

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 غرداية
Université de Ghardaïa



Facultés des Sciences
Département de Biologie
Spécialité : Biochimie Appliquée

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Thème

Étude Microbiologique des Terfesses Algériennes (Région de Ghardaïa)

Réalisé par

Faiza BICHI

Manel Salsabil LAGRAB

Encadrante : Dr. Ahlem DAFRI

Membres du jury :

Dr Saïd BELGHIT

Université de Ghardaïa

Président

Dr Soumia HADDAD

Université de Ghardaïa

Examinatrice

Année universitaire : 2020/2021

Dédicace

Je dédie ce travail

À mes chers parents qui m'ont donnée une éducation digne, m'ont soutenue, encouragée et supportée pour continuer mes études.

À mes chères sœurs Tasmim et Anfel. Je vous souhaite plein de succès et de bonheur dans votre vie.

À tous ceux que j'aime et tous ceux qui m'ont aidée même par un mot.

Manel Salsabil

Dédicace

*Je dédie ce travail à
Mes très chers parents qui durant toute ma vie
et mes études n'ont épargné aucun effort pour
ma réussite. Qu'ils trouvent ici toute ma
gratitude et ma reconnaissance*

*Ma très chère grand-mère. Tes prières m'ont
été d'une grande aide pour mener à bien ma
vie*

*Mes chers sœurs, frères, oncles et tantes,
chacun en son nom et ma grande famille*

BICHI

*Ma dédicace va également à mes chères amies
intimes, Samia et Hanane qui m'ont soutenue
et encouragée.*

*Toute personne qui m'a aimée et m'a soutenue
avec un mot*

Faiza

Remerciement

Après rendre grâce à Dieu tout puissant et miséricordieux.

Tout d'abord, nous remercions notre encadrante Dr. Ahlem DAFRI, que nous avons eu l'honneur d'avoir comme directrice de ce travail. Les mots de remerciement ne suffisent pas pour exprimer une sincère gratitude de votre temps, de votre patience et votre soutien moral ininterrompu et le plus important vos précieux conseils.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Dr Saïd BELGHIT, pour la présidence du jury et d'avoir accepté de juger et évaluer ce travail.

Un grand merci également à Dr Soumia HADDAD pour avoir accepté de faire part du jury et d'examiner et enrichir le travail.

Nous remercions aussi vivement, tout le corps professionnel du laboratoire de contrôle de qualité et de la répression de la fraude de la wilaya de Ghardaïa, (plus connu sous le nom CACQE) à leur tête la directrice qui nous a ouvert les portes de l'établissement. Nous adressons un remerciement particulier à Mlle Hadjer BILARABI qui nous a assistées depuis le début et jusqu'à la fin du travail.

Nous remercions également les professionnels de l'ADE de la wilaya de Ghardaïa pour nous avoir soutenues soit par du matériel ou par leur expérience.

Nos remerciements vont aussi à Mr Hichem BENHAMMOUDA ingénieur de laboratoire, ainsi que toute personne, professionnels et enseignants, de l'université de Ghardaïa, pour toute aide et contribution.

Un grand remerciement à nos familles réciproques et nos amis pour leur soutien constant tout au long de ce travail.

Les mots de remerciement restent insuffisants. Merci à tous.

Résumé

Ce travail a été réalisé afin de satisfaire une curiosité scientifique portant sur la de vérification de la qualité microbiologique des terfesses considérées comme un plat délicieux de luxe.

L'analyse de la qualité microbiologique était basée sur la présence/absence ainsi que les taux des germes pathogènes parmi la flore totale étudiée. Cette étude a été effectuée sur cinq échantillons de terfesse chacun divisé en deux sous échantillons traités de deux différentes manières ; une première moitié gardée à l'état frais et une autre moitié à l'état cuit, notant que la dernière est la plus importante pour le consommateur local qui inclue cette denrée alimentaire dans plusieurs plats.

Les méthodes utilisées pour effectuer ces analyses microbiologiques étaient conformes aux protocoles du journal officiel algérien dédié à ces fins. Les manipulations ont été réalisées au niveau du laboratoire de Contrôle de Qualité et de la répression des fraudes de la Wilaya de Ghardaïa sur dix germes.

Les résultats ont montré la présence de quelques germes sans dépassement de la norme maximale de conformité, ainsi que pour certains échantillons, la présence de germes à norme zéro. Ces résultats vont outre la présence ou absence des germes, et ouvrent les portes à la discussion des méthodes de cuisson et de conservation des terfesses, afin d'éviter les éventuelles contaminations à risque pour la santé publique.

Mots clé : Terfesse, Analyse microbiologique ; Contrôle de qualité ; Germes pathogènes ; Aliments frais et cuits.

Abstract

This Work is carried out to verify the microbiological quality of desert truffles considered as a delicious and luxury dish.

The analysis of these truffles microbiological quality was based on the presence/absence of some pathogenic germs among the studied total flora. This research was held on five truffle samples, each divided on two subsamples treated differently; a half fresh and the other half cooked. Noting that the last one is considered as the most important to the consumer.

The methods used to make these microbiological analyses are conform to the protocols of the Algerian official journal. The work was realized in the laboratory of quality control and fraud repression of the Wilaya of Ghardaïa.

The results were positive for some germs without exceeding the maximum standard, as well as the presence, in some samples, of germs with standard zero. They also went beyond the presence or absence of germs, and lead to a discussion of methods of cooking and preserving meals with desert truffles, in order to avoid risky contamination for public health.

Key words: Desert truffles; Microbiological analysis; Control of quality; pathogenic germs; Fresh and cooked aliments.

ملخص

تقرر موضوع هاته الدراسة بدافع الفضول حول جودة الكما أو الترفاس الذي نقوم باستهلاكه خصوصا وأنه يعتبر من الأطعمة الشهية والأطباق الفاخرة.

تم تحليل الجودة الميكروبيولوجية على أساس وجود أو انعدام بعض الجراثيم المسببة للأمراض من بين اجمالي الكائنات الدقيقة التي تمت دراستها. حيث أجري البحث على خمس عينات من الترفاس، كل منها مقسم إلى نصفين أحدهما تمت دراسته طازجا والآخر مطهيا، إذ يعتبر هذا الأخير أكثر أهمية بالنسبة للمستهلك.

حيث أن التقنيات المستخدمة في إجراء هذه التحاليل الميكروبيولوجية كانت وفق معايير الجريدة الرسمية للدولة الجزائرية، وأجريت الأبحاث على مستوى معمل مراقبة الجودة وقمع الغش في ولاية غرداية.

أظهرت النتائج وجود بعض الجراثيم دون تجاوز الحد المعياري الأقصى، كما ظهرت في بعض العينات جراثيم لا تخضع لمعايير حيث أن مجرد وجودها يحول دون صلاحية المادة المدروسة للاستهلاك. كما تجاوزت هذه النتائج حدود التحقق من وجود الجراثيم أو عدمه بفتح الأفاق على مناقشة طرق الطهي والاحتفاظ بهذه المادة الغذائية ذات المنفعة، من أجل تجنب المايكروبات المحتملة والتي تشكل خطراً على الصحة العامة.

الكلمات المفتاحية: ترفاس، التحاليل الميكروبيولوجية، الجودة، الكائنات المجهرية الممرضة، الأطعمة الطازجة والمطهية.

Table des matières

<i>Dédicace</i>	III
<i>Dédicace</i>	IV
Remerciement.....	V
Résumé	VII
Abstract	VII
ملخص.....	VIII
Table des matières	IX
Index des figures	XII
Index des tableaux	XIII
Table des annexes.....	XIII
Liste des abréviations	XIV
Introduction	3
Chapitre I : Revue bibliographique	7
I. Les terfesses	7
1. Historique	7
2. Présentation et propriétés morpho-anatomiques des terfesses	8
2.1 Présentation des terfesses.....	8
2.2 Propriétés morpho-anatomiques	8
3. Taxonomie.....	11
4. Cycle biologique	11
4.1 La germination	13
4.2 La formation de l'ascocarpe	13
5. Affinité écologiques des terfesses	13
6. Aire de répartition	15
7. Les terfesses en Algérie.....	16
II. La flore pathogène et d'altération dans les aliments	16

1. Flore aérobie mésophile totale	17
2. Levures et Moisissures	17
2.1 Levures	17
2.2 Moisissures.....	17
3. Coliformes.....	20
3.1 Coliformes totaux.....	20
3.2 Coliformes fécaux ou thermotolérants	20
3.3 <i>Escherichia coli</i>	20
4. Entérocoques et Streptocoques.....	21
5. Anaérobies Sulfite-Réducteurs	21
6. Staphylocoques.....	21
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
8. Salmonelles	22
Chapitre II : Étude Expérimentale	26
I. Sur terrain : Zone et méthodes d'échantillonnage	26
1. Présentation générale de la région.....	26
2. Exploration de la zone.....	26
3. Méthode d'échantillonnage	26
II. Au laboratoire : Analyses microbiologiques des échantillons.....	27
2. Prise d'essai et dilution	29
2.1 Prise d'essai.....	29
2.2 Préparation des dilutions	29
3. Analyses microbiologiques	30
3.1 Flore aérobie mésophile totale	30
3.2 Levures et Moisissures	32
3.3 Coliformes totaux, fécaux et <i>E. coli</i>	32
3.4 Entérocoques et Streptocoques.....	35

3.5 Anaérobies Sulfito-Réducteurs (ASR)	37
3.6 Staphylocoques à coagulase positive	38
3.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
3.8 Salmonella.....	42
4. Méthode d'interprétation des résultats	43
Chapitre III : Résultats et Discussion	48
I. résultats de l'exploration du terrain	48
1. Physionomie générale de la zone d'échantillonnage.....	48
2. Partenaires de la symbiose à terfesse dans la région d'échantillonnage	50
II. Qualité microbiologique des échantillons	52
1. Flore aérobie mésophile totale	52
2. Levures et Moisissures	52
3. Coliformes totaux, fécaux et <i>E. coli</i>	54
4. Entérocoques et Streptocoques.....	55
5. Anaérobies Sulfito-Réducteurs	56
7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
8. Salmonelles	57
Conclusion et perspectives	62
Références bibliographiques	64
Annexes	70
Annexe 1. Protocole de recherche d' <i>Escherichia coli</i>	70
Annexe 2. Isolement et identification des salmonelles	70

Index des figures

Fig. 1 Morpho-anatomie générale des terfesses	9
Fig. 2 Position taxonomique et classification des terfesses	12
Fig. 3 Quelques espèces de terfesses.....	12
Fig. 4 Cycle biologique des terfesses	14
Fig. 5 Aspect macro et microscopique des germes étudiés.....	18
Fig. 6 Échantillonnage des terfesses	27
Fig. 7 Préparation des échantillons.....	28
Fig. 8 Préparation de la prise d'essai.....	29
Fig. 9 Préparation des dilutions décimales.....	30
Fig. 10 Méthode de recherche des Germes aérobies, Levures et Moisissures.....	30
Fig. 11 Méthode de recherche des Coliformes totaux et fécaux	33
Fig. 12 Méthode de recherche des Entérocoques et Streptocoques	35
Fig. 13 Méthode de recherche des Anaérobies Sulfite-Réducteurs	37
Fig. 14 Méthode de recherche des staphylocoques à coagulase positive.....	38
Fig. 15 Méthode de recherche des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Fig. 16 Méthode de recherche des salmonelles.....	42
Fig. 17 Méthodes d'interprétation des résultats	43
Fig. 18 Zone d'échantillonnage.....	48
Fig. 19 Diversité floristique de la zone d'échantillonnage.....	49
Fig. 20 Les échantillons de terfesse récoltés	50
Fig. 21 Plantes hôtes des terfesses dans la zone d'étude.....	50
Fig. 22 Résultat des Germes aérobies sur milieu GN.....	52
Fig. 23 Résultat des Levures et Moisissures	54
Fig. 24 Résultat de la recherche des Coliformes totaux et fécaux	54
Fig. 25 Résultats de la recherche des Streptocoques.....	55
Fig. 26 Résultats des ASR sur milieu VF.....	56
Fig. 27 Résultats des Staphylocoques	56
Fig. 28 Colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57

Index des tableaux

Tableau 1. Les normes officielles utilisées dans l'interprétation des résultats	45
Tableau 2. Résultats de l'étude de la qualité microbiologique des échantillons de terfesses étudiés.....	53

Table des annexes

Annexe 1. Protocole de recherche d'Escherichia coli	70
Annexe 2. Isolement et identification des salmonelles	70

Liste des abréviations

ASR	Anaérobies Sulfito-Réducteurs
BEA	<i>Bile Esculine et Azoture de Sodium</i>
BHIB	Brain Heart Infusion BD
BP	Baird-Parker
D/C	Double Concentration
S/C	Simple Concentration
EVA	<i>Ethyl-Violet-Azide</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	gramme
GN	Gélose nutritive
h	Heure
HCl	Acide chlorhydrique
IND	Indénombrable
ml	Millilitre
NPP	Le Nombre le Plus Probable
OGA	Oxytétracycline Glucose Agar
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
RVS	Rappaport-Vassiliadis Soja
s	Seconde
SM	Solution Mère
TSE	Tryptone Sel Eau
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
VF	Viande Foie
XLD	Xylose lysine deoxycholate agar
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADE	Algériennes des eaux
CACQE	Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage.
H ₂ O	Eau

Introduction

Introduction

Truffes des sables, Terfesses, Kamma, Banat Al-Raad ou Bint al Ard, sont toutes des appellations connues dans différentes régions du monde et désignant un large groupe diversifié de champignons macroscopiques comestibles. Ce sont des champignons hypogés classés parmi les Ascomycètes dans l'ordre Pézizales. Ils sont mycorhiziens et vivent en symbiose avec les plantes herbacées de la famille Cistacées. Elles possèdent un intérêt économique et médicinal connu depuis l'aube des temps.

La plupart des chercheurs s'intéressent depuis longtemps à l'étude de leur taxonomie, leurs caractéristiques biochimiques et physicochimiques, leur bio-écologie, leurs effets thérapeutiques et récemment encore à leur production biotechnologique destinée à la vente.

Outre tous ces axes de recherche sur ces champignons, l'objectif principal du présent travail est d'étudier la qualité microbiologique des terfesses tant désirées par le consommateur et qui se vendent dans nos marchés sans control. Ce travail vise ainsi à répondre à la question suivante : «Les terfesses, en l'occurrence celles de la région de Ghardaïa, sont-elles microbiologiquement sans effet néfaste pour le consommateur ?». En plus de répondre à cette principale problématique, le travail vise également à vérifier, ne serait-ce que préliminairement, les conditions de cuisson exigées afin d'éliminer toute source de danger venant de la consommation de ces champignons dans le cas où les ascocarpes à l'état frais s'avèrent contaminés par quelques espèces fongiques ou bactériennes. Afin d'aboutir à ces fins, le travail a été réalisé au laboratoire du CACQE à El-Atteuf, wilaya de Ghardaïa.

Ce manuscrit qui en est issu, est divisé en trois parties essentielles :

- Chapitre I : consacré à l'étude bibliographique des terfesses et qui passe en revue historique, présentation et autres généralités du champignon étudié.
- Chapitre II : exposant les sites d'étude et la méthodologie du travail utilisée dans l'analyse microbiologique effectuée pour réaliser cette étude.
- Chapitre III : présentant les résultats obtenus et leur discussion.

Chapitre I
Revue Bibliographique

Chapitre I : Revue bibliographique

I. Les terfesses

1. Historique

La présence des truffes est connue depuis l'Antiquité (environ 3500 avant J.-C.), par les Grecs et les Romains, comme un produit de la nature, sans intervention humaine. Théophraste (372-287 av. J.-C.), qui croyait que les truffes étaient le produit de pluies d'automne orageuses, accompagnées de tonnerre et d'éclairs, considérait que la truffe était le produit de la fusion de trois éléments : la foudre, l'eau et la terre (Chatin, 1892a).

Le Moyen Âge, qui marque l'apogée de la prospérité des civilisations arabo-musulmanes, nous renseigne sur les légendes de la terfesse à travers l'héritage culturel laissé par les savants arabes et musulmans de l'époque.

Outre l'utilisation culinaire connue de la terfesse, Avicenne, écrivain, médecin et scientifique perse du Moyen Âge, mentionne sa valeur médicinale contre la paralysie, l'apoplexie et les maladies des yeux (Al-kazwini, 2000 ; In Dafri 2017). Au VII^{ème} siècle (600 après J.-C.), le savant arabe musulman Al-kazwini a décrit la terfesse comme une plante souterraine qui pousse comme des joyaux dans les profondeurs du sol sans intervention humaine.

Les Arabes prétendaient que certaines espèces vénéneuses poussaient à l'ombre des oliviers. Loin de toute logique, les légendes arabes racontaient également que les terfesses non récoltées étaient transformées en serpents par les pluies d'été (Al-kazwini, 2000)

Les premiers travaux importants sur les truffes ont été réalisés au XVI^{ème} siècle. En effet, en 1554, deux espèces de truffes comestibles ont été mentionnées pour la première fois. En 1583, les truffes ont été reconnues comme des champignons pour la première fois (Chatin, 1982a).

Vers la fin du XVII^{ème} siècle, l'Anglais John Ray a décrit 184 espèces de champignons dans deux ouvrages : « *Historia plantarum* » (1686) et « *Synopsis methodica* » (1690), et a identifié de véritables espèces de "graines" dans la truffe (Murat-Furminieux, 2004).

Micheli en 1729, était premier à dessiner les spores et à donner le mot *Tuber* dans son livre « *Nova plantarum genera* ». En 1788, Vittorio Pico, médecin de Turin, fournit les bases de la nomenclature des Tuberales dans un ouvrage intitulé « *Melethemata inauguralia* ».

Au XIXe siècle, Vittadini (1831) a publié la « *Monographia Tuber acearum* », dans laquelle il a réorganisé la systématique des truffes. Il a été le premier à distinguer deux groupes de tubercules sur la base de leurs caractéristiques externes : une chair relativement tendre, un arôme agréable et une bonne qualité gustative ; une chair dure, un arôme désagréable et une qualité gustative médiocre (Murat-Furminieux, 2004).

En 1862, les frères Tulasne ont publié un livre sur les champignons hypogés, « *Funghi hypûgaei* », dans lequel ils présentent la première classification scientifique mais aussi pratique des truffes. Ils ont utilisé pour la première fois des critères microscopiques (Murat-Furminieux, 2004).

Après 1892, Chatin (1893, 1894a ; b ; 1895a ; b ; c ; 1896a ; b ; 1897) et plusieurs autres chercheurs (Patouillard, 1894a ; b ; 1899 ; Maire, 1906) ont décrit plusieurs nouvelles espèces, dont certains noms se sont avérés par la suite synonymes d'espèces précédemment décrites (Loizides *et al.*, 2011 ; Kovács et Trappe, 2014). Les recherches se sont poursuivies, les méthodes d'étude ont évolué, et ainsi l'histoire des truffes est devenue de plus en plus taxonomique (Dafri, 2017).

2. Présentation et propriétés morpho-anatomiques des truffes

2.1 Présentation des truffes

Truffes ; truffes des sables ou truffes du désert sont des tubercules souterrains très appréciés. Ce sont des champignons hypogés appartenant aux ascomycètes et vivant en symbiose avec des plantes-hôtes de différentes familles végétales. Elles se développent à une profondeur de 5 à 10 cm sur sols sablonneux, d'où leur appellation « Truffes des sables ». Elles vivent plus particulièrement dans des régions arides ou semi-arides, ce qui leur a dû le nom de « Truffes du désert ». Cependant, elles peuvent aussi proliférer sous des climats humides ou subhumides chauds comme au niveau des dunes littorales du Nord-Est algérien. Selon la région et la nature du terrain, les truffes acquièrent un aspect arrondi ou irrégulier, différentes couleurs et diverses caractéristiques morpho-anatomiques (Morte *et al.*, 2009 ; Navaro-Rodena *et al.*, 2011 ; Bradai *et al.*, 2014 ; Dafri et Beddiar, 2017a ; Liu *et al.*, 2018).

2.2 Propriétés morpho-anatomiques

Les ascocarpes sont constitués d'une gléba (chair) contenant de petits sacs appelés asques, qui contiennent de nombreuses spores. La chair est protégée par une gaine rigide nommée péridium

(Gutiérrez *et al.*, 2003 ; Kagan-Zur et Roth-Bejerano, 2008 ; Morte *et al.*, 2009 ; Navaro-Rodena *et al.*, 2011 ; Bradai *et al.*, 2014 ; Kovacs et Trappe, 2014 ; Dafri et Beddiar, 2017a ; Liu *et al.*, 2018) (Fig. 1).

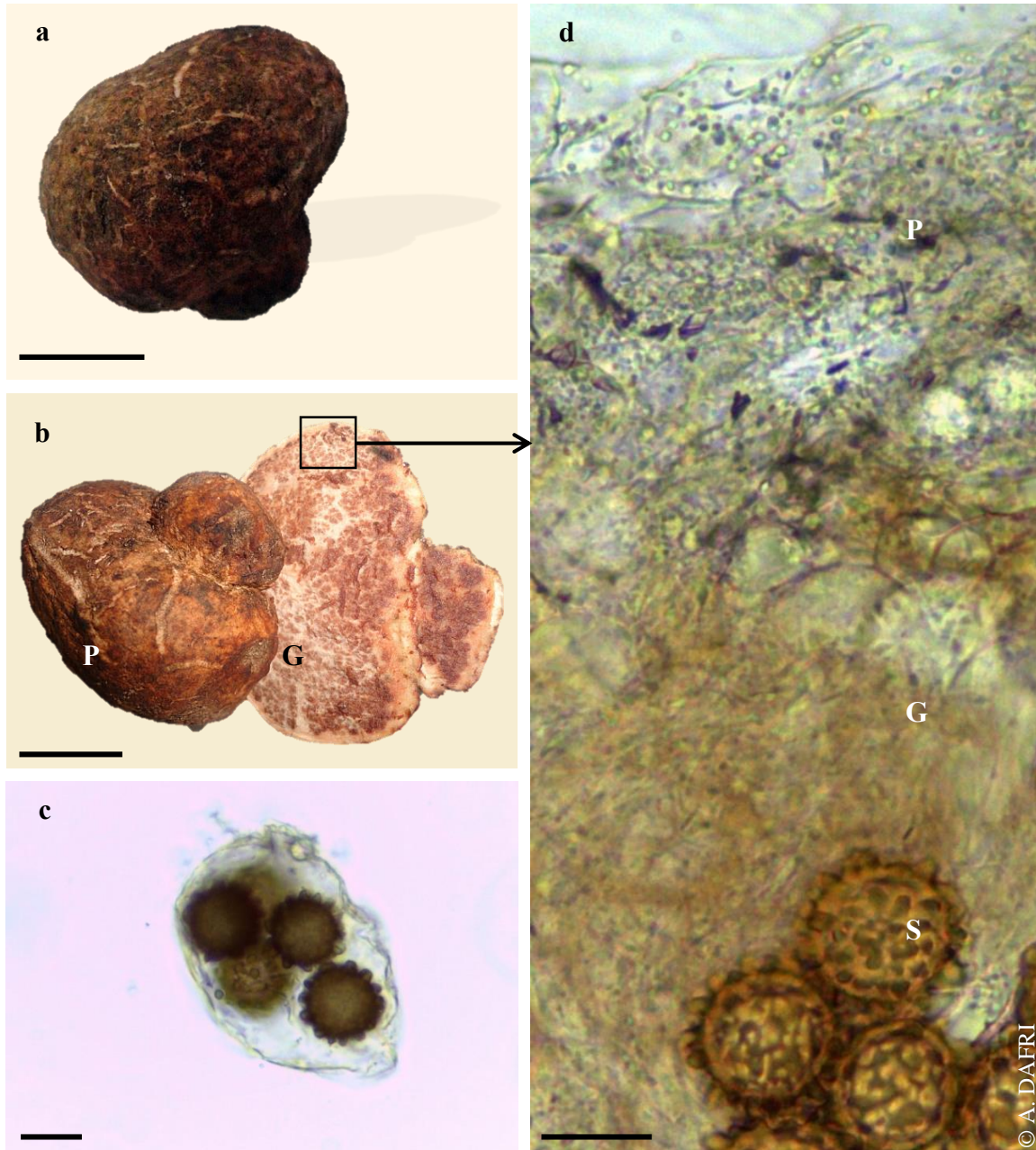


Fig. 1 Morpho-anatomie générale des terfesses

La figure décrit la morpho-anatomie générale de *Terfezia arenaria* récoltée au printemps 2012 des dunes littorales du Nord-Est algérien (Dafri, 2017). **a** : ascocarpe, **b** : coupe transversale au niveau d'un ascocarpe montrant à l'extérieur le périodum (P) et à l'intérieur la glèbe (G), **c** : asque renfermant des ascospores, **d** : coupe fine de l'ascome observée en microscope photonique montrant de l'extérieur vers l'intérieur : le périodum, la glèbe et les ascospores. Échelle barre [a, b] = 1 cm, [c, d] = 20 μ m.

Selon plusieurs auteurs, la clé de la classification des truffes repose essentiellement sur les caractéristiques du périidium (aspect ; couleur) et sur celles des spores (nombre ; forme ; ornementation) ; et d'autres caractères complémentaires (forme ou taille des fructifications, coloration de la gléba ; disposition des nervures, odeur, etc.) (Chevalier, 1986)

2.2.1 L'ascocarpe

L'ascocarpe est le nom scientifique du corps de la truffe elle-même. Chez les terfesses, ces fructifications ou ascocarpes ont une forme variable : sphérique, ovoïde, piriforme ou ellipsoïdale, mais toujours bosselée et irrégulière. Leur poids est également variable, allant de 1 g à plusieurs centaines de grammes pour les plus gros (Sawaya *et al.*, 1985 ; Benicivenga et Urbani, 1996 ; Jamali et Banihashemi, 2012)

2.2.2 Le périidium

Le périidium est une structure résistante qui protège la gléba interne. Il est constitué d'hyphes au cytoplasme dégénéré et aux parois épaisses et mélanisées. À la surface du périidium, il est également possible d'observer la formation de revêtements calcaires d'environ 100 µm, qui sont formés par la précipitation de carbonates de calcium due aux sécrétions acides des filaments mycéliens. Ces filaments jouent un rôle actif dans les échanges nutritionnels entre le champignon et le sol (Callot, 1999 ; Ricard, 2003). Il peut avoir différentes structures, consistances et couleurs : blanc, jaune, brun clair ou foncé, voir brun noirâtre (Alsheikh, 1994; Callot, 1999 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Ricard, 2003)

2.2.3 La Gléba

Les hyphes internes de l'ascocarpe forment la chair ou gleba, qui est constituée de poches fertiles entourées de veines stériles plus ou moins visibles selon leur épaisseur (Moreno *et al.*, 2000 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Agnello et Kaounas, 2011). Tout au long de sa maturité, la glèbe acquiert une texture spongieuse ou ferme et une couleur variable allant du blanc au jaune, brun clair ou foncé, selon l'espèce et le stade de développement (Moreno *et al.*, 2000 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Agnello et Kaounas, 2011).

2.2.4 Les asques

Les asques sont les structures caractéristiques des ascomycètes. Il s'agit d'une sorte de poche de spores, de taille microscopique. Elles sont souvent hyalines, parfois pédicellées, de forme

variable : subglobulaire, globulaire ou ovoïde (Moreno *et al.*, 2000 ; Khabar *et al.*, 2001 ; Lamb et Kaounas, 2011).

2.2.5 Les ascospores

Les ascospores sont les cellules reproductrices des ascomycètes. Elles permettent à ces champignons de se multiplier et de se propager. Chez les terfesses, les ascospores sont regroupées par deux, quatre, six ou, pour la plupart des espèces, huit ascospores par asque. Leur forme est globulaire, subglobulaire ou elliptique, et leur couleur hyaline, jaunâtre ou rouge. Leur surface est lisse ou ornée de verrues ou d'épines tronquées ou arrondies (Chatin, 1896a ; Laessle et Hansen, 2007).

3. Taxonomie

Comme pour tous les autres êtres vivants, la classification des terfesses était basée sur les caractéristiques morphologiques, macro et microscopiques avant l'apparition des méthodes moléculaires.

Selon la taxonomie actuelle, les terfesses appartiennent au règne des champignons ou « Fungi ». Elles sont placées dans la classe des Ascomycotina et dans l'ordre Pezizales (Fig. 2). Elles sont divisées en plusieurs familles, chacune comportant différents genres parmi les suivants : *Terfezia*, *Tirmania*, *Picoa*, *Carbomyces*, *Elderia*, *Eremiomyces*, *Kalaharituber*, *Mattiolomyces*, *Mycoclelandia*, *Stouffera* *Ulurua*.

En notant que les espèces des trois premiers genres peuvent être considérées comme les mieux connues au niveau mondial, nous citons à titre d'exemple : *Terfezia arenaria*, *Terfezia boudieri*, *terfezia claveryi*, *Terfezia leptoderma*, *Tirmania nivea*, *Tirmania pinoyi*, *Picoa juniperi*, *Picoa lefebvrei*, *Picoa carthusiana*... (Fig. 3) (Kagan-Zur et Roth-Bejerano, 2008 ; Morte *et al.*, 2009 ; Navaro-Rodenas *et al.*, 2011 ; Bradai *et al.*, 2014 ; Kovacs et Trappe, 2014 ; Dafri et Beddiar, 2017a ; Dafri et Beddiar, 2017b ; Liu *et al.*, 2018).

4. Cycle biologique

Selon Roth-Bejerano *et al.*, 2004 et Kagan-Zur *et al.*, 2008, le cycle de reproduction des terfesses peut se résumer dans les étapes suivantes :

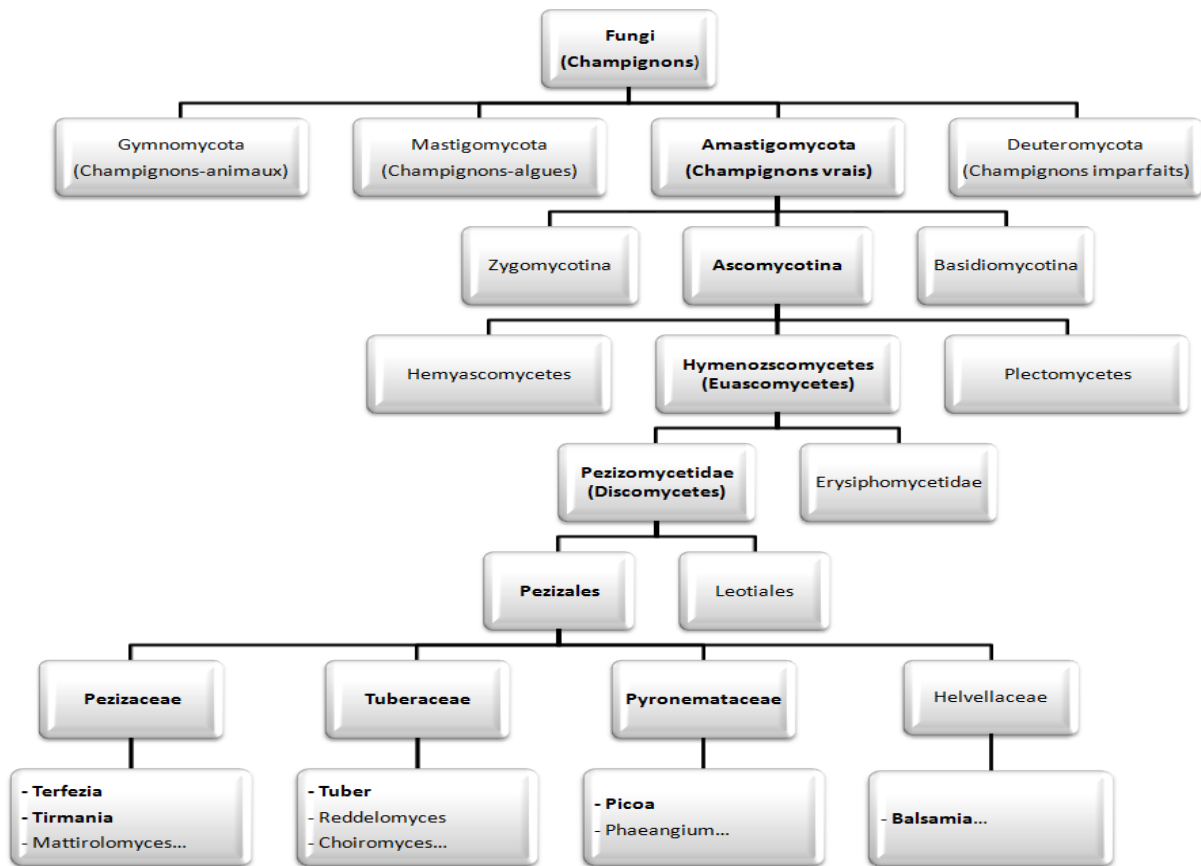


Fig. 2 Position taxonomique et classification des terfesses

(Boucher, 1999)

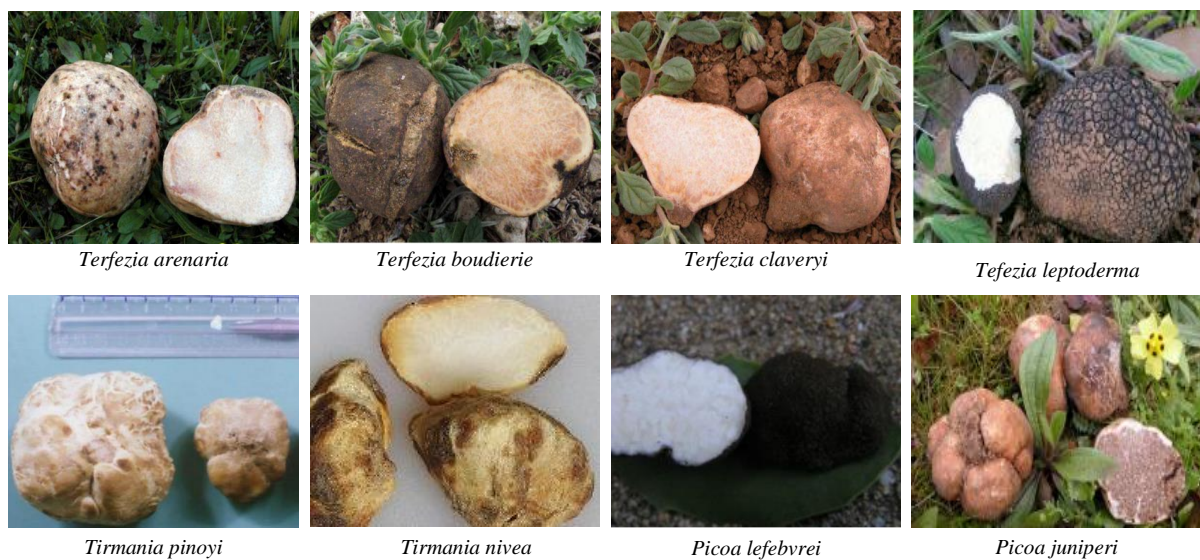


Fig. 3 Quelques espèces de terfesses

4.1 La germination

La germination serait la première étape du cycle de vie des terfesses si nous partons d'une spore mature (Fig. 4). Au sol, près des racines des plantes hôtes, et dans des conditions de température et de pluie (automnales) bien adéquates, la spore mature expulse un tube germinatif qui s'allonge en un mycélium primaire homocaryotique pour se développer. Le mycélium peut entreprendre deux voies différentes (Roth-Bejerano *et al.*, 2004 ; Kagan-Zur *et al.*, 2008) :

4.1.1 La voie sexuée

La fusion de deux mycéliums homocaryotiques (n) qui donne un mycélium hétérocaryotique ($n + n$), c'est ce qu'on appelle « la plasmogamie » qui donne naissance à un mycélium secondaire hétérocaryotique. Ce dernier s'unit aux racines des plantes hôtes et induit la formation de mycorhizes, puis de primordium.

4.1.2 La voie végétative

Avant plasmogamie, le mycélium homocaryotique passe directement à la mycorhization. Il se développe et forme un réseau d'hyphe.

4.2 La formation de l'ascocarpe

Les hyphes binucléés hétérocaryotiques des racines mycorhiziennes s'enroulent pour former un petit corps appelé « primordium ». Dans les bonnes conditions, le développement de ce primordium conduit à la fructification de la terfesse mature avec tous ses composants (du périidium qui l'entoure et la protège, à la gléba qui contient les asques qui regroupent les ascospores).

À la fin du cycle, les terfesses restées dans le sol dégénèrent et libèrent leur contenu en spores. Les spores sont dispersées par divers moyens, tels que le vent, l'eau et les animaux. Dès que les conditions sont à nouveau favorables, les spores germent et le cycle recommence

5. Affinité écologiques des terfesses

Les truffes des sables n'occupent pas une région définie ; elles se trouvent sur tous les continents. Cette répartition dépend de plusieurs facteurs écologiques essentiels : le sol, le climat et les plantes hôtes, qui varient d'une région à l'autre. En effet, les sols dans lesquels elles poussent sont divers et peuvent être : sablonneux, calcaires, graveleux-gypseux ou sablo-

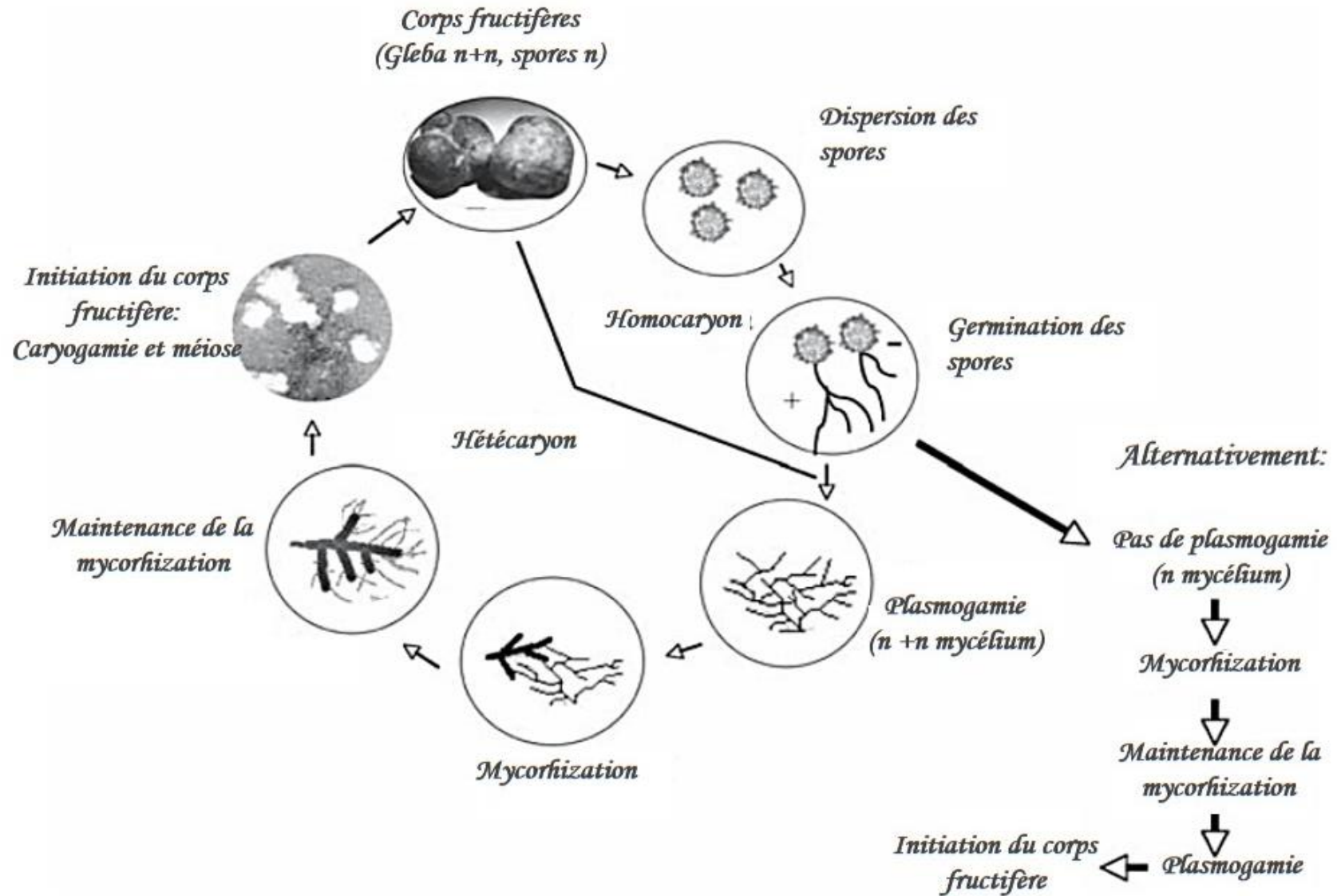


Fig. 4 Cycle biologique des truffes

(Kagan-Zur *et al.*, 2008 ; In Dafri, 2017)

limoneux. Généralement bien aérés, à pH acide, alcalin ou neutre, riches en calcaire et pauvres en phosphore (Kermani, 2013).

En ce qui concerne le climat, qui est le principal facteur influençant directement la production, les terfesses poussent dans des régions où les précipitations annuelles varient entre 50 et 380 mm (Morte *et al.*, 2008). Elles ne supportent pas les périodes prolongées de sécheresse et de froid (Callot, 1999). Cependant, Callot (1999) a confirmé que pour une bonne année de production et un bon rendement, la température du sol doit dépasser 50 °C vers la fin du mois d'avril et 23 °C de juin à septembre, et que les bonnes années de récolte dépendent d'une année chaude et humide avec quelques périodes sèches et de bonnes pluies en automne.

Symbiotiquement, les terfesses s'associent avec des plantes de la famille Cistaceae, appartenant surtout aux genres *Helianthemum* et *Tuberaria*, aussi à des cistes, des pins, des chênes, et d'autres espèces, telles que : *Plantago albicans* (Plantain blanchissant), *Robinia pseudoacacia* (Robinier faux Acacia), *Artemisia herba alba* (Armoise blanche), *Citrullus vulgaris* (Melon d'eau ou Pastèque), *Kobresia bellardii* (Cobrésia queue-de-souris) : *Acacia sp.*, voir aussi avec *Stipagrostis sp.* exclusivement en Afrique du Sud (Malençon, 1973 ; Janex-Favre *et al.*, 1988 ; Chatin, 1891 ; Moreno *et al.*, 2000, 2002 ; Díez *et al.*, 2002 ; Comandini *et al.*, 2006 ; Kagan-Zur et Roth-Bejerano, 2008 ; Kovacs *et al.*, 2011 ; Roth-Bejerano *et al.*, 2014). Selon Chatin (1869), elles peuvent s'associer même au cèdre du Liban (*Cedrus libani*).

6. Aire de répartition

« Truffes du désert », cette appellation suggère qu'il s'agit d'espèces purement désertiques, ce qui n'est pas tout à fait juste. Elles sont certes originaires des zones arides et semi-arides, mais sont presque généralisées sur les deux côtés de la Méditerranée, au sud de l'Europe (Portugal, Espagne, France, Italie et Hongrie) et au nord de l'Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye,...). Ainsi qu'en Afrique du Sud, au Botswana, en Namibie et dans les îles des Caraïbes... D'ouest en est du globe, on les trouve dans différentes régions, des Etats-Unis à la Chine (Janex-Favre *et al.*, 1988 ; El-Kholy, 1989 ; Gucin et Dulger, 1997 ; Łaxrynowicz *et al.*, 1997 ; Moreno *et al.*, 2000 ; Callot, 1999)

Les espèces les plus répandues en Afrique du Nord (Tunisie, Libye, Algérie, Maroc, Egypte) sont : *Terfezia boudieri*, *Tirmania nivea*, *Tirmania pinoyi*, *Picoa carthusiana* (en Tunisie), et le genre *Delastria* (au Maroc). Ces régions sont caractérisées par des températures moyennes de 14 à 18°C de mars à mai, des précipitations automnales bien réparties d'octobre à mars, allant

de 40 à 60 mm, chutant à 15 mm en mars (Malencon, 1973 ; Chevalier *et al.*, 1984 ; 2004 ; Khabar *et al.*, 1994 ; 2001; Pegler, 2002 ; Khabar, 2005 ; Slama *et al.*, 2006 ; Bradai, 2014 ; Dafri et Beddiar, 2017).

Les terfesses poussent aussi dans Le Moyen-Orient où le climat est continental avec des étés secs et hivers humides, les précipitations annuelles varient entre 300 et 600 mm dans les régions relativement humides et semi-arides et entre 50 et 250 mm dans les zones sèches telles qu'en Turquie, Syrie et Liban. Les espèces les plus fréquentes sont : *Terfezia boudieri*, *Terfezia claveryi*, *Terfezia leptoderma*, *Tirmania nivea*, *Terfezia arenaria*, *Picoa juniperi*, *Picoa lefebvrei*, *Tirmania pinoyi*. (Awameh et Al-Sheikh, 1986 ; Mandel et Al-Laith, 2007 ; Kagan-Zur et Akyuz, 2014).

7. Les terfesses en Algérie

Selon les régions, Les terfesses algériennes se développent sous des climats variés et forment leurs mycorhizes avec des plantes symbiotiques diverses souvent des cistacées du genre *Helianthemum*, à savoir : *Helianthemum guttatum*, *H. salicifolium*, et *H. Lippii* (Fig. 5) (Fortas, 1990 ; Ozenda, 1991 ; Fortas et Chevalier, 1992a ; Diez *et al.*, 2002 ; Bradai *et al.*, 2014a ; Dafri et Beddiar, 2017a ; b).

En termes d'affinité avec le sol, la terfesse en Algérie pousse sur des sols sableux, sablo-argileux ou sablo-limoneux, au pH alcalin ou acide, calcaires, pauvres en matière organique et en phosphore et riches en potassium et magnésium (Fortas, 1990, 2004 ; Aibeche, 2008 ; Zitouni, 2010 ; Mokaddem, 2013 ; Aroui, 2013 ; Bendahou, 2013 ; Roukby, 2013 ; Dafri et Beddiar, 2017).

La récolte débute à la fin de l'hiver et se prolonge jusqu'à la fin du printemps (Fortas, 1990 ; Bradai *et al.*, 2014b ; Dafri et Beddiar, 2017). Elle se fait amplement dans les régions arides et semi-arides, mais aussi dans des zones remarquablement plus humides au Nord-est du pays (Dafri, 2017 ; Dafri et Beddiar, 2017a ; b).

II. La flore pathogène et d'altération dans les aliments

L'étude de la qualité microbiologique des terfesses requiert une connaissance préalable des germes pouvant contaminer la terfesse, tout autant que n'importe quel autre aliment frais ou cuit. Parmi ces germes, une dizaine intéresse vivement les laboratoires de contrôle de qualité qui les recherchent dans les échantillons d'aliment à analyser, dans l'espoir de n'en trouver

aucun, en quantité périlleuse pour la santé publique. L'ensemble de ces germes est connu dans ces laboratoires sous le nom « Flore totale », dont l'étude donne d'ample renseignement sur la viabilité de l'aliment et les éventuels dangers qu'il puisse représenter.

1. Flore aérobie mésophile totale

La flore mésophile aérobie totale, également appelée « germes aérobie » est composée d'un groupe de microorganismes variés correspondant aux germes banaux de contaminations, c'est-à-dire il ne s'agit pas d'un groupe taxonomique particulier mais de l'ensemble des bactéries, levures et moisissures capables de se développer en aérobiose. Ce sont des germes non pathogènes aptes à se développer dans des conditions normales de culture à 30 °C (Wiseman et Applebaum, 1983 ; Site web 1 ; Site web 2).

2. Levures et Moisissures

Les levures et moisissures sont des cellules eucaryotes classées sous le terme flore fongique.

2.1 Levures

Ce sont des champignons microscopiques, eucaryotes, unicellulaires aptes à provoquer la fermentation des matières organiques animales ou végétales. Ce sont des microorganismes de formes variables selon l'espèce (sphérique, ovoïde, en bouteille, triangulaire ou apiculée), parfois volumineuse, et souvent capables d'accomplir une sporulation. Elles sont, aérobies parthénogènes, et se développent sur les surfaces pour former des boutons naturels.

Certaines levures font partie de la flore normale de divers produits alimentaires. On les utilise en industrie alimentaire dans les processus de fermentation de boissons, de charcuteries, de fromages et de pain ; et en industrie pharmaceutique dans la production d'antibiotiques et de compléments alimentaires (Site web 1).

2.2 Moisissures

Les moisissures sont des cellules eucaryotes en général plus complexes dans leur morphologie (Fig. 5) et dans leur mode de reproduction. Elles se développent en surface à des températures optimales se situant entre 20 et 30 °C, et sont capables de contaminer les produits alimentaires. Ce sont des champignons microscopiques filamenteux dont les cellules sont organisées en mycélium. En général, les moisissures sont aérobies, acidophiles et mésophiles, qui produisent souvent des métabolites secondaires, dont des mycotoxines (Guiraud et Rosec, 2004).

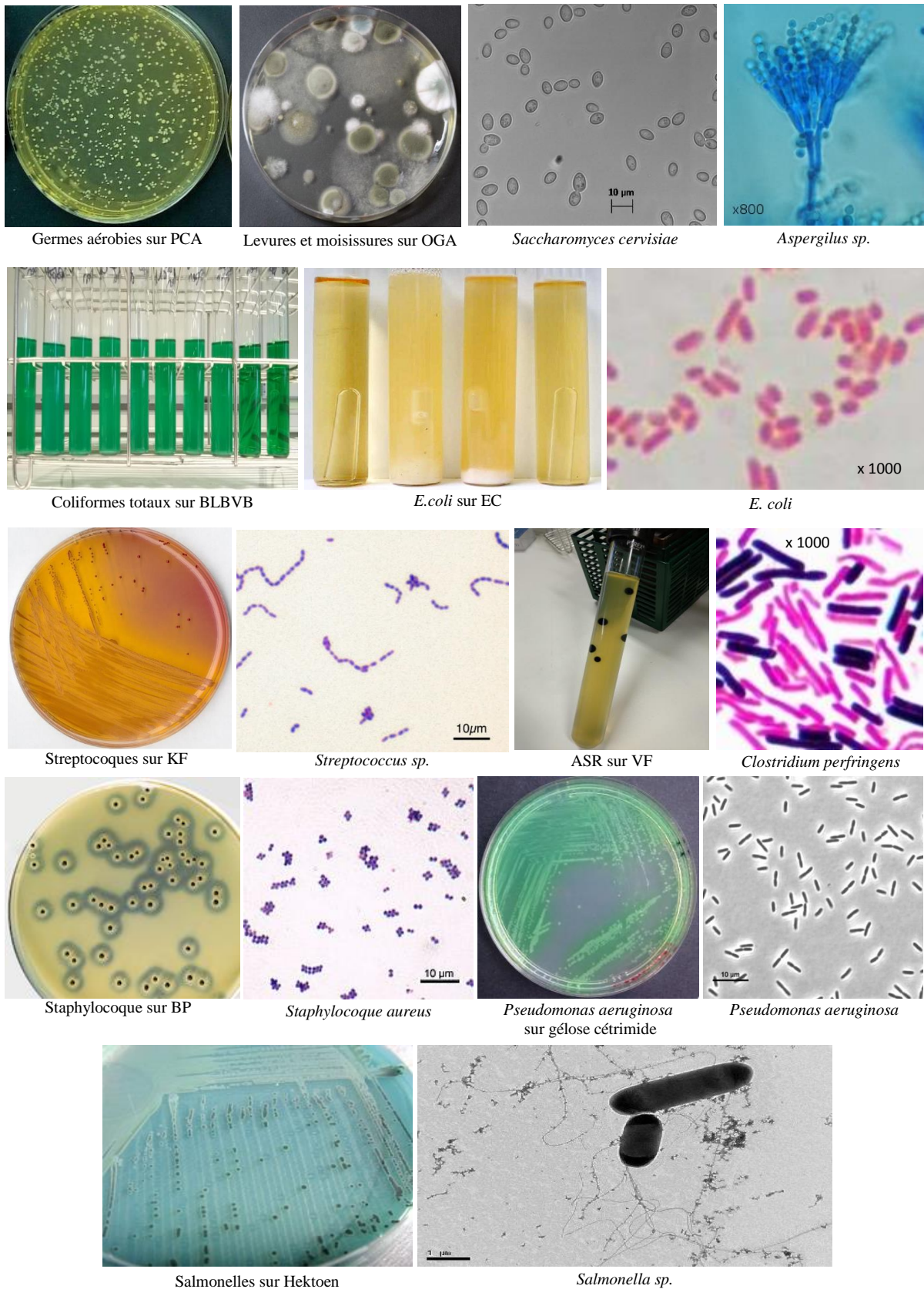


Fig. 5 Aspect macro et microscopique des germes étudiés

(Sites web 1, 2, 3, 4, 5, 6)

3. Coliformes

3.1 Coliformes totaux

Le terme « coliformes » ou « coliformes totaux » est utilisé pour désigner un certain nombre d'espèces bactériennes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, et vivant dans l'intestin des animaux homéothermes, mais aussi dans l'environnement en général (sols, végétation et eau). Ce sont des bacilles (en forme de bâtonnets), asporulés, mobiles ou immobile. Il s'agit de bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, à Gram négatif, à oxydase négative, et qui réduisent les nitrates en nitrites en conditions anaérobies. Ces germes peuvent se développer en présence de sels (halophile) ou d'autres agents de surface ayant une activité inhibitrice, ou en présence d'agents tensioactifs, avec une capacité de fermentation du lactose (et du mannitol) pour former un acide et un aldéhyde dans les 48 heures à des températures de 35 à 37°C.

Les coliformes comprennent les genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Serratia*. Ils sont l'indice d'une contamination d'origine fécale (Site web 1).

3.2 Coliformes fécaux ou thermotolérants

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capable de fermenter le lactose à une température de 44,5 °C. Leur présence et plus particulièrement celle d'*Escherichia coli* (*E. coli*) dans un milieu, est considérée comme un bon indicateur d'une contamination récente du milieu par du matériel fécal humain ou d'animaux à sang chaud. Outre *E. coli*, le nom « coliformes fécaux » regroupe les espèces suivantes :

Citrobacter freundii, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Moellerella wisconsensus*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* (Site web 3).

3.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) est l'espèce type du genre *Escherichia* de la famille des Enterobacteriaceae. On l'appelle familièrement "Colibacille", c'est-à-dire "bacille du côlon".

E.coli est un résident de l'intestin et des excréments des animaux à sang chaud et des reptiles. Cette espèce, qui a été largement étudiée, est le modèle des bacilles à Gram négatif aérobies. Elle se multiplie rapidement (18-24 h) sur des milieux standards. Les colonies ont un diamètre

moyen de 2 mm, une longueur de 2 à 4 μm et une largeur de 0,4 à 0,6 μm . Elles sont rondes, en forme d'étoile et ont des marges régulières (Site web 1 ; Site web 3).

4. Entérocoques et Streptocoques

Les entérocoques (E) sont des bactéries de la famille Streptococcaceae, classées dans le genre *Streptococcus* (S) de groupe sérologique Lance Field D. Ce sont des anaérobies facultatifs, asporulés, à gram positif, se présentant sous forme de coques sphériques légèrement ovales, disposées en diplocoques ou en chaînes. C'est un groupe de commensaux, de nature homofermentaire, avec production d'acide lactique sans gaz, se développant le mieux à 37 °C. Étant des hôtes normaux de l'intestin, leur présence dans un milieu est un bon témoin d'une ancienne contamination d'origine fécale (Site web 1).

5. Anaérobies Sulfito-Réducteurs

Les clostridium ou anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) sont des bactéries anaérobies strictes, à Gram positif, de la famille des Clostridiaceae, possédant des caractéristiques biochimiques particulières. Ce sont des bacilles d'une longueur de 3 à 4 μm et d'une largeur de 1 μm , isolés ou en courtes chaînettes, immobiles, capsulés et sporulés (spore de grande taille, ovale centrale ou subterminale, résistante aux facteurs chimiques). Elles sont dotées d'une forme ovale ou sphérique déformante, à flagelle pérित्रiche. Leur optimum de température tourne autour de 37 °C. Toutefois, leurs spores peuvent résister à des températures de bien plus de 65 °C. Leurs cultures au laboratoire sont réalisées en anaérobiose (Site web 1).

6. Staphylocoques

Parmi les bactéries du genre *Staphylococcus*, l'un des plus redoutables et donc le plus recherché en analyse microbiologique des aliments, est le *Staphylococcus aureus* (S.A) aussi appelé Staphylocoques dorés.

Ces staphylocoques sont des coques (Cocci) avec une forme sphérique d'environ 1 μm de diamètre, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, en général sans capsule. Ce sont des aérobies facultatifs, à Gram positif, à oxydase négative et à catalase positive. En effet, ces bactéries possèdent une catalase qui permet de les différencier des Streptocoques. Elles doivent leur pouvoir pathogène à la présence de l'enzyme staphylocoque à coagulase positive. Elles sont communes dans le nez, la peau, l'intestin ou les surfaces muqueuses de l'être humain et de plusieurs espèces animales.

Ces bactéries sont également connues pour leur capacité d'hydrolyser l'acide désoxyribonucléique (ADN) en nucléotides ou polynucléotides par hydrolyse des liaisons phosphodiester grâce à des enzymes ADNases thermostables pouvant résister à des températures de 100 °C pendant 15 minutes. Ces enzymes sont appelées les thermonucléases, et sont exclusives, dans le genre *Staphylococcus*, à l'espèce *S. aureus* ce qui facilite sa confirmation (Delarasse, 2007). La réaction catalysée est la suivante :



Des souches de *S. aureus* d'origine variée (animale, humaine ou environnementale) peuvent contaminer les aliments crus et causée des intoxications alimentaires suite à la production d'une entérotoxine thermorésistante, même si 30 à 50 % de la population sont des porteurs sains de staphylocoques ; les germes existent sur leur peau ou leurs muqueuses externes surtout nasales, mais aucun symptôme ne se développe (Site web 1, Site web 4).

7. Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (P.A) est le bacille le plus commun du groupe *Pseudomonas*, famille des *Pseudomonadaceae*. Ce sont des bâtonnets droits ou courbés, mobiles avec un flagelle polaire simple. Il s'agit d'une bactérie à gram négatif, strictement aérobie, et ubiquitaire (vit dans des environnements humides. Cette bactérie forme des biofilms sur les surfaces humides, comme les rochers et le sol). Elle est caractérisée par une odeur spéciale, l'odeur de fleur de seringa (orthoaminoacétophénone), et par la production de deux pigments : la pyocyanine (bleu vert) et la pyoverdine (vert fluorescent).

Les dangers de ces espèces présentent partout dans le sol et l'eau, notamment *Pseudomonas aeruginosa*, s'étendent des infections externes mineures aux maladies graves (Site web 1)

8. Salmonelles

Les salmonelles sont des bacilles (bâtonnets) à gram négatif appartenant à la famille des *enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives, essentiellement présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux. Elles sont sulfatoréductrices (H₂S positives), à lactase négative. Elles se développant dans une gamme de température variant entre 4 et 47 °C, c'est pourquoi, malgré leur optimum situé entre 35 et plus de 40°C, elles résistent à la réfrigération et à la congélation. (Site web 1, Site web 5).

Chapitre II
Étude Expérimentale

Chapitre II : Étude Expérimentale

Le travail s'est déroulé en deux phases bien distinctes, une première brève, effectuée sur le terrain et une seconde, la plus importante d'ailleurs, au laboratoire.

I. Sur terrain : Zone et méthodes d'échantillonnage

1. Présentation générale de la région

Pour réaliser ce travail sur les terfesses, nous avons dû commencer par la récolte du champignon. La zone d'échantillonnage à laquelle nous a guidées un des récolteurs des terfesses dans la région, se trouve au niveau de la vallée de Metlili à environ 40 km du chef-lieu de la wilaya de Ghardaia, elle-même située au centre de la partie Nord du Sahara algérien à environ 600 Km au sud de la capitale Alger.

Tout comme le reste de la commune, voir le désert en entier, la région d'échantillonnage est caractérisée par son climat sec et sa pauvreté en précipitations (22,8 mm/an en moyenne). En effet, les principales ressources hydriques de la région sont les eaux souterraines, à savoir la nappe albienne profonde et la nappe phréatique.

Les températures de la région sont très élevées en été (jusqu'à 46°C en moyenne) et descendent remarquablement en hiver (environ 5°C en moyenne).

2. Exploration de la zone

Pendant notre quête des terfesses, il ne nous est pas échappé d'explorer au mieux possible la zone d'échantillonnage dont la physionomie et la végétation sont importantes aussi bien dans l'étude actuelle que dans d'éventuelles futures études.

La zone a globalement été observée et sa végétation dominante recensée. Les résultats de cette partie du travail réalisée sur le terrain sont résumés dans le prochain chapitre où de plus amples détails sur ces sites sont donnés.

3. Méthode d'échantillonnage

La récolte de la terfesse est basée sur la présence de plantes hôtes comme indicateur. Autour de l'endroit, par simple observation, le lieu de présence de l'ascocarpe se caractérise par des critères clairement définis par le récolteur, comme un sol enflé généralement avec des fissures

ou craquelures (Fig. 6). Bien que théoriquement simple, la récolte des terfesses via cette méthode nécessite une pratique fréquente.



Fig. 6 Échantillonnage des terfesses

Une fois l'ascocarpe détecté, le sol autour, est dégagé soigneusement afin de garder l'ascocarpe intacte. Ce dernier est retiré avec ou sans son pied qui reste souvent dans le sol ou est détruit lors de récolte à cause de sa fragilité et sa profondeur.

II. Au laboratoire : Analyses microbiologiques des échantillons

L'étude microbiologique a été réalisée au Laboratoire de contrôle de la qualité et de répression des fraudes, de la wilaya de Ghardaia ; situé à la commune d'El Atteuf, Daïra de Bounoura, à environ 7 km du centre ville, et plus connu sous le nom de l'organisme auquel il est rattaché : CACQE, pour Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage.

Toutes les manipulations se sont effectuées avec un maximum de précision et dans des conditions aseptiques.

1. Préparation des échantillons

Entre deux becs bunsen, bien laver les ascocarpes à l'eau distillée stérile et désinfecter leur surface à l'alcool puis les épulcher (Fig. 7). À l'aide d'un couteau, provoquer une légère lésion à la surface, en évitant d'enfoncer la lame dans la profondeur de la glèbe afin ne peut pas porter les éventuels contaminants de la surface à l'intérieur de l'échantillon.



Brossage de l'ascocarpe



Lavage avec l'eau distillée stérile



Désinfection avec l'alcool



Peler avec une lame bistouri

Fig. 7 Préparation des échantillons

Le premier morceau est utilisé pour la préparation de prise d'essai du sous-échantillon analysé à l'état frais et l'autre passe à une simple cuisson coutumière mais sans autres produits alimentaires, avec uniquement une quantité de sel comme pour une vraie préparation culinaire destinée à la consommation du champignon. Le deuxième sous-échantillon à analyser à l'état cuit est donc mis à coction pendant plusieurs minutes (jusqu'à cuisson de l'échantillon) dans une eau préalablement portée à ébullition.

Cette méthode de préparation a été répétée avec les cinq échantillons, un à un, en changeant bien évidemment à chaque fois l'eau de cuisson des sous-échantillons à analyser à l'état cuit.

2. Prise d'essai et dilution

2.1 Prise d'essai

- Peser X g de l'ascocarpe et ajouter ($9 \times X$ g) de diluant TSE.
- Pour assurer l'homogénéisation ; on utilise l'appareil *Stomacher* pendant 15s.
- Après homogénéisation du produit (Fig. 8), on obtient ce que l'on appelle la solution mère (SM). Cette dernière, de concentration 10^{-1} , sera la base de la préparation des dilutions sur lesquelles les analyses seront effectuées (de 10^{-2} jusqu'à 10^{-5}).



Peser X g de l'échantillon

L'ajout de diluant TSE

Broyage par Stomacher

Fig. 8 Préparation de la prise d'essai

2.2 Préparation des dilutions

- Préparer pour chaque échantillon une série de 4 tubes à essai stériles, chacun contenant 9 ml de TSE et servant à la préparation de l'une des quatre dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) (Fig. 9).
- À l'aide d'une micropipette, introduire aseptiquement 1 ml de la suspension mère dans l'un des quatre tubes à essai cités précédemment.
- Agiter pour homogénéiser.
- On obtient ainsi la dilution de 10^{-2} .
- À partir de la dilution 10^{-2} préparée, on réalise (suivant les mêmes étapes ci-dessus) la prochaine dilution de 10^{-3} , qui servirait à son tour et de la même manière à préparer la dilution 10^{-4} , laquelle serait utilisée pareil pour préparer la dernière dilution décimale 10^{-5} .

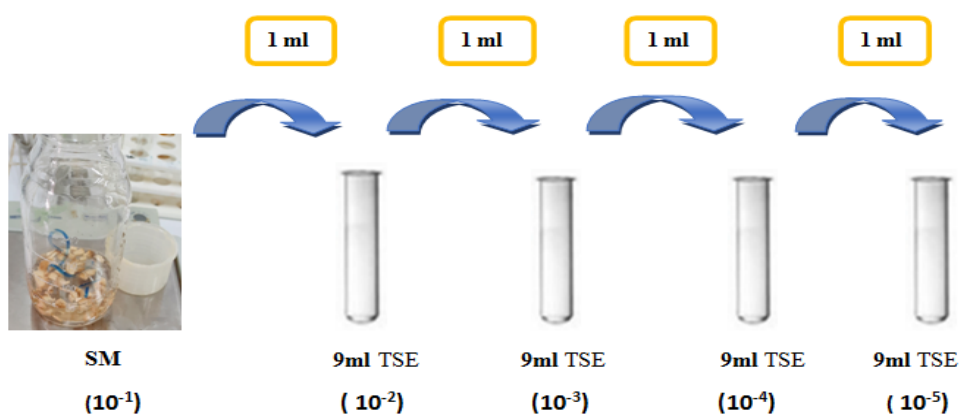


Fig. 9 Préparation des dilutions décimales

3. Analyses microbiologiques

L'étude de la qualité microbiologique des terfesses a été effectuée par l'analyse de dix germes considérés importants à étudier dans une telle étude préliminaire sur la microflore et les contaminants de ces ascocarpes. Ces germes sont la flore aérobie mésophile totale ou germes aérobie, les levures et moisissures, les coliforme totaux et fécaux et *E. coli*, les entérocoques et streptocoques, les clostridium ou anaérobies sulfite-réducteurs (ASR), les staphylocoques les pseudomonas et les salmonelles. L'ensemble de ces germes est communément appelé « Flore totale » dans le laboratoire de contrôle de qualité où nous avons réalisé notre travail. Les protocoles de recherches sont conformes au journal officiel algérien du 2 juillet 2017.

3.1 Flore aérobie mésophile totale

Le milieu et les conditions de culture utilisés dans la recherche de la flore aérobie mésophile totale, ou plus courtement germes aérobie, permettent la croissance de différents microorganismes (bactéries aérobies, levures, moisissures, hormis les bactéries anaérobies). Le but de cette analyse est d'évaluer la charge microbienne totale d'un aliment. Si cette dernière est élevée, il devient nécessaire d'évaluer tous les autres paramètres.

Le protocole mené consiste en un ensemencement en masse sur milieu PCA selon les étapes suivantes (Fig. 10) :

- Dans une zone stérile, à l'aide d'une pipete pasteur ou une micropipette, prendre 1ml (environ 20 gouttes) de chaque dilution de l'échantillon à analyser et le verser dans une

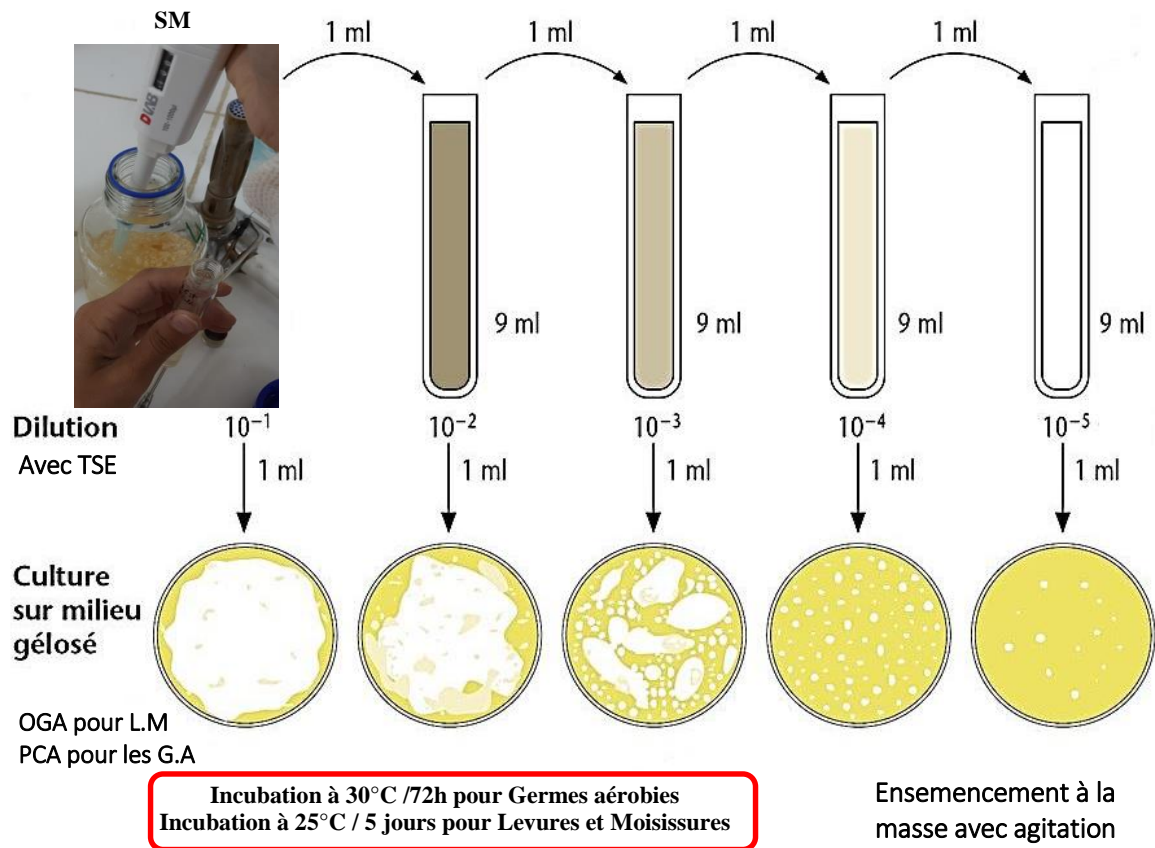


Fig. 10 Méthode de recherche des Germes aérobies, Levures et Moisissures

boite de pétri (vide). Réaliser deux boites de pétri par dilution pour une meilleure fiabilité des résultats.

- Couler dans chaque boite de Pétri, environ 15 ml du milieu PCA en surfusion à 55°C et homogénéiser le contenu (échantillon-milieu) par agitation douce en forme 8 (Agitateur type Vortex).
- Laisser le milieu se solidifier sur la paillasse puis incuber les boites à 30°C pendant 72 heures. On procède à la vérification des boites toutes les 24h. Si l'une se charge complètement avant la fin des 72 d'incubation, on l'élimine et on continue avec l'autre.

◆ Lecture

La lecture se fait par comptage des colonies apparues dans chaque boite (soient X et Y), suivi d'un calcul de la moyenne des boites pour chaque dilution (soit N°) selon la formule suivante :

$$N^{\circ} = [(X + Y) / 2] \times 1/\text{la concentration de la dilution}$$

Pour la SM (10^{-1}) par exemple : $N^{\circ} = [(X + Y) / 2] \times 1/10^{-1} = N^{\circ} = [(X + Y) / 2] \times 10$

Tandis que pour la dilution 10^{-2} : $N^{\circ} = [(X + Y) / 2] \times 1/10^{-2} = N^{\circ} = [(X + Y) / 2] \times 100$ et ainsi de suite.

Les résultats s'expriment en UFC (Unité Formant Colonie). Si le nombre d'UFC de la dilution est supérieur à 300, on dit qu'elle est indénombrable.

3.2 Levures et Moisissures

Il repose sur l'emploi d'un milieu de culture générique rendu sélectif par addition d'un antibiotique (oxytétracycline), il s'agit de la gélose OGA. Cette étude suit le même protocole que pour la flore aérobie mésophile totale, mais avec incubation à 25°C pendant 5 jours (voir Fig. 10, ci-avant).

3.3 Coliformes totaux, fécaux et *E. coli*

Dans ce protocole de trois étapes, on effectue un premier test présomptif destiné à la recherche des coliformes totaux suivi d'un second test confirmatif destiné à la recherche des coliformes fécaux, suivi dans le cas de positivité de celui-ci, du test plus spécifique portant sur la recherche d'*E. coli*.

3.3.1 Coliformes totaux

Les coliformes totaux sont un groupe bactérien utilisé comme indicateur de la qualité microbienne des produits alimentaires. La méthode d'analyse utilisée pour ce paramètre est appelée « Fermentation en tube » « Méthode semi-quantitative ». Elle consiste en une évaluation du Nombre le plus probable (NPP) après ensemencement sur le milieu liquide ou bouillon Lauryl Sulfate Tryptose (LST) à simple et à double concentration, avec utilisation de cloches de Durham. Les étapes pratiques sont les suivantes (Fig. 11) :

- Autour d'un bec bunsen, ensemencer pour chaque échantillon neuf tubes :
 - Trois tubes contenant environ 10 ml de LST à simple concentration (SC) avec 1 ml par tube de la SM de l'échantillon à analyser.
 - Trois tubes pareils que les précédents mais avec seulement 0.1 ml de la SM de l'échantillon par tube.
 - Trois tubes contenant environ 10 de LST à double concentration (DC) avec 10 ml de la SM de l'échantillon à analyser par tube.
- Chassez l'air éventuellement présent dans les cloches de Durham

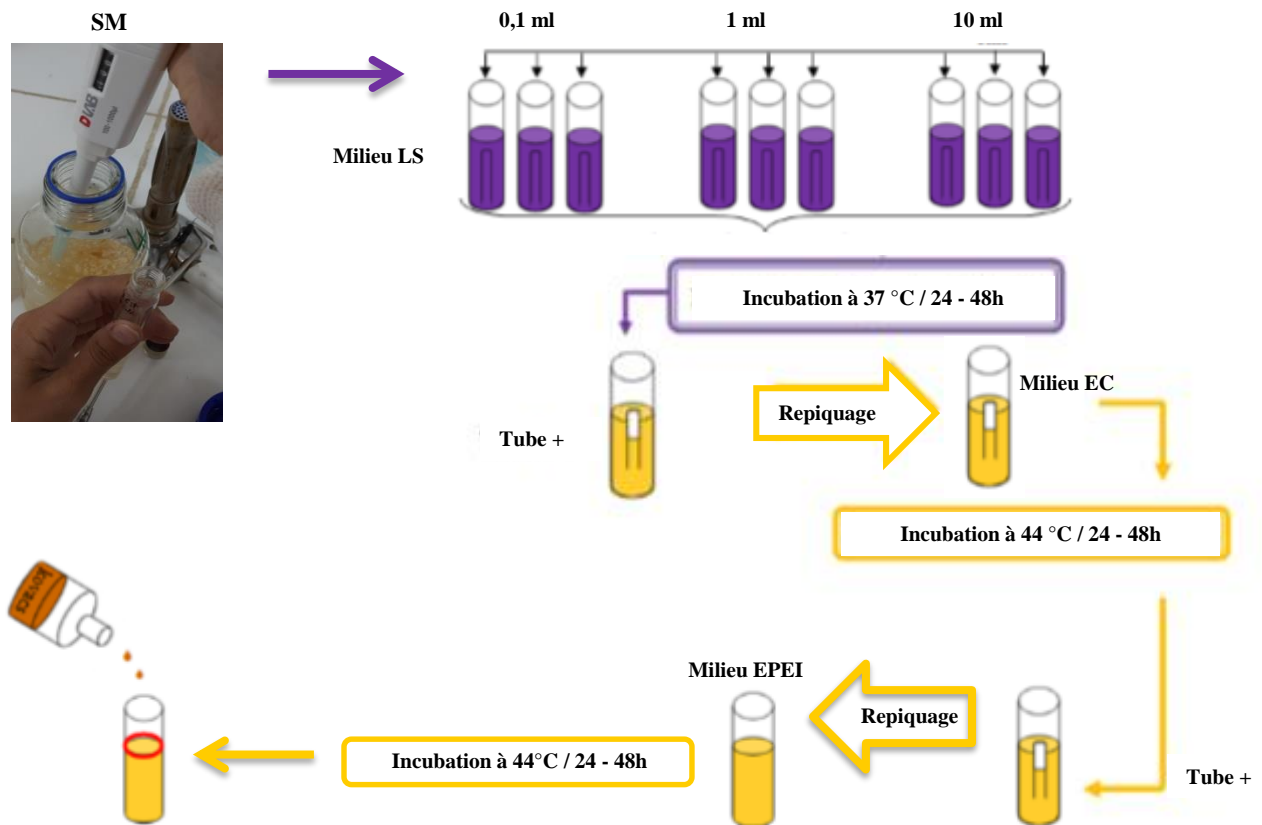


Fig. 11 Méthode de recherche des Coliformes totaux et fécaux

- Mélanger bien le milieu et l'inoculum avec un Agitateur type Vortex et incuber à 37°C pendant 24 à 48 h.

❖ Autre méthode

Comme l'échantillon 2 était petit, nous avons changé pour l'étude à l'état cuit, la méthode de recherche des coliformes totaux, afin de nous éviter les 10 ml de la SM à ensemer sur milieu LST à double concentration. Cette méthode alternative est réalisée comme suit :

- Préparer trois tubes à essai avec cloches contenant chacun 10 ml de BLBVB.
- Ensemencer dans chaque tube 1 ml de chacune des trois premières dilutions (SM, 10^{-2} , 10^{-3}), puis incuber à 44°C pendant 24 à 48 h.

Les prochaines étapes, à partir de la lecture, restent les mêmes.

◆ Lecture

Sont considérés comme positifs (+), les tubes présentant à la fois :

- ✓ Un dégagement de gaz (supérieur au 10% de la hauteur de la cloche).

- ✓ Un trouble remarquable du milieu.

Le résultat final est un nombre de trois chiffres où :

- Le chiffre représentant les unités correspond au nombre de tubes positifs de la SC avec 0.1 ml de la SM.
- Le chiffre représentant les dizaines correspond au nombre de tubes positifs de la SC avec 1 ml de la SM.
- Le chiffre représentant les centaines correspond au nombre de tubes positifs de la DC.

Ce nombre que l'on appelle le nombre le plus probable (NPP) est comparé à la table du NPP de Mac Grady afin d'estimer le nombre de colonies de coliformes totaux dans l'échantillon dans le but d'en tirer conclusion à l'égard de l'état de l'échantillon (satisfaisant ou non satisfaisant).

Cependant, pourvu qu'il ne soit pas nul, l'analyse doit être poursuivie, pour tous les tubes positifs, par la recherche des coliformes fécaux parmi les totaux déjà recherchés dans cette étape.

3.3.2 Coliforme fécaux

Les tubes comptés positifs dans l'étape précédente des coliformes totaux sont soumis au test confirmatif par la recherche de coliformes fécaux. Le protocole est comme suit :

- Préparer pour chaque tube positif en provenance de l'étape précédente un nouveau tube muni d'une cloche de Durham et contenant environ 10 ml du bouillon EC.
- Chassez l'air éventuellement présent dans les cloches.
- Agiter pour assurer une homogénéité entre le milieu et l'inoculum, puis incuber les tubes à 44°C pendant 24 à 48 heures.

◆ Lecture

La lecture est effectuée exactement de la même manière précédente, en prenant en considération l'origine de l'ensemencement des tubes EC comme suit :

- Le chiffre représentant les unités correspond au nombre de tubes EC positifs, ensemencés par le LST SC avec 0.1 ml de la SM.
- Le chiffre représentant les dizaines correspond au nombre de tubes EC positifs, ensemencés par le LST SC avec 1 ml de la SM.

- Le chiffre représentant les centaines correspond au nombre de tubes EC, ensemencés par le LST DC.

Le nouveau NPP est à son tour comparé avec la table de Mac Grady afin d'estimer le nombre de colonies de coliformes fécaux par lequel on évalue l'état de l'échantillon. Dans le cas de présence de coliformes fécaux, les tubes positifs passent à leur tour à l'étape suivante qui est la recherche d'*E. coli*.

3.3.3 *E. coli*

N'ayant pas été réalisé, ce protocole de recherche d'*E. coli* ne figure pas dans la partie expérimentale du manuscrit. Cependant, à toute fin utile, il est annexé à la fin du document (voir Annexe 1).

3.4 Entérocoques et Streptocoques

La vérification de la présence des entérocoques dans les terfesses par la technique du NPP, se fait en deux principales étapes (Fig. 12). Une première consistant en un test présomptif recherchant les entérocoques en général, et une deuxième consistant en des tests confirmatifs dont le premier confirme la présence des entérocoques du genre *streptococcus* ou streptocoques, et un deuxième réalisé dans le but de vérifier la présence des streptocoques pathogène du groupe D.

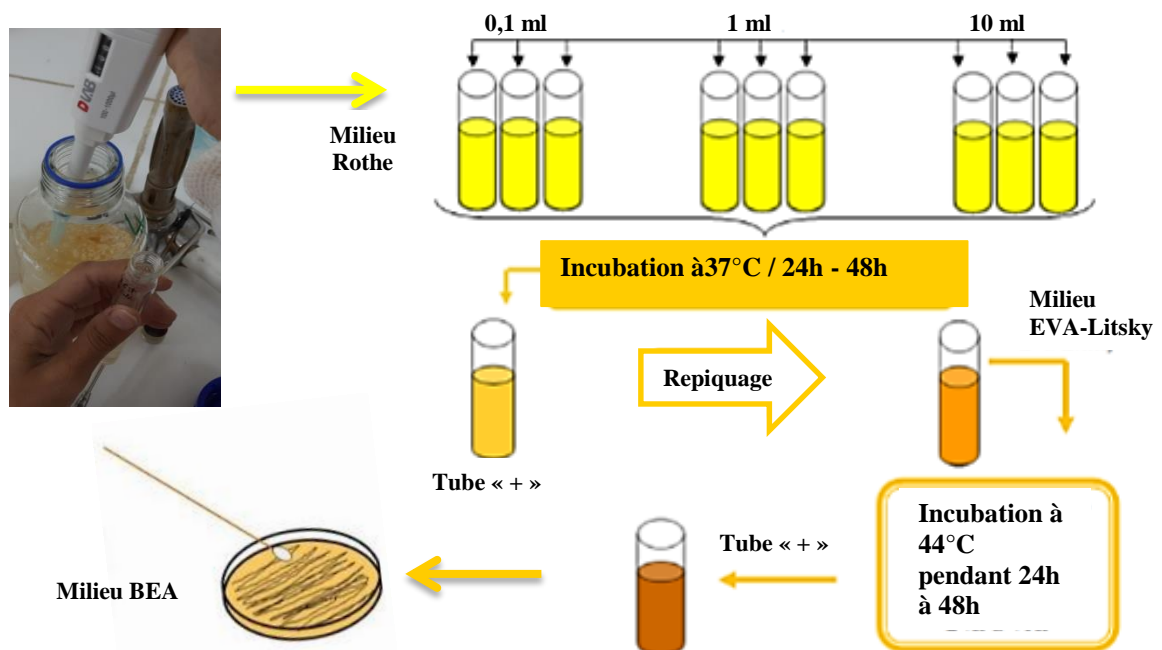


Fig. 12 Méthode de recherche des Entérocoques et Streptocoques

3.4.1 Test présomptif (Entérocoques)

Destiné à la recherche des entérocoques en général, ce test est réalisé suivant les mêmes étapes que pour les coliformes totaux, sur bouillon Rothe contenu dans des tubes sans cloches.

◆ Lecture

Les tubes sont considérés comme positifs s'ils présentent un trouble accompagné d'une modification de l'aspect général du milieu comparé avec un tube témoin placé à 4 °C pendant 48 h. A ce stade on présume que les tubes positifs contiennent des entérocoques.

Si en plus du trouble on remarque la présence d'une pastille violette (ou blanchâtre) au fond des tubes, on peut alors déjà penser à une présence de streptocoque dans l'échantillon analysé.

Dans le cas où le milieu représente juste le trouble, l'analyse s'arrête à ce stade et la lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady de la même manière détaillée là-haut. En revanche, dans le cas de présence de la pastille, l'analyse se poursuit par les tests confirmatifs ci-après.

3.4.2 Tests confirmatifs

3.4.2.1 Test EVA (Streptocoques)

Ce premier test confirmatif est comme évoqué là-haut, destiné à la confirmation de la présence des streptocoques. Il est réalisé sur milieu liquide EVA (également appelé milieu Litsky), Comme suit :

- Comme pour tous les tests confirmatifs, préparer chaque tube Rothe positif à un tube EVA.
- Introduire l'anse de platine dans le tube Rothe positif et la réintroduire avec son contenu dans le tube EVA correspondant.
- Bien agiter pour homogénéiser le tout, puis incubation à 37 °C pendant 24 h.

◆ Lecture

Sont considéré positifs les tubes qui présentent un trouble du milieu.

3.4.2.2 Test BEA (*S. groupe D*)

Ce deuxième est réalisé sur milieu gélosé BEA (Bile Esculine Acide), en vue de la vérification de la présence de streptocoques pathogènes (groupe D). Dans ce test :

- Chaque tube positif EVA correspond à une boîte de pétri contenant le milieu solide BEA,ensemencée à l'aide d'une anse de platine par la méthode des stries.
- Les boîtes sont incubées à 44 °C, pendant 4h.

◆ Lecture

Le test est considéré positif pour les boîtes de pétri qui présentent des colonies noires brillantes.

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady du NPP toujours de la même façon dores-et-déjà expliquée.

3.5 Anaérobies Sulfito-Réducteurs (ASR)

La recherche des ASR se base sur leur croissance sur un milieu sélectif, viande fois (VF) contenant du sulfite de sodium et l'alun de fer. Leur ensemencement se fait en profondeur pour créer l'anaérobiose nécessaire à leur croissance. Il passe par les étapes suivantes (Fig. 13) :

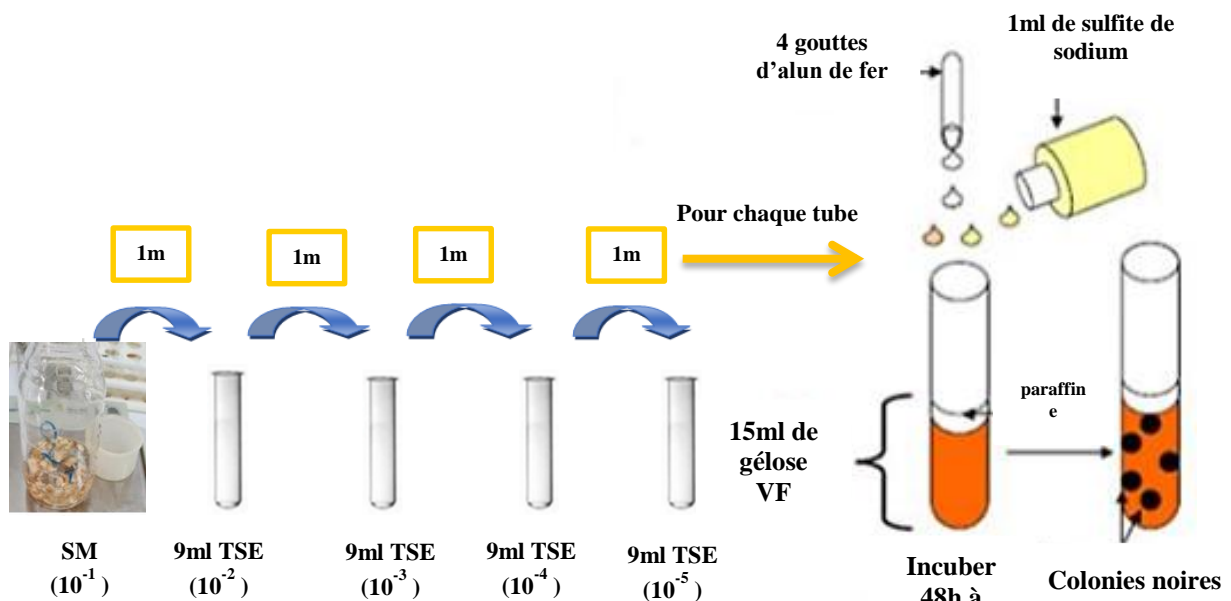


Fig. 13 Méthode de recherche des Anaérobies Sulfito-Réducteurs

- Ensemencer 1 ml de chaque dilution dans deux tubes à essai stériles.
- Ajouter environ 15 ml du milieu VF et homogénéiser le contenu par une agitation lente sans formation de bulles d'air.
- Laisser solidifier sur la paillasse puis incuber les tubes à 37 °C pendant 24 à 48 h.

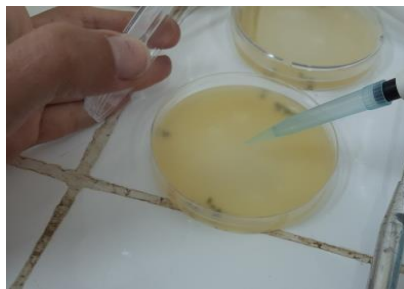
◆ Lecture

La présence des ASR est mise en évidence par l'apparition de colonies noires. Les nombre est déterminé par comptage direct et le résultat est comparé aux normes prédéfinies pour chaque type d'aliment, dans le journal officiel ou dans les articles scientifiques dédiés à ces fins.

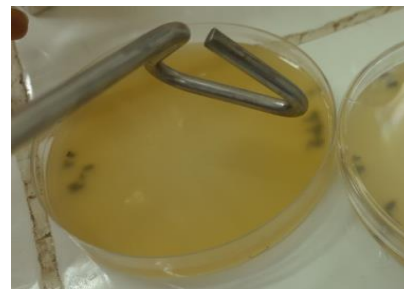
3.6 Staphylocoques à coagulase positive

3.6.1 Test présomptif

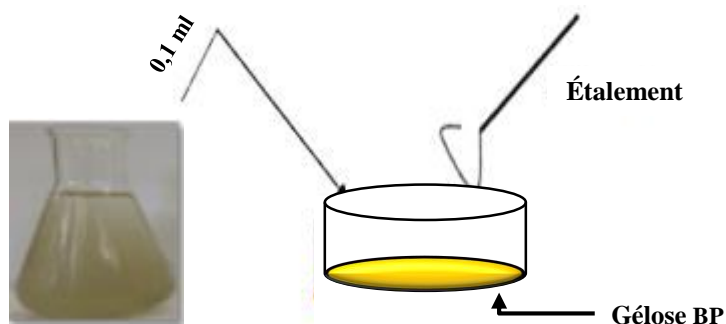
Les staphylocoques sont identifiés sur milieu Baird-Parker additionné d'émulsion de jaune d'œuf et de tellurite de potassium, à raison de deux boites par dilution, selon les étapes suivantes (Fig. 14) :



Déposer 0,1 ml de l'inoculum



Étaler



Incuber à 37°C / 24 - 48h

Fig. 14 Méthode de recherche des staphylocoques à coagulase positive

- Effectuer un ensemencement en surface par étalement de 0.1 ml de chaque dilution par boîte de pétri.
- Laisser les boîtes, avec couvercle en place, environ 15 minutes à température ambiante, puis incuber à 37 °C pendant 24 à 48 h.

◆ **Lecture**

Après incubation on distingue deux types de colonies l'un non caractéristique et l'autre caractéristique.

- Les colonies non caractéristiques sont noires et brillantes marquant sans halos. Elles sont surtout formées de souches de Staphylocoques à couagulase positive.
- Les colonies caractéristiques sont noires, brillantes et convexes et sont entourées de deux halos, un opaque et l'autre transparent. Elles suspectent la présence de *staphylococcus aureus* et impliquent des tests confirmatifs.

3.6.2 Tests confirmatifs

La confirmation de *staphylococcus aureus* se fait par deux tests : ADNase (également DNase / DNase) et Catalase, précédés par les étapes suivantes :

- À l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une partie de chaque colonie sélectionnée et l'ensemencer dans un tube à essai contenant 10 ml du milieu de conservation BHIB en bouillon.
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 24 h. On marque l'apparition de colonies de couleur jaune. Ce sont ces colonies jeunes que l'on soumet aux tests confirmatifs à suivre.

3.6.2.1 Test ADNase

Ce test est effectué sur milieu ADNase solide selon les étapes suivantes :

- Couler le milieu ADNase solide dans les boîtes de pétri.
- Creuser deux sillons parallèles sur la gélose en perçant des puits de 4 mm avec l'anse de platine tout le long des deux côtés de la boîte.
- Remplir les sillons avec l'inoculum préalablement préparé sur bouillon BHIB.
- Ajouter deux à trois gouttes d'acide chlorhydrique HCl 1N à chaque sillon.
- Incuber à 37 °C pendant 4 h.
- Après incubation, inonder la surface du milieu avec quelques millilitres d'HCl et attendre 10 à 15 min.

◆ Lecture

L'HCl précipite les molécules d'ADN combinées à des protéines. Donc, dans le cas de présence de *S. aureus*, l'ADN est hydrolysé et on observe un précipité blanchâtre, avec un halo clair est visible au pourtour des puits.

3.6.2.2 Test Catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en H_2O et $\frac{1}{2} O_2$ (dégagement de gaz), selon la réaction : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$

Le protocole consiste en ce qui suit :

- Placer sur une lame, à l'aide d'une pipette Pasteur, quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- À l'aide d'une anse de platine, prélever une petite quantité de la culture réalisée sur bouillon BHIB et la placer sur l' H_2O_2 .
- Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz correspondant au dégagement d'oxygène.

3.7 *Pseudomonas aeruginosa*

3.7.1 Test présomptif

La recherche des *Pseudomonas* a été initiée avec une première étape réalisée sur une gélose nutritive (GN) en une seule petite étape consistant à ensemencer en stries à l'aide d'une anse de platine, une goutte de la suspension mère, sur la GN et incubé pendant 24 h à 44 °C (Fig. 15).

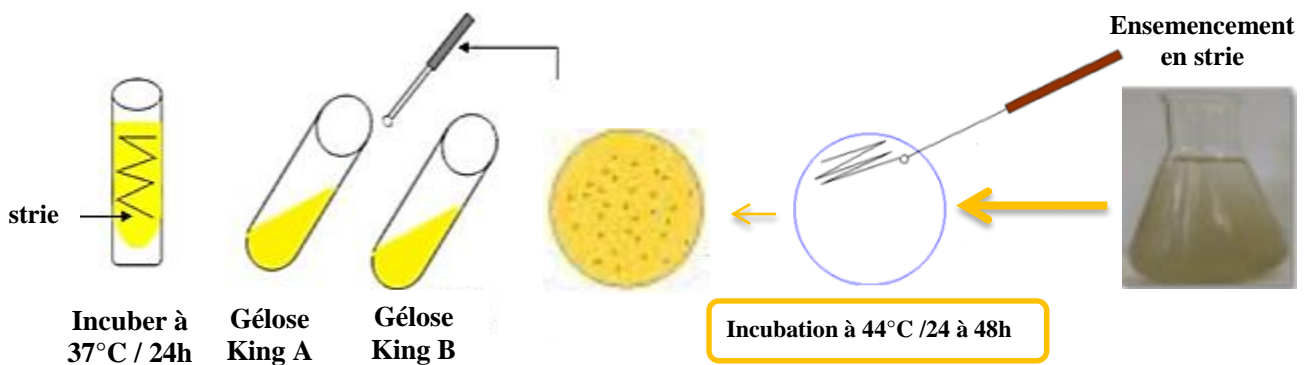


Fig. 15 Méthode de recherche des *Pseudomonas aeruginosa*

◆ **Lecture**

Le résultat positif se présente sur la gélose nutritive sous forme de colonies blanches.

3.7.2 Test confirmatif

La confirmation de présence des *P. aeruginosa* se fait en utilisant deux milieux sélectifs : King A et King B.

3.7.2.1 Test sur King A

La gélose King A est utilisée pour la caractérisation des *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de la pyocyanine, selon les étapes suivantes :

- Préparer un tube contenant de la gélose King A, pour chaque boîte de GN positive du test présumptif.
- Effectuer un ensemencement en stries, à partir de la GN positive, sur le milieu gélosé King A contenu dans le tube.
- Procéder pareil pour toutes les boîtes GN positive (chacune ensemencée dans un tube), puis incuber les tubes à 37 °C pendant 48 à 72 heures.

◆ **Lecture**

Sont considérés positifs les tubes caractérisés par une pigmentation bleue qui réfère à la production de la pyocyanine.

3.7.2.2 Test sur King B

La gélose King B permet la détection de la synthèse de la pyoverdine, pigment élaboré par *Pseudomonas aeruginosa*. Ce test peut être réalisé en parallèle avec le premier, suivant des étapes plus ou moins similaires, à savoir :

- Préparer pour chaque boîte GN positive un tube avec de la gélose King B.
- Ensemencer chaque tube, à partir d'une boîte GN positive, en faisant une strie médiane à la surface de la gélose avec l'anse de platine. Incuber à 37°C pendant 5 jours.

◆ **Lecture**

Sont considérés positifs les tubes présentant une coloration verte fluorescente qui correspond à la synthèse de la pyoverdine.

3.8 Salmonella

En général, la recherche des salmonelles nécessite quatre phases successives : pré-enrichissement, enrichissement, isolement et identification, et confirmation (Fig. 16).

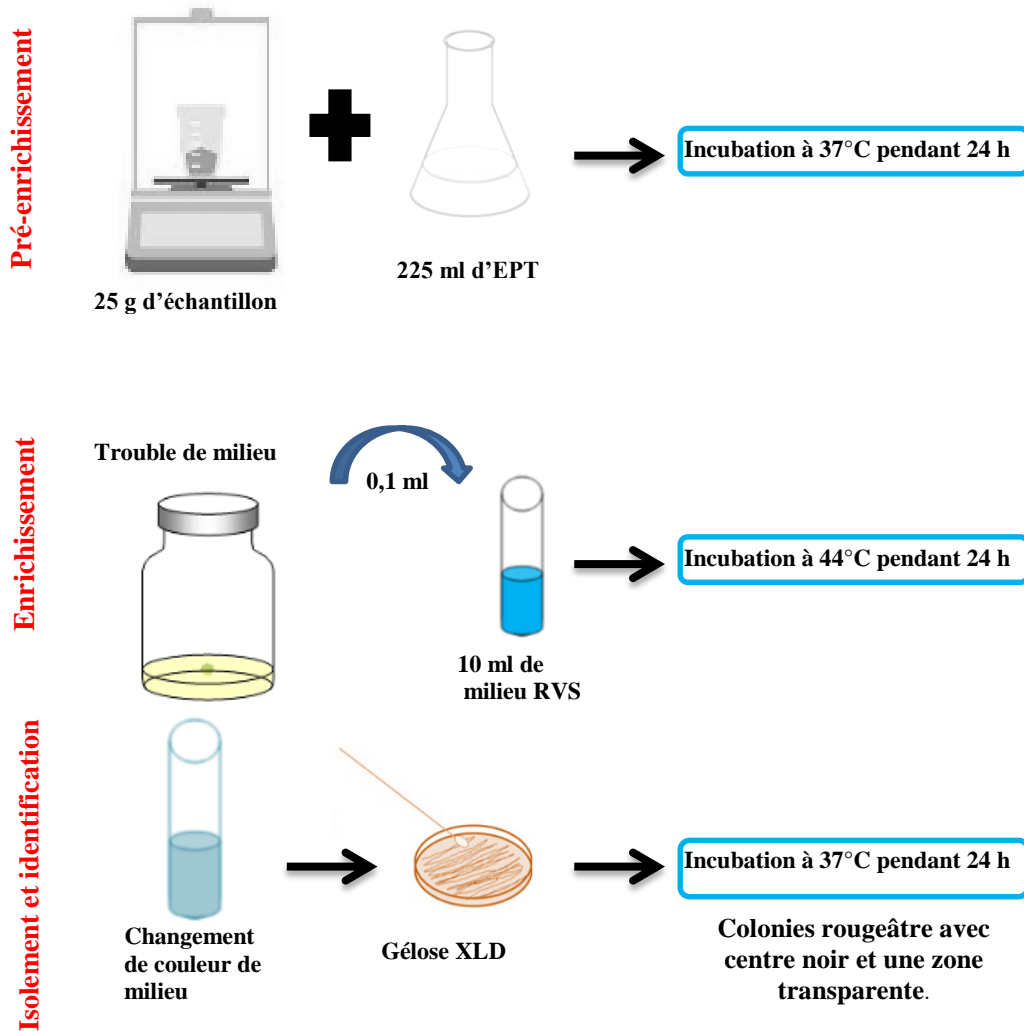


Fig. 16 Méthode de recherche des salmonelles

3.8.1 Pré-enrichissement

- Peser aseptiquement 25 g de la glèbe de terfesse dans un flacon à vice stérile.
- Ajouter 225 ml d'Eau Peptonée Tamponnée (EPT) et bien agiter, puis Incuber le flacon à 37 °C pendant 24h.

Remarque

Si le poids de l'un des échantillons ne permet d'utiliser 25g juste dans cette analyse, nous pouvons changer à la méthode suivante :

- Peser Xg de la glèba et lui ajouter quatre fois son poids (X x 4g) EPT.
- Bien agiter, puis incuber dans les mêmes conditions précédentes (37 °C / 24h).

◆ **Lecture**

Le résultat positif est reconnu grace au trouble du milieu.

3.8.2 Enrichissement

- Transférer, à l'aide d'une pipette pasteur 0.1 ml du flacon du pré-enrichissement incubé, dans un tube à essai contenant 10 ml du milieu d'enrichissement RVS, et incuber à 44°C pendant 24h.

◆ **Lecture**

Le résultat se traduit par un changement de couleur du milieu en bleuâtre.

Si le résultat est négatif, l'étude s'arrête à ce stade. Sinon, il faut procéder aux prochaines étapes d'isolement et identification et de confirmation. N'ayant pas été réalisées, ces dernières étapes ne sont pas expliquées dans le présent chapitre. L'étape d'isolement et identification peut toutefois être consultée dans l'Annexe 2 de ce document.

4. Méthode d'interprétation des résultats

À la fin du travail pratique réalisé pour vérifier la qualité microbiologique des terfesses ; les résultats trouvés sont comparés à des normes du journal officiel de la république algérienne du 02 juillet 2017 ou à des normes internationales trouvées dans d'autres références (Site web 6). L'interprétation de ces résultats peut suivre deux méthodes différentes : l'une se fait selon ce qu'on appelle un plan d'échantillonnage à deux classes et l'autre selon un plan d'échantillonnage à trois classes (Fig. 17).

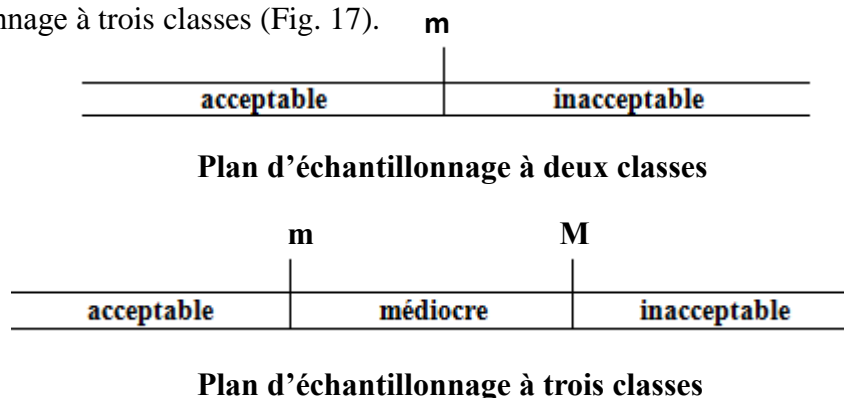


Fig. 17 Méthodes d'interprétation des résultats

La méthode suivant un plan à deux classes est utilisée lorsque « c » est égal à 0. Dans cette méthode, l'échantillon est « satisfaisant » si les résultats sont inférieurs à « m », ou « non satisfaisant » si les résultats sont supérieurs à « m ».

La méthode suivant un plan à trois classes quant à elle, est utilisée lorsque « c » est différent de 0. Dans cette méthode l'échantillon est « satisfaisant » si les résultats sont inférieurs à « m », « non satisfaisant » si l'un des résultats est supérieur à « M », et « acceptable » si aucun résultat n'est supérieur à « M » et le nombre des résultats dans l'intervalle entre « m » et « M » est compris entre 1 et « c ».

Nota bene

Etant donné qu'il n'y a pas de normes pour tous les paramètres étudiés, désignées pour ce genre de denrées alimentaires, les résultats de certains germes à l'état frais et/ou cuit sont comparés à des normes d'autres types de denrées alimentaires juste à titre informatif. Ces comparaisons cependant, elles ne peuvent servir à l'élaboration d'une conclusion quant à la viabilité ou non du lot analysé. Elles servent simplement à avoir une idée à propos de la teneur des échantillons en ces germes et à voir l'évolution de ces taux de l'état frais à l'état cuit.

Les paramètres n, m, c et M :

« n » est le nombre d'unité constituant l'échantillon.
« m » est le nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante.

« M » est le nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable ou non satisfaisante.

« c » est le nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté.

Les valeurs « m » et « M » des normes adoptées dans ce travail sont résumées dans le tableau 1 ci-après, avec « n » égal à 5 partout et « c » égal à 2 pour tous les paramètres analysés dans ce travail, sauf pour les salmonelles où il est égal à 0.

Tableau 1. Les normes officielles utilisées dans l'interprétation des résultats

	Frais ⁽¹⁾		Cuit ⁽²⁾	
	m	M	m	M
Flore aérobique mésophile totale	5.10 ⁶	5.10 ⁷	3.10 ⁵	3.10 ⁶
Levures et moisissure	10 ⁴	10 ⁵	10 ²	10 ³
Coliformes totaux et fécaux	10 ³	10 ⁴	10 ²	10 ³
<i>E. coli</i>	10 ²	10 ³	10	10 ²
Entérocoques et Streptocoque	5.10 ⁵	5.10 ⁶	10	10 ²
Anaérobies Sulfito-Réducteurs ⁽³⁾	10 ²	10 ⁴	5.10 ¹	5.10 ²
Staphylocoque à coagulase + ⁽³⁾	10 ³	10 ⁴	10 ²	10 ³
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absence			
Salmonelle	Absence dans 25g			

⁽¹⁾ : Les normes pour les résultats des échantillons analysés à l'état frais, sont tirées des valeurs dédiées aux « Légumes, fruits, végétaux et produits à base de végétaux » à la catégorie « Fruits et légumes prêts à l'emploi » c'est à dire lavés, épluchés, égouttés, coupés, râpés, emballés sous atmosphère modifiée ou non.

⁽²⁾ : Les normes pour les résultats des échantillons analysés à l'état cuit, sont tirées des valeurs dédiées aux « Plats préparés » à la catégorie « Plats préparés dont tous les ingrédients sont cuits ».

⁽³⁾ : Doses toxiques : 10⁵

■ Paramètre mentionné dans le journal officiel de la république algérienne pour ce genre de denrées alimentaire et donc pris en considération dans l'évaluation de la qualité microbiologique des échantillons étudiés.

■ Paramètre non mentionné dans le journal officiel de la république algérienne pour ce genre de denrées alimentaire et donc non pris en considération dans l'évaluation de la qualité microbiologique des échantillons étudiés. Ces normes sont prises d'autres catégories de denrées alimentaires dans le journal officiel ou carrément d'une autre référence (Site web **). Ces paramètre sont analysés à titre informatif et dans le but de l'étude préliminaire de la flore microscopique des ascocarpes des terfesses.

Chapitre III
Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. résultats de l'exploration du terrain

1. Physionomie générale de la zone d'échantillonnage

La zone d'échantillonnage (Fig. 18) se trouve dans un endroit connu sous le nom de « Oudey Eddibe », à environ 495 m d'altitude, et à une latitude de 32° 15' Nord et une longitude de 03° 38' Est.



Fig. 18 Zone d'échantillonnage



Fig. 19 Diversité floristique de la zone d'échantillonnage

A, B, C. Asteraceae ; D. *Cistanche sp.* ; E. *Henophyton deserti* Coss et Durieu. ; F. *Androcymbium sp.* ; G. Apiaceae ; H. « Hommid » ; I. *Echium sp.* ; J. Brassicaceae

Les deux endroits d'échantillonnage, bien qu'appartenant à la même zone, peuvent être considérés comme deux sites correspondant à deux propriétés privées, caractérisées par la présence de plusieurs espèces de plantes cultivées, notamment des gymnospermes (sapins), autour, probablement utilisés en guise de brise-vent et pour la protection et des angiospermes à l'intérieur. Ces derniers sont surtout des arbres fruitiers, tels des agrumes (oranger et citronnier), des grenadiers et des oliviers.

Ces vergers ne sont pas exemptes de plantes spontanées (Fig. 19 ci-avant). Celles-ci sont surtout représentées par des espèces herbacées ou arbustives comme des brassicacées, des astéracées, des plantes grasses, et bien évidemment des cistacées symbiotes des terfesses.

2. Partenaires de la symbiose à terfesse dans la région d'échantillonnage

Les espèces de terfesses récoltées, sont pour la plupart dures à cause de la sécheresse du terrain, et de petite taille (entre 2 et 5 cm de diamètre) (Fig. 20).



Fig. 20 Les échantillons de terfesse récoltés

Visiblement, elles paraissent appartenir aux genres *Terfezia* et *Tirmania* mais la confirmation de l'identification requiert une analyse moléculaire du périidium épluché, car l'identification morphologique se fait sur la glèbe et celle-ci était à peine suffisante pour l'analyse microbiologique ciblée.

En termes de cistacées ou partenaires verts des terfesses, le récolteur nous a informées que dans la région, il existe cinq différentes espèces de plante hôte, portant presque les mêmes noms communs connus ailleurs en Algérie, el-rgig et el-rgè, à la simple différence de prononciation entre les différentes régions.

D'après l'identification morphologique basée surtout sur l'observation sur terrain, il existe au moins deux espèces : *Helianthemum sp.* (*H. lippii*) et *Tuberaria sp.* (Fig. 21).



Helianthemum sp.



Tuberaria sp.

Fig. 21 Plantes hôtes des terfesses dans la zone d'étude

II. Qualité microbiologique des échantillons

Les résultats de la qualité microbiologique des échantillons étudiés ont été résumés dans le tableau 2 ci-après. Ces résultats ont été discutés par paramètre puis par échantillon avant de passer à la conclusion générale tirée de cette étude préliminaire de la qualité microbiologique et de la microflore des terfesses algériennes en provenance de la wilaya de Ghardaïa.

1. Flore aérobie mésophile totale

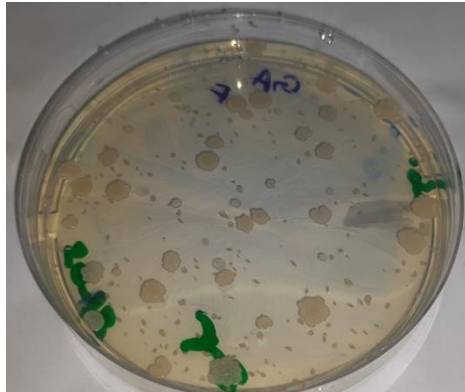


Fig. 22 Résultat des Germes aérobies sur milieu GN

Les résultats de dénombrement des germes aérobies à l'état frais pour les échantillons 1, 2, 4 et 5 montre que les dilutions jusqu'à 10^{-4} sont indénombrables, on outre l'échantillon 3 est indénombrable dans toutes les dilutions. À l'état cuit, nous observons que l'échantillon 1 et 5 marquent une présence des germes recherchés juste dans la suspension mère (10^{-1}), tandis que les échantillons 2 et 4 sont positifs à la deuxième dilution aussi, et l'échantillon 3 jusqu'à la troisième (10^{-3}). Cet échantillon est d'ailleurs le plus chargé en termes de germes aérobies que tous les autres échantillons dans les deux états frais et cuits.

La comparaison de ces résultats avec les normes adoptées, montre que la charge bactérienne de tous les échantillons à l'état frais sur les boîtes dénombrables est située dans l'intervalle [$5 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^7$], donc dans les normes d'acceptabilité pour fruits et légumes frais, prêts à l'emploi. À l'état cuit, cette charge baisse considérablement et se trouve dans les normes de satisfaction désignées pour les plats préparés dont tous les ingrédients sont cuits.

2. Levures et Moisissures

À l'état frais les échantillons montrent tous une charge indénombrable jusqu'aux dernières dilutions (10^{-4} et/ou 10^{-5}). À l'état cuit, cette charge est très considérablement réduite à des taux dénombrables dans les premières dilutions et à zéro dans les autres.

Tableau 2. Résultats de l'étude de la qualité microbiologique des échantillons de terfesses étudiés

Échantillons Paramètres		Échantillon 1		Échantillon 2		Échantillon 3		Échantillon 4		Échantillon 5			
		Frais	Cuit	Frais	Cuit	Frais	Cuit	Frais	Cuit	Frais	Cuit		
Flore aérobie mésophile totale		IND	1.1x10 ¹	IND	1.1x10 ²	IND	6.5x10 ²	IND	4.3x10 ²	IND	5.3x10 ²	10 ⁻¹	Dilutions
		IND	-	IND	1x10 ²	IND	5.5x10 ²	IND	1.5x10 ²	IND	-	10 ⁻²	
		IND	-	IND	-	IND	5x10 ²	IND	-	IND	-	10 ⁻³	
		IND	-	IND	-	IND	-	IND	-	IND	-	10 ⁻⁴	
		3.7x10 ⁷	-	3.5x10 ⁷	-	IND	-	1.1x10 ⁷	-	9.9x10 ⁶	-	10 ⁻⁵	
Levures & Moisissures		IND	5x10 ¹	IND	4x10 ¹	IND	5.5x10 ¹	IND	10 ¹	IND	1.7x10 ²	10 ⁻¹	Dilutions
		IND	-	IND	-	IND	-	IND	-	IND	10 ²	10 ⁻²	
		IND	-	IND	-	IND	-	IND	-	IND	-	10 ⁻³	
		1.6x10 ⁵	-	IND	-	8.9x10 ⁵	-	IND	-	2.5x10 ⁵	-	10 ⁻⁴	
		10 ⁵	-	3.2x10 ⁷	-	7.5x10 ⁵	-	7.8x10 ⁶	-	3.1x10 ⁵	-	10 ⁻⁵	
Coliformes (totaux, fécaux, <i>E. coli</i>)		1.1x10 ³	-	-	-	0.4x10 ¹	-	0.7x10 ¹	-	1.1x10 ¹	-	totaux	Dilutions
		-	/	/	/	-	/	-	/	-	/	fécaux	
		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	<i>E. coli</i>	
Entéro	Entérocoque	>1.1x10 ³	4.6x10 ²	>1.1x10 ³	-	>1.1x10 ³	2.4x10 ²	>1.1x10 ³	>1.1x10 ³	>1.1x10 ³	1.2x10 ²	Entéro	Dilutions
	Streptocoque	/	+	/	/	/	+	/	+	/	+	Conf. 1 EVA	
	S. Groupe D	/	+	/	/	/	+	/	+	/	+	Conf. 2 BEA	
ASR		-	-	-	-	-	-	-	1x10 ³	-	-	/	Dilutions
Staphylocoques	à coagulase positive contaminants	-	-	-	-	3.4x10 ³	3.1x10 ³	1.1x10 ³	8.5x10 ²	10 ³	10 ²	10 ⁻¹	
		-	-	-	-	5x10 ³	2.5x10 ³	10 ³	5.2x10 ²	-	-	10 ⁻²	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ⁻³	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10 ⁻⁴	
	<i>S. aureus</i>	/	/	/	/	-	-	+	+	+	+	ADNase	
	/	/	/	/	-	-	+	+	+	+	Catalase		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	Test prés.	Dilutions
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Test conf.		
Salmonelle		+	/	+	/	+	/	+	/	+	/	Pré-enrich	Dilutions
		-	/	-	/	-	/	-	/	-	/	Enrichiss.	

IND : Résultat indénombrable. ; « - » : Résultat négatif ; « + » : Résultat positif ; « / » : Paramètre non analysé

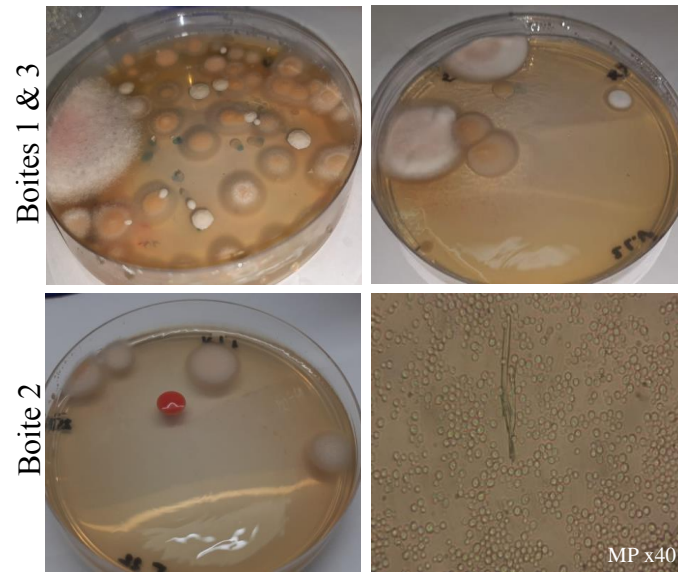


Fig. 23 Résultat des Levures et Moisissures

La charge des levures et moisissures dans les échantillons frais excède les normes critiques maximales d'acceptabilité retenues dans ce travail. À l'état cuit, les taux sont en dessous de la valeur minimale donc les échantillons sont dans les normes de la satisfaction. Cette comparaison est effectuée juste à titre informatif, vu que les normes qui y sont utilisées ne sont pas désignées pour ce genre de denrées alimentaires spécialement.

3. Coliformes totaux, fécaux et *E. coli*

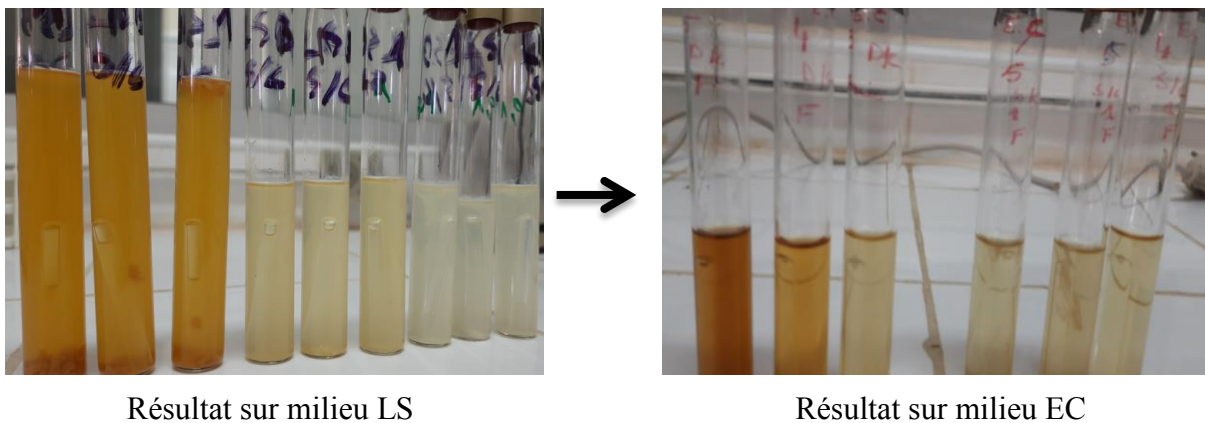


Fig. 24 Résultat de la recherche des Coliformes totaux et fécaux

À l'état frais, le résultat du dénombrement des coliformes totaux est positif pour les échantillons 1, 3, 4 et 5 ; et négatif pour l'échantillon 2. La présence de coliforme totaux dans les ascocarpes

précédemment cités nous a menées à l'étape de la recherche de coliformes fécaux, lesquels n'ont été détectés en aucun échantillon. Par conséquent, l'analyse s'arrête à ce deuxième stade pour ces échantillons, et la recherche d'*E. coli* qui appartient à la famille des coliformes fécaux, n'est pas effectuée à cause de l'absence de ces derniers. Au stade cuit cependant, l'absence de la grande famille de coliforme totaux dans tous les échantillons a fait stoppé la recherche de ce groupe à cette étape avec déduction d'absence des coliformes fécaux et d'*E. coli* partout.

À titre informatif, pour ce paramètre également, nous pouvons dire que les résultats de l'analyse des échantillons à l'état frais sont tous en dessous de la norme minimale donc dans la plage de satisfaction sauf pour l'échantillon 1 dont le résultat se trouve dans l'intervalle d'acceptabilité. Pour les échantillons cuits, l'absence totale est sans comparaison signe de satisfaction des échantillons par rapport à ces germes.

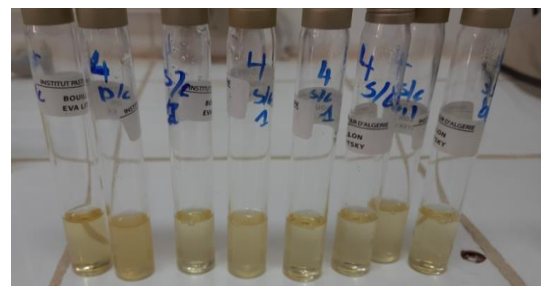
4. Entérocoques et Streptocoques

A l'état frais, les résultats de contrôle des entérocoques montrent leur présence dans les cinq échantillons. Ce résultat est traduit dans nos échantillons, par l'apparition d'une pastille blanche semblable à une hélice d'ADN, au lieu de la pastille violette habituelle. La couleur blanche inhabituelle nous a induites en erreur, nous n'avions donc pas considérés le résultat de présence des entérocoques positif au début, et avons donc arrêté l'étude pour les échantillons frais à ce stade. Par conséquent, la confirmation de présence des streptocoques n'a pas été effectuée.

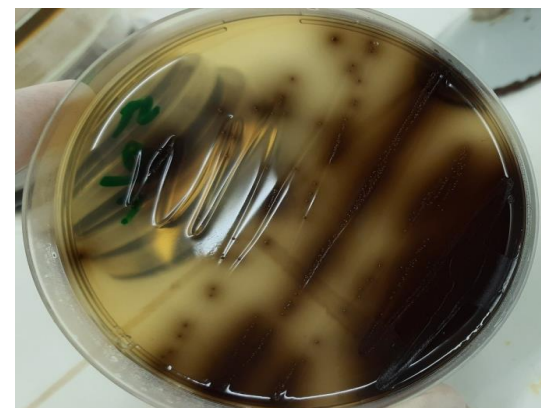
En outre, à l'état cuit, nous avons pris pour positifs tous les tubes avec pastille blanche (sauf l'échantillon 2 qui n'en présentait aucune). Le premier test confirmatif sur milieu EVA était positif pour les quatre échantillons (1, 3, 4 et 5) confirmant ainsi la présence de Streptocoques fécaux. Le deuxième test confirmatif sur gélose



Lecture sur milieu Rothe



Lecture sur milieu EVA



Lecture sur milieu BEA

Fig. 25 Résultats de la recherche des Streptocoques

BEA, était à son tour positif pour tous les quatre et a confirmé qu'il s'agit bien de streptocoques groupe D.

Afin d'interpréter ces résultats, nous les avons comparé aux normes désignées pour la flore lactique, étant donné que ces germes font partie de cette flore. Cette comparaison montre que le taux des entérocoques dans tous les échantillons est en dessous du « m », donc dans la plage de satisfaction. À l'état cuit, les résultats sont comparés juste à titre informatif avec les normes désignées pour plats préparés, et sont trouvés supérieurs à la norme maximale donc dans l'intervalle de non satisfaction.

5. Anaérobies Sulfito-Réducteurs

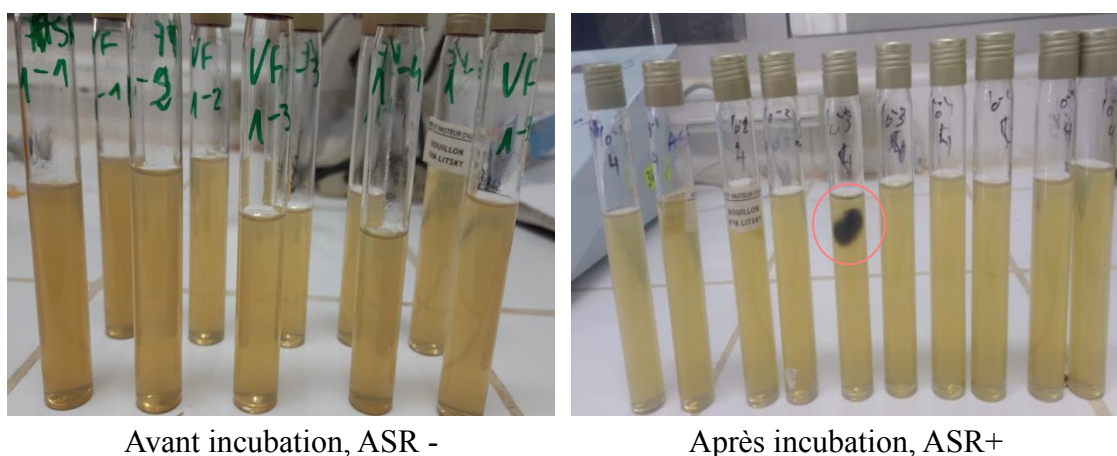


Fig. 26 Résultats des ASR sur milieu VF

Nous avons observé l'absence des anaérobies sulfito-réducteurs dans tous les échantillons à l'état frais et cuit, sauf dans l'échantillon 4, dilution 10^{-3} après cuissons. Le taux des ASR dans ce sous-échantillon franchit la barre de la norme maximale d'acceptabilité déterminée dans le journal officiel et atteint le seuil de non satisfaction.

6. Staphylocoques

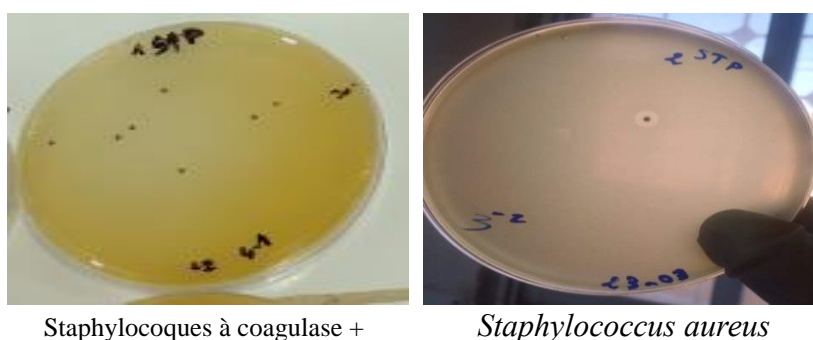


Fig. 27 Résultats des Staphylocoques

Les échantillons 1 et 2 frais et cuits sont exempts de staphylocoques à couagulase positives. Les échantillons 3, 4 et 5 à l'état frais présentent des colonies noires caractéristiques des staphylocoques à couagulase positive contaminants. Ces échantillons ont une catalase et une ADNase positives qui confirment la présence de *staphylococcus aureus*.

À l'état cuit, les tubercules 3, 4 et 5 marquent la présence des staphylocoques à couagulase positive. Les tests confirmatifs Catalase et ADNase sont positifs pour les échantillons 4 et 5 ce qui confirme la présence de *staphylococcus aureus* dans ces échantillons. En outre, ces tests sont négatifs pour l'échantillon 3 ce qui signifie que cet échantillon ne contient pas *S. aureus*.

Par une comparaison aux normes les plus répondus pour ce germe, on remarque que les résultats à l'état frais ne dépassent pas le seuil maximal d'acceptabilité. À l'état cuit, ce résultat reste dans l'intervalle d'acceptabilité pour les échantillons 4 et 5, et dépasse le seuil maximal d'acceptabilité pour l'échantillon 3 qui se trouve dans la plage de non satisfaction.

7. *Pseudomonas aeruginosa*

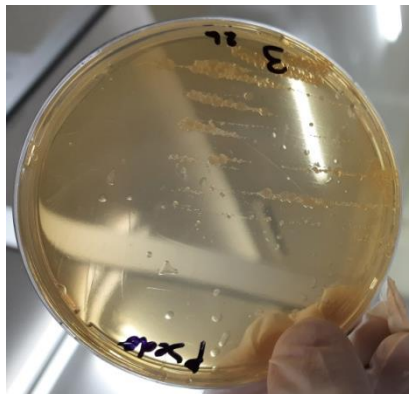


Fig. 28 Colonies de *Pseudomonas aeruginosa*

Les tests présomptifs de *Pseudomonas aeruginosa* révèle des colonies suspectes et un résultat positif partout. Cependant, les tests confirmatifs sont négatifs sur King A et B ce qui infirme la présence de ce germe dans les échantillons frais. Après cuisson, dès le test présomptif le *Pseudomonas aeruginosa* n'était pas détecté.

8. Salmonelles

Le résultat du pré-enrichissement des salmonelles montre un trouble avec un dégagement de gaz dans tous les échantillons. Ce résultat positif nous a menées à l'étape de l'enrichissement sur RVS, dont les résultats négatifs ont infirmé la présence de ce germe dans l'ensemble des échantillons analysés. Tant que les salmonelles ne sont pas détectées à l'état frais, l'analyse à

l'état cuit n'a pas été réalisée afin de privilégier l'analyse des paramètres précédents difficiles à prévoir d'après les résultats des sous-échantillons frais. Ce choix a dû se faire à cause de la quantité des échantillons insuffisante pour tous les paramètres.

L'absence totale des salmonelles dans les échantillons est conforme aux normes critiques du journal officiel qui considèrent ce germe comme un paramètre à norme zéro dont la présence dans les aliments n'est strictement pas tolérée.

En termes d'échantillons, nous constatons que les deux premiers sont acceptables à l'état frais et satisfaisants à l'état cuit, le troisième et le quatrième sont respectivement satisfaisant et acceptable à l'état frais, mais tous deux non satisfaisants après cuisson (ASR et/ou Staphylocoques) et le cinquième échantillon acceptable aussi bien à l'état frais que cuit. Le lot des cinq échantillons est donc jugé acceptable à l'état frais et non satisfaisant à l'état cuit.

Ces résultats ne peuvent naturellement pas être généralisés sur toutes les terfesses, et ne peuvent refléter que la qualité des tubercules récoltés de la région d'étude précisément. Ils peuvent également avoir été influencés par l'état des ascocarpes asséchés et récoltés un peu vers la fin de la saison, sachant que d'après le cycle biologique du champignon, ces périodes sont le début de la détérioration des ascocarpes dans le but de libérer les spores pour que le cycle recommence. Bien que paraissant péjoratifs, ces deux points (période de récolte et état des ascocarpes) peuvent être perçus mélioratifs du fait qu'ils nous renseignent des dangers que peuvent porter les terfesses partiellement abimées d'une part, et de la flore microscopique de ce champignon d'autre part, surtout que les répétitions et les conditions d'aseptie confirment, ou presque, la provenance endogène des microorganismes retrouvés.

De plus, ces résultats nous font penser que le sol de la région est probablement contaminé. Nous suspectons une contamination ancienne via le résultat positif des ASR, et une récente déuite à travers les résultats positifs des streptocoques. Cette analyse n'est que préliminaire et la confirmation de cette contamination requiert des études sur le sol lui-même. Si cette contamination se confirme, elle ne toucherait pas les terfesses seulement, mais toutes les autres cultures, notamment celles dont la partie consommable est sous terraines donc en contact direct avec le sol.

Par ailleurs, Les résultats positifs des staphylocoques dans trois échantillons parmi les cinq étudiés nous a mené à la recherche d'une explication convaincante. Il en est ressorti que la réfrigération des échantillons entre 4 et 7°C après cuisson et avant analyse de ce paramètre (le

temps de finaliser les autres expérimentations des échantillons frais) a favorisé la prolifération de ces germes dont les températures à moins de 4°C empêchent la prolifération et des températures de 4°C la favorisent (Site web, 1). D'après ces informations, il est possible de déduire que la réfrigération des terfesses ne soit pas une si bonne pratique. La congélation serait probablement mieux, sinon, le cas échéant, la consommation des ascocarpes fraîchement récoltés qui est d'ailleurs meilleure de plusieurs points de vue.

Outre cela, le résultat positif des ASR après cuisson était également intéressant à clarifier. Tel que déjà mentionné dans le premier chapitre du manuscrit, les ASR sont capables de résister aux conditions défavorables de leur environnement grâce à la formation de spores pouvant supporter des températures allant jusqu'à 110°C pendant 10 minutes et qui avec le retour des conditions favorables redonnent naissance à des cellules végétatives aptes à la germination (Site web, 1). L'explication du résultat se trouve donc dans les conditions de cuisson. Celle-ci a été réalisée à 100°C pendant un maximum de 10 minutes pour les échantillons les plus durs. Ceci dit que les échantillons n'ont pas eu le temps et les conditions de cuisson nécessaires pour invalider les spores des ASR. Au lieu de cela, le traitement thermique a provoqué la lésion de l'enveloppe sporale et donc l'activation de la spore. Au retour aux conditions favorables sur le milieu de culture avec incubation à la température optimale les ASR ont germé de nouveau donnant la colonie à l'origine du résultat positif observé. Ce résultat est particulièrement important dans la détermination des conditions de cuisson des terfesses, préférablement bouillies pendant une période excédant les 10 minutes avant cuisson dans des mets et avant consommation.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et perspectives

A l'issu de ce travail nous avons conclu que les échantillons de terfesses durs et asséchés, récoltés de la région de Metlili, wilaya de Ghardaia, vers la fin du mois de mars, forment à leur état frais un lot acceptable comme aliment d'un point de vue microbiologique, et un lot non satisfaisant après cuisson à 100°C pendant 5 à 10 minutes.

Ces résultats ne viennent bien évidemment pas bannir la consommation des terfesses, mais au contraire favoriser une consommation saine et bénéfique de ce champignon qui regorge de bienfaits et dont la valeur aussi bien nutritive que gastronomique sont indiscutables.

Les causes de cette qualité médiocre ne reviennent pas forcément à la qualité des terfesses de la région elles-mêmes, même si cela reste à vérifier, mais à l'état du sol qui paraît comporter des contaminations anciennes et récentes, à la période de récoltes tardive des ascocarpes concernés par l'étude ainsi qu'à leur état dû à la fois à la période de récolte justement, et à la fois à l'état du sol très sec et défavorable à une bonne fructification du champignon.

Le résultat non satisfaisant après cuisson n'est, lui aussi, pas forcément dû à des conditions intrinsèques uniquement. Il peut bel et bien avoir été causé par la cuisson réalisée en une seule étape et n'ayant pas excédé les 10 minutes.

Ces résultats, ainsi que tous les autres détaillés dans le manuscrit nous ont mené à dresser une liste non exhaustive des bonnes pratiques à adopter pour une consommation sans danger des terfesses par toutes ces populations qui les savourent et les attendent d'année en année. Parmi ces pratiques, nous citons les suivantes :

- Récolter les terfesses en bonne période et éviter les fin de saison de fructification
- Privilégier les ascocarpes de bonne texture, propres et exempts de parties endommagées.
- Pré-cuire les terfesses dans de l'eau bouillante pendant plus de 10 minutes avant leur inclusion dans la préparation des mets et avant leur consommation.
- Préférer les terfesses fraîchement récoltées à celles réfrigérées.
- Eviter la consommation directe après réfrigération des terfesses cuites, sinon procéder à un bon chauffage à haute température (plus de 100°C) pendant plus de dix minutes.

- Si pas sûr de la qualité microbiologique des terfesses récoltées ou achetées sur les marchés, les consommer avec prudence, notamment pour les femmes enceintes, les enfants et les sujets dont l'immunité est affaiblie par quelque cause que ce soit.

Il est indispensable de noter que malgré les germes détectés, nous n'avons pas entendu auparavant de cas d'intoxications alimentaires dues aux terfesses. Leur place dans la gastronomie et leur valeur nutritive restent préservées, et la prudence à l'égard de leur consommation n'en réduit aucunement l'une ou l'autre de leurs vertus.

En plus de répondre à sa problématique et d'atteindre son objectif en déterminant, ne serait-ce que pour les échantillons testés, la qualité microbiologique des terfesses, le présent travail a également pu contribuer à cerner quelques bonnes pratiques à adopter pour une consommation saine et bénéfique des terfesses. Il a également constitué une base à de futures recherches.

En perspective, il serait judicieux de :

- Étendre l'étude de la qualité microbiologique sur les terfesses de différentes régions.
- Comparer la qualité microbiologique de différentes espèces de terfesses.
- Réaliser une étude microbiologique sur la qualité des terfesses mises en vente sur les marchés.
- Vérifier l'évolution de la qualité microbiologique des terfesses dans différentes conditions de cuisson et de conservation.
- Vérifier la qualité microbiologique du sol à terfesse et de l'eau qui l'arrose (le cas échéant), afin de contribuer à la vérifier de la nature (endogène ou exogène) de ces microorganismes.

Références bibliographiques

Bibliographie

Alsheikh, A. M., & Trappe, J. M. (1983b). Taxonomy of *Phaeangium lefebvrei*, a desert truffle eaten by birds. Canadian Journal of Botany, 61(7): 1919-1925.

Alsheikh, A. M. (1994). Taxonomy and mycorrhizal ecology of the desert truffles in the genus *Terfezia*.

Alsheikh, A. M., & Trappe, J. M. (1983). Desert truffles: The genus *Tirmania*. Transactions of the British Mycological Society, 81(1): 83-90.

Alsheikh, A. M., & Trappe, J. M. (1983a). Desert truffles: The genus *Tirmania*. Transactions of the British Mycological Society, 8(1): 83-90.

Arioui, S. (2013). Etude des sols à terfez et leurs associés et accompagnatrices dans la région Sud-ouest de la wilaya de Bechar. Thèse de Magister. Faculté des Sciences et Technologies, Béchar, 78 p.

Awameh, M. S., & Alsheikh, A. (1980b). Features and analysis of spore germination in the brown kame *Terfezia claveryi*. Mycologia, 72(3): 494-499.

Awameh, M. S., & Alsheikh, A. M. (1980). Features and Analysis of Spore Germination in the Brown Kamé *Terfezia claveryi*. Mycologia, 72(3): 494-499.

Bellameche ,A.,et Raoudi S (2020) . Étude Microbiologique Des Terfesses Algériennes. Diplôme de mastre . Univ Ghardaia, Algérie ,19p .

Bencivenga, M., & Urbani, G. (1996). Yields white truffles in a truffle ground cultivated for three years. Informatore-Agrario, 52: 25-26.

Bendahou, H. (2013). Ecologie des terfez de la région Nord Est de la Wilaya de Bechar. Thèse de Magister. Faculté des Sciences et Technologies, Béchar, 67 p.

Boucher, R. C. (1999). Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. The Journal of Physiology, 516(3): 631-638.

Boucher, R. C. (1999). Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. The Journal of Physiology, 516(3): 631-638.

- BOUSLAMA N.(2010). Étude de l'activité de la microflore des sols à terfez : *Terfezia boudieri* Chatin , mémoire de MAGISTER, Université d'ORAN ,P18-9-20.
- Bradai, L. (2014). Inventaire et bio-écologie des Terfez dans quelques régions du Sahara septentrional (Oued M'ya, Oued Righ et Ghardaïa), Thèse de doctorat, Univ Kasdi Merbah Ouargla, Algérie, 16 p.
- Bradai, L. (2014). Inventaire et bio-écologie des Terfez dans quelques régions du Sahara septentrional (Oued M'ya, Oued Righ et Ghardaïa), Thèse de doctorat, Univ Kasdi Merbah Ouargla, Algérie, 16 p.
- Bradai, L., Bissati, S., & Chenchouni, H. (2014). Desert truffles of the North Algerian Sahara: Diversity and bioecology. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(5): 10.
- Bradai, L., Bissati, S., & Chenchouni, H. (2014a). Desert truffles of the north Algerian sahara: Diversity and biotecology. *Emir J Food Agric*, 26(5): 425-435.
- Callot, G. (1999). *La Truffe, la Terre, la Vie*. INRA, Paris, 210 p.
- Chatin, A. (1869). Etude des conditions générales de la production truffières. In *primerie et librairie de Bouchard-Huzard*, Paris, 200 p.
- Chatin, A. (1891). Contribution à l'histoire botanique de la truffe: kamé de Damas (*Terfezia claveryi*). *Bulletin de la Société Botanique de France*, 38: 332-335.
- Chatin, A. (1896a). Un terfas d'Espagne et trois nouveaux terfas du Maroc. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 43: 397-399.
- Chevalier, G., Rioussel, L., Rioussel, G., & Dupre, C. (2004). Truffles et terfez communes à la France et au Maroc. Premier symposium sur les champignons hypogés du bassin méditerranéen, Rabat (Maroc), 23 p.
- Comandini, O., Contu, M., & Rinaldi, A.C. (2006). An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16: 381-395.
- Dafri , A.,et Beddair,A. (2017) . Les terfezs des dunes littorales du Nord - Est algérien : Localisation , Identification et Symbiose . thèse de doctorat . Univ Annaba , Algérie ,34 p .

- Diez, J., Manjon, J.L., & Martin, F. (2002). Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia*, 94(2): 247-259.
- El-Kholy, H. (1989). Genetical and Physiological Studies on Truffles. PhD. Thesis, Fac. of Agric., Cairo University (Egypt), 46-82.
- Fortas, Z. (1990). Etude de trois espèces de terfez : Caractères culturaux et cytologie du mycélium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*. Thèse de Doctorat , Univ Oran Es-sénia (Algérie), INRA de Clermont-Ferrand (France), 166 p.
- Fortas, Z. (2004). Ecologie et production naturelle des terfez d'Algérie. Premier symposium sur les champignons hypogés du bassin méditerranéen, Rabat (Maroc), 24-25.
- Fortas, Z., & Chevalier, G. (1992a). Effet des conditions de culture sur la mycorhization de *Helianthemum guttatum* par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *tirmania* d'Algérie. *Canadian Journal of Botany*, 70: 2453-2460.
- Fortas, Z., & Chevalier, G. (1992b). Caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe, récoltés en Algérie. *Cryptogamie, Mycol*, 13: 21-29.
- Gücin, F., & Dülger, B. (1997). Yenen ve antimikrobiyal aktiviteleri olan keme mantarı (*Terfezia boudieri* Chatin) üzerinde araştırmalar. *Nisan-Mayis-Haziran*, 23: 27-33.
- inhibitors and activators. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15): 6140-6145.
- Jamali, S., & Banihashemi, Z. (2012a). Fungi associated with ascocarps of desert truffles from different parts of Iran. *J. Crop Prot*, 1(1): 41-47.
- Janex-Favre, M. C., Parguey-Leduc, A., & Rioussel, L. (1988). L'ascocarpe hypogé d'une terfez française (*Terfezia leptoderma* Tul., Tubérales, Discomycètes). *Bulletin de la Société Mycologique de France*, 104: 145-178.
- Kagan-Zur, V., & Akyuz, M. (2014). « Asian Mediterranean Desert Truffles. In Kagan-Zur V., Roth-Bejerano N., Sitrit Y., Morte A., (eds), *Desert Truffles Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication*» *Soil Biology Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 38: 159-172.
- Kagan-Zur, V., & Roth-Bejerno, N. (2008). Desert Truffles. *Fungi*, 1(3): 32-37.

- Kagan-Zur, V., Kuang, J., Tabak, S., Taylor, F.W., & Roth-Bejerano, N. (1999). Potential verification of a host plant for the desert truffle *Terfezia pfeillii* by molecular methods. *Mycological Research*, 103(10): 1270-1274.
- Kagan-zur, V., Zaretsky, M., Sitrit, Y., & Roth-Bejerano, N. (2008). *Hypogeous Pezizaceae: Physiology and Molecular Genetics*. *Mycorrhiza*, 23: 05-06.
- Kermani, I. (2013). Mycorrhization contrôlée d'une Cistacée pérenne par les terfez en conditions gnotoxéniques et essai de transplantation sur le terrain. Thèse de Magister, Univ d'Oran, 115 p.
- Khabar, L., Najim, L., Janex-Favre, M. C., & Parguey-Leduc, A. (2001). Contribution à l'étude de la flore mycologique du Maroc. Les truffes marocaines (Discomyètes). *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France*, 117(3): 213-229.
- Kovács, G. M., & Trappe, J. M. (2014). Nomenclatural History and Genealogies of Desert Truffles. In *Desert Truffles* Springer Berlin Heidelberg, 21-37.
- Læssøe, T., & Hansen, K. (2007). Truffle trouble: what happened to the Tuberales. *Mycological research*, 3: 1075-1099.
- Ławrynowicz, M., Markowicz, M., Milenković, M., & Ivančević, B. (1997). *Terfezia Terfezioides* a new hypogeous fungus for Balkan Peninsula. *Acta Mycologica*, (32): 233-238.
- Liu, L.-N., Razaq, A., Atri, N.S., Bau, T., Belbahri, L., Chenari Bouket, A., Chen, L.-P., Deng, C., Ilyas, S., Khalid, A.N., Kitaura, M.J., Kobayashi, T., Li Y., Lorenz, A.P., Ma Y.-H., Malysheva, E., Malysheva, V., Nuytinck, J., Qiao, M., Saini, M.K., Scur, M.C., Sharma, S., Shu, L.-L., Spirin, V., Tanaka, Y., Tojo, M., Uzuhashi, S., Valério-Júnior, C., Verbeken, A., Verma, B., Wu R.-H., Xu J.-P., Yu, Z.-F., Zeng, H., Zhang, B., Banerjee, A., Beddiar, A., Bordallo, J.J., Dafri, A., Dima, B., Krisai-Greilhuber, I., Lorenzini, M., Mandal, R., Morte, A., Nath, P.S., Papp, V., Pavlík, J., Rodríguez, A., Ševc'íková, H., Urban, A., Voglmayr, H. & Zapparoli, G. (2018). *Fungal Systematics and Evolution: FUSE 4. – Sydowia* 70: 211-286.
- Loizides, M., Hobart, C., Konstandinides, G., & Yiangou, Y. (2011). Desert truffles: The of mysterious jewels antiquity. *Field Mycology*, doi : 13 (1) : 17-21 , 10.1016 / j.fldmyc.2014.12.004.

Mandeel, Q. A., Al-Laith, A. (2007). Ethnomycological aspects of the desert truffle among native Bahraini and non-Bahraini peoples of the Kingdom of Bahrain. *Journal of Ethnopharmacology*, 118-129.

Mokkadem, K., (2013). Caractéristiques pédoclimatiques et phytosociologiques des terfez de la région de Sud-Est de la wilaya de Becher. Mémoire de Magister, univ d'Oran Es-sénia, 83 p.

Moreno, G., Diez, J., & Manjon, J. L. (2000). *Picoa lefebvrei* and *Tirmania nivea*, two are hypogeous fungi from Spain. *Mycological Research*, 104 (3): 378-381.

Navarro-Ródenas, A., Lozano-Carrillo, M. C., Pérez-Gilabert, M., & Morte, A., (2011). Effect of water stress on in vitro mycelium cultures of two mycorrhizal desert truffles. *Mycorrhiza*, 21(4): 247-253.

Ricard, J. M. (2003). *La Truffe—Guide technique de trufficulture*. [The truffle—technical guide of truffle cultivation] Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes CTIFL. Paris (in French), 33, 48, 49, 50.

Roth-Bejerano, N., Li, Y. F., & Kagan-Zur, V. (2004). Homokaryotic and heterokaryotic hyphae in *Terfezia*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(2): 165-168.

Roth-Bejerano, N., Navarro-Rodenas, A., & Gutierrez, A. (2014). In : Types of Mycorrhizal Association. In V. Kagan-Zur et al. (eds.), *Desert Truffles, Soil Biology 38*, Springer Berlin Heidelberg, 69-80.

Roukbi, R. (2013). Etude écologique des terfez de la région nord-ouest de Béchar. Mémoire de Magister, Faculté des science et technologies, Béchar, 108 p.

Sawaya, W. N., Al-Shalhat, A., Al-Sogair, A., & Al-Mohammad, M. (1985). Chemical composition and nutritive value of truffles of Saudi Arabia. *Journal of Food Science*, 50(2): 450-453.

Slama, A., Neffati, M., Fortas, Z., Khabar, L., & Boudabous, A. (2006). Etude taxinomique de quelques ascomycota hypogés (terfeziaceae) de la Tunisie Méridionale. *Bulletin de la Société Mycologique de France*, 122(2-3): 187-195.

Trappe, J., Claridge, AW., Arora, D., & Smit, W. A. (2008). Desert Truffles of the African Kalahari: Ecology, Ethnomycology, and Taxonomy. *Economic Botany*, 62(3): 521-529.

Trappe, J.M. (1979). The orders, families and genera of hypogeous ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon*, 9: 297-340.

Zitouni, F. E-H. (2010). Étude des conditions mycorhiziennes entre quatre espèces de terfez et diverses plantes Cistacées et ligneuses en conditions contrôlées. Thèse de Magister, Univ Oran, Algérie, 264 p.

Zitouni, F.E. (2016). Etude de la diversité des truffes du désert et de leurs associations mycorhiziennes Thèse de Doctoral, Univ d'Oran1-Ahmed Ben Bella, 95 p.

عجائب المخلوقات و الحيوانات و غرائب الموجودات . Z. (2000) , (زكرياء بن محمد بن محمود القزويني -Al-

Kaiwinil

مؤسسة الأعلمی للمطبوعات ، بيروت ، لبنان ، 306

Webographie

Site web 1

<https://www.vigilab.com/documentation/fiches-microbiologie>

Site web 2

<https://www.sfm.uqam.ca/toxin/EAU/PARAMETR/GERMEANA.HTM>

Site web 3

<https://mobile.inspq.qc.ca/eau-potable/coliformes-fecaux>

Site web 4

<https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque#:~:text=Le%20staphylocoque%20dor%C3%A9%20peut%20infecter%20aucun%20sympt%C3%B4me%20ne%20soit%20d%C3%A9velopp%C3%A9>

Site web 5

<https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-salmonelle-7912/#:~:text=Les%20salmonelles%20appartiennent%20au%20genre,des%20fi%C3%A8vres%20typho%C3%AFdes%20et%20paratypho%C3%AFdes>

Site web 6

http://www.fcd.fr/media/filer_public/37/fd/37fd2d16-85a6-4059-acc4-c876bc023dc4/fcd_criteres_microbiologiques_2020_produits_ls_mp_vdef_15112019.pdf

Annexes

Annexe 1. Protocole de recherche d'*Escherichia coli*

Les tubes comptés positifs pour le dénombrement des coliformes fécaux sont utilisés dans l'analyse d'*Escherichia coli* dans l'échantillon. Ceci suit les mêmes étapes précédentes avec pour chaque tube EC positif, un tube contenant 5 ml d'Eau Peptonée Exempte d'Indole (EPEI), incubé à 44°C / 24 à 48 h.

◆ Lecture

Après incubation, on ajoute quelques gouttes de réactif de KOVACKS aux tubes montrant un trouble et on considère positif seulement les tubes qui présenteraient un halo rouge en surface (témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de KOVACKS).

La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de Mac Grady du NPP comme détaillé précédemment.

Annexe 2. Isolement et identification des salmonelles

Cette étape intervient dans le protocole de la recherche des salmonelles, après les deux premières étapes de pré-enrichissement et d'enrichissement. Elle s'effectue sur milieu gélosé XLD comme suit :

À partir de la culture d'enrichissement, ensemercer par la méthode des stries, la surface du milieu gélosé XLD coulé en boîte de pétri, puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

◆ Lecture

Après incubation, le résultat positif se présente sous forme de colonies rougeâtres avec un centre noir et une zone transparente.

Nota bene

Selon les caractéristiques des salmonelles retrouvées, les colonies peuvent se présenter différemment :

- *Salmonella* (H₂S⁻) sur gélose XLD : Colonies roses avec un centre rose foncé.
- *Salmonella* (Lact⁺) sur gélose XLD : Colonies jaunes avec ou sans noircissement du milieu.