, à savoir :

- L'extraction et la caractérisation des composés actifs par des méthodes plus spécifiques ;
- La recherche de microorganismes antagonistes vis-à-vis les moisissures toxigènes, afin de réduire leur prolifération en post-récolte et qui inhibe, par conséquent, la production des Aflatoxines et Ochratoxines dans le fruit.

Les références bibliographiques

Les Références bibliographiques

- Abdollahi, H.O et al., A 2019. Isolement et caractérisation de souches fongiques à partir de poisson fumés/sèches du lac Fitri au Tchad. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 2(4), 155-160.
- Afssa, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. (2006). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale Rapport Final. Maisons-Alfort. 308 p.
- Alwakeel, S.S., Nasser, L.A. (2011). Microbial contamination and mycotoxins from nuts in Riyadh, Saudi Arabia. *American Journal of Food Technology*, 6(8), 613–630 p.
- 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.
- 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.
- Atoui A.K. (2006). Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius* : Etudes moléculaire et physiologique. Thèse de doctorat : Microbiologie & Biocatalyse Industrielles. L'institut national polytechnique de Toulouse, 226 p.
- Awad, G. (2005). Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A. thèse de doctorat : Génie des procédés. L'institut national polytechnique de Toulouse, 175 p.
- Bandh S.A, Azra N. Kamili A.N and Ganai B.A. (2011). Identification of some *Penicillium* species by traditional approach of morphological observation and culture. *African Journal Microbiology Research*, 5(21), 3493-3496 p.
- Barik, B. P., Tayung, K., Jagadev, P. N., Dutta, S. K. (2010). Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences*, 2(1), 8-16 p.
- Benmansour-Brixi, G.N. (2005). Étude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs physiques sur l'aflatoxinogénèse. Thèse de magister de biologie, Université de Djillali Liabes de Sidi Bel Abbés, Algérie.
- Bennett, J.W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 497-516 p.
- Bernard, A. (2020). Étude des ressources génétiques du noyer en vue de la mise en œuvre d'une sélection assistée par marqueurs. Thèse de doctorat : Biologie végétale. Université de Bordeaux, 24 p.
- Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan, 13- 80. Bordas.Paris, 36-153 P.
- Boissier, M. (2003). Etude et compréhension des phénomènes environnementaux régissant la colonisation des produits de construction par les aérosols fongiques : application à l'hygiène des environnements intérieurs. Thèse de doctorat : Microbiologie et Parasitologie. Université Paris XII Val de Marne, 8-14 p.

Les Références bibliographiques

- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance Industrielle. Paris : Masson, 12-426 p.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris ,12-426 P.
- Bouchet, P., Guignard J-L, Pouchus Y-V. Les champignons, mycologie fondamentale et Appliquée. (2005). Paris : Masson 2^{ème} édition ,109-111 P.
- Boudih, S. (2011). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers : évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. Thèse de doctorat : Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et santé. Paris : Paris-EST, 185 p. Université Paris-Est, 19-21 p.
- Bourgeois, C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1989). Microbiologie alimentaire. Aspect Microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris : 216-244 p.
- Bourgeois, C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1998). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris : 216-244 P.
- Brochard, G., Le Bacle C. Mycotoxines en milieu de travail. I. Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. (2009). Document pour le médecin du travail, DMT n°129, Septembre.
- Chabasse, D., Bouchara, J. P., Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. (Edn) Bioforma. 12 P.
- Chapeland-Leclerc, F., Papon, N., Noël, T., Villard, J. (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). Revue francophone des laboratoires, 61-66 p.
- Chen, J., Mirocha, C.J., Xie, W. et al., 1992. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. Applied and Environmental Microbiology, 58(12), 3928–3931.
- Compaore, H., Sawadogo-Lingani, H., Savadogo, A., Dianou D, Alfred S. (2016). Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substance antibactériennes à partir d'aliments locaux au Burkina Faso. International journal of biological and chemical sciences, 10(1), 198-210 P.
- Davet, P. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P : 52-57. (1996).
- El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., Lebrihi, A. (2011). Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. Journal of Food Science, 76 (4), 247-253 P.
- Frazier, W. C. (1967). Food microbiology. Academic presse. London. 3 -429 P.
- Gauthier, A., 2016. Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat : Science pharmaceutique. Paris : Université de Bordeaux, 120 p.

Les Références bibliographiques

- Guechi, A., Girre, L. (2002). Recherche et analyse d'un effet mutagène des extraits de feuilles d'olivier parasitées par le champignon *cycloconium ole aginum cast.* Sciences & Technology. A, exactes sciences, 96-100 p.
- Gmitter, F. G., Soneji, J. R., Rao, M. N., Gradziel, T. M. (2009). *Breeding Plantation Tree Crops : Temperate Species.* Springer-Verlag New York, 290 p. Gmitter2009
- Guiraud, J. P. *Microbiologie alimentaire.* Dunod. Paris. P : 7-330. (1998).
- Heit, S., 2015. Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. Thèse doctorat : Faculté de pharmacie. Nancy : Université de Lorraine, 114 P
- Hocking, A.D., 2006. *Aspergillus* and related teleomorphs. *Food spoilage microorganisms*, 451-487.
- Houissa, H. (2021). Les Mycotoxines du mil : occurrence et flore fongique. Thèse de doctorat : Sciences Biologiques. L'université de Montpellier : Tunisie, 210 p.
- Huybrechts, B et al., 2013. Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles. *Centre d'étude et de recherches vétérinaires et agrochimiques*, 22 (3), 202_215.
- Jackson, L.S., Al-Taher, F. Factors Affecting Mycotoxin Production in Fruits. In : *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* (R. Barkai-Golan, N. Paster, and Ed.), Elsevier, California, Usa. P : 75–104. (2008).
- Jagoda, K.P et Wioletta, B., 2021. Mycotoxines — Prévention, détection, impact sur la santé animale. *Processus*, 9, 2-17.
- Jouany, J.P., Morgavi, D.P., Boudra, H., 2006. Le Risque Mycotoxique Dans La chaîne Alimentaire En France. *Centre de Clermont-Theix 63122 Saint Genès Champanelle*, 41(3), 151-158.
- Juchet, A., Chevallier, M., Chabbert-Broué, A. (2013). Allergie aux fruits à coque : L'indispensable. *Revue Française d'Allergologie*, 53(2), 77-83 p
- Knoden, J. L., Dufour, L., Bindelle, J. (2003). *Fabrication de beurre de cacahuete.* Collection Manuels et Techniques, Bruxelles, Belgique, 2-4 p.
- Laifa, B., S. Adouani, et al. (2020). Production des substances antifongiques par les bactéries lactiques, Université de Jijel.
- Lahouar, A., 2016. Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysiologicals. Thèse doctorat : Sciences Biologiques, Biotechnologie et Santé. Tunisie : Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, 135 P.
- Leveau, S. B., Bouix, M. Les microorganismes d'intérêt industriel. *Lavoisier Microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments.* Lavoisier. Paris. P : 216-244. (1993).
- Madelin T. M. (1994). Fungal aerosols : A review. *Journal of Aerosol Science*, 25(8), p : 1405–1412.
- Maniar, S., El ouali lalami, A. (2011). Qualité hygiénique des fruits secs au centre du Maroc.

Les Références bibliographiques

- Marie-Paule H. (2002). Dosage des mycotoxines dans les produits oléagineux .Laboratoire DGCCRF de Rennes, 26, rue Antoine Joly, 35000 Rennes, 10(4) ,1-6P.
- Matmoura, A., Bouti, K., Bouras, N., Houmani, Z. (2019).Contamination fongique des amandes commercialisées dans les marchés de trois villes algériennes : Blida, Médéa et Tipaza. Journal of Advanced Research in Science and Technology, 6(1), 888-896 p.
- Meheust, D. (2012). Eposition aux moisissures en environnement intérieur : Méthodes de Mesure et Impacts sur la santé. Thèse de doctorat : Biologie et Science de la Sante .Rennes : Université Rennes, 19-25 p.
- Mohanta J., Tayung K.,Mohapatra U. (2007). Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. The Internet Journal of Microbiology. 5(2),1-8 p.
- Monroy, A .M. T .(2020). Etude de la potentialité du développement de microorganismes sur des matériaux d'isolation bio-sourcés et conventionnels utilisés dans la rénovation de bâtiments : impacts sur la qualité de l'air intérieur. Thèse de doctorat : Génie des Procédés et bioprocédés. Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique, 21-22 p
- Moussaoui, M., Ziane, M., Ben Braïek, O., Yezli, W., Moussaoui A. (2021). Detection and preliminary identification of ochratoxins and aflatoxins produced by Aspergillus species isolated from coffee. Plant Archives, 21(2), 719-726 p.
- Navale, V. et al., 2021. Aspergillus derived mycotoxins in food and the environment : Prevalence, detection, and toxicity. Toxicology Reports, 8, 1008-1030.
- Nawar, L. S. (2008). Prevention and control of fungi contaminated stored pistachio nuts imported to Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, 15(1), 105-112 p.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O., 1983. Fusarium species : an illustrated manual for identification. Pennsylvania state univ. Editor. 206 P.
- Nguyen, M. T. (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Viêt Nam – Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxins. Thèse de doctorat : Génie des procédés et de l'environnement. L'institut national polytechnique de Toulouse, 145 p.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000). L'essentiellen microbiologie.Edition Berti, 210-216 P.
- Organisation Mondiale de la Santé .Mycotoxines . (2018).
- Patricia, A. M., Suzanne, H., Cindy, L., Cory, M. B. (2006). Food Mycotoxins : An Update. Institute of Food Technologists. J Food Sci, 71(5), 51-65 p.
- Pitt J.I, Hocking A.D. (1987). Fungi and Food spoilage, 2nd edition. London : Blackie Academix and Professional.
- Rahmani, A., Jinap, S., Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. Comprehensive reviews in food science and food safety, 8(3), 202-251 p.
- Reboux G (2006). Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. Revue Française d'Allergologie. 46 : 208-212.

Les Références bibliographiques

- Richard, J.L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses : An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119 (1-2), 3-10.
- Riba A. (2008). Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et 'ochratoxine A dans la filiere ble En Algerie. Thèse : micro
- Rojas T.R., Sampayo C.A.F., Vázquez B.I., Franco C.M., Cepeda A. (2005). Study of Interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. In the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control*, 16,445–450 P.
- Roncero, J.M., Álvarez-Ortí, M., Pardo-Giménez, A., Rabadán, A., Pardo, J.E. (2020).Review about Non-Lipid Components and Minor Fat-Soluble Bioactive Compounds of Almond Kernel. *Foods*, 9(11), 1646.
- Samson, R. A., Houbraken, J. Q. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., Frisvad, J. C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. 50, 45-61.
- Samson, R.A., Varga, J., 2009. Qu'est-ce qu'une espèce dans *Aspergillus* ? .*Mycologie Médicale*, 47 (1), 13_20.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G.,Yaguchi, T., Frisvad, J.C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78 (1) : 141-173
- Senanayake I. C., Rathnayaka A. R., Marasinghe D. S., Calabon M. S., Gentekaki E., Lee H. B., Hurdeal V. G., Pem D., Dissanayake L. S., Wijesinghe S. N., Bundhun D., Nguyen T. T., Goonasekara I. D., Abeywickrama P. D., Bhunjun C. S., Jayawardena R. S., Wanasinghe D. N., Jeewon R., Bhat D. J., Xiang M. M. (2020). Morphological approaches in studying fungi : collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere*, 11(1), p : 2678–2754.
- Sheorey, S. D., Sengupta, R., Hinge, M. A. (2011). Heart healthy nuts. *International Journal Of Current Pharmaceutical Review and Research*, 2(3), 145-160 p.
- Steyn, P.S. 1998. The biosynthesis of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149, 6: 469-478.
- Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat : Pathologie mycologie génétique et nutrition .Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, 29-31 p.
- Tortora J, Funk BF, Case CL (2003). Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN.Canada.
- Tournas V.H., Niazi N.S., Kohn J.S. (2015). Fungal Presence in Selected Tree Nuts and Dried fruits. *Microbiology Insights*, 8, 1–6 p.
- Tuomi, K., Huuhtanen, P., Nykyri, E., Ilmarinen, J. (2001). Promotion of work ability, the quality of work and retirement. *Occupational medicine*, 51(5), 318-324 p.
- Uchikoba,T., Mase, T., Arima, K., Yonezawa, H et Kaneda, M. Isolation and Characterization of a trypsin like protase from *Trichoderma viride*. *Biological Chemistry*. (2001) 382, 1509- 1513.

Les Références bibliographiques

Varga, J., Kocsubé, S., Toth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson, R.A. (2007). *Aspergillus brasiliensis* sp. Nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1925–1932 p.

Vidal A, Ouhibi S, Ghali R, Hedhili A, Saeger S.D, Boevre M.D. (2019). The mycotoxin Patulin : An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food and Chemical Toxicology*, 129 : 249-256 p.

Visagie, C.M et al., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343–371.

Wagacha JM, Mutegi CK, Christie ME, Karanja LW, Kimani J. (2013). Changes in Fungal Population and Aflatoxin Levels and Assessment of Major Aflatoxin Types in Stored Peanuts (*Arachis hypogaea* Linnaeus). *Journal of Food Research*, 2(5), 10-23P.

Yada, S., Lapsley, K., Huang, G. (2011). A review of composition studies of cultivated almonds : macro nutrients and micro nutrients. *Journal of Food Composition and analysis*, 24(4-5), 469-480 p.

<https://shop.dpanda.in/blogs/blog/5-ways-dry-fruits-benefit-diabetes-low-gi-high-fiber-nutrient-rich-snack-options>

<https://www.ricardocuisine.com/chroniques/1-ingredient/806-10-faits-sur-les-arachides>

<https://cuisine.journaldesfemmes.fr/encyclopedie-produits/1955618-amande/>

<https://scitechdaily.com/adding-just-a-small-handful-of-walnuts-to-diet-can-have-important-benefits/>

<https://www.seneplus.com/societe/laflatoxine-fait-des-ravages-au-senegal>

<https://www.sacvalleyorchards.com/almonds/insects-mites/harvest-samples-for-almond-crop/attachment/ptb-damage/>

https://www.123rf.com/photo_139245498_moldy-walnut-on-wooden-table-unhealthy-food-food-mold-poisonous-mold-storage-of-nuts.html

Annexe

I. milieu PDA “Potato Dextrose Agar “

Composition :

- -Pomme de terre 200g
- -Glucose 20g
- -Agar 15_20g
- -Eau distillé 100ml

Préparation :

- 1- Éplucher et couper les pommes de terre en petits morceaux.
- 2- Faire bouillir dans environ 500ml d'eau pendant 20 à 30 minutes.
- 3- Filtrer le bouillon à travers un tamis fin pour récupérer l'extrait clair.
- 4- Compléter le volume avec de l'eau distillé jusqu'à 1000ml.
- 5- Ajouter de Dextrose et l'agar_Agar à l'extrait filtré.
- 6- Bien mélanger jusqu'à dissolution complète.
- 7- Autoclave à 121C° pendant 2h.

II. milieu YES “YEAST EXTRACT SUCROSE”

Composition :

- Extrait de levure 20g.
- SSaccharose 150g.
- Mg So4 7H2O 0.1g.
- Zn So4 7H2O 0.01g.
- Cu So4 5 H2O 0.05g.
- Eau distillé 100ml .

Préparation :

- 1- Dissoudre les composants respectivement dans 100 ml de l'eau distillé.
- 2- Mélanger les composants avec une agitation sans chaleur.
- 3- Stériliser à autoclave 121C°pendant 2h.

III. Calcule de rapport frontal(RF)

Rapport frontal (RF) = Distance parcourue par soluté / Distance parcourue par solvant

Souche	Numéro des taches	Distance parcourue par soluté	Distance parcourue par solvant	Rf
Amande sc v	1	4,5	10,1	0,44
	2	5,3		0,52
	3	6		0,59
	4	6,5		0,61
	5	7		0,69
	6	7,6		0,75
D2 Noix	1	2,1	10,1	0,20
	2	2,7		0,26
	3	3,3		0,32
	4	4		0,39
	5	5		0,49
	6	5,5		0,54
	7	6,3		0,62
Amande sc j	1	4,5	10,1	0,44
	2	5		0,49
	3	5,9		0,58
	4	6,7		0,66
	5	7,2		0,71
D3 Arachide	1	5	10,1	0,49
	2	5,6		0,55
	3	6,8		0,67
D3 Noix	1	1,9	10,1	0,18
	2	5,2		0,51
	3	5,9		0,58
	4	6,8		0,67
	5	9,1		0,90
Amande sc j (2)	1	5,1	10,1	0,50
	2	5,8		0,57
	3	6,7		0,66
	4	7,2		0,71
	5	9,1		0,çà
SM Arachide B	1	5	10,1	0,49
	2	5,3		0,52
	3	6,7		0,66
	4	9		0,89
D3 Arachide	1	5,1	10,1	0,50
	2	6		0,59
	3	6,9		0,68
	1	9		0,89
D2 Arachide	1	5,8	10,1	0,57

Résumé

Peanuts, nuts, and almonds are tree nuts that provide a favorable substrate for mold Toxigenic development, which can lead to both organoleptic and sanitary deterioration. In this context, the aim of this study is focused on mycotoxins, starting with a mycological analysis: isolation and purification of the fungal flora from these dried fruits according to different commercial categories (shelled or with shells), using two methods: the Ulster method and the classic dilution method.

The results showed that peanuts were the most contaminated with 42% of the isolates, followed by almonds with 33% and walnuts with 25%. Macroscopic and microscopic analysis allowed the identification of two fungal isolates belonging to the genus *Penicillium*, one from the genus *Fusarium*, and eight from the genus *Aspergillus*, reflecting poor storage and commercialization conditions.

Next, detection and screening for mycotoxins were carried out on different species through liquid fermentation in a YES medium for 14 days. The raw extracts were analyzed by Thin-Layer Chromatography (TLC) under UV light (365 nm). The results show that all samples were contaminated with various mycotoxins (AFB1, AFB2, AFG2, OTA).

Keywords: Dried fruits, Toxigenic molds, Mycotoxins, TLC

يعد الفول السوداني والجوز واللوز من الفواكه الجافة التي تُشكّل ركيزة مناسبة لنمو السموم الفطرية، مما قد يؤدي إلى تدهور عضوي وصحي. في هذا السياق، يهدف هذا العمل إلى دراسة مشكلة السموم الفطرية، بدءًا بتحليل فطري يشمل عزل وتنقية الفلورا الفطرية من هذه الفواكه الجافة وفقًا لفئات تجارية مختلفة (مقشّرة أو مع القشرة)، باستخدام طريقتين: طريقة أستر والطريقة الكلاسيكية للتخفيف.

أظهرت النتائج أن الفول السوداني كان الأكثر تلوثًا بنسبة 42% من العزلات، يليه اللوز بنسبة 33%، ثم الجوز بنسبة 25%. وقد سمحت الدراسة العيانية والمجهريّة بالتعرف على عزلتين فطريتين تنتمي إلى جنس *Penicillium* وعزلة واحدة إلى جنس *Fusarium*، وثمانية عزلات من جنس *Aspergillus*، مما يعكس سوء ظروف التخزين والتسويق.

بعد ذلك، تم إجراء الكشف والبحث عن السموم الفطرية في الأنواع المختلفة من خلال التخمير السائل في وسط YES لمدة 14 يومًا. وتم تحليل المستخلصات الخام باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM) تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية (365 نانومتر). أظهرت النتائج أن جميع العينات كانت ملوثة بأنواع مختلفة من السموم الفطرية (OTA، AFG2، AFB2، AFB1).

الكلمات المفتاحية: الفواكه الجافة، الفطريات المنتجة للسموم، السموم الفطرية، TLC.

<p>Année universitaire : 2024-2025</p>	<p>Présenté par : Chouit Maissa Draoui Oumayma Merdoul Amina Mihoub Rokia</p>
<p align="center">Etude Mycologique et Mycotoxicologique Des Fruits Secs À Coque Commercialisées Dans La Région de Skikda</p>	
<p align="center">Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie appliqué</p>	
<p>Les arachides, les noix et les amandes sont des fruits secs à coques oléagineux qui constituent un substrat favorable au développement de moisissures toxigènes, pouvant entraîner une détérioration organoleptique et sanitaire. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail s'inscrit dans la problématique des mycotoxines, en commençant par une analyse mycologique : isolement et purification de la mycoflore de ces fruits secs selon différentes catégories commercialisées (écalées ou avec coque), en utilisant deux méthodes : la méthode d'Ulster et la méthode classique de dilution.</p> <p>Les résultats ont montré que les arachides étaient les plus contaminées avec 42 % des isolats, suivies des amandes avec 33 % et des noix avec 25 %. L'étude macroscopique et microscopique ont permis d'identifier deux isolats fongiques appartenant au genre <i>Penicillium</i>, 1 isolat du genre <i>Fusarium</i> et 8 du genre <i>Aspergillus</i>, ce qui reflète de mauvaises conditions de stockage et de commercialisation.</p> <p>Ensuite, une détection et une recherche de mycotoxines ont été réalisées sur les différentes espèces par fermentation liquide dans le milieu YES pendant 14 jours. Les extraits bruts ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) sous lumière UV (365 nm). Les résultats montrent que tous les échantillons sont contaminés par différentes mycotoxines (AFB1, AFB2, AFG2, OTA).</p>	
<p>Mots-clefs : Fruits secs, Moisissures toxigènes, Mycotoxines, CCM.</p>	
<p>Laboratoires de recherche : laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'activité Microbienne (LaMyBAM) (U Constantine 1 Frères Mentouri).</p>	
<p>Président du jury : Dr Boulechfar Safia (MCA – Université 20 Août 1955-Skikda). Encadrant : Dr Krouma Hamida (MCB – Université 20 Août 1955-Skikda). Examinatrice : Dr Melouka Hadda (MCB – Université 20 Août 1955-Skikda).</p>	