

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun –Tiaret-  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master académique

**Domaine:** "Sciences de la Nature et de la Vie"

**Filière:** "Sciences Biologiques"

**Spécialité:** "Microbiologie Appliquée"

Intitulé du mémoire

**Étude physicochimique des espèces de moisissures  
productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans la  
région Tiaret**

**Présenté et soutenu publiquement par**

- Djihad BELHAOUAS
- Hanene LOUALI
- Fouzia BELAKRED

**Devant le Jury:**

- **Président:** Dr. KADDAR B.
- **Promoteur:** Dr. YEZLI W.
- **Co-promoteur:** Dr. MANSOURI D.
- **Examineur:** Dr. MEDJEBER N.

**Année universitaire: 2017–2018**



# *Remerciements*

*Tout d'abord, nous remercions DIEU, le tout puissant, qui nous a donné le courage et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadreur Mr. Wassim YEZZI, Maître de conférences -B- à l'université Ibn Khaldoun, Tiaret, pour ses orientations, son aide, sa rigueur scientifique et pour la confiance qu'il nous a accordé tout au long de cette étude.*

*Nos remerciements s'adressent également à Mr Dou el Kefel MANSOURI, Maître de conférences -B- à l'université Ibn Khaldoun, Tiaret.*

*Nous tenons à remercier Mr Bachir KADDAR et Melle Nacira MEDJEBER, Maîtres de conférences -B- à l'université Ibn Khaldoun, Tiaret, pour avoir bien accepté d'examiner ce travail.*

*Enfin, un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# *Dédicace*

*Nous dédions ce mémoire à :*

*Nos mères et nos pères qui nous ont ' soutenu sans relâche et nous ont donné la force et la volonté d'achever ce travail.*

*À nos sœurs, nos frères, nos nièces le bonheur de nos familles, nos cousins et cousines, nos tantes et oncles.*

*À nos chères amies sans exception.*

*Et à toutes les personnes que nous aimons.*

# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	i
LISTE DES FIGURES.....	ii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	iii
INTRODUCTION	

## **CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

I.Moisissures toxigènes .....	3
I.1. Genre <i>Aspergillus</i> .....	3
I.2. Genre <i>Penicillium</i> .....	3
I.3. Genre <i>Fusarium</i> .....	3
I.4. Les Facteurs favorisant la contamination des aliments par les moisissures.....	4
I.5. Conditions de toxigénèse.....	4
I.6. Mycotoxines.....	4
I.7. Facteurs affectant la production des mycotoxines.....	5
I.7.1. Facteurs physico-chimiques.....	5
I.7.1.1. Température.....	5
I.7.1.2. Activité en eau (Aw).....	5
I.7.1.3. pH.....	5
I.7.1.4. Présence d'oxygène.....	5
I.7.1.5. Composition du substrat.....	5

I. 7.2.Facteurs biologiques.....	6
I.7.2.1. Interactions microbiennes.....	6
I.8 Principales mycotoxines.....	6

## **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODE**

II. Matériel et méthodes.....	8
II.1. Objectif de travail.....	8
II.2. Date et lieu de travail.....	8
II.3. Matériel utilisé.....	8
II.3.1. Matériel biologique.....	8
II.3.2. Milieux de culture.....	8
II.3.3. Autre matériel.....	9
II.4. Protocole expérimental.....	9
II.4.1. Échantillonnage.....	11
II.4.2. Isolement à partir des grains de riz.....	11
II.4.3. Purification des isolats.....	11
II.4.3.1. Repiquage.....	11
II.4.3.2. Purification par culture monospore.....	11
II.4.4. Identification des moisissures.....	12
I.4.4.1. Identification macroscopique.....	12
I.4.4.2. Identification microscopique.....	12
II.4.5. Caractérisation physicochimique.....	12

II.4.5.1. Diversité de croissance sur différentes sources de carbone.....	13
II.4.5.2. Diversité de croissance sur différentes sources d'azote.....	13
II.4.5.3. Diversité de croissance à différentes températures.....	13
II.4.5.4. Diversité de croissance à différents pH.....	13
II.4.6. Filtration et pesée du mycélium.....	14
I.4.7. Analyses statistiques.....	14
II.4.7. Création d'une interface classifiant la croissance fongique.....	14

### **CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION**

III. Résultats et discussion.....	15
III.1. Isolement des moisissures.....	15
III.2. Purification des isolats.....	16
III.3. Identification macroscopique et microscopique des souches.....	17
III.4. Caractérisation physicochimique.....	20
III.4.1. Caractérisation de la croissance sur différentes sources de carbone.....	20
III.4.2. Caractérisation de la croissance sur différentes sources d'azote.....	22
III.4.3. Caractérisation de la croissance à différentes températures.....	24
III.4.4. Caractérisation de la croissance à différents pH.....	26
III.5. Programmation de l'interface.....	28
Discussion générale.....	31
CONCLUSION.....	34
ANNEXES.....	36

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	48
----------------------------------	----

Résumé

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau n° 01 :</b>	Appareillages et verreries de l'expérimentation	9
<b>Tableau n° 02 :</b>	Pourcentage de la population fongique isolée à partir du riz.	15
<b>Tableau n° 03 :</b>	Caractères macroscopiques des souches purifiées cultivées sur le milieu PDA.	18
<b>Tableau n° 04 :</b>	Caractères microscopiques des souches purifiées cultivées sur milieu PDA.	19
<b>Tableau n° 05 :</b>	Étude macroscopique et microscopique des différentes souches isolées de riz.	39
<b>Tableau n° 06 :</b>	Analyse de variance à un facteur de la croissance sur les différentes sources de carbone	45
<b>Tableau n° 07 :</b>	Analyse de variance à un facteur de la croissance sur les différentes sources d'azote.	45
<b>Tableau n° 08 :</b>	Analyse de variance à un facteur de la croissance sur les différentes températures.	45
<b>Tableau n° 09 :</b>	Analyse de variance à un facteur de la croissance sur les différents pH.	46

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure n° 01 :</b>	Schéma de Protocol expérimental.	10
<b>Figure n° 02 :</b>	Isolement des souches d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Rhizopus</i> .	16
<b>Figure n° 03 :</b>	Pourcentage des souches obtenues de chaque région.	16
<b>Figure n° 04 :</b>	Purification par culture monospores des souches de genre <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium</i> et <i>Penecillium</i> .	17
<b>Figure n° 05 :</b>	Moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée avec chaque source de carbone.	21
<b>Figure n° 06 :</b>	Moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées chaque source de carbone.	22
<b>Figure n° 07 :</b>	Moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée avec chaque source d'azote.	23
<b>Figure n° 08 :</b>	Moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées à chaque source d'azote.	24
<b>Figure n° 09</b>	Moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée à chaque température.	25
<b>Figure n° 10 :</b>	Moyenne de la croissance radiale hebdomadaire de l'ensemble des souches testées à chaque température.	26
<b>Figure n° 11 :</b>	Moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée à chaque pH.	27
<b>Figure n° 12 :</b>	Moyenne de la croissance hebdomadaire à l'ensemble des souches testée pour chaque pH.	28
<b>Figure n° 13 :</b>	Interface de classification « Croissance fongique».	29
<b>Figure n° 14 :</b>	Guide d'utilisation de l'interface « Croissance Fongique ».	30
<b>Figure n° 15 :</b>	Filtration et pesage de mycélium fongique.	37
<b>Figure n° 16 :</b>	Isolement et purification des différentes souches isolées de riz	38
<b>Figure n° 17 :</b>	Étude macroscopique et microscopique des souches purifiées.	42
<b>Figure n° 18 :</b>	Étude physicochimique de genre de genre <i>Aspergillus</i> souche (S2).	43

<b>Figure n° 19 :</b>	Étude physicochimique de genre <i>Penecillium</i> souche (M13).	43
<b>Figure n° 20 :</b>	Étude physicochimique de genre <i>Fusarium</i> souche (V221).	44

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFs : Aflatoxines totales.

Aw: activité de l'eau.

CDB : Czapeck Dox Broth.

DON: Déoxynivalénol.

Fbs : Fumonisines B.

OTA: Ochratoxine A.

PDA: Potato Dextrose Agar.

PDB: Potato Dextrose Broth.

spp. : Espèces.

ZEA: Zéaralénone.

FAO: Food and Agriculture Organisation.

# **INTRODUCTION**

Les céréales occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie mondiale, notamment le riz, avec une production de 741 millions de tonnes sur une superficie récoltée de 159 millions d'hectare en 2016 (FAO, 2016). L'Algérie tant qu'un pays importateur, la conservation post-récolte est le seul moyen d'assurer le lien entre la récolte de l'année et la consommation permanente.

Les récoltes conservées en général dans des conditions inadéquates, sont attaquées par des moisissures, qui sont des champignons microscopiques, eucaryotes, pluricellulaires filamenteux, ubiquistes et hétérotrophes, qui peuvent se reproduire soit sexuellement soit de façon asexuée (Toffa, 2015).

Ces champignons peuvent contaminer des milieux divers en provoquant des modifications physiques ou chimiques. Par ailleurs, dans des conditions propices de température, humidité, pH,..., les moisissures peuvent synthétiser des mycotoxines (Tabuc, 2007). Ces derniers sont des substances chimiques hautement toxiques. Actuellement, plus de 400 mycotoxines sont identifiées à l'échelle internationale. Seules quelques unes d'entre elles attirent l'attention des chercheurs et sont produites majoritairement par les espèces toxigènes des genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Zinedine et Idrissi, 2007).

Au vu des gigantesques pertes économiques (des milliers de tonnes chaque année) et des problèmes sanitaires dont les mycotoxines sont la cause (Toffa, 2015), des stratégies destinées à limiter et prévenir la contamination, mais aucun procédé de décontamination fiables permettant d'éliminer les mycotoxines (Lahouar, 2016). C'est pour cette raison, que nous avons opté pour l'étude des conditions physicochimiques contrôlant la prolifération ainsi que la production des mycotoxines par les micromycètes à fin de réduire l'abondance des espèces qui sont en compétition alimentaire.

# **Chapitre I**

## **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Moisissures toxigènes**

Plusieurs moisissures ont la capacité de produire des métabolites secondaires toxiques dans les produits agricoles notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Nguyen, 2007).

### **I.1. Genre *Aspergillus***

Ce genre appartenant à l'embranchement des Ascomycètes, est plus souvent associé aux régions à climat chaud. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C et se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales, etc. D'autres sont présentes dans l'air et la poussière (Lahouar, 2016). De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines : *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. ochraceus* (Tabuc, 2007).

### **I.2. Genre *Penicillium***

Ce genre appartenant à l'embranchement des Ascomycètes. Les espèces de *Penicillium* se développent dans des milieux humides, où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses 20-27°C. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition les céréales (Lahouar, 2016). La majorité d'espèces du genre *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines, tel que *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. verrucosum* et *P. islandicum* (Tabuc, 2007).

### **I.3. Genre *Fusarium***

Ce genre appartenant à l'embranchement des Ascomycètes, renferme des espèces phytopathogènes. Ces moisissures contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. La température optimale à la croissance des espèces de *Fusarium* est comprise entre 22 et 37°C. La majorité des espèces sont toxigènes, dont les principales sont *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticilloides* *F. proliferatum* et *F. culmorum* (Tabuc, 2007).

#### **I.4. Les facteurs favorisant la contamination des aliments par les moisissures**

Les moisissures sont généralement mésophiles (20-30°C), ce qui apparaît optimal pour la plupart des moisissures (Dérache, 1989). Elles sont xérotolérantes, la plupart se développent à une  $A_w$  située entre 0,85 et 0,99 (Toffa, 2015). Les moisissures se développent dans une large gamme de pH 3 à 8, avec une croissance optimale entre (pH5 à 6). Elles sont aérobies ayant besoin d'oxygène pour une croissance normale. La lumière favorise la maturation des conidies et la germination des spores. Les moisissures sont, généralement, indifférentes à l'action de lumière (Tabuc, 2007).

L'interaction microbienne, ou le phénomène de compétition est le plus répandu dans le monde vivant, où certaines espèces envahissent rapidement le milieu en inhibant le développement des autres espèces. La présence des insectes favorise la contamination des grains par les moisissures et sont considérés comme des vecteurs importants des spores (Lahouar, 2016).

#### **I.5. Conditions de toxogénèse**

Divers moisissures ayant la capacité de produire des mycotoxines, la production de ces métabolites nécessite des conditions environnementales plus étroites que celles permettant la croissance fongique, plus souvent, proches des conditions optimales de développement de l'espèce considérée (Tabuc, 2007).

#### **I.6. Mycotoxines**

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques de faible poids moléculaire (200-10000 Da), peut volatiles, peut solubles dans l'eau, très stable à la chaleur, également à l'acidité. Elles sont difficilement métabolisées par les organismes vivants et elles ont des origines chimiques diverses : acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique et acide cyclopiazonique) ou des polycycoacides (AFs, ochra, patuline et stréptomatocystine) ou bien des dérivés terpéniques (fusarénone...) (Mahideb et Merrouche, 2015).

Les mycotoxines sont synthétisées dans le mycélium et les spores et peuvent diffuser dans le substrat, en quantité suffisante. Elles sont susceptibles d'affecter la santé de l'Homme et d'animal, même si le microorganisme producteur n'est plus viable, leur toxicité peut persister longtemps (Halewyn *et al.*, 2002).

## **I.7. Facteurs affectant la production des mycotoxines**

### **I.7.1. Facteurs physico-chimiques**

#### **I.7.1.1. Température**

La température permettant une toxogénèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance, mais, le plus souvent, légèrement inférieure (Mahideb et Merrouche, 2015). Par exemple, la température optimale pour la croissance de *Fusarium graminearum* est de 25°C, mais la synthèse de la ZEA peut avoir lieu à 15°C. Alors que le DON sera majoritairement produit à 28°C (Tabuc, 2007).

#### **I.7.1.2. Activité en eau (Aw)**

L'activité hydrique nécessaire à la toxogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique. Le *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une Aw de 0,80. Par contre, la production d'OTA n'est possible que lorsque l'Aw est  $\geq 0,85$  (Lahouar, 2016).

#### **I.7.1.3. pH**

La gamme de pH permettant la toxogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique (Tabuc, 2007). La production de fumonisine B1 est maximale à un pH compris entre 3,7 et 4,2 (Lahouar, 2016).

#### **I.7.1.4. Présence d'oxygène**

La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO<sub>2</sub> a un effet dépresseur important sur la toxogénèse (Mahideb et Merrouche, 2015).

#### **I.7.1.5. Composition du substrat**

La composition qualitative et quantitative des substances nutritives et la présence de certaines molécules dans le substrat peut influencer la production des mycotoxines. La proline stimule la synthèse d'aflatoxine par *A. parasiticus* et *A. flavus*, alors que l'acide phytique diminue cette production (Tabuc, 2007).

## **I.7.2. Facteurs biologiques**

### **I.7.2.1. Interactions microbiennes**

La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacun des microorganismes producteurs. La présence d'*A. niger* inhibe la production d'aflatoxines par *A. flavus* (Lahouar, 2016). Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine (Mahideb et Merrouche, 2015).

## **I.8. Principales mycotoxines**

Actuellement plus de 400 mycotoxines sont identifiées à l'échelle internationale, seules quelques unes d'entre elles attirent l'attention des chercheurs. Ce sont les aflatoxines (AFs), l'ochratoxine A (OTA), la fumonisine B1 (FB1), la zéaralénone (ZEA) et les trichothécènes déoxynivalénol (DON) (Zinedine et Idrissi 2007).

- Aflatoxines
- Ochratoxine A
- Zéaralénone
- Fumonisines
- Trichothécènes

## **Chapitre II**

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1. Objectifs de travail**

- Isolement et identification des différentes moisissures productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans la région de Tiaret.
- Étude physicochimique des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines.
- Maîtrise des conditions permettant la prolifération des moisissures, ainsi la production des mycotoxines durant le stockage.
- Programmation d'interface de classification de la croissance fongique en fonction de ces paramètres physicochimiques.

### **II.2. Date et lieu de travail**

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun-Tiaret, à partir du 31 janvier jusqu'au 19 avril 2018.

### **II.3. Matériel utilisé**

#### **II.3.1. Matériel biologique**

Une collection fongique a été isolée, purifiée et identifiée à partir des échantillons collectés aux différents points de vente de la région de Tiaret

#### **II.3.2. Milieux de culture**

Les compositions des milieux de cultures utilisés dans ce travail sont représentées en Annexe n° 1.

- PDA (Potato-Dextrose-Agar).
- PDB (Potato-Dextrose-Broth).
- CDB (Czapeck-Dox-Broth).
- Agar 2%.

### II.3.3. Autre matériel

**Tableau n° 1 : Appareillage et Verreries d'expérimentation**

Appareillage	Verreries	Produits
Agitateur (IKAMAG AH) Autoclave (wolf,weskzeug, vorrichtungsbau 7340 geislingen). Balance analytique (KERN). Balance ordinaire (KERN). Bec bensèn Incubateur (Memmert). Microscope (OPTIKA B-350). pH mètre (LEYBOLD-HERAEUS.62865) Vortex (techno kartell TK3S).	Ance de platine. Bécher. Boîtes de Pétri. Éprouvettes. Erlenmeyers. Flacons. Lames. Pipette Pasteurs. Tube à essai.	Source de carbone : Amidon fructose glucose sucrose Lactose Sources d'azotes : Nitrate de potassium( $KNO_3$ ) Nitrate de sodium ( $NaNO_3$ ) Nitrate d'ammonium ( $NH_4NO_3$ ) Nitrite de sodium ( $NaNO_2$ )

### II.4. Protocol expérimental

Dans ce travail, nous avons choisi la culture de riz comme matériel végétal, vu son importance mondiale, sa valeur nutritionnelle, ainsi que sa sensibilité envers divers moisissures.

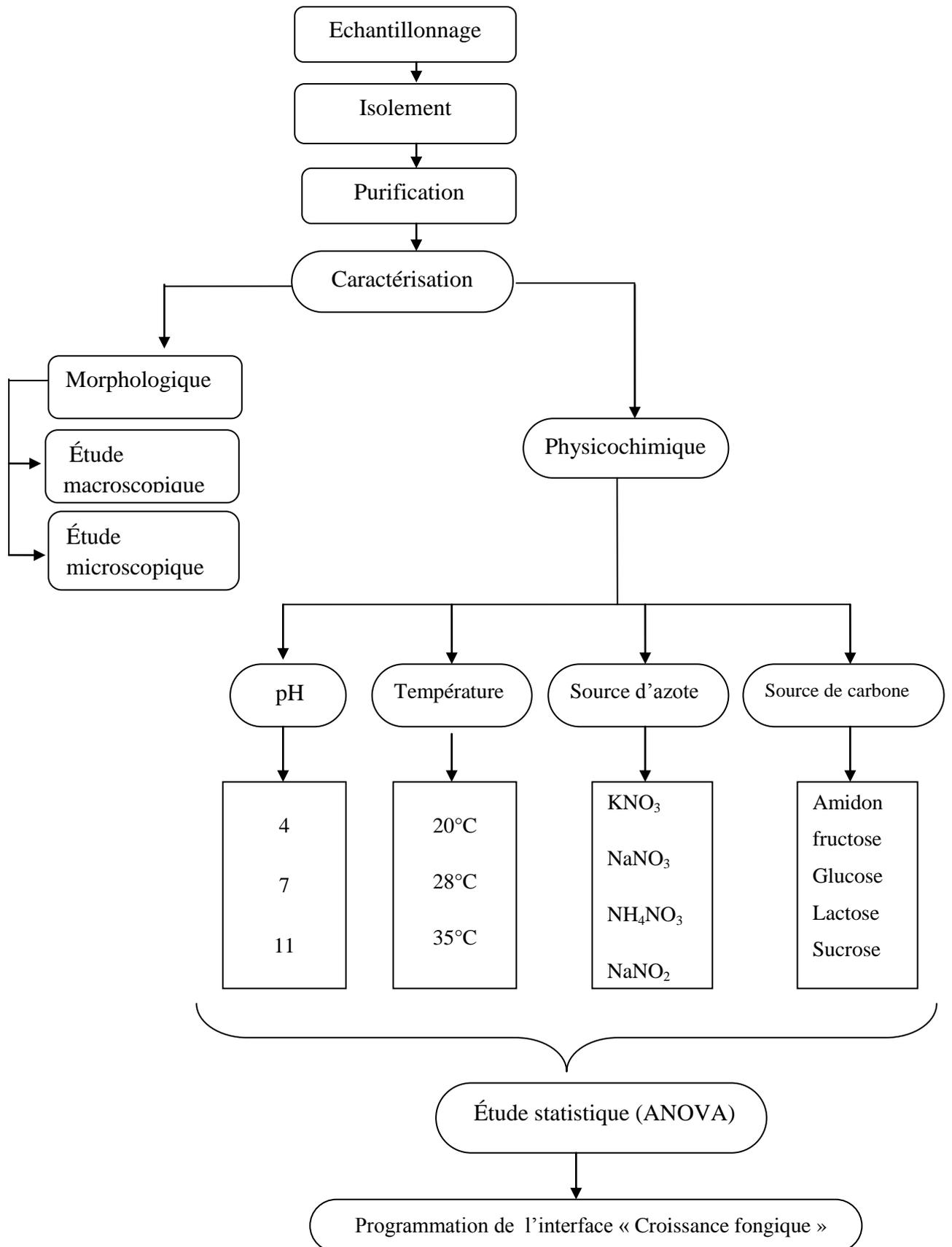


Figure n° 01 : Schéma du protocole expérimental.

### **II.4.1 Échantillonnage**

Dix (10) échantillons de riz commercialisés en Algérie, ont été collectés de différents fournisseurs de la wilaya de Tiaret. L'échantillonnage a été effectué de telle sorte que les échantillons prélevés soient de différentes origines et ce dans le but d'avoir une hétérogénéité des prélèvements.

Les dix régions à partir des quelles l'échantillonnage a été réalisé sont : Ain Dheb, Dahmouni, Frenda, Machraa sfa, Oued Lily, Sidi El Hossni, Sougeur, Tiaret (Rahma et cité de belle vue) et Tousnina.

### **II.4.2. Isolement à partir des grains de riz**

La technique d'isolement utilisée est celle décrite par Davet et Rouxel (1997) avec quelques modifications. Nous avons d'abord choisi (20 grains/ région), que nous avons ensuite désinfecté avec l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) 16° dilué à 30 % pendant trois minutes, afin d'éliminer les bactéries. Les grains ont été rincés trois fois avec de l'eau distillée stérilisée pour éliminer les traces de l'hypochlorite de sodium. Après rinçage, 10 grains ont été placés à l'aide d'une pince Brucelle stérile sur le milieu PDA (Annexe n° 1) + ATB (céfazoline). À la fin de cette étape, on a obtenu 20 boîtes à raison de deux répétitions pour chaque région. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C pendant 72 h.

### **II.4.3. Purification des isolats**

#### **II.4.3.1. Repiquage**

Après incubation, les isolats obtenus ont été repiqués en spots sur milieu PDA + ATB, pour séparer les différents morphotypes obtenus, représentant les différents genres fongiques.

#### **II.4 .3.2. Purification par culture monospore**

Le but de cette technique est d'obtenir un matériel fongique génétiquement homogène. La purification a été réalisée par culture monospore selon la méthode décrite par Henni *et al.* (1994) avec quelques modifications. Cette technique repose sur la préparation de dilutions décimales. Les cultures monospores ont été obtenues dans des conditions stériles. Trois fragments mycéliens ont été introduits dans 9 ml d'eau distillée stérilisée, que nous avons agité vigoureusement au vortex pour libérer les conidies. La suspension conidienne a été diluée jusqu' à  $10^{-3}$  à fin de décharger le nombre de conidies par millilitre. Un volume de 0.1 ml a été prélevé de la dilution  $10^{-3}$ , déposé et étalé sur la surface du milieu Agar 2 % (Annexe

n° 1) en boîte de Pétri. Après incubation à 28°C pendant 24 à 48 h, nous avons utilisé des pipettes Pasteur pour repiquer les germinations issues d'une seule et unique conidie. Les disques prélevés ont été placés à l'envers au centre des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA + ATB. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours.

#### **II.4.4. Identification des moisissures**

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux (identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique).

##### **I.4.4.1. Identification macroscopique**

Pour procéder à l'identification macroscopique des champignons purifiés, nous avons suivie la méthode décrite par (Booth, 1984 et Nelson *et al.*, 1981). Cette identification est basée sur des observations à l'œil nu. Nous avons noté les caractères cultureux notamment : la pigmentation de la face et de l'envers des colonies, le contour des colonies et l'aspect du mycélium.

##### **I.4.4.2. Identification microscopique**

Les caractères microscopiques ont été identifiés par la Technique du drapeau. Pour une bonne observation des caractères microscopiques des champignons, nous avons utilisé la technique décrite par Guezlane-Tebibel *et al.* (2011) qui permet d'examiner directement une culture mycélienne sur une lame et qui pourra être conservée par la suite. Cette technique consiste à prélever une empreinte sur le bord de la colonie fongique, par un fragment de ruban adhésif. Nous avons recollé ce dernier sur une lame, sur la quelle nous avons préalablement déposé une goutte de bleu de méthylène. Par la suite, on est passé directement à l'observation par microscope optique aux grossissements (Gr 100 et Gr 400).

#### **II.4.5. Caractérisation physicochimique**

L'étude des caractéristiques physicochimique représente un axe reflétant la diversité de croissance sur différents paramètres. Cette analyse a été réalisée en étudiant la croissance sur différentes sources de carbone, différentes sources d'azote, différents pH et différentes températures. Cette analyse a été réalisée pour voir est ce que ces paramètres influencent significativement la croissance fongique. La diversité de croissance sur ces différents facteurs a été analysée pour chaque souche séparée, ainsi que pour l'ensemble des souches utilisées.

#### **II.4.5.1. Diversité de croissance sur différentes sources de carbone**

La diversité de croissance sur différentes sources de carbone a été réalisée selon la méthode décrite par Farooq *et al.* (2005). Cette méthode permet aussi de mettre en évidence la source de carbone qui donne une croissance optimale. Elle consiste à l'utilisation de différentes sources de carbones, introduites dans des Erlenmeyers contenant 50 ml du bouillon CDB (Annexe n° 1). Les sources de carbone utilisées sont toutes des glucides : Amidon, Glucose, Fructose, Lactose et Sucrose. Chaque glucide a été utilisé comme seule source de carbone dans le milieu de base modifié CDB, ce qui a donné cinq milieux CDB modifiés : CDB-amidon, CDB-glucose, CDB-fructose, CDB-lactose et CDB-sucrose.

#### **II.4.5.2. Diversité de croissance sur différentes sources d'azote**

Pour étudier la diversité de croissance sur différentes sources d'azote, nous nous sommes basés sur la méthode décrite par Ramteke et Kamble (2011) avec quelques modifications. Cette méthode consiste à l'utilisation de différentes sources d'azotes, introduites dans le bouillon CDB. Nous avons utilisé quatre sources d'azote qui sont : Nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ), Nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ), Nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) et Nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ).

Chaque composé a été utilisé comme seule source d'azote dans le milieu de base modifié CDB, ce qui a donné quatre milieux CDB modifiés : CDB- $\text{KNO}_3$ , CDB- $\text{NaNO}_3$ , CDB- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et CDB- $\text{NaNO}_2$ .

#### **II.4.5.3. Diversité de croissance à différentes températures**

La méthode décrite par Desai *et al.* (2016) a été utilisée avec quelques modifications. Pour déterminer la diversité de croissance à différentes températures, et voir quelle est la température la plus favorable pour la croissance de nos souches, les souches ont été incubées sur bouillon PDB à 20, 28 et 35 °C.

#### **II.4.5.4. Diversité de croissance à différents pH**

La méthode décrite par Rathore *et al.* (2015) a été utilisée avec quelques modifications. Pour analyser la diversité de croissance de nos souches, ainsi que de mettre en évidence le pH qui leur permet une croissance optimale. Cette méthode consiste à préparer des milieux PDB séparés avec différents pH. La gamme de pH sur laquelle on a travaillé est : pH 4, pH 7 et pH

11. Ces pH ont été ajustés avec des solutions de chlorure d'hydrogène (HCl) et L'hydroxyde de sodium (NaOH).

#### **II.4.6. Filtration et pesée du mycélium**

Au bout de 7 jours, après apparition des biomasses mycéliennes dans les milieux de culture, on a procédé à la filtration à l'aide de la gaze stérile. Le mycélium a été récupéré et séché délicatement à l'aide d'un papier filtre, puis pesé sur une balance de précision.

#### **I.4.7. Analyses statistiques**

L'analyse des résultats expérimentaux et la représentation graphique ont été effectuées par logiciel Microsoft Office Excel 2007. Pour étudier la variabilité de croissance fongique, sous différents facteurs (sources de carbone, sources d'azote, pH et température), on a utilisé l'analyse de la variance (ANOVA). Cette méthode consiste à mettre en évidence l'effet d'un/des facteur(s) sur la croissance fongique. Dans ce contexte, le seuil de signification considéré est de 5 % ( $P < 0.05$ ).

#### **II.4.7. Création d'une application classifiant la croissance fongique**

En se basant sur les résultats des différents paramètres physicochimiques et les résultats théoriques, on a créé une application, qui nous permet de classer la croissance fongique dans différents intervalles. Ces derniers ont été nommés : Excellente croissance, Bonne croissance et faible croissance.

L'application est une interface graphique, conviviale, qui propose à l'utilisateur les différents choix, en menu déroulant, qui rentrent en interaction, reflétant les différents paramètres utilisés pour la caractérisation de la biodiversité de croissance fongique de nos souches d'*Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*.

L'application a été réalisée par le langage de programmation Python. Ce dernier, conçu par Guido van Rossum en 20 février 1991, est sous une licence libre et fonctionne sur plusieurs plates-formes informatiques. Il offre aux programmeurs des outils de haut niveau et une syntaxe simple à utiliser (Swinnen, 2012).

## **Chapitre III**

# **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

### III. Résultats et discussion

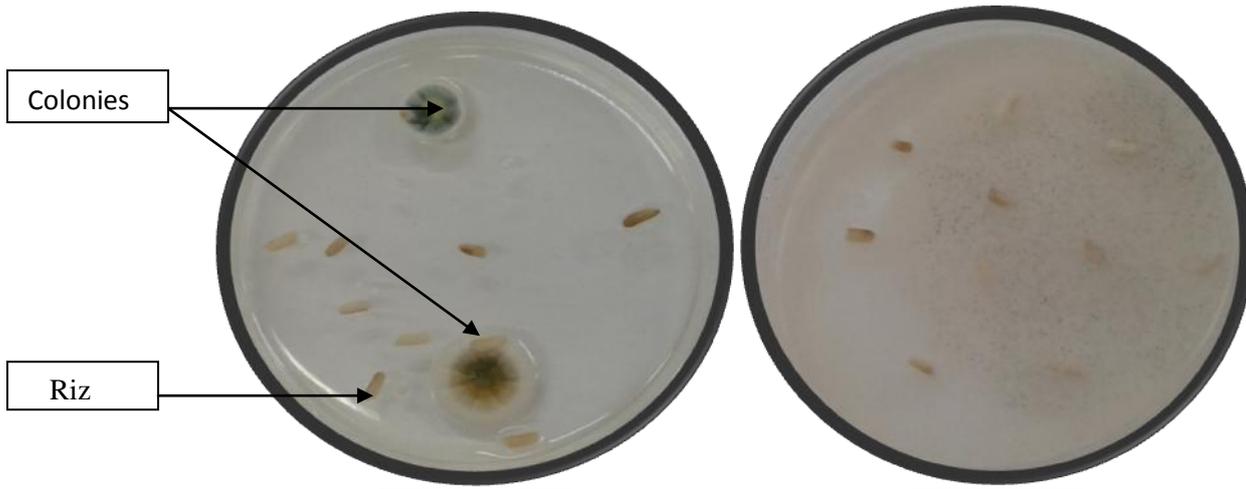
#### III.1. Isolement des moisissures

Nous avons utilisé 10 échantillons du riz pour l'isolement et la purification des moisissures répartition du nombre des moisissures obtenues à partir des échantillons est mentionnée dans le Tableau n°1.

**Tableau n° 2 :** Pourcentage de la population fongique isolée à partir du riz.

Région	Pourcentage
Ain Dhab	15%
Dahmouni	5%
Frenda	5%
Mechraa Sfa	15%
Oued Lili	5%
Sidi EL Hocni	5%
Sougueur	10%
Tiaret 1 (R)	10%
Tiaret 2 (v)	10%
Tousnina	10%

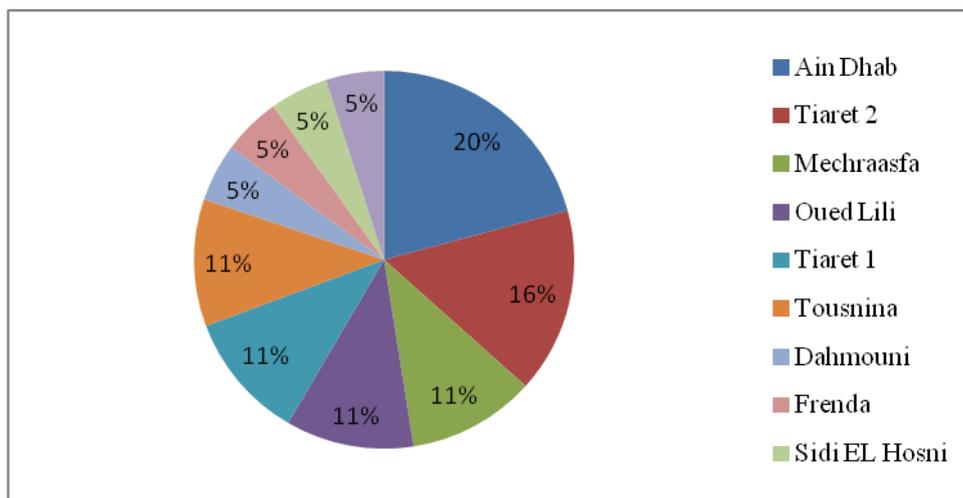
Les échantillons d'Ain Dhab et Mechraa Sfa ont un pourcentage plus élevé correspondant à 15 %. Un pourcentage de 10 % pour les échantillons des régions Oued Lili, Tiaret 1 et 2 et Tousnina. La plus faible croissance est celle obtenue dans les régions Dahmouni, Frenda, Sidi EL Hocni et Sougueur avec 5 %.



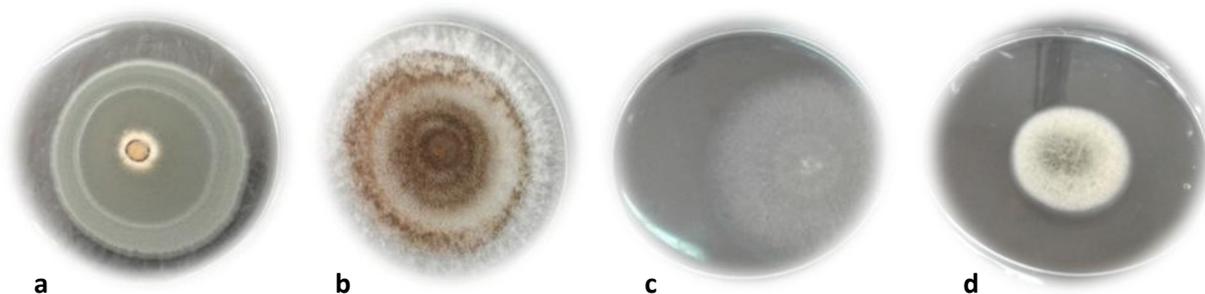
**Figure n° 2 :** Isolement des souches d'*Aspergillus* et de *Rhizopus*.

### III.2. Purification des isolats

La purification par culture monospore nous a permis d'obtenir 19 souches purifiées. La région Ain Dhab contient 4 souches, correspondant à 20% de la population fongique isolée. Leur nombre est très élevé par rapport à la région Tiaret 2 qui contient 3 souches correspondant à 16 %, et les régions Mechraa Sfa, Oued Lili, Tiaret 1 et Tousnina contiennent 2 souches correspondant à 11%. Le pourcentage le plus faible est de 5 % correspondant aux régions de Dahmouni, Frende, Sougeur et Sidi EL Housni, représentées par une seule souche.



**Figure n°3 :** Pourcentage de contamination de chaque région.



**Figure n°4:** Purification par culture monospores des souches.  
**a :** *Aspergillus* ; **b :** *Alternaria* ; **c :** *Fusarium* ; **d :** *Penicillium*.

### III.3. Identification macroscopique et microscopique des souches

Les résultats illustrés dans les Tableaux n° 3 et 4 représentent les caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques des souches obtenues.

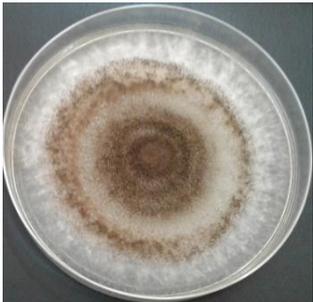
L'identification macroscopique, nous a permis de mettre en évidence trois morphotypes différents pour le genre *Aspergillus* : granuleux, duveteux et poudreux. Ces souches sont caractérisées par une pigmentation variable : brune-blanchâtre, blanche-verte à jaune-verte. Les observations microscopiques ont montré la présence d'un mycélium cellulaire (cloisonné), tête aspergillaire et des phialides.

Le morphotype cotonneux de *Penicillium* est caractérisé par une pigmentation blanche au vert foncé à gris. Les observations microscopiques ont montré la présence d'un mycélium cellulaire (cloisonné), l'organe fructifère a une organisation en pinceau, conidiophore ramifié en branches et des phialides en forme de verticilles.

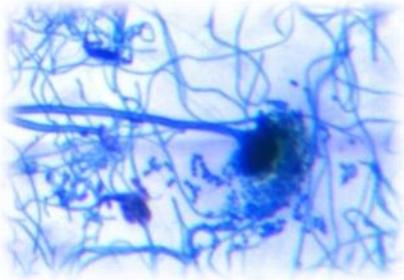
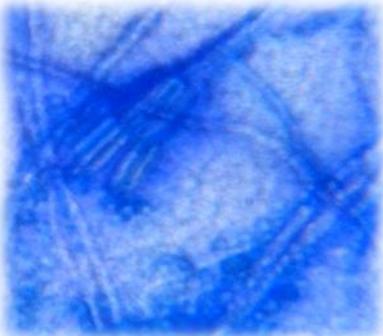
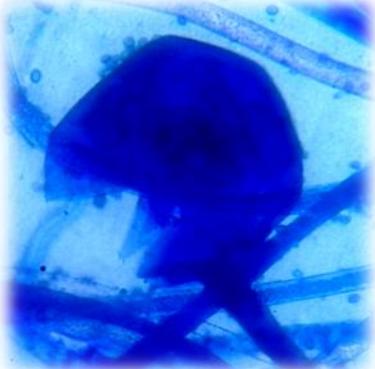
L'aspect duveteux pour le genre *Fusarium* est caractérisé par une pigmentation blanche. L'étude microscopique du genre a montré que le mycélium est cloisonné, avec présence de macroconidies, microconidies et des stromas globuleux.

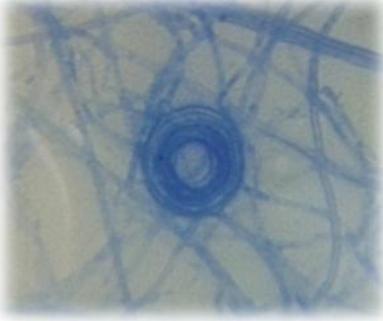
**Tableau n° 3:** Caractères macroscopiques des souches purifiées cultivées sur le milieu PDA.

Région	Code de la souche	Morphotype et pigmentation de la face de la colonie	Pigmentation de l'envers de la colonie	Observation macroscopique	Genre
Ain Dhab	A22	Aspect : granuleux  Pigmentation : brune-blanchâtre	Pigmentation : brune foncée		<i>Aspergillus</i>
	A23	Aspect : duveteux à poudreux Pigmentation : blanche-verte à jaune-verte	Pigmentation : verdâtre à jaunâtre		<i>Aspergillus</i>
Mechra Sfa	M13	Aspect : cotonneux Pigmentation : blanche-verte foncée.	Pigmentation Rouge-brune		<i>Penicillium</i>
Tiaret 2	V222	Aspect : duveteux Pigmentation: blanche	Pigmentation : blanche		<i>Fusarium</i>

Oued Lili	O21	Aspect : duveteux à granuleux Pigmentation : beige cannelle	Pigmentation: Marron-brune		<i>Alternaria</i>
-----------	-----	--	-------------------------------	--	-------------------

**Tableau n° 4 :** Caractères microscopiques des souches purifiées cultivées sur milieu PDA.

Souche	Description	Observation (Gr400)	Genre
<b>A22</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphes septées.</li> <li>- Tête aspergillaire : conidiophore qui se termine par une vésicule</li> <li>* Phialides.</li> <li>* Métules.</li> </ul>		<i>Aspergillus</i>
<b>M13</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphes septées.</li> <li>- Organisation en pinceau.</li> <li>- Conidiophore ramifié en branches.</li> <li>- Métules.</li> <li>- Phialides en forme de verticilles</li> <li>- Conidies disposées en longues chaînes.</li> </ul>		<i>Penicillium</i>
<b>SH3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphes non cloisonnées.</li> <li>- Sporocyste globulaire.</li> <li>- Columelle persistante coiffe le sporocyste.</li> <li>- Spores dispersées par l'éclatement de la paroi du sporosyste.</li> </ul>		<i>Rhizopus</i>

<b>T2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphe septé.</li> <li>- Présence de microconides bi-cellulaire, macroconidies avec 5 à 7 cloisons et stroma globuleux.</li> </ul>		<i>Fusarium</i>
<b>O21</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hyphes septées.</li> <li>- Conidiophore court.</li> <li>- Conidies disposé en chaînes ramifiées pluricellulaires et divisées par des cloisons longitudinales ou transversales (dictyospores).</li> </ul>		<i>Alternaria</i>

#### III.4. Caractérisation physicochimique

L'étude des facteurs physicochimiques représente un axe reflétant la diversité de croissance sur différents paramètres. Parmi les 19 souches isolées et purifiées, nous avons testé seulement 9 souches appartenant à trois genres mycotoxinogènes, qui sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.

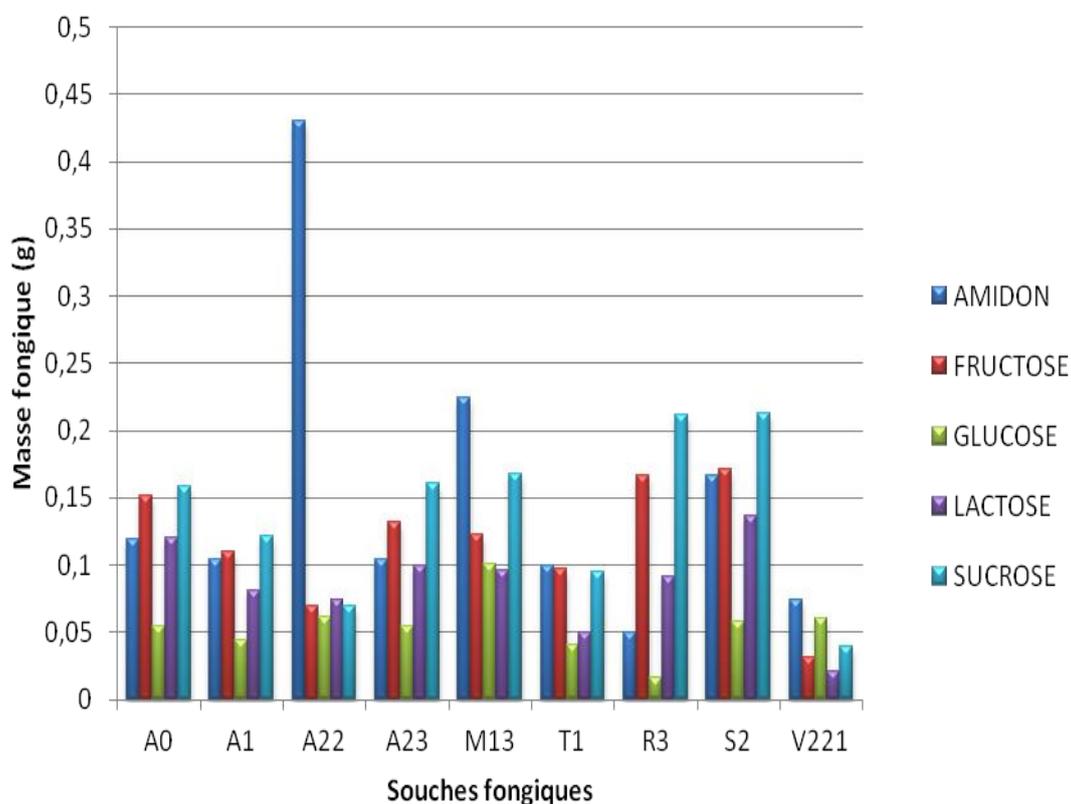
##### III.4.1. Caractérisation de la croissance sur différentes sources de carbone

Cette étude a été réalisée pour mettre en évidence la diversité de croissance sur différentes sources de carbone, ainsi que celle qui donne une croissance optimale. Le milieu CDB modifié a été utilisé tout en changeant la source de carbone (Amidon, Glucose, Fructose, Lactose et Sucrose).

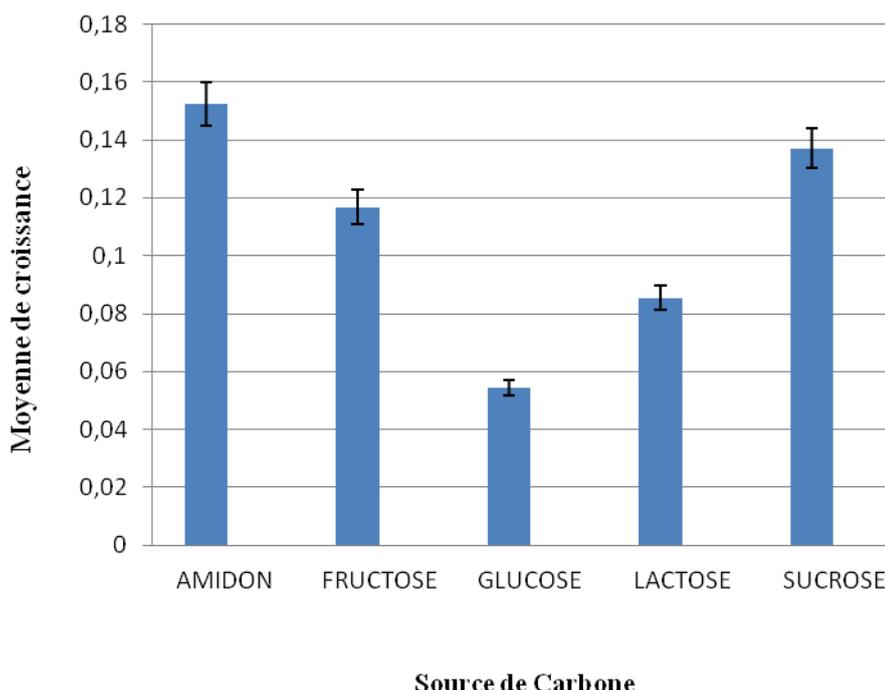
Les résultats illustrés sur la Figure n°5 représentent la moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée sur chaque source de carbone, ainsi que sur l'ensemble des sources de carbone. Ces résultats montrent qu'il n'y pas une différence de croissance significative entre les différentes souches, malgré que quelques souches poussent mieux sur une source de carbone différente de celle favorable pour la croissance des autres souches. On peut voir comme exemple, que les souches M13, T1 et V222 ont une biomasse relativement importante sur le milieu CDB-amidon; par contre, les souches A0, R3 et S2

poussent mieux sur le milieu CDB-sucrose. Concernant le milieu CDB-glucose, il semble être le moins favorable pour l'ensemble des souches testées.

Les résultats illustrés sur la Figure n° 6 représentent la moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées, sur les différentes sources de carbone. On voit qu'il y a une moyenne de croissance maximale de 0.152 g pour l'ensemble des souches sur le milieu CDB-amidon, suivie par le milieu CDB-sucrose, avec une moyenne de croissance de 0.137 g, puis le milieu CDB-fructose avec 0.116 g, le milieu CDB-lactose avec 0.085 g et en fin le milieu CDB-glucose avec 0.0542 g de moyenne. Ces résultats nous montrent qu'il y a une grande différence de la moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées. L'étude statistique a confirmée cette remarque et on a trouvé qu'il y a une différence significative de la croissance sur ces différentes sources de carbone ( $P < 0,05$ ) et que ce facteur est un facteur limitant. L'analyse de variance à un facteur de la croissance sur les différentes sources de carbone est représentée en Annexe n° 3.



**Figure n° 5:** Moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée avec chaque source de carbone.



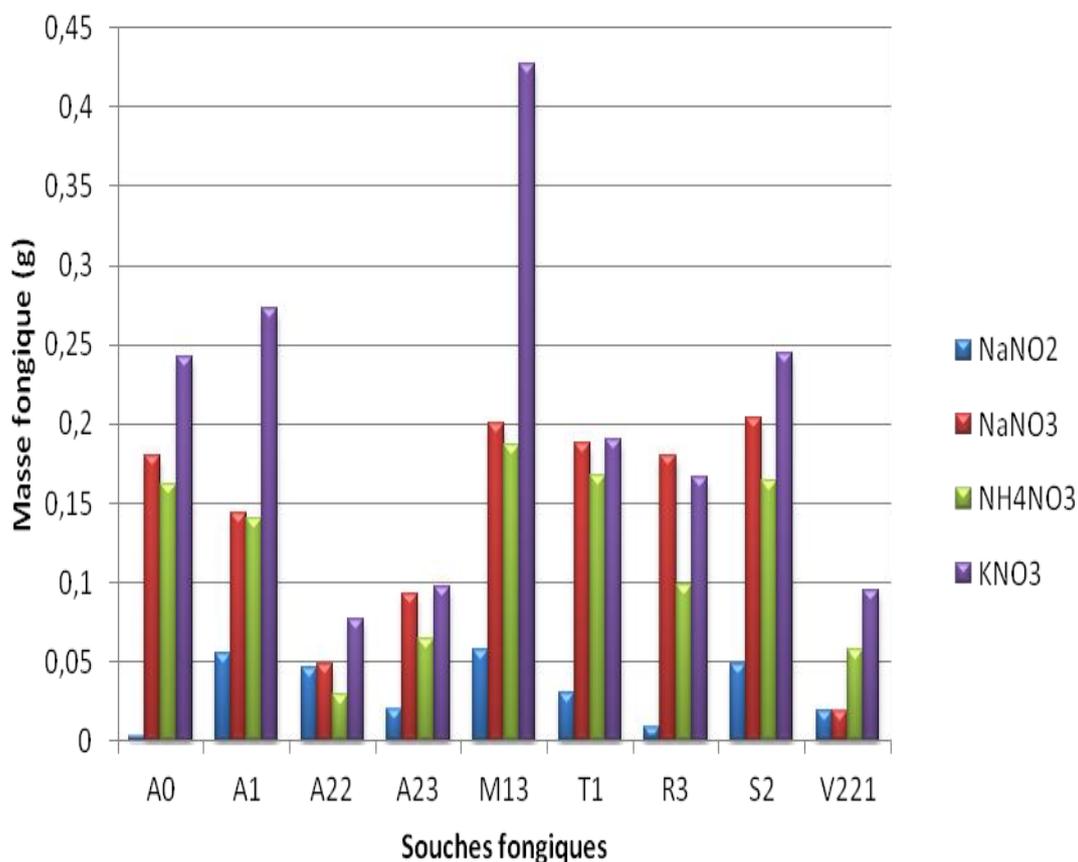
**Figure n°6:** Moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées à chaque source de carbone.

#### III.4.2. Caractérisation de la croissance sur différentes sources d'azote

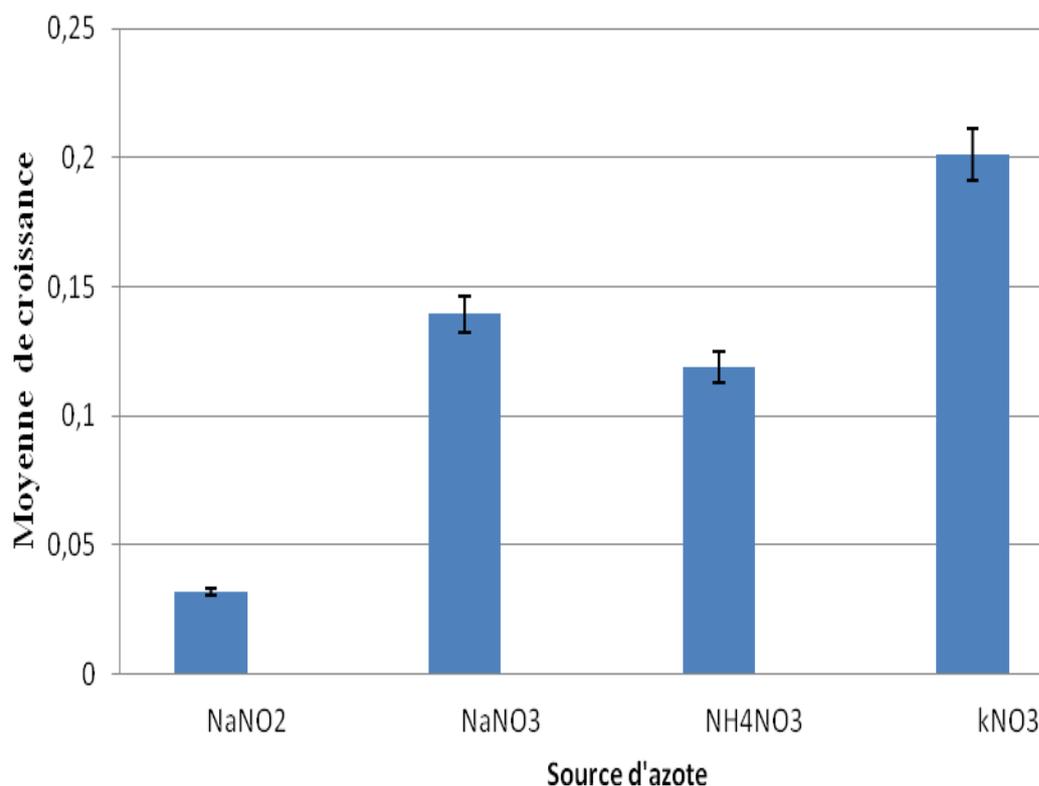
Cette étude a été réalisée pour mettre en évidence la diversité de croissance sur différentes sources d'azote, ainsi que celle qui donne une croissance optimale. Le milieu CDB modifié a été utilisé tout en changeant la source d'azote (Nitrate de potassium, Nitrate de sodium, Nitrate d'ammonium et Nitrite de sodium).

Les résultats illustrés sur la Figure n°7 représentent la moyenne de la croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée sur chaque source d'azote, ainsi que sur l'ensemble des sources d'azote. D'après ces résultats, on remarque qu'il n'existe pas une grande variabilité de croissance entre les différentes souches. Mais, certaines souches poussent mieux sur une source d'azote différente de celle qui est favorable pour la croissance des autres souches. On peut voir comme exemple que les souches A0, A1, A22, A23, T1, S2 et V221 ont une croissance relativement importante sur le milieu CDB-KNO<sub>3</sub>, par contre les souches R3 et M13 poussent sur le milieu CDB-NaNO<sub>3</sub>, concernant les deux autres milieux CDB-NaNO<sub>2</sub> et NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> sont les moins favorables pour l'ensemble des souches testées. Les résultats illustrés sur la Figure n°8 représentent la moyenne de croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées, sur les différentes sources d'azote. On voit qu'il y a une

moyenne de croissance maximale de 0.201g pour l'ensemble des souches sur le milieu CDB-KNO<sub>3</sub>, suivie par le milieu CDB- NaNO<sub>3</sub>, avec une moyenne de croissance de 0.139 g, puis le milieu CDB-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> avec 0.118 g et en fin le milieu CDB-NaNO<sub>2</sub> avec 0.031 g de moyenne. Ces résultats nous montrent qu'il y a une grande différence de la moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées. L'étude statistique a confirmée cette remarque et on a trouvé qu'il y'a une différence significative de la croissance sur ces différentes sources d'azote ( $P < 0,05$ ) et que ce facteur est un facteur limitant. L'analyse de variance à un facteur de la croissance sur les différentes sources d'azote est représentée en Annexe n° 3.



**Figure n° 7:** Moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée avec chaque source d'azote.



**Figure n° 8:** Moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées à chaque source d'azote.

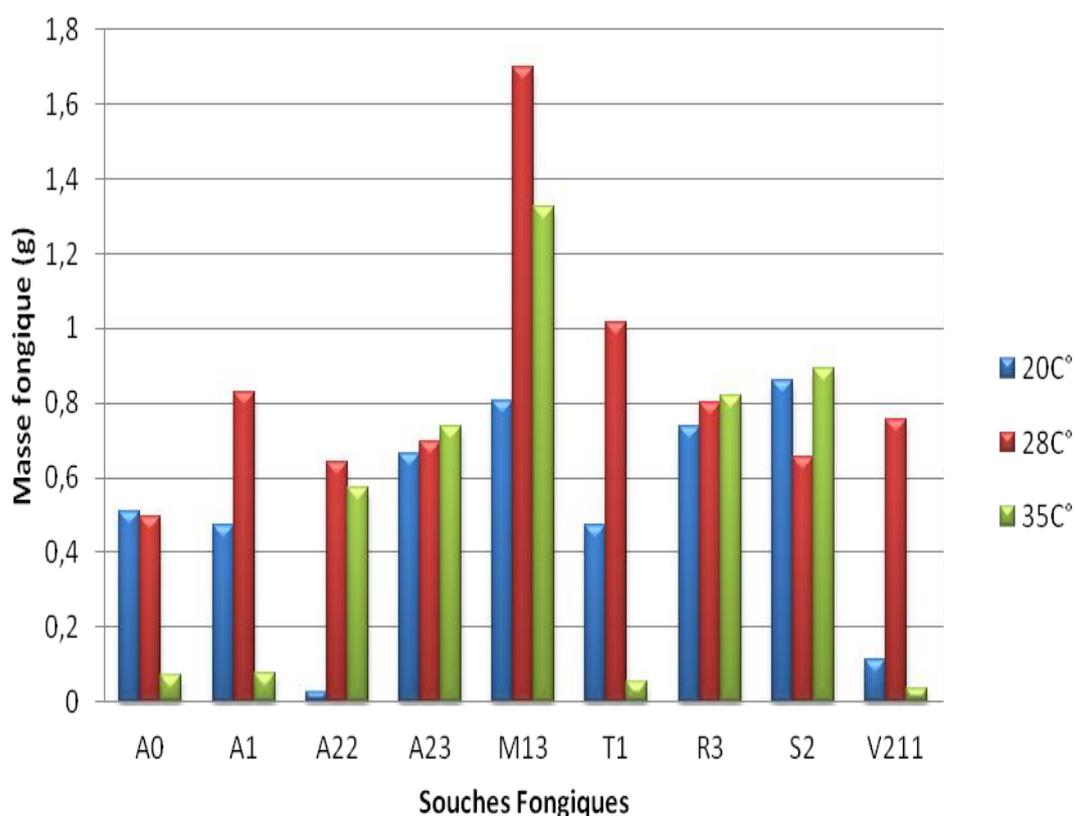
### III.4.3. Caractérisation de la croissance à différentes températures

Cette étude a été réalisée pour mettre en évidence la diversité de croissance à différentes températures, ainsi que, celle qui donne une croissance optimale. Le milieu PDB a été utilisé pour effectuer cette étude.

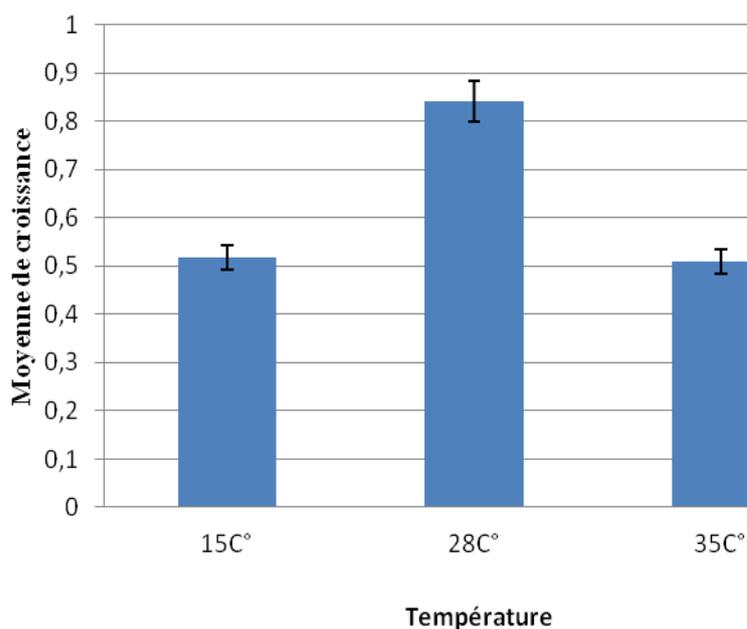
Les résultats illustrés sur la Figures n°9 représentent la moyenne de la croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée à chaque température. D'après ces résultats, on remarque qu'il existe une grande variabilité de croissance entre les différentes souches. La plus part des souches ont une croissance optimale à 28°C, à l'exception de : A23, R3 et S2, qui poussent mieux à 35°C. On remarque aussi qu'une seule souche A0 a poussé à 20°C.

Les résultats illustrés sur la Figure n°10 représentent la moyenne de croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées, aux différentes températures. On voit qu'il y a une moyenne de croissance maximale de 0.842 g pour l'ensemble des souches à 28°C, suivie par la température 20°C, avec une moyenne de croissance de 0.518 g, et en fin la température 35°C avec 0.510 g.

Ces résultats nous montrent qu'il n'y a pas une grande différence, surtout qu'il s'agit de la moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches testées. L'étude statistique a confirmée cette remarque et on a trouvé qu'il n'y a pas une différence significative de la croissance à ces différentes températures ( $P > 0,05$ ) et que ce facteur ne n'est pas un facteur limitant. L'analyse de variance à un facteur de la croissance à différentes températures est représentée en Annexe n° 3.



**Figure n° 9 :** Moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée à chaque température.



**Figure n° 10 :** Moyenne de la croissance radiale hebdomadaire de l'ensemble des souches testées à chaque température.

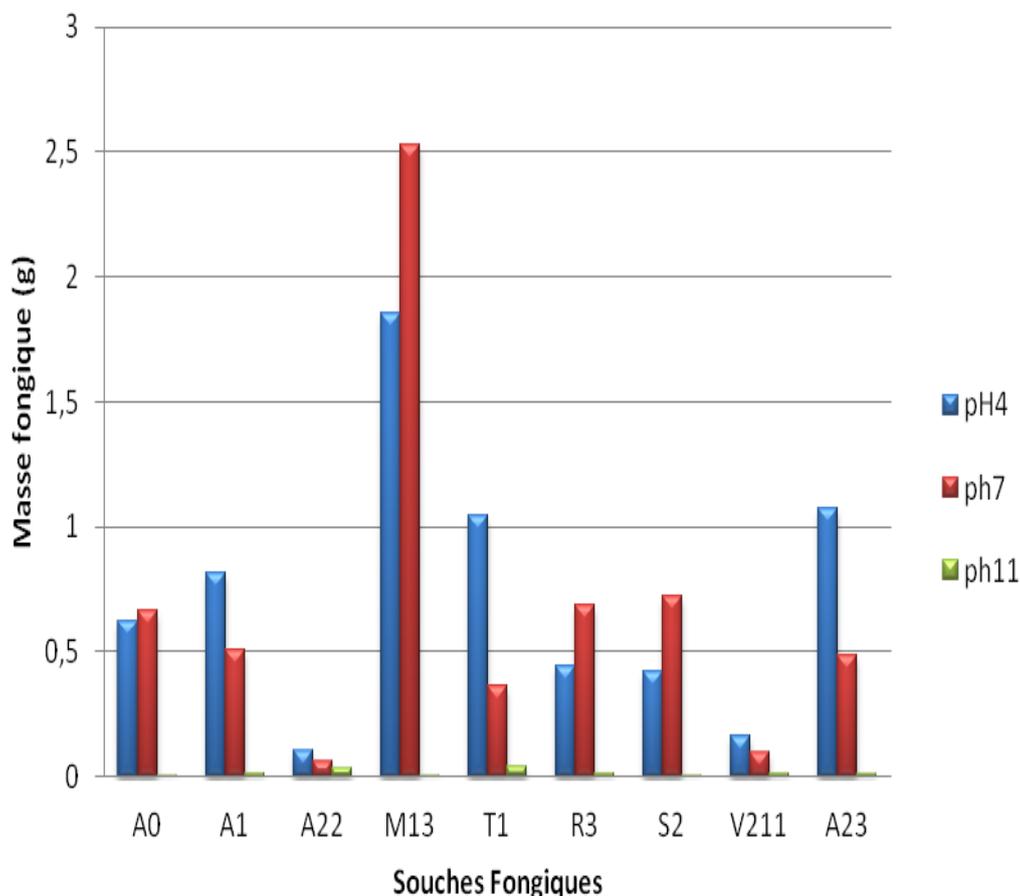
#### III.4.4. Caractérisation de la croissance à différents pH

Cette étude a été réalisée pour mettre en évidence la diversité de croissance à différents pH, ainsi que celui qui permet une croissance optimale. Le milieu PDB a été utilisé pour effectuer cette étude.

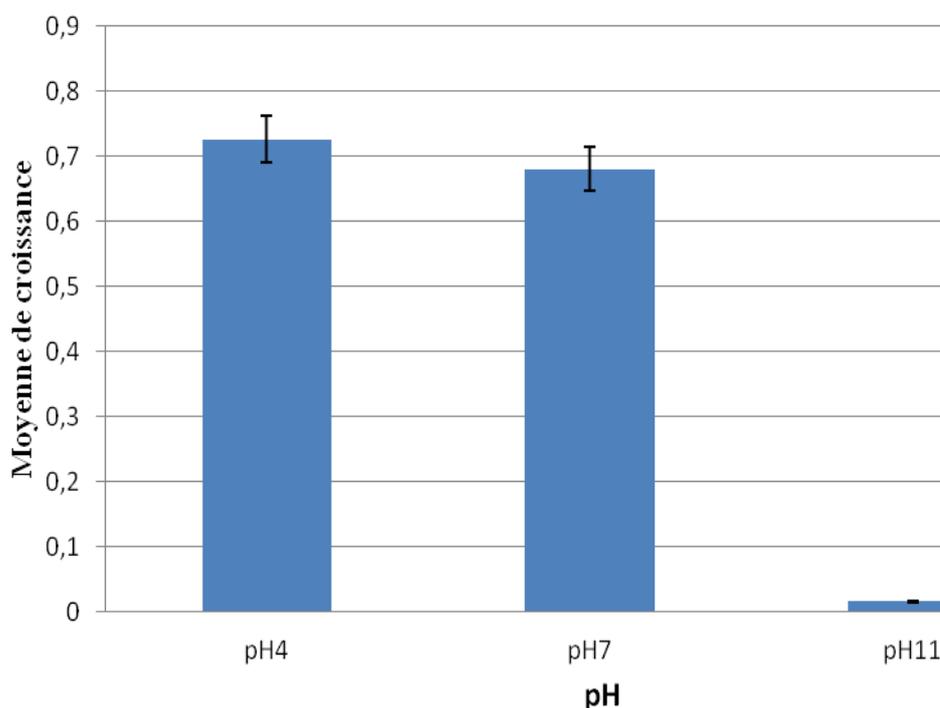
Les résultats illustrés sur la Figures n° 11 représentent la moyenne de la croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée à chaque pH. D'après ces résultats, on remarque qu'il n'existe pas une grande variabilité de croissance entre les différentes souches. On remarque que les souches A1, A22, T1, V211 et A23 ont une croissance optimale à pH 4. On voit aussi, qu'il une croissance moyenne à pH 7 pour les souches A0, M13, R3 et S2 et toutes les souches, sans aucune exception ont très faible croissance à pH11.

Les résultats illustrés sur la Figure n° 12 représentent la moyenne de croissance radiale hebdomadaire de l'ensemble des souches testées, aux différents pH. On voit qu'il y a une moyenne de croissance maximale de 0.726 g pour l'ensemble des souches à pH 4, suivie par le pH 7, avec une moyenne de croissance de 0.680 g et en fin le pH 11 avec une moyenne de croissance 0.016 g.

Ces résultats nous montrent qu'il y a une grande différence, surtout qu'il s'agit de la moyenne de la croissance hebdomadaire de l'ensemble des souches de testées. L'étude statistique a confirmée cette remarque et on a trouvé qu'il y a une différence significative de la croissance à ces différents pH ( $P < 0,05$ ) et ce facteur est un facteur limitant. L'analyse de variance à un facteur de la croissance à différents pH est représentée en Annexe n°3.



**Figure n°11 :** Moyenne de croissance hebdomadaire (6 jours) de chaque souche testée à chaque pH.



**Figure n° 12:** Moyenne de la croissance hebdomadaire à l'ensemble des souches testée pour chaque pH.

### III.5. Programmation de l'interface

En se basant sur les résultats de croissance de nos souches sur différents paramètres physicochimiques, nous avons programmé une interface que nous avons nommé « Croissance Fongique », qui permet à l'utilisateur de classer la croissance fongique dans trois intervalles. Ces intervalles ont été nommés : Excellente croissance, bonne croissance et Faible croissance.

L'interface contient sur la droite cinq listes déroulantes de choix correspondant aux : Nom du champignon, milieu de culture, source de carbone, source d'azote, température et pH. En bas de ces listes un bouton «Démarrer» et un autre bouton «Quitter». Au centre de l'interface s'affiche le résultat de la croissance.

Pour obtenir le résultat de la croissance de nos souches, il suffit de choisir les paramètres de cultures affichés sur les listes déroulantes et cliquer sur le bouton « Démarrer ». Le résultat s'affiche automatiquement au milieu de l'interface. Les Figures n° 13 et 14 représentent l'affichage de l'interface.

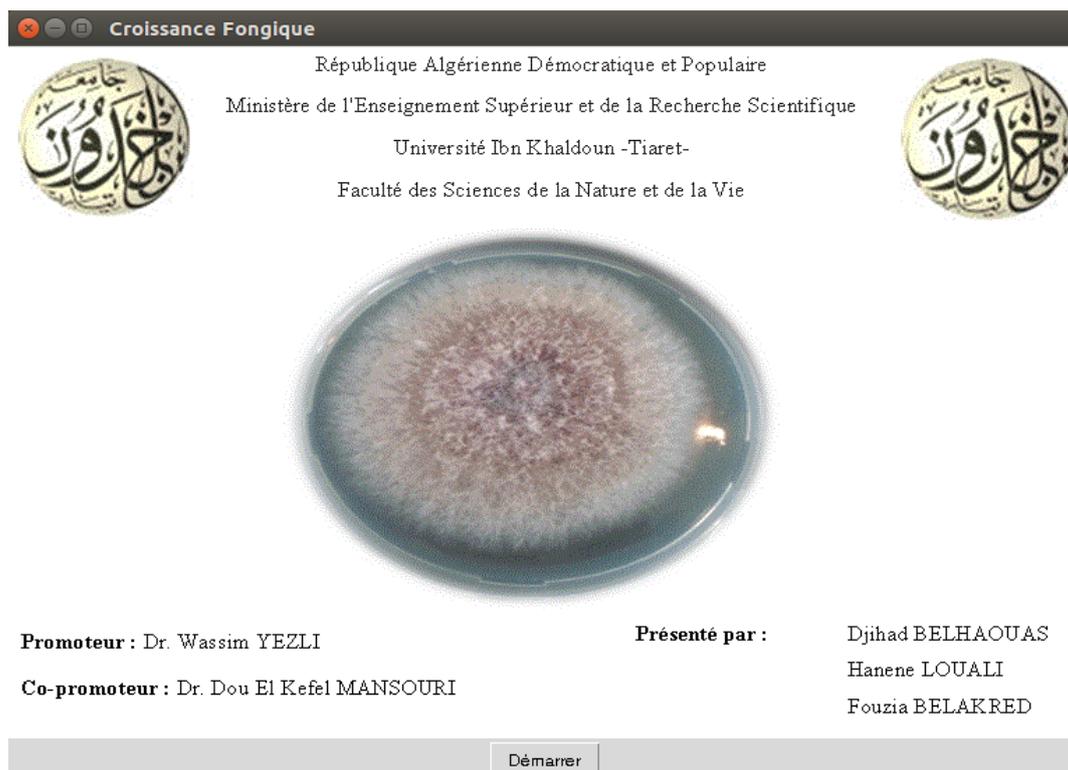


Figure n° 13: Interface de classification « Croissance fongique»

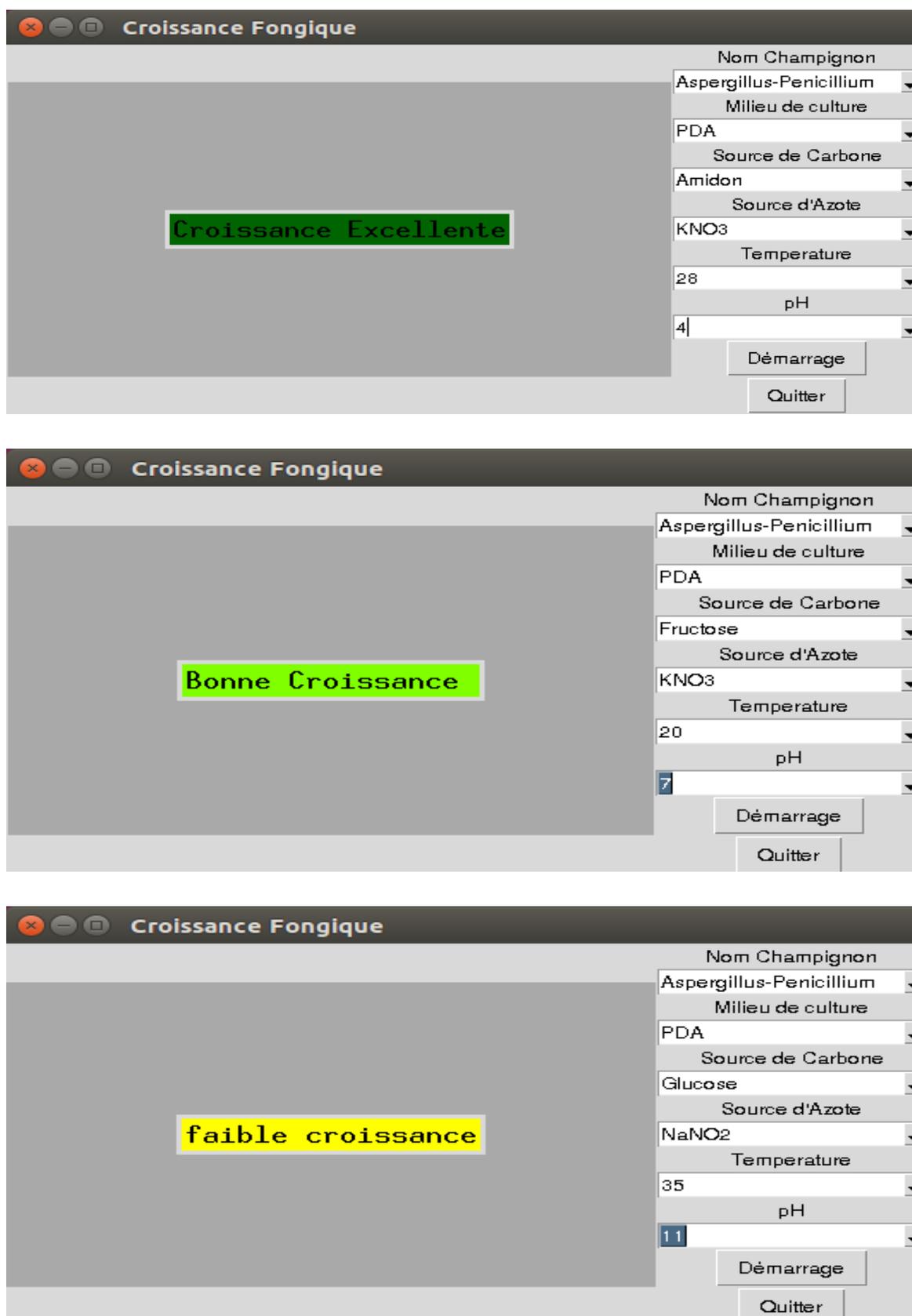


Figure n° 14: Guide d'utilisation de l'interface « Croissance Fongique ».

## Discussion générale

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une étude physicochimique des espèces de moisissures toxigènes (*Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*), qui sont des agents responsables de gigantesques pertes économiques et de véritables problèmes sanitaire.

L'identification macroscopique, nous a permis de mettre en évidence trois morphotypes différents pour le genre *Aspergillus*. Les morphotypes obtenus sont : granuleux, duveteux et poudreux. Ces souches sont caractérisées par une pigmentation variable : vert gris, vert jaune, brun blanc. Les observations microscopiques ont montré la présence d'un mycélium cellulaire (cloisonné), tête aspergillaire et des phialides. Cette diversité morphologique du genre *Aspergillus* a été déjà décrite dans les travaux de Cahagnier *et al.* (1998).

Le morphotype cotonneux de *Penicillium* est caractérisé par une pigmentation blanche au vert foncé à gris. Les observations microscopiques ont montré la présence d'un mycélium cellulaire (cloisonné), l'organe fructifère a une organisation en pinceau, conidiophore ramifié en branches et des phialides en forme de verticilles. Ces résultats sont confirmés par les études sur les caractères morphologiques du genre *Penicillium* réalisées par Pitt (1979).

L'aspect duveteux pour le genre *Fusarium* est caractérisé par une pigmentation blanche. L'étude microscopique du genre a montré que le mycélium est cloisonné, présence de macroconidies, microconidies et des stromas globuleux. Ces résultats sont en concordance avec ceux décrits par Yezli (2016) dans son étude sur la biodiversité et l'écologie de *Fusarium*.

L'étude de l'influence de la source de carbone sur la croissance des souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* a montré que les sources de carbone les plus appropriées sont l'amidon puis le sucrose suivi par le fructose avec une différence significative. Ces résultats sont confirmés par ceux de Badoc *et al.* (2007), qui ont trouvé que l'amidon, sucrose, fructose et le glucose permettent une croissance optimale. En revanche, Bernard-Trique (1968) a trouvé que le glucose et le sucrose sont les plus favorables pour la croissance d'*Aspergillus* et *Penicillium*.

La source de carbone la plus appropriée pour le développement de *Fusarium* est le glucose, suivi par le fructose et le sucrose et une faible croissance en présence de lactose et d'amidon. D'après l'étude de Yezli (2017), on voit que les sources de carbone les plus

appropriées sont le fructose, sucrose et glucose. Cela peut être lié à la grande biodiversité de ce genre fongique.

L'étude de l'influence de la source d'azote sur la croissance des trois genres testés a montré que la source d'azote la plus assimilable par ces champignons est le  $\text{KNO}_3$ , suivi par  $\text{NaNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Badoc *et al.* (2007) ont trouvé que  $\text{KNO}_3$  est favorable pour la croissance d'*Aspergillus* et *Penicillium* et défavorable pour *Fusarium*.

D'après l'étude de Yezli (2017) a montré que la source d'azote la plus assimilable par le *Fusarium* est le  $\text{NaNO}_3$ , vu que ce dernier peut s'adapter et se développer sur différentes sources d'azote.

Nous avons enregistré un meilleur développement pour *Aspergillus* et *Penicillium* à pH 4 et pH 7. Le pH 11 est le moins favorable pour l'ensemble des genres, avec une différence significatifs. Grigoryan *et al.* (2015) ont montré que la croissance des espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* se situe entre pH 3 et 10 avec un optimum entre 4 et 6.5. wheeler *et al.* (1990) ont montré que les *Aspergillus* spp. Tolèrent beaucoup plus les pH alcalins alors que les *Penicillium* spp. tolèrent les pH acides.

Nous avons constaté que la variation de la température n'influence pas significativement la croissance des souches testées, puisque la fourchette de température dans laquelle nous avons travaillé n'est pas assez large. Nous avons obtenu une croissance maximale du mycélium fongique des trois genres à une température de 28°C. Cette croissance diminue à 20°C et à 35°C. Shehu *et al.* (2011) ont montré que les espèces d'*Aspergillus* associées aux céréales se développent à une température optimale entre 30 et 35°C. Par contre, les espèces de *Penicillium* poussent à une température optimale qui varie entre 25 et 30°C selon Lahlali *et al.* (2005).

## **CONCLUSION**

Au cours de notre étude, menée sur l'étude de la flore fongique potentiellement productrice de mycotoxines, isolée à partir des grains de riz, les analyses mycologiques effectuées sur les dix échantillons de riz ont permis d'isoler 19 souches fongiques.

La purification et l'identification des souches isolées ont donné la possibilité d'identifier dix genres de moisissures: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Absidia*, *Stemphiliium* et *Mucor*, dont on compte neuf souches appartenant à trois genres mycotoxinogènes (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*).

L'étude physicochimiques des neuf souches mycotoxinogènes, appartenant aux 3 genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, fait apparaitre que les sources de carbones, d'azotes et le pH sont des facteurs limitant, ainsi leur variation influence significativement la croissance des souches. Les facteurs donnant une croissance optimale sont l'amidon,  $KNO_3$  et un pH4. En revanche, la température n'influence pas significativement la croissance fongique et 28°C est la température la plus favorable pour la croissance optimale des souches étudiées.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire qu'il reste comme perspectives de faire des études plus poussées, sur la contamination par les mycotoxines dans le riz au cours du stockage, comme on propose d'étudier l'influence d'une large gamme de température et d'humidité sur l'accumulation des mycotoxines dans les céréales, ainsi il est important aussi d'étudier l'effet de la compétition entre les champignons mycotoxinogènes sur la croissance et la production des mycotoxines.

# **ANNEXES**

## ANNEXE N° 1

### Composition des milieux de culture

Les milieux de culture ont été autoclaves à 121°C pendant 15 minutes sous une pression de 1 bar.

#### Milieu PDA pH 6,5 (Bouhot ,Billote 1964).

Pomme de terre .....	200 g
Dextrose .....	20 g
Agar agar .....	20 g
Eau distillée .....	1000 ml

Le milieu PDB a la même composition que celle du PDA, mais il est dépourvu d'agar-agar.

#### Milieu Agar 2 % (Downes et Ito, 2001).

Agar agar .....	20 g
Eau distillée .....	1000 ml

#### Milieu CDB pH 6,5 (Thom et Church, 1926).

Sucrose .....	30 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
KCl .....	0.5 g
Na <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> .....	2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O .....	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0.01 g
Eau Distillée .....	1000ml

## ANNEXE N° 2

### Les résultats de isolement purification et la caractérisation morphologique et physicochimique

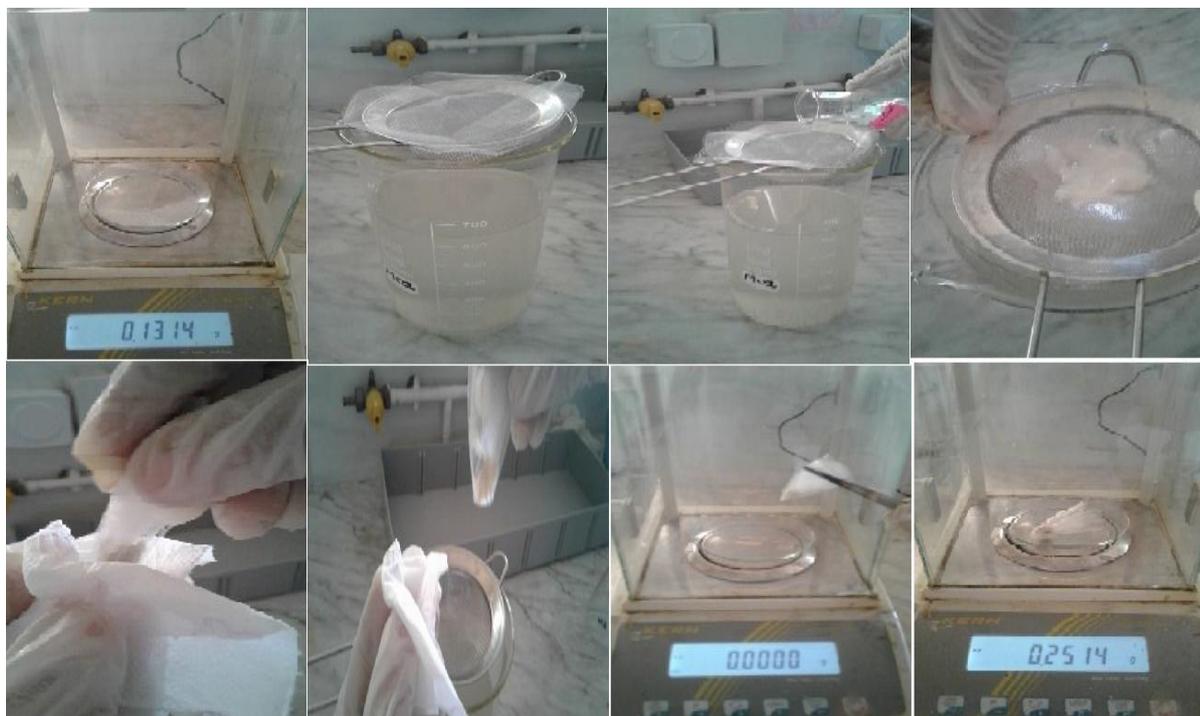
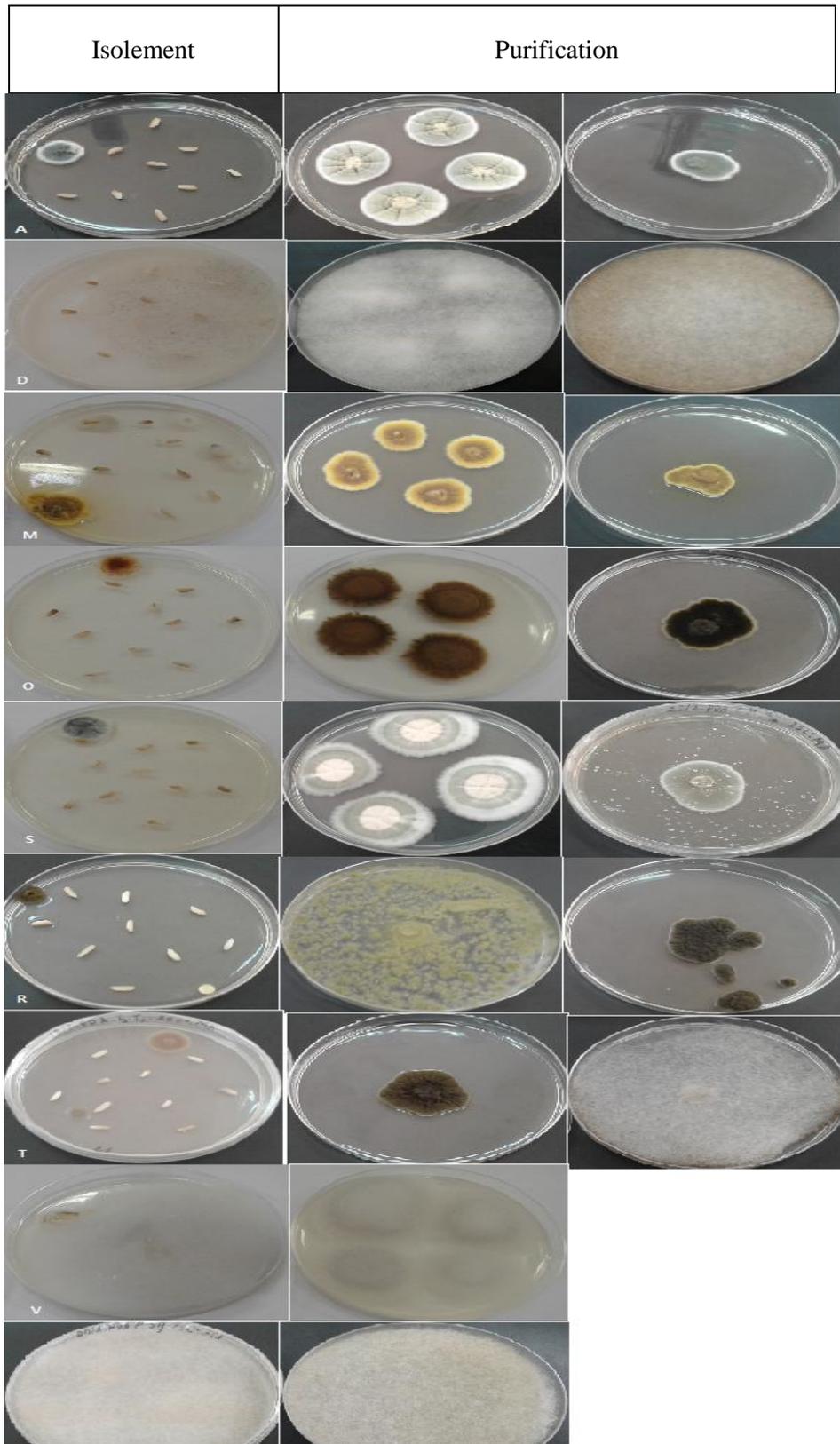


Figure n° 15 : Filtration et pesage de mycélium fongique.

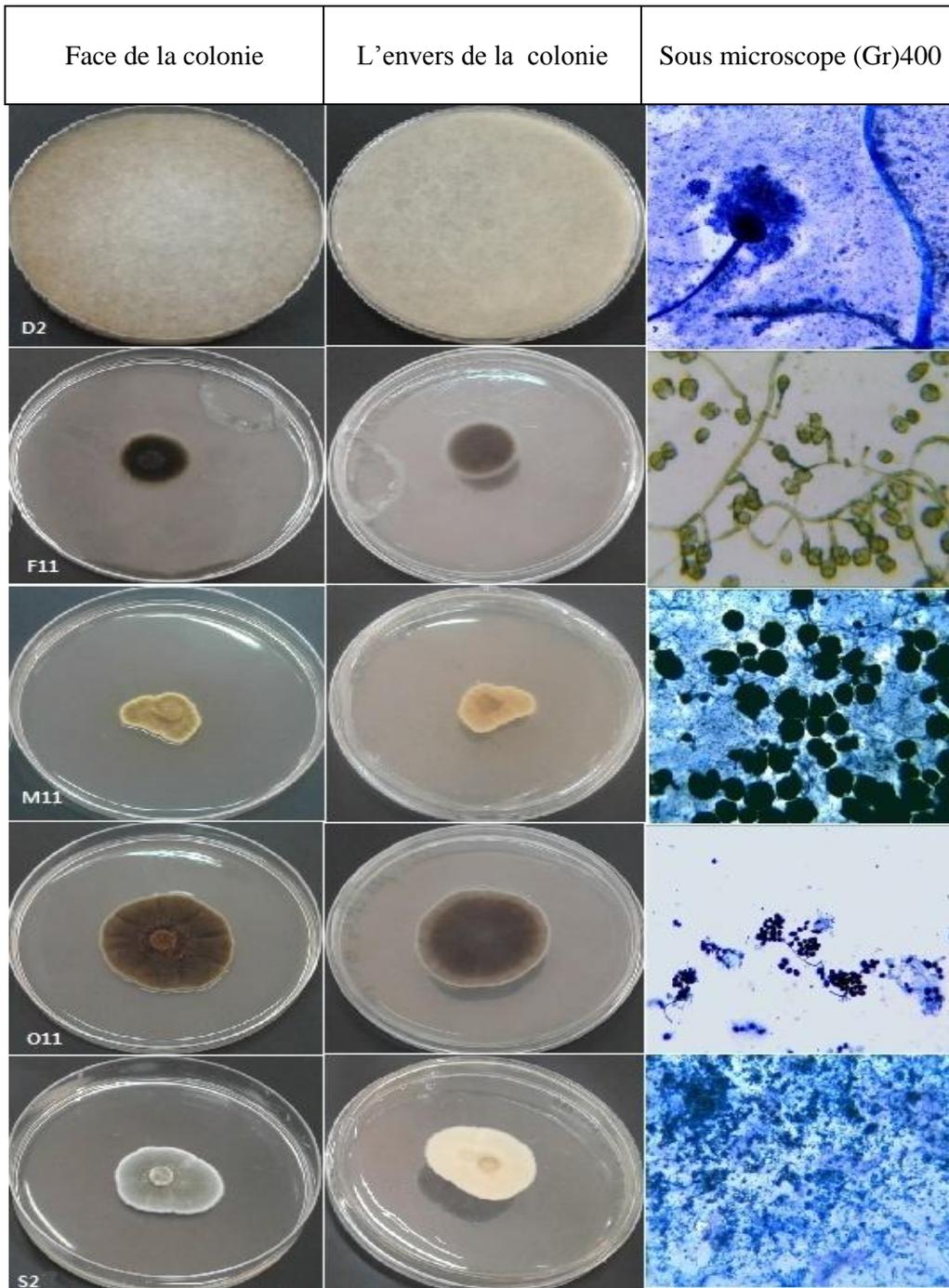


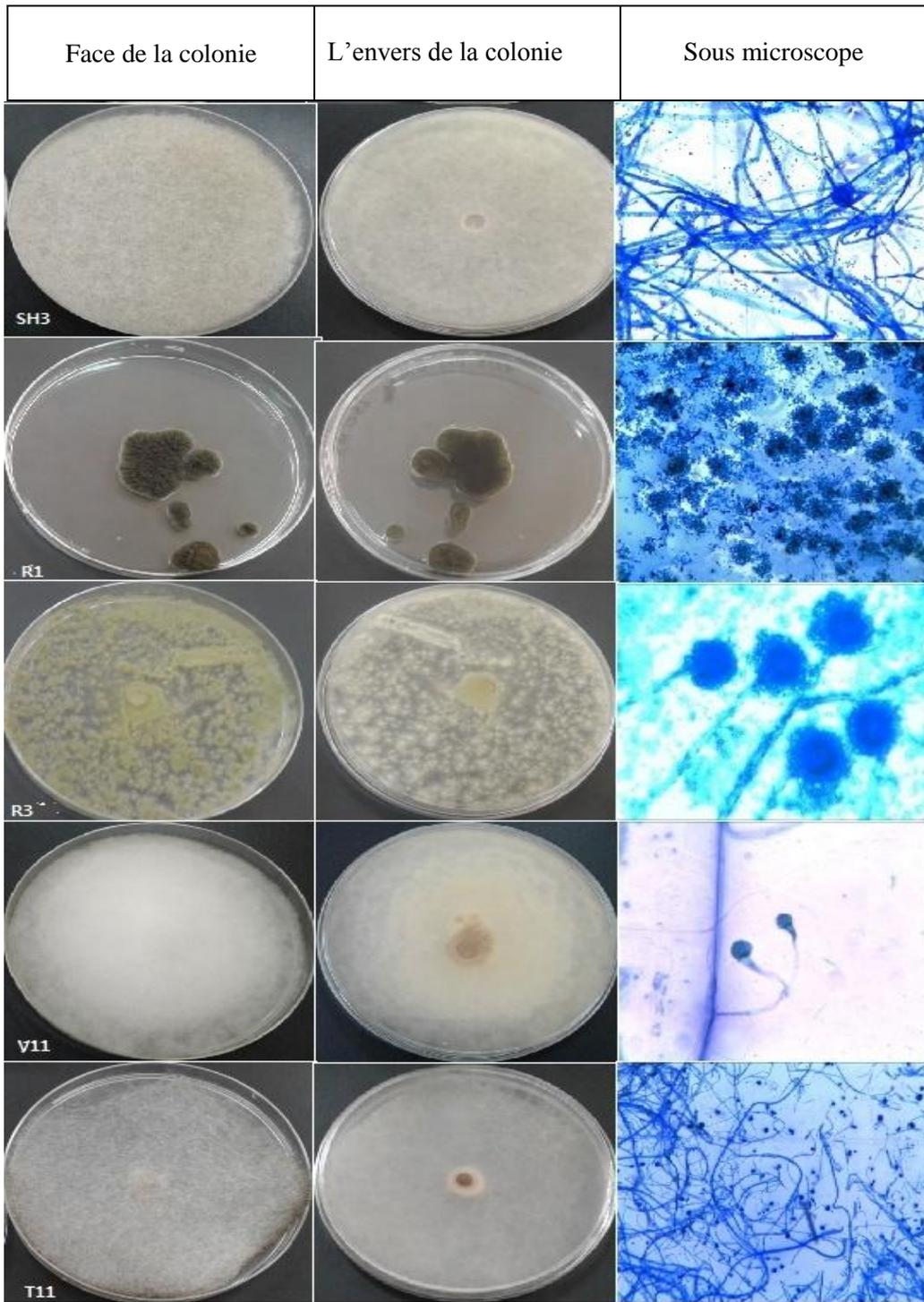
**Figure n° 16 :** Isolement et purification des différentes souches à partir du riz du riz

Tableau n° 05 : Étude macroscopique et microscopique des différentes souches isolé de riz

Région	Souche /Genre	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
Dahmouni	D2 <i>Rhizopus</i>	Face Aspect : duveteux. Pigmentation : blanchâtre à beige. Mycélium : blanc. Enver Pigmentation : beige claire.	- Hyphe : non cloisonné - Sporangiophore - Sporocyste : globulaire - Columelle : persistante coiffe le sporocyste - Conidies : dispersé par l'éclatement de la paroi de sporosyste.
Frenda	F11 <i>Stemphylium</i>	Face Aspect : duveteux. Pigmentation : brunâtre ou verdâtre. Mycélium: blanc. Enver Pigmentation : brunâtre.	- Hyphe : septé - Conidiophore : a une apparence noduleuse. - Spores : brun foncé et sont divisées par plusieurs parois longitudinales et transversales.
Machraassfa	M11 <i>Aschochyta</i>	Face Aspect : poudreux. Pigmentation : jaune verdâtre. Mycélium : blanc. Enver Pigmentation : jaunâtre chamois.	- Hyphe : septé. - Mycélium : hyalin et cloisonné. - Ascospores : hyalines, non cloisonnées.
Oued Lili	O11 <i>Mucor</i>	Face Aspect : granuleux. Pigmentation : marron a noirâtre. Mycélium : blanc. Enver Pigmentation : noir.	- Hyphe : non cloisonné - Spores : dans le Sporange libérées lors de leur éclatement. - Columelle.
Sougeur	S2 <i>Aspergillus</i>	Face Aspect : poudreux. Pigmentation : vert gris. Mycélium : blanc. Enver Pigmentation: brun.	- Hyphe septé - Tête aspergillaire : conidiophore qui se termine par une vésicule - Phialides. - Métules.

Sidi El Hosni	SH <i>Rhizopus</i>	Face Aspect : duveteux. Pigmentation : blanchâtre. Mycélium : blanc. Enver Pigmentation : beige claire	- Hyphe : non cloisonné. - Sporangiophore. - Sporocyste : globulaire. - Columelle : persistante coiffe le sporocyste - Conidies : dispersé par l'éclatement de la paroi de sporocyste.
Tiaret 1(R)	R11 <i>Cladosporium</i>	Face Aspect : floconneux. Pigmentation: verdâtre foncé à noir. Mycélium: blanc. Enver Pigmentation : noir.	- Hyphe : septé. -Conidiophore : sombre. - Spores : sont uni- ou loculaires et se produisent en longues chaînes ramifiées.
	R3 <i>Aspergillus</i>	face Aspect : Poudreux Pigmentation : vert ou vert jaune Mycélium: blanc Enver Pigmentation : blanche	- Hyphe septé. - Tête aspergillaire : conidiophore qui se termine par une vésicule. - Phialides. - Métules.
Tiaret 2(V)	V11	Face Aspect : duveteux. Pigmentation : blanchâtre. Mycélium: blanc. Enver Pigmentation: blanche ou Incolore.	- Hyphe : non septé,larges. - Mycéliums : aériens. - Conidies : sont formées dans des sporanges globuleux ou piriformes et elles sont montées sur un sporangiophore.
Tousnina	T12 <i>Stemphylium</i>	Face Aspect : duveteux Pigmentation : blanchâtre. Mycélium: blanc. Enver Pigmentation: blanche.	-Hyphe : cloisonné. - Conidiophore :a une apparence noduleuse. - Spores : brun foncé et sont divisées des parois longitudinales et transversales.





**Figure n°17 :** Étude macroscopique et microscopique des souches purifiées.



Figure n°18 : Étude physicochimique de genre *Aspergillus* (souche S2).

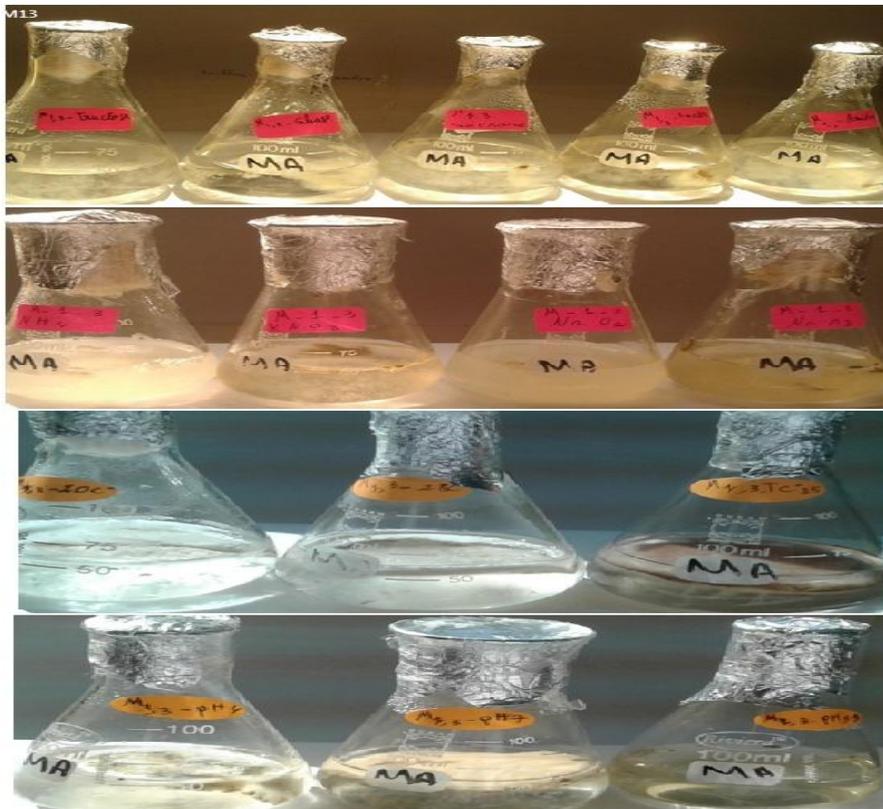


Figure n°19: Étude physicochimique de genre *Penicillium* (souche M13).



Figure n°20 : Étude physicochimique de genre *Fusarium* (souche V221).

## ANNEXE N° 3

**Tableau n° 6:** Analyse de variance à un facteur de la croissance sur les différentes sources de carbone.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,05657159	4	0,0141429	3,3803385	0,01788985	2,60597495
A l'intérieur des groupes	0,1673548	40	0,00418387			
Total	0,22392638	44				

**Tableau n°7:** Analyse de variance à un facteur de la croissance sur les différentes sources d'azote.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,13258448	3	0,04419483	8,47663877	0,00027483	2,90111959
A l'intérieur des groupes	0,16683907	32	0,00521372			
Total	0,29942355	35				

**Tableau n° 8:** Analyse de variance à un facteur de la croissance à différentes températures.

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,64705469	2	0,32352734	2,25512515	0,1266259	3,40282611
A l'intérieur des groupes	3,44311546	24	0,14346314			
Total	4,09017014	26				

**Tableau n° 9** : Analyse de variance à un facteur de la croissance à différents pH.

Source des Variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre groupes	2,84149162	2	1,42074581	5,10151854	0,01424816	3,40282611
A l'intérieur des groupes	6,6838725	24	0,27849469			
Total	9,52536412	26				

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Attrassi, K., Benkirane, R., Attarassi, B., Badoc, A., & Douira, A. (2007). Effet de la source de carbone et d'azote sur la croissance et la sporulation de moisissures des pommes en conservation. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146: 211-224.
- Booth, C. (1984). The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. In *The applied mycology of Fusarium*. Symposium of the British Mycological Society held at Queen Mary College, London, September 1982. (pp. 1-13). Cambridge University Press.
- Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssinet, C., J.M. Frémy, Hennebert, G.L., Lesage-meessen, L., Multon, J.L., Richard-Molard, D. & Roquebert, M.F. (1998). Moisissures des aliments peu hydratés. Lavoisier Tec&Doc, France.
- Davet, P., & Rouxel, F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. Editions Quae.
- Derache, R. (1989). Toxicologie et sécurité des aliments. Lavoisier. Paris. p160.
- Desai, U., Andoji, Y., & Kamble, S. (2016). Influence of temperature and different culture media on growth of *Fusarium udum* (Butler), causal organism of wilt of pigeonpea. *International Journal of Biological Research*, 4(1), 42-45.
- Farooq, S., Iqbal, S. M., & Rauf, C. A. (2005). Physiological Studies of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Int. J. Agri. Biol.*, 7(2), 275-277.
- Guezlane-Tebibel, N., Kahlouche, B., & Athmani-Guemouri, S. (2011). Microbiologie (Travaux pratiques). 4ème édition corrigée, OPU. Algérie.
- Grigoryan, K. M., & Hakobyan, L. L. (2015). Effect of water activity, pH and temperature on contamination level of dried vine fruit by filamentous fungi during storage. *Chemistry and Biology*, (3), 23-28.
- Halewyn, M. A. (2002). Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur: rapport scientifique. Montréal: Institut national de santé publique Québec
- Henni, J., Boisson, C., & Geiger, J. P.
- <http://www.fao.org/faostat/fr/#compare> consulté le : 07/06/2018
- Lahlali, R., M. N. Serrhini, & M. H. Jijakli. (2005). Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 103:315–322.
- Lahouar, A. (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie: Incidence et profils écophysiologicals. Thèse de doctorat en sciences biologiques et Biotechnologie. Université de Lleida. Sousse. 225p.

- Mahideb, N., & Merrouche, H. (2015). Étude des moisissures potentiellement productrices des mycotoxines isolées à partir des graines de blé dur (traité et non traité). mémoire de master en biotechnologie des mycètes. Université des frères Mentouri. Constantine. 59p.
- Nguyen, M. T. (2007). Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat en Génie des procédés et de l'environnement. Institut national polytechnique de Toulouse. France. 147p.
- Pitt, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.
- Ramteke, P. K., & Kamble, S. S. (2011). Physiological studies in *Fusarium solani* causing rhizome rot of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *The Bioscan*, 6(2), 195-197.
- Rathore, S. S., Saxena, S. N., Shirma, Y. K., Mishra, B. K., & Singh, B. (2015). Effect of pH and salt levels on growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* isolate from cumin. *International Journal of Seed Spices*, 5(1), 100-101.
- Shehu, K., & Bello, M. T. (2011). Effect of Environmental Factors on the Growth of *Aspergillus* Species Associated with Stored Millet Grains in Sokoto. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 19(2).
- Swinnen, G. (2012). *Apprendre à programmer avec Python 3*. Editions Eyrolles.
- Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. thèse de doctorat en pathologie mycologie génétique et nutrition. Université de Bucares. Toulouse. 190p.
- Toffa, D. D. (2015). Étude de la contamination de certains aliments d'origine végétale de la République du Niger les moisissures toxigènes. thèse de doctorat en mycologie – environnement. Université de Mohammed V .Rabat. 252P.
- Trique, B. (1968). Croissance et sporulation de *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi et du *Penicillium cyclopium* Westl. en fonction des sources de carbone et d'azote. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 115(sup1), 101-109.
- Wheeler, K. A., Hurdman, B. F. & Pitt, J. I. (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 12, 141-150.

Yezli, W. (2017). Biodiversité et écologie de *Fusarium*. Thèse de doctorat en Microbiologie. Université Ahmed Ben Bella.Oran.199 p.

Zinedine, A., & Idrissi, L. (2004). Présence et réglementation des mycotoxines dans les aliments au Maroc: Situation actuelle et perspectives. Les technologies de laboratoire N°7 .10P