



جامعة الشاذلي بن جديد - الطارف

UNIVERSITE CHADLI BENDJEDID - ELTARF



جامعة الشاذلي بن جديد - الطارف

UNIVERSITE CHADLI BENDJEDID - ELTARF

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الشاذلي بن جديد الطارف

Université Chadli Bendjedid El Tarf

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

## Mémoire

Présentée en vue de l'obtention d'un Diplôme de Master II

Spécialité :

**Toxicologie Industrielle et Environnementale**

**THEME**

**Contribution à l'étude de l'activité antifongique des substances naturelles contre *Alternaria citri* comme alternative à l'utilisation des pesticides**

Présenté Par : BOUALLAGHI Roumaissa

Devant le jury :

|               |                       |     |           |
|---------------|-----------------------|-----|-----------|
| Présidente:   | Dr. BENMEZIANE Farida | MCA | U.C.B.E.T |
| Examinatrice: | Dr. ALAYAT Amel       | MCA | U.C.B.E.T |
| Promotrice :  | Dr. FEKNOUS Nesrine   | MCA | U.C.B.E.T |

Année universitaire : 2021/2022

## Remerciements

Avant tout, nous tenons particulièrement à remercier, notre Créateur **Dieu** le tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté pour élaborer et finaliser ce modeste travail.

Nos remerciements à notre Encadreur :

**Mme. FEKNOUS Nesrine**, Maître de Conférences à l'Université Chadli Bendjedid El-Tarf pour ses efforts et sa disponibilité pendant ce mémoire.

Nous exprimons toute notre gratitude aux membres de jury :

**Mme. BENMEZIANE Farida**, Maître de Conférences à l'Université Chadli Bendjedid El-Tarf, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury.

**Mme. ALAYAT Amel**, Maître de Conférences à l'Université Chadli Bendjedid El-Tarf, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant d'examiner et de juger le travail.

Nos profonds remerciements vont également au **Professeur MESSARAH Mahfoud**, Directeur du Laboratoire de Recherche Biochimie et Toxicologie Environnementale, du département de Biochimie à l'Université Badji Mokhtar Annaba, pour avoir accepté de nous accueillir au sein de son laboratoire et pour avoir mis à notre disposition tous les moyens et réactifs nécessaires à la réalisation de notre partie pratique.

Aussi toute ma gratitude et mes remerciements vont à **Mme. BENALIOUCHE Fouzia**, Directrice de l'Institut National de Protection des Végétaux «INPV» de la wilaya d'El-Tarf.

## **Dédicaces**

*Je remercie tout d'abord le bon dieu tout puissant qui  
m'adonnée*

*La force et le courage pour terminer ce travail*

*Je dédie ce modeste aux deux personnes que j'aime le plus dans*

*La vie, ma raison de vivre qui méritent tout le respect du  
monde*

*Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond amour et*

*Mon dévouement infini.*

*Ma mère, Salima source de compassion et de tendresse,*

*L'exemple de patience et de sacrifice, la raison de mon  
existence*

*et le support de ma vie ;*

*A mon très cher père, Kamel le plus parfait dans*

*le monde, mon grand exemple et le secret de ma réussite ; Que*

*Dieu les protège et leur réserve une longue vie*

*Pleine de bonheur et de santé*

*A mon frère : Yacoub.*

*A mes sœurs : Mallek et Ghofran*

*A mes grands-mères : Chahla et Barkahim*

*A mes meilleurs amis : Mallek, Nouha, Roufaïda*

*A toute ceux que je connais et qui m'ont aidé de près ou le loin*

*A finaliser ce travail.*

*A tous ceux que j'aime et qui m'aime*

*Je dédie ce travail du fond mon cœur*

## Résumé

*Alternaria citri* est un champignon pathogène responsable de la maladie des taches brunes et de la pourriture noire des agrumes. L'utilisation des fongicides naturels constitue une excellente alternative à l'utilisation des fongicides chimiques pour la lutter contre les agents d'Alternarioses. Des jus brut et frais des substances naturelles (*Allium cepa* «oignon rouge», *Allium sativum* «Ail», *Zingiber officinale* «Gingembre» et l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus* «bouton floraux ou clou de girofle») ainsi qu'un pesticide chimique le «Difenoconazole» ont été testés *in vitro* sur la croissance de la moisissure *Alternaria citri* par la méthode de diffusion en milieu Sabouraud. Les résultats obtenus ont montré l'arrêt de la croissance centrifuge d'*A.citri* avec respectivement les distances suivantes ( $14 \pm 1$  mm,  $16.33 \pm 3.214$  mm,  $9.33 \pm 0.577$  mm,  $16.66 \pm 2.081$  mm et  $16 \pm 1.732$  mm). Nous pouvons conclure que tous les produits testés avaient un effet inhibiteur sur la croissance centrifuge la colonie et qu'*Allium sativum*, *Allium cepa* et l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus* «clou de girofle» constituant une alternative intéressante à l'utilisation des phytosanitaires chimiques.

**Mots clés :** *Alternaria citri*, Difenoconazole, fongicide naturel, croissance, fongicide chimique.

## Abstract

*Alternaria citri* is a pathogenic fungus responsible for citrus brown spot disease and black rot, using natural fungicides is an excellent alternative to using chemical fungicides to fight *Alternaria* agents. Raw and fresh juices of natural substances (*Allium cepa* "red onion", *Allium sativum* "Garlic", *Zingiber officinale* "Ginger" and the essential oil of *Eugenia caryophyllus* "flower bud or clove" as well as a chemical pesticide "Difenoconazole" were tested *in vitro* on the growth of *Alternaria citri* mold by the diffusion method in Sabouraud medium. The results obtained showed the stopping of the centrifugal growth of *A. citri* with the natural products tested with respectively the following distances ( $14 \pm 1$  mm,  $16.33 \pm 3.214$  mm,  $9.33 \pm 0.577$  mm,  $16.66 \pm 2.081$  mm and  $16 \pm 1.732$  mm). We can conclude that all the products tested had an inhibitory effect on the centrifugal growth of the colony and that '*Allium sativum*, *Allium cepa*, and the essential oil of *Eugenia caryophyllus* "clove" constitute an interesting alternative to the use of chemical phytosanitary products.

**Keywords:** *Alternaria citri*, Difenoconazole, natural fungicide, growth, chemical

## الملخص

يعتبر *Alternaria citri* من الفطريات المسببة للأمراض المسؤولة عن مرض البقع البنية في الحمضيات والعفن الأسود ، واستخدام مبيدات الفطريات الطبيعية هو بديل ممتاز لاستخدام مبيدات الفطريات الكيميائية لمحاربة عوامل *Alternaria*. تم اختبار العصائر الخام والطازجة من المواد الطبيعية (*Allium cepa* "red onion" و "*Allium sativum* "Garlic" و "*Zingiber officinale* "Ginger" والزيت العطري لـ "*Eugenia caryophyllus* برعم الزهرة أو القرنفل" بالإضافة إلى المبيد الكيميائي "Difenoconazole" في المختبر على نمو العفن *Alternaria citri* بطريقة الانتشار في وسط Sabouraud أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وقف نمو الطرد المركزي لعطر *A. citri* مع المنتجات الطبيعية التي تم اختبارها بالمسافات التالية على التوالي (  $14 \pm 1$  مم ،  $16.33 \pm 3.214$  مم ،  $9.33 \pm 0.577$  مم ،  $16.66 \pm 2.081$  مم و  $16 \pm 1.732$  مم) يمكننا أن نستنتج أن جميع المنتجات التي تم اختبارها كان لها تأثير مثبت على نمو الطرد المركزي للمستعمرة وأن *Allium sativum* ، *Allium cepa* ، الزيت الأساسي لـ *Eugenia caryophyllus* "قرنفل" مقارنة بمبيد الآفات "Difenoconazole" وتشكل بديلاً مثيراً للاهتمام لاستخدام منتجات الصحة النباتية الكيميائية.

**الكلمات المفتاحية:** *Alternaria citri* ، Difenoconazole ، مبيدات الفطريات الطبيعية، النمو، مبيدات الفطريات الكيميائية

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Principaux sites d'action des fongicides (INRA, 2019).....   | 8  |
| Figure 2. <i>P. notatum</i> au microscope électronique<br>( <a href="http://www.visualsunlimited.com/image/I0000iTwhQpa35KE">http://www.visualsunlimited.com/image/I0000iTwhQpa35KE</a> ) .....  | 22 |
| Figure 3.Schéma des différentes dispositions de verticilles chez <i>Penicillium sp.</i> (Samson et al., 1980)....  | 22 |
| Figure 4.Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> (Azzoune, 2009) .....   | 24 |
| Figure 5.Schéma d'un <i>Fusarium</i> (a) Microconidie ; (b) Chlamidospores (www.telmeds.org).....  | 26 |
| Figure 6.Conidie et conidiophore d' <i>A. dauci</i> observée au microscope optique (Courtial, 2018) .....  | 27 |
| Figure 7.a) Symptômes causés par <i>Alternaria dauci</i> sur une feuille de carotte porte-graine provenant d'une parcelle de la FNAMS, Pays de la Loire, b) Conidies d' <i>Alternaria dauci</i> à la surface nécrotique d'une feuille de carotte observées à la loupe binoculaire (Courtial, 2018) ..... | 28 |
| Figure 8.Sclérote de <i>Claviceps microcephala</i> ( <a href="https://www.talking.com/blogeurope/?p=1600">https://www.talking.com/blogeurope/?p=1600</a> ).....  | 29 |
| Figure 9. <i>Alternaria citri</i> sur milieu PDA .....   | 31 |
| Figure 10. Repiquage de la moisissure sur gélose Sabouraud-chloramphénicol en boîtes .....   | 32 |
| Figure 11. Culture de la moisissure sur la gélose Sabouraud-chloramphénicol avant incubation .....   | 33 |
| Figure 12.Technique de ruban adhésif pour l'examen microscopique.....  | 34 |
| Figure 13.Les produits testés contre la croissance d' <i>A. citri</i> .....  | 35 |
| Figure 14.(a) et (b) Prélèvement de la moisissure, (c) : dépôt de disque de papier Wathman imbibé, (d) incubation des boîtes .....   | 36 |
| Figure 15.Morphologie de la colonie d' <i>Alternaria citri</i> sur milieu Sabouraud.....   | 38 |
| Figure 16.Les spores d' <i>Alternaria citri</i> (conidies jeunes et adultes) à l'objectif X 40.....  | 39 |
| Figure 17.Aspect des colonies d' <i>A.citri</i> (a) : après incubation avec les produits testés, (b) : après incubation sans produits inhibiteurs .....  | 41 |
| Figure 18.Activité antifongique du pesticide sur la croissance d' <i>A. citri</i> .....  | 42 |
| Figure 19.Activité antifongique de Zingiber officinale sur la croissance d' <i>A. citri</i> .....  | 43 |
| Figure 20.Activité antifongique de l'Ail rouge sur la croissance d' <i>A. citri</i> .....  | 44 |
| Figure 21.Activité antifongique de l' <i>Allium cepa</i> sur la croissance d' <i>A. citri</i> .....  | 45 |
| Figure 22.Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>Eugenia caryophyllus</i> sur la croissance d' <i>A. citri</i> .....   | 46 |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1. Modes d'action des fongicides .....   | 9  |
| Tableau 2. Températures de croissance de quelques espèces <i>d'Aspergillus, Penicillium et Fusarium.</i> ..... | 18 |
| Tableau 3. Résultats de l'activité antifongique des produits testés .....                                      | 40 |

## Liste des abréviations

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>FAO</b>             | <i>Food and Agriculture Organization</i> (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) |
| <b>DDT</b>             | Dichloro Diphényl Trichloroéthane  |
| <b>OMS</b>             | Organisation Mondiale de la Santé  |
| <b>DL<sub>50</sub></b> | Dose létale 50   |
| <b>mg/kg</b>           | milligramme par kilogramme   |
| <b>DJA</b>             | Dose journalière admissible  |
| <b>CL<sub>50</sub></b> | Concentration létale 50  |
| <b>pH</b>              | Potentiel hydrogène  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>  | Dioxyde de Carbone   |
| <b>UFC</b>             | Unité formant colonie  |
| <b>spp.</b>            | Sous espèces   |
| <b>ppm</b>             | Partie par million   |

# Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| RESUME .....  | I         |
| ABSTRACT .....  | II        |
| المخلص .....  | III       |
| LISTE DES FIGURES .....   | IV        |
| LISTE DES TABLEAUX .....  | V         |
| LISTE DES ABREVIATIONS .....  | VI        |
| TABLE DES MATIERES .....  | VII       |
| INTRODUCTION .....  | 1         |
| <b>1 CHAPITRE 1 : LES PESTICIDES.....</b>   | <b>4</b>  |
| 1.1 DEFINITION .....  | 4         |
| 1.2 CLASSIFICATION DES PESTICIDES.....  | 4         |
| 1.2.1 <i>Le premier système de classification</i> .....   | 4         |
| 1.2.2 <i>Le deuxième système de classification</i> .....  | 5         |
| 1.2.3 <i>Classification selon le domaine d'utilisation</i> .....  | 6         |
| 1.2.4 <i>Classification selon la toxicité</i> .....   | 7         |
| 1.3 MODE D'ACTION DES PESTICIDES .....  | 7         |
| 1.3.1 <i>Actions des herbicides</i> .....   | 7         |
| 1.3.2 <i>Actions des fongicides</i> .....   | 8         |
| 1.3.3 <i>Actions des insecticides</i> .....   | 9         |
| 1.4 PRINCIPAUX USAGES ET ROLE DES PESTICIDES.....   | 10        |
| 1.5 EFFETS TOXIQUES DES PESTICIDES.....   | 10        |
| 1.5.1 <i>Effets sur l'environnement</i> .....   | 10        |
| 1.5.2 <i>Effets sur la santé humaine</i> .....  | 12        |
| 1.5.2.1 Voies d'exposition .....  | 12        |
| 1.5.2.2 Toxicité des pesticides.....  | 13        |
| <b>2 CHAPITRE 2 : LES MOISSURES TOXINOGENES .....</b>   | <b>16</b> |
| 2.1 GENERALITES .....   | 16        |
| 2.2 FACTEURS INFLUENÇANT LE DEVELOPPEMENT DES MOISSURES.....  | 16        |
| 2.2.1 <i>Développement pendant le stockage</i> .....  | 16        |
| 2.2.2 <i>Les éléments nutritifs</i> .....   | 17        |
| 2.2.3 <i>Les facteurs environnementaux</i> .....  | 17        |
| 2.2.3.1 Humidité relative.....  | 17        |
| 2.2.3.2 Température.....  | 17        |
| 2.2.3.3 Teneur en oxygène moléculaire (O <sub>2</sub> ) et en dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ) ..... | 18        |
| 2.2.3.4 Le potentiel hydrogène (pH) du substrat.....  | 18        |
| 2.3 IDENTIFICATION DES MOISSURES.....   | 18        |
| 2.3.1 <i>Analyse morphologique</i> .....  | 18        |
| 2.3.2 <i>Analyse chimique</i> .....   | 19        |
| 2.3.3 <i>Analyse moléculaire</i> .....  | 19        |
| 2.4 ROLE DES MOISSURES.....   | 20        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.4.1    | Rôle dans l'industrie alimentaire.....  | 20        |
| 2.4.2    | Rôle dans l'industrie pharmaceutique.....   | 20        |
| 2.4.3    | Rôle phytosanitaire .....   | 21        |
| 2.5      | LES PRINCIPALES MOISSURES TOXINOGENES.....  | 21        |
| 2.5.1    | Genre <i>Penicillium</i> .....  | 21        |
| 2.5.2    | Genre <i>Aspergillus</i> .....  | 23        |
| 2.5.3    | Genre <i>Fusarium</i> .....   | 25        |
| 2.5.4    | Genre <i>Alternaria</i> .....   | 27        |
| 2.5.5    | Genre <i>Claviceps</i> .....  | 28        |
| <b>3</b> | <b>PARTIE MATERIEL ET METHODES .....</b>  | <b>31</b> |
| 3.1      | OBJECTIF DE L'ÉTUDE.....  | 31        |
| 3.2      | MATERIEL BIOLOGIQUE .....   | 31        |
| 3.3      | REPIQUAGE DE LA SOUCHE.....   | 31        |
| 3.3.1    | <i>Technique</i> .....  | 32        |
| 3.3.2    | <i>Incubation</i> .....   | 32        |
| 3.3.3    | <i>Caractérisation macroscopique</i> .....  | 33        |
| 3.3.4    | <i>Caractérisation microscopique</i> .....  | 33        |
| 3.4      | TEST DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE.....  | 34        |
| 3.4.1    | <i>Préparation des jus bruts</i> .....  | 34        |
|          | Le test de l'activité antifongique a été réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé.....                                      | 34        |
| 3.4.2    | <i>Technique</i> .....  | 35        |
|          | ❖ Prélever stérilement un disque de la moisissure <i>Alternaria citri</i> à l'aide d'une pipette Pasteur stérile (Figure 14 a et b) ..... | 35        |
| 3.4.3    | <i>Incubation</i> .....   | 35        |
| <b>4</b> | <b>RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>  | <b>38</b> |
| 4.1      | ASPECT MACROSCOPIQUE DE LA COLONIE REPIQUEE .....   | 38        |
| 4.2      | EXAMEN MICROSCOPIQUE .....  | 38        |
| 4.3      | LES TESTS DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES PRODUITS .....   | 40        |
| 4.3.1    | <i>Le pesticide «Difénoconazole»</i> .....  | 41        |
| 4.3.2    | <i>Zingiber officinale «Gingembre»</i> .....  | 42        |
| 4.3.3    | <i>Allium sativum</i> .....   | 43        |
| 4.3.4    | <i>Allium cepa</i> .....  | 44        |
| 4.3.5    | <i>Huile essentielle d'Eugenia caryophyllus «bouton floraux ou clou de girofle»</i> .....   | 46        |
|          | <b>CONCLUSION.....</b>  | <b>48</b> |
|          | <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>   | <b>49</b> |

## Introduction

Depuis la fin de 20<sup>ème</sup> siècle, l'impact de l'environnement sur la santé humaine suscite un intérêt grandissant, parmi la diversité de notre environnement, celui chimique est l'un de ceux qui suscitent le plus d'appréhension. Les produits phytosanitaires sont, à tort ou à raison des porteurs emblématiques, des angoisses de la population (**Regnault, 2005**).

D'après l'Institut Nationale de Protection des Végétaux, plus de 480 pesticides sont enregistrés en Algérie, dans le domaine de l'agriculture les autorités algériennes emploient l'expression d'usage « produits phytosanitaires à usage agricole ». Les pesticides sont parmi les polluants les plus dangereux de l'environnement en raison de leurs stabilités, leurs mobilités et les effets à longue terme sur les organismes vivants. Le devenir des pesticides concerne tout le milieu naturel dans son ensemble (sol, eau et air) mais le sol reste un compartiment clé car une grande proportion des pesticides appliqués lors du traitement des cultures arrive au sol, par application directe et / ou par lessivage du feuillage (**Calvet, 2005**). Leur comportement dans les sols conditionne donc leurs impacts sur d'autres compartiments de l'environnement. C'est pourquoi il est crucial d'étudier les sols et le devenir des pesticides sur ces différents sols en vue de comprendre, ou mieux de prédire leur répartition ultérieure dans l'environnement et les risques de contamination des eaux (**Saibi, 2008**).

Les moisissures, champignons filamenteux microscopiques apparus sur terre il y a 550 millions d'années, sont très nombreuses, cosmopolites, saprophytes, symbiotes ou parasites (**Lavaud et al., 2008**). Le développement des moisissures à la surface et dans les produits destinés à l'alimentation est très souvent constaté, en particulier dans les denrées stockées. Or l'étalement dans le temps de la consommation (fruits saisonniers consommés toute l'année) et l'augmentation des transports internationaux des denrées alimentaires nécessitent de plus en plus la réalisation de stocks (**Leclerc, 2005**). Ce n'est que vers le début du 20<sup>ème</sup> siècle que les propriétés toxiques de ces champignons commencent à être soupçonnées.

Les moisissures sont capables de provoquer d'importantes détériorations, dans le domaine agronomique. Ainsi, leur présence indésirable donne aux aliments des odeurs moisies et modifient leurs aspect via la production de pigments, comme la mélanine. Il y a donc une réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée, accompagnée d'une baisse du rendement des récoltes. Les métabolites produits par ces champignons lors de leur

croissance sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires dont les mycotoxines sont les plus graves en raison de risque d'intoxication (**Nguyen, 2007**).

L'objectif de notre travail de master est de tester *in vitro* l'activité antifongique des substances naturelles sur la croissance de la moisissure *Alternaria citri* comme alternative à l'utilisation des pesticides chimiques.

Ce présent travail comprend une première partie de synthèse bibliographique regroupant deux chapitres : le premier chapitre est sur les pesticides, le second chapitre porte sur les moisissures toxigènes. La seconde partie du mémoire comprend matériel et méthodes, suivie par la partie des résultats et discussions, puis nous terminerons par une conclusion.

# **Chapitre 1**

## **Les pesticides**

# 1 Chapitre 1 : Les pesticides

## 1.1 Définition

Avant la seconde guerre mondiale, les pesticides employés en agriculture étaient des dérivés de composés minéraux ou de plantes ; arsenic, cuivre, zinc, manganèse, plomb, pyrèthre, roténone, sulfate de nicotine...que l'on retrouve en partie dans les cigarettes actuelles. Les armes chimiques de la première guerre mondiale comme le gaz moutarde composé de chlore assura un nouveau débouché industriel pour les pesticides, une fois le conflit terminé. Ainsi, les organochlorés firent leur apparition avec de nombreuses déclinaisons qui ont connu un énorme succès (**Bidelman, 1988**). L'étymologie du mot pesticide s'est construite à partir du suffixe "cide" qui signifie "tuer " et de la racine anglaise "*Pest*" (animal, insecte ou plante nuisible) provenant du latin *Pestis* (peste) qui désignait le fléau en général (**El Azzouzi, 2013**).

**L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)** définit ainsi les pesticides : toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre (**Batsch, 2011**).

La substance qui détruit ou empêche les organismes nuisibles de s'installer sur les végétaux est dénommée « substance active » à laquelle sont associés dans la préparation un certain nombre de «formulants» (mouillants, solvants, anti-mousses, ...) qui la rendent utilisable par l'agriculteur (**Bourbia-Ait Hamlet, 2013**).

## 1.2 Classification des pesticides

L'hétérogénéité de ce vaste ensemble de produits rend difficile toute classification. Certains auteurs préfèrent classer les produits selon la cible visée (insecticides, herbicides, fongicides...etc.), le domaine d'utilisation, leur toxicité. Il y a alors plusieurs possibilités de classification (**Morejohn, 1987**).

### 1.2.1 Le premier système de classification

Ce système repose sur le type de parasites et de plantes à contrôler, on distingue trois grandes classes :

- ❖ **Les insecticides** : ce sont des substances actives ou des préparations destinées à détruire les insectes nuisibles par la perturbation des processus vitaux (respiration, système

nerveux, motricité...) par action chimique. Ce sont souvent les pesticides les plus toxiques, ils peuvent présenter des risques pour la santé et l'environnement via notamment leur persistance (**Snégarof, 1997**).

- ❖ **Les fongicides** : ce sont des produits chimiques utilisés pour lutter contre les moisissures et les champignons parasites des végétaux. Ils sont le plus souvent de nature synthétique. Les fongicides les plus anciens sont le soufre, le cuivre et ses dérivés organiques comme la bouillie bordelaise ; un mélange de sulfate de cuivre et d'hydroxyde de calcium (**Kane, 1997**).
  
- ❖ **Les herbicides, désherbants, phytocides ou débroussaillants** : produits chimiques complexes destinés à détruire les plantes indésirables (aussi appelées mauvaises herbes ou adventices) qui entrent en concurrence avec les plantes à protéger en ralentissant leur croissance. Ils sont de nature et mode d'épandage différent assez de celle des autres familles puisqu'ils sont déposés directement sur le sol, tandis que les autres produits sont plutôt pulvérisés sur la plante en croissance (**Hayne et al., 2000**). Outre, les trois grandes familles de pesticide mentionnées ci-dessus, différentes familles peuvent être citées comme par exemple (**Brtles, 1988**) :
  
- ❖ **Les molluscicides** : produits destinés à éliminer les escargots et les limaces.
- ❖ **Les rodenticides** : produits employés contre les rongeurs (rats, souris, surmulots...)
- ❖ **Les nématocides** : produits destinés à lutter contre les nématodes.
- ❖ **Les acaricides** : contre les acariens.
- ❖ **Les taupicides** : contre les taupes.
- ❖ **Les parasitocides** : contre les parasites.
- ❖ **Les bactéricides** : contre les bactéries.
- ❖ **les virucides** : contre les virus.

### 1.2.2 Le deuxième système de classification

Le deuxième système tient compte de la nature chimique de la principale substance active majoritaire qui compose les produits phytosanitaires.

Les principaux groupes chimiques sont (**López et al., 2005**) :

**Les organochlorés** : parmi les plus anciens et les plus persistants, dont le fameux DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane) déjà évoqué. Ils sont surtout utilisés comme insecticides en agriculture et dans les métiers du bois.

- ❖ **Les carbamates** : fongicides et insecticides.
- ❖ **Les phénoxyalcanoïques** : herbicides.
- ❖ **Les organo-azotés** : repérables par le suffixe « zine », principalement utilisés comme herbicides. (Exemple : atrazine, simazine, etc).
- ❖ **Les urées** : repérables par le suffixe « uron », utilisés comme herbicides et fongicides (Exemple : Diuron, Isoproturon, etc.).
  
- ❖ **Les organophosphorés** : eux aussi utilisés comme insecticides moins persistants que les précédents.
- ❖ **Les pesticides sulfonilurées** : herbicides utilisés à des doses de quelques grammes par hectare seulement, contre quelques kilos pour les organoazotés par exemple.

### 1.2.3 Classification selon le domaine d'utilisation

Actuellement, les pesticides sont séparés en deux groupes, selon leurs utilisations (**OMS, 1991**):

**Les pesticides à usage agricole ou produits phytosanitaires** : c'est l'usage le plus connu qui utilise le plus fort tonnage de matières actives pour la protection des végétaux contre les maladies et contre les organismes nuisibles aux cultures et assurer de bon rendement des produits alimentaires.

- ❖ **Les pesticides à usage non-agricole ou biocides** : qui sont similaires aux premiers, utilisés en milieu non-agricole pour détruire ou repousser les nuisibles, en hygiène publique (lutte anti-vectorielle) et dans d'autres applications comme la conservation du bois, la désinfection, ou certains usages domestiques, ainsi que pour la santé humaine vis-à-vis des vecteurs de maladies (*Typhus*, Paludisme).

#### 1.2.4 Classification selon la toxicité

L'organisation mondiale de la santé (OMS) classe les pesticides par dangerosité en se basant sur le danger que présentent les pesticides à court terme (toxicité aigüe) après l'utilisation d'une dose létale DL50 médiane orale ou cutanée. Chaque pesticide est alors placé dans une des quatre classe : Extrêmement dangereux, hautement dangereux, modérément dangereux, peu dangereux (Arzul *et al.*, 2008).

### 1.3 Mode d'action des pesticides

Par mode d'action, on entend généralement le mécanisme par lequel la substance va exercer son effet sur la cible biologique du ravageur visé. La grande diversité des cibles s'accompagne d'une grande variété de modes d'action, aussi bien entre les différentes catégories de pesticides qu'à l'intérieur même de ces catégories, en lien avec leurs propriétés physicochimiques, et donc toxicologiques (Calvet *et al.*, 2005).

#### 1.3.1 Actions des herbicides

Les herbicides, appelés parfois désherbants sont des substances chargées de détruire ou de ralentir la croissance des mauvaises herbes, nommées adventices. Elles se distinguent entre elles par rapport à leur voie de pénétration dans les végétaux et à leur déplacement dans la plante (Cirad, 2000).

Agissant sur différents processus de croissance et de développement des plantes, ils perturbent le fonctionnement de :

- La physiologie de la plante : la photosynthèse ou la perméabilité membranaire.
- La croissance : la division cellulaire, l'élongation, etc.
- La biosynthèse des constituants cellulaires : lipides, pigments caroténoïdes, acides aminés, etc. (Batsch, 2011).

### 1.3.2 Actions des fongicides

Les fongicides sont des substances conçues exclusivement pour éliminer ou limiter le développement des champignons parasites des végétaux. Leur effet pourra être qualifié de « préventif » lorsque son action se situe avant la pénétration du parasite dans les tissus de la plante, de « curatif » lorsqu'il intervient sur des filaments déjà bien installés dans les tissus avant l'apparition des premiers symptômes, ou d'« éradiquant » lorsqu'il intervient sur des filaments déjà bien installés dans les tissus avec l'apparition des premiers signes de la maladie (Azzouz, 2012).

Leur mode d'action, peut être observé sur un seul site et on parle ici de fongicide unisite (Figure 1), ou sur plusieurs cibles (Figure 1) et on parle dans ce cas de fongicide multi-sites (Batsch, 2011).

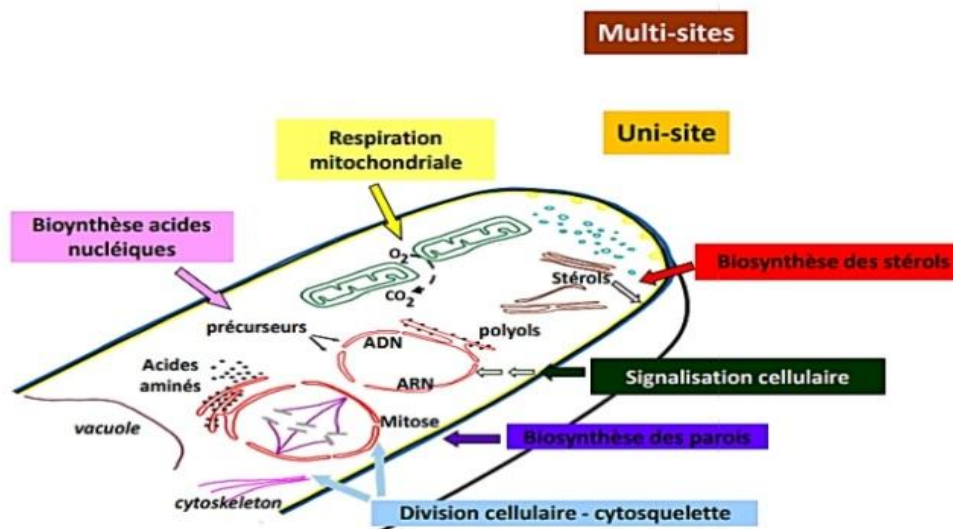


Figure 1. Principaux sites d'action des fongicides (INRA, 2019)

La plupart des fongicides utilisés n'ont qu'un seul site d'action pour stopper ou altérer le bon fonctionnement d'une réaction nécessaire à la survie du champignon, ce qui engendrera la mort de la cellule. Cependant, si ces cellules mutent au niveau de l'unique site d'action du fongicide, le produit peut devenir inactif car il ne reconnaîtra plus sa cible. Il en résulte ce qu'on appelle une résistance du pathogène au fongicide. Les fongicides multi-sites sont dans ce cas des alliés de

choix puisque l'acquisition d'une résistance par le pathogène doit passer par la mutation de plusieurs cibles, ce qui n'est encore jamais arrivé (**Aprifel, 2004**).

Plusieurs actions peuvent être attribuées aux fongicides à l'égard des cibles potentielles du pathogène. **Le tableau 1** illustre les grandes lignes de ces principaux modes d'action sur les organismes cibles.

**Tableau 1.** Modes d'action des fongicides

|   |  |
|---|--|
| <p><b>Action sur les processus respiratoires</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Inhibition des complexes I et III</li> <li>➤ Phosphorylation oxydative</li> <li>➤ Inhibition de la germination</li> </ul> | <p><b>Actions sur les biosynthèses</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Biosynthèse des stéroïdes</li> <li>➤ Biosynthèse de l'ARN et de l'ADN</li> <li>➤ Biosynthèse des mélanines</li> </ul>  |
| <p><b>Actions sur les microtubules</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Combinaison avec la tubuline</li> </ul>   | <p><b>Autres modes d'actions</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Action sur les membranes et la croissance</li> <li>➤ Inhibition de la germination</li> <li>➤ Modification de la perméabilité cellulaire</li> <li>➤ Inhibition de l'élongation des tubes germinatifs</li> </ul> |

(**Aprifel, 2004**).

### 1.3.3 Actions des insecticides

Les insecticides sont des biocides destinés à détruire les insectes pour assurer la protection des cultures. Largement utilisés en agriculture pour éliminer les ravageurs, ils sont également présents dans l'environnement domestique sous forme de spécialités contre les poux, de médicaments vétérinaires, d'insecticides ménagers, de produits de jardinage ou encore de xyloprotecteurs (**Testud and Grillet, 2007**).

Considérer comme des produits neurotoxiques, leurs actions sur le système nerveux se manifeste par le blocage de la propagation de l'influx nerveux au niveau des neurones et des synapses, tant au niveau du système nerveux central que périphérique (**Calvet et al., 2005**).

Certains insecticides agissent en perturbant la physiologie de la reproduction de l'insecte (perturbateurs de mue) alors que d'autres inhibent la production de chitine, élément constitutif

majeur de l'exosquelette des insectes (**Batsch, 2011**). Les insecticides peuvent également cibler les larves et les œufs d'insectes.

## 1.4 Principaux usages et rôle des pesticides

Le principal usage des pesticides est la protection des cultures, on parle alors de pesticide à usage agricole. Toutefois, ils sont aussi utilisés pour des usages non-agricoles, afin de lutter contre des espèces végétales jugées envahissantes pour des raisons de sécurité (infrastructures de transport) ou d'aménagements paysagers (parcs et jardins) (**Dugeny, 2010**).

Leurs utilisations est une pratique nécessaire pour l'agriculteur afin de lui assurer un bon rendement agricole (qualitatif et quantitatif), permettant de garantir un revenu acceptable et de compenser les pertes de sol consécutives à leur dégradation (**FAO, 1998**).

L'autre aspect, est celui de l'entretien des espaces de loisirs tels que les jardins d'amateurs, les parcs et les terrains de sport. En effet, les pelouses, les arbustes et les arbres d'ornement peuvent nécessiter des traitements phytosanitaires pour conserver leur attrait et permettre leur fonction récréative (**Calvet et al., 2005**).

Les pesticides sont aussi des moyens contribuant au confort des habitations. Les opérations de désinsectisation et de dératisation sont couramment pratiquées pour l'entretien des bâtiments, afin d'éliminer des rongeurs (souris, rats...) et d'insectes nuisibles (mouches, moustiques, termites et fourmis) vecteurs de maladies transmissibles (**Calvet et al., 2005**).

## 1.5 Effets toxiques des pesticides

### 1.5.1 Effets sur l'environnement

L'utilisation des produits phytosanitaires a permis d'augmenter considérablement les rendements agricoles en réduisant les pertes dues aux ravageurs des cultures, mais cela n'a pas été sans contrepartie (**Merhi, 2008**).

#### a) Pollution des sols

La plupart des produits phytosanitaires arrivent tôt ou tard au sol où ils sont soumis à un ensemble de processus conditionnant leur devenir et leur dispersion vers d'autres compartiments

de l'environnement. Cette dispersion et leur accumulation dans les sols sont à l'origine de problèmes de contamination des milieux par les pesticides (**Barriuso, 2004**).

### **b) Pollution de l'eau**

La contamination des nappes souterraines est le sujet de préoccupation principal dans la mesure où elle peut être l'indicateur d'une pollution insidieuse et durable de l'eau (**Anonyme, 2010**). Le risque est essentiellement lié au régime pluviométrique, à l'épaisseur de la zone non saturée, aux interactions nappes-rivières, à la nature et à la vitesse des écoulements à travers le sol et le sous-sol. Le transport de certaines substances dans l'eau est parfois observé plusieurs années après application, notamment dans le cas de produits phytosanitaires à forte rémanence dans le sol, ceux-ci restant longtemps adsorbés sur la couche humique du sol (**Batsch, 2011**). Des pics de concentration des pesticides sont fréquemment observés dans les quelques heures qui suivent les épisodes pluvieux et que la contamination des eaux de surface est d'autant plus élevée que la surface des bassins versants est faible. Par ailleurs, dans certaines régions, une part significative de la contamination des eaux peut parfois provenir du dépôt de substances transportées par voie aérienne ou beaucoup plus fréquemment découler d'usages autres qu'agricoles (désherbage des infrastructures de transport ou industrielles, des parcs et jardins ou bien d'utilisations domestiques) (**Bourbia Ait-Hamlat, 2013**).

### **c) Pollution de l'air**

La présence de pesticides est observée dans toutes les phases atmosphériques en concentrations variables dans le temps (avec parfois un caractère saisonnier, en lien avec les périodes d'application) et dans l'espace (selon la proximité des sources). L'air peut être contaminé, de manière locale, mais aussi à distance des lieux de traitement (**Merhi, 2008**).

Le transfert des pesticides dans l'air est variable (de 25 à 75 %) selon la nature du produit, les modes d'utilisation, la nature des sols, la climatologie. Le transfert dans l'atmosphère peut survenir au moment du traitement : par dérive (transport par le vent) ou par évaporation des gouttelettes, ou bien après traitement, par volatilisation depuis la surface d'application ou par érosion éolienne (**Anonyme, 2010**). Les plus grandes concentrations de pesticides passent dans l'atmosphère après les épandages aériens (**Liliana, 2007**).

Les concentrations sont minimales en hiver, de décembre à février, et sont les plus élevées au printemps et en arrière-saison (**Chubileau et al., 2011**).

Pour ce qui est de l'air intérieur, (**Merhi, 2008**) stipule que les pesticides peuvent contaminer l'air intérieur non seulement suite à leur application ou leur stockage dans les logements mais également du fait du transport des produits utilisés à l'extérieur (agriculture, jardins, parcs) par l'intermédiaire des chaussures, des vêtements, des animaux domestiques ou par l'air.

### 1.5.2 Effets sur la santé humaine

Les pesticides sont plus ou moins toxiques à l'égard de l'Homme qui peut les absorber par contact (voie cutanée et voie oculaire), inhalation (voie respiratoire) ou ingestion (voie digestive) (**Calvet et al, 2005**). L'importance des dangers dépend de deux facteurs : la toxicité du pesticide et le degré d'exposition au produit (**Piche, 2008**).

#### 1.5.2.1 Voies d'exposition

Les risques d'exposition aux pesticides sont multiples et plusieurs facteurs peuvent en être responsables. Ils apparaissent dès qu'une personne manipule des pesticides sans tenir compte des règles de base en matière de sécurité et ce, à l'étape de la préparation des mélanges, en cours d'application ou de pulvérisation ainsi qu'au retour sur le site traité.

##### a. Voie cutanée

La peau constitue généralement une barrière relativement imperméable aux substances chimiques. Toutefois, la majorité des pesticides peuvent être absorbés à travers toute la surface corporelle et ce, en quantité suffisante pour causer des effets systémiques tant aigus que chroniques en plus des effets dermatologiques et oculaires possibles. Les pesticides peuvent être absorbés plus facilement par certaines régions corporelles comme le cuir chevelu, le front, les yeux et les organes génitaux (**Samuel et Saint-Laurent, 2001**).

La durée d'exposition, les conditions de la peau, la température et l'humidité influencent le degré d'absorption (**Piche, 2008**).

## **b. Voie respiratoire**

L'exposition par les voies respiratoires constitue la voie d'intoxication la plus rapide et la plus directe. Les pesticides qui sont normalement appliqués sous forme d'aérosol, de brouillard ou de gaz peuvent facilement être inhalés. Ces produits peuvent aussi adhérer à des particules de poussières en suspension et parfois même à la fumée de cigarette. Le risque d'exposition par cette voie est normalement plus important lorsque les travaux sont effectués dans un espace fermé, comme une serre ou un tunnel de culture (**Samuel et Saint-Laurent, 2001**).

## **c. Voie digestive (voie orale)**

Selon (**Piche, 2008**), les intoxications les plus sévères se produisent lorsque le pesticide est accidentellement ingéré. L'absorption accidentelle se produit principalement par la contamination des mains ou d'aliments, d'où l'importance de se laver les mains après avoir manipulé des pesticides ou avoir été en contact avec une surface contaminée.

### *1.5.2.2 Toxicité des pesticides*

Le critère utilisé pour rendre compte de la toxicité pour l'Homme est la dose journalière admissible ou **DJA** appelée aussi dose journalière tolérable. Elle est exprimée en **mg/kg** de poids corporel et par jour et représente la dose maximale qui, si elle est ingérée quotidiennement, n'entraîne pas d'effets chez l'homme (**Marliere, 2000**). Les effets de l'exposition aux pesticides chez l'homme nécessitent de distinguer :

#### **a. Toxicité aigue**

La toxicité aigue est liée à une pénétration massive du produit dans l'organisme, les symptômes apparaissent peu de temps après le contact (24-48 heures). Cette toxicité est généralement assez bien connue. Elle est évaluée par la DL50 ou la CL50 (dose ou concentration létale 50), ainsi que par des études sur les propriétés irritantes et allergisantes (**Le Clech, 1998**).

Les signes ou symptômes les plus souvent rapportés lors d'une intoxication aiguë aux pesticides sont les suivants : céphalées, nausées, vomissements, étourdissements, fatigue, perte d'appétit et irritation cutanée ou oculaire. La sévérité de l'intoxication varie normalement en fonction de la

dose absorbée. En plus de l'ingrédient actif, certaines substances inertes présentes dans les formulations commerciales peuvent contribuer à moduler le niveau de risque d'intoxication. Par ailleurs, la voie d'exposition (orale, cutanée ou respiratoire) ainsi que les susceptibilités individuelles pourront aussi jouer un rôle important sur la sévérité des symptômes observés (**Samuel et Saint-Laurent, 2001**).

### **b. Toxicité chronique**

La toxicité chronique est le résultat d'une exposition répétée ou continue à des doses faibles. Les signes apparaissent souvent très tardivement (**Le Clech, 1998**). Les signes sont souvent difficiles à reconnaître et le délai avant l'apparition de la maladie peut être très long.

Parfois, celle-ci survient alors que la personne n'est plus exposée aux pesticides depuis des années. Il peut, par ailleurs, être difficile de faire le lien entre l'exposition chronique aux pesticides et les symptômes observés en raison de cette période de latence caractéristique.

Les symptômes peuvent se présenter sous forme de : fatigue, fréquents maux de tête, manque d'appétit, perte de poids (**Samuel et Saint-Laurent, 2001**).

# **Chapitre 2**

## **Les moisissures toxinogènes**

## 2 Chapitre 2 : Les moisissures toxogènes

### 2.1 Généralités

Le terme « moisissure », bien qu'il ne soit en aucun cas une dénomination de taxonomistes, il est communément utilisé pour désigner tout micro-organisme fongique saprophyte appartenant aussi bien aux champignons supérieurs (Ascomycètes, Hyphomycètes et Basidiomycètes) qu'aux champignons inférieurs à hyphes coenocytiques (Zygomycètes) (**Chapeland-Leclerc et al., 2005 ; Reboux & Millon, 2008**). C'est des champignons microscopiques, eucaryotes, hétérotrophes dont les aliments sont généralement des substrats très favorables à leur développement (**Cahagnier, 1998**). Le nombre d'espèces fongiques varie de 60 à 100 milles (**Reboux et al., 2010**). Elles sont omniprésentes dans notre environnement. La plupart sont phytopathogènes et se développent en saprophyte dans la terre et sur les plantes ou les débris végétaux en voie de putréfaction, elles se retrouvent aussi bien dans l'air que sur le sol et les surfaces, dans l'alimentation et parfois dans l'eau (**Anonyme, 2011**). Elles se rencontrent également sur les viandes et les produits d'origine animale, les cadavres d'animaux et les déjections des animaux herbivores (**Delarras, 2007**). Elles sont également considérées comme des formes imparfaites d'agents pathogènes entraînant mycoses et allergies (**Pfohl-Leszkowicz, 1999**). Les moisissures saprophytes contaminent les aliments et les dégradent de point de vue qualitatif (**Guiraud, 1998**). Les espèces pouvant contaminer les aliments sont très nombreuses, se retrouvent aussi bien sous forme végétative (conidies) que sous leur forme sexuée (ascospores), ces dernières étant particulièrement aptes à la survie (**Chapeland-Leclerc et al., 2005**)

### 2.2 Facteurs influençant le développement des moisissures

#### 2.2.1 Développement pendant le stockage

Le stockage du grain a généralement lieu dans des silos. Des mauvaises conditions de stockage associées au facteur temps peuvent être favorables au développement de la flore fongique de stockage notamment lorsque les systèmes de ventilation sont insuffisants pour assurer une bonne régulation de la température. Lorsque la contamination des fruits à coque par les mycotoxines a lieu au cours du stockage, elle est liée au développement de moisissures capables de croître sur des substrats contenant 10 à 18% d'humidité. Bien qu'elles soient peu exigeantes, la réunion de certains facteurs, nutritifs et environnementaux est néanmoins nécessaire au développement des moisissures (**Oswald, 2000**).

### 2.2.2 Les éléments nutritifs

Ainsi, le carbone et l'azote sont les éléments nutritifs les plus importants pour les moisissures en sus de quelques ions minéraux (potassium, phosphore, magnésium...) et ce, en très faibles quantités (**Najih, 2008**).

### 2.2.3 Les facteurs environnementaux

Ces substances nutritives sont souvent abondantes mais c'est généralement une bonne combinaison des facteurs environnementaux déterminants que sont l'humidité, l'oxygénation, la température et le pH qui fait défaut entravant ainsi le développement des moisissures (**Najih, 2008**).

#### 2.2.3.1 Humidité relative

Elle est optimale entre 0,78 et 0,84 pour *Aspergillus flavus*. C'est le facteur le plus important et commun à toutes les moisissures (**Morceau, 1974**).

#### 2.2.3.2 Température

Les champignons sont classés selon la gamme de température à laquelle ils se développent (**Tableau 2**). On distingue quatre catégories des plus fréquentes au moins fréquentes : mésophiles (0 à 50 °C), à température optimale de 15 à 30°C, thermophile (20 à 50°C), psychrophiles (0 à 20°C). La majorité des champignons sont mésophiles (**Roquebert, 1977**). La majorité des espèces se développent entre 22°C et 27°C. Pour la plupart des champignons, surtout les moisissures dont les mésophiles c'est à dire qu'il se développe autour de 20°C à 25°C, pour *Aspergillus flavus* l'éventail va de 10 à 45°C (**FAO, 1977 ; DIO, 1978 ; Adary et Med, 1998**).

**Tableau 2.**Températures de croissance de quelques espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.

| Champignons                        | Température |          |          |
|------------------------------------|-------------|----------|----------|
|                                    | Minimale    | Optimale | maximale |
| <i>Aspergillus flavus</i>          | 15          | 35       | 44       |
| <i>Aspergillus clavatus</i>        | 10          | 25       | 37       |
| <i>Penicillium aurantiogriseum</i> | 8           | 24       | 28       |
| <i>Penicillium purpurogenum</i>    | 12          | 28       | 35       |
| <i>Fusarium tricinctum</i>         | 5           | 25       | 35       |

(Pfohl-Leszkowicz, 1999)

### 2.2.3.3 Teneur en oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) et en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)

La plupart des moisissures sont aérobies et exigent une bonne oxygénation et un taux de CO<sub>2</sub> inférieur ou égal à 10% cependant, certains tolèrent des quantités relativement faible d’oxygène et peuvent même se développer en anaérobiose.

### 2.2.3.4 Le potentiel hydrogène (pH) du substrat

Le développement d’un champignon sur un substrat donné est liée à des propriétés inhérentes au champignon telles que la capacité à produire des métabolites (enzyme, pigments, synthèse de toxine) .La tolérance au pH est assez grande pH = 2 à 7,5 (Meletiadis et al., 2001).

## 2.3 Identification des moisissures

### 2.3.1 Analyse morphologique

L’identification des moisissures repose sur des critères essentiellement morphologiques ; tels que la taille, la forme, la couleur des colonies sur des milieux définis et étude microscopique des caractères du mycélium et des fructifications. Cette dernière fait appel à des techniques particulières comme la culture sur lame gélosée directement observable au microscope. Si la détermination du genre est assez simple, celle des espèces de nombreux genres est l’affaire de spécialiste (Guiraud & Rosec, 2004). Les moisissures peuvent êtres identifiées et quantifiées à l’aide d’un microscope. Elles sont quantifiées en unités formatrices de colonies (UFC).

### 2.3.2 Analyse chimique

Il existe des galeries d'identification biochimiques mais leur emploi n'est pas courant, citons l'exemple des tests Biolog TM utilisables pour de nombreux micro-organismes dont les moisissures (**Guiraud & Rosec, 2004**). L'identification des micro-organismes par le système Biolog est réalisée grâce à un lecteur de plaques automatique jumelé à une banque de données informatique contenant le profil de la bactérie ou la moisissure de référence (**Breton et al., 2014**). La technologie Biolog TM utilise des microplaques 96 puits prêts à l'emploi avec 95 substrats de 6 à 8 classes différentes pour une meilleure discrimination. La capacité d'un isolat à métaboliser chaque substrat est mesuré par la présence ou l'absence d'une coloration rouge pour les champignons filamenteux (**Diguta, 2010**). Elles s'accompagnent souvent d'observations macroscopiques et microscopiques, mais elles ne sont pas fiables et nécessitent une confirmation d'identification par séquençage.

### 2.3.3 Analyse moléculaire

La mise en œuvre de techniques d'identification moléculaire par séquençage de gènes de référence se révèle utile, soit pour confirmer certaines identifications difficiles, soit d'emblée pour permettre une identification d'un isolat sans diagnostic microscopique au préalable. Dans ce cas, le diagnostic moléculaire doit être confronté aux caractéristiques morphologiques et physiologiques (**Reboux et al., 2006**). Les techniques moléculaires ne peuvent pas être appliquées en routine à un grand nombre d'isolats fongiques pour des contraintes économiques et de temps. Elles ne sont mises en œuvre que dans des cas précis où il est nécessaire d'obtenir une identification non-équivoque (**Reboux et al., 2006**).

## 2.4 Rôle des moisissures

Sur le plan économique on peut distinguer deux groupes de moisissures, celles qui sont utiles, utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques, d'autres nuisibles et toxigènes qui peuvent se développer sur différents substrats et y produire, dans certaines conditions de températures et d'humidité, des molécules toxiques dénommées mycotoxines (**Boudra, 2009**).

### 2.4.1 Rôle dans l'industrie alimentaire

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, protéolytiques, etc....) qui en font des agents de dégradation dangereux mais parfois des agents technologiques utilisés dans l'affinage des fromages et dans la production d'enzymes (**Guiraud, 1998 ; Guiraud & Rosec, 2004**). Selon **Webster & Weber (2009)** les *Aspergillus* et les *Penicillium* jouent un rôle primordial en biotechnologie grâce à leur aptitude à produire de grandes quantités d'enzymes extracellulaires tels que les protéases, amylases, lipases et les pectinases utilisés dans de nombreux processus industriels y compris la fabrication de produits de boulangerie, les produits laitiers, les jus et dans l'industrie de l'amidon.

On note leur rôle utile dans la fabrication de nombreux aliments. Ainsi, des souches sélectionnées de moisissures sont utilisées dans la fabrication du Roquefort (*Penicillium roquefortii*) ou du Camembert (*Penicillium camembertii*) (**Delarras, 2007**). En outre, d'autres souches appartenant au genre *Aspergillus* interviennent dans la production des sauces de soja dont la matière première est un mélange de grains de soja et de blé, la dégradation de ce substrat est appelée le processus de Koji et consiste l'un des meilleurs exemples pour la fermentation d'un substrat solide où l'on utilise les deux espèces *A. oryzae* et *A. sojae* (**Webster & Weber, 2009**).

### 2.4.2 Rôle dans l'industrie pharmaceutique

Certaines moisissures sont utilisées pour la production d'antibiotiques telle que la découverte de l'activité antibiotique très importante de la pénicilline (**Filtenborg et al., 1996**) contre les bactéries à Gram-négatif, produite naturellement par l'espèce *Penicillium notatum* (**Webster & Weber, 2009**). Selon (**Boutibonnes et al., 1984**), les toxines secrétées par quelques moisissures s'accompagnent également d'un pouvoir antibactérien qui s'exprime préférentiellement sur des espèces du genre *Bacillus*.

### 2.4.3 Rôle phytosanitaire

Les champignons entomopathogènes sont bien connus d'être efficaces dans la lutte contre les insectes. Une étude récente de (Seye *et al.*, 2014) a mis en évidence, pour la première fois, l'effet pathogène de deux moisissures à savoir *Aspergillus flavus* et *A. clavatus* contre le puceron de la fève *Acyrtosiphon pisum* (Harris) et suggère leur utilisation comme agents de lutte biologique contre les aphides.

## 2.5 Les Principales moisissures toxigènes

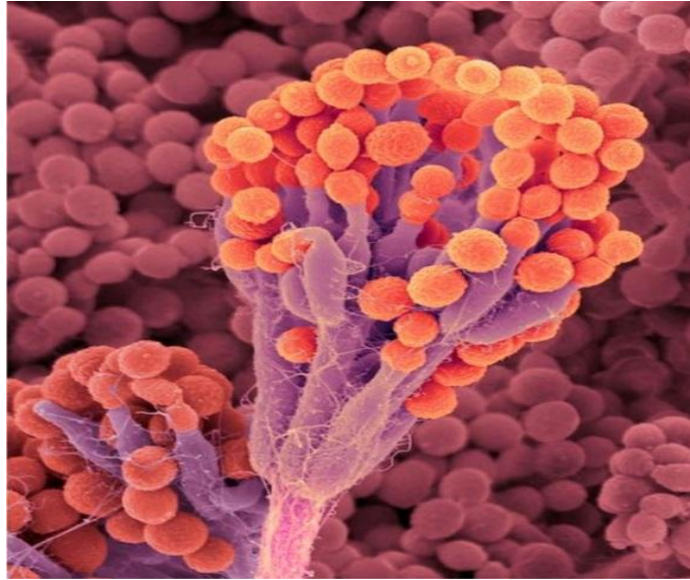
### 2.5.1 Genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* comprend entre 150 et 300 espèces, réparties en quatre sous-genres appartenant à la division 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 & Hocking, 1987).

#### a. Critères d'identification microscopiques et macroscopiques

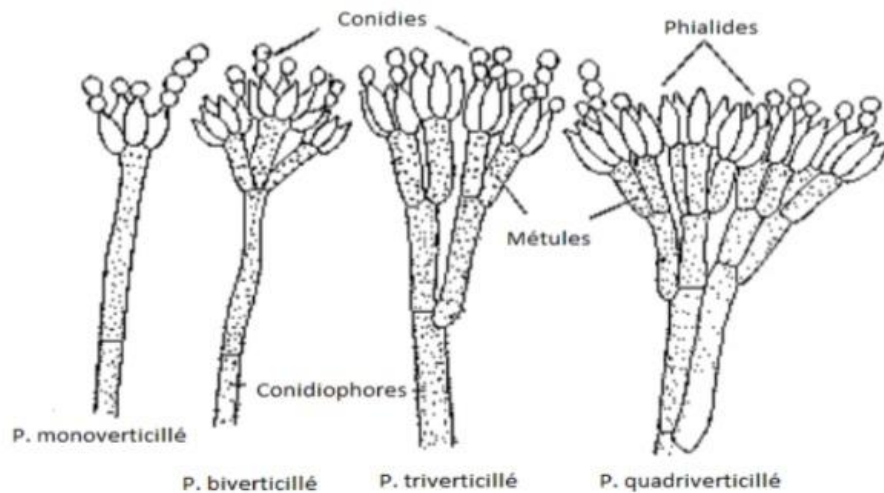
Les colonies présentent un aspect duveteux voire poudreux, de couleur vert-de-gris et, plus rarement, blanche. Morphologiquement, les individus du genre *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau (*Penicillius* en latin) (Figure 2).

Le thalle cloisonné porte les conidiophores, simples ou ramifiés, 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 conidiophores. Les phialides donnent naissance aux spores qui se positionnent alors en chaînes (Botton *et al.*, 1990)



**Figure 2.** *P. notatum* au microscope électronique  
 (<http://www.visualsunlimited.com/image/I0000iTwhQpa35KE>)

Plusieurs dispositions sont possibles (**Figure 3**) :



**Figure 3.** Schéma des différentes dispositions de verticilles chez *Penicillium sp.* (Samson et al., 1980)

- **Penicillium monoverticillé** : les phialides sont insérées directement sur le stipe. Exemple : *Penicillium restrictum*, *Penicillium glabrum*.

- **Penicillium biverticillé** : on observe la présence d'une rangée de métules (cellules stériles). Exemple : *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*.
- **Penicillium triverticillé** : il se caractérise par la présence de deux rangées de métules. Exemple : *Penicillium verrucosum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*.
- **Penicillium quadriverticillé** : cette disposition est plutôt rare et se distingue par trois rangées de métules insérées sur les conidiophores (<http://www.univbrest.fr>).

## b. Habitat

Genre polyphage et saprophyte, *Penicillium* est responsable de nombreuses dégradations. Il est très commun dans l'environnement ; on le retrouve aussi bien dans le sol et les matières organiques en décomposition que dans les denrées alimentaires telles que les céréales, les arachides et les produits laitiers. C'est un contaminant très fréquent des régions tempérées ; sa croissance est optimale pour des températures comprises entre 20 et 27°C et pour une humidité importante. On le retrouve également poussant sur des matériaux de construction dans des environnements endommagés par l'eau, ainsi que dans l'air intérieur et la poussière domestique (Storey et al., 2004).

### 2.5.2 Genre *Aspergillus*

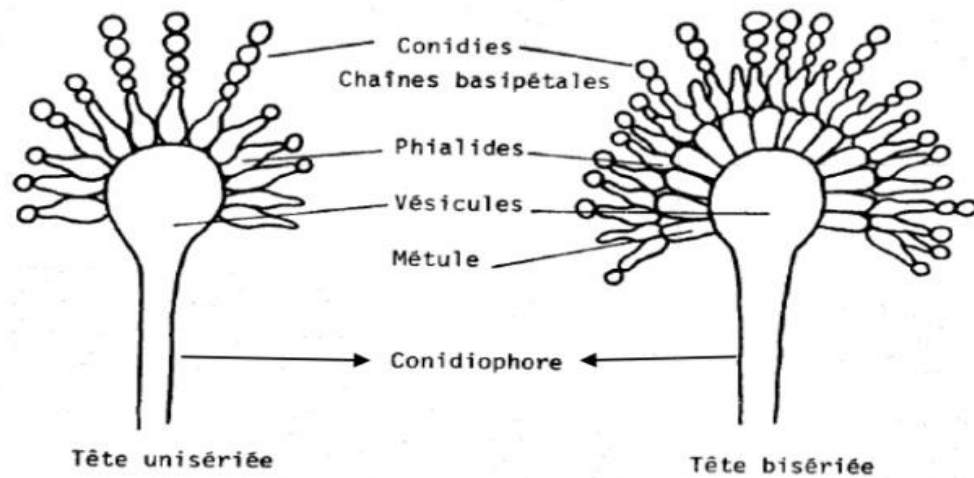
Le genre *Aspergillus* est classé dans la division des Deutéromycètes. De même que pour les *Penicillia*, certaines formes sexuées d'*Aspergillus spp* sont connues et appartiennent à la division des Ascomycètes, dont les genres les plus notables sont *Eurotium* et *Emericella*. Environ 180 espèces, réparties en 18 groupes, composent le genre *Aspergillus* (Gams et al., 1986). Sur ces 180 espèces, une vingtaine est pathogène pour l'Homme et l'animal.

#### a. Critères d'identification microscopiques et macroscopiques

Les colonies d'*Aspergillus spp.*, duveteuses ou poudreuses, à développement rapide, sont le plus souvent de couleurs vives et variées.

L'appareil végétatif d'*Aspergillus spp* est formé de filaments mycéliens cloisonnés et ramifiés. Se dressent sur ces filaments végétatifs les conidiophores (**Figure 4**) qui se terminent par une vésicule de forme variable. La forme et la taille de cette vésicule sont spécifiques de l'espèce en question. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule : dans ce cas on parlera

de « tête unisériée ». Si les cellules conidiogènes sont précédées de métules, on parlera de « tête bisériée» (**Figure 4**). L'ensemble phialides/métules forme le stérigmate. Le stérigmate, la vésicule et les spores constituent la « tête aspergillaire ». Les spores sont insérées en chaîne sur les phialides. Elles sont unicellulaires, de forme globuleuse, ou elliptique, et de couleurs variables (**Raper et al., 1965**).



**Figure 4.** Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (**Azzoune, 2009**)

### b. Habitat

À l'instar des *Penicillia*, les *Aspergilli* sont cosmopolites et omniprésents dans l'environnement intérieur, surtout dans la poussière. Leur dissémination est d'autant plus facile qu'une « tête aspergillaire » est capable de produire au cours de sa vie jusqu'à 104 spores.

La répartition géographique des *Aspergilli* est assez vaste. Ils sont le plus souvent présents dans les zones tropicales et subtropicales, donc adaptés à des climats chauds et à des milieux pauvres en eau (**Castegnaro & Pfohl-Leszkowicz, 2002**). La température optimale de croissance de la plupart des espèces d'*Aspergillus* se situe entre 25 et 40°C. La plupart des *Aspergilli* poussent à 20-25°C. Les espèces thermophiles, comme *Aspergillus fumigatus*, se développent au-delà de 35°C et parfois même jusqu'à 57°C (**Badillet et al., 1987**). C'est pourquoi ils se développent très

bien dans les produits alimentaires dits secs : salaisons, blé, farines et arachide. Les espèces à l'origine d'Aspergillose sont (**Morin, 1994**) :

- *Aspergillus fumigatus* : c'est l'agent responsable de l'aspergillose bronchopulmonaire, qui est une réaction allergique au champignon, et d'Aspergillomes (colonisation d'une cavité tuberculeuse).
- *Aspergillus flavus* : il est responsable d'aspergillose pulmonaires ou généralisées.
- *Aspergillus niger* : il est à l'origine d'otites, de sinusites et d'infections cutanées.
- *Aspergillus terreus* : il est impliqué dans l'apparition d'aspergillose pulmonaires et cérébrales chez les patients immuno-déficients (**Baculard & Tournier, 1995**).

D'autres espèces sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des biotechnologies, impliquée dans la production d'acides organiques, d'enzymes et de pigments (**Botton et al., 1990**) ; (**Schuster et al., 2002**). *Aspergillus niger* est employé pour la synthèse d'acides alimentaires comme l'acide citrique et l'acide gluconique, ainsi que pour la production d'enzymes (alpha-amylase, lipase, pectinase...). *Aspergillus oryzae* est utilisé dans les pays asiatiques pour la production de produits fermentés à base de soja.

### 2.5.3 Genre *Fusarium*

Les *Fusaria* sont des champignons filamenteux saprophytes appartenant aux Deutéromycètes. Certaines formes sexuées (*Gibberella*, *Nectria*) sont connues et rattachées à l'embranchement des Ascomycètes. C'est un genre qui comprend entre 50 et 100 espèces anamorphes. Le genre *Fusarium* tire son nom du latin « fusus » qui signifie fuseau, en référence à la forme des conidies.

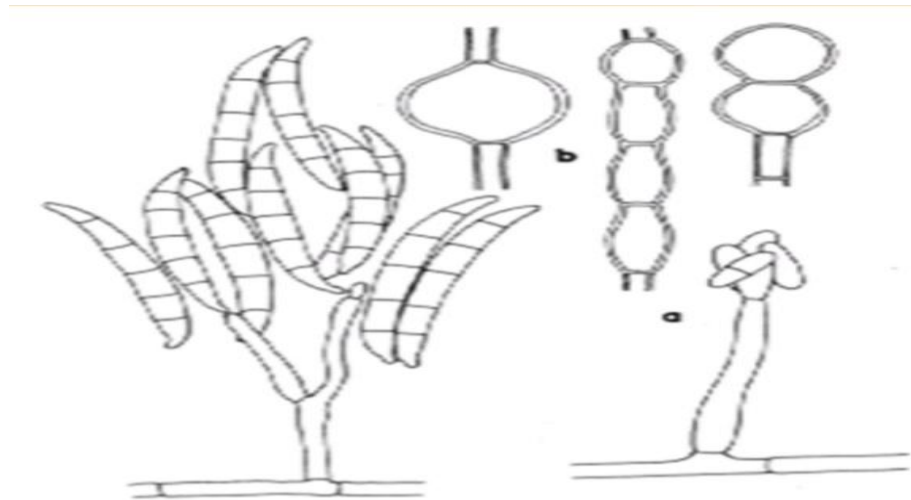
#### a. Critères d'identification microscopiques et macroscopiques

Les *Fusaria* se développent rapidement et produisent des colonies planes, d'aspect cotonneux, voire floconneux, et de couleurs claires : crème, blanche, saumon, violette, brune, jaune (**Chermette & Bussieras, 1993**).

Le principal caractère microscopique de reconnaissance des *Fusaria* réside dans la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées. Les différentes espèces se distinguent essentiellement par la forme de leurs conidies. Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des

coussinets (sporodochies) et portent des grappes de spores. Les cellules conidiogènes peuvent produire différents types de spores :

- **Les microconidies** : elles sont de petite taille et peuvent être uni- ou bicellulaires. Elles sont de différentes formes : fusiformes, ovoïdes, cylindriques, solitaires ou groupées (**Figure 5a**). On peut citer en exemple *Fusarium verticillioides*.



**Figure 5.**Schéma d'un *Fusarium* (a) Microconidie ; (b) Chlamidospores ([www.telmeds.org](http://www.telmeds.org))

- **Les macroconidies** : ce sont des conidies pluricellulaires, cloisonnées, fusiformes et de grande taille. La cellule basale est pédicellée et la cellule apicale forme un crochet, idéal pour la dissémination. Elles sont fréquemment regroupées en grappe. On retrouve les macroconidies notamment chez *Fusarium graminearum*.
- **Les chlamydo-spores** : ce sont des spores résistantes ne se détachant pas de la moisissure. Elles ne sont pas produites par toutes les espèces de *Fusarium*. Elles peuvent être terminales ou intercalaires (**Roquebert, 1998**) et peuvent résister des années dans le sol, préservant ainsi le champignon (**Figure 5b**).

## **b. Habitat**

Les *Fusaria* sont cosmopolites, on les retrouve dans toutes les régions du monde, des régions tropicales et désertiques aux régions tempérées, leur température idéale de croissance étant située

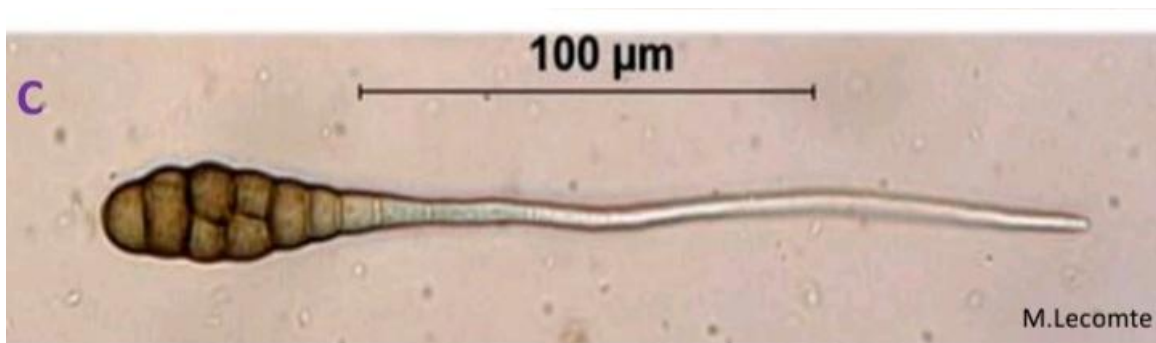
entre 22 et 37°C (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Du fait de l'existence de chlamydo-spores chez certaines espèces, la conservation du mycélium dans le sol et sa dissémination sont facilitées.

#### 2.5.4 Genre *Alternaria*

Ces mycètes filamenteux imparfaits appartiennent à la division des Deutéromycètes. Environ une cinquantaine d'espèces est identifiée, mais on estime qu'il en existe plus du double. *Clathrospora*, *Lewia*, *Pleospora* sont les formes sexuées du genre *Alternaria*, elles sont rattachées aux Ascomycètes. *Alternaria alternata* est le chef de file de ce genre.

##### a. Critères d'identification microscopiques et macroscopiques

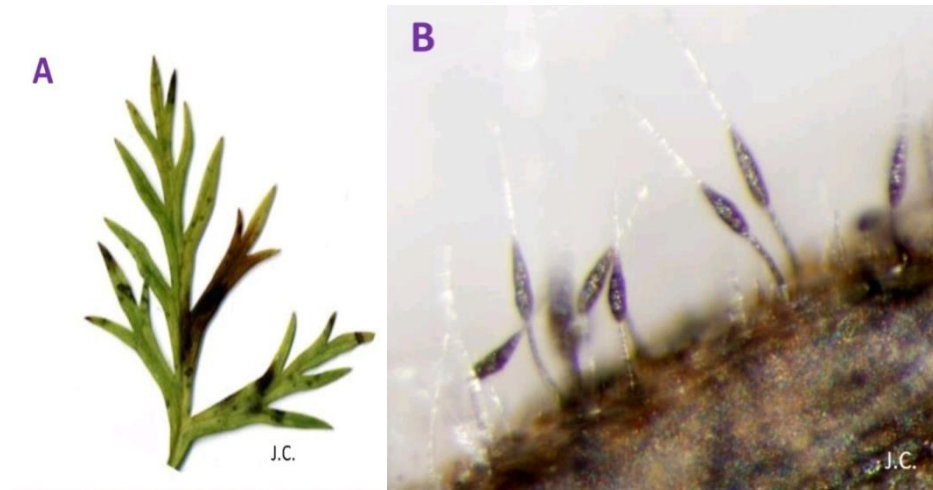
Au niveau macroscopique, les colonies d'*Alternaria spp.* ont un aspect de velours, de couleur noire ou grise. Au niveau microscopique, les conidiophores courts et cloisonnés sont de couleur foncée (Figure 6). À leur extrémité se situent des chaînes simples ou ramifiées de spores. Les spores, initialement ovales, prennent une forme de massue en vieillissant. Elles sont pluricellulaires et divisées par des cloisons longitudinales ou transversales (Larone, 1987).



**Figure 6.** Conidie et conidiophore d'*A. dauci* observée au microscope optique (Courtial, 2018)

##### b. Habitat

Le genre *Alternaria* est aussi un genre ubiquitaire, on le retrouve dans toutes les régions du Globe. Les espèces d'*Alternaria* peuvent croître à des températures allant de 0 à 32°C, bien que leur température optimale de croissance soit comprise entre 22 et 27°C. Ce champignon est considéré comme une des moisissures aéroportées extérieures les plus importantes. Il est aussi très présent dans la poussière des environnements intérieurs (Figure 7).



**Figure 7.a)** Symptômes causés par *Alternaria dauci* sur une feuille de carotte porte-graine provenant d'une parcelle de la FNAMS, Pays de la Loire, **b)** Conidies d'*Alternaria dauci* à la surface nécrotique d'une feuille de carotte observées à la loupe binoculaire (**Courtial, 2018**)

### 2.5.5 Genre *Claviceps*

Les espèces du genre *Claviceps* ne sont pas classées dans la division des Deutéromycètes. En effet, le mode de reproduction sexuée a été identifié chez tous les individus de ce genre. C'est donc un genre prenant place à part entière dans la famille des *Clavicipitacées*, division des Ascomycètes. Il regroupe une cinquantaine d'espèces produisant plus de cinquante alcaloïdes différents (**Rehacek & Sajdl, 1990**). L'espèce la plus représentative est *Claviceps purpurea*, agent responsable de la maladie de l'ergot du seigle chez les végétaux et de l'ergotisme chez l'Homme et l'animal (**Bouchet et al., 2005**).

#### a. Critères d'identification

Les différentes espèces se distinguent par la couleur, la forme et la taille du sclérote, aussi nommé ergot. Le sclérote (**Figure 8**) est la forme de résistance du champignon durant l'hiver. Son enveloppe protectrice est rigide et de couleur brun-violacé à noir. Les caractéristiques morphologiques du sclérote dépendent de l'hôte. Il est composé d'un amas compact de filaments mycéliens. Au printemps, le sclérote germe et cet agglomérat, dénommé stroma, devient l'organe dans lequel se réalise l'élaboration des ascocarpes, producteurs de spores. Si le sclérote est la forme sexuée du *Claviceps spp*, la sphacélie en est la forme végétative.



**Figure 8.**Sclérote de *Claviceps microcephala* (<https://www.talking.com/blogeurope/?p=1600>)

#### **b. Habitat**

*Claviceps* est un genre qui prolifère dans les zones tempérées car sa croissance nécessite des températures comprises entre 5 et 20°C (Alderman, 1993). Une température de 12°C est idéale pour le développement des sclérotes et la production de spores. Par ailleurs, les temps frais et humides favorisent la germination des ergots.

# **Partie**

## **Matériel et méthodes**

### 3 Partie Matériel et méthodes

#### 3.1 Objectif de l'étude

L'objectif de notre travail est de tester *in vitro* l'activité antifongique des jus brut frais des substances naturelles (*Allium cepa* «oignon rouge», *Allium sativum* «Ail», *Zingiber officinale* «Gingembre» et l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus* «bouton floraux ou clou de girofle») ainsi qu'un pesticide chimique le «Difenoconazole» sur la croissance de la moisissure *Alternaria citri*.

#### 3.2 Matériel biologique

La souche de moisissure *Alternaria citri* a été donnée par l'Institut National de Protection des Végétaux «INPV» de la wilaya d'El-Tarf (**Figure 9**), elle a été isolée à partir des feuilles d'oranges et cultivé sur le milieu spécifique : Potato Dextrose Agar (PDA).



**Figure 9.** *Alternaria citri* sur milieu PDA

#### 3.3 Repiquage de la souche

Un repiquage a été réalisé sur milieu Sabouraud-chloramphénicol en tubes pour assurer la conservation de la moisissure jusqu'à la réalisation de nos tests.

Le repiquage a été réalisé au laboratoire de Recherche de Biochimie et Toxicologie Environnementale à l'université Badji Mokhtar de Annaba.

Les tests de l'activité antifongique ont nécessité une culture jeune de la moisissure *Alternaria citri*.

### 3.3.1 Technique

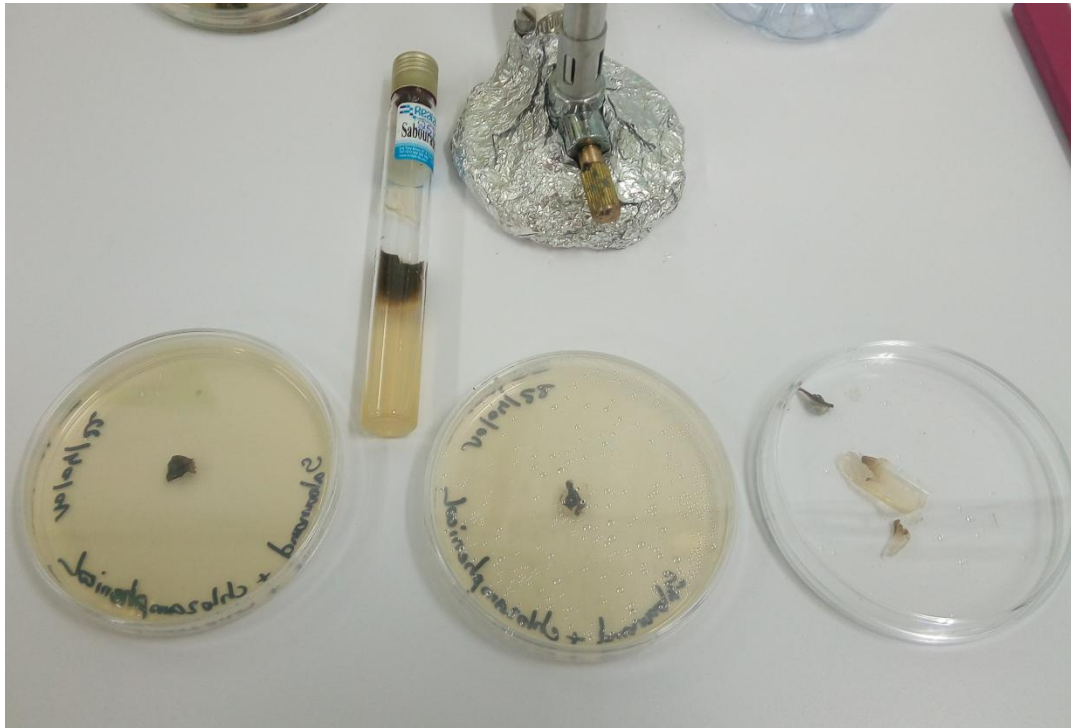
- ❖ Dans une zone de paille propre et javellisée, on découpe stérilement à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'un bistouri stérile un fragment à la périphérie de la colonie de la moisissure repiquée.
- ❖ On dépose ce fragment stérilement au centre de la boîte de Pétri contenant la gélose Sabouraud-chloramphénicol (**Figure 10**).



**Figure 10.** Repiquage de la moisissure sur gélose Sabouraud-chloramphénicol en boîtes

### 3.3.2 Incubation

- ❖ On incube notre boîte de Pétri dans une étuve bactériologique réglée à 25°C pendant 5 jours



**Figure 11.** Culture de la moisissure sur la gélose Sabouraud-chloramphénicol avant incubation

### 3.3.3 Caractérisation macroscopique

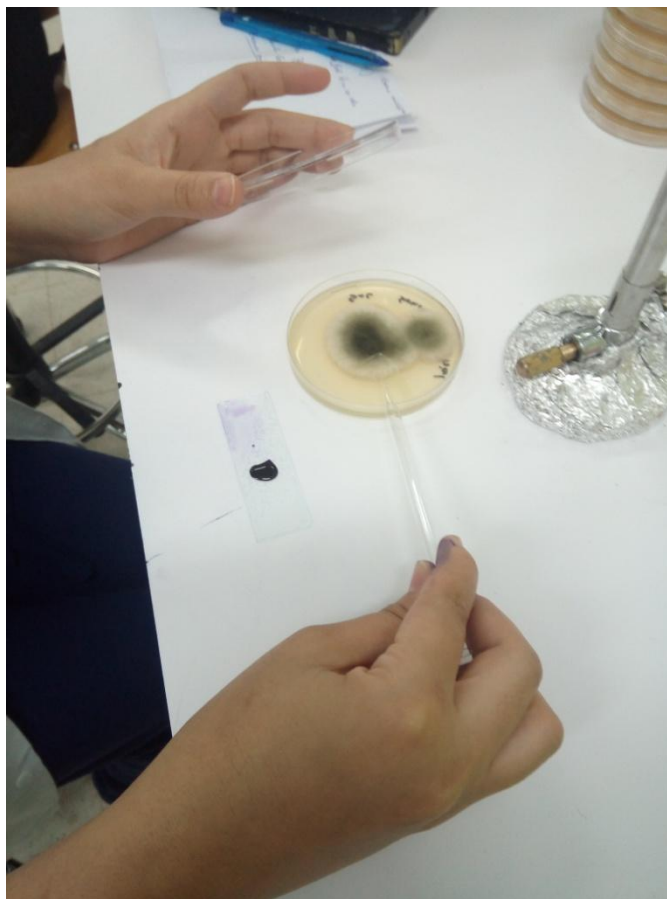
La caractérisation macroscopique de la culture après incubation de la moisissure à été basé sur l'étude des caractères suivants:

- [1].La vitesse de croissance de la moisissure
- [2].Le diamètre de la colonie
- [3].Aspect de la colonie
- [4].La pigmentation

### 3.3.4 Caractérisation microscopique

L'examen microscopique de la moisissure a été réalisé selon la technique suivante :

- ❖ On met une goutte de colorant Bleu de méthylène sur une lame propre et dégraissée
- ❖ On découpe un morceau de ruban adhésif qu'on dépose sur la moisissure jeune
- ❖ on prélève et on dépose sur le colorant (**Figure 12**)
- ❖ On observe au microscope optique à l'objectif X40



**Figure 12.** Technique de ruban adhésif pour l'examen microscopique

### 3.4 Test de l'activité antifongique

#### 3.4.1 Préparation des jus bruts

Des jus bruts frais ont été extraits à partir des produits naturels, connus pour leurs activités antibactérienne et antifongique : *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale* « Gingembre», ces jus ont été récoltés dans des tubes stériles et soigneusement étiquetés, l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus* «bouton floraux ou clou de girofle» ainsi que le pesticide Difenoconazole ont été testés (**Figure 13**).

Le test de l'activité antifongique a été réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé.



**Figure 13.** Les produits testés contre la croissance d'*A. citri*

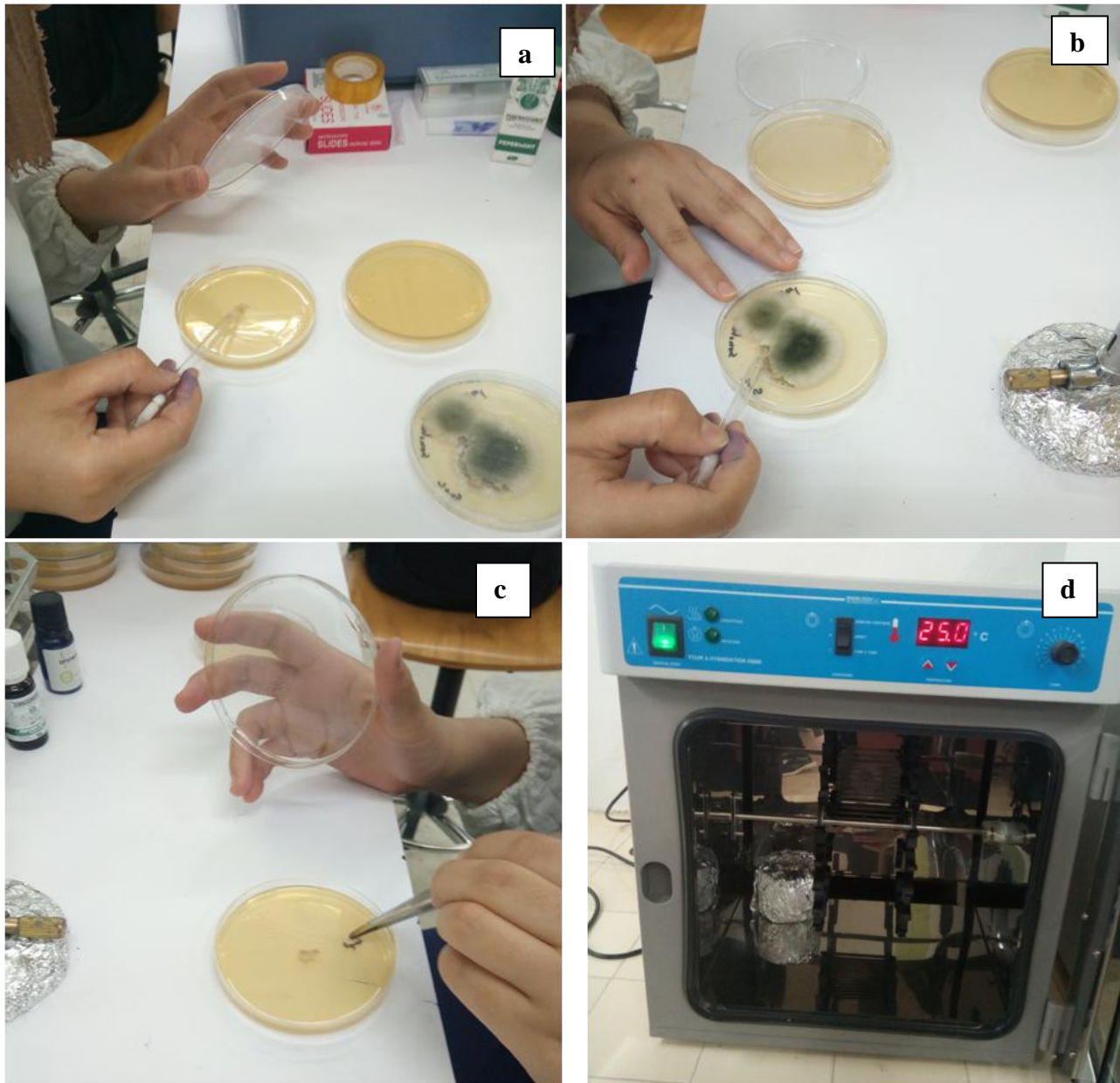
### 3.4.2 Technique

- ❖ Prélever stérilement un disque de la moisissure *Alternaria citri* à l'aide d'une pipette Pasteur stérile (**Figure 14 a et b**)
- ❖ Déposer stérilement le disque de moisissure au centre de la boîte de Pétri contenant la gélose Sabouraud.
- ❖ Déposer les disques de papier Whatman stériles (6mm de diamètre) imbibés par des jus bruts des produits naturels (**Figure 14 c**)
- ❖ Déposer les disques de papier Whatman stérile imbibés par l'huile essentielle et par le fongicide chimique (**Figure 14 c**)

### 3.4.3 Incubation

- ❖ Incuber les boîtes dans une étuve bactériologique réglée à 25°C pendant 5 jours (**Figure 14 d**)
- ❖ Les tests ont été répétés 3 fois pour chaque produit naturel testé.

❖ Mesurer les zones d'inhibition en mm après la période d'incubation



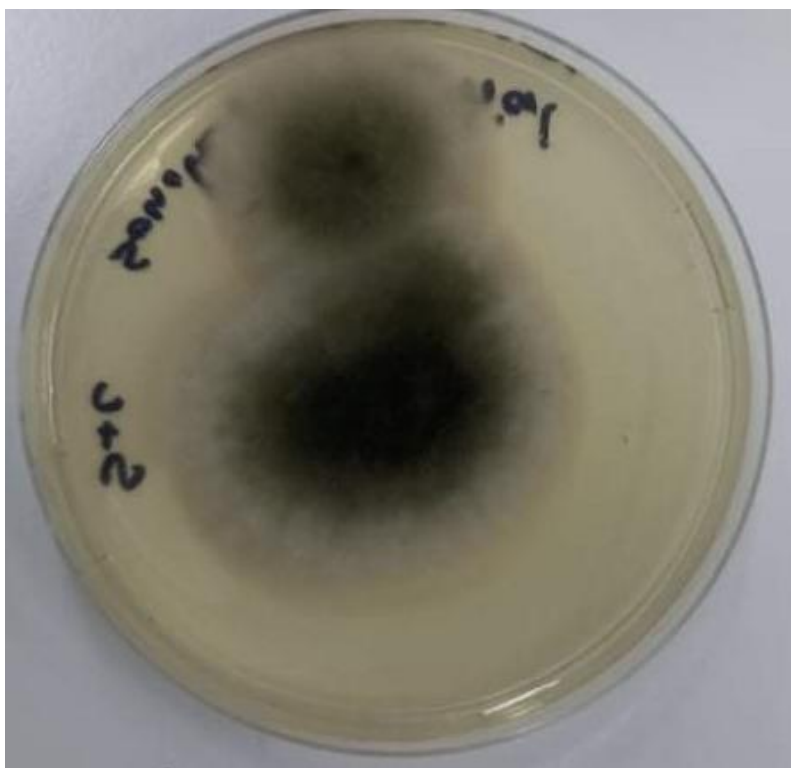
**Figure 14.**(a) et (b) Prélèvement de la moisissure, (c) : dépôt de disque de papier Wathman imbibé, (d) incubation des boites

# **Résultats & Discussion**

## 4 Résultats et discussion

### 4.1 Aspect macroscopique de la colonie repiquée

Après cinq (05) jours d'incubation dans une étuve bactériologique à 25°C, on a obtenu une colonie qui a avait un diamètre de **4.8 cm** avec un centre de couleur vert olive de **3.5 cm** de diamètre, entourée par une zone blanchâtre de **5 mm** d'épaisseur (**Figure 15**).



**Figure 15.**Morphologie de la colonie d'*Alternaria citri* sur milieu Sabouraud

### 4.2 Examen microscopique

L'examen microscopique à montrée la présence de petites conidies, qui sont une caractéristique importante de cette espèce. Les conidies sont de forme ovale, divisés par des parois transversales et verticales (**Figure 16**).



**Figure 16.** Les spores d'*Alternaria citri* (conidies jeunes et adultes) à l'objectif X 40

*Alternaria citri* germe et produit un grand nombre de conidies (spores asexuées) qui se propagent par l'air et les précipitations et se dispersent et germent sur l'hôte (Rotem, 1994). Le fruit se ramollit et la pourriture noire se développe (Anwaar et al., 2020).

La pourriture noire des agrumes est le principal problème post-récolte des agrumes dans le monde (Muhammad et al., 2021).

La pourriture noire des agrumes est une maladie fongique causée par *A. citri*, ce champignon cause de graves pertes économiques dans la production des agrumes, il infecte en produisant des lésions nécrotiques noires les feuilles, les branches, les brindilles, les fruits (Smith et al., 1997) et même leurs jus qui peuvent être contaminés par des masses de mycélium noir (Vitale et al., 2021)

*A.citri* infecte principalement les fruits stressés et trop mûr. Les tissus de fruits sains exposés augmenteraient le risque d'infection par les fruits malades en ayant une blessure permettant à l'agent pathogène d'entrer. La pourriture noir est la cause de pertes importantes d'agrumes lors du stockage.

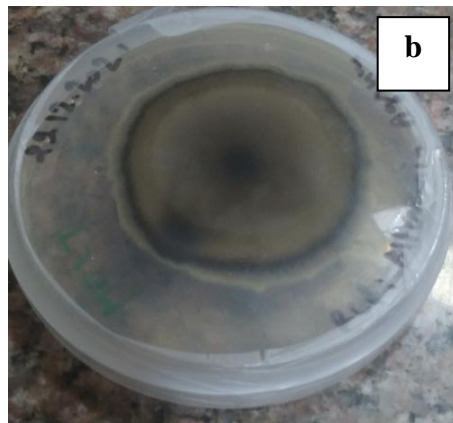
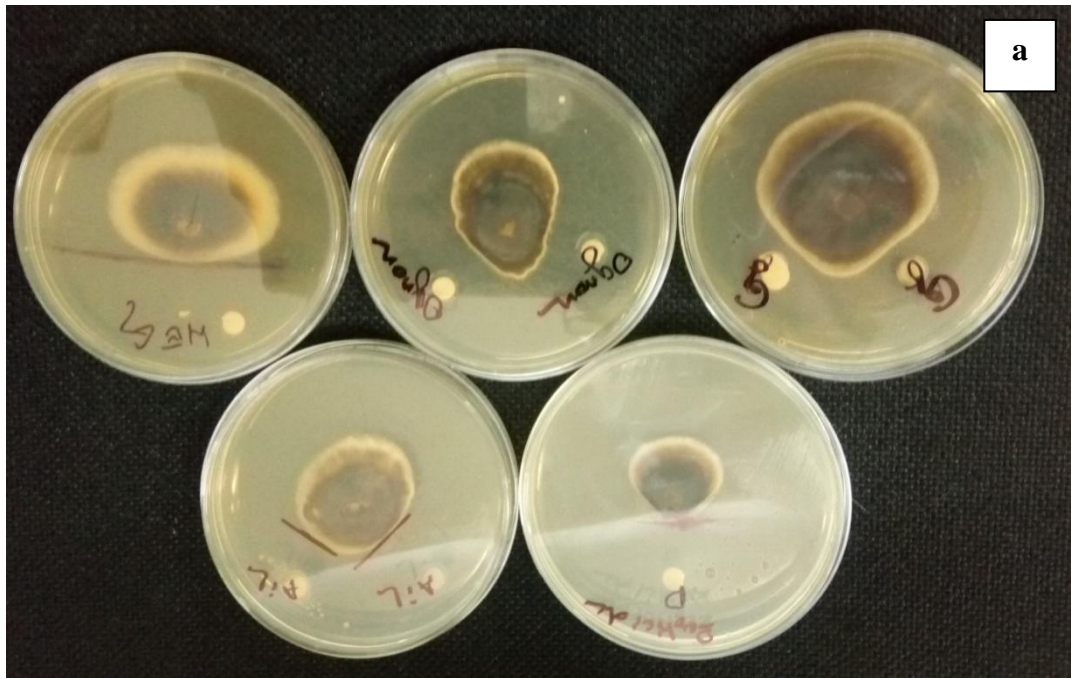
#### 4.3 Les tests de l'activité antifongique des produits

Les résultats des tests antifongiques obtenus ont montrés les résultats résumés dans le **tableau 3** ci-dessous :

**Tableau 3. Résultats de l'activité antifongique des produits testés**

| Diamètre | Pesticide | <i>Allium cepa</i> | <i>Allium sativum</i> | <i>Zingiber officinale</i> | HE<br><i>Eugenia caryophyllus</i> |
|----------|-----------|--------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|
|          | 16±1.732  | 14±1               | 16.33±3.214           | 9.33±0.577                 | 16.66± 2.081                      |

On remarque qu'après incubation des boîtes pendant 5 jours que la moisissure testée avec les produits naturels et le pesticide n'avaient pas la forme circulaire (Figure 17a) comme celle de la forme initiale (Figure 17b).

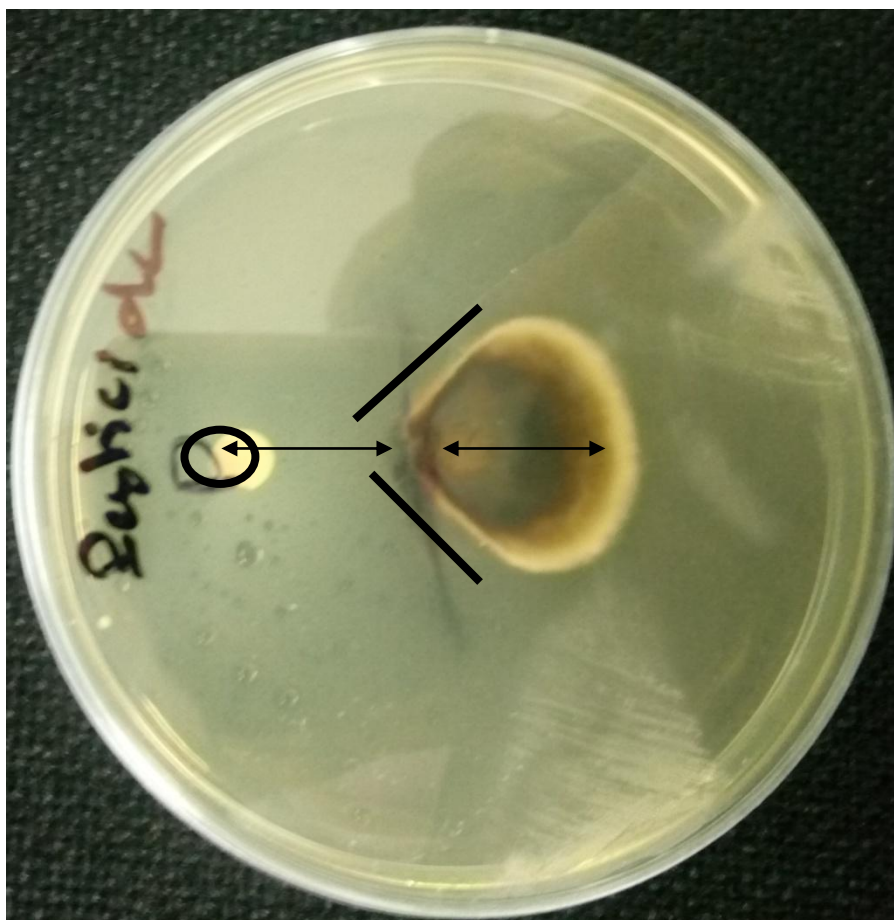


**Figure 17.**Aspect des colonies *d'A.citri* (a) : après incubation avec les produits testés, (b) : après incubation sans produits inhibiteurs

#### 4.3.1 Le pesticide «Difénoconazole»

Des études menées *in vitro* par **Farooq et al. (2018)** ont montré qu'une combinaison d'azoxystrobine et de difénoconazole a présentée une inhibition maximale de la croissance mycélienne d'*A. Citri* jusqu'à 94,95% à une concentration de fongicide de 300 ppm.

**La figure 18** montre l'arrêt de la croissance *d'A.citri* à une distance de  $16 \pm 1.732$  mm du disque de «Difénoconazole», ceci montre l'efficacité de ce pesticide chimique sur la croissance de cette moisissure.



**Figure 18.**Activité antifongique du pesticide sur la croissance *d'A. citri*

#### 4.3.2 *Zingiber officinale* « Gingembre »

La déhydrozingérone composé dérivé de la zingérone (présent dans le rhizome de gingembre est un composé antifongique potentiel entraine une diminution significative de la croissance fongique et de la germination des spores de plusieurs espèces d'*Aspergillus* (Kubra et al., 2012).



**Figure 19.**Activité antifongique de *Zingiber officinale* sur la croissance d'*A. citri*

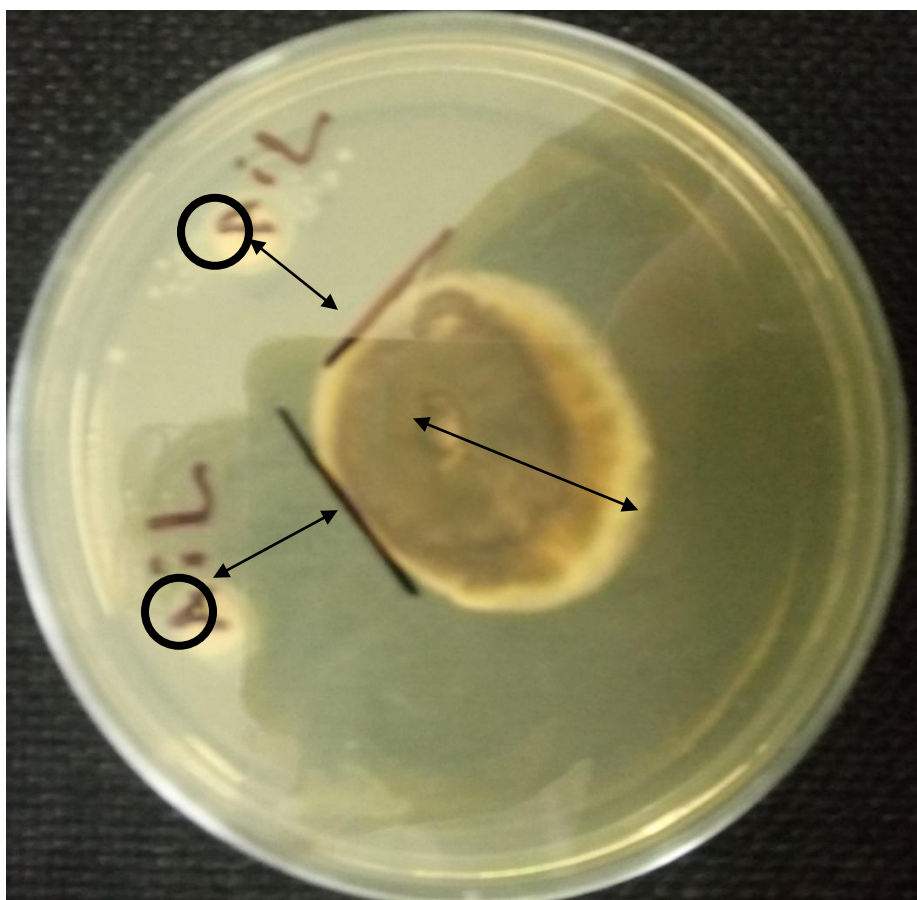
La croissance centrifuge d'*A. citri* s'est arrêtée à un diamètre de  $9.33 \pm 0.577$  mm du disque imbibé par le jus frais de *Zingiber officinale* (Figure19).

#### 4.3.3 *Allium sativum*

L'utilisation des composés organosoufrés du genre *Allium* en agriculture s'est principalement concentrée sur l'activité antifongique des dérivés de l'ail contre *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium* et *Rhizopus* spp. (Curtis et al., 2004; Kutawa, 2018).

L'ail possède une activité antifongique sur *Microsporium*, *Tricophyton* et *Aspergillus* (Tansey & Appleton, 1975). Les études de l'Institut des Plantes Médicinales de Poznan (Pologne) ont montré action importante de l'ail sur les dermatophytes (Lecerf, 2016).

La même chose à été constaté pour l'*Allium sativum* qui a inhibé la croissance d'*A. citri* à une distance de  $16.33 \pm 3.214$  mm (**Figure 20**)



**Figure 20.**Activité antifongique de l'Ail rouge sur la croissance d'*A. citri*

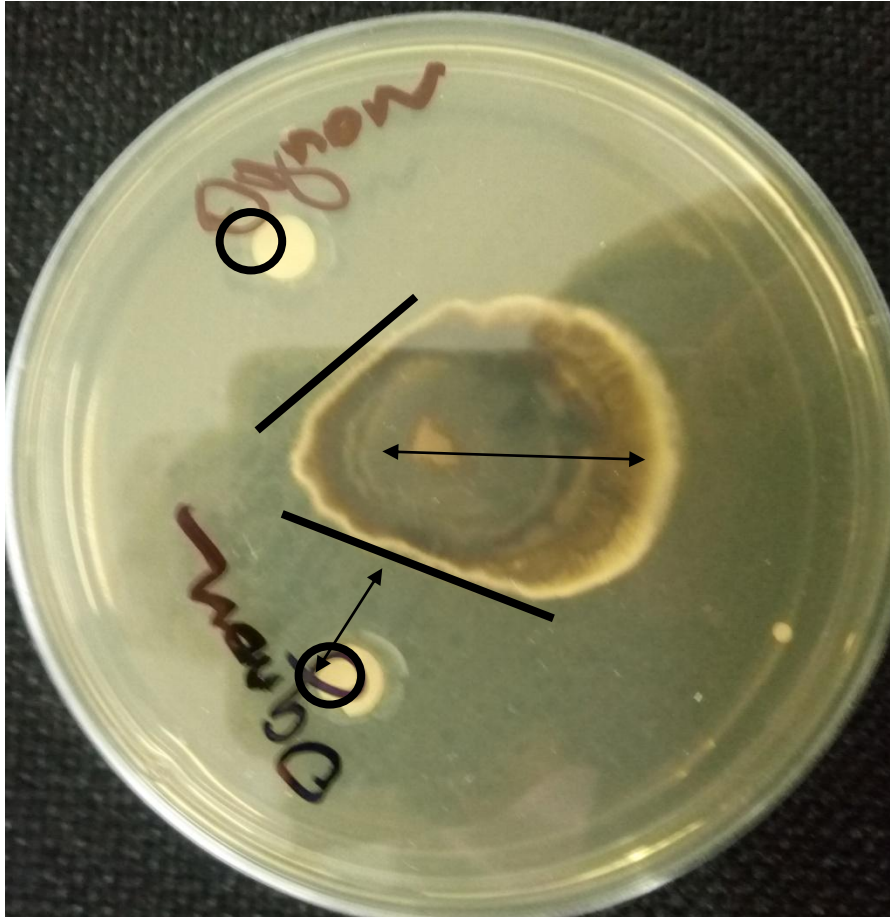
#### 4.3.4 *Allium cepa*

Idem pour *Allium cepa* qui a arrêté la croissance centrifuge de la moisissure à une distance de  $14 \pm 1$  mm (**Figure 21**).

*Allium cepa* est une plante bulbeuse largement cultivée dans presque tous les pays du monde (FAO, 2018). les propriétés biologiques d'*Allium cepa* ont été signalés par plusieurs auteurs, antibactérienne (Sorlozano-Puerto et al., 2018 ; Marrelli et al., 2019), antifongique (Falcón-Piñeiro et al., 2021).

Dans l'oignon, les composés organosoufrés les plus courants sont: l'isoalliine (S-propenyl-L-cysteine sulfoxide) et propiine (S-propyl-L-cysteine sulfoxide). Lorsqu'un oignon est écrasé ou

coupé, la propiine est transformé sous une action enzymatique en propyl-propane thiosulfinate (PTS) (Keusgen et al., 2002). Ce dernier est un composé labile qui se transforme en dipropyle disulfide et propyl-propane thiosulfonate (PTSO) (Guillamón, 2018).

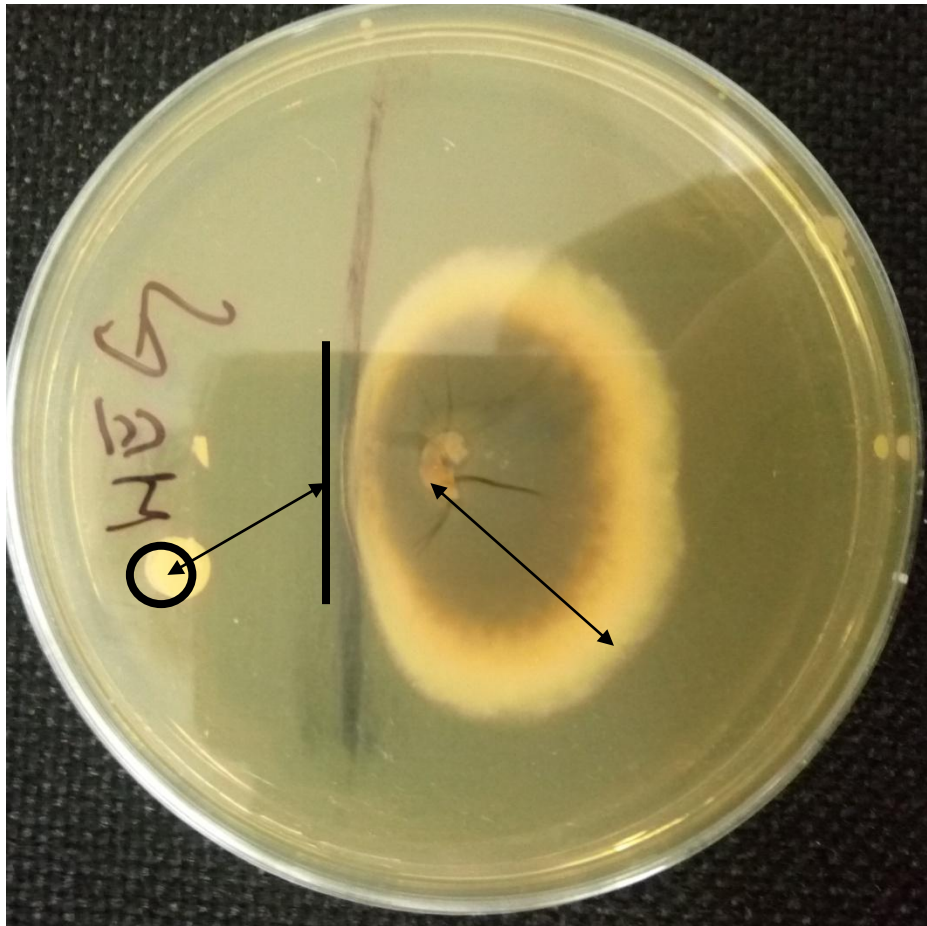


**Figure 21.**Activité antifongique de l'*Allium cepa* sur la croissance d'*A. citri*

Les résultats ont montrés que le PTS et le PTSO d'*Allium cepa* présentent une activité antifongique *in vitro* et *in vivo* contre *Verticillium dahliae* (Falcón-Piñeiro et al., 2021) agent fongique pathogène dévastateur qui attaque plus de 400 espèces végétales : les oliviers (Landa et al., 2019), l'amandier, la tomate et le cotonnier (Castro et al., 2020)

#### 4.3.5 Huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus* «bouton floraux ou clou de girofle»

La croissance d'*A.citri* en présence de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus* «clou de girofle» a montrée une diminution de diamètre la moisissure à une distance de  $16.66 \pm 2.081$  mm de l'huile essentielle (**Figure 22**).



**Figure 22.**Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus* sur la croissance d'*A. citri*

Plusieurs extraits méthanoliques de plantes ont été testés pour leur capacité à inhiber la croissance d'*A. citri* : *Polygonum perfoliatum*, *Cymbopogon citrates*, *Lantana camara* and *Mimosa pudica* (**Riaz et al., 2012**), les extraits *Acorus calamus L.* (**Masunaka et al., 2000**), ainsi que les extraits aqueux d'*Aloe vera* (**Riaz et al., 2012**).

Selon **Shehata et al. (2018)**, ont montrés dans leurs essais *in vitro* que l'utilisation des agents de lutte biologique tels que les champignons et les bactéries comme *Trichoderma harzianum* et *Bacillus subtilis* ont eu une action antagoniste sur *Alternaria citri* avec différents degrés d'inhibition.

L'alternariose est considérée l'une des maladies endémiques et émergentes dont les agents pathogènes sont potentiellement nocifs pour l'industrie des agrumes dans la région méditerranéenne (**Khanchouch et al., 2017**)

Les agrumes sont des fruits qui peuvent être affectés par la manipulation, le transport, le stockage et une commercialisation inappropriés entraînant leur pourriture. Les champignons pathogènes détruisent les fruits en produisant des mycotoxines rendant les fruits impropres à la consommation (**Mubeen et al., 2015b**).

## Conclusion

Des jus brut et frais des substances naturelles (*Allium cepa* «oignon rouge», *Allium sativum* «Ail», *Zingiber officinale* «Gingembre» et l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus* «bouton floraux ou clou de girofle») ainsi qu'un pesticide chimique le «Difenoconazole» ont été testés *in vitro* sur la croissance de la moisissure *Alternaria citri*. Les résultats obtenus ont montré que tous les produits testés avaient un effet inhibiteur sur la croissance centrifuge la colonie. Nous pouvons conclure que l'utilisation des produits naturels constitue une alternative intéressante à l'utilisation des produits chimiques et toxiques (pesticides) pour l'Homme et l'environnement.

En perspective, il serait intéressant de :

- D'explorer et rechercher d'autres sources naturelles dotées de molécules bioactives à action antibactérienne contre sur la croissance d'*Alternaria citri*.
- Caractériser les composés bioactifs à activité antifongique de ces substances naturelles
- Tester les produits naturels contre d'autres moisissures d'altération des produits végétaux.

## Références bibliographiques

- [01]. **Alderman S.C. (1993).** Aerobiology of *Claviceps purpurea* in Kentucky bluegrass. Plant Dis, 77.
- [02]. **ANONYME. (2010).** Produits phytosanitaires risques pour l'environnement et la santé. Connaissances des usages en zone non agricole, Institut d'Aménagement et d'Urbanisme île de-France, 58 p.
- [03]. **Anwaar H. ; Iqbal, Z. ; Rehman M.A. ; Mubeen M. ; Abbas A. ; Usman H.M. ; Farhan M. ; Sohail M.A. ; Kiptoo J.J. ; Iqbal S. (2020).** Evaluation of fungicides and biopesticides for the control of Alternaria black rot disease in citrus. Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology 21, 118-126.
- [04]. **Arzul G. ; Quiniou F. ; Videau C. et Durand G. (2008).** La toxicité des pesticides varie selon le stade de développement des cultures de phytoplancton au moment de leur exposition. Poster GFP, Brest.
- [05]. **Azzouz Z. (2012).** Etude des Effets Toxiques d'un Fongicide (Amistar Xtra) et d'un Herbicide (Glyphosate) sur la Biologie et le Comportement de Paramecium tetraurelia. Thèse de Doctorat en Biologie Animale, Spécialité : Toxicologie Cellulaire, Université Badji Mokhtar, Annaba, p. 14, 15.
- [06]. **Baculard A. ; Tournier G. (1995).** Aspergilloses broncho-pulmonaires et mucoviscidose, Rev. Pneumol. Clin. 51, 159-162.
- [07]. **Badillet G. ; de Briève C. ; Guého E. (1987).** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, dans : Atlas clinique et biologique, volume II. Paris : Edition VARIA.
- [08]. **Barriuso E. (2004).** Estimation des risques environnementaux des pesticides, Ed. INRA, Paris. 123 p.
- [09]. **Batch D. (2011).** L'impact des pesticides sur la santé humaine. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré-Nancy1, 165 p.
- [10]. **Batsch D. (2011).** L'impact des Pesticides sur la Santé Humaine, Thèse de Doctorat, Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté de Pharmacie, p. 14,15.
- [11]. **Bidelman T.F. (1988).** Atmospheric transport and air surface exchange of pesticides. Water, air and soil pollution .115: 115-166.
- [12]. **Botton B. ; Buton A. ; Fèvre M. et al. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Paris : Masson 2ème édition, 442p.
- [13]. **Bouchet P. ; Guignard J.L. ; Pouchus Y.V. (2005).** Les champignons, mycologie fondamentale et appliquée. Paris : Masson 2ème édition. pp. 109-111.
- [14]. **Boudra H. (2009).** Les mycotoxines dans les fourrages : un facteur limitant insidieusement la qualité des fourrages et les performances des ruminants. Fourrages, 199, 265-280.

- [15]. **Bourbia Ait-Hamlet S. (2013).** Evaluation de la toxicité de mixture de pesticides sur un bioindicateur de la pollution des sols *H. aspersa*. Thèse Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba, 110 p.
- [16]. **Boutibonnes P. ; Auffray Y. ; Malherbe C. ; Kogbo W. ; Marais C. (1984).** Propriétés antibactériennes et génotoxiques de 33 mycotoxines. *Mycopathologia* 87, 43-49 pp.
- [17]. **Brtles (1988).** Guide des plantes du bassin méditerranéen Ed française p : 252.
- [18]. **Cahagnier B. (1998).** Céréales et produits dérivés. In: Bourgeois C. M. Mescle J.-F. Zucca J. (coord.). *Microbiologie alimentaire : Aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Ed. Tec & Doc, Paris, pp. 392-414.
- [19]. **Calvet R. (2005).** Les pesticides dans le sol. Editions France Agricole 2005.
- [20]. **Calvet R. ; Barriuso E. ; Bedos C. ; Benoit P. ; Charnay M-P. et Coquet Y. (2005).** Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales. Ed.France Agricole, Paris. 637 p.
- [21]. **Calvet R.; Barriuso E.; Bedos C.; Benoit P.; Charnay M P.; Coquet Y. (2005).** Les Pesticides dans le Sol, Conséquences Agronomiques et Environnementales. Référence Scientifique. Editions France Agricole, 641 p.
- [22]. **Castegnaro M.; Pfohl-Leszkowicz A. (2002).** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*. Lavoisier, Tec & Doc.
- [23]. **Castro D. ; Torres M. ; Sampedro I. ; Martínez-Checa F. ; Torres B. ; Béjar V. (2020).** Biological Control of Verticillium Wilt on Olive Trees by the Salt-Tolerant Strain *Bacillus velezensis* XT1. *Microorganisms* : 8, 1080.
- [24]. **Chapeland-Leclerc F. ; Papon N. ; Noël T. ; Villard J. (2005).** Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires*, N°373 :61-66
- [25]. **Chermette R. ; Bussieras J. (1993).** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons – Alfort.
- [26]. **Chubilleau C. ; Pubert M. ; Comte J. et Giraud J. (2011).** Pesticides et santé : Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007, Observatoire Régional de la Santé Poitou-Charentes, 199 p.
- [27]. **Courtial J. ; Latifa Hamama ; Jean-Jacques Helesbeux ; Mickaël Lecomte ; Yann Renaux ; Esteban Guichard ; Linda Voisine. et al. (2018).** « Aldaulactone – An Original Phytotoxic Secondary Metabolite Involved in the Aggressiveness of *Alternaria Dauci* on Carrot ». *Frontiers in Plant Science* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00502>.
- [28]. **Curtis H.; Noll U.; Störmann J.; Slusarenko A.J. (2004).** Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004, 65, 79–89.
- [29]. **Dealarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec &Doc ; éditions médicales internationales, pp 776.
- [30]. **Diguta C. F (2010).** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisins. Thèse Doc. Univ. De Bourgogne, Institut universitaire de la vigne et du vin, 154p.

- [31]. **Dio I. M. (1978)**. Etude des problèmes posés par les aflatoxines dans les aliments du bétail et de l'homme. Thèse Vet. Dakar. N°12
- [32]. **Dugeny F. (2010)**. Produits Phytosanitaires, Risques pour l'Environnement et la Santé Connaissances des usages en Zone non Agricole, Livre, p. 9.
- [33]. **El-Azzouzi E. (2013)**. Processus Physico-chimiques d'Elimination des pesticides dans l'environnement : Cas de l'Imazéthapyr. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Agdal, Rabat, 108 p.
- [34]. **F.A.O. (1977)**. Food and nutrition paper 2 mycotoxines Nairobi Sept 1 9-27 Food Cosmet. Toxicologie. 1979 17 159-166.
- [35]. **Falcón-Piñeiro A. ; Remesal E. ; Noguera M. ; Ariza J.J. ; Guillamón E. ; Baños A. ; Navas-Cortes J.A. (2021)**. Antifungal Activity of Propyl-Propane- Thiosulfinate (PTS) and Propyl-Propane-Thiosulfonate (PTSO) from *Allium cepa* against *Verticillium dahliae*: In Vitro and in Planta Assays. *J. Fungi* 2021, 7, 736. <https://doi.org/10.3390/jof7090736>
- [36]. **FAO [(Accessed on 4 November 2018)]** : Available online : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- [37]. **Farooq M.; Siddique M.; Ateeq-Ur-Rehman. Golly M. K.; Zib B.; Khan I.; Khan S.; Khan I.; Bakhtiar M. et Ilyas N. (2018)**. Effectiveness of systemic and contact fungicides against *Alternaria citri* the causal organism of citrus brown spot disease in citrus mangroves of Pakistan. *Journal of Agri-cultural Science and Practice*, 3: 38 45.
- [38]. **Filténborg O.; Frisvad J.C. et Thrane, U (1996)**. Moulds in food spoilage. *International Journal Of Food Microbiology* 33; 85-102.
- [39]. **Gams W. ; Christensen M. ; Onions A.H.S. et al. (1986)**. Infrageneric taxo of *Aspergillus*, in: Samson R.A. Pitt J.I. *Advances of Penicillium and Aspergillus systematics*. London&New-York, Plenum Publi.
- [40]. **Guillamón E. (2018)**. Effect of phytochemical compounds of the genus *Allium* on the immune system and the inflammatory response. *Ars Pharm.* 59, 185–196.
- [41]. **Guiraud J. P. (1998)**. Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. P. 7-330.
- [42]. **Guiraud J.P.; Rosec J.P. (2004)**. Pratique des normes en microbiologie alimentaire, Ed. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine, France, 300pp.
- [43]. **Hayne D. ; Müller J. ; Carter S. (2000)**. Pesticide and herbicide residues in sediments and seagrasses from the Great barrier Reef world heritage area and Queensland coast. *Marine Poll. Bull.*, 41 (7-12),. p : 279-287.
- [44]. **INRA (2019)**. Sciences & Impact, R4P (Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides), ANSES (Agence National de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail), Fongicides Agricoles : Modes d'Action, Mécanismes de Résistance et Exemples par Filière, Colloque Résistance aux Pesticides à Montréal, Site web : <https://irda.blob.core.windows.net>.
- [45]. **Kane A. (1997)**. Effets des fongicides (Basamid, Cryptonol/ Enzone) et des endomycorhizes sur la croissance-et le développement de deux variétés d'oignon (red créole et early yellow texas"grano 502 prr) cultivées, sur un "sol infesté par pyrenochaeta

terrestris au nord-ouest du Sénégal. Thèse de Doctorat, Université Cheikh Anta Diop, Sénégal, 107 p.

- [46]. **Keusgen M.; Schulz H.; Glodek J.; Krest I.; Krüger H.; Herchert N.; Keller J. (2002).** Characterization of Some Allium Hybrids by Aroma Precursors, Aroma Profiles, and Alliinase Activity. *J. Agric. Food Chem*, 50, 2884–2890.
- [47]. **Khanchouch K.; Pane A.; Chriki A.; Cacciola S. O. (2017).** Major and Emerging Fungal Diseases of Citrus in the Mediterranean Region. In H. Gill & H. Garg (Éds.), *Citrus Pathology*. InTech.
- [48]. **Kubra I.R.; Murthy P.S.; Rao L.J. (2012).** In vitro antifungal activity of dehydrozingerone and its fungitoxic properties. *Journal of Food Science*, 78 (1)
- [49]. **Kutawa M.D.D.A.B. (2018).** Antifungal Activity of Garlic (*Allium sativum*) Extract on Some Selected Fungi. *J. Med. Herbs Ethnomed*, 12–14.
- [50]. **Landa B.B. ; Pérez A.G. ; Luaces P. ; Montes-Borrego M. ; Navas-Cortés J.A. ; Sanz C. (2019).** Insights Into the Effect of *Verticillium dahliae* Defoliating-Pathotype Infection on the Content of Phenolic and Volatile Compounds Related to the Sensory Properties of Virgin Olive Oil. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 232.
- [51]. **Larone D.H. (1987).** Medically important fungi. A guide to identification, 2-nd edition. New York, London, Amsterdam: Elsevier Science Publishing, 1987. 230p.
- [52]. **Lavaud F. ; Leynadier F. ; Marmouz F. ; Vervloet D. (2008).** Les moisissures sont-elles dangereuses pour la santé. *Le journal faxé d'allergologie*.
- [53]. **Le Clech (1998).** Environnement et agriculture, Ed. Synthèse Agricole, France, 2<sup>ème</sup> édition, 334p.
- [54]. **Lecerf J.-M. (2016).** Ail et santé. *Phytothérapie* 14, 139-139.
- [55]. **Leclerc F. C. ; Papon N. ; Noel T. ; Villard J. (2005).** Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoles). *Revue Francophone des Laboratoires*. 373 : 61-66.
- [56]. **Liliana J. (2007).** Etude des risques liés à l'utilisation des pesticides organochlorés et impact sur l'environnement et la santé humaine. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard- Lyon1, 184 p.
- [57]. **López B.C. ; Gómez Á. S. ; Rey G. M. ; Cancho G.B. ; Simal G. J. (2005).** Determination of carbamates and organophosphorus pesticides by SDME–GC in natural water, *Analytical and bioanalytical chemistry*. Vol 383 (4), p : 557-561.
- [58]. **Marliere F. (2000).** Mesure des pesticides dans l'atmosphère, Institut National de L'Environnement Industriel et des Risques INERIS, 55 p.
- [59]. **Marrelli Mariangela ; Valentina Amodeo ; Giancarlo Statti et Filomena Conforti. (2019).** Biological Properties and Bioactive Components of *Allium cepa* L.: Focus on Potential Benefits in the Treatment of Obesity and Related Comorbidities, *Journal of molecules*, 24 (1): 119
- [60]. **Masunaka A.; Tanaka A.; Tsuge T.; Peever T.L.; Timmer L.W.; Yamamoto M.; Yamamoto H.; Akimitsu K. (2000).** Distribution and characterization of AKT homologs in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 90, 762-768.

- [61]. **Meletiadis J.; Meis J.; Mouton J.W.; Verweu P. E. (2001).** Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. *Journal of Clinical Microbiology* (2001) 39, 478-484.
- [62]. **Merhi M. (2008).** Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, 140 p.
- [63]. **Moreau C. (1974).** Moisissures toxiques dans l'alimentation Paris –Vie Masson et Cie 1974 471p.
- [64]. **Morejohn S. (1987).** Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta*, 172: 252-264.
- [65]. **Morin O. (1994).** *Aspergillus* et aspergilloses : biologie, Ed. Techniques, Encycl. Mèd. Chir. Paris : Elsevier. Maladies infectieuses 8-600-A-10.
- [66]. **Mubeen M.; Arshad H.M.; Iftikhar Y.; Irfan Ullah M. et Bilqees I. (2015).** Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: a gram negative bacterium causing citrus canker. . *International Journal of Science and Nature* 6, 151, 154.
- [67]. **Muhammad Umer ; Mustansar Mubeen ; Muhammad Ateeq ; Munsif Ali Shad; Muhammad Nauman Atiq ; Muhammad Mohsin Kaleem; Shehzad Iqbal ; Aamir Ali Shaikh ; Ikram Ullah ; Moman Khan ; Akhtiar Ahmed Kalhor ; Aqlem Abbas. (2021).** Etiology, epidemiology and management of citrus black rot caused by *alternaria citri*- an outlook. *Plant Protection*, 05 (02) 2021. 105-115.
- [68]. **Nguyen Minh Tri M. (2007).** Identification Des Espèces De Moisissures, Potentiellement Productrices De Mycotoxines Dans Le Riz Commercialisé Dans Cinq Provinces De La Région Centrale Du Vietnam - Etude Des Conditions Pouvant Réduire La Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Génie Des Procédés Et De L'environnement. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 2007. 147p.
- [69]. **OMS. (1991).** L'utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique. Genève, 145 p.
- [70]. **Oswald I.P. (2000).** Mycotoxines et immunotoxicité. Association pour la Recherche en Toxicologie, *Actualités* 2000, numéro de décembre ; 32-34.
- [71]. **Pfohl-Leskowicz A. (1999).** Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Paris : Tec&Doc, 1999. 478p
- [72]. **Piche M. (2008).** La dérive des pesticides : Prudence et solutions, Centre de référence en agriculture et agroalimentaire au Québec. *Agriculture, Pêcherie et Alimentation* n°08-0075,15p.
- [73]. **Pitt J.I.; Hocking A.D (1987).** *Fungi and Food spoilage*, 2-nd edition. London: Blackie Academic and Professional, 1987.
- [74]. **Raper K.B.; Fennel D.I. (1965)** *The genus Aspergillus.* New York, USA, William&Wilkinson.
- [75]. **Reboux G. ; Bellanger A. ; Roussel S. ; Grenouillet F. ; et Million L. (2010).** Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées, *revue française d'allergologie* 50 : 611–620.

- [76]. **Reboux G. ; Roussel S. et Grenouillet F. (2006).** Moisissures de l'environnement agricole Fungi in agricultural environment, *Journal de Mycologie Médicale* 16: 248– 262.
- [77]. **Regnault-Roger C. ; Fabres G. et Bernard J.R. (2005).** Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. France. ISBN, pp255.
- [78]. **Rehacek Z.; Sajdl P. (1990).** Ergot Alkaloids. Amsterdam: Elsevier, 1990. 383p.
- [79]. **Riaz T.; Abbasi A.M.; Shahzadi T.; Ajaib M.; Khan M.K. (2012).** Phytochemical screening, free radical scavenging, antioxidant activity and phenolic content of *Dodonaea viscosa*. *Journal of the Serbian Chemical Society* 77, 423-435.
- [80]. **Roquebert M.F. (1998).** Taxonomie des moisissures : Méthodes de culture et techniques d'observation, in : Moisissures des aliments peu hydratés, Paris : Tec&Doc, pp. 39-95.
- [81]. **Rotem J. (1994).**The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. American Phytopathological Society.
- [82]. **Saibi A. (2008).**mémoire de magister Ecole Nationale Polytechnique Alger 2008.
- [83]. **Samson R.A. ; Hoekstra E.S. ; Oorschot C.A.N. (1980) .** Compendium of spoil fungi. Volume 1. London : Academic Press, 1980.
- [84]. **Samuel O. et Saint-laurent L. (2001).** Guide de prévention pour les utilisateurs de pesticides en agriculture maraîchère, l'Institut de Recherche en Santé et en Sécurité du Travail du Québec IRSST, 89 p.
- [85]. **Schuster E. ; Dunn-Coleman N. ; Frisvad J.C. et al. (2002).** On the safety of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59. pp. 426-435.
- [86]. **Seye F.; Bawine T.; Boukraa S.; Zimmer J.Y. ; Ndiaye M. ; Delvigne F. ; Francis F. (2014).** Effect of entomopathogenic *Aspergillus* strains against the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae).
- [87]. **Smith I.M.; McNamara D.G.; Scott P.R.; Holderness M. (1997).** Quarantine Pests of Europe CAB International, University Press, Cambridge, Cambridge.
- [88]. **Snégarof F.J. (1997).** Les résidus d'insecticides or ganochlorés dans les sols et les rivières de la région bananière de la Guadeloupe. Rapport INRA.
- [89]. **Sorlozano-Puerto ; Maria Albertuz-Crespo ; Isaac Lopez-Machado ; Juan Jose ArizaRomero ; Alberto Baños-Arjona ; Manuela Exposito-Ruiz et Jose GutierrezFernandez. (2018).** Invitro Antibacterial Activity of Propyl-Propane-Thiosulfinate and Propyl-PropaneThiosulfonate Derived from *Allium* spp. against GramNegative and Gram-Positive MultidrugResistant Bacteria Isolated from Human Samples , *journal of Biomed Research International* , (12) :1-11.
- [90]. **Storey E.; Dangman K.H.; Schenck P. et al. (2004).** Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. Farmington, University of Connecticut Health Center, 2004.
- [91]. **Tansey M.R. et Appleton J.A. (1975).** Inhibition of fungal growth by garlic extract. *Mycologia* 67, 409-413.
- [92]. **Testut F. ; Grillet J .P. (2007).**Insecticides Organophosphorés, Carbamates, Pyréthrinoides de Synthèse et Divers.

- [93]. **Université de Bretagne Occidentale, Les Penicillium [en ligne], disponible sur [http://www.univbrest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Principaux\\_groupes/Les+Penicillium](http://www.univbrest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Principaux_groupes/Les+Penicillium).**
- [94]. **Vitale A.; Aiello D. ; Azzaro A. ; Guarnaccia V.; Polizzi G. (2021).** An Eleven-Year Survey on Field Disease Susceptibility of Citrus Accessions to Colletotrichum and Alternaria Species. Agriculture 11, 536.