

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES

DEPARTMENT OF PLANT BIOLOGY

**IDENTIFICATION ET PRÉVENTION DES MOISSURES SUR MILIEU DE
CULTURE MALT EXTRACT AGAR (MEA) ET QUELQUES ALIMENTS
COURAMMENT CONSOMMÉS DANS LA REGION DU CENTRE**

Mémoire présenté et soutenu en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie des
Organismes Végétaux

Option : Botanique-Écologie

Présenté par :

ZANG Paul Castro Mathys

Licencié ès sciences

Matricule: 08S0345



Sous la Direction de:

MOSSEBO Dominique Claude

Professeur

Année académique 2018-2019

DÉDICACE

À ma maman de regretté mémoire

MEKOUI OBADA Jeanne Henriette

REMERCIEMENTS

Mes remerciements sont d'abord adressés à l'Université de Yaoundé1 pour avoir admis comme étudiant.

Ce travail ne saurait être l'œuvre d'une seule personne. Qu'il me soit permis de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation. Je pense notamment à :

- Pr YOUMBI Emmanuel, Chef de Département de Biologie et Physiologie Végétales, qui ne ménage aucun effort pour le rayonnement dudit Département par la qualité des enseignements dispensés ;
- Pr MOSSEBO Dominique Claude, Directeur de ce mémoire qui a proposé le sujet et a suivi les travaux avec beaucoup de disponibilité, de rigueur et d'intérêt. Je lui serai à jamais reconnaissant pour l'ensemble de la formation que j'ai reçue, son soutien moral et financier, son investissement indispensable, sa délicatesse et sa patience;
- Tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Végétales pour la qualité de la formation reçue ;
- Tous les membres du jury ;
- Dr KENGNI MOUAFFO AYISSI Beaudelaire et Dr ESSOUMAN EBOUEL Pyrus F., pour leurs encouragements, leurs critiques et suggestions ;
- Mon oncle Jean Luc EBELA et à sa femme Bernadette EBELA pour leurs encouragements et leur soutien ;
- Toute la grande famille OBADA, en particulier, Sylvie MELOUNOU, Théophile MBARGA, Roger ZE, Blanche NGA-ABE NA, Serge OBADA, Paul BIYA, Stève OBADA, Raïssa OSSELE, pour leur soutien permanent et leurs encouragements ;
- Tous mes camarades de laboratoire, OBA'A, Fabrice TSIGAIN, Blondo METSEBING, pour leur support ;
- Tous mes camarades de promotion et amis, pour leurs encouragements et disponibilité ;
- Mon ami, père Cyrille EDOA TSOUNGUI, pour son soutien.

SOMMAIRE

DÉDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
SOMMAIRE	ii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ANNEXES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ.....	x
ABSTRACT	x
CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉS	1
I.1. Introduction	1
I.2.Revue de la littérature	2
I.2.1. Caractères généraux.....	2
I.2.2. Identification des moisissures.....	3
I.2.3. Mycotoxines et mycotoxigenèse.....	6
I.2.4. Classification des moisissures.....	7
I.2.5. Intérêt des moisissures.....	10
I.2.6. Dissémination	11
I.2.7. Cycle de vie des moisissures	11
I.2.8. Conditions physico-chimiques nécessaires au développement des moisissures	12
I.2.9. Conditions de croissance des moisissures	13
I.2.10. Les aliments	14
I.2.11. Le milieu de culture MEA	15
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	16
II.1. Matériel	16
II.1.1. Types d'aliments utilisés	16
II.1.2. Matériel de laboratoire	16
II.1.3. Matériel de préparation du milieu de culture (MEA : Malt Extract Agar) utilisé..	17
II.2. Méthodes.....	17
II.2.1. Origine et conservation des aliments mis en observation	17
II.2.2. Conservation du milieu de culture MEA.....	18
II.2.3. Description de la flore fongique	18
II.2.4. Identification des contaminants fongiques	19

II.2.5. Conditions de travail.....	19
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	20
III.1. Résultats.....	20
III.1.1. Identification des moisissures	20
III.1.2. Influence de la température sur le développement des moisissures.....	33
III.2. Discussion.....	42
CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....	44
IV.1. Conclusion.....	44
IV.2. Perspectives	44
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	46
ANNEXES.....	49

LISTE DES FIGURES

Fig.1. Quelques champignons filamenteux (Fraizier, 1967) X 400	8
Fig.2. Classification des moisissures (Fraizier, 1967)	9
Fig.3. Cycles de vie des champignons (Roquebert, 2002).	12
Fig.4: Dispositif de conservation des aliments.....	18
Fig. Fig.5. Pain présentant des taches de moisissures causées par <i>Aspergillus</i> sp.....	20
Fig.6. Gâteau présentant des taches de moisissures causées par <i>Aspergillus</i> sp.	21
Fig.7. <i>Aspergillus</i> sp. poussant spontanément comme contaminant fongique sur milieu de culture MEA à température ambiante au laboratoire.....	21
Fig.8. : Structure morphologique de <i>Aspergillus</i> sp. poussant comme moisissure spontanée sur milieu de culture (MEA) et sur produits alimentaires de boulangerie (pain, gâteau).....	22
Fig.9. Développement des conidies sur phialides (cellules conidiogènes) et conidiophores chez <i>Aspergillus</i> sp. poussant comme moisissure spontanée sur milieu de culture (MEA) et sur produits alimentaires de boulangerie (pain, gâteau,).	24
Fig.10. Bâton de manioc présentant des taches (flèches) de moisissures causées par <i>Rhizopus</i> sp.....	24
Fig.11. Gâteau présentant des taches de moisissures causées par <i>Rhizopus</i> sp.	25
Fig.12. Culture pure puis zoom sur loupe binoculaire de <i>Rhizopus stolonifer</i>	25
Fig.13. : Structures morphologiques de <i>Rhizopus stolonifer</i> prélevé sur pain et gâteau moisiss et ensuite cultivé sur milieu artificiel (MEA).....	26
Fig.14. Structure morphologique des stolons de <i>Rhizopus stolonifer</i> prélevé sur pain et gâteau moisiss et ensuite cultivé sur milieu artificiel (MEA).....	27
Fig.15. Structure morphologique et conidies de <i>Rhizopus</i> aff. <i>acidus</i> prélevé sur pain et gâteau moisiss et ensuite cultivé sur milieu artificiel (MEA)	28
Fig.16. <i>Trichoderma</i> sp. poussant sur gâteau conditionné et mis en observation à température ambiante du laboratoire.....	28
Fig.17. culture pure de <i>Trichoderma</i> sp. prélevé du gâteau.....	29

Fig.18. Structures morphologiques de <i>Trichoderma</i> sp.....	29
Fig.19. <i>Ulocladium</i> sp ou espèce affine poussant spontanément comme contaminant fongique sur milieu de culture (MEA) à température ambiante du laboratoire.....	30
Fig.20. Temps moyen de colonisation du pain par la flore fongique à température ambiante et de réfrigérateur.....	33
Fig.21. Temps moyen de colonisation du gâteau par la flore fongique à température ambiante et de réfrigérateur.....	34
Fig.22. Temps moyen de colonisation du bâton de manioc par la flore fongique à température ambiante et de réfrigérateur.....	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Aliments	16
Tableau II : principaux facteurs de croissance et de développement des moisissures	19
Tableau III: Tableau récapitulatif des espèces observées sur les aliments et le milieu de culture (MEA).....	32
Tableau IV: Évaluation de la durée de colonisation du pain par la mycoflore en fonction de la température de conservation.....	33
Tableau V : Évaluation de la durée de colonisation du gâteau par la mycoflore en fonction de la température de conservation.....	34
Tableau VI: Évaluation de la durée de colonisation du bâton de manioc par la mycoflore en fonction de la température de conservation.....	35
Tableau VII: Evaluation du temps (en jours) de colonisation du milieu de cultures MEA par les contaminants fongiques en fonction de la température (i et ii) de conservation	37

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Fiche d'observation des symptômes de contaminations sur les aliments.....45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A D N : Acide Désoxyribonucléique ;

A R N : Acide Ribonucléique ;

A W : Activity Water;

M E A: Malt Extract Agar;

P C R : Polymerase Chain Reaction.

RÉSUMÉ

L'étude sur la prévention des moisissures sur les aliments et le milieu de culture MEA visait trois objectifs incluant une contribution à l'identification des moisissures sur les aliments couramment consommés dans le grand sud Cameroun avec une attention particulière à certains produits de boulangerie tels que le pain et les gâteaux d'une part et le bâton de manioc d'autre part. L'influence de la température sur le temps de conservation de ces aliments aussi bien que le temps d'incubation avant apparition des moisissures spontanées sur le milieu de culture MEA fraîchement préparé ont été également évalués. Les températures de conservation testées étaient la température ambiante du laboratoire (23°C à 25°C) et celle du réfrigérateur (4°C à 8°C). Après isolement des moisissures sur ces aliments et leur culture sur le milieu MEA et ensuite sur lames porte-objet, des descriptions macroscopiques et microscopiques ont été faites sur les structures observées afin d'identifier la mycoflore qui y pousse suivant les 2 types de conservation ainsi que celle qui pousse spontanément sur le milieu MEA. L'expérimentation à température ambiante a conduit à l'identification sur les aliments échantillonnés des moisissures appartenant à 3 genres incluant *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. Et *Trichoderma* sp. et seulement *Aspergillus* a été isolé sur certains de ces aliments conservés au réfrigérateur. *Aspergillus* sp. et *Ulocladium* sp. ont été identifiés comme moisissures poussant spontanément sur le milieu de culture MEA avec des différences sur le temps d'apparition suivant que les aliments sont conservés à température ambiante ou au réfrigérateur. Tous les aliments incluant le pain, les gâteaux et le bâton de manioc ont montré des moisissures sus-évoquées à température ambiante. Au réfrigérateur, seul le bâton de manioc n'a pas montré de signes de moisissures. Le temps d'incubation à température ambiante pour l'apparition des premiers signes de moisissures était de 3 à 4 jours pour le pain et le gâteau et de 6 à 8 jours pour le bâton de manioc. Au réfrigérateur, ce temps était étendu à 26-30 jours pour les produits de boulangerie et au-delà de 30 jours pour le bâton de manioc.

En définitive, les basses températures du réfrigérateur (4°C à 8°C) permettent de réduire la diversité de ces contaminants fongiques sur ces aliments. Aussi ces températures du réfrigérateur permettent de prolonger de plus de 3 semaines le temps de conservation des produits de boulangerie (pain, gâteau) comparé à la conservation à température ambiante et de plus de 30 jours la conservation du bâton manioc. Aussi, le temps d'incubation avant l'apparition des moisissures spontanées sur le milieu MEA est également prolongé de plus de 3 semaines quand ce milieu est conservé au réfrigérateur comparé à la conservation à température ambiante.

Mots clés : moisissures, produits de boulangerie, bâton de manioc, milieu de culture MEA, température de conservation, temps de conservation

ABSTRACT

This study aimed at three different objectives including a contribution to the identification of food fungi on some currently consumed foodstuff in the center region with particular attention to some bakery product such as bread and cakes on the hand, and cassava “bâton” (popularly known as “bobolo”) on the other hand. The influence of temperature on the time of conservation of these food items as well as the time of incubation before occurrence of spontaneous molds on freshly prepared MEA culture medium were also assessed. Temperature of conservation included room temperature (averagely 25°C) and conservation in the refrigerator (4°C to 8°C). After isolation of molds on these food items and their cultivation on MEA and thereafter as slide cultures; microscopic and macroscopic descriptions were done on structures observed in order to identify the fungal flora that grows in both types of conservation as well as for spontaneous molds growth on MEA. The experiment conducted at room temperature led to the identification on the above mentioned food items of molds belonging to three genera including *Aspergillus*, *Rhizopus* and *Tricoderma* and only *Aspergillus* was isolated from some of these items conserved in the refrigerator. *Aspergillus* sp and *Ulocladium* sp were recorded as spontaneous molds growing on MEA culture medium with major differences in the time of occurrence at room temperature and in the refrigerator. All the food items including bread, cakes, and cassava “bâton” never showed mouldy contaminations. The time of incubation at room temperature for appearance of the first signs of molds was 3 to 4 days on bakery products including bread and cakes and 6 to 8 days for cassava “bâton”. In the refrigerator this time was extended to 26 to 30 days for bakery products and far over 30 days for cassava “bâton”. All in all, this work led to several key remarks, the first being that without fully preventing the growth of molds on the food items tested, low temperature (4°C to 8°C) of refrigeration enables to reduce the diversity of the contaminating microfungi on these food items. Also this range of refrigeration (4°C to 8°C) temperature enables to extend by more than 3 weeks the time of conservation of bakery products (bread and cake) compared to room temperature and by more than 30 days the conservation of cassava “bâton”. Also the incubation period before appearance of spontaneous molds on MEA culture medium is also extended by more than 3 weeks in refrigerator compared to conservation at room temperature.

Key words: mold, bakery food items, cassava “bâton” MEA culture medium, temperature of conservation, time of conservation

CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉS

I.1. Introduction générale

La contamination des produits alimentaires par les microorganismes est un problème auquel s'attaquent les gouvernements de tous les pays dans le monde. Ces microorganismes qui peuvent être de plusieurs types causent des maladies qui peuvent s'avérer très graves chez l'Homme. Leurs répercussions sur la santé et sur l'économie mondiale sont de plus en plus reconnues. Certaines de ces maladies sont causées par les champignons microscopiques et en particulier les moisissures.

Les champignons (ou Fungi) sont des organismes Eucaryotes dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes. Une source de carbone organique est donc nécessaire à leur développement. Dans l'arbre du vivant, ils constituent un groupe à part au sein des eucaryotes. Classiquement, les champignons étaient regroupés dans un règne distinct, celui des Eumycètes ou cinquième règne (Kendrick, 2000). Les classifications les plus récentes les font apparaître dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des Opisthokonta (Simpson et Roger, 2004 ; Adl et *al.* 2005 ;). A l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en Classes, en Ordres, en Familles, en Genres et Espèces. Ces derniers étant utilisés pour les regrouper. Parmi les champignons se démarque un groupe assez remarquable par ses effets néfastes sur bon nombre de substrats incluant plusieurs types d'aliments. Il s'agit des moisissures.

Les moisissures sont des champignons filamenteux microscopiques, susceptibles de coloniser des substrats très variés tels que les textiles, le papier, le bois et même les produits alimentaires. Elles sont partout présentes dans l'environnement, tant interne qu'externe et ont la capacité de se développer sur et/ou à l'intérieur des supports organiques inertes qu'elles vont utiliser comme sources nutritives. Elles sont essentiellement saprophytes. Les aliments tels que le pain, le bâton de manioc de par leur richesse en sucres et en amidon constituent des substrats idéals pour leur développement et leur prolifération. La capacité des moisissures à coloniser presque tous les types de substrats est à l'origine des problèmes de conservation des denrées alimentaires. Plusieurs travaux ont porté sur l'identification des moisissures et la toxicité de leurs mycotoxines dans le domaine alimentaire (Bennett et Klich 2003; Bouhet et Oswald, 2005). Des travaux similaires n'ont pas encore été faits dans le contexte camerounais principalement. C'est vraisemblablement aussi le cas en ce qui concerne certains produits de pâtisserie tels que le pain et les différents types de gâteaux en ce qui concerne le bâton de manioc.

Ce sont en effet des aliments très consommés dans le grand Sud Cameroun, voir sur tout le territoire national. Les moyens de leur conservation variant en fonction du niveau de vie des consommateurs qui pour la plupart ne dispose pas toujours d'un réfrigérateur. En effet, contrairement aux températures ambiantes, les basses températures de par leurs effets ralentissant sur les métabolismes biologiques et donc la germination des spores et le développement du mycélium des champignons, pourraient-elles constituer une meilleure méthode de conservation des aliments ? Quel serait par exemple le temps moyen de conservation de ces aliments tant en milieu ambiant qu'à température de réfrigérateur pour une consommation sans risque ? Vu les effets néfastes sur la santé après consommation des aliments contaminés, quels seraient les types de moisissures impliqués ?

Cette étude a comme pour objectif général d'identifier les moisissures qui se développent sur le pain, le gâteau et les bâtons de manioc lors de leur conservation et déterminer le temps maximal de cette conservation avant apparition des premiers signes de contamination sur ces aliments d'une part et d'autre part du milieu de culture MEA tant à température ambiante qu'à celle du réfrigérateur.

Plus spécifiquement, il sera question de :

- caractériser les espèces fongiques observées sur les aliments suscités tant sur le plan macroscopique que microscopique en vue de leur identification ;
- déterminer le temps d'incubation avant apparition des contaminants fongiques sur ces aliments et ceux qui apparaissent spontanément sur le milieu de culture MEA ce qui permettra de :
 - déterminer la durée maximale (approximative) de leur conservation dans ces différents types de milieux.

I.2.Revue de la littérature

I.2.1. Caractères généraux

Les moisissures sont des champignons filamenteux, hétérotrophes et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin et *al.*, 2000). Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou d'animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant au dépens des substrats internes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1989 ; Bouix et Leveau, 1993). Les moisissures possèdent un appareil végétatif représenté par un thalle filamenteux, le mycélium dont les filaments

s'appellent les hyphes. Le mycélium peut se différencier en des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989). Les moisissures peuvent avoir des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme. Elles sont aussi ubiquitaires. Les aliments sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques (Cahagnier et al., 1998 ; Doyle et al., 1998 ; Meyer et al., 2004)

I.2.1.1. Appareil végétatif

L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments ou d'hyphes, de cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10 µm de diamètre. Ces hyphes comprennent des organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme, vésicules. Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium.

I.2.1.2. Modes de reproduction

Les moisissures se reproduisent grâce à des spores. Celles-ci sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon télémorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Les champignons, chez qui les deux formes coexistent sont appelés holomorphes. Différents groupes de moisissures ont été définis suivant leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques de leurs spores. Les Zygomycètes possèdent des spores contenues à l'extérieur d'une cellule renflée, les Ascomycètes ont des spores regroupées dans de sortes de sacs appelés asques, les Basidiomycètes qui ont des spores portées par des basides, et les Hyphomycètes. Ces derniers forment un groupe hétérogène dont on ne connaît pas actuellement, pour la plupart, la forme de reproduction sexuée (Kiffer et Morelet, 1997 ; Cahagnier et al., 1998). Les moisissures se rencontrent dans tous les groupes en particulier dans les Hyphomycètes mais sont assez peu nombreuses chez les Basidiomycètes. Dans le cas d'une reproduction asexuée, il y a formation à partir d'une structure spécialisée de l'hyphe nommée conidiophore, de spores mitotiques qui sont des excroissances appelées conidies.

I.2.2. Identification des moisissures

L'identification de très nombreuses espèces de moisissures fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer leur qualité, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable pour la détermination taxonomique et l'évaluation du risque mycotoxique. Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie

moléculaire ont permis de proposer les outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait qu'actuellement ces outils ne peuvent encore pas remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

I.2.2.1 Identification morphologique

L'identification d'une espèce de moisissure repose sur l'analyse des caractères cultureux (température et vitesse de croissance, milieu favorable) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) d'une part et d'autre les critères microscopiques (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

I.2.2.1.1. Critères d'identification macroscopique

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, lianeuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien). Ces critères sont :

- le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être molle, friable, élastique ou dure) ;
- la taille des colonies : elle peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire colonies étendues, envahissantes (*Mucor* ; *Rhizopus*). La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleu, vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*) ;
- les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèce) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (Botton et *al.*, 1990).

I.2.2.1.2. Critères d'identification microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration à la solution coton bleu. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart d'éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

I.2.2.1.2.1. Le thalle

Tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé :

- le thalle siphonné, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifiés, de diamètre large et irrégulier (5-6 μm), non cloisonné est caractéristique des zygomycètes ;
- le thalle septé ou cloisonné, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 μm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des Ascomycètes, Basidiomycètes et Deutéromycètes (Badillet et *al.*, 1987).

I.2.2.1.2.2. Les spores

Les spores qui sont des produits de la reproduction sexuée ou asexuée peuvent être endogènes ou exogènes :

- Les spores endogènes (endospores) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez mes mucorales, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité ;
- Les spores exogènes (conidies), retrouvées chez les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Campbell et *al.*, 1996).

I.2.2.1.2.3. Aspect des spores

D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores :

- les amérospores : spores unicellulaires et de petite taille (*Penicillium*, *Aspergillus*) ;
- les didymospores: spores bicellulaires (*Trichothecium*) ;
- les phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*) ;

- les dictyosporos : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*) ;
- les scolécospores : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*).

I.2.3. Mycotoxines et mycotoxigénèse

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin toxicum signifiant « poison ». Les mycotoxines sont des molécules capables, à de faibles concentrations, d'induire un effet toxique (Reboux, 2006). Elles sont, chez l'animal et l'humain qui en consomment, à l'origine d'effets biologiques nocifs regroupés sous le terme de mycotoxicoses. Ce sont des métabolites secondaires produits après la phase de croissance du champignon. Ils se distinguent des métabolites primaires comme par exemple les produits de la glycolyse, qui sont primordiaux pour tout être vivant. Le métabolisme secondaire est très diversifié, d'où la multitude de métabolites secondaires. Tous les métabolites secondaires ne sont pas néfastes pour l'homme. Il en est ainsi pour les antibiotiques (Sidhu, 2002). Il existe donc une grande diversité de mycotoxines. Sur plus de 400 mycotoxines recensées, seule une trentaine de molécules possède des propriétés toxiques inquiétantes (Mannon et *al.*, 1985). Certaines de ces toxines sont supposées cancérogènes ou mutagènes, tandis que d'autres sont toxiques pour les reins, le système nerveux ou encore le foie. Par ailleurs, il convient de noter que la toxicité ne provient pas forcément de la mycotoxine elle-même, mais peut être due à l'un de ses métabolites issus de sa dégradation.

La mycotoxinogénèse correspond à l'ensemble des conditions nécessaires au processus de synthèse et de sécrétion des toxines fongiques dans l'environnement. La production de toxines et le développement fongique sont intimement liés. Dès lors, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique joueront aussi un rôle sur la toxinogénèse. En revanche, les conditions idéales de toxinogénèse sont plus étroites que celles favorisant le développement fongique (Moreau, 1994). L'apparition de toxines fongiques dans un milieu est d'autant plus complexe qu'une même espèce de moisissure a la faculté de synthétiser plusieurs substances différentes selon les conditions environnementales. La synthèse des mycotoxines n'est pas seulement influencée par des paramètres environnementaux mais aussi par la croissance d'une moisissure spécifique. Par conséquent, l'identification d'une espèce de moisissure sur un substrat ne permet pas de prédire avec certitude la présence d'une mycotoxine dans ce substrat. D'autre part, la résistance des toxines aux facteurs physiques est telle que l'absence de moisissures sur

une denrée ne signifie pas obligatoirement que celle-ci est dépourvue de mycotoxines. La toxinogénèse est un processus complexe qui n'est pas intégralement connu. La synthèse des toxines fongiques et la croissance fongique sont donc conditionnées par divers facteurs d'ordre physiques, chimiques et biologiques (D' Mello et *al.*, 1997) tels que développés dans la partie intitulée : Conditions physico-chimiques et biologiques nécessaires au développement des moisissures.

I.2.4. Classification des moisissures

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent dans diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur les caractères microscopiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois, 1980), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes.

I.2.4.1. Les Zygomycètes

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998). Les familles appartenant à l'ordre des mucorales sont les plus importantes dans cette classe et comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (mucormycoses) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996).

I.2.4.2. Les Ascomycètes

Les ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (Guiraud, 1998). Ces moisissures sont plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microsciales et des Sphaeriales. Dans cette classe, les genres les plus connus sont *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1998).

I.2.4.3. Les Basidiomycètes

Ils regorgent seulement quelques moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation des spores exogènes (basidiospores), c'est le cas des *Agaricus* et *Coprinus* (Botton et *al.*, 1999).

I.2.4.4. Les Deutéromycètes

Encore appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et des produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum* ; cette classe regroupe aussi les genres *Penicillium* et les *Aspergillus* (Frazier, 1967 ; Punt et al., 2002).

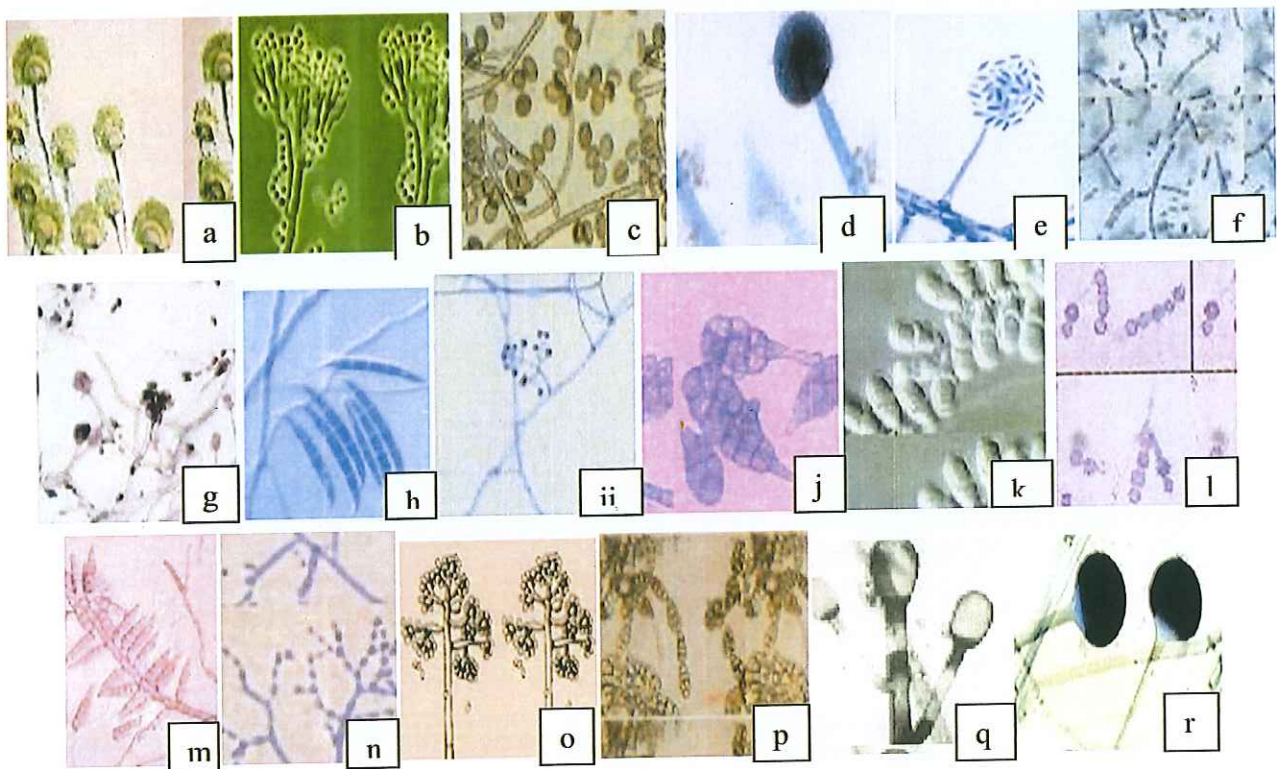


Fig.1. Quelques champignons filamenteux (Fraizier, 1967) x 400

a) *Aspergillus*; b) *Penicillium*; c) *Cladosporium*; d) *Mucor*; e) *Acremonium*; f) *Trichoderma*
g) *Stachybotrys*; h) *Fusarium*; i) *Geotrichum*; j) *Alternaria*; k) *trichothecium*;
l) *Scopulariopsis*
m) *Helminthosporium*; n) *Neurospora*; o) *Botrytis*; p) *Cephalosporium*; q) *Rhizomucor*; r)
Rhizopus.

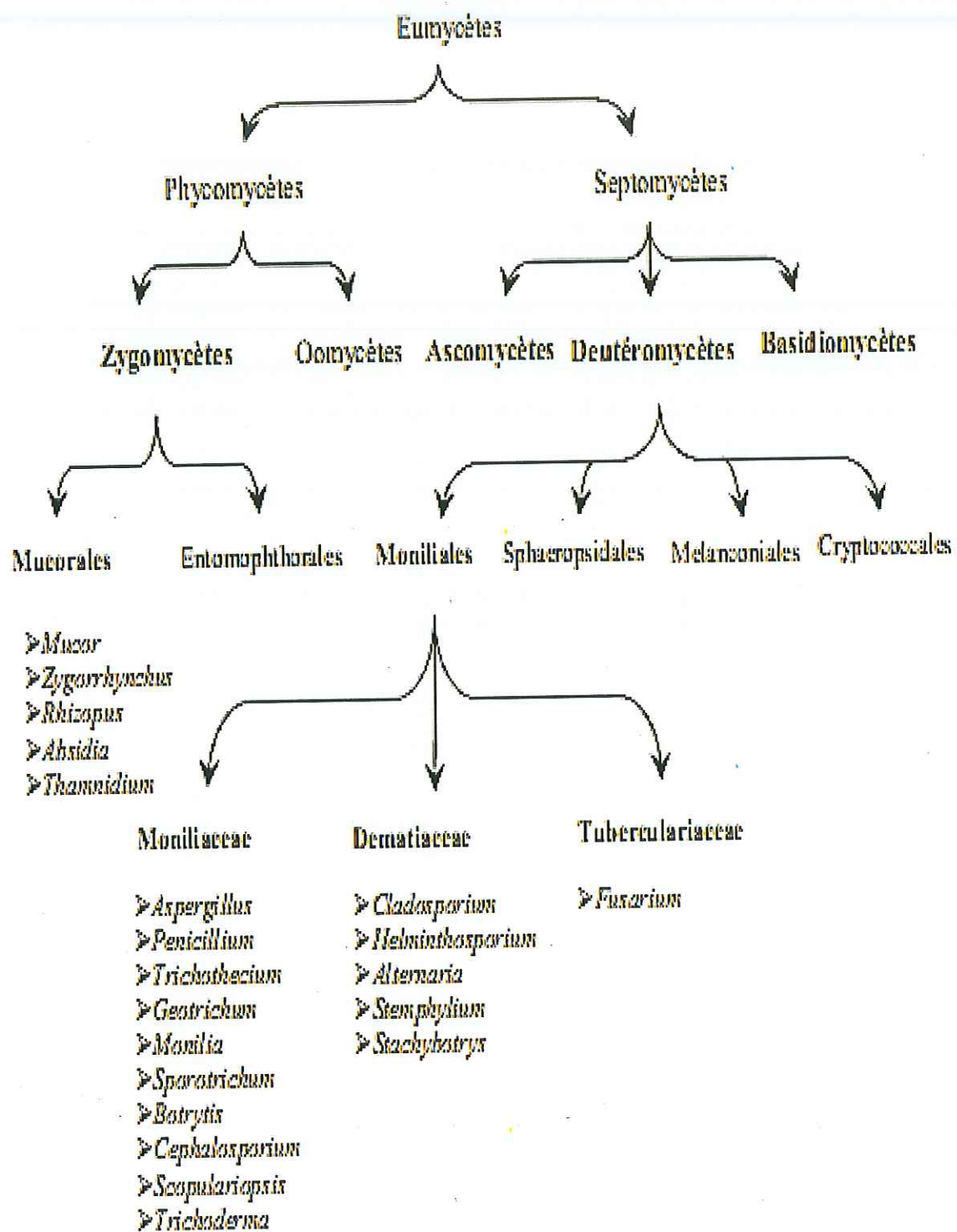


Fig.2. Classification des moisissures (Fraizier, 1967)

I.2.5. Intérêt des moisissures

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'application; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgau et Sanglier, 1992).

I.2.5.1. Intérêt alimentaire

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (Botton et al., 1999).

La production de biomasse peut être une source importante pour l'alimentation animale et même humaine, en servant de complémentation des produits céréaliers. Quelques espèces fongiques ont un grand usage, c'est le cas d'*Aspergillus niger*, de *Fusarium graminearum* et de *Trichoderma harzianum* (Botton et al., 1999; Larpend-Gourgau et Sanglier, 1992 ; Delgado-Jarana et al., 2002). Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. *Aspergillus niger* est un bon exemple, il produit la cellulase, l'amylase, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons. Cette moisissure secrète aussi des protéases, des lipases et des estérases utilisées dans différentes applications alimentaires (Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999).

I.2.5.2. Intérêt pharmaceutique

La production industrielle en vitamines se limite à une partie de la synthèse de la riboflavine produite spécialement par *Eremothecium ashbyii* cultivé en milieu agité et supplémené en lipides. La vitamine A pourrait faire l'objet d'une production microbiologique par les champignons notamment les espèces de l'ordre des mucorales (Botton et al., 1999). Les champignons filamenteux sont des grands producteurs d'antibiotiques tel que la pénicilline produite par le genre *Penicillium* et la céphalosporine produite par *Cephalosporium* (Larpend-Gourgau et Sanglier, 1992 ; Botton et al., 1999). Cependant les acides organiques d'origine fongique n'ont pas une application pharmaceutique importante (Divies, 1984).

1.2.5.3. Intérêt médical

La découverte par Fleming (1928) du premier antibiotique (la Pénicilline) extrait de *Penicillium notatum*

Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications (Boiron, 1996 ; Botton et *al.*, 1999).

La découverte de la cyclosporine, puissant agent immunodépresseur, puis la mise en évidence de corrélation entre l'activité de certaines enzymes et diverses pathologies ont permis de donner un grand essor aux sciences médicales et pharmaceutiques (Botton et *al.*, 1999 ; Richard, 2005).

1.2.6. Dissémination

Les champignons se propagent sur différents substrats, par l'intermédiaire de spores qui sont des corpuscules de 2 à 250 μm de diamètre. Les spores sont disséminées principalement par l'air ambiant ou par le contact de l'homme. Lorsqu'elles se déposent sur un substrat organique, tel que le support papier, elles germent si les conditions d'humidité et de température sont favorables. Elles y pénètrent par voie chimique (production d'enzymes, de toxines) ou par voie mécanique en exerçant une pression sur le substrat (Chabasse et *al.*, 1999).

1.2.7. Cycle de vie des moisissures

Le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction :

- une reproduction asexuée, au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat. Le mycélium différencie des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées;
- la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à n chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores.

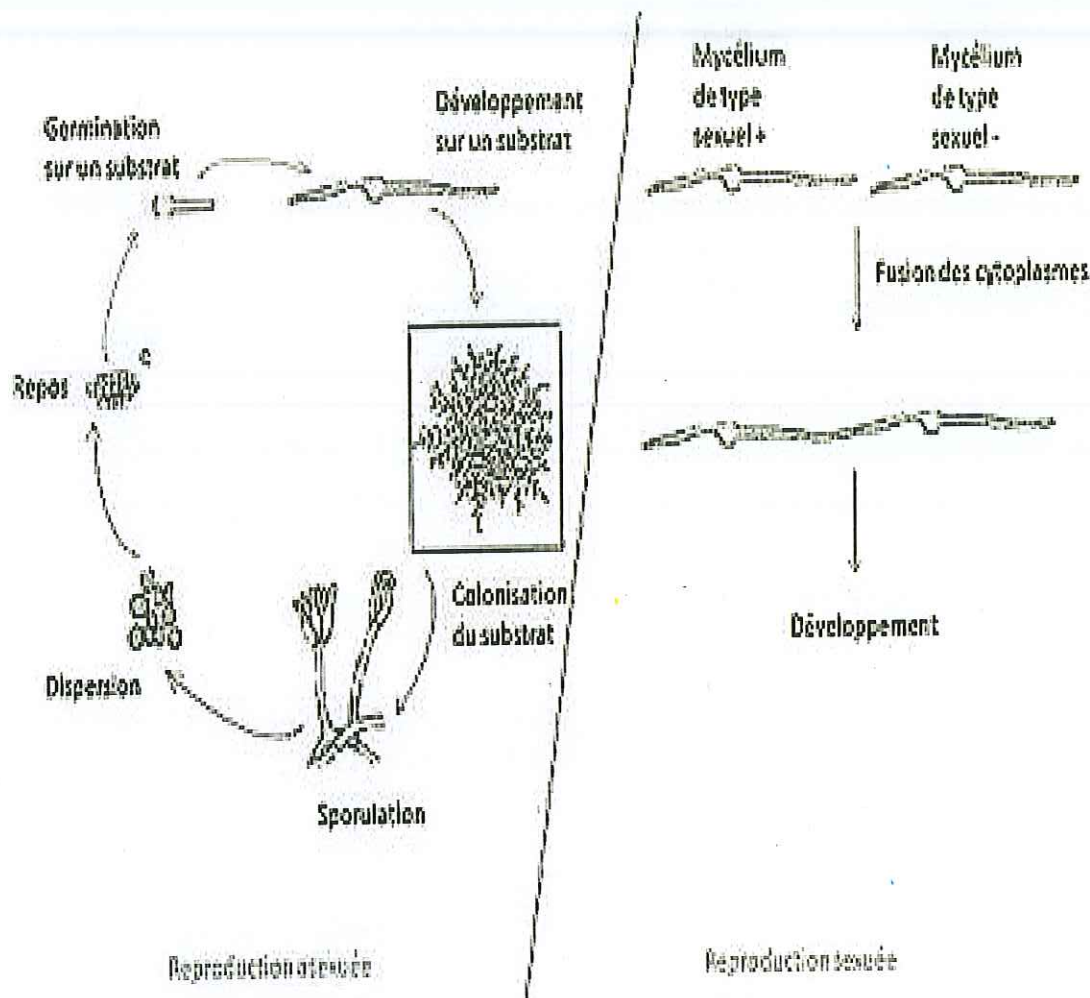


Fig.3. Cycles de vie des champignons (Roquebert, 2002).

I.2.8. Conditions physico-chimiques nécessaires au développement des moisissures

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes. Elles se développent seulement si le milieu leur apporte les éléments nutritifs nécessaires. Comme tout microorganisme, la croissance fongique est dépendante d'un certain nombre de paramètres intrinsèques et extrinsèques du milieu.

I.2.8.1. Température

Les moisissures peuvent se développer entre 0°C et 35°C. Certaines espèces sont capables de se développer à des températures extrêmes : *Cladosporium herbarum* peut se développer à des températures inférieures à 0°C et *A. flavus* ou *A. fumigatus* jusqu'à 60°C. En général, la température optimale de toxinogénèse est voisine de la température optimale de croissance. Pour d'autres toxines, telles que la zéaralénone élaborée par *F. roseum*, la température optimale de toxinogénèse est généralement inférieure à celle de la croissance,

respectivement 15 et 25°C. Parfois, l'apparition de mycotoxine dans les conditions naturelles est favorisée par des températures relativement basses, au voisinage de la température minimale de croissance : de l'ordre de 1°C à 4°C pour les trichothécènes produites par *F. tricinatum* (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

I.2.8.2. Activité en eau (A_w)

L' A_w d'un aliment dépend de sa composition chimique, c'est-à-dire de la quantité d'eau retenue par les sels, sucres et protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure). Les moisissures sont, de façon schématique, plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures se développent bien pour des activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures. Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penillium* sont généralement capables de se développer à des A_w voisines de 0,7 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de saison sèche, confitures,...) (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002). Par comparaison, les *Fusarium* ne peuvent se développer qu'à des A_w supérieures à 0,9. Il s'agit donc d'espèces se développant au champ, sur les plantes vivantes (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

I.2.8.3. pH

Les moisissures peuvent se développer dans une large gamme de pH ; elles se développent normalement pour des pH compris entre 3 et 8, leur croissance étant normalement optimale entre 5 et 6. En raison de leur acidité (pH inférieur à 6), de nombreux aliments comme les légumes et les fruits sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne (Tabuc, 2007).

I.2.9. Conditions de croissance des moisissures

I.2.9.1. Éléments nutritifs

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

(extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

I.2.9.2. Source de carbone et d'énergie

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et *al.*, 2000). D'autres produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acide gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996 ; Tabuc, 2007).

I.2.9.3. Présence d'oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium*, *Oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (Bourgeois, 1989 ; Botton et *al.*, 1999).

I.2.10. Les aliments

Le pain et le bâton de manioc constituent une alimentation de base pour bon nombre de familles camerounaises.

I.2.10.1. Bâton de manioc

Plus connu sous le nom de « bobolo » au Cameroun, le bâton de manioc est classé dans la catégorie des mets populaires chez les bantous. C'est l'un des mets les plus populaires des cérémonies au Cameroun (mariage, dote, funérailles...).

Le processus de fabrication du bâton de manioc se décrit de la manière suivante : Éplucher et laver le manioc avant de le faire tremper dans de l'eau froide pendant 4 à 5 jours. Les tubercules doivent être bien molles avant de les retirer de l'eau. Égoutter les tubercules, puis les ouvrir en deux dans le sens de la longueur et retirer la partie centrale. Presser pour extraire le maximum d'eau, puis piler la chair. Prélever la pâte et la rouler pour obtenir des bâtonnets de 7 à 9 cm de longueur et de 2 à 3 cm de diamètre selon les préférences. Disposer les bâtonnets dans le sens de la longueur d'une feuille d'*Hypselodelphis violacea* (Marantaceae) servant d'emballage, laisser 2 cm à chaque extrémité pour rabattre en roulant le tout avec une ficelle de ménagère qui peut être faite à partir de la peau du tronc du bananier. Mettre les feuilles

de bananier au fond de la marmite et ajouter de l'eau. Puis laisser cuire à la vapeur pendant 1 h 30 min (ANI International ; 2018)

I.2.10.2. Pain

Les différents ingrédients nécessaires à la fabrication du pain sont : farine, eau, levure et sel.

Le processus de fabrication du pain s'articule sur 8 étapes (Jurgen *et al.*, 2003) :

- le pétrissage, consiste à mettre les ingrédients dans un pétrin en les mélangeant pour obtenir une grosse boule de pâte ;
- le pointage, ici on laisse la pâte se reposer suivi d'un gonflement grâce à la levure qu'elle contient ;
- la division ou le repos, consiste à partager la grosse boule de pâte en petites boules de même poids appelées pâtons ;
- le façonnage, consiste à donner à chaque pâton une forme voulue par exemple une baguette, à la main ou avec une machine ;
- l'apprêt qui consiste à poser le pain cru obtenu sur un tissu pour qu'il se repose et gonfle encore plus ;
- l'enfournement, consiste à faire des traits réguliers sur chaque pain cru suivi de leur enfournement dans un four à 250°,
- la cuisson, ici le pain cuit sans se dessécher grâce à la vapeur injectée dans le four avant l'enfournement ;
- le défournement, ici le pain est retiré du four après vérification de leur état de cuisson.

I.2.11. Le milieu de culture MEA

Encore appelé gélose à l'extrait de malt, le milieu de culture MEA (Malt Extract Agar) est utilisé pour la recherche, le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires et des produits pharmaceutiques. Il convient également pour l'entretien et l'isolement des souches. En milieu acide, l'extrait de malt, qui est riche en glucides, apporte tous les éléments nutritifs nécessaires au métabolisme des moisissures. En outre, l'acidité du milieu inhibe le développement de la plupart des germes contaminants. Le milieu de culture MEA préparé en tubes ou en flacons peut se conserver pour une durée de 6 mois à 2-8°C (à titre indicatif) et d'un mois à 2-8°C pour le milieu préparé en boîtes de pétri (www.biokar-diagnostics.fr).

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Types d'aliments utilisés

Le matériel utilisé pour ce travail est constitué de trois types d'aliments couramment consommés dans la zone et de trois marchés, à savoir : le bâton de manioc, le pain et le gâteau. Cette variabilité des lieux d'achat représente les 3 répétitions utilisées pour chaque aliment à qui un code est attribué suivant le tableau ci-dessous :

Tableau I: Aliments

Code	Aliment	Répétitions
Z01	Pain	R1 / R2/ R3
Z02	Gâteau	R1/ R2/ R3
Z03	Bâton de manioc	R1/ R2/ R3

Chaque aliment est échantillonné en 3 répétitions en rapport avec les 3 lieux d'achat que sont les marchés de Melen (R1), de Mfoundi (R2) et de Mvog Mbi (R3) où les boulangeries Santa Lucia, Sélect et Socropol ont été respectivement sollicitées.

II.1.2. Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé pour ce travail est constitué :

- du brûleur à alcool pour stériliser les pincettes à chaque prélèvement des moisissures cultivées ;
- de l'anse de platine pour le prélèvement de la flore fongique ;
- des lames porte-objets qui servent à faire des préparations microscopiques ;
- de la glycérine à 12% pour réaliser des préparations à longue durée ;
- du microscope optique à oculaire micrométrique de marque OLYMPUS CH-2 pour les observations et la mesure de la taille des structures observées ;
- d'un autoclave de marque SANO pour stériliser le matériel et les milieux de culture ;
- des boîtes de pétri de 9 cm de diamètre pour réaliser les cultures des moisissures ;
- des tubes à essai pour conserver les cultures ;
- des erlenmeyer de 500 ml, pour la préparation des milieux de culture ;
- du parafilm pour sceller les cultures dans les boîtes de pétri ;

- d'une balance électronique de marque KERN pour mesurer le poids des ingrédients des milieux de culture ;
- d'un réfrigérateur à température variable (4 à 8°C) utilisé comme milieu de conservation
- d'un appareil photo numérique de marque CANON pour les photos réalisées.

II.1.3. Matériel de préparation du milieu de culture MEA (Malt Extract Agar) utilisé

Composition:

Extrait de Malt.....15g
 Agar-agar.....7,5g
 Eau distillée.....1000 ml

II.2. Méthodes

II.2.1. Origine et conservation des aliments mis en observation

Ceci s'est fait en plusieurs étapes qui se résument ainsi qu'il suit

- 1) Préparation du dispositif de conservation (petits cartons, bocaux, boîtes en plastiques) et de mise en observation en les mettant au propre ;
- 2) Achat des aliments supposés sains et mise en observation au laboratoire après vérification au préalable à l'œil nu de leur état sanitaire déjà au marché au moment de l'achat, et ensuite beaucoup plus méticuleusement au laboratoire, et si nécessaire à la loupe ou au microscope à dissection pour pouvoir les classer avec assurance soit comme aliments sains et dans ce cas éventuellement utilisés ou alors susceptibles d'être déjà contaminés et dans ce cas non utilisés dans l'expérimentation ;
- 3) Disposition des aliments séparément par type dans le dispositif de conservation (carton, bocal, boîte), portant la date de mise en place agrafée sur un bout de papier, puis dépôt des 3 répétitions (R1, R2 et R3) de chaque aliment d'une part à température ambiante du laboratoire et d'autre part dans le réfrigérateur (4°C à 8°C).



Fig.4: Dispositif de conservation des aliments

II.2.2. Conservation du milieu de culture MEA

Dix-huit boîtes de Pétri de 10 mm de diamètre contenant le milieu MEA coulé le même jour ont été réparties en 2 lots de 9 boîtes (3 répétitions de 3 boîtes chacune) dont l'un des lots, placé en observation à température ambiante du laboratoire et le deuxième placé le même jour plutôt dans un réfrigérateur (4°C-8°C). Les boîtes étaient observées tous les 2 à 3 jours afin de déceler tout début de contamination par les moisissures spontanées qui apparaîtraient sur le milieu de culture MEA à ces différentes températures et noter le temps d'incubation avant apparition des premiers signes, le temps mis par la moisissure pour coloniser la moitié de la surface du milieu de culture et le temps de colonisation de toute la boîte de pétri afin d'évaluer le différentiel de temps en plus ou en moins entre ces 2 milieux de conservation.

II.2.3. Description de la flore fongique

La description de la flore fongique s'est faite suivant le processus ci-après :

- 1) Observation de l'état sanitaire de l'aliment tous les 2 à 3 jours maximum et après avoir pris des photos quand nécessaire, tout en notant sur la fiche d'observation des symptômes des contaminants fongiques sur aliments les dates et caractéristiques des contaminations observés ;
- 2) Réalisation des prélèvements avec l'anse de platine ou la lancette ou une pincette stérilisée à la flamme sur l'échantillon contaminé (Répétition R1 ou R2 ou R3) le plus représentatif et réalisation des préparations microscopiques sur lames et lamelles

d'abord pour observation directe au microscope des caractéristiques du contaminant fongique ;

- 3) Préparation des milieux de culture appropriés (MEA, principalement) dans les boîtes de pétri de 9 cm de diamètre pour la mise en culture pure des moisissures observées ;
- 4) Mise en place des cultures de la moisissure dans les boîtes de Pétri (3 répétitions R1, R2 et R3 par type de contaminant observé) en inoculant au milieu des boîtes à l'aide de l'anse de platine (ou lancette, ou pincette) préalablement stérilisée à la flamme ;
- 5) Repiquage si nécessaire (en inoculant toujours au milieu de la boîte) jusqu'à obtenir des cultures pures pour chaque type de moisissure observée ;
- 6) Réalisation des photos et description des caractéristiques des cultures obtenues telles que observées à l'œil nu et au microscope à dissection : caractéristiques du mycélium, couleurs et variations de couleurs, ornementsations, etc.... ;
- 7) Réalisation des cultures pures sur lames porte-objet ;
- 8) Observation à l'œil nu et au microscope des cultures sur lames et description de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques
- 9) Identification du contaminant à partir des caractéristiques décrites.

II.2.4. Identification des contaminants fongiques

Les contaminants fongiques sont identifiés en utilisant essentiellement les outils de la taxonomie conventionnelle qui consistent à comparer les caractéristiques macroscopiques et microscopiques décrits à celles existant dans les monographies, les clés d'identification et autres documents spécialisés citées en bibliographie. Les principaux documents utilisés pour l'identification étaient ceux de Samson et *al.* (2010), Gams et *al.*(1998) et Barnett et Hunter (1972).

II.2.5. Conditions de travail

Tableau II : principaux facteurs de croissance et de développement des moisissures

Traitements	Principaux facteurs	
	Température	Hygro thermométrie
Réfrigérateur	5,5°C	61 %
Température ambiante	25°C-30°C	46 %

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Identification des moisissures

Les moisissures sont identifiées par la combinaison des différents examens macroscopiques et microscopiques effectués après une incubation de 5 à 7 jours sur le milieu de culture MEA à température ambiante et à température de réfrigération. Sur la base des principaux documents (Samson et *al.*(2010), Gams et *al.*(1998) et Barnett et hunter (1972) utilisés pour leur identification.

4 genres de moisissures ont été identifiés sur les aliments analysés et le milieu de culture MEA, à savoir les genres *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma* et *Ulocladium*.

Leur répartition par aliment ainsi que leurs caractères cultureux et autres caractères microscopiques sont présentés ainsi qu'il suit :

III.1.1.1. Types de moisissures identifiés sur les aliments et leurs caractéristiques

III.1.1.1.1. *Aspergillus* identifié sur différents types d'aliments et milieu de culture MEA

- Sur le pain :



Fig.5. Pain présentant des taches de moisissures causées par *Aspergillus* sp.

Couleur grisâtre et aspect poudreux des colonies sur le pain ; temps d'incubation avant apparition des premiers signes de contamination à température du réfrigérateur est égal à 27 jours.

- Sur le gâteau



Fig.6. Gâteau présentant des taches de moisissures causées par *Aspergillus* sp.

Couleur grisâtre et aspect poudreux des colonies sur le gâteau ; temps d'incubation avant apparition des premiers signes de contamination à température ambiante est égal à 2 jours.

- Spontané sur le milieu de culture MEA



Fig.7. *Aspergillus* sp. poussant spontanément comme contaminant fongique sur milieu de culture MEA à température ambiante au laboratoire.

Couleur verdâtre et aspect poudreux des colonies sur le milieu de culture ; temps d'incubation avant apparition des premiers signes de contamination à température ambiante est égal à 7 jours.

III.1.1.1.2. Caractères cultureux et microscopiques des *Aspergillus* observés sur aliment et sur milieu de culture MEA

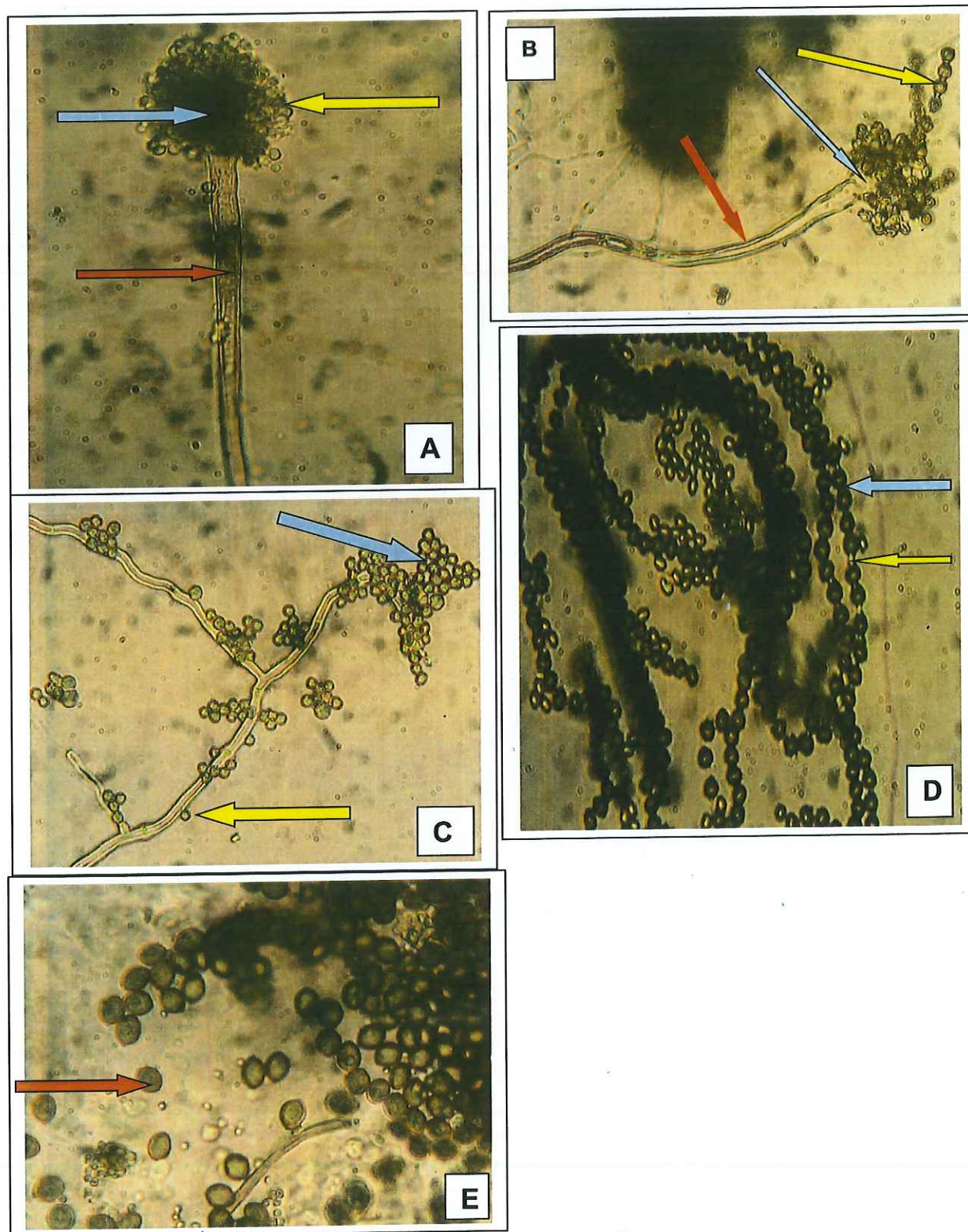


Fig.8. : Structure morphologique de *Aspergillus* sp. poussant comme moisissure spontanée sur milieu de culture (MEA) et sur produits alimentaires de boulangerie (pain, gâteau)

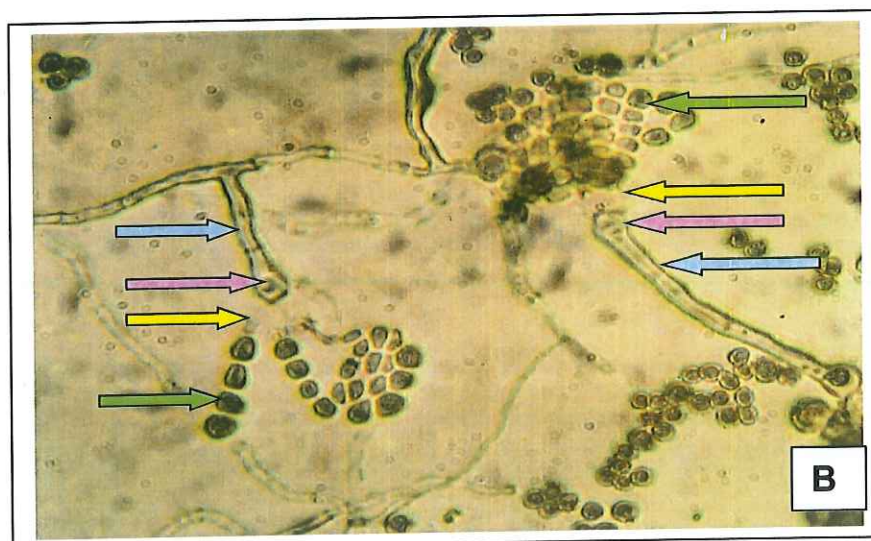
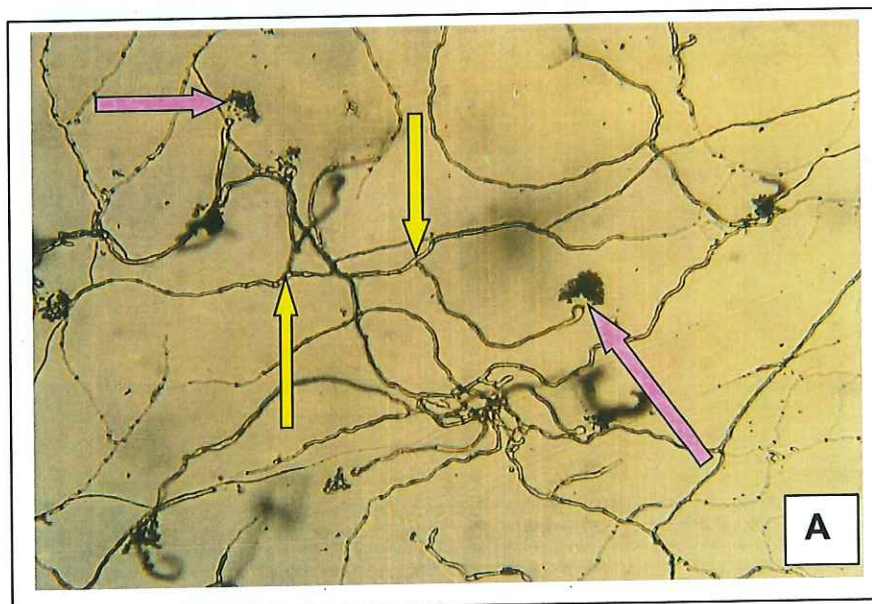
A : la flèche bleue indique un sporocyste ; la flèche rouge indique un sporocystophore et la flèche jaune indique les conidies.

B : la flèche rouge un sporocystophore ; la flèche bleue indique un sporocyste et la flèche jaune indique les conidies regroupées en chaine sur phialide.

C : la flèche jaune indique une conidie isolée, et la flèche bleue indique des conidies en amas.

D : la flèche bleue indique le développement des conidies en chaine et la flèche jaune indique un anneau reliant les conidies en chaine.

E : la flèche rouge indique des conidies verdâtres présentant une paroi épaisse.



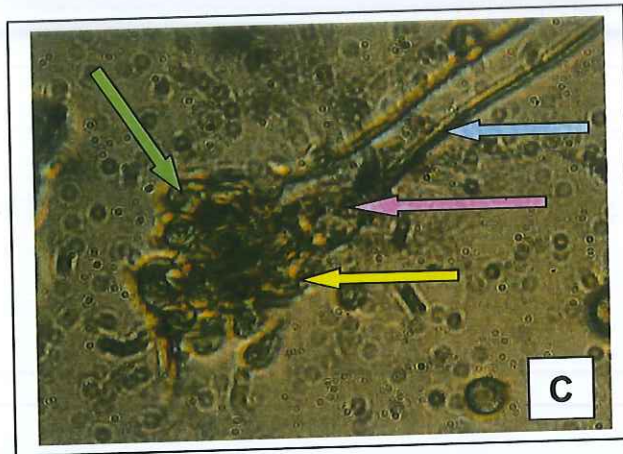


Fig.9. Développement des conidies sur phialides (cellules conidiogènes) et conidiophores chez *Aspergillus* sp. poussant comme moisissure spontanée sur milieu de culture (MEA) et sur produits alimentaires de boulangerie (pain, gâteau,).

A : la flèche rouge indique un conidiophore portant des conidies en chaîne sur phialides, la flèche jaune indique une ramification des hyphes à conidiophores sur l'hyphe végétatif.

B : la flèche verte indique les conidies en chaîne, la flèche jaune indique un phialide unisériel, la flèche rouge indique un conidiophore et la flèche bleue indique un stipe.

C : la flèche verte indique une conidie, la flèche jaune un phialide unisériel, la flèche rouge un conidiophore et la flèche bleue un stipe.

III.1.1.1.3. *Rhizopus* identifié sur les différents types d'aliments

- Sur le bâton de manioc :

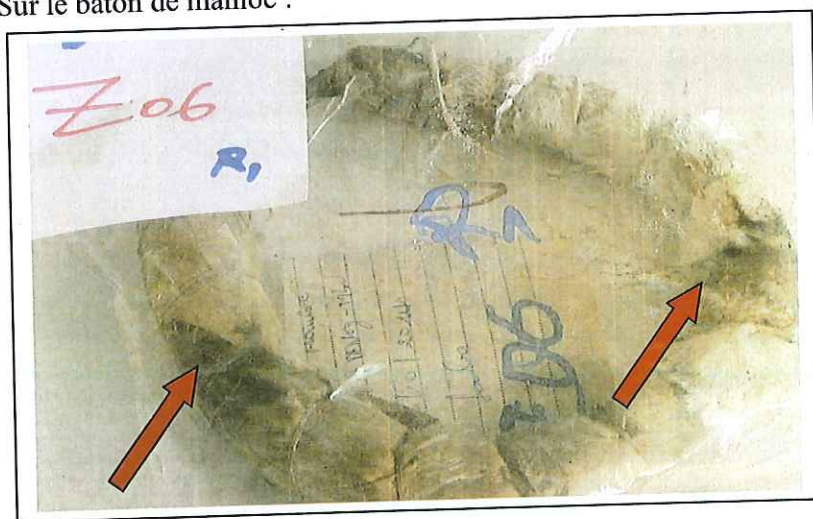


Fig.10. Bâton de manioc présentant des taches (flèches) de moisissures causées par *Rhizopus* sp.

Couleur verdâtre et aspect laineux des colonies observées sur l'aliment ; temps d'incubation avant apparition des premiers de contamination à température ambiante est égal à 3 jours.

- Sur le gâteau :

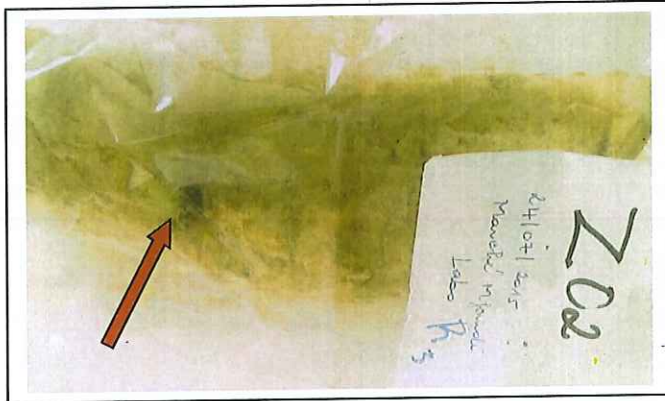


Fig.11. Gâteau présentant des taches de moisissures causées par *Rhizopus* sp.

Couleur noirâtre et aspect poudreux des colonies observées sur l'aliment ; temps d'incubation avant apparition des premiers signes de contamination en milieu ambiant est égal à 3 jours.

III.1.1.1.4. Caractères cultureux et microscopiques des *Rhizopus* observés

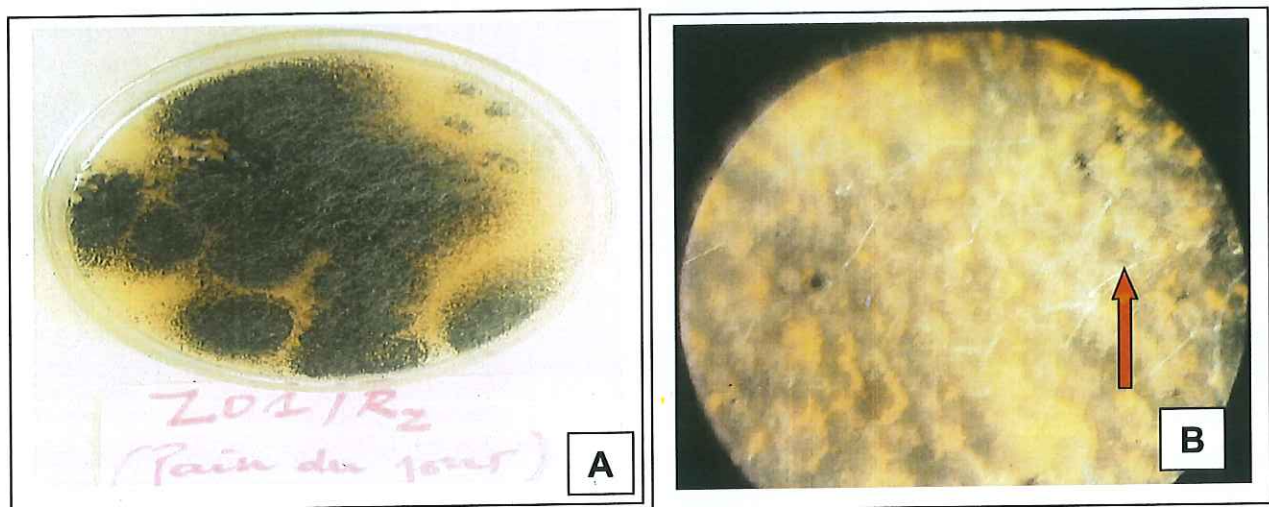


Fig.12. Culture pure puis zoom sur loupe binoculaire de *Rhizopus stolonifer*

A : culture pure très dense et mature de *Rhizopus stolonifer* de couleur noirâtre à aspect poudreux à cotonneux prélevée sur l'aliment.

B: zoom sur vieilles cultures de *Rhizopus stolonifer* présentant sporocystophores à aspect blanchâtre (flèche rouge) et des sporocystes d'apparence grenue (tâches grises).

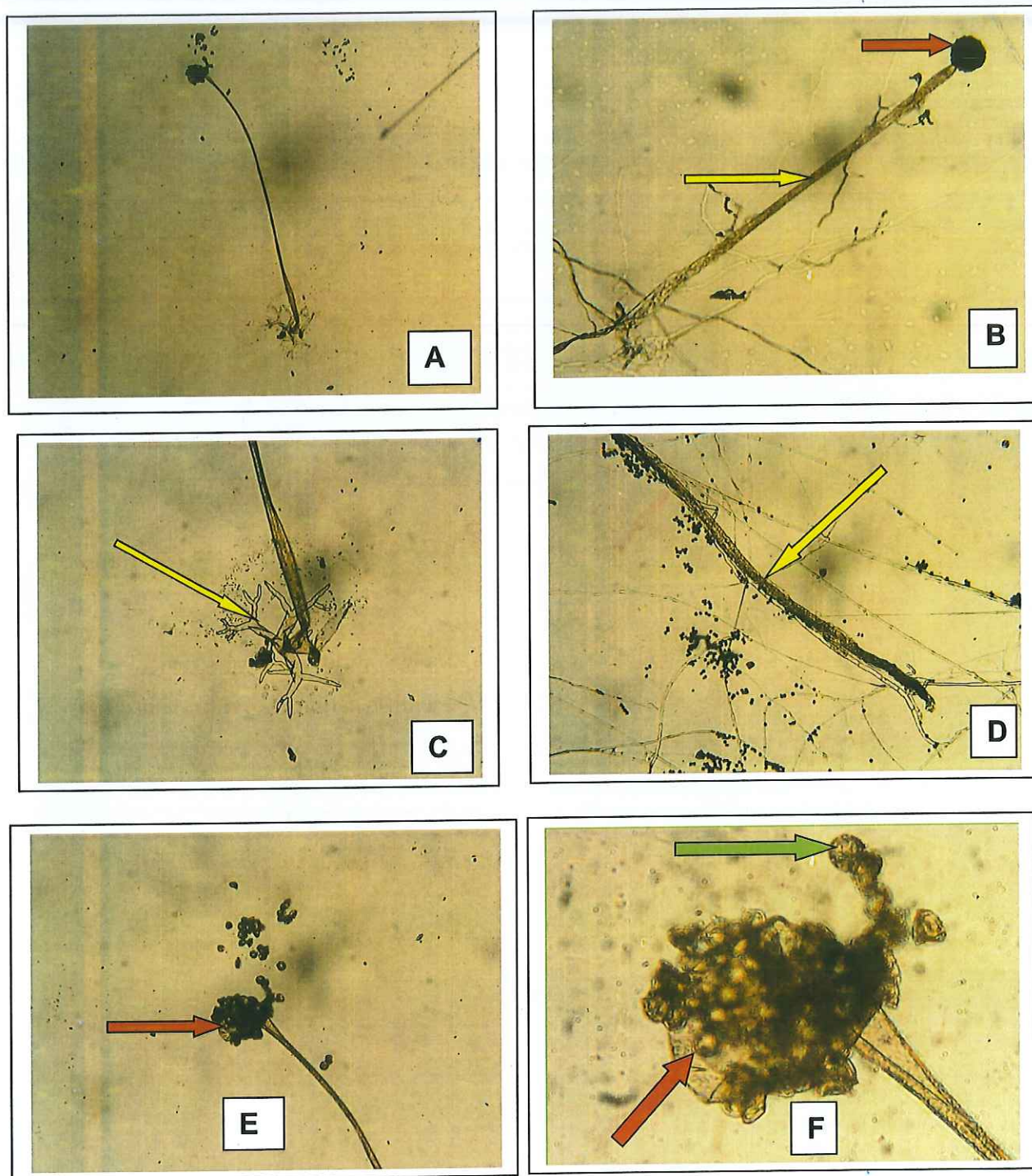


Fig.13. : Structures morphologiques de *Rhizopus stolonifer* prélevé sur pain et gâteau moisis et ensuite cultivé sur milieu artificiel (MEA).

A : structure complète de *Rhizopus stolonifer*

B : la flèche rouge indique un sporocyste mature, la flèche jaune un sporocystophore bien différencié

C : la flèche jaune indique un sporocystophore différenciant des stalons ramifiés à sa base

D : la flèche jaune indique un sporocystophore sans stalons à sa base

E : la flèche rouge indique un sporocyste libérant des conidies après rupture de la paroi

F : la flèche rouge indique une paroi du sporocyste à maturité déchirée, la flèche verte indique la libération des conidies.

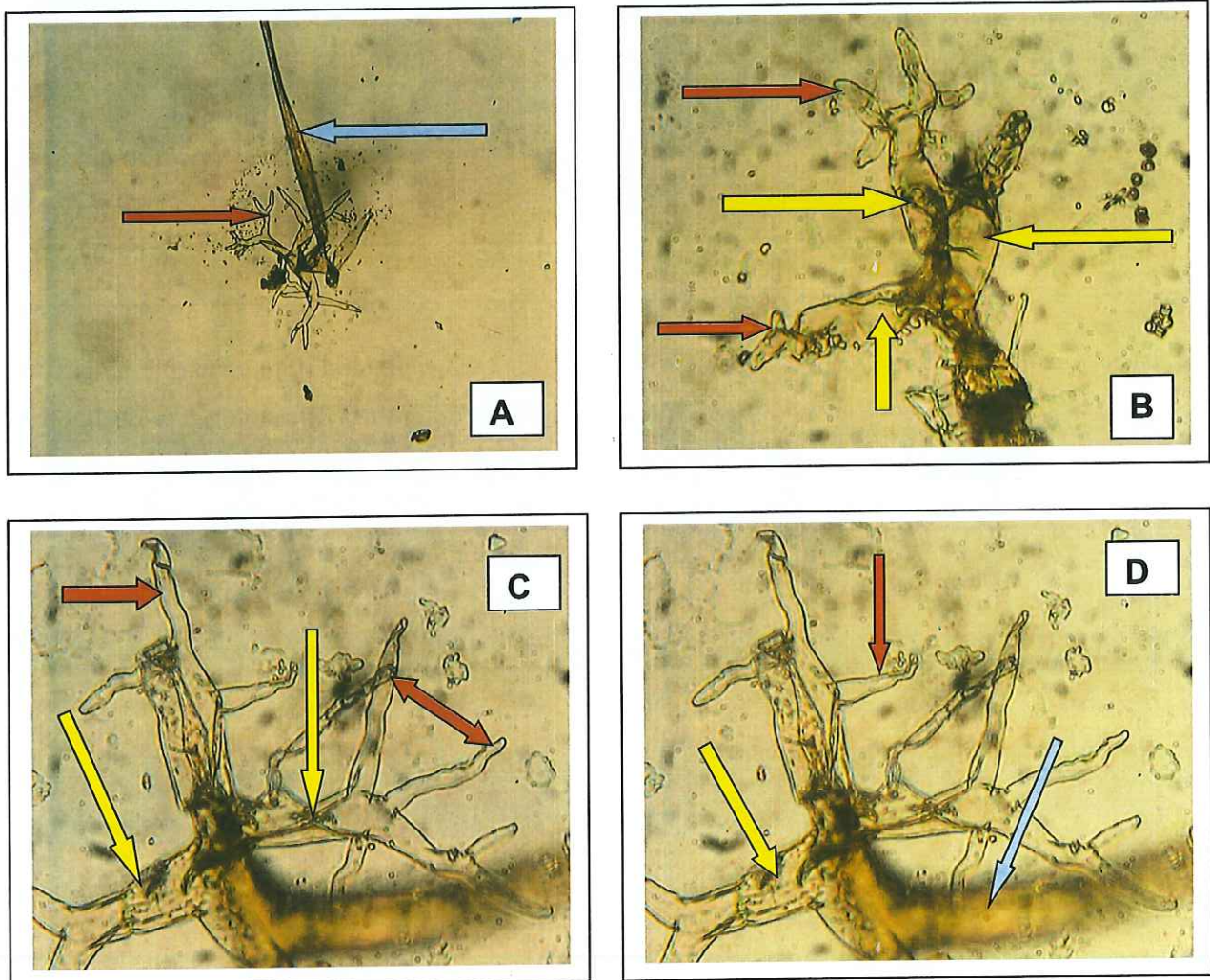


Fig.14. Structure morphologique des stolons de *Rhizopus stolonifer* prélevé sur pain et gâteau moisissés et ensuite cultivé sur milieu artificiel (MEA)

A : la flèche bleue indique un sporocystophore, la flèche rouge des stalons développés du sporocystophore

B/C/D : la flèche jaune indique des ramifications primaires des stalons, les flèches rouges indiquent des ramifications secondaires des stalons et la bleue indique un sporocystophore.

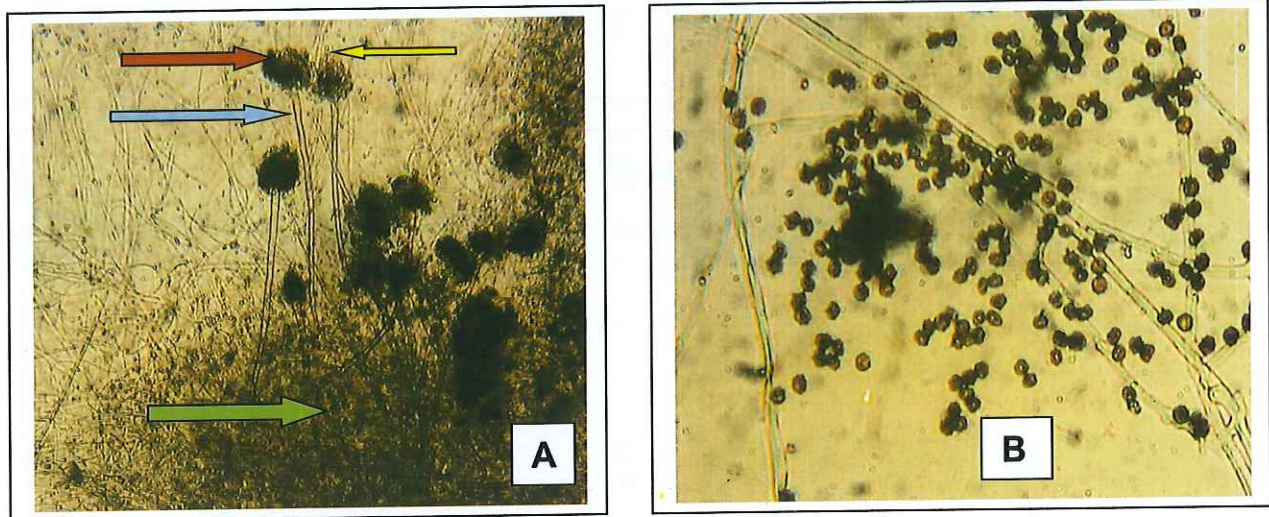


Fig.15. Structure morphologique et conidies de *Rhizopus* aff. *acidus* prélevé sur pain et gâteau moisis et ensuite cultivé sur milieu artificiel (MEA)

A : la flèche jaune indique des conidies en chaînes sur sporocyste ; la flèche rouge indique un sporocyste ; la flèche bleue, un sporocystophore et la flèche verte, des amas d'hyphes végétatifs sur milieu de culture

B : représente les conidies isolées et en amas présentant des aspérités en surface

III.1.1.1.5 *Trichoderma* sp. identifié sur différents types d'aliments

- Sur le gâteau :



Fig.16. *Trichoderma* sp. poussant sur gâteau conditionné et mis en observation à température ambiante du laboratoire.

Couleur verdâtre et aspect poudreux des colonies de *Trichoderma* sp. observées sur l'aliment ; temps d'incubation avant apparition des premiers signes de contamination à température ambiante du laboratoire est égal 3 jours.

III.1.1.1.6. Caractères cultureux et microscopiques des *Trichoderma* sp. observés

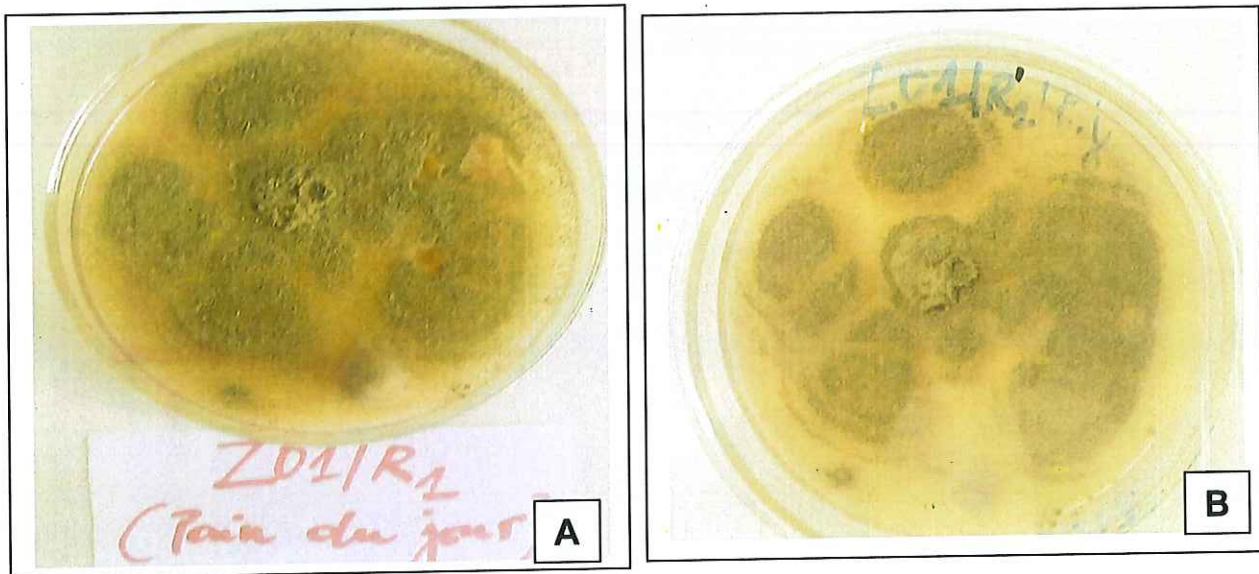


Fig.17. culture pure de *Trichoderma* sp. prélevé du gâteau

A : indique une culture pure, dense et à maturité sur le milieu de culture MEA de *Trichoderma* sp., couleur verdâtre et aspect glabre des colonies

B : indique une vieille culture de *Trichoderma* sp.

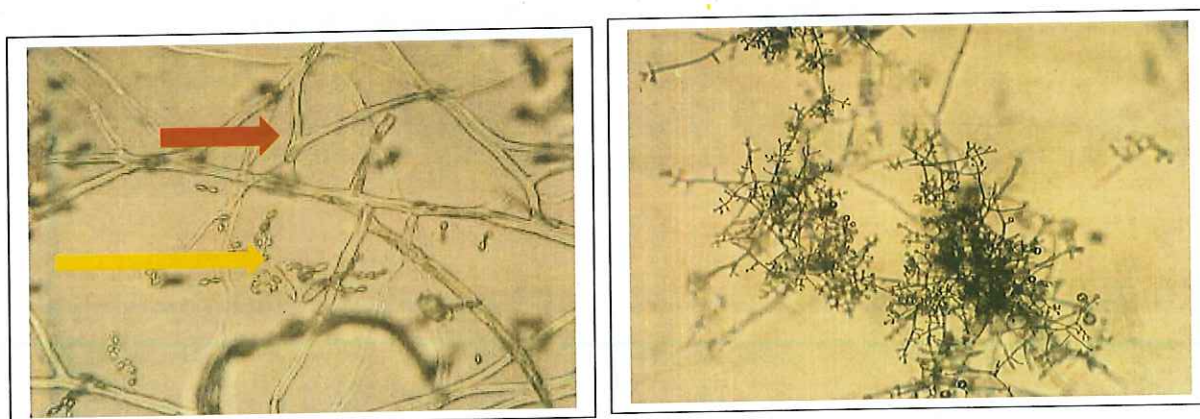


Fig.18. Structures morphologiques de *Trichoderma* sp.

Flèche rouge : filaments de mycélium ramifiés ; Flèche jaune : conidies ou spores regroupées en amas.

III.1.1.1.7. Caractères cultureux et microscopiques de *Ulocladium* ou espèce affine observée

- Poussant spontanément sur le milieu de culture MEA :

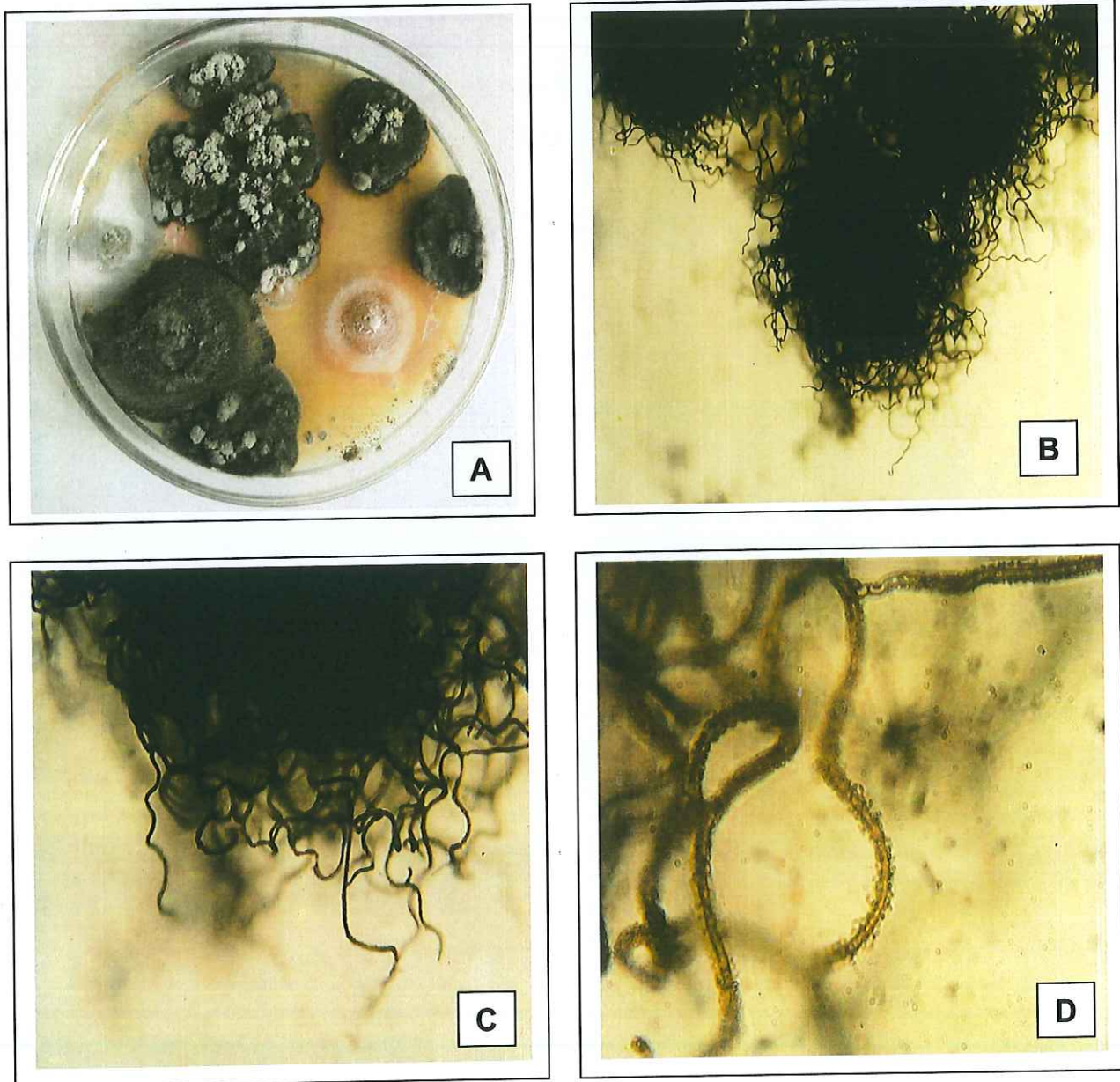


Fig.19. *Ulocladium* sp ou espèce affine poussant spontanément comme contaminant fongique sur milieu de culture (MEA) à température ambiante du laboratoire.

Couleur noirâtre et aspect cotonneux en général de la culture sur MEA, le sommet des colonies à maturité sur milieu de culture apparait à fond claire et avec un aspect grenu.

B/C/D : présentent des hyphes de *Ulocladium* sp. Ou espèce affine présentant des structures secondaires en forme d'amas de filaments.

Tableau II : Tableau récapitulatif des espèces de moisissures observées sur les aliments et sur le milieu de culture MEA

Type d'aliment ou milieu de culture	Espèces de moisissures observées		Temps moyen d'incubation (jours)	
	A température ambiante (20-27°C)	Dans le réfrigérateur (4-8°C)	A température Ambiante (20-27°C)	Dans le réfrigérateur (4-8°C)
Pain	- <i>Rhizopus</i> sp. - <i>Trichoderma</i> sp.	-	-3 jours -3 jours	-
Gâteau	-	<i>Aspergillus</i> sp.	-	26 jours
Bâton de manioc	<i>Rhizopus</i> sp.	-	7 jours	-
Milieu de culture	- <i>Aspergillus</i> sp. - <i>Ulocladium</i> sp.	-	-7 jours -8 jours	-

Sur la base des résultats portant sur l'identification des contaminants fongiques de quelques aliments couramment consommés dans la région du Centre, 3 genres de moisissures ont été mis en évidence à savoir : *Rhizopus*, *Aspergillus* et *Trichoderma*. Ajoutés à ces derniers, 2 genres poussant spontanément sur les milieux de culture MEA : *Ulocladium* et *Aspergillus*. Ces résultats montrent l'existence d'une flore fongique variée, avec une plus grande représentativité des genres *Aspergillus* et *Rhizopus* qui contaminent plus les produits pâtisseries à savoir le pain et le gâteau.

III.1.2. Influence de la température sur le développement des moisissures

Les aliments placés dans les conditions de température ambiante et de réfrigération présentent des différences sur le type des moisissures qui s'y développent et sur la durée de colonisation.

Tableau III : Évaluation de la durée de colonisation du pain par la mycoflore en fonction de la température de conservation

Paramètres	Type d'aliment : pain (Z01) conservé à température ambiante				Type d'aliment : pain (Z01) conservé au réfrigérateur (4°-8°C)				b-a
	R1	R2	R3	R moyen (a)	R' 1	R' 2	R' 3	R' moyen (b)	
Mise en observation (d1)	J0	J0	J0	0	J0	J0	J0	0	0J
Temps d'apparition des premiers symptômes (d2) sur l'aliment	J3	J4	J4		J27				
Nombre de jours d'incubation (N=d2-d1)	3	4	4	3,66	27			27	23,33J
Temps de colonisation à 50% (d50)	J6	J8	J9		J53				
Nombre réel de jours (N=d50-d1) pour d50	6	8	9	7,66	53			53	45,34J
Temps de colonisation à 100%(d100)	J9	J11	J14	11,33	J68			68	56,57

NB : R(répétitions) ; J (Jour) ; Température ambiante : 23-25°C ; a et b : temps moyen

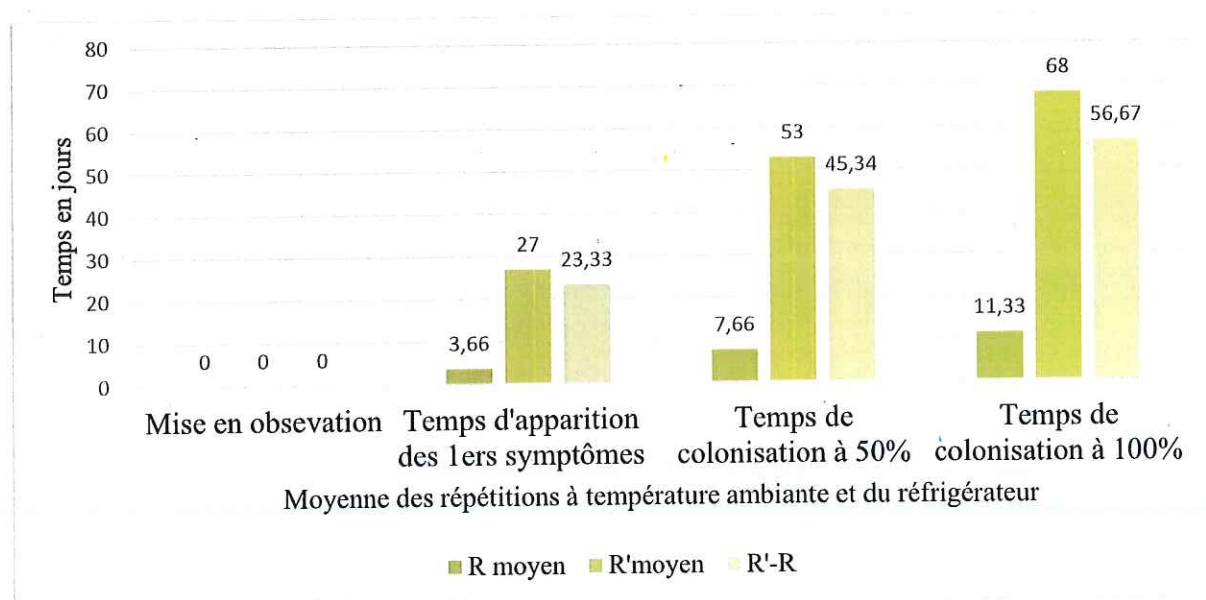


Fig.20.Temps moyen de colonisation du pain par la flore fongique à température ambiante et de réfrigérateur

Tableau IV : Évaluation de la durée de colonisation du gâteau par la mycoflore en fonction de la température de conservation

Paramètres	Type d'aliment : gâteau (Z02) conservé à température ambiante				Type d'aliment : gâteau (Z02) conservé au réfrigérateur				b-a
	R1	R2	R3	R moyen (a)	R' 1	R' 2	R' 3	R' moyen (b)	
Mise en observation (d1)	J0	J0	J0		J0	J0	J0		0J
Temps d'apparition des premiers symptômes (d2) sur l'aliment	J2	J2	J3		J29		J26		26J
Nombre de jours d'incubation (N=d2-d1)	2	2	3	2,33	29		26	27,5	25,2J
Temps de colonisation à 50% (d50)	J6	J7	J6		J44		J42		
Nombre de jours (N=d50-d1)	6	7	6	6,33	44		42	43	36,67J
Temps de couverture surface d'aliment à 100% (d100)	J11	J12	J13	12	J54		J50	52	40J

NB : R(répétitions) et J (Jour) ; Température ambiante : 23-25°C ; a et b : temps moyen

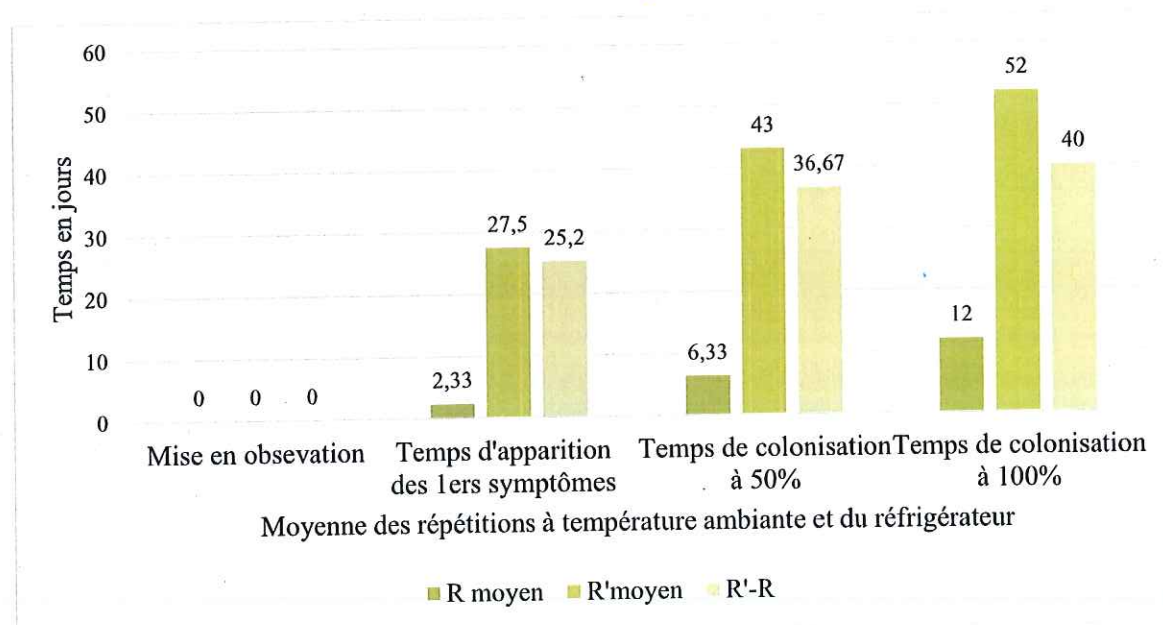


Fig.21. Temps moyen de colonisation du gâteau par la flore fongique à température ambiante et de réfrigérateur

Tableau V: Évaluation de la durée de colonisation du bâton de manioc par la mycoflore en fonction de la température de conservation

Paramètres	Type d'aliment : bâton de manioc (Z03) conservé à température ambiante				Type d'aliment : bâton de manioc (Z03) conservé au réfrigérateur				b-a
	R1	R2	R3	R moyen (a)	R'1	R'2	R'3	R moyen (b)	
Mise en observation (d1)	J0	J0	J0	0	J0	J0	J0	0	0
Temps d'apparition des premiers symptômes (d2) sur l'aliment	J8	J7	J6		-	-	-	Néant	-
Nombre de jours d'incubation (N=d2-d1)	8	7	6	7	-	-	-	Néant	-
Temps de colonisation de la surface d'aliment à 50% (d50)	J16	J18	J15		-	-	-	Néant	-
Nombre de jours (N=d50-d1)	16	18	15	16,33	-	-	-	Néant	-
Temps de colonisation à 100% (d100)	J23	J27	J25	25	-	-	-	Néant	-

NB : R(répétitions) et J (Jour) Température ambiante : 23-25°C ; a et b : temps moyen

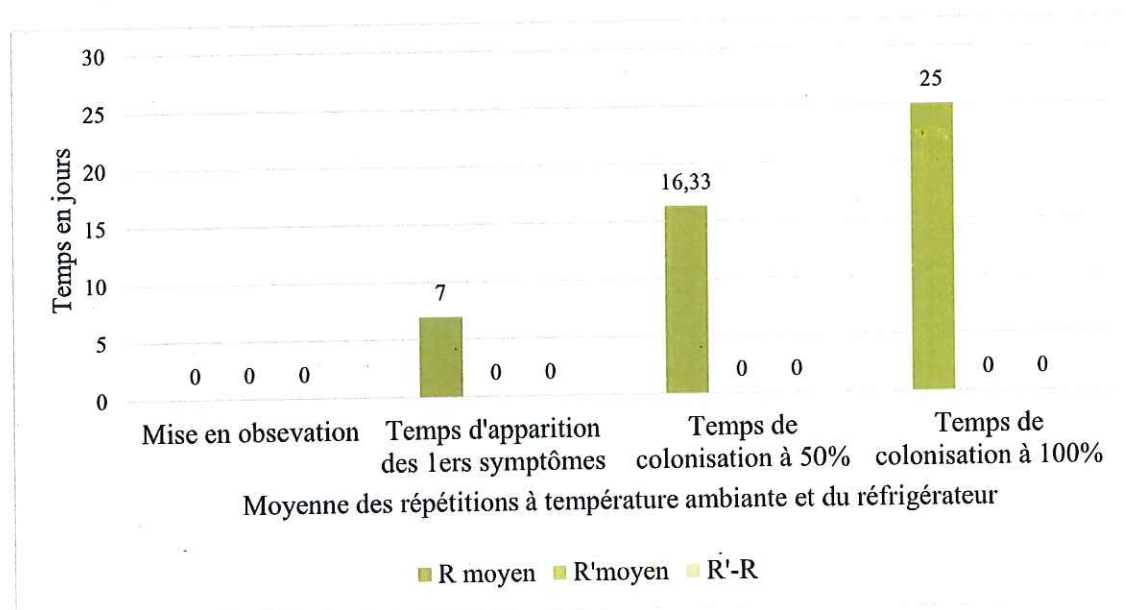


Fig.22. Temps de colonisation du bâton de manioc par la flore fongique à température ambiante et de réfrigérateur

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'influence de la température sur le processus de conservation des aliments (tableaux et histogrammes ci-dessus) montrent que pour une même date de mise en incubation du pain, des gâteaux et des bâtons de manioc (J0), 100% de ces aliments placés à température ambiante du laboratoire sont contaminés. Ce qui n'est pas le cas avec ceux placés à température du réfrigérateur (4-6°C) où seule une partie des produits pâtisseries (pain et gâteau) est contaminée soit 50% et 0% de bâton de manioc placé à température du réfrigérateur contaminé. Un autre aspect remarquable des résultats est la durée d'apparition des premiers symptômes de contamination des aliments et la durée de recouvrement. Le temps d'apparition des premiers signes de contamination est en moyenne de 3,66 jours pour le pain, 2,33 jours pour le gâteau et de 7 pour le bâton de manioc, placés à température ambiante et de 23,33 jours pour le pain, 27,5 jours pour le gâteau tous placés au réfrigérateur. Le bâton de manioc placé au réfrigérateur est resté sans signe de contamination jusqu'à la fin de l'expérimentation deux mois environ avec des différentiels de temps de conservation de 27 jours pour le pain, 26 jours pour le gâteau et néant pour le bâton.

Tableau VI: Evaluation du temps (en jours) de colonisation du milieu de cultures MEA par les contaminants fongiques en fonction de la température (i et ii) de conservation

Paramètres	Milieu de culture MEA conservé à température ambiante ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) (i)		Temp moyen (T1 en jours) de colonisation du milieu MEA en R1, R2 et R3		Temp moyen (T2 en jours) de colonisation du milieu MEA en R1, R2 et R3		Milieu de culture MEA conservé au réfrigérateur (4°C à 8°C) (ii)		Différentiel de temps (en jours) de conservation en plus (réfrigérateur et T ambiante (T2-T1))	
	R1 (Myne 3 boites)	R2 (Myne 3 boites)	R3 (Myne 3 boites)	R1 (Myne 3 boites)	R2 (Myne 3 boites)	R3 (Myne 3 boites)	R1 (Myne 3 boites)	R2 (Myne 3 boites)	R3 (Myne 3 boites)	
Mise en observation (d1) des boîtes de pétri contenant le milieu de culture MEA	J0	J0	J0	0	J0	J0	J0	J0	J0	0
Temps (en jours) d'apparition des premiers symptômes (d2)	7,33	10,33	4,66	7,44	19,33	14,33	22,33	18,33	10,92	
Nombre de jours d'incubation (N1=d2-d1)	7,33	10,33	4,66	7,44	19,33	14,33	22,33	18,33	10,92	
Nombre de jours pour la colonisation de la moitié (50%=d50) de la surface du milieu de culture (i)	11,33	15,33	8,66	11,44	37,33	28,33	36,33	33,99	22,55	
Nombre réel de jours pour la d50 (N2=d50-d2)	4	5	4	4,33	18	14	14	15,33	11	
Nombre de jours pour la colonisation de la totalité (100%=d100) de la surface du milieu de culture (i)	19,33	25,33	14,66	19,44	53,66	49,66	63,33	55,55	35,11	
Nombre réel de jours pour la d100 (N3=d100-d2)	12	15	10	12,33	34,33	35,33	41	36,88	24,55	

i : la surface du milieu de culture est la surface intérieure d'une boîte de pétri de 9 cm de diamètre

R1, R2, R3 et R'1, R'2, R'3 représentent la moyenne des 3 boîtes

Les résultats sur l'évaluation du temps de colonisation du milieu de culture MEA par les contaminants fongiques en fonction de la température de conservation montrent que pour un même temps de mise en observation J0, le temps moyen d'apparition des premiers symptômes est de 7,44 jours pour le milieu de culture MEA conservé à température ambiante et 18,33 jours pour le milieu de culture MEA conservé au réfrigérateur soit une différence de 10,92 jours en moyenne entre les deux types de conservation. A 50% de colonisation du milieu de culture, le temps moyen de colonisation à température ambiante est 11,44 jours pour un nombre réel moyen de jours égal à 4,33 et de 33,99 jours de moyenne au réfrigérateur pour un nombre réel moyen de 15,33, soit une différence de 22,55 jours. A 100% de colonisation du milieu de culture, le temps de colonisation à température ambiante est de 12,33 jours pour un nombre réel moyen de jours égal à 12,33 et de 55,55 jours, soit une différence de 35,11 jours de moyenne au réfrigérateur pour un nombre réel moyen de jours 36,88.

III.2. Discussion

Le travail sur l'identification des contaminants fongiques qui se développent sur quelques aliments couramment consommés placés à températures ambiante et au réfrigérateur a permis d'identifier trois genres à savoir *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Trichoderma* à température ambiante et un seul genre (*Aspergillus*) à température de réfrigérateur. Ces résultats sont en conformité avec ceux des travaux menés par Phohl-leswkowicz (1990) portant sur la répartition des genres de moisissures en fonction du type d'aliment. Ces résultats témoignent le caractère mésophile de la plupart des moisissures dont l'intervalle de température pour un développement et une croissance optimale se situe entre 15 et 25°C, température correspondante à la température ambiante. Les travaux menés par Bensoussan et al. (2007) vont un peu plus loin en donnant la plage de développement optimal de plusieurs espèces du genre *Apergillus* pour des températures moyennes égales ou supérieures à 30°C et sont en conformité avec les résultats obtenus dans ce présent travail. La non contamination des bâtons de manioc par des moisissures deux mois après leur mise en observation à température de réfrigérateur pourrait s'expliquer par la complexité de constitution du matériau « feuille » servant d'emballage de ces bâtons de manioc qui n'est facilement pas digéré par les enzymes de ces moisissures aux températures du réfrigérateur (4-8°C). Les différences observées au niveau du temps d'apparition des premiers signes de contamination et même de la durée de recouvrement de ces moisissures chez le pain et le gâteau à température ambiante et de réfrigérateur pourraient s'expliquer par la consistance, la teneur en eau et en éléments nutritifs de chacun de ces aliments. Ainsi, le gâteau de consistance plus souple (teneur en eau plus élevée qui est un ingrédient indispensable pour la

croissance du mycélium), au goût plus sucré (contient plus de glucides très appréciés par les champignons en général) a eu un temps moyen d'apparition des premiers signes de contamination égal à 2,33 jours et de recouvrement total de 12 jours plus court que le pain dont ce temps moyen est de 3,66 jours. Les différences de temps d'apparition et de recouvrement complet observées à la fois entre les différents échantillons de pain d'une part et les échantillons de gâteau d'autre part, pourraient s'expliquer par les types de pain (consistance, teneur en eau et éléments nutritifs) qui dépendent des recettes de chaque fabricant (les pains étant été achetés dans des boulangeries différentes et pareil pour les gâteaux). A température ambiante, nous avons eu un temps moyen de colonisation, ce qui n'est pas le cas à température de réfrigérateur où la plupart des répétitions ne présentent pas de contamination. L'absence ou la moins colonisation des contaminants fongiques sur la plupart des aliments conservés au réfrigérateur pourrait s'expliquer par l'action des basses températures (froid) qui ralentissent le métabolisme de ces contaminants fongiques.

Le temps moyen d'apparition des premiers symptômes de contamination du milieu de culture MEA conservé à température du réfrigérateur (4-8°C) est de 18,33 jours, soit une différence d'environ 11 jours par rapport au temps indiqué dans la littérature (dans www.biokar-diagnostics.com / gélose à extrait de malt.fr). Cette différence pourrait s'expliquer au non contrôle des conditions d'environnement du laboratoire au moment des manipulations.

Le pourcentage d'apparition des moisissures du genre *Aspergillus* sur les aliments et le milieu de culture MEA est le plus important par rapport aux autres genres (*Rhizopus* et *Trichoderma*) ; par ailleurs, le genre *Aspergillus* est le seul à contaminer les aliments et le milieu de culture MEA dans les deux conditions de température de conservation (ambiante et de réfrigération). Ce résultat démontre le caractère ubiquitaire des moisissures du genre *Aspergillus* qui ont des capacités à vivre et à se développer à des conditions de climats très variés.

CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1. Conclusion

Il a été question dans la présente étude d'identification des moisissures qui contaminent quelques aliments couramment consommés à l'instar du pain, des gâteaux et des bâtons de manioc et d'évaluer l'influence des différences de température sur la conservation de ces aliments. Au terme de ce travail, l'identification a révélé 3 genres de moisissures : *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Trichoderma* se développant à température ambiante et un seul, *Aspergillus* poussant à température de réfrigération. Deux genres poussant spontanément dans le milieu de culture MEA ont été aussi identifiés : *Ulocladium* sp. et *Aspergillus* sp. En ce qui concerne l'influence de variation de température, tous les trois aliments soit 100% ont été contaminés en moyenne 3,66 jours pour le pain, 2,33 jours pour le gâteau et 7 jours pour le bâton de manioc après leur mise en observation à température ambiante, contrairement à ceux placés au réfrigérateur avec un pourcentage de colonisation de 50%. Tout comme la durée d'apparition des premiers signes de colonisation, la durée de recouvrement total est aussi rapide à température ambiante, 11,33 jours pour le pain et 12 jours pour le gâteau qu'à température de réfrigération 68 jours pour le pain et à 52 jours pour le gâteau. Ces résultats montrent d'une façon globale, que les basses températures conditionnent non seulement la diversité des moisissures (genre de moisissures) se développant sur ces aliments et celles poussant spontanément sur le milieu de culture MEA mais ont aussi un impact remarquable sur la vitesse de colonisation et de recouvrement de ces aliments et de ce milieu de culture. Les basses températures de réfrigération n'empêchent donc pas un développement réel des moisissures sur les aliments et milieu de culture MEA mais constituent tout de même un moyen de conservation rassurant pour le premier mois pour ces aliments.

IV.2. Perspectives

Il serait intéressant de :

- d'étudier les mycotoxines pouvant découler de la contamination de ces aliments à des températures ambiante et du réfrigérateur et déterminer l'intervalle de temps avant leur production ;
- étendre cette recherche sur une gamme de denrées alimentaires plus élargie ;

- faire ce travail pendant un intervalle de temps assez conséquent pouvant s'étendre à quelques semaines de plus pour une observation prolongée des aliments placés à température de réfrigération ;
- élargir le test de prévention des moisissures spontanées à d'autres milieux de culture ;
- faire ces mêmes tests en incluant des produits antibiotiques et des antifongiques dans les milieux de culture dont MEA pour réduire les contaminants fongiques et bactériens spontanés sur ce milieu de culture ;
- faire des tests de la viabilité des milieux de culture testés au maximum de leur temps de conservation, en comparaison avec les mêmes milieux fraîchement préparés ;
- inclure les antibiotiques dans le milieu de culture MEA à des doses à déterminer pour limiter les contaminants fongiques.

ANNEXES

Annexe 1: Fiche d'observation des symptômes de contaminations sur les aliments

Paramètres observés	<u>Type d'aliment : pain (Z01)</u> conservé à température ambiante.			<u>Type d'aliment : pain (Z01)</u> conservé au réfrigérateur.		
	Répétitions			Répétitions		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Date de mise en observation (d1)	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015
Date d'apparition des premiers Symptômes sur aliment	27/07/2015	28/07/2015	28/07/2015	20/09/2015		
Nombre de jours (N=d2-d1)	3	4	4	27		
Date de couverture à 50% (d50)	30/08/2015	01/08/2015	02/08/2015	15/10/2015		
Nombre de jours (N=d50-d1)	6	8	9	53		
Date de couverture à 100% (d100)	02/08/2015	04/08/2015	07/08/2015	30/10/2015		
Nombre de jours (N=d100-d1)	9	11	14	68		

Paramètres observés	<u>Type d'aliment : gâteau (Z02)</u> conservé à température ambiante.			<u>Type d'aliment : gâteau (Z02)</u> conservé au réfrigérateur.		
	Répétitions			Répétitions		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Date de mise en observation (d1)	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015
Date d'apparition des premiers Symptômes sur aliment	26/07/2015	26/07/2015	27/07/2015	23/08/2015		20/09/2015
Nombre de jours (N=d2-d1)	2	2	3	29		26
Date de couverture à 50% (d50)	30/07/2015	01/08/2015	30/07/2015	07/09/2015		05/07/2015
Nombre de jours (N=d50-d1)	6	7	6	44		42
Date de couverture à 100% (d100)	05/08/2015	06/08/2015	07/08/2015	17/09/2015		13/09/2015
Nombre de jours (N=d100-d1)	11	12	13	54		50

Paramètres observés	Type d'aliment : bâton de manioc (Z03) conservé à température ambiante. Répétitions			Type d'aliment : bâton de manioc (Z01) conservé au réfrigérateur. Répétitions		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Date de mise en observation (d1)	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015	24/07/2015
Date d'apparition des premiers Symptômes sur aliment	01/08 2015	31/07 2015	30/07 2015			
Nombre de jours (N=d2-d1)	8	7	6			
Date de couverture à 50% (d50)	10/08 2015	12/08 2015	09/08 2015			
Nombre de jours (N=d50-d1)	16	18	15			
Date de couverture à 100% (d100)	17/08 2015	21/08 2015	19/08 2015			
Nombre de jours (N=d100-d1)	23	27	25			