



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Etude mycologique et mycotoxique des fruits secs (à coque) commercialisés dans
la région de Constantine.**

Présenté par : LEMLOUM Hiba

Le : 10/06/2024

CHENNIB Sarra

Jury d'évaluation :

Président : Mme. MIHOUBI Ilhem (Pr - Université Frères Mentouri, Constantine).

Encadrant : Mme. BENSERRADJ Ouafa (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine).

Examineur : Mme. GHORRI Sana (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine).

Année universitaire

2023 - 2024

Remerciement

J'exprime toute ma reconnaissance envers mon Encadreuse de mémoire, BENSERRADJ Ouafa, Enseignante à la Faculté des Sciences Université frères Mentouri Constantine. 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 laboratoire de Mycologie biotechnologie et de l'activité microbienne qui nous ont aidés pour rédiger notre pratique.

Aussi nous remercions les membres de jury :

Président du jury : Mme. MIHOUBI Ilham, Professeur UFM Constantine.

Rapporteur : Mme. GHORRI Sana, MCB- UFM Constantine.

A toute personne qui a participé de près ou loin, directement ou indirectement à réaliser notre travail.



Dédicace

Par-dessus tout, je remercie et loue Dieu de m'avoir accordé le succès et de m'avoir honoré de ce grand statut de connaissances utiles.

Je dédie mon succès à mes honorables parents :

A` la plus grande femme que j'ai jamais connue « *ma mère* » la belle âme de qui j'ai hérite la patience, la force et la confiance. Que Dieu te garde comme une lumière brillé dans ma vie.

A « *mon père* », qui a été pour moi un soutien dans ma vie académique et sociale, qui m'a fourni tout j'avais besoin. A l'homme qui ne lasse pas de répondre à mes demandes répétées, que Dieu vous garde comme couronne sur nos têtes et vous accorde une longue vie.

Je dédie aussi cet réussies à mes chers sœurs (*Hadjer, Khadidja et Anissa*) et chers frères (*Hilal et Mahdi*), « Merci » du fond du cœur.

Au professeur qui supervise cela recherche « *Mme Benserradj.O* », je lui adresse mes sincères remerciements pour ses instructions et ses conseils tout ou long préparation de ce mémoire.

A ma collègue dans cette recherche « *Hiba* », merci beaucoup.

Je tiens à remercier ma tante maternelle « *Donia* », qui m'a toujours soutenu dans mes études et aspirait à être aux plus hauts rongs.

Je remercie toute ma famille et mes amis sans exception, à tous ceux qui m'ont soutenu, ne serait-ce qu'un mot gentil.

Sarra



Dédicace

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à Dieu, qui nous a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

À mes très chers parents,

Source de mon bonheur : mon père et ma mère, en témoignage de ma reconnaissance pour leur soutien, leurs sacrifices et tous leurs efforts pour mon éducation, qui m'ont toujours guidé vers le chemin de la réussite.

À mes chères sœurs,

«Rawnak et Yasmine», qui m'ont aidée et soutenue dans les moments difficiles.

À mon cher frère, «Abd el Ali»,

À mes chers grands-parents,

À qui je souhaite une bonne santé.

À toute ma famille,

À toute la promotion de 2ème Année Master MBF 2024,

Et spécialement à ma collègue de ce travail, « Sarra ».

Hiba

Table des matières

Liste abrégées

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction.....1

Chapitre 1 : les moisissures

I. Revue bibliographique

1. Généralités.....	3
2. Cycle de vie.....	3
3. Modes de reproduction.....	4
a) Reproduction sexuée.....	4
b) Reproduction asexuée.....	5
4. Conditions de développement des moisissures.....	6
4.1. Conditions physico-chimiques.....	6
4.1.1. Température.....	6
4.1.2. Effet du pH.....	6
4.1.3. AW.....	7
4.1.4. Composition chimique du substrat.....	7
4.2. Les nutriments.....	7
5. Mode de vie des moisissures.....	8
5.1. Le saprophytisme.....	8
5.2. Le parasitisme.....	8
5.3. La symbiose.....	8

Chapitre 2 : les Mycotoxines

1. Définition.....	10
2. La biosynthèse.....	11
3. Nature chimique.....	11
4. Les principales mycotoxines.....	11
4.1. Aflatoxine.....	11
4.2. Ochratoxine A.....	12
4.3. Trichothécènes.....	13
4.4. Zéaralenone.....	14
4.5. Fumonisines.....	15
4.6. Patuline.....	16

5. Mycotoxinogénèse.....	17
5.1.Champignons toxinogénèses.....	18
5.1.1. Le Genre <i>Penicillium</i>	18
5.1.2. Le Genre <i>Aspergillus</i>	19
5.1.3. Le Genre <i>Fusarium</i>	21
5.2.Facteurs influençant la production des mycotoxines.....	22
5.2.1. Facteurs intrinsèques.....	22
5.2.2. Facteurs extrinsèques.....	22
6. Les moisissures et les mycotoxines dans la chaîne alimentaire.....	24

Chapitre 3 : les fruits secs

1. Généralités.....	26
1.1. L'arachide.....	26
1.2. Les amandes.....	27
1.3. Les noix.....	28
2. Caractéristiques des fruits secs.....	28
3. Stockage des fruits à coque.....	29
4. Altération des fruits secs par la production des mycotoxines.....	30

II. Matériels et Méthodes

1. Etude mycologique des fruits à coque.....	32
1.1.Echantillonnage.....	32
1.2.Désinfection des fruits secs (les graines et les coques).....	34
1.3.Isolement de la flore fongique.....	34
1.3.1. Méthode directe d'Ulster.....	34
1.3.2. Méthode indirecte de dilution.....	35
1.4.Purification.....	36
1.5.Identification des isolats.....	37
1.5.1. Identification macroscopique.....	37
1.5.2. Identification microscopique.....	37
2. Etude mycotoxicologique.....	38
2.1.Production de mycotoxines sur milieu de fermentation.....	38
2.2.Préparation du milieu de fermentation.....	38
2.3. Ensemencement du milieu de fermentation.....	38

2.4.Extraction.....	38
2.5.Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	39

III. Résultats et discussion

1. Etude mycologique des fruits à coque.....	41
1.1. Mise en évidence de la flore fongique contaminant les échantillons des fruits à coque.....	41
1.2. Identification des souches fongiques isolées.....	42
1.2.1. Identification macroscopique.....	42
1.2.2. Identification microscopique.....	44
2. Etude mycotoxicologique.....	47
Discussion	53
Conclusion et perspectives	56
Références bibliographique	58
Annexe	67

Résumé

Liste des abréviations

AGMI : acide gras mono insaturé.

AGPI : acide gras polyinsaturé.

AGS : acide gras saturé.

Am env : Amande enveloppé.

Am nu : Amande nu.

Ar env : Arachide enveloppé.

Ar nu : Arachide nu.

Aw : L'activité de l'eau.

Ca : Calcium.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CHO : aldéhyde.

CPA : l'acide cyclopiazonique.

DAS : le diacétoxyscirpénol.

DON : déoxynivalénol.

FB1 : fumonisine B1.

FB2 : fumonisine B2.

FB3 : fumonisine B3.

F-X : Fusarenone-X.

IARC : Centre International de Recherche sur le Cancer.

K : Potassium.

Mg : Magnésium.

N env : Noix enveloppé.

N nu : Noix nu.

Na : Sodium.

NIV : nivalénol.

O2 : Dioxygène.

OTA : Ochratoxine A.

P : Phosphore.

PAT : patuline.

PDA : Potato Dextrose Agar.

PDB : Potato Dextrose Broth.

PH : Potentiel hydrogène.

Rf : facteur de rétention.

TCT : Trichothécènes.

UV : ultra-violet.

ZEA : Zéaralénone.

Listes des figures

Figure 1 : Photo microscopique de la moisissure.....	3
Figure 2 : Cycle de vie des moisissures.....	4
Figure 3 : la reproduction sexuée et asexuée chez les champignons.....	5
Figure 4 : Structure chimique d'Aflatoxine B1.....	12
Figure 5 : la structure chimique d'Ochratoxine A.....	13
Figure 6 : Structure chimique générale des Trichothécènes.....	14
Figure 7 : la structure chimique de Zéaralénone.....	15
Figure 8 : Structure chimique générale des Fumonisines.....	16
Figure 9 : la structure chimique de Patuline.....	17
Figure 10 : les caractères morphologiques de genre <i>Penicillium</i>	18
Figure 11 : l'appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i>	20
Figure 12 : l'aspect microscopique des conidies de <i>Fusarium</i>	21
Figure 13 : fruits à coque (noix).....	26
Figure 14 : L'arachide avec et sans coque.....	27
Figure 15 : L'amande avec et sans coque.....	27
Figure 16 : La noix avec et sans coque.....	28
Figure 17 : Fruits secs contaminés.....	31
Figure 18 : Désinfection des fruits secs. A) Eau de javel, B) Ethanol, C) Eau distillée.....	34
Figure 19 : Ensemencement des fruits secs décortiqués sur milieu PDA : A) Arachide, B) Amande, C) Noix.....	35
Figure 20 : Ensemencement des fruits secs enveloppés sur milieu PDA : A) Arachide, B) Amande, C) Noix.....	35

Figure 21 : Les étapes de l'isolement de la flore fongique à partir des fruits secs (arachide, amande, noix) : A) Echantillon, B) Broyage de l'échantillon, C) Echantillon moulu, D) Agitation, E) Dilutions décimales, F) Ensemencement.....	36
Figure 22 : Purification des isolats.....	36
Figure 23 : Fermentation et extraction de mycotoxines : A) Inoculation des disques, B) Incubation, C) Culture fongique après fermentation, D) filtration du milieu de fermentation, E) Décantation, F) Evaporation de l'extrait.....	39
Figure 24 : Les extraits bruts.....	39
Figure 25 : La migration de solvant.....	40
Figure 26 : Examiner des plaques CCM sous lampe UV.....	40
Figure 27 : Pourcentage des isolats fongique obtenus de chaque type de fruits à coque.....	41
Figure 28 : représentation graphique de différents espèces d' <i>Aspergillus</i> identifiés par rapport les échantillons (noix, amande, arachide).....	47
Figure 29 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus terreus</i>	48
Figure 30 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus ochraceus</i>	48
Figure 31 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus flavus</i>	49
Figure 32 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus fumigatus</i>	50
Figure 33 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus niger</i>	50
Figure 34 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par <i>Aspergillus brasiliensis</i>	51

Liste des tableaux

Tableau 1 : les toxines produites par le genre <i>Penicillium</i>	19
Tableau 2 : les toxines produites par le genre <i>Aspergillus</i>	20
Tableau 3 : les toxines produites par le genre <i>Fusarium</i>	22
Tableau 4 : la composition nutritive des arachides, amandes et noix.....	29
Tableau 5 : tableau représente les différentes variétés des échantillons étudié.....	33
Tableau 6 : Observations macroscopiques des différents isolats obtenus à partir des fruits à coques analysé.....	42
Tableau 7 : Caractères microscopiques des souches isolées des fruits à coq.....	45
Tableau 8 : Les valeurs de coefficients Rf (rapport frontal) des spots séparées par CCM.....	51

Introduction

La qualité microbienne est un élément important de la sécurité alimentaire, qui pose des défis considérables au commerce international et est souvent utilisée pour renforcer les barrières à l'importation. En outre, elle joue également un rôle démontrable dans la prévention des maladies d'origine alimentaire (**Maniar et El ouali lalami, 2011**).

Comme ailleurs, la population algérienne consomme de grandes quantités de fruits à coques directement ou sous forme d'ingrédients dans des préparations traditionnelles préparées pendant les festivités notamment au cours du mois de Ramadan et des festivités (circoncision, mariage...) (**Matmoura et al., 2019**).

Les fruits à coque sont riches en nutriments, donc ils sont très vulnérables et propices à des contaminations par des microorganismes particulièrement les moisissures pendant la croissance, le pré- et la post-récolte. Grâce à un arsenal enzymatique très varié, les moisissures constituent un agent de détérioration très important pour ces aliments.

Au cours de leur développement, ils produisent aussi des métabolites secondaires. Ils peuvent aussi produire un certain nombre de métabolites toxiques, nommées mycotoxines (**El Khoury, 2016**), qui sont des métabolites secondaires de champignons microscopiques qui peuvent se développer sur la plante au champ ou en cours de récolte, transport ou stockage. Ces toxines se trouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses produits alimentaires, notamment les céréales mais aussi les fruits, noix, amandes, graines, ainsi que les aliments composés ou manufacturés provenant de ces matières premières et destinés à l'alimentation humaine ou animale (**Huybrechts et al., 2013**).

L'Algérie est un pays surplombant la Méditerranée, caractérisé par un climat chaud et humide favorisant la croissance des moisissures (champignons microscopiques) et la production des mycotoxines dans les zones côtières abritant environ 75% de la population totale (**Matmoura et al., 2019**).

Malgré les efforts visant à contrôler la contamination fongique, les champignons toxigènes sont partout dans la nature et peuvent contaminer une large gamme de produits agricoles en raison de l'infestation de moisissures avant et après la récolte, là où l'humidité et la température sont suffisantes (**Rahmani et al., 2009**).

De nos jours, la prévention de la contamination fongique dans les denrées alimentaires, en particulier les fruits secs et à coque, est devenu un problème de santé publique (**Alwakeel *et al.*, 2011**).

Dans ce contexte, 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).

Cette étude, repose sur plusieurs points importants :

- Isolement des souches fongiques à partir de différents fruits à coque, commercialisés à Constantine.
- Purification et Identification des isolats obtenus.
- Production des mycotoxines par les différents isolats
- Analyse des mycotoxines élaborées par les différentes souches isolées en utilisant la chromatographie sur couche mince

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les moisissures

1. Généralités

Le terme « moisissure » fait référence à leur texture laineuse, poudreuse ou cotonneuse, que l'on retrouve souvent sur les aliments conservés pendant de longues périodes.

Les moisissures sont des champignons microscopiques à croissance filamenteuse, présents partout et regroupant de nombreuses espèces. 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**).

Les moisissures possèdent une structure végétative qui ne comprend pas de composants traditionnels tels que des tiges, des racines, des feuilles ou un système vasculaire. Ce corps végétatif, connu sous le nom de thalle, est dépourvu de structure filamenteuse formée d'hyphes (**Nasraoui, 2015**). Au sein de différents groupes, le mycélium peut développer divers organes spécialisés dans la reproduction et la dispersion, collectivement appelés spores (**Bourgeois et al., 1989**).

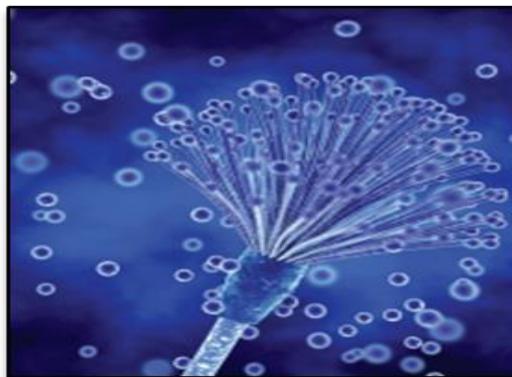


Figure 1 : Photo microscopique de la moisissure. (**Blaizeet et al.,2021**).

2. Cycle de vie

Les moisissures sont des champignons microscopiques à croissance filamenteuse et leur développement comporte trois étapes principales : germination, croissance et sporulation (**Monroy, 2020**).

- Les spores doivent être hydratées pour produire les premiers filaments, ou hyphes, et commencer à s'allonger et à se ramifier.

- Les hyphes ramifiés se développent en absorbant l'eau et la matière organique de la matrice colonisatrice pour former le mycélium, structure qui assure le maintien, la croissance et la reproduction de la moisissure.
- Dans des conditions favorables, le mycélium produit des structures spécialisées telles que des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées (Meheust, 2012 ; Monroy, 2020).

Chaque moisissure produit un grand nombre de spores qui forment une couche généralement poudreuse et colorée à sa surface. Les caractéristiques des spores, telles que la taille, la forme et la couleur, varient d'une espèce à l'autre mais sont souvent constantes au sein d'une même espèce, ce qui facilite l'identification taxonomique par microscopie (Meheust, 2012).

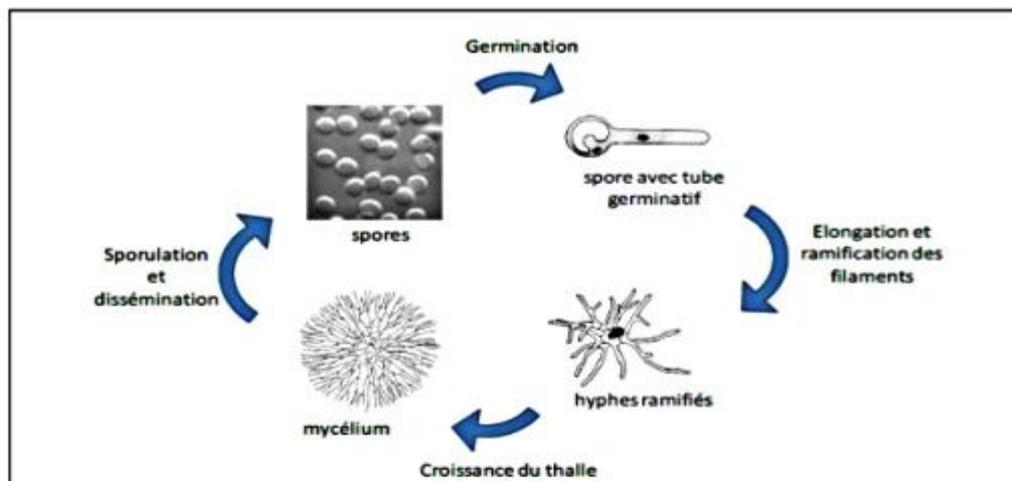


Figure 2 : Cycle de vie des moisissures (Deffontaine, 2015).

3. Mode de reproduction

Le mode de reproduction est un critère très important pour la classification des champignons (Chabasse *et al.*, 2002), selon le mode de production des spores il existe deux types de reproduction : reproduction sexuée (phase téléomorphe) et reproduction asexuée (phase anamorphe) (Boudih, 2011).

a. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée généralement dépend à des conditions de l'environnement, elle est assurée par la formation des spores sexuées qui permettent la dissémination.

La première étape est la plasmogamie se base sur la fusion des cytoplasmes, conduisant à la formation d'un hétérocaryon.

La deuxième étape est une caryogamie qui permet la fusion des deux noyaux ; il y a un stade dicaryotique présent dans le cycle de vie des Basidiomycètes et Ascomycètes et absent chez certains groupes fongiques par exemple les Mucoromycota.

La troisième étape est une méiose succédant à la caryogamie rétablit dans tous les cas d'haploïdie (**Lebreton, 2018**).

b. La reproduction asexuée

Ce type de reproduction est basé sur la dispersion des spores asexuées (sporulation), il existe des formes distinctes de la sporulation :

- La fragmentation : un fragment parent de mycélium se développera en un nouvel organisme.
- Sporulation endogène : les spores produites à l'intérieure du sporocyste (sporocystiospores).
- Sporulation exogène : En continu à l'extrémité des phialides (conidiospores).

Les spores sont déposer sur un nouveaux substrat sous l'effet d'un courant d'air, d'un frôlement ou d'un vent, et germent lorsque les conditions de l'environnement deviennent favorable (**Lecellier, 2013**).

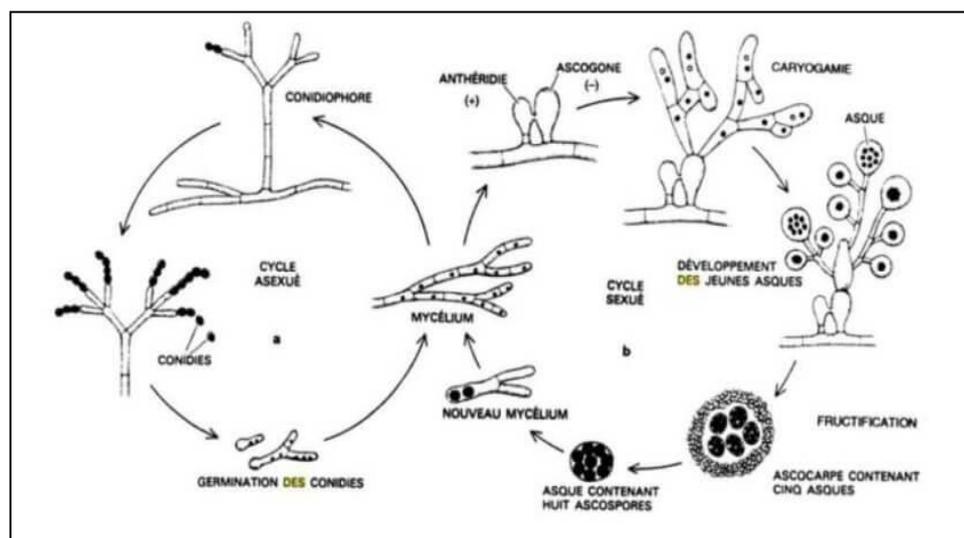


Figure 3 : la reproduction sexuée et asexuée chez les champignons (**Gauthier, 2016**).

4. Conditions de développement des moisissures

4.1. Conditions physico-chimiques

4.1.1. Température

Les champignons sont principalement mésophiles et certains se développent dans des conditions extrêmes. C'est le cas par exemple des champignons dits thermotolérants comme *Aspergillus fischeri* qui peuvent se développer à des températures allant jusqu'à 80°C (Boudih, 2011 ; Monroy, 2020).

Les moisissures ont une capacité remarquable à résister à une large plage de températures. La plupart des moisissures nécessitent une température minimale de 0 à 5 °C pour se développer, tandis que les moisissures trouvées dans les environnements intérieurs ont besoin de températures légèrement plus élevées (5 à 10 °C) pour germer et croître. Il est important de noter que les températures inférieures à la plage minimale affectent principalement la croissance plutôt que la viabilité de la moisissure, car le champignon peut rester inactif pendant de longues périodes.

En termes de température optimale pour la croissance mycélienne, ces espèces préfèrent généralement des températures comprises entre 22 et 35°C. De plus, pendant cette phase de croissance, la température maximale pour les espèces de moisissures les plus couramment isolées dans les espaces intérieurs varie de 35 à 52°C (Boissier ,2003; Monroy, 2020).

4.1.2. Effet du pH

Contrairement à la température, le pH cellulaire n'est pas uniquement influencé par l'environnement. La cellule a la capacité de réguler le passage des ions, notamment des ions hydrogène.

Les moisissures peuvent également altérer le pH de leur environnement en consommant certains ions présents dans le substrat. En général, la croissance fongique est optimale dans des substrats présentant un pH allant d'acide à neutre (entre 4 et 7). Cependant, la gamme de pH permettant la croissance est plus large, avec des valeurs limites allant de 2,2 à 9,6 pour les espèces les plus courantes, tandis que *Penicillium variable* peut tolérer des valeurs limites aussi extrêmes que 1,6 et 11,1(Boissier ,2003).

4.1.3. Activité de l'eau (aw)

La plupart des moisissures se développent dans une plage de valeur d'activité de l'eau (aw) située entre 0,85 et 0,99. Les champignons qui prospèrent dans des environnements à forte humidité sont désignés comme hygrophiles. C'est le cas, par exemple, de *Cladosporium*, *Fusarium* et *Mucorales*. D'autres champignons, qualifiés de xérophiles, ont la capacité de croître à des valeurs d'aw inférieures à 0,85. C'est notamment le cas de certaines espèces fongiques telles que *A. penicillioides* ou *Eurotium herbariorum*. Des études ont démontré que ces deux dernières espèces peuvent se développer à partir d'un aw aussi bas que 0,747 (Boudih, 2011 ; Meheust, 2012).

4.1.4. Composition chimique du substrat

Le développement d'un champignon sur un substrat donné est influencé par des caractéristiques intrinsèques au champignon, telles que sa capacité à produire divers métabolites tels que des enzymes, des pigments et des toxines (Boudih, 2011).

Les propriétés intrinsèques du champignon pour dégrader un substrat, la composition même de ce dernier joue un rôle dans le développement du champignon. La présence d'éléments essentiels aux champignons, comme le carbone ou l'azote, favorise leur croissance. D'un autre côté, les matrices très complexes contenant des inhibiteurs de croissance nuisent également à la prolifération fongique (Boudih, 2011 ; Monroy, 2020).

4.2. Les nutriments

La moisissure peut se développer partout où se trouve de la matière organique. Les microchampignons peuvent sécréter du liquide extracellulaire. Il contient des enzymes hydrolytiques qui décomposent les substrats (polysaccharides, protéines, acides nucléiques, lignine, lipides, etc.) en monomères facilement assimilables par les micro-organismes (Boissier, 2003; Meheust, 2012).

Les besoins nutritionnels requis sont divisés en deux catégories :

- Les nutriments essentiels comprennent le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, le phosphore, le potassium, l'azote, le soufre et le magnésium à des concentrations d'environ 10 mol/l. Le carbone, combiné à l'hydrogène, à l'oxygène et à l'azote, est le principal élément structurel des organismes vivants. L'hydrogène provient de l'eau du milieu et l'oxygène de l'atmosphère.

- Les micronutriments, notamment le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, nécessitent des concentrations ne dépassant pas 10 mol/l.

Certains sont des cofacteurs nécessaires au fonctionnement enzymatique normal des cellules. Ces micro-organismes ont également besoin de vitamines telles que la thiamine (B1), la biotine (B7), l'inositol (C₁₆H₁₂O₆) (**Boissier, 2003**).

5. Mode de vie des moisissures

Les champignons, ou les moisissures pour être plus précis, se distinguent du règne végétal en raison de leur manque de chloroplaste (chlorophylle), essentiel à la production de matière organique nécessaire à la subsistance des plantes. Ils ont ainsi développé trois méthodes distinctes pour obtenir de la matière organique (élément vital pour leur survie), directement à partir du milieu environnant (**Oei et van Nieuwenhijzen, 2005**).

5.1. Le saprophytisme

Le concept de saprophytisme, dérivé des mots grecs signifiant pourriture et plante, est désigné par les termes « sapos » et « phyton » (**Kachour, 2005**). Les grands nettoyeurs de la nature sont les champignons saprophytes, qui consomment des matières végétales (feuilles et débris végétaux) ou animales décédées (cadavres), constituant la majorité des macro champignons (**Senn-Irlet et al., 2012**). Leur fonction cruciale consiste à décomposer la matière organique en substances minérales.

5.2. Le parasitisme

Le parasitisme (dérivé des mots grecs « par » et « nourriture ») est un autre aspect à considérer (**Kachour, 2005**).

Le parasitisme est une interaction biologique où un organisme, qu'il soit animal ou végétal, profite (en se nourrissant, en s'abritant ou en se reproduisant) aux dépens d'un ou plusieurs autres organismes, entraînant divers effets tels que les mycoses, la rouille, l'oïdium et l'anthracnose (**Cassier et al., 1998 ; Combes, 2001**).

5.3. La symbiose Selon (**Kachour, 2005**).

La symbiose est une association étroite et durable entre les organismes d'espèces variées, s'étendant potentiellement sur différents règnes, vivant en équilibre les uns avec les autres et

tirant les bénéfices mutuels de cette union, tout en conservant la capacité de vivre de manière indépendante.

→ **Les lichens** : se forment grâce au partenariat de champignons (principalement du phylum Ascomycota) et de cyanobactéries. Les algues, possédant la capacité de subir la photosynthèse, fournissent au champignon des composés organiques carbonés, tandis que le champignon fournira aux algues des éléments minéraux essentiels.

→ **Les mycorhizes** : sont constituées d'une association entre un champignon et la racine d'une plante. Les mycorhizes constituent la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire. On estime que 90% des végétaux contractent spontanément cette association. Les champignons forment un réseau de filaments mycéliens à partir des racines, contribuant ainsi à la nutrition minérale des plantes. C'est d'ailleurs une association symbiotique qui aurait permis aux plantes de coloniser le milieu terrestre (Nasraoui, 2006).

Chapitre 2 : Les Mycotoxines

1. Définition

Les mycotoxines sont des métabolites fongiques secondaires de petite taille, de nature chimique ou biologique (**Patricia et al., 2006 ; Turner et al., 2009**).

Ces métabolites présents dans les aliments en quantités suffisamment élevées comme les noix, les céréales et les fruits. Ce qui permet d'avoir des effets toxiques (pour l'homme et l'animal) chroniques, tératogènes et mutagènes... (**Patricia et al., 2006 ; Huybrechts et al., 2013**).

Il existe des milliers de mycotoxines, mais seules quelques-unes présentent des défis importants en matière de sécurité alimentaire (**Patricia et al., 2006**) sont les suivants : les aflatoxines, les ochratoxines A, les fumonisines, les zéaralénone, la patuline, et la désoxynivalénone... (**Huybrechts et al., 2013**).

La production des mycotoxines dépend des conditions environnementales telles que la température optimale et l'activité de l'eau au champ et pendant le stockage. Lorsque la flore fongique naturelle associée aux aliments est dominée par *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* comme des genres ubiquitaires (**Patricia et al., 2006 ; Lahouar, 2016**).

L'envahissement des mycotoxines au corps se fait par deux manières :

- ✓ La voie primaire : par la consommation directe des aliments contaminés par les mycotoxines.
- ✓ La voie secondaire : par le biais des aliments d'origine animale provenant d'animaux exposés (**Lahouar, 2016**).

Le diagnostic des mycotoxicoses peut s'avérer difficile en raison de la similitude des signes de la maladie avec ceux provoqués par d'autres agents, et dépend de tests adéquats pour les mycotoxines impliquant l'échantillonnage, la préparation et l'analyse des échantillons (**Richard, 2007**).

Sur le marché, les mycotoxines peuvent constituer un obstacle au commerce international, ce qui conduit à une réglementation accrue des denrées alimentaires et des aliments pour animaux qui peuvent en contenir et au retrait du marché des produits ne respectant pas les limites réglementaires (**Patricia et al., 2006**).

2. Biosynthèse

Les mycotoxines sont synthétisées pendant la phase idiopathique, c'est-à-dire après la phase active de multiplication cellulaire (trophophase) ; l'hypothèse la plus probable est qu'en fin de prolifération les cellules fongiques sont épuisées en alcalis non utilisés. Les précurseurs sexuels conduisent à la lyse cellulaire. En conséquence, les cellules parviennent à modifier leur métabolisme, conduisant à la synthèse de « produits de détoxification cellulaire » (**Krska et al., 2012**).

3. Nature chimique

Généralement les mycotoxines sont très diverses entre eux au niveau chimique et structurale, et synthétisées par simples réactions à partir de certaines molécules tel que pyruvates, acétates..., ce qui permet de la diversité de leur effets toxiques (**Turner et al., 2009**).

Ces toxines fongiques ne sont pas immunogènes, très stable à la chaleur et dans les milieux alcalins et acide, ainsi que leur résistance au traitement thermique (**Gauthier, 2016**).

Les mycotoxines forment des groupes chimiques différents, certaines sont des dérivés des acides aminés caractérisés par la présence des groupes -COOH et -NH comme l'acide Aspergillique, les alcaloïdes de l'ergot du seigle, la Roquefortine, l'Acide cyclopiazonique, la Tryptoquivaline, la Gliotoxine, etc. d'autres sont des polycétoacides (nécessaires pour l'énergie) comme ochratoxine, aflatoxines, patuline, acide pénicillique, citrinine, stérigmatocystine et zéaraléon. Il existe aussi des dérivés des terpènes d'origine végétale par exemple : T2, le DON, la Fusarénone et les Roridines (**Nguyen Minh Tri, 2007 ; Gauthier, 2016**).

4. Les principales mycotoxines

4.1. Aflatoxine

La présence de mycotoxines a été révélée par l'épidémie de maladie X de la dinde en Grande-Bretagne au début des années 1960. L'aflatoxine a été isolée de la farine d'arachide, couramment consommée par la volaille et contaminée par des souches d'*Aspergillus* (**Abbott, 2002; Gauthier, 2016**).

Les aflatoxines sont les mycotoxines les plus connues et restent l'un des cancérigènes naturels les plus puissants connus de l'homme. Les aflatoxines sont des substances cancérigènes du foie (hépatocarcinogènes) (Abbott, 2002).

Le principal champignon producteur d'aflatoxines est *Aspergillus flavus* (Christensen et al., 1988 ;Krska et al., 2012 ; Gauthier, 2016).

Cependant, un autre champignon, *Aspergillus parasiticus*, ainsi que d'autres espèces mineures d'*Aspergillus*, peuvent également produire ces toxines. *Aspergillus parasiticus* est particulièrement important dans les arachides. Toutes les souches d'une espèce donnée ne sont pas capables de produire des aflatoxines (Abbott, 2002;Krska et al., 2012).

Elles sont principalement composées d'aflatoxine B1, d'aflatoxine B2, d'aflatoxine G1, d'aflatoxine G2 et d'aflatoxine M1, qui doit leur nom à leurs propriétés de fluorescence inhérentes (Krska et al., 2012 ; Gauthier, 2016).

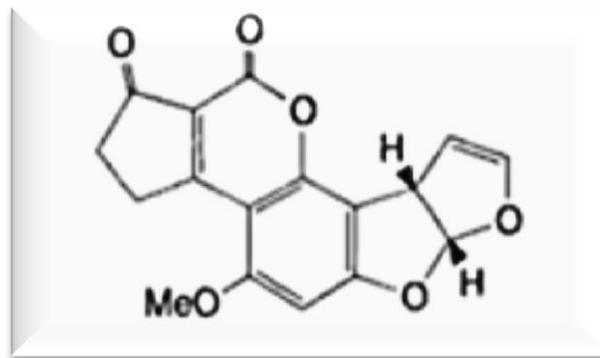


Figure 4 : Structure chimique d'Aflatoxine B1 (Gauthier, 2016)

4.2.L'Ochratoxine A

C'est le mycotoxine majeure dans le groupe des Ochratoxines, produite principalement par deux genres *Aspergillus* (*A.ochraceus*, *A.niger*...) et *Penicillium* (*P.verrucosum*...). L'ochratoxine a été considérée comme étant produite dans des conditions de stockage favorisant la croissance de moisissures ainsi que au cours de leur développement au champ (Richard,2007).

L'ochratoxine A est un composé fluorescent de masse molaire 403,08 g/mole, leur point de fusion est 169 C° lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène, mais entre 94 C° et 96 C° dans le benzène. Il existe des dérivées d'OTA comme l'OTB et l'OTC qui sont différent structurellement (Richard, 2007 ; Nguyen Minh Tri, 2007).

Les Ochratoxines sont présentes dans les céréales, le café, le raisin, les produits à base de soja ainsi que dans les produits alimentaires d'origine animale dans de nombreux pays (Peraica *et al.*, 1999 ; Richard, 2007).

L'OTA peut avoir des effets néphrotoxique causale de la néphropathie qui est une maladie rénale chez l'homme. Cette maladie mortelle touche les populations rurales de Roumanie, Croatie et Yougoslavie... les principales caractéristiques de la néphropathie sont des lésions bilatérales, chronique et du cortex rénal. En plus des effets immunosuppressive, tératogènes et cancérigènes chez les animaux testés comme les souris, les rats et le porc... (Peraica *et al.*, 1999 ; Nguyen Minh Tri, 2007 ; Richard, 2007).

La présence des Ochratoxines dans les poussières et dans les autres particules en suspension dans l'air jouer un rôle important dans les maladies humaines, d'ailleurs le CIRC a été classé l'OTA comme un composé cancérigène pour l'homme (Peraica *et al.*, 1999 ; Richard, 2007).

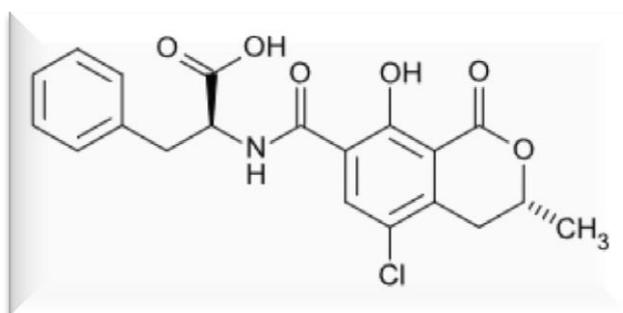


Figure 5 : la structure chimique d'Ochratoxine A (Lahouar, 2016).

4.3. Trichothécènes

Le groupe des Trichothécènes (TCT) a suscité une attention considérable après la Seconde Guerre mondiale en raison de soupçons concernant leur implication dans des incidents de guerre chimique en Iran et en Afghanistan (Gauthier, 2016).

Les mycotoxines connues sous le nom de TCT sont principalement synthétisées par divers champignons, notamment *Fusarium* (Bennett et Klich, 2003; Gauthier, 2016), *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* et d'autres genres apparentés (Bennett et Klich, 2003).

Les types courants de TCT comprennent le déoxynivalénole (DON), également connu sous le nom de vomitoxine, le nivalénole (NIV), le diacétoxyscirpénole (DAS), la toxine T-2 et la toxine HT-2 (Gauthier, 2016).

Il existe quatre catégories distinctes dans la classification des TCT :

- Le groupe A englobe les TCT dépourvus de fonction cétonique en position C. Les principaux exemples incluent la toxine T-2, la toxine HT-2 et le DAS. Parmi celles-ci, la toxine T-2 est largement considérée comme la plus puissante et la plus toxique (Bennett et Klich, 2003; Richard, 2007; Gauthier, 2016).
- Le groupe B comprend les TCT qui possèdent une fonction cétone en position C. Parmi les plus répandus figurent le déoxynivalénole (DON), le nivalénole (NIV) et la Fusarenone-X (F-X) (Bennett et Klich, 2003; Richard, 2007; Gauthier, 2016).
- D'autre part, le groupe C comprend les TCT qui comportent un deuxième époxyde en position C, illustré par la Crotochine (Gauthier, 2016).
- Au sein du groupe D, il existe des TCT qui possèdent un macrocycle supplémentaire en position Ca-Cas. Les TCT répandus dans ce groupe comprennent les verrucarines, les roridines et les satratoxines (Gauthier, 2016).

Les toxines les plus répandues dans les aliments sont les groupes A et B. Cependant, lorsqu'il s'agit d'exposition aux toxines C et D, il est plus courant de les rencontrer par la peau et les voies respiratoires (Gauthier, 2016).

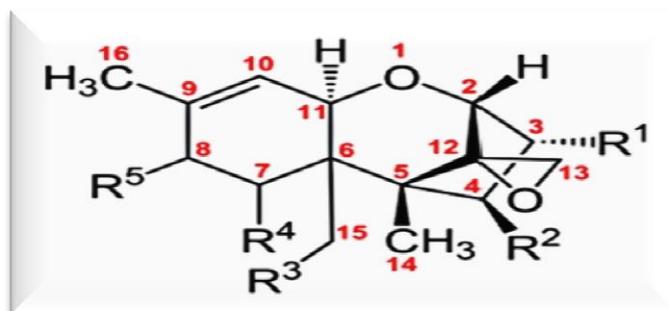


Figure 6 : Structure chimique générale des Trichothécènes (Gauthier, 2016).

4.4.Zéaralénone

La Zéaralénone appelé aussi F-2 est une mycotoxine amyco-oestrogène, produite par le genre *Fusarium* (*Fusarium graminearum*) présente dans le maïs, le blé, le sorgho et les aliments composés (Peraica et al.,1999 ; Patricia et al.,2006).

La ZEA est un composé cristallin de masse molaire 318,4 g/mol, résiste à des températures élevées, des traitements thermiques et caractérisée par une hydrolyse dans les milieux alcalins. Elle est soluble dans certains solvants tels que l'acétonitrile, chloroforme, le benzène, etc (Gauthier, 2016).

La ZEA et ses dérivés L' α -zéaralénol et le β -zéaralénol, produisent des effets oestrogéniques chez diverses espèces animales comme l'œdème vulvaire, l'infertilité, prolapsus vaginal et hypertrophie des glandes mammaires chez les femelles. Cependant, L' α -zéaralénol a une capacité oestrogénique élevée par trois fois que de Zéaralénone (Peraica *et al.*, 1999 ; Patricia *et al.*, 2006 ; Gauthier, 2016).

Cette mycotoxine a été trouvée dans le sang d'enfants ayant un développement sexuel précoce exposés à des aliments contaminés, et classée par l'IARC comme un agent cancérigène de groupe 3 (Peraica *et al.*, 1999 ; Lahouar, 2016).

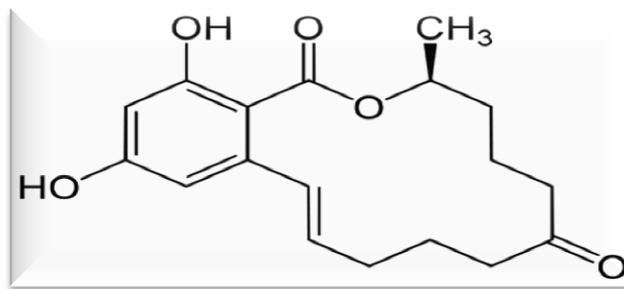


Figure 7 : la structure chimique de Zéaralénone (Lahouar, 2016).

4.5. Fumonisines

Les fumonisines sont un groupe de mycotoxines non fluorescentes (Richard, 2007 ; Krska *et al.*, 2012; Gauthier, 2016). Ils ont été découverts en Afrique du Sud en 1988 (Bennett et Klich, 2003 ; Krska *et al.*, 2012; Gauthier, 2016).

Les fumonisines sont un groupe de toxines, principalement FB1, FB2 et FB3 (Richard, 2007 ; Krska *et al.*, 2012). Les fumonisines les plus courantes sont les fumonisines du groupe B₁ (F B₁) (Bennett et Klich, 2003; Gauthier, 2016).

Produite par plusieurs espèces de *Fusarium*, composées principalement de *Fusarium verticillioides* et de *Fusarium proliferant* (Bennett et Klich, 2003 ; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Richard, 2007 ; Krska *et al.*, 2012; Gauthier, 2016), cette dernière est une moisissure endophyte, c'est-à-dire qu'elle peut coloniser les plantes sans produire de signes

évidents. Ainsi, les plantes peuvent être contaminées mais paraître saines (Gauthier, 2016), et *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. (Bennett et Klich, 2003). Les souches varient dans leur capacité à produire des toxines (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ;Richard, 2007).

Le maïs est le principal produit touché par ce groupe de toxines, bien que cette maladie ait également été constatée dans le sorgho, le riz, les épis de maïs et les céréales (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ;Richard, 2007 ;Krska *et al.*, 2012).

Le Centre international de recherche sur le cancer a évalué le risque de cancer des fumonisines chez l'homme et les a classés dans le groupe B2 (éventuellement cancérigènes) (Bennett et Klich, 2003). Il apparaît que certaines fumonisines pourraient favoriser le développement du cancer de l'œsophage chez l'homme (Bennett et Klich, 2003 ;Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Krska *et al.*, 2012).

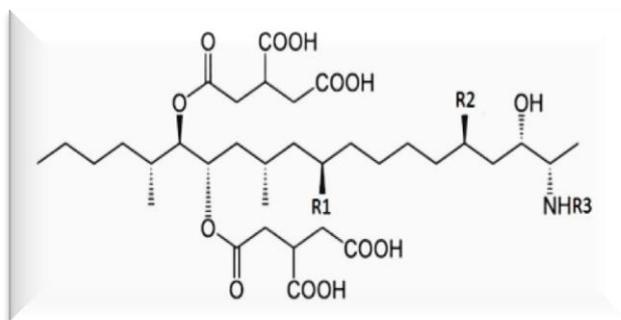


Figure 8 : Structure chimique générale des Fumonisinolones (Gauthier, 2016).

4.6. Patuline

La patuline est une mycotoxine métabolisée principalement par *Aspergillus* et *Penicillium* (Gauthier, 2016), 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).

C'est une molécule incolore de poids moléculaire très faible (154,1 g/mol) hautement polaire, ce qui justifie la présence de nombreux défis analytiques pour sa détection. Elle est soluble dans l'eau et certains solvants organiques, stable à haute température et au cours de traitement thermique.

En outre, la PAT a des effets néfastes sur la santé comme l'hépatotoxicité, l'altération gastro-intestinale et l'immunotoxicité qui peut être très grave (Gauthier, 2016 ; Vidal *et al.*, 2019).

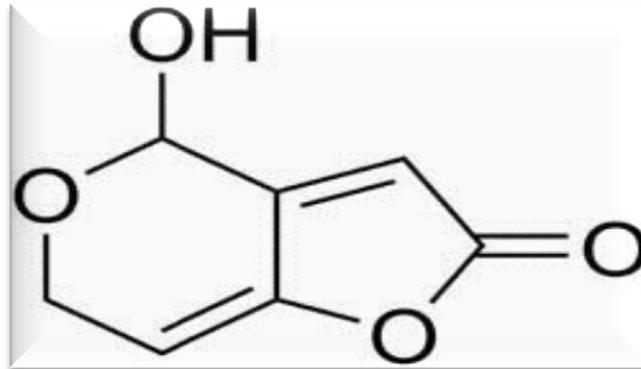


Figure 9 : la structure chimique de Patuline (Gauthier, 2016).

5. La mycotoxinogénèse

La synthèse et la sécrétion de toxines fongiques, appelées mycotoxinogénèse, se produisent dans des conditions environnementales spécifiques. La production de toxines est étroitement liée au développement des champignons. Cependant, les exigences liées à la mycotoxinogénèse sont plus limitées que celles nécessaires à la croissance fongique (Royer et TAP, 2003 ; Gauthier, 2016).

Il est important de noter que la simple identification d'un type particulier de moisissure sur une surface ne garantit pas la présence d'une mycotoxine sur cette surface spécifique. À l'inverse, l'absence de moisissure sur un aliment n'indique pas automatiquement qu'il est exempt de mycotoxines (Gauthier, 2016).

L'émergence de toxines fongiques dans un environnement est un processus à multiples facettes, car une même espèce de moisissure peut produire diverses substances en fonction des conditions environnantes (Gauthier, 2016).

Parmi les différentes toxines pouvant être sécrétées par *Aspergillus flavus*, on retrouve les aflatoxines, l'acide cyclopiazonique (CPA) et l'acide kojique. À l'inverse, *Penicillium verrucosum* et *Aspergillus ochraceus* sont des espèces de moisissures différentes qui peuvent produire la même toxine, l'ochratoxine A (Gauthier, 2016).

5.1. Les Champignons toxinogènes

Des champignons ont la capacité de produire les mycotoxines et responsable pour la détérioration des aliments (**Tantaoui-Elaraki et al., 1994**). Alors, il y a des moisissures toxinogènes envahissant leurs substrat et produisant la mycotoxine sur des plantes stressés (mycotoxine de champs), et quelques d'autre accumulent les mycotoxines après la récolte (mycotoxine de stockage). Il existe des champignons de débris de plantes ou du sol peuvent disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage dans les conditions favorables (**Afssa, 2006**).

5.1.1. Le Genre *Penicillium*

Il existe environ 150 jusqu'à 300 espèces de genre *Penicillium* (**Gauthier, 2016**), réparties en quatre sous-genres appartenant à le groupe des Deutéromycètes. Les formes téléomorphes de certaines d'entre elles sont connues et appartiennent à l'embranchement des Ascomycètes dont les genres les plus représentatifs sont *Eupenicillium* et *Talaromyces* (**Pitt, 1987**). L'aspect des colonies peut être poudreux ou duveteux de couleurs variés (blanche, vert-de-gris...) (**Gauthier, 2016**). Concernant la micromorphologie, les individus du genre *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau (*Penicillius* en latin) (**Botton et al., 1990**). Possède des hyphes cloisonnées portent les conidiophores, ces dernières sont ramifier ou simple (**Chabasse et al., 2002**), se terminant par un pénicille. Les conidiophores peuvent être groupés en faisceaux lâches ou rassemblés en corémies (colonne de conidiophores). Les phialides (cellules conidiogènes) sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiospores (**Botton et al., 1990**).

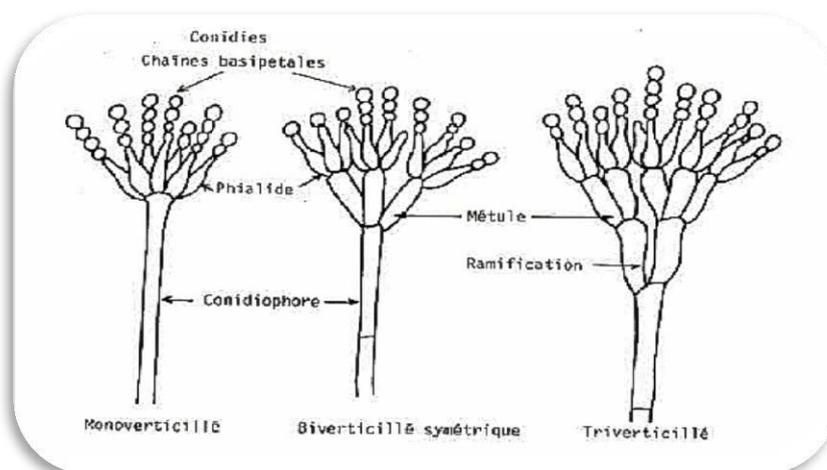


Figure 10 : les caractères morphologiques de genre *Penicillium* (**Tabuc, 2007**).

Les espèces appartenant au genre *Penicillium* produisent un certain nombre de mycotoxines, le Tableau 1 représente quelques toxines produites par le genre *Penicillium*.

Tableau 1 : les toxines produites par le genre *Penicillium* (Gauthier, 2016).

Espèces	Toxines produites
<i>Penicillium nordicum</i>	Ochratoxine A
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Roquefortine C, Acide cyclopiazonique
<i>Penicillium roqueforti</i>	Acide pénicillique, Roquefortine C
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinine

5.1.2. Le genre *Aspergillus*

Comme le genre *Penicillium*, les *Aspergillus* appartenant à le groupe des Deutéromycètes, certaines formes sexuées d'*Aspergillus spp* sont connues et appartiennent à la division des Ascomycètes, dont les genres les plus notables sont *Eurotium* et *Emericella*.

Environ 180 espèces, réparties en 18 groupes, composent le genre *Aspergillus* (Gams *et al.*, 1986). *Aspergillus spp*, caractérisées par des colonies poudreuses ou duveteuses, à croissance rapide, sont le plus souvent de couleurs variées. L'appareil végétatif d'*Aspergillus spp* est formé de filaments mycéliens septés et ramifiés. Se dressent sur ces filaments végétatifs les conidiophores qui se terminent par une vésicule de forme variable. La forme et la taille de cette vésicule sont spécifiques de l'espèce en question. La tête peut être unisériée lorsque les phialides sont insérées directement sur la vésicule, mais bisériées si les cellules conidiogènes sont précédées de métules. L'ensemble phialides/métules forme le stérigmate. les spores, la vésicule et le stérigmate constituent la « tête aspergillaire » (Figure11). Les spores sont insérées en chaîne sur les phialides. Elles sont unicellulaires, très variables en taille, en couleur, en forme (elliptique ou globuleuse) et ornementation (Raper et Fennel, 1965 ; Samson *et al.*, 2014).

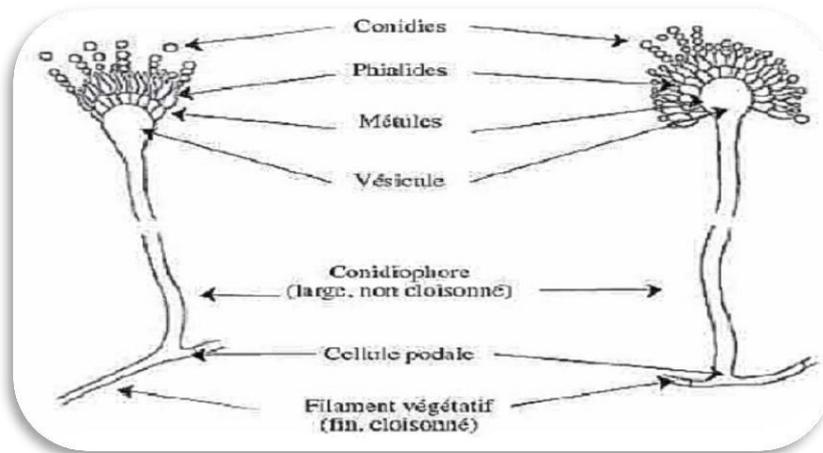


Figure 11 : l'appareil reproducteur des *Aspergillus* (Chabasse *et al.*, 2002).

Les espèces appartenant au genre *Aspergillus* produisent un certain nombre de mycotoxines, le Tableau si dessous (Tableau 2) représente quelques toxines produites par le genre *Aspergillus*.

Tableau 2 : les toxines produites par le genre *Aspergillus* (Gauthier, 2016).

Espèces	Toxines produites
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1 et B2, Acide aspergillique Acide cyclopiazonique, Acide kojique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavine, Fumagiline, Fumitoxine Fumitremorgine A et C, Gliotoxine
<i>Aspergillus clavatus</i>	Acide kojique, Patuline, Xanthocilline
<i>Aspergillus carneus</i>	Citrinine
<i>Aspergillus niger</i>	Malformine, Naftoquinone
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Acide kojique, Ochratoxines, Acide pénicillique, Acide sécalonique A
<i>Aspergillus oryzae</i>	Acide cyclopiazonique, Acide kojique

5.1.3. Le Genre *Fusarium*

Des champignons filamenteux de groupe des Deutéromycètes, comprend entre 50 et 100 espèces (Gauthier, 2016). Certaines de forme anamorphe et quelques d'autre téléomorphe ou de forme parfait (Lahouar, 2016).

La vitesse de croissance des *Fusarium* est rapide, sont cultivées généralement dans différents régions (tempérés, tropicales, désertiques). L'aspect de leurs colonies cotonneuses de couleur : blanche, crème, brune, violet... (Gauthier, 2016). Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (Figure 12) (Messiaen et Cassini, 1968). Les *Fusarium* sont caractérisés par trois types de spores :

- ✓ Les macroconidies, qui sont des spores de grandes taille, pluricellulaires sous forme d'un fuseau (exemple : *Fusarium graminearum*).
- ✓ Les microconidies, petites spores unicellulaires ou bicellulaires de formes différents cylindrique, fusiforme, ovoïdes, etc. (exemple : *Fusarium verticillioides*)
- ✓ Les chlamydoconidies, des spores de résistances, mais ne sont pas présentent chez tous les espèces (Gauthier, 2016).

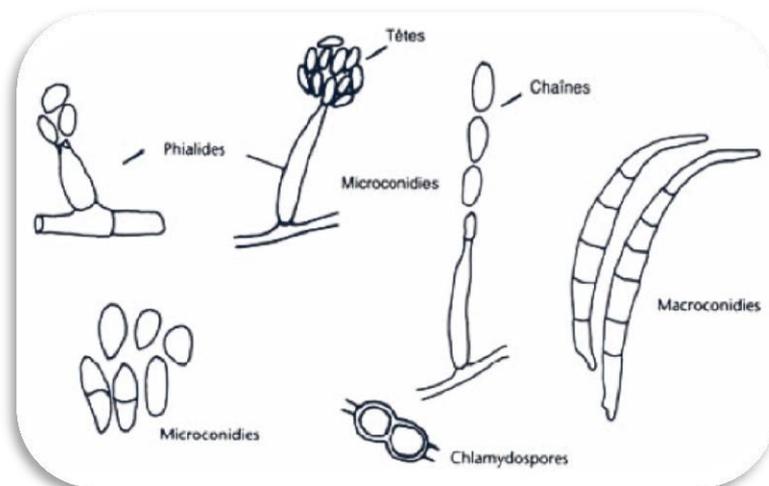


Figure 12 : l'aspect microscopique des conidies de *Fusarium* (Lahouar, 2016).

Les espèces appartenant au genre *Fusarium* produisent un certain nombre de mycotoxines, le tableau ci-dessous (Tableau 3) représente quelques toxines produites par le genre *Fusarium*.

Tableau 3 : les toxines produites par le genre *Fusarium* (Gauthier, 2016).

Espèces	Toxines produites
<i>Fusarium graminearum</i>	Zéaralénone, Trichothécènes B
<i>Fusarium culmorum</i>	Zéaralénone, Culmorine, Fusarine C, Trichothécènes B
<i>Fusarium oxysporum</i>	Acide fusarique, Moniliformine, Oxysporine
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Trichothécènes A, Zéaralénone, Fusarine C
<i>Fusarium verticillioides</i>	Moniliformine, Naftoquinone, Gibberelines

5.2. Facteurs influençant la production des mycotoxines

Les conditions optimales de production de toxines dépendent de la combinaison de facteurs qui conduisent à l'imprégnation des mycotoxines dans les aliments : on peut distinguer les facteurs induits liés à la souche fongique elle-même et les facteurs extrinsèques constitués de l'ensemble des conditions écologiques.

5.2.1. Facteurs intrinsèques

Les facteurs liés à la souche, notamment son taux de croissance, sa capacité à se propager, la dispersion des spores et la longévité des spores, contribuent tous au risque d'infection fongique. Ces facteurs jouent également un rôle dans la production de toxines au sein d'un environnement particulier (Gauthier, 2016).

Différents types de mycotoxines peuvent être générés par certaines espèces, notamment *Aspergillus flavus*, capable de produire des aflatoxines, de l'acide cyclopiazonique (CPA) et de l'aspertoxine. Il est à noter qu'une même mycotoxine peut être produite par différentes espèces voire par deux genres distincts, comme l'ochratoxine A, qui peut être produite à la fois par *Aspergillus* et *Penicillium* (Royer et TAP, 2003 ; Mitchell *et al.*, 2004).

5.2.2. Facteurs extrinsèques

Les facteurs extrinsèques représentent tous les conditions environnementales d'origine chimique (pH, composition gazeuse, substrat), physique (température, l'activité de l'eau) ou biologiques (Gauthier, 2016 ; Lahouar, 2016).

❖ pH

Les moisissures peuvent se développer à des valeurs de pH confiné entre 3 et 8, mais l'optimal est entre 5 et 6. Alors que, *Fusarium proliferatum* développe à pH= 5.6 et produit la Fumonisine B1 à pH= 3.7 (**Gauthier, 2016**).

❖ Compositions gazeuse

Lorsque la teneur en O₂ est réduite, et la teneur en CO₂ augmente, la production des mycotoxines (toxino-génèse) diminue. (Comme le cas d'aflatoxine produit dans l'arachide) (**Nguyen Minh Tri, 2007**).

❖ Substrat

Les moisissures préfèrent les aliments (substrats) qui contiennent les sucres (source de carbone), et certaines substances comme les acides aminées et le saccharose, qui stimulent la croissance des moisissures et élaborent les mycotoxines. La présence de certaines molécules dans le substrat peut influencer la production des mycotoxines. Par exemple l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* (**Lahouar, 2016**).

❖ Température

La température de croissance de la majorité des moisissures est entre 0°C et 35°C. Tandis que certaines espèces ont la capacité de se développer à des températures extrêmes (*A. fumigatus* à 60°C et *Cladosporium herbarum* inférieures à 0°C) (**Nguyen Minh Tri, 2007**). La température optimale pour la production des mycotoxines dépend de la température optimale de croissance mais, le plus souvent, légèrement inférieure comme le cas des aflatoxines synthétisées par *A. flavus* (**Lahouar, 2016**).

❖ Aw

L'activité de l'eau reflète la quantité d'eau disponible dans une substance solide ou liquide, sa valeur est confinée entre 0 et 1 (**Gauthier, 2016**). L'aw optimal pour la croissance des moisissures est de 0,85 à 0,99. Mais la majorité des champignons contaminants les céréales capables de croître à aw = 0.7 (**Nguyen Minh Tri, 2007**).

6. Les moisissures et les mycotoxines dans la chaîne alimentaire

Les moisissures ont des effets bénéfiques et néfastes dans divers domaines dont l'agriculture, la biotechnologie, l'environnement et la santé, mais peuvent également causer des dégâts importants, notamment en agronomie (Atoui, 2006).

Certaines sont utilisées dans l'alimentation, comme *Penicillium roquefortii* et *P. camembertii* pour la production de fromages, d'autres sont utilisées pour la production d'enzymes (telles que la protéase et pectinase produites par *A. niger*), de produits pharmaceutiques (*P. chrysogenum* produit de la pénicilline). Cependant, leur présence indésirable dans les produits alimentaires peut entraîner des changements d'apparence, des odeurs de moisi et une réduction de la valeur nutritionnelle et du rendement (Atoui, 2006).

Les métabolites produits par ces champignons lorsqu'ils se développent sur les aliments peuvent altérer leur qualité sensorielle et créer des problèmes de santé, notamment un risque d'intoxication aux mycotoxines (Atoui, 2006).

Les mycotoxines peuvent être absorbées par les poussières et se propager sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organiques. Dans divers contextes, notamment l'agriculture, l'industrie et même à l'intérieur, l'inhalation de spores et de fragments fongiques peut provoquer ou aggraver des réactions immunitaires et allergiques, produire des effets toxiques ou provoquer une infection (Miller, 1992; Jarvis et Miller, 2005).

La production de mycotoxines est un processus complexe qui peut se produire à différentes étapes, notamment sur le terrain, avant et après la récolte, le transport, le stockage ou pendant la transformation des aliments. Cette méthode de production est particulièrement appréciée lorsque les aliments sont destinés à une consommation durable et doivent être stockés sur de longues distances (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

Il convient de noter que la présence de mycotoxines ne signifie pas nécessairement que les aliments sont contaminés par des moisissures. Cependant, les mycotoxines peuvent pénétrer dans la chaîne alimentaire humaine par différentes voies, notamment via la consommation directe d'aliments contaminés (cacahuètes, pistaches, amandes...) ou indirectement via des produits dérivés (farines de céréales par exemple). Étant donné que les mycotoxines sont difficiles à métaboliser par les organismes, elles peuvent également être

transmises par les produits d'origine animale si les animaux consomment des aliments contaminés (Atoui, 2006).

Chapitre 3 : Les fruits à coque

1. Généralités

Les fruits à coque, également connues sous le nom de noix, constituent un aliment de base de l'alimentation humaine depuis d'innombrables années. Ils sont classés comme leur propre groupe alimentaire distinct. D'un point de vue botanique, une noix est essentiellement un fruit séché contenant une seule (parfois deux) graines, entourée d'une paroi ovarienne dure et ligneuse à pleine maturité (Figure 13). Cependant, dans l'usage courant, le terme « noix » est souvent utilisé pour décrire tout noyau huileux de grande taille enfermé dans une coque qui est consommé comme aliment. Cela comprend les amandes, les noix du Brésil, les noix de cajou, les noisettes, les arachides, les pistaches et les noix. Bien que les arachides soient classées dans la catégorie des légumineuses, elles sont généralement regroupées avec les noix en raison de leur composition nutritionnelle similaire et de leurs bienfaits cardiovasculaires établis (Rojas *et al.*, 2005 ; Juchet *et al.*, 2013).



Figure 13 : fruits à coque (noix)

(https://fr.123rf.com/photo_13503792_arachides-noix-de-cajou-pistaches-amandes-noix-noix-du-br%C3%A9sil-et-les-noisettes-sur-un-fond-blanc.html). Consulté le 12 mai 2024.

1.1. L'arachide

L'arachide ou cacahuète (*Arachis hypogea* L) (Figure 14), appartient à la famille des légumineuses et est une plante annuelle cultivée sur plus de 19 millions d'hectares dans les régions tropicales et subtropicales du monde ainsi que dans les régions tempérées les plus chaudes (Knoden *et al.*, 2003).

Bien que taxonomiquement membre de la famille des légumineuses, et tout comme ses similitudes visuelles, les arachides sont plus proches des noix dans leur profil de macronutriments. En effet, les cacahuètes, comme les autres légumineuses, possèdent une

quantité importante de protéines ; cependant, ils contiennent également une quantité notable de matières grasses et une quantité minimale de sucre, ressemblant au profil nutritionnel de la plupart des noix (**Basse, 2020**).



Figure 14 : L'arachide avec et sans coque .

<https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/medecine-allergie-arachides-nouveau-traitement-semble-efficace-49446/>. Consulté le 12 mai 2024

1.2. Les amandes

Les amandes (Figure 15) sont parmi les fruits à coque les plus riches en nutriments, ils constituent les acides gras essentiels, les vitamines et les minéraux, ainsi que les amandes crues qui sont des principales sources végétales de protéines (**Gmitter et al., 2009**). Elle est originaire d'Asie Occidentale, des régions d'Iran et d'Afghanistan (**Yada, Lapsley et al., 2011**).

L'amande est l'un des noix les plus importants en termes de la production mondiale d'amandes (**Karci, 2023**), où la production annuelle estimée dépasse les trois millions de tonnes (**Roncero et al., 2020**).



Figure 15 : L'amande avec et sans coque

<https://www.gerbeaud.com/fruit-legume-de-saison/amande.php>. Consulté le 12 mai 2024.

1.3. Les noix

Les noix (Figure 16) sont les fruits du noyer du genre « *Juglans L* » et de la famille « juglandacées » (Bernard, 2020).

Les noix, principale source d'huile comestible naturelle, sont généralement dérivées de plantes et sont protégées par une enveloppe extérieure durable. Ces coquilles servent de barrière protectrice pour le réservoir abondant de nutriments essentiels tels que les protéines, les minéraux, les vitamines et les acides gras essentiels qu'ils contiennent (Sheorey *et al.*, 2011).



Figure 16 : La noix avec et sans coque .

(<https://www.jardinet.fr/blog/tout-savoir-sur-le-noyer>). Consulté le 12 mai 2024

2. Caractéristiques des fruits secs

Les fruits secs tel que : les arachides, les amandes et les noix sont riches en nutriments, chacun à une composition spécifique (Souza, Gomes *et al.*, 2015) comme reporté au Tableau 4.

Tableau 4 : la composition nutritive des arachides, amandes et noix (Souza, Gomes et al.,2015).

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

3. Stockage des fruits à coque

Les mycotoxines peuvent être présentes dans les fruits à coque et les produits à base de fruits secs. Leur rendement dépend du type et de la variété des fruits, de la situation géographique où les fruits sont cultivés et récoltés, du climat, du traitement avant récolte, des méthodes de récolte, du traitement après récolte et des conditions de stockage. Ils s'accumulent dans les produits fruitiers au champ, pendant et après la récolte et pendant le stockage (Jackson, Altach, 2007).

La plupart des aliments ont des propriétés chimiques et/ou physiques qui permettent une altération fongique ou microbienne. Les fruits sont plus sensibles à l'altération fongique que microbienne en raison de leur activité élevée en eau et de leur teneur en sucre, ainsi que de la

présence d'acides organiques, qui contribuent à faire baisser le pH de la pulpe du fruit (**Jackson, Altach, 2007**).

Après la récolte, les fruits séchés contiennent naturellement des agents phytopathogènes provenant du champ qui peuvent ou non survivre au processus de séchage. Cependant, lorsque l'activité de l'eau (A_w) des fruits secs dépasse 0,65, les fruits secs sont susceptibles de pourrir par certains agents pathogènes fongiques post-récolte, en particulier *Aspergillus* xérophiles (qui vit dans des environnements très pauvres en eau). La présence de ces espèces peut affecter la qualité des fruits à coque et causer de graves problèmes de santé aux consommateurs (**Tournas et al., 2015**).

Plusieurs champignons peuvent infecter et détruire les noix en croissance. Le fractionnement précoce de la coquille favorise souvent l'infection, conduisant à l'infestation par de nombreux insectes hémiptères qui se nourrissent des noix et agissent comme vecteurs non spécifiques de maladies (**Nawar, 2008**).

4. Altération des fruits secs par la production des mycotoxines

Les champignons appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria* sont responsables à la détérioration des fruits. En plus de leur capacité à altérer les fruits, ces champignons produisent des mycotoxines préoccupantes pour la santé humaine (**Jackson, Al-Taïher, 2007**). Le développement des mycotoxines peut se produire avant ou après la récolte, pendant la conservation, sur ou dans l'aliment lui-même souvent dans un environnement chaud et humide. La plupart des mycotoxines sont chimiquement stables et résistent au traitement des aliments.

Les mycotoxines les plus couramment présentes dans les fruits (et aux produits fruitiers) sont : les aflatoxines, l'ochratoxine A, la patuline, les fumonisines, la zéaralénone et le nivalénol/déoxynivalénol (**Organisation Mondiale de la Santé, 2018**).

Les figures suivantes (Figure 17) montrent un exemple d'altération des fruits secs causé par la mycotoxine observée à l'œil nu.



(A): Noix

(B) : Amande

(C) : Arachide

Figure 17 : Fruits secs contaminés

- (A) : (<https://forums.futura-sciences.com/identification-especes-animales-vegetales/910757-noix-moisissure.html>). Consulté le 02 juin 2024.
- (B) : (https://www.key.net/en/wp-content/uploads/2018/12/WP_Sorting-Nuts_PDF.pdf). Consulté le 02 juin 2024.
- (C) : (<https://www.aflatoxinpartnership.org/sites/default/files/2018-06/2.2%20-%20The%20aflatoxin%20challenge%20to%20the%20GN%20sector%20in%20West%20Africa.pdf>). Consulté le 02 juin 2024.

Matériels et Méthodes

1. Etude mycologique des fruits à coque

Le présent travail porte sur l'étude mycologique et mycotoxique des fruits à coque commercialisés dans la région de Constantine. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Mycologie biotechnologie et de l'activité microbienne (Université frères mentouri Constantine)

1.1.Echantillonnage

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 Khroub situé dans la wilaya de Constantine et transportés au laboratoire dans des flacons stériles. Ces échantillons ont été prélevés de façon aléatoire, en évitant les prélèvements systématiques, prélèvement à partir de la surface, et sur les côtés du compartiment.

Le nombre total des échantillons est : 18. L'échantillon de chaque type se compose de (Tableau 5) :

- ✓ Noix : 6 échantillons (3 Noix enveloppées, 3 Noix décortiquées au laboratoire)
- ✓ Amandes : 6 échantillons (3 Amandes enveloppées, 3 Amandes décortiquées au laboratoire)
- ✓ Arachide : 6 échantillons (3 Arachides enveloppées, 3 Arachides décortiquées au laboratoire)

Tableau 5 : tableau représente les différentes variétés des échantillons étudiés.

Les fruits à coques	Décortiqués (nus)	Non décortiqués (enveloppés)
Noix		
Amandes		
Arachides		

1.2. Désinfection des fruits secs (les graines et les coques)



Figure 18 : Désinfection des fruits secs. **A)** Eau de javel, **B)** Ethanol, **C)** Eau distillée.

1.3. Isolement de la flore fongique

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

1.3.1 Méthode directe d'Ulster

Pour prévenir la contamination par d'autres micro-organismes indésirables, les graines et les coques des fruits secs (arachides, amandes, noix) de chaque échantillon ont été soumises à une désinfection. Elles ont été traitées d'abord avec de l'eau de Javel à 0,5%, puis avec de l'éthanol pendant une minute, suivies de deux rinçages à l'eau distillée stérile. Ensuite, elles ont été séchées avec du papier filtre stérile (Adjou et Soumanou, 2013 ; Houissa, 2021).

Sous des conditions aseptiques, Les graines et les coques des fruits secs désinfectées, ont été placées directement à l'aide d'une pince stérile, dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (3 boîtes pour chaque échantillon) à raison de trois arachide par boîte et deux pour les amandes et les noix (Figures 19) et (Figure 20). 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 19: Ensemencement des fruits secs décortiqués sur milieu PDA.

A) Arachide, B) Amande, C) Noix.

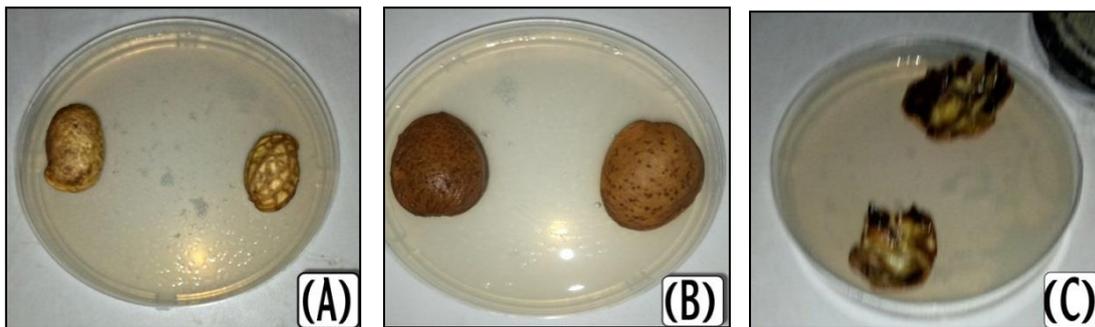


Figure 20: Ensemencement des fruits secs enveloppés sur milieu PDA.

A) Arachide, B) Amande, C) Noix.

1.3.2. Méthode indirecte de dilution

Cette méthode permet d'isoler la flore fongique se trouvant à l'intérieur et à l'extérieur des graines.

Après désinfection et broyage de fruits secs (les arachides, les amandes et les noix), un gramme de celui-ci a été ajouté à un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillé stérile et agité pendant 1 à 2 min pour former une solution mère. Des dilutions décimales successives ont été réalisées à partir de la solution mère jusqu'à 10^{-4} ml.

Pour chaque dilution, un volume de 0,1 ml a été ensemencé en surface sur une gélose PDA (**Annexe**), cette opération a été réalisée en duplicata. Les boîtes ont été en suite, incubées à 28°C pendant 4 à 6 jours (**Atoui, 2006 ;Matmoura et al., 2019 ;Bouricha,2022**).

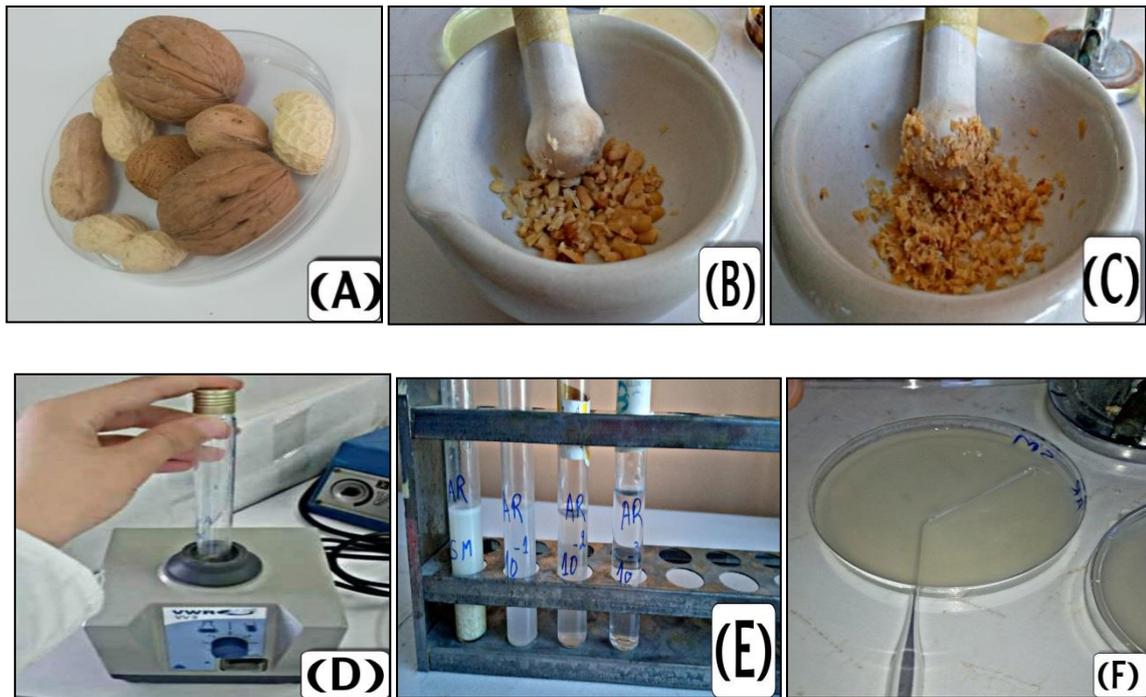


Figure 21 : Les étapes de l'isolement de la flore fongique à partir des fruits secs (arachide, amande, noix). **A)** Echantillon, **B)** Broyage de l'échantillon, **C)** Echantillon moulu, **D)** Agitation, **E)** Dilutions décimales, **F)** Ensemencement.

1.4. Purification

La purification a été réalisée en prélevant un fragment d'hyphes fongiques à l'aide d'une anse de platine stérilisée, en veillant à éviter tout contact avec les autres colonies présentes sur la même boîte de Pétri. Ces fragments ont été repiqués individuellement sur des milieux Sabouraud et PDA, puis incubés à 28 °C pendant une période de 6 jours. des repiquages successives ont été fait jusqu'à l'obtention de souches pures (Compaore *et al.*, 2016 ; Abdoullahi *et al.*, 2019 ; Moussaoui *et al.*, 2021 ; Bouricha, 2022).

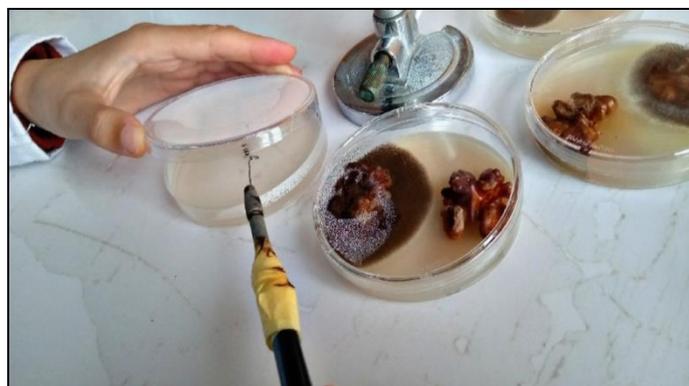


Figure 22 : Purification des isolats

1.5. Identification des isolats

L'identification des espèces fongiques repose sur les caractéristiques morphologiques de la colonie et des examens microscopiques (**Bandh et al., 2011**).

1.5.1. Identification macroscopique

Selon **Chabasse et al., (2002)** et **Compaore et al.,(2016)** Les caractéristiques morphologiques des colonies ont été déterminées avec des cultures de 5 ou 7 jours dans le milieu PDA et sabouroud. Alors que la morphologie de cellules repose sur :

- La vitesse de croissance (rapide, moyenne, lente).
- Le relief des colonies (plissés, plats, cérébriforme,...)
- L'aspect des colonies : poudreuses, duveteuses, laineuses ou granuleuses (les champignons filamenteux) et glabre ou lisses (les champignons levuriformes).
- La couleur des colonies: blanches, crèmes ou colorées (gris, violettes, brunes, vertes, ...)
- La couleur du revers de la culture.
- La forme de colonies.

1.5.2. Identification microscopique

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

- **La technique du scotch** : qui consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune. Puis de le coller sur une lame contenant.
- **Lactophénole bleu de coton** : un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame dans une goutte de colorant, ensuite recouvrir avec une lamelle

Les observations microscopiques ont été réalisées à des grossissements de $\times 40$ et $\times 100$ en utilisant la microscopie optique.

L'étude microscopique du mycélium est basée sur :

- L'absence ou présence de cloisons ;
- Couleur des filaments mycéliens ;
- Mode de ramification des cloisons ;
- Différenciation des spores (**Chabasse et al., 2002 ;Compaore et al.,2016 ;Moussaoui et al.,2021**).

2. Etude mycotoxique

2.1. Production de mycotoxines sur milieu de fermentation

La production des métabolites secondaires (mycotoxines) par les souches isolées a été mise en évidence par une extraction et purification à partir d'une culture de fermentation, suivie par la détection qualitative de ces mycotoxines par chromatographie sur couche mince (CCM).

2.2. Préparation du milieu de fermentation

Le milieu PDA liquide (PDB) a été choisi comme un milieu spécifique pour une production optimale des mycotoxines (**Rojas et al., 2005**). La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture (PDB) et le pH a été ajusté à 5,5 (**Tuomi et al., 2001**).

2.3. Ensemencement du milieu de fermentation

Après le développement de différentes souches fongiques pures, Nous avons réalisé la fermentation par l'inoculation avec des disques de PDA (8 disques / Erlenmeyer) de chaque souche. ils seront après incubés à 28°C pendant trois semaines avec une agitation périodique à 150 tours/minute (**Mohanta et al., 2007; Barik et al., 2010; Xiaoling et al., 2010**).

2.4. Extraction

Après 14 jours d'incubation, la biomasse formée a été éliminée en filtrant le milieu PDB à travers du papier filtre type Wattman N° 01 (Figure 23 D) (**Barik et al., 2010; Mohanta et al., 2007**).

Les 50 ml du filtrat obtenu ont été additionnés à 50 ml de chloroforme, le mélange a été rigoureusement agité pendant 1 à 2 min puis laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation (Figure 23 E) (**Awad, 2005**).

La phase chloroformique 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 45 °C (Figure 23 F). Une fois sèche, l'extrait a été remis en suspension dans 500µl de méthanol et placé dans un flacon en verre parafilmé pour des analyses ultérieures par CCM (**Awad, 2005**).

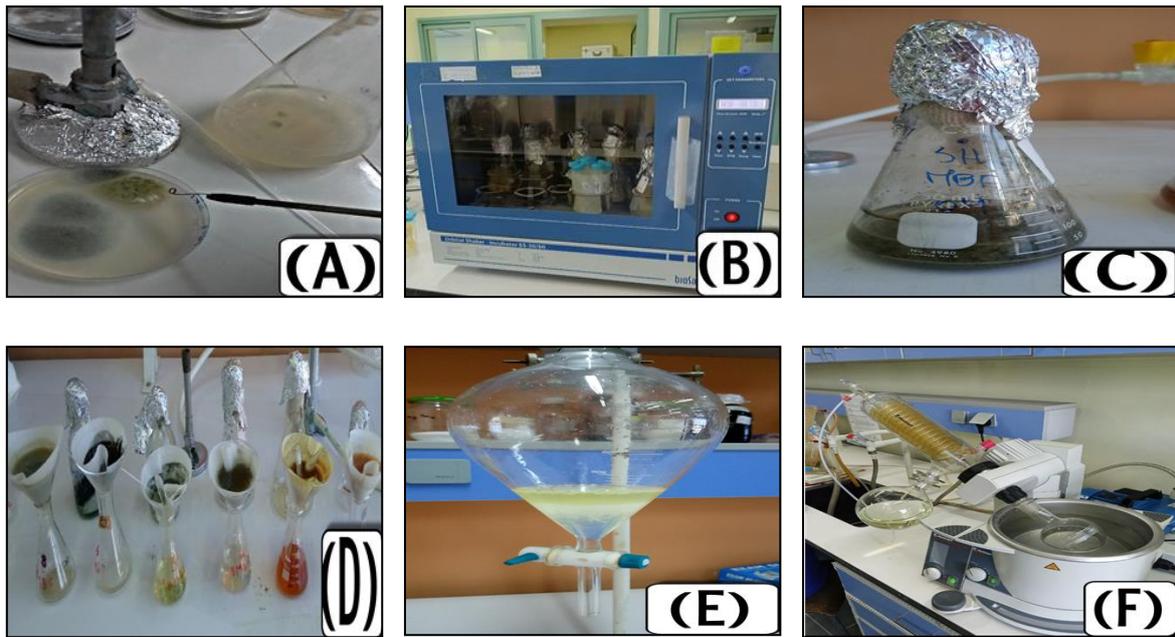


Figure 23 : Fermentation et extraction de mycotoxines. **A)** Inoculation des disques, **B)** Incubation, **C)** Culture fongique après fermentation, **D)** filtration du milieu de fermentation, **E)** Décantation, **F)** Evaporation de l'extrait.

2.5.Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification avec une bonne précision.

Elle a été faite sur une plaque de silice de 20 x 20 cm sur laquelle est déposé un spot de 20 μ l de chaque extrait chloroformique concentré. La plaque a été déposée verticalement dans une cuve qui contient 80 mL de solvant qui est constitué de toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (40/32/8 v/v/v) respectivement (Figure 25) (Guechi et Girre, 2002).



Figure 24 : Les extraits bruts



Figure 25 : La migration de solvant

Après migration et évaporation du produit d'éluion à sec, la plaque a été retirée et séchée à l'air libre puis examinée sous Une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm (Figure 26). La présence des mycotoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques (**Guechi et Girre, 2002;Awad, 2005**).



Figure 26 : Examiner des plaques CCM sous lampe UV

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 14 isolats répartis comme suit : 06 isolats fongiques à partir de l'échantillon des Amandes (enveloppées et décortiquées au labo), qui représente 43% des isolats. 05 isolats fongiques à partir de l'échantillon des Noix (décortiquées, enveloppées et décortiquées au labo), qui représentent 36% des isolats et 03 isolats fongiques à partir de l'échantillon des Arachides (décortiquées, enveloppées et décortiquées au labo), qui représentent 21% des isolats. Le pourcentage des isolats obtenu selon chaque type de fruits à coque analysé, est représenté dans la figure.

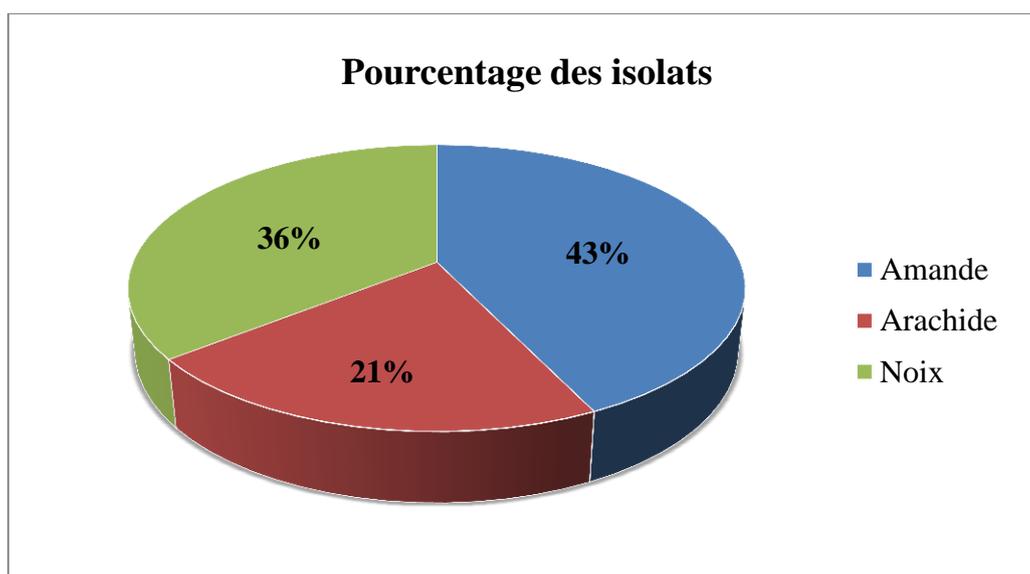


Figure 27 : Pourcentage des isolats fongique obtenus de chaque type de fruits à coque.

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

1.2. Identification des souches fongiques isolées

L'identification des genres fongiques a été réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de **Chabasse *et al.*, 2002 ; Compaore *et al.*, 2016 ; Moussaoui *et al.*, 2021** en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc.).

1.2.1. Identification macroscopique

L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation, à l'œil nu, des caractères cultureux (aspect de la colonie, couleur, revers, et la vitesse de la croissance). Les résultats obtenus, ont été rassemblés dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 : Observations macroscopiques des différents isolats obtenus à partir des fruits à coques analysés.

Aspect macroscopique			Référence
Isolat	Surface	revers	
S1			 (Ranjbar <i>et al.</i>, 2019)
S2			 (El-Fadaly <i>et al.</i>, 2015)

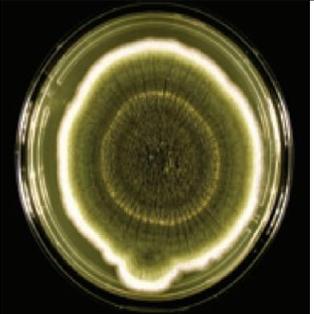
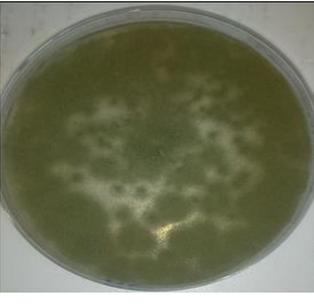
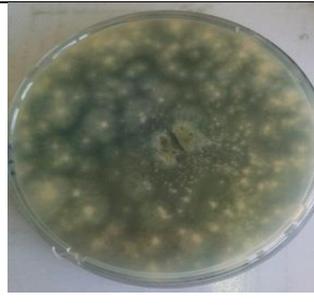
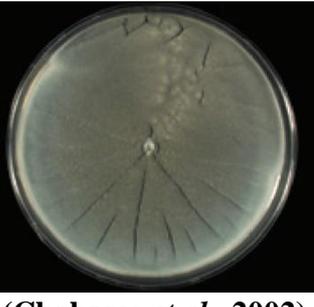
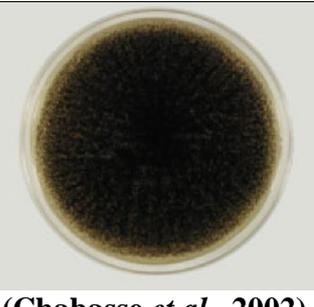
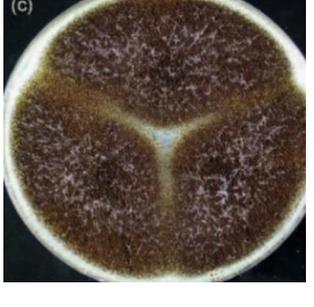
<p>S3</p>			 <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p>S4</p>			 <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p>S5</p>			 <p>(Chabasse <i>et al.</i>, 2002)</p>
<p>S6</p>			 <p>(Varga <i>et al.</i>, 2007)</p>

Figure 28 : représentation graphique de différents espèces d'Aspergillus identifiés par rapport les échantillons (noix, amande, arachide).

La souche **S1** isolée à partir de l'échantillon des Noix enveloppées. Elle a les caractéristiques macroscopiques suivantes : une croissance rapide, l'aspect des colonies duveteuse à poudreuse avec couleur brun noisette, le revers peut être jaune à brun orange.

La souche **S2** isolée à partir de l'échantillon des Amandes enveloppées. Elle a les caractéristiques macroscopiques suivantes : un thalle à croissance rapide sur le milieu de culture PDA, avec un aspect duveteux à poudreux avec couleur jaune à brun jaunâtre. Le revers est jaune à brun clair.

La souche **S3** isolée à partir de l'échantillon des : Amandes décortiquées, Noix décortiquées, Arachides décortiquées et enveloppées. Elle a les caractéristiques macroscopiques suivantes : un thalle à croissance rapide sur le milieu de culture PDA, avec un aspect duveteux à poudreux, d'abord Blanc, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers est incolore à jaune clair.

La souche **S4** isolée à partir de l'échantillon des Amandes décortiquées. Elle a les caractéristiques macroscopiques suivantes : un thalle à croissance rapide sur le milieu de culture PDA avec Des colonies d'abord blanches, puis bleu vertes et enfin vert foncé à gris Noirâtre. Le revers peut être incolore.

La souche **S5** isolée à partir de l'échantillon des Amandes décortiquées, Noix enveloppées et des Arachides décortiquées. Elle a les caractéristiques macroscopiques suivantes : un thalle à croissance rapide sur le milieu de culture PDA, avec un aspect granuleux, blanc au début, puis jaune et à maturité, il devient noir. Le revers peut être incolore ou jaune pâle.

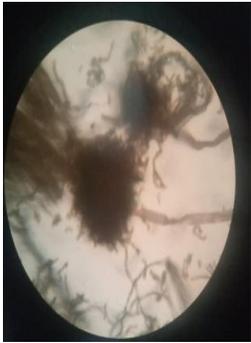
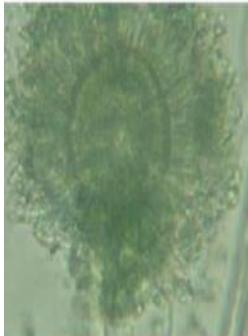
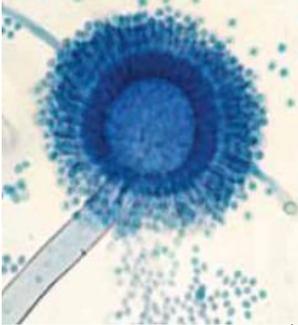
La souche **S6** isolée à partir de l'échantillon des Noix enveloppées et des Amandes décortiquées. Elle a les caractéristiques macroscopiques suivantes : Une lente croissance, la couleur de colonies est blanche au début puis brune foncée à noire, le revers de la boîte crème à brun clair.

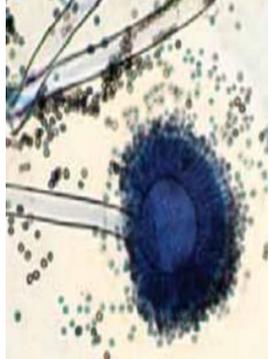
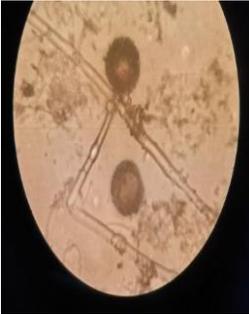
1.2.2. Identification microscopique

Une identification microscopique a été réalisée à des grossissements de X40 et X100. Cette identification était fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium

(absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois).

Tableau 7 : Caractères microscopiques des souches isolées des fruits à coques.

photo microscopique	Aspect microscopique	Photo microscopique de référence	Identification de la souche
	<ul style="list-style-type: none"> • La tête : en colonne envasée, bisérées. • Conidiophore : incolore lisse. • Conidies : lisse, petites et globuleuse. • Phialides : portes par des métules insérées sur la vésicule <p>(Chabasse et al., 2002).</p>	 <p>(Ranjbar et al., 2019)</p>	<p><i>Aspergillus terreus</i></p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Conidiophores : granuleuse avec des parois jaune-brun pâle qui s'attachent brusquement à une « vésicule globuleuse à subglobuleuse » <p>(El-Fadaly et al., 2015).</p>	 <p>(El-Fadaly et al., 2015)</p>	<p><i>Aspergillus ochraceus</i></p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Tête conidiale en colonne compacte et de diamètre uniforme. • Ddes petites conidies globuleuses de couleur vert. • Une vésicule hémisphérique porte des phialides. 		<p><i>Aspergillus flavus</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> • Les conidiophores sont lisses et incolore (Chabasse et al.,2002 ; Abdoullahi et al., 2019). 	<p>(Tabuc, 2007)</p>	
 	<ul style="list-style-type: none"> • Têtes conidiennes unisériées ou bisériées. • Les conidiophores hyalins. • Les vésicules sont sub-globuleuses (45 µm de diamètre) insérées par des phialides ces dernières portées par des métules. • Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, (3-6 µm de diamètre) de couleur verte pâle (Tabuc,2007). 	 <p>(Tabuc, 2007)</p>	<p><i>Aspergillus 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>(Tabuc, 2007)</p>	<p><i>Aspergillus niger</i></p>
	<ul style="list-style-type: none"> • Têtes conidiennes globuleuses. • Parois épaisses et lisses. • Des vésicules larges. • Métules couvrant pratiquement toute la surface de la vésicule. 		<p><i>Aspergillus brasiliensis</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> Les phialides ayant une forme flaçon (Varga <i>et al.</i>,2007) 	 <p>(Varga <i>et al.</i>, 2007)</p>	
--	---	---	--

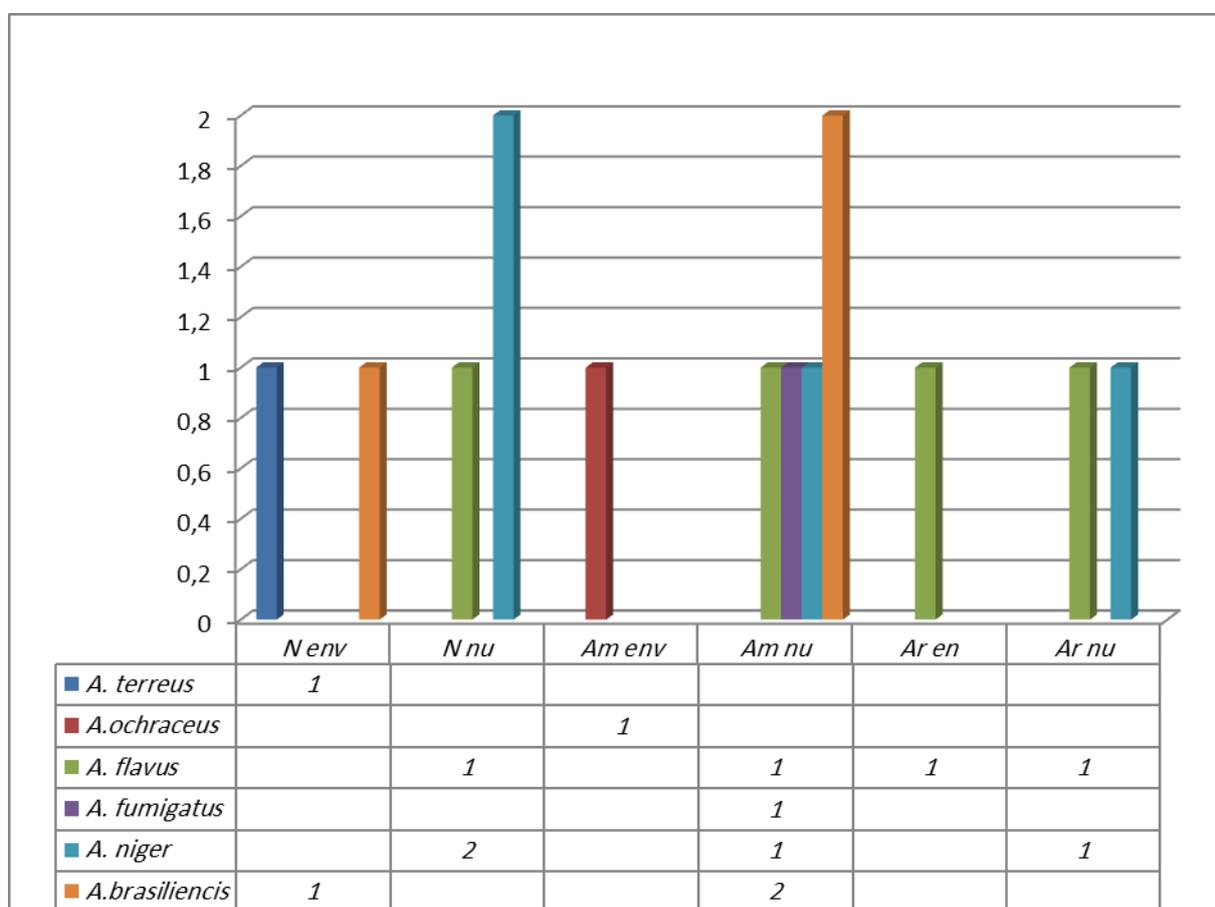


Figure 28 : représentation graphique de différents espèces d'*Aspergillus* identifiés par rapport les échantillons (noix, amande, arachide).

2. Etude mycotoxicologique

Pendant les 14 jours d'incubation, les Erlens ont été contrôlés hebdomadairement pour confirmer l'absence de contamination par d'autres espèces fongiques.

L'extraction des métabolites secondaires a été réalisée par les solvants organiques, leur séparation a été faite sur la chromatographie sur couche mince (CCM) avec une révélation par radiation des UV à une longueur d'onde =365 nm.

La chromatographie sur couche mince de l'extrait d'*Aspergillus terreus* a permis de séparer plusieurs spots(figure 29), apparus sous formes de taches colorées après révélation sous lumière UV. Les spots correspondant à la gliotoxine donnent une fluorescence bleue vert et un Rf=0,49



Figure 29 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus terreus*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait de la souche *Aspergillus ochraceus* contient 8 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 30). Les spots correspondant à l'Ochratoxine A donnent une fluorescence bleue vert et un Rf=0,54

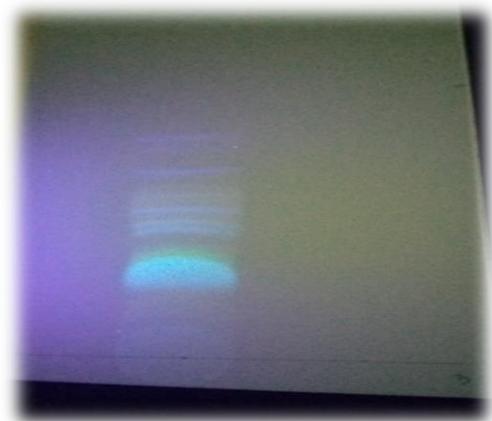


Figure 30: Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus ochraceus*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait de la souche *Aspergillus flavus* contient 6 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 31). Selon la couleur fluorescente des spots et le Rf,

La fluorescence bleue détectée par l'UV et un Rf de l'ordre de 0,67 sont deux paramètres qui indiquent la production de l'aflatoxine B1 par l'espèce *A.flavus*.

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait de la souche *Aspergillus flavus* contient 06 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 31). Selon la couleur fluorescente des spots et le Rf, deux composants ont été identifiés ; l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2 qui donnent une fluorescence Bleue verte et des Rf =0,67 et 0,62 respectivement.

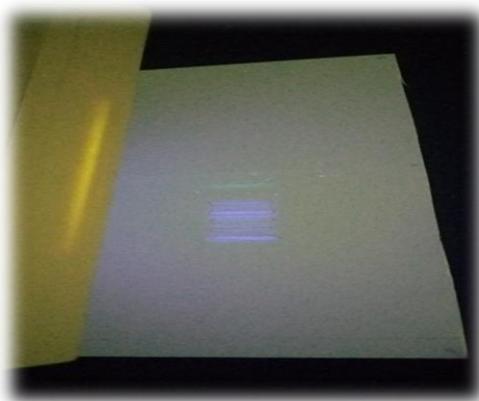


Figure 31 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus flavus*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait de la souche *Aspergillus fumigatus* contient 09 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 32). Selon la couleur fluorescente des spots et le Rf, trois composants ont été identifiés. La gliotoxine caractérisée par une fluorescence bleue et un Rf= 0,49, la verrucologène et la fumagilline qui donnent une fluorescence verte et des Rf =0,53 et 0,59 respectivement.

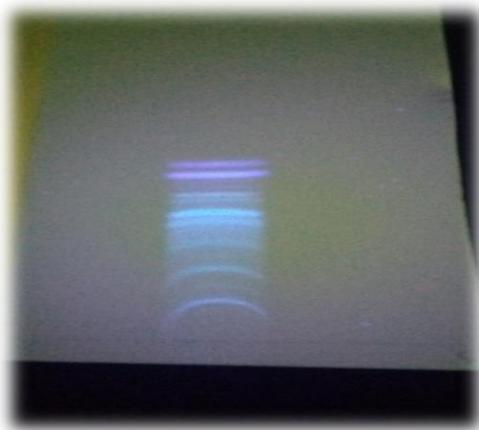


Figure 32 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des mycotoxines produites par *Aspergillus fumigatus*

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait de la souche *Aspergillus niger* contient 4 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 33). La fluorescence bleue vert détectée par l'UV et un Rf de l'ordre de 0,54 sont deux paramètres qui indiquent la production de l'Ochratoxine A par l'espèce *A.niger*.



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

La révélation par radiation UV a montré que l'extrait de la souche *Aspergillus brasiliensis* contient 2 composés qui apparaissent sous forme de taches distinctes (Figure 34).



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

Tableau 8 : Les valeurs de coefficients Rf (rapport frontal) des spots séparées par CCM.

Les souches	Numéro des taches	Couleur des taches sous		Rapport frontal Rf
		Lumière visible	Longueur d'onde 365 nm	
<i>Aspergillus terreus</i>	1	/	Bleu	0.49
	2	/	Vert	0.51
	3	/	Vert	0.61
	4	/	Bleu	0.72
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	Orange	Vert	0.35
	2	Jaune-vert	Vert	0.36
	3	/	Vert	0.46
	4	/	Vert	0.48
	5	/	Bleu vert	0.54
	6	/	Vert	0.61
	7	/	Bleu	0.7
	8	/	Bleu	0.85
<i>Aspergillus flavus</i>	1	/	Bleu	0.57
	2	/	Bleu	0.62
	3	/	Bleu	0.67
	4	/	Bleu	0.74
	5	/	Bleu	0.8

	6	/	Vert	0.92
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	/	Bleu clair	0.16
	2	/	Vert	0.3
	3	/	Vert	0.4
	4	/	Bleu	0.49
	5	/	vert	0.53
	6	/	Vert	0.58
	7	/	Vert	0.59
	8	/	Violet	0.69
	9	/	Violet	0.75
<i>Aspergillus niger</i>	1	/	vert	0.41
	2	/	Vert	0.47
	3	Jaune	Bleu Vert	0.54
	4	Jaune	Vert	0.59
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1	/	Vert	0.62
	2	Jaune	Jaune	0.72

Discussion

Les fruits à coques sont des aliments susceptibles d'infection fongique dans le champ et dans des conditions de stockage inadéquates. Plus précisément, les fruits secs qui ont été endommagés par des charançons ou des facteurs mécaniques pendant le processus de récolte et de transport sont très sensibles à l'invasion fongique et à la pourriture ultérieure (**Nawar, 2008**).

Les graines oléagineuses gâtées se sont révélées être un milieu favorable à la prolifération, à la maturation et au fonctionnement des moisissures responsables de la détérioration, comme le rapportent divers auteurs (**Riba et al., 2005 ; Abdoullahi et al., 2019**).

L'analyse de la flore fongique des fruits à coques (Noix, Amandes et Arachides) a identifié la présence des espèces appartenant au genre *Aspergillus*, ce qui est en accord avec les conclusions de (**Chapeland-Leclercetal. 2005**). Comparativement avec les études de **Benmansour-Brixi (2005)**, le taux de contamination de l'*Aspergillus* est le plus dominant.

La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminant des fruits à coques a été reportée dans plusieurs travaux (**Riba et al., 2005**). Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage (**Nawar, 2008**). Parmi les espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, il faut souligner la grande dominance d'*Aspergillus flavus* suivi d'*Aspergillus fumigatus* dans les quatre échantillons. Cette contamination importante est accompagnée aussi par une production de mycotoxines.

L'Algérie avait rapporté la présence des souches fongiques appartenant aux genres *Aspergillus* dans les aliments secs. C'est un champignon ubiquitaire, dans le sol et l'air à travers ses spores ce qui permet leur apparition avec haute fréquence sur la majorité des échantillons analysés (**Abdoullahi et al., 2019**).

Moussaoui et al., 2021 montre que l'humidité relative est un facteur essentiel au développement des champignons et à la production de mycotoxines, notamment dans les aliments mal hydratés. D'ailleurs, Le genre *Aspergillus* pourrait croître dans différents milieux à faible humidité. Alors que la température et l'humidité sont les principaux facteurs qui limitent sa croissance et son activité toxigène. Selon **Ayari-guentri et al., 2020** le genre *Aspergillus* capable de développer à une large gamme de température de 25°C à 40°C.

En termes de mycotoxicologie, il est important de noter que les différentes souches d'*Aspergillus* isolées et caractérisées possèdent le potentiel de produire des toxines.

L'identification d'*Aspergillus flavus*, d'*Aspergillus noirs* (*A. niger* et *A. brasiliensis*), d'*Aspergillus terreus*, d'*Aspergillus fumigatus*, et particulièrement d'*Aspergillus ochraceus* indique un danger potentiel en termes de synthèse de mycotoxines.

Afin d'examiner la synthèse des mycotoxines par diverses souches fongiques, ces souches ont été cultivées sur un milieu PDA Broth, connu pour produire les niveaux les plus élevés de production de mycotoxines, comme indiqué par **Bennett et al., (2003)**. Après l'extraction des surnageant des différentes souches au chloroforme, les extraits actifs ont ensuite été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM).

En soumettant du gel de silice (CCM) à l'extrait brut d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus ochraceus*, plusieurs bandes fluorescentes ont été observées. Notamment, la présence d'ochratoxine A (OTA) a été identifiée par sa fluorescence bleu-vert distincte et une valeur Rf de 0,54. Ces résultats sont en corrélation avec les recherches menées par **Riba et al., en 2013**. De plus, la fluorescence bleue détectée sous la lumière UV et une valeur Rf de 0,67 servent d'indicateurs de la production d'aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus*. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Bennet et al., 2003**. La fluorescence bleue vert détectée par l'UV, le Rf = 0,49 sont deux paramètres qui indiquent la production de la gliotoxine par l'espèce *Aspergillus terreus*.

L'analyse d'extraits bruts d'*Aspergillus fumigatus* par CCM a également montré la présence de taches distinctes. Nos résultats sont identiques à ceux obtenus par (**Kosalec et al., 2004**), qui ont déduit que les taches ayant des Rf = 0,53 et 0,59 correspondant respectivement à la gliotoxine, au verrucogène et à la fumagilline.

De plus, **Kosalec et al., 2004** ont montré qu'*Aspergillus terreus* et *Aspergillus fumigatus* produisent de la gliotoxine, qui est un métabolite secondaire de la famille des épipolythiodioxopipérazine.

Dans l'étude de **Varga et al., 2007**, les isolats d'*A. brasiliensis* ont produit certains des mêmes composés que ceux d'*A. niger* et d'*A. tubingensis*, en particulier les tensidol A et B, naptho-h-y-pyrones et pyrophène. Aucun isolat ne produit de l'ochratoxine A.

La consommation de fruits secs (amandes, noix, cacahuètes) contaminés par des mycotoxines présente des risques pour l'homme et les animaux. **Gargouri, 2020** Ces mycotoxines sont des composés très stables lors du stockage et du traitement de torréfaction

.Ils résistent thermiquement aux traitements techniques lors de la préparation (**Moussaoui et al., 2021**).

Les arachides sont l'une des graines oléagineuses les plus contaminées par des moisissures toxigènes, le plus souvent pendant la culture, la récolte et le stockage. De plus, selon **Wagacha et al., (2013)**, certaines moisissures, comme *Aspergillus* et *Penicillium*, sont capables de produire des mycotoxines dans les graines d'arachide et leurs dérivés (amandes, noix), très toxiques pour les consommateurs. Leurs effets négatifs résident dans la modification des substrats (qualités sensorielles : goût, couleur, saveur, texture) et dans la sécrétion d'aflatoxines, dont l'aflatoxine B1, la plus toxique.

Conclusion et perspective

L'objectif de ce travail est de faire un isolement des moisissures qui contaminent les fruits à coques commercialisées dans la Wilaya de Constantine et d'évaluer le pouvoir producteur de mycotoxines 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 Constantine.

Sur les 18 échantillons analysés nous avons isolé 14 souches fongiques. En effet, les amandes étaient les plus contaminées avec 43 % des isolats, suivies par les noix avec 36 % et les cacahuètes avec 21 %. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les trois échantillons des fruits à coques analysés sont contaminés par les moisissures.

L'étude macroscopique et microscopique a révélé une nette dominance du genre *Aspergillus* représenté par 6 espèces qui sont : (*A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.brasiliensis*, *A.terreus* et *A.ochraceus*).

L'étude du pouvoir producteur des mycotoxines sur CCM a été effectuée dans une chambre noire sous lampe à UV à 365 nm. L'analyse des mycotoxines par CCM a révélé la production de l'Aflatoxine B1 par *Aspergillus flavus*, l'ochratoxine A par *Aspergillus niger* et *Aspergillus ochraceus*, la production de la gliotoxine par *Aspergillus terreus* et la production de la fumagilline, la gliotoxine et la verruculogène par l'espèce *Aspergillus fumigatus*. Du point de vue mycotoxicologique, tous les échantillons analysés sont contaminés par les aflatoxines et les ochratoxines.

Malheureusement il n'est pas possible d'éliminer les mycotoxines au niveau de la préparation des denrées sans altérer la valeur alimentaire des produits. En attendant, quelques règles d'hygiène et de sécurité peuvent être appliquées :

- Vente des fruits secs à coques dans les bacs opaques et qui se ferment hermétiquement cette technique réduit le contact direct entre les fruits secs et l'humidité de l'air, ce qui évite la contamination par les mycotoxines, malgré la présence des spores de moisissures et aussi d'éviter la destruction des huiles essentielles par la lumière. Ces derniers en un rôle fongicide et bactéricide très important.
- Veiller au respect de règles d'hygiène telle que les conditions d'emballage, d'entreposage et de stockage et multiplier les contrôles microbiologiques et toxicologiques des denrées alimentaires susceptibles d'être contaminer par les mycotoxines.

Comme perspectives, il reste plusieurs travaux à mener afin de répondre aux questions soulevées lors de cette étude :

- Elargissement de notre recherche sur les mycotoxines vers d'autres fruits secs à coques afin d'avoir plus d'informations sur l'état hygiénique de ces denrées alimentaires ;
- Extraction et caractérisation des composés actifs par des méthodes plus spécifiques.

Références bibliographiques

Abbott, S. P. (2002). Mycotoxins and indoor molds. *Indoor Environment Connections*, 3(4), 14-24 p.

Abdoullahi, H. O., Tidjani, A., Sawadogo, A., Tarnagda, B., Abakar, L. I., Cissé, H., Savadogo, A. (2019). Isolement et caractérisation de souches fongiques à partir de poissons fumés/séchés du lac Fitri au Tchad. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 2(4), 155-160 p.

Adjou E.S, Soumanou M.M. (2013). Efficacité des extraits de plantes dans la lutte contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin. *Journal of Applied Biosciences*, 70, 5555– 5566 p.

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. *Maison 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.

Atoui A.K. (2006). Approche de la mycotoxinogenese 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.

Ayari-guentri, S., Djemouai, N., Gaceb-terrak, R., Rahmania F. (2020). Abondance et diversité de la mycoflore associée à *Hyoscyamus muticus* L. subsp. *falezlez* (Coss.) Maire; une plante médicinale de la région d'Adrar. *Journal Algérien des Régions Arides (JARA)* ,14 (1): 141-149 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 of 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.

Basse, B. (2020). Valorisation de la graine d'arachide broyée: rôle des différentes fractions dans la structuration par gélification d'une suspension aqueuse. Thèse de doctorat : Chimie organique .Université Paris-Saclay, 5-17 p.

Benmansour-Brixi, G.N. (2005). Étude microbiologique et mycotoxique 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.

Blaize, M., Normand, A. C., Fekkar, A., Piarroux, R. (2021). Identification des moisissures au laboratoire de routine hospitalière. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2021(529), 58-65 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.

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.

Bouricha M. (2022). Potentiel technologique des souches *Leuconostoc* isolées à partir de différents produits laitiers de là. Thèse de doctorat : Sciences Biologiques. UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA, 699 p.

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.

Cassier, P, Brugerolles, G ; Combes, C. (1998). Le parasitisme : un équilibre dynamique Enseignement des sciences de la vie. Edition Masson, 366 p.

Chabasse, D ; Bouchara, J. P ; Gentile, L ; Brun, S ; Cimon, B ; Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation N° 25.

Chapeland-Leclerc, F., Papon, N., Noël, T., Villard, J. (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue francophone des laboratoires*, 61-66 p.

Chermette, R., Bussiéras, R. (1993). Mycologie vétérinaire. Service de parasitologie, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort.

Christensen, C. M., Mirocha, C. J., Meronuck, R. A. (1988). Molds and mycotoxins in feeds, 3-4 p.

Compaore, H., Sawadogo-Lingani, H., Savadogo, A., Dianou, D., Traore, A. S. (2016). Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes à partir d'aliments locaux au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 198-210 p.

Combes, C. (2001). Les associations du vivant : L'art d'être un parasite nouvelle bibliothèque scientifique, Edition Flammarion, 348 p.

Deffontaine, M. (2015). Caractérisation et analyse de la contamination fongique de l'habitat en Picardie .Thèse de doctorat : Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie, 15 p.

El-Fadaly, H. M., El-Kadi, S. M., Hamad, M. N., Habib, A. A. (2015). Isolation and identification of Egyptian Ras cheese (Romy) contaminating fungi during ripening period. *Journal of Microbiology Research*, 5(1), 1-10.

- Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H., Pitt, J. I., Samson, R. A. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Boston, MA: Springer US, 55-62 p.
- Gargouri, D. (2020). Synthèse de réactifs multifonctionnels et d'analogues de mycotoxine. Application à la détection de mycotoxines dans des solutions alimentaires. Thèse de doctorat: Chimie Bio-Organique. Normandie Université, 207 p.
- Gauthier, A. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat : Sciences pharmaceutiques: Université de Bordeaux, 14-61 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
- Guechi, A., Girre, L. (2002). Recherche et analyse d'un effet mutagène des extraits de feuilles d'olivier parasitées par le champignon *Cycloconium oleagineum* Cast. *Sciences & Technology. A, exactes sciences*, 96-100 p.
- 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., Tangni, E. K., Debongnie, P., Geys, J., Callebaut, A. (2013). Méthodes analytiques de détermination des mycotoxines dans les produits agricoles: une revue. *Cahiers Agricultures*, 22(3), 202-215 p.
- Jackson, L.S., Al-Taher, F. (2007). Factors Affecting Mycotoxin Production in Fruits. : *Mycotoxins in fruits and vegetables*. Academic Press, 75-104 p.
- Jarvis, B. B., Miller, J. D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied microbiology and biotechnology*, 66, 367-372 p.
- Juchet, A., Chevallier, M., Chabbert-Broué, A. (2013). Allergie aux fruits à coque: l'indispensable. *Revue Française d'Allergologie*, 53(2), 77-83 p.
- Kachour, L. (2005). Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité, Mémoire de magister en microbiologie de l'environnement. Université baji mokhtar Annaba, 90 p.

- Karci, H. (2023). QTL-seq for the identification of candidate genes responsible for double seeds in almond. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 47(5), 633-644 p.
- Knoden, J. L., Dufour, L., Bindelle, J. (2003). Fabrication de beurre de cacahuete. *Collection Manuels et Techniques, Bruxelles, Belgique*, 2-4 p.
- Krska, R., Richard, J. L., Schuhmacher, R., Slate, A. B., Whitaker, T. B. (2012). Romer Labs Guide to Mycotoxins. *Englanti: Anytime Publishing Services*, 3-26 p.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Jandrljic, M. (2005). Influence of media and temperature on gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* strains. *Arhiv za Higijenu Rada I Toksikologiju/Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 56(3), 269-273 p.
- Lahouar, A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils écophysiologiques. Thèse de doctorat : Sciences biologique et technologie. Université de Lleida, 85 p.
- Lebreton, A. (2018). Caractéristique génomique du genre fongique *Mucor* et évolution adaptative liée à différents modes et conditions de vie au sein de genre. Thèse de doctorat : Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation. Bretagne. Université de Bretagne occidentale-Brest, 205 p.
- Lecellier, A. (2013). Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de doctorat : Sciences Technologie Sante. Université de Reims Champagne-Ardenneecole, 196 p.
- Maniar, S., El ouali lalami, A. (2011). Qualité hygiénique des fruits secs au centre du Maroc.
- 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.
- Messiaen, C. M., Cassini, R. (1968). Recherches sur les Fusarioses. IV. La systématique des *Fusarium*. *Ann. Epiphyt*, 19(3), 387-454 p.

Miller, J. D. (1992). Fungi as contaminants in indoor air. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 26(12), 2163-2172 p.

Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 439-445 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.

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.

Nasraoui, B. (2006). Les champignons parasites des plantes cultivées. Biologie, Systématique, pathologie, maladie. Centre de publication universitaire. Tunisie, 78 p.

Nasraoui, B. (2015). Les champignons et pseudo-champignons pathogènes des plantes cultivées. Tunisie: Institut National Agronomique de Tunisie.

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.

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 mycotoxines. Thèse de doctorat : Génie des procédés et de l'environnement. L'institut national polytechnique de Toulouse, 145 p.

Oei, P ; avec la contribution de Nieuwenhijzen, B.N. (2005). La culture des champignons à petite échelle, *Agaricus et volvariella*.

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.
- Peraica, M., Radić, B., Lucić, A., Pavlović, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the world health organization*, 77(9), 754 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.
- Ranjbar, R., Roayaei Ardakani, M., Mehrabi Kushki, M. (2019). Identification of Toxigenic *Aspergillus* Species from Rice of Khuzestan and Mycotoxins in Imported Cereals. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 13(5), 355-373.
- Raper K.B, Fennel D.I. (1965). *The genus Aspergillus*. New-York, USA, William er Wilkinson, 209 p.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International journal of food microbiology*, 119, 3-10 p.
- Riba, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Lebrihi A. (2005). Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. *In symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques chimiques et la sécurité alimentaire*, Fès.
- Riba, A., Matmoura, A., Mokrane, S., Mathieu F., Sabaou N. (2013). Investigations on aflatoxigenic fungi and aflatoxins contamination in some nuts sampled in Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 7(42), 4974-4980 p.
- 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(5),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.
- Royer, G., TAP, J. (2003). Les mycotoxines. *Université Paris XII*, 1 p.

Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraeken, 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 p.

Senn-Irlet, B., Egli, S., Boujon, C., Kuchler, H., Küffer, N., Neukom, H. P., Roth, J.J. (2012). Protéger et favoriser les champignons. *Notice pour le praticien (49)*, Birmensdorf, Suisse, 12 P.

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.

Souza, R.G., Gomes, A.C., Naves, M.M., Mota, J.F. (2015). Nuts and Legume Seeds for Cardiovascular Risk Reduction: Scientific Evidence and Mechanisms of Action. *Nutrition reviews*, 73(6), 335-347 p.

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.

Tantaoui-Elaraki, A., Benabdellah, L., Majdi, M., Elalaoui, M. R., & Dahmani, A. (1994). Recherche de mycotoxines dans des denrées alimentaires distribuées au Maroc. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 14(3), 11-16 p.

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.

Turner, N. W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica chimica acta*, 632(2), 168-180 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.

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.

Vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat : Génie des procédés et de l'environnement, 145 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.

Wagacha, J.M., Mutegi, C.K., Christie, M.E., Karanja, L.W., 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): 10-23 p.

Xiaoling, C., Xiaoli, L., Shining, Z., Junping, G., Shuiping, W., Xiaoming, L., Yongcheng, L. (2010). Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *Journal of Ecology and Natural Environment*, 2(2), 017-024 p.

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.

Annexe

1. Milieu PDA « Potato dextrose agar »

- **Composition :**

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillé	1000 mL

- **Préparation :**

- Râper la pomme de terre et la mettre dans 500 mL d'eau distillé.
- Porte à l'ébullition pendant 30 min.
- On met l'Agar dans 500 mL d'eau distillé.
- Pressez la pomme de terre puis filtrée, le filtrat a été ajouté à la solution d'Agar.
- Ajouter le glucose.
- Le volume doit être compléter à 1000 mL.
- Autoclavage à 121°C pendant 2 h.

2. Milieu PDB « Potato dextrose Broth »

- **Composition :**

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Eau distillé	1000 mL

- **Préparation :**

- Râper la pomme de terre et la mettre dans 500 mL d'eau distillé.
- Porte à l'ébullition pendant 30 min.
- On met le glucose dans 500 mL d'eau distillé.
- Agitation.
- Pressez la pomme de terre puis filtrée, le filtrat a été ajouté à la solution de glucose.
- Le volume doit être compléter à 1000 mL.
- Autoclavage à 121°C pendant 2 h.

3. Calcule de rapport frontal (RF)

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

Les souches	Numéro des taches	Distance parcourue par soluté	Distance parcourue par solvant	Rapport frontal Rf
<i>Aspergillus terreus</i>	1	4.9	10.6	0.49
	2	5.3		0.51
	3	6.5		0.61
	4	7.6		0.72
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	3.7	10.7	0.35
	2	3.9		0.36
	3	4.9		0.46
	4	5.1		0.48
	5	5.8		0.54
	6	6.5		0.61
	7	7.5		0.7
	8	9.1		0.85
<i>Aspergillus flavus</i>	1	6	10.6	0.57
	2	6.6		0.62
	3	7.1		0.67
	4	7.8		0.74
	5	8.5		0.8
	6	9.7		0.92
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1.8	11	0.16
	2	3.3		0.3
	3	4.4		0.4
	4	5.4		0.49
	5	5.8		0.53
	6	6.4		0.58
	7	6.5		0.59
	8	7.6	0.69	

	9	8.2		0.75
<i>Aspergillus niger</i>	1	5.1	12.4	0.41
	2	5.8		0.47
	3	6.7		0.54
	4	7.3		0.59
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1	6.4	10.3	0.62
	2	7.4		0.72

Résumé

Peanuts, walnuts and almonds are oil-bearing nuts that provide a preferable substrate for molds that can lead to technological and health deterioration. To this end, the objective of this work is part of the mycotoxin problem starting with a mycological analysis: isolation and purification of the mycoflora of these nuts with these different marketed categories shelled, with shell, by two methods: Ulster and the classic dilution method. The results showed that almonds were the most contaminated with 43% of isolates, followed by walnuts with 36% and peanuts with 21%. The macroscopic and microscopic study made it possible to identify 6 fungal isolates of the *Aspergillus* genus (*A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.brasiliensis*, *A.terreus* and *A.ochraceus*) with a dominance of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* which reflects poor storage and marketing conditions. Then a detection and search for mycotoxins in the different species of *Aspergillus* by liquid fermentation of these species in the PDB medium for 14 days. The crude extracts were analyzed by thin layer chromatography (TLC) method under UV light (365 nm). The results show that all samples are contaminated by different mycotoxins (AFB1, AFB2, OTA, Gliotxin, etc.).

Keywords: Nuts, Fungi, Mycotoxins, CCM.

القول السوداني والجوز واللوز عبارة عن مكسرات تحتوي على الزيت وتوفر ركيزة مفضلة للعفن الذي يمكن أن يؤدي إلى تدهور تكنولوجي وصحي. وتحقيقاً لهذه الغاية، فإن الهدف من هذا العمل هو جزء من مشكلة السموم الفطرية بدءاً من التحليل الفطري: عزل وتنقية الفطريات لهذه المكسرات مع هذه الفئات المسوقة المختلفة المقشرة و بالقشرة بطريقتين: طريقة الستر وطريقة التخفيف الكلاسيكية. وأظهرت النتائج أن اللوز كان الأكثر تلوثاً بنسبة 43% من العزلات، يليه الجوز بنسبة 36% والقول السوداني بنسبة 21%. أتاحت الدراسة الميكروسكوبية والمجهريّة التعرف على 6 عزلات فطرية من جنس الرشاشيات (*A.ochraceus*، *A.flavus*، *A.fumigatus*، *A.niger*، *A.brasiliensis*، *A. terreus*) مع سيادة *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* مما يعكس سوء ظروف التخزين والتسويق. ثم تم الكشف والبحث عن السموم الفطرية في أنواع مختلفة من فطر *Aspergillus* عن طريق التخمير السائل لهذه الأنواع في وسط PDB لمدة 14 يوماً. تم تحليل المستخلصات الخام بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية (365 نانومتر). أظهرت النتائج أن جميع العينات ملوثة بالسموم الفطرية المختلفة (AFB1)، ، AFB2، ، OTA، جليوتكسين، الخ.

الكلمات المفتاحية: المكسرات، العفن، السموم الفطرية، CCM.

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : LEMLOUM Hiba
CHENNIB Sarra

Etude mycologique et mycotoxicologique des fruits secs (à coque) commercialisés dans la région de Constantine.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et Biotechnologie Fongique

Les arachides, les noix et les amandes sont des fruits à coque oléagineuses qui constituent un substrat préférable pour les moisissures pouvant entraîner une détérioration technologique et sanitaire. A cet effet, l'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de problématique de mycotoxine débutant par une analyse mycologique : isolement et purification de la mycoflore de ces fruits à coque avec ces différentes catégories commercialisées décortiquée, avec coque, par deux méthodes : Ulster et la méthode classique de dilution. Les résultats ont montré que les amandes étaient les plus contaminées avec 43 % des isolats, suivies par les noix avec 36 % et les arachides avec 21 %. L'étude macroscopique et microscopique a permis d'identifier 6 isolats fongiques du genre *Aspergillus* (*A.flavus*, *A.fumigatus*, *A.niger*, *A.brasiliensis*, *A.terreus* et *A.ochraceus*) avec une dominance d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus* qui témoignent les mauvaises conditions de stockage et de commercialisation. Ensuite une détection et une recherche de mycotoxines dans les différentes espèces d'*Aspergillus* par fermentation liquide de ces espèces dans le milieu PDB pendant 14 jours. Les extraits bruts ont été analysés par la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM) sous la lumière UV (365 nm). Les résultats montrent que tous les échantillons sont contaminés par différentes mycotoxines (AFB1, AFB2, OTA, Gliotxine, etc.).

Mots-clefs : Fruits à coques, Moisissure, Mycotoxines, CCM.

Laboratoires de recherche : laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'activité Microbienne (LaMyBAM) (U Constantine 1 Frères Mentouri).

Président du jury : Pr/ Mme. MIHOUBI Ilham (Pr – Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadrant : Dr BENSERRADJ Ouafa (MCA – Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur(s) : Dr GHORRI Sana (MCA – Université Frères Mentouri, Constantine 1).