

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 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Microbiologie Appliquée

Département : Écologie et Génie de l'Environnement

Thème :

Recherche des *Aspergillus Flavi* dans le blé et évaluation des risques des mycotoxines sur la santé humaine

Présenté par :

HAMEL Asma

MAIZI Nahla

BOUDECHICHE Bouthaina

Devant le jury composé de :

Président :	BENDJEDOU D.	Professeur	Université de Guelma
Examinatrice :	BENHALIMA L.	M.C.A	Université de Guelma
Encadreur :	ROUAIGUIA M.	M.C.B	Université de Guelma

Septembre 2021

Remerciement

Tout d'abord, louange à «ALLAH» qui, m'a guidé sur le droit chemin tout au long de ce travail, m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes et m'a donné la volonté et le Courage. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Nous rendons un vibrant hommage aux du jury de ce mémoire qui ont accepté de juger travail :

*Nous vifs remerciements vont à **Mme BENDJEDOU D.**, qui nous à fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ce mémoire.*

*Un Merci particulier à l'examinatrice de ce mémoire ; **Mme BENHALIMA L.**, pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont a madame **ROUAIGUIA Meri** pour ses conseils, ses encouragements, sa patience sa compétence et sa gentillesse qui nous ont permis de bien mener ce travail. Le suivi et l'orientation dont nous avons pu bénéficier.*

*Un grand merci à Monsieur **Touati et Madame Zigheme** qui nous a fait découvrir et aimer le monde des mycètes. Un grand merci également à toute l'équipe du laboratoire mesdames **Houda, Lwiza** pour leurs gentillesse et serviabilité.*

Ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien actif des membres de notre famille, surtout nos parents qu'ils nous ont toujours encouragé

moralemment et matériellement et à qui ont tient à les remercier.

En fin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience, la volonté et de m'avoir sa bénédiction ;

Je dédie ce travail...

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié ; mon très cher père YOUCEF

Toute l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers toi, tu as toujours été pour moi un exemple du père affectueux, respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es, vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le fruit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme père. J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur. Je t'aime mon héro.

A la plus belle perle du monde mon tender MÈRE

Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie. Je t'aime ma rose.

Aucune dédicace ne pourra compenser les sacrifices de mes parents. Dieu merci de m'avoir donné ces deux personnes qui n'ont cessé de veiller à mon bien être, à m'assurer un cadre de vie agréable et une éducation exemplaire.

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; mes sœurs **Rima, Nour, Wedjdane**, que j'adore. A mon soutien moral et source de joie et de bonheur, mes frères **Walid et Imad***

En signe de l'affection et du grand amour que je vous porte, les mots sont insuffisants pour exprimer ma profonde estime. Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragement et de prier pour moi. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement. Que Dieu le tout puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

*Aux personnes toujours présentes dans mon cœur ; A vous mes princes **Kikou, Mohammed et Adem**. Je souhaite une vie pleine de bonheur, de joie et de réussite. Que Dieu vous garde pour moi.*

*Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon cher et regretté **grand-père** qui nous a quittés si brusquement « Que son âme repose en paix ».*

*A ma chère **Nacera**, quoique je dise, les mots ne sauraient exprimer ma profonde gratitude pour ton soutien permanent sans faille à tous les moments et pour tes attentions qui sont le reflet d'une générosité sans égal. Merci pour tout ma chérie, souhaite tout le bonheur possible que le bon dieu te bénisse inshalah.*

*A mes chères **Imen, Raïhana, Chaima**, pour leurs amitiés, leurs soutiens inconditionnels et leurs encouragements.*

A tous les gens qui étaient avec moi dans les mauvais moments avant les bons... et qui me donnent l'envie d'aller en avant, je remercie tous, votre soutien et vos encouragements me donnent la force de continuer.

A mes amis avec lesquels j'ai passé de très bonnes années de l'université.

A tous mes enseignants, je leur exprime ma profonde gratitude.

Pour finir, A tous ceux qui m'aiment et ceux que j'aime.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

ASMA



Dédicace

Avant toute chose, je tiens à remercier "ALLAH" qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

*A mon père **Boubaker** et ma mère **Aicha** pour leurs sacrifices.*

*A mes belles sœurs **Imen, Chaima, hadil** et ma cousine **Bouthaina***

*A mes frères **Abd EL, Rahmen** et **Iyad***

*A toute la famille **Maizi***

A tous mes amis (es) sans exception.

Nahla

Dédicace

Après avoir remercié Dieu

Je dédie ce travail...

A la Lune de ma vie a qui m'a donné de ça santé et de son temps, a qui m'a soutenu dans mes jours difficiles qui m'encouragent toute le temps à faire de plus, Qui a tout endurée pour m'offrir le bon entourage pour finir mes études à ma chère maman "MERJEM".

A ma perle perdue, à mon héros, qui m'a comblé de soutien et sacrifice dans sa vie, à qui m'encourage jusqu'à la dernière minute de sa vie. Dieu seul sait combien j'ai besoin de toi à mes côtés dans ces moments à mon meilleur papa "RACHID". Sans vous et vos prières, je n'arrive pas à ce stade.

A mes chers Frères

Qui m'ont facilité la vie avec leur soutien : Ahmed et sa femme Dounia, Jalil et Mohamed

A mes chères sœurs : Yousra, Dhikra et Soumia

Je n'oublierai jamais vos encouragements et votre tendresse.

A mes meilleures amies : Hind et Rania

Je vous dédie ce travail pour tous les jours qu'au on a partagé ensemble, vous rendus mes années universitaires plus beaux. Je ne trouve pas les mots pour vous remercier pour vos soutiens, tendresse, encouragements dans mes moments difficiles avant les moments heureux.

A toutes membres de famille qui reste à mes cotés.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Boutheyne

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction 1

Première partie: Étude bibliographique

Chapitre 1 : Les grains de blé

1.Définition 5

2.Position systématique du blé 5

3.Histologie et structure du grain de blé 7

4.Composition biochimiques 8

5.Importance de blé 8

5.1. A l'échelle mondiale 8

5.2. A l'échelle nationale 9

6.Stockage de blé 9

6.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie 9

6.2. Le stockage à plat en sac 9

6.3. Le stockage à plat en vrac 10

6.4. Le stockage en silo 10

7.Facteurs d'altération du blé 10

7.1 Altération d'origine environnementale 10

7.1.1. L'humidité 10

7.1.2. La température 10

7.2. Altérations enzymatiques 11

7.3. Altération d'origine mécanique ou physique 11

7.4. Altération d'origine biologique.....	11
8. Les moisissures pathogènes du blé	12
8.1. Flore des champs.....	12
8.1.1.Le genre <i>Alternaria</i>	12
8.1.2.Le genre <i>Fusarium</i>	13
8.2. Flore intermédiaire.....	13
8.3. Flore de stockage.....	13
8.3.1.Le genre <i>Aspergillus</i>	13
8.3.2.Le genre <i>Penicillium</i>	14

Chapitre 2 : Généralité sur l'*Aspergillus*

1.Généralité sur le genre <i>Aspergillus</i>	15
2.Les caractères morphologiques d'identification du genre <i>Aspergillus</i>	15
2.1. Description macroscopique d' <i>Aspergillus</i>	15
2.1.1. L'aspect de la colonie.....	16
2.1.2. La texture de la colonie.....	17
2.1.3. La production des sclérotés	17
2.1.4. Vitesse de croissance	17
2.2. Morphologie microscopique	17
3.Principales espèces du genre <i>Aspergillus</i>	18
3.1. <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	18
3.2. <i>Aspergillus ochraceus</i>	19
3.3. <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
3.4. <i>Aspergillus oryzae</i>	21
3.5. <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	21
3.5.1. Principales espèces de la section <i>Flavi</i>	22
3.5.2. Chémotype des différentes espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	25
3.5.3. <i>Aspergillus Flavi</i> et la production des aflatoxines	25

4.Importance du genre <i>Aspergillus</i>	25
5. Potentiel toxigène	25
6. Pouvoir pathogène	26
6.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	27
6.2. <i>Aspergillus flavus</i>	27
6.3. <i>Aspergillus niger</i>	27
6.4. <i>Aspergillus sydowi</i>	27
6.5. <i>Aspergillus terreus</i>	27

Chapitre 3: Mycotoxine cancérigène

1. Généralité sur les mycotoxines	28
1.1. Définition	28
1.2. Les moisissures mycotoxinogènes	28
1.3. La nature et l'origine des mycotoxines	29
1.4. Biogénèse des mycotoxines	30
1.5. Structure des mycotoxines	31
2. La mycotoxinogénèse	32
2.1. Définition de la mycotoxinogénèse	32
2.2. Facteurs favorisant la mycotoxinogénèse	33
2.2.1. Facteurs intrinsèques ou biotiques	33
2.2.2. Facteurs extrinsèques ou abiotiques	33
2.2.3. Facteurs biologiques	39
2.3. Effets des mycotoxines	41
2.4. Les mycotoxines dans la chaîne alimentaire	42
3.Les principales mycotoxines	44
3.1. Les Aflatoxines	44
3.1.1.Structure	45
3.1.2.Propriétés physico-chimiques	45

3.1.3. Les facteurs influençant la teneur en aflatoxine dans les denrées alimentaires	46
3.1.4. Toxicité	47
3.1.5. Mécanisme d'action	47
3.2. Les Ochratoxines	48
3.2.1. Structure	49
3.2.2. Propriétés physicochimique	50
3.2.3. Toxicité	50
3.2.4. Mécanisme d'action	51
4. Stratégies de prévention contre la contamination par les mycotoxines	51
4.1. Pratiques précédant la récolte	52
4.2. Pratiques de stockage	52
4.3. Méthodes scientifiques de lutte	52
4.3.1. Méthodes chimiques	53
4.3.2. Méthodes biologiques	53
4.3.3. Méthodes physiques	54
4.3.4. Norme HACCP	54
Chapitre 4: Profil toxicologique	
1. Impacts sanitaire	56
1.1. Mutagenèse	56
1.2. Cancérogénèse	56
1.3. Tératogénèse	56
1.4. Immunotoxicité	57
2. Profil toxicologique	57
2.1. Évaluation du risque lié à l'Aflatoxine B1	57
2.1.1. Hépatotoxicité	57
2.1.2. Immunotoxicité	58
2.1.3. Tératogénicité	58

2.1.4. Génotoxicité et mutagénicité	58
2.1.5. Effets antibactériens.....	58
2.2. Évaluation du risque lié à l’Ochratoxine A	58
2.2.1. Néphrotoxicité	59
2.2.2. Génotoxicité.....	59
2.2.3. Cancérogenèse	60
2.2.4. Immunotoxicité.....	60

Chapitre 5: Règlementation et législation

1.Réglementation et législation	61
1.1. Valeurs toxicologiques des mycotoxines	61
1.2. Limites réglementaires	61
1.2.1.L’union européenne.....	62
1.2.2.En Afrique	63
1.3. Réglementation des aflatoxines.....	64
1.3.1.À l’échelle nationale	65
1.3.2.À l’échelle internationale.....	66
1.4. Réglementation relative à l’Ochratoxine A	66

Deuxième partie :Étude expérimentale

Chapitre 6:Matériel et méthodes

1.Objectif du travail	69
2. Matériel.....	69
2.1. Blé et dérivés	69
2.2. Milieux de culture	69
2.3. Produits et appareillages	70
3. Site d’étude et échantillonnage.....	70
3.1. Période et lieu du travail	70
3.2. Échantillonnage	70

3.2.1. Précautions d'échantillonnage.....	70
3.2.2. Collecte des échantillons.....	71
4. Méthodes	72
4.1. Étude de la qualité physicochimique	73
4.1.1.Détermination du taux d'humidité relative	73
4.1.2.Détermination du pH	73
4.2. Étude mycologique des grains de blé.....	73
4.2.1. Isolement de la flore fongique.....	73
4.2.1.1.Méthode directe	73
4.2.1.2.Méthode indirecte ou de dilution	74
4.2.2. Identification des isolats fongiques	76
4.1.1.2.Étude des caractères macroscopiques	76
4.1.1.2.Identification microscopique	77
4.3 Analyses mycotoxicologiques.....	79
4.3.1.Détection visuelle des souches productrices de mycotoxine.....	79
4.3.2.Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	79
5. Précaution de manipulation et décontamination du matériel utilisé	80
Chapitre 7 : Résultats et discussion	
Résultats.....	81
1.Résultat de l'étude de la qualité physicochimique du blé	81
1.1. Résultat de la détermination du taux d'humidité	81
1.2. Résultat de la détermination du pH	82
2.Résultats des analyses mycologiques des grains de blé.....	82
2.1. Isolement de la flore fongique	83
2.1.1. La méthode directe	83
2.1.1.1.Méthode d'ulster (M.U)	83
2.1.1.2.Méthode d'Ulster modifiée	84

2.1.2.Méthode de dilution	86
2.2. Identification	88
2.2.1.Identification macroscopique	88
2.2.2. Identification microscopique par la méthode de Scotch et de lactophénol bleu de coton	103
2.2.3. Reconnaissance des genres et des espèces	114
Discussion	119
Conclusion et perspectives	129
Références bibliographiques	134
Résumés	156
Glossaire	159
Annexe	160

Liste des tableaux

Tableau 1: Position systématique du blé dur et du blé tendre.	6
Tableau 2: Différences entre un blé tendre et un blé dur.	6
Tableau 3: Distribution histologique des principaux constituants du grain de blé.	8
Tableau 4: Les <i>Aspergillus</i> producteurs de mycotoxines.	26
Tableau 5: Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées.	29
Tableau 6: Origine chimique des mycotoxine.	29
Tableau 7: Températures de croissance de quelques espèces d' <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>fusarium</i>	35
Tableau 8: Aw minimum et maximum de plusieurs espèces d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i>	36
Tableau 9: Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement.	42
Tableau 10: Exemples de produits contaminés par des moisissures toxigéniques.	43
Tableau 11: Les principales Aflatoxines.	45
Tableau 12: Les principales Ochratoxines.	50
Tableau 13: Principales mycotoxines et leurs valeurs toxicologiques de référence.	61
Tableau 14: Qualités maximales admissibles d'Aflatoxine.	65
Tableau 15: Limites réglementaires algériennes des Aflatoxines dans les produits d'alimentations humaine et animale.	65
Tableau 16: Les teneurs maximales en Aflatoxines exprimées en µg/kg dans l'alimentation humaine et animale dans l'Union Européenne.	66
Tableau 17: Teneurs maximales en Ochratoxine A dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg.	67
Tableau 18: Caractéristiques des échantillons de blé et dérivés.	71
Tableau 19: Caractères morphologiques des espèces d' <i>Aspergillus</i> Flavi.	77
Tableau 20: Analyse physico-chimique des grains de blé dur et tendre.	81
Tableau 21: Les échantillons de blé analysé par méthode d'Ulster et leurs codages.	84
Tableau 22: Les échantillons de blé analysé par la méthode d'Ulster modifié et leurs codages.	85
Tableau 23: Résultats de la recherche de la flore fongique de blé par la méthode indirecte.	87
Tableau 24: Caractères macroscopiques des souches isolées de blé dur et tendre par méthode d'ulster (M.U).	89

Tableau 25: Caractères macroscopiques des souches isolées de blé dur et tendre par méthode d'ulster modifié.	90
Tableau 26: Caractères macroscopiques des souches isolées de blé dur et tendre par méthode de dilution.....	93
Tableau 27: Identification microscopiques des souches isolées des grains de blé par la méthode de Scotch et de lactophénol bleu de coton.....	103
Tableau 28: Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé par la méthode A.....	111

Liste des figures

Figure 1 :Blé dur	5
Figure 2 :Blé tendre.....	5
Figure 3 : Structure de grain de blé.	7
Figure 4 :Aspect macroscopique de colonie des différentes sections d' <i>Aspergillus</i>	16
Figure 5 : Caractéristiques microscopiques des espèces appartenant au genre <i>Aspergillus</i>	18
Figure 6 :Aspect microscopique (droite) et macroscopique (gauche) d' <i>Aspergillus niger</i>	19
Figure 7 :Aspect microscopique et macroscopique d' <i>Aspergillus ochraceus</i>	20
Figure 8 :Aspect microscopique (droite) et macroscopique (gauche) <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
Figure 9 : Aspect microscopique (droite) et macroscopique (gauche) d' <i>Aspergillus oryzae</i> ..	21
Figure 10 : Aspect microscopique et macroscopique d' <i>Aspergillus flavus</i>	22
Figure 11 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus parasiticus</i>	23
Figure 12 :Aspect macroscopique de l' <i>Aspergillus nomius</i> , après culture sur MEA à 25°C pendant 5 jours	23
Figure 13 :Aspect microscopique et macroscopique d' <i>Aspergillus tamarii</i>	24
Figure 14 : Aspect microscopique (droite) et macroscopique (gauche) d' <i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	24
Figure 15 : Voies de biosynthèse des mycotoxines.....	31
Figure 16 :Mécanisme d'action AFB1.	48
Figure 17 :Structure chimique d'Ochratoxine.....	49
Figure 18 : Stratégies de prévention contre la contamination par les mycotoxines	55
Figure 19 : Pourcentage de la population mondiale protégée par des réglementations sur les mycotoxines.	62
Figure 20 :Mycotoxines présentes dans l'alimentation humaine réglementée en Afrique.....	64
Figure 21 : Siège de coopération des céréales et des légumes secs de la wilaya de Guelma et Chelghoum l'aïd (Mila).....	72
Figure 22 : Les échantillons de blé dur et tender.	72
Figure 23 : Isolement des moisissures sur le milieu PDA par la méthode d'Ulster modifié. ..	74
Figure 24 : Isolement des moisissures par la méthode de dilution.	75
Figure 25 :Techniques d'isolement des souches fongiques isolées à partir des grains de blé par la méthode indirecte.	76
Figure 26 :Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de scotch.....	78

Figure 27: Humidité moyenne des échantillons de blé.	82
Figure 28: pH moyen des échantillons de blé.	82
Figure 29: Colonies obtenues dans les graines contaminées de blé par la méthode d'ulster. .	84
Figure 30: Colonies obtenues dans les graines contaminées de blé par la méthode d'Ulster modifiée.....	86
Figure 31: Colonies obtenues dans les graines contaminées de blé par la méthode de dilution.	88
Figure 32: Répartition fongique globale.	114
Figure 33: Structures micromorphologiques des moisissures photo de référence.	117

Liste des abréviations

- A** : Le genre *Aspergillus*
- ACP** : L'acide cyclopiazonique
- ADN** : Acidedésoxyribonucléique
- AFB1**: Aflatoxin B1
- AFG1**: Aflatoxin G1
- AFM1**: Aflatoxin M1
- AFNOR**: Association française de normalisation
- AFPA** : *Aspergillusflavusparasiticus* agars
- AFSSA** : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
- AFs**: Aflatoxins totaux
- ALARA**: As low as reasonably achievable
- AOAC**: Association of official analytical chemists
- ARN**: Acide ribonucléique
- ATP** : Acide adénosine triphosphorique
- Aw** : Activité en eau
- BHA**: Hydroxyanisole butylé
- BHT**: Hydroxytoluène butylé
- CPG** : Chromatographie en phase gazeuse
- CIRC** : Centre international de recherche sur le cancer
- CCLS** : Coopérative des céréales et de légumes secs
- CSAH** : Le comité scientifique de l'alimentation humaine
- CE** : Commission européenne
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- DON** : Déoxynivalenol
- DRO** : Dérivés réactifs de l'oxygène
- DJT** : Dose journalière tolérable
- DZ1**: AOAC (1990). 986.22. Aflatoxins in peanuts and peanuts products –CB method Food and Drug Laboratories –Canada –Best food method.
- DZ2**: NF-VF (1980). Animal feed –aflatoxins measurement B1, June 1980:18-200
- EU**: Union européenne
- EFSA**: European food safety authority
- ELISA**: Enzyme linked immuno-adsorbent assay

FAO: Food and Agriculture Organization

FLA: *flavus*

HACCP: Hazard analysis critical control point

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

IARC : L'agence internationale pour la recherche sur le cancer

JECFA: Joint expert committee of food and additives

LMR : Limite, maximale de résidus

MEA : Malt extract agar

NEB : Néphropathie endémique des Balkan

OTA : Ochratoxine A

OTB : Ochratoxine B

OTC : Ochratoxine C

O.M.S : L'organisation mondiale de la santé

P : Pression de vapeur d'eau d'un produit

P0 : Pression de vapeur de l'eau pure

PM : Poids moléculaire

PP : Parabène de propyle

ZEN : Zéaralénone

Introduction

Introduction

Les grains de céréales constituent, la principale ressource alimentaire de l'Homme et de l'animal et possèdent un pouvoir nutritionnel important. Dans la plupart des cas, la production des céréales est assurée par une seule récolte dans l'année alors que la consommation est prolongée toute au long de l'année, d'où la nécessité du stockage (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Gacem, 2011 et Belyagoubi, 2006**). Leur stockage se fait dans les sacs, les silos et les vrac (**Mahideb et Merrouche, 2015 et Belyagoubi, 2006**). Les céréales sont des produits stockés à long terme et présentent une facilité pendant leurs transport (**Doumandji et al., 2003**).

La population algérienne est caractérisée par un mode alimentaire basé essentiellement sur la consommation des céréales sous toutes ses formes (pâtes alimentaires, couscous, galettes de pain,...etc.) (**Bouchenafa et Kherchi-Medjden, 2015**). Ainsi, la consommation céréalière moyenne par habitant est l'une des plus importantes au monde. En 2005, elle a été estimée à 223 kg/an par personne (**FAO, 2005**). Cette consommation céréalière est dominée par celle du blé, qui a doublé en l'espace d'un demi-siècle (**Chabane, 2011**).

Parmi ces céréales, le blé occupe la première place pour la production mondiale, comme source de nourriture pour les populations humaines, il assure 15% de ses besoins énergétiques (**Bajji, 1999**). Il étant le produit de consommation de base, les habitants des pays magrébins sont les plus gros consommateurs de cette denrée au monde notamment l'Algérie avec près de 600 grammes par personne et par jour (**Abis, 2012**).

En Algérie chaque année, environ 3,3 millions d'hectares sont consacrés à des cultures céréalières dont environ 1,5 million d'hectares sont plantés de blé dur et 600 000 hectares de blé tendre (**Zettal, 2017**). Selon la FAO, l'Algérie est classée en quatrième position au niveau Africain et à la dix-septième position au niveau mondial durant l'année 2014 avec une production du blé de 2,4 millions de tonnes, collectée est constituée en moyenne de blé dur 58,7%, blé tendre 33%.

Le blé présente le plus grand facteur de risque en raison de leur fréquence de contamination par les mycotoxines et de leur consommation importante. La contamination d'un produit d'origine végétale par les mycotoxines peut se faire tout au long de la filière: production, stockage, transport, transformation et conditionnement (**Doré et al., 2002**).

L'Algérie, pays importateur de produits de graines de blé, attentif au danger des moisissures toxigènes et disposant très peu de laboratoires utilisant en routine le dosage des

mycotoxines, n'applique pas régulièrement au niveau des ports stratégiques les diverses mesures préventives ou procédures de surveillance afin de palier au dommage notable sur la santé du consommateur (**Guezlane-Tebibel et al., 2016**).

Les moisissures sont des microorganismes pluricellulaires ubiquistes. La plupart des espèces disposent d'un potentiel enzymatique important de coloniser de nombreux substrat et notamment des aliments (**Mahideb et Merrouche, 2015**) et leurs mycotoxines entraînent à l'échelle mondiale des pertes estimées de 5 à 10% des céréales et leurs dérivés (**Belyagoubi, 2006**).

Les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Elles diminuent la qualité technologique (taux du gluten) et sanitaire (allergie, agents toxiques responsables de graves intoxications humaines et animales), réduisant la valeur nutritionnelle, modifiant l'aspect organoleptique et enfin provoquant des problèmes économiques due aux coûts de détoxification des grains ou les rejets des produits contaminés (**Belyagoubi, 2006; Gacem, 2012**).

Les maladies d'origines alimentaires constituent l'un des problèmes préoccupants à l'échelle mondiale. Ces maladies engendrent à la fois des souffrances humaine et de graves retombées économiques et sociale (**Bennoudia, 2016**). Parmi les contaminants biologiques, la contamination des produits alimentaires par les mycotoxines a récemment été reconnue par l'organisation mondiale de la santé (O.M.S) comme source importante de maladies d'origine alimentaire (**O.M.S, 2002**).

Les mycotoxines sont des substances naturelles produites par métabolisme secondaire des moisissures appartenant principalement au genre *Aspergillus* et exercent un pouvoir toxique réel pour le consommateur (homme et animal) une fois introduites même en faibles concentrations à partir des facteurs biotiques et abiotiques qui favorisent la mycotoxinogénèse de cette substance (**Eskola, 2002 ; Bennet, 1987**).

Actuellement, il existe plus de 300 métabolites secondaires fongiques recensés mais seule une trentaine posséderait des caractéristiques toxiques préoccupantes (**Pfohl-Leskowicz, 1999**). La même toxine peut être élaborée par diverses espèces fongiques mais pas obligatoirement par toutes les souches appartenant à une même espèce (**Eskola, 2002**).

L'*Aspergillus* est une espèce de moisissures de stockage à ces conditions de développement. Le genre *Aspergillus* se multiplie plus rapidement que la température et l'activité de l'eau sont élevées. Les espèces d'*Aspergillus* les plus fréquemment observées

dans le grain de blé stocké sont surtout : *A. flavus* et *A. niger* (**Belmehdi et Beddar, 2019**). À l'intérieur de ce genre, la section Flavi est considérée comme un problème majeur pour l'industrie alimentaire pendant les cinq dernières décennies, comme elle comporte des espèces responsables de la production d'un groupe de composés fortement toxiques : les aflatoxines (AFs) (**Rodrigues et al., 2011**).

Aspergillus section Flavi est l'un des genres les plus importants des micromycètes, avec beaucoup d'espèces ayant le grand impact sur divers champs d'intérêt : en tant que microbes pathogènes de l'être humain, l'animal et de plante, comme agents de détérioration des produits alimentaires ou comme producteurs de bioactif et / ou métabolites secondaires toxiques (**Djabali et Fedghouche, 2016**). La taxonomie d'*Aspergillus* section Flavi est complexe et en constante évolution (**Geiser et al., 2007**).

Actuellement, il n'existe pas de procédés de décontamination fiables permettant d'éliminer les mycotoxines sans dénaturer la denrée alimentaire (**Jouany, 2007**). Une stratégie de prévention est donc exigée. Pour cela, il est indispensable de comprendre la physiologie des champignons toxiques ainsi que les conditions de sécrétion des mycotoxines (**Lahouar, 2016**).

L'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (F.A.O) estime qu'environ un quart des récoltes de la planète est significativement contaminé par les mycotoxines, occasionnant des pertes mondiales estimées de 5 à 10 % (**Yiannikouris et Jouany, 2002**). Ces substances peuvent occasionner des effets néfastes sur la santé tel que cancérogènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, œstrogéniques, nécrosants, neurotoxiques et néphrotoxiques sur la santé humaine (**Bennett et Klich, 2003**).

Jusqu'à présent, il y a très peu d'informations sur le taux de mycotoxines préjudiciable engendré par ces contaminants naturels pervers ; par conséquent l'ingestion régulière qui a lieu, fait susciter des questionnements sur les champignons toxiques à rechercher, les relations dose-effet, et les outils les plus efficaces à mettre en place pour freiner cette flambée ou cauchemar épidémique (**Guezlane-Tebibel et al., 2016**).

Dans ce contexte, l'objectif principal de la présente étude est l'isolement et l'identification des moisissures présentes dans les grains de blé dur et tendre et la recherche des *Aspergillus* Flavi. Les grains de blé ont fait l'objet de quelques caractéristiques physico-chimiques.

Pour ce faire, une synthèse bibliographique représentant la première partie de notre étude a été réalisée afin de regrouper les informations essentielles sur le blé dur et les éventuelles moisissures toxiques et leurs métabolites (mycotoxines) pouvant altérer cette céréale. Nous évoquerons aussi les généralités sur les moisissures, et particulièrement le genre *Aspergillus* de la section Flavi et leurs critères d'identification. Nous présenterons ensuite le profil des mycotoxines produites, une détermination de l'occurrence des mycotoxines ainsi que celle des champignons mycotoxinogènes, leurs effets sur la santé, la réglementation et les stratégies de lutte. Afin d'établir des méthodes de prévention et de minimisation de la contamination des céréales en Algérie. Une revue bibliographique sur les aflatoxines et l'Ochratoxine sera également donnée.

La deuxième partie, illustre le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les principaux résultats obtenus et la discussion.

L'étude est achevée par une conclusion qui résume l'ensemble des résultats obtenus et des perspectives.

Première partie
Étude bibliographique

Chapitre 1 :
Les grains de blé

1. Définition

Le blé est l'une des principales céréales et la plus cultivée dans le monde (200 millions d'hectares en 2009) (Mosiniak *et al.*, 2001 ; FAOSTAT, 2009). Il est devenu un produit de première nécessité à l'échelle mondiale. Il est domestiqué au Proche-Orient à partir d'une graminée sauvage il y a environ 10.000 ans, il compte actuellement quelque 30.000 formes cultivées (Lesage, 2011).

Il fournit plus de 60% des calories et des apports en protéines de l'alimentation humaine. Une des particularités du blé réside dans la forte teneur en amidon (70%) et en gluten (15%) de ses grains (Zouaou, 2012 ; El Hadeff El Okki, 2015).

On distingue deux types de blé (dur et tendre) en particulier constituent la principale base du régime alimentaire pour les consommateurs (Zettal, 2017). Le blé est en effet la seule céréale donnant une farine panifiable grâce à la nature unique de ces protéines de réserve qui permettent la formation du réseau de gluten (Lesage, 2011) et aussi il est utilisé depuis plusieurs années comme matière première pour la fabrication de biocarburants (Debiton, 2010), en plus cette céréale constitue également une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et pour de multiples applications industrielles (Nour et Louhichi, 2015).



Figure 1 : Blé dur (Mercier et Pireyre, 2011)



Figure 2: Blé tendre (Abecassis, 2015)

2. Position systématique du blé

Le blé est un fruit sec et indéhiscence, appelé caryopse, constitué d'une graine et de téguments (Feillet, 2000). Il est monocotylédone appartenant au genre *Triticum*, tribu des *Triticeae* famille des *Poaceae*. Trois groupes de *Triticum* sont connus, répartis selon le nombre de leurs chromosomes (Zettal, 2017).

- **Le groupe diploïde** ($2n = 14$ chromosomes) ou groupe de *Tritium monococcum* (engrain, en langage courant).

- **Le groupe tétraploïde** ($2n = 28$ chromosomes) ou groupe de *Triticum dicoccum* (amidonnier), dans lequel on trouve *T. durum* (blé dur).
- **Le groupe hexaploïde** ($2n = 42$ chromosomes) ou groupe de *Triticum sativum*, auquel appartient *T. sativum* (blé tendre), ou encore appelé *T. vulgare* (Gouasmi et Badaoui, 2017).

Tableau 1: Position systématique du blé dur et du blé tendre (Doumandji *et al.*, 2003 ; Mazoyer, 2002).

	Blé dur	Blé tendre
Règne	Végétale	Végétale
Embranchement	<i>Stomatifères</i>	<i>Phanérogames</i>
Sous-embranchement	<i>Angiospermes</i>	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Monocotylédones</i>	<i>Monocotylédones</i>
Ordre	<i>Glumales</i>	<i>Graminales</i>
Famille	<i>Graminées(graminacées), (Poacées)</i>	<i>graminacées (poacées)</i>
Genre	<i>Triticum</i>	<i>Triticum</i>
Espèce	<i>Triticum turgidum</i> (synonyme : <i>Triticum durum</i> .)	- <i>Triticum vulgare</i> aussi appelé <i>triticum aestivum</i>

Par ailleurs, le blé tendre et le blé dur se différencient au niveau de la forme, l'aspect de la plante, leurs utilisations etc., les différences qui existent entre un blé tendre et un blé dur sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2: Différences entre un blé tendre et un blé dur (Aidani, 2015).

Caractère	Blé tendre	Blé dur
Prédominance	- De l'amidon	- Des protéines
Aspect de la plante	- Feuilles très étroite. - Maturation rapide.	- Feuilles large - Maturation très longue - Moisson tardive exigeante du point de vue sol et climat.
Forme	- Texture opaque - Structure de l'amande farineuse.	- Texture vitreuse.
Utilisation	- Obtention de la farine utilisée dans la fabrication du pain et des biscuits.	- Obtention de la semoule à partir de laquelle on fabrique de la galette, du couscous et des pâtes alimentaires.

3. Histologie et structure du grain de blé

Le grain de blé est un caryopse ce fruit sec indéhiscant est constitué d'une unique graine intimement soudée à l'enveloppe du fruit qui la contient. Sur l'épi le grain est entouré d'enveloppes : les glumes et les glumelles. Au niveau morphologique le grain de blé est ovoïde et présente sur la face ventrale un sillon qui s'étend sur toute sa longueur (**Surget et Barron, 2005**). Le grain de blé à maturité est formé de trois compartiments :

- **Les enveloppes**, composées de cinq tissus différents : le péricarpe externe, le péricarpe interne formé par la couche de cellules tubulaires et la couche de cellules croisées, la testa ou tégument séminal et la bande hyaline ou épiderme du nucelle.
- **Le germe (3%)**, composé du scutellum et d'un embryon lui-même formé de la coléoptile, de la gemmule, de la radicule, du coléorhize et de la coiffe.
- **L'albumen**, constitué de la couche à aleurone et de l'albumen amylicé. La couche à aleurone est le seul tissu restant vivant lorsque le grain a atteint sa maturité. Lors du broyage, ce tissu reste accroché au péricarpe et ne se retrouve donc pas dans la farine. L'albumen amylicé est constitué de cellules riches en granules d'amidon, englobés dans une matrice protéique (**Lesage, 2011**).

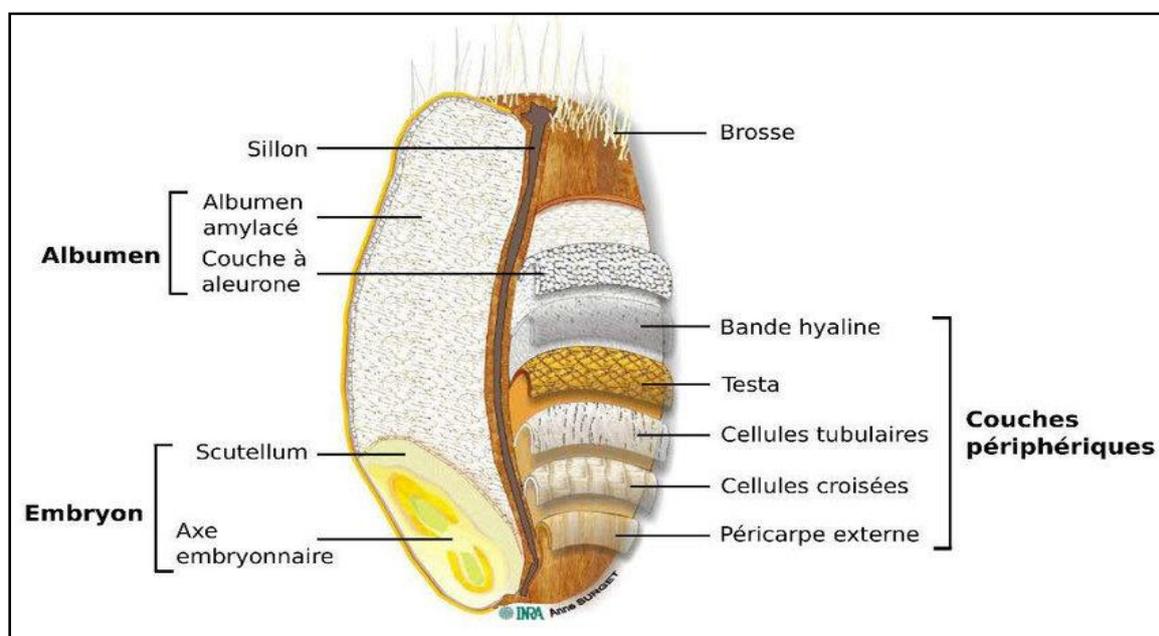


Figure 3: Structure de grain de blé (**Micard et al., 2009**).

4. Composition biochimiques

Il est constitué majoritairement d'amidon qui représente environ 70% de la matière sèche du grain et qui est situé dans l'albumen. Les protéines représentent entre 10 et 15% de la matière sèche et se retrouvent dans tous les tissus du grain de blé avec une concentration plus importante dans le germe et la couche à aleurone (**Pomeranz, 1988**).

Les pentosanes (polysaccharides non amylacés) représentent quant à eux entre 2 et 3% de la matière sèche et sont les principaux constituants des parois cellulaires de l'albumen (70 à 80%) (**Debiton, 2010**).

Tableau 3: Distribution histologique des principaux constituants du grain de blé (**Feillet, 2000**).

	% Grain	% Albumen	% Aleurone	% Péricarpe	% Germe
Amidon	68.9	82	0	0	0
Protéines	13.7	12	30	10	31
Fibres	10.2	2	49	83	0
Lipides	2.7	2	9	0	12
Minéraux	1.9	0.5	12	7	6
Sucre réducteurs	2.4	1.8	0	0	30

5. Importance de blé

5.1. A l'échelle mondiale

La production de blé est répartie sur l'ensemble du globe puisque le blé pousse même si la température n'est guère favorable ou que l'eau est rare. Le blé occupe la première place pour la production mondiale comme source de nourriture pour les populations humaines, il assure 15% de ses besoins énergétiques (**Bajji, 1999**). C'est ce qui explique une production élevée en Chine, en Inde et même en Russie. Il est cultivé principalement dans les pays du bassin méditerranéen à climat arides et semi-arides (**Mahideb et Merrouche, 2015**).

Elle se classe au quatrième rang mondial en matière de culture, derrière le riz, le maïs et la canne à sucre. Grâce à de multiples techniques culturales et de sélection génétique ayant permis une augmentation et une amélioration du rendement et de la production (**Houda, 2017**). Il présente, un rôle social, économique et politique dans la plupart des pays dans le monde (**Zettal, 2017**) par ce que cette céréale est l'une des grandes plantes nourricières de l'humanité et sa production a accompagné la croissance démographique, avec un triplement

entre 1961 et 2014. Avec environ 6 % de la production mondiale de blés. Selon le conseil international des céréales (**I.P.E.M.E.D, 2017**).

5.2. A l'échelle nationale

Depuis l'indépendance, les différentes politiques et interventions de l'état dans le secteur agricole avaient pour but d'améliorer le niveau de production des céréales en Algérie, et du blé dur en particulier (**Bourras, 2001**).

La production nationale des céréales demeure insuffisante et couvre moins de 25 à 30% des besoins nationaux. Pour cela, l'état est toujours intervenu dans le marché pour assurer à tous les citoyens un accès équitable à cet aliment (**Morsli, 2010 ; Louze et Hadjaissa, 2018**). La consommation en Algérie augmente rapidement, principalement du fait de la croissance du nombre de consommateurs qui a doublé en vingt ans (**Zettal, 2017**).

6. Stockage de blé

Le blé est récolté une seule fois par an et quelquefois deux fois dans l'année d'où la nécessité du stockage (**Druvefors, 2004**), à cause de ça il est courant de voir de longues files de remorques attendant devant les silos des organismes de stockage à la moisson en Algérie, la politique de stockage des céréales uniquement dans les silos des CCLS fait une désorganisation des chantiers de récolte pourtant il existe des déférant autre méthode de stockage (**Belaid, 2014**).

6.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie

Dans des enceintes creusées dans un sol argileux ; c'est ce qu'on appelle « El matmour » ou dans des sacs en toile de jute, le paysan algérien, sur les hauts plateaux, conservait surtout le produit de ses champs d'orge et de blé, entreposés dans divers locaux, magasins ou hangars. La trop forte humidité et les eaux d'infiltration sont les inconvénients majeurs de cette méthode de stockage favorisant le développement des moisissures et les phénomènes de fermentations bactériennes (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Belyagoubi, 2006**).

6.2. Le stockage à plat en sac

Une méthode simple où les sacs reposent sur des palettes disposées à même une aire bétonnée ou en terre battue les sacs entreposent dans des divers locaux, hangar magasins (**Doumandji et al., 2003**). Les palettes doivent être une hauteur pour assurer l'aération et

éviter l'humidité. Cette méthode facilite les opérations de décharge puis reprise de la marchandise (**Belaid, 2014**).

6.3. Le stockage à plat en vrac

Dans cette méthode le blé repose à même le sol sur une aire bétonnée sous un hangar fermé. La récupération des grains peut être effectuée au godet attelé à l'avant d'un tracteur. Dans le cas de très grandes quantités stockées (**Belaid, 2014**). Malheureusement y`a une possibilité de contaminations (**Belyagoubi, 2006**).

6.4. Le stockage en silo

Les silos permettent de stocker les différents types de céréales en même temps (blé dure, blé tendre, orge...) (**Duron, 1999**). On trouve des enceintes silos cylindriques en béton armé ou en métal inoxydable tailles constitués de plusieurs cellules adaptées pour les exploitations céréalières (**Belaid, 2014**). L'emploi des silos réduit la main d'œuvre, augmente l'aire de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux (**Doumandji et al., 2003 ; Mahideb et Merrouche, 2015**).

7. Facteurs d'altération du blé

7.1 Altération d'origine environnementale

7.1.1. L'humidité

La faible teneur en humidité est le facteur le plus important pour la conservation des grains lors du stockage. Les grains, stockés avec le contenu d'humidité élevé, sont soumis à des pertes élevées causées par l'attaque des insectes et des champignons (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Vasquez et al., 2008**). Elle favorise la respiration des grains et accentue en conséquence le dégagement de chaleur au sein des grains stockés (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Cruz et al., 2002**).

7.1.2. La température

La température joue un rôle important dans la conservation des grains (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Cruz et al., 2002**). Elle est le facteur le plus important qui affecte la qualité du grain au cours de stockage (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Kusinska, 2001**). Elle intervient d'une part sur la valeur de l'activité de l'eau (A_w) et d'autre part sur les vitesses de réactions chimiques et enzymatiques et donc la croissance des microorganismes (**Richard-**

Molard, 1998). Au cours de la conservation, plus la température est élevée plus les réactions biologiques des microorganismes sont rapides (**Multon, 1982**).

7.2. Altérations enzymatiques

Les altérations enzymatiques dues aux enzymes propres aux grains se manifestent de façon variée. Ce sont d'abord des hydrolases, agissant sur les protéines, les lipides et les glucides donnant des produits qui peuvent se dégrader ensuite par autres voies (**Multon, 1982**). C'est ainsi que les lipases libèrent des acides gras qui sont ensuite oxydés par la lipoxygénase. Il ne faut pas négliger cette altération enzymatique car certains produits peuvent être toxiques tel que les produits de la fermentation (**AFNOR, 1986**).

Les réactions de Maillard donnent aussi un grand nombre de composés intermédiaires aboutissant dans leur stade ultime à la formation de composés brunâtres avec une destruction des vitamines B1, E et les caroténoïdes (**AFNOR, 1986**).

7.3. Altération d'origine mécanique ou physique

Les altérations d'origine mécanique sont dues à des chocs entraînant des cassures et favorisant les autres causes d'altération. L'utilisation des radiations telles que les rayons gamma et les rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques (**AFNOR, 1986**).

7.4. Altération d'origine biologique

La microflore des grains est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. Les bactéries, les levures et les mycètes filamenteux constituent un envahisseur interne et/ou contaminant externe qui font l'objet d'altération biologique (**Magan et al., 2003**). Pendant le stockage, les céréales subissent généralement une perte de qualité, cette détérioration est caractérisée par une diminution de la germination, une décoloration, des changements chimiques et nutritionnels, un durcissement et de mauvais goûts qui ont comme conséquence le rejet du produit (**Mills, 1990**). L'activité fongique mène également aux pertes de matière sèche et de la valeur nutritive ainsi qu'à des problèmes de santé dus à la formation des mycotoxines et des spores allergéniques, et aussi aux modifications des propriétés rhéologiques du grain (**Molinie et al., 2005**).

Les virus paraissent négligeables, et les lichens sont parmi les rares organismes vivants capables de supporter sans dommage une grande sécheresse : leurs teneurs en eau se situent entre 5 et 40%, contre 75 à 97% pour le reste du monde vivant (**Multon, 1982**).

8. Les moisissures pathogènes du blé

On trouve sur les grains des céréales plus de 150 espèces de moisissures comme contaminants extérieurs (**Jouany et al., 2002 ; Belmehdi et Beddar, 2019**). Les graines sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage (**Belyagoubi, 2006**). Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité pour leur croissance (20 à 25%), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18 % d'humidité (**Molinie et al., 2005 ; Mahideb et Merrouche, 2015**). Les mycètes colonisant le grain ont été classifiés dans trois groupes, connus sous le nom de moisissures de champ, de stockage et la flore intermédiaire (**Magan et al., 1988**).

8.1. Flore des champs

Les grains de blé sont contaminés dès avant la récolte par une microflore dite "du champ" (**Breton, 1990 ; Belyagoubi, 2006**). Et cette microflore est dominée par des moisissures (**Mahideb et Merrouche, 2015**). Les genres rencontrés sont : *Alternaria* (le plus fréquent), *Fusarium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* et *Helminthosporium* (moins fréquents), *Chaetomium*, *Curvularia*, *Rhizopus* et *Stemphylium* (**Sauer et al., 1982 ; Zillinsky, 1983 ; Mahideb et Merrouche, 2015**). Cette flore est bien adaptée à des changements rapides des conditions dans le champ, pour une croissance optimale elle exige des activités en eau relativement élevées, ces champignons peuvent survivre pendant de longues périodes en fonction des conditions précises (longue à basse température et à faibles niveaux d'humidité). (**Roberts, 2005**). Les genres les plus rencontrés sont :

8.1.1. Le genre *Alternaria*

Il est fréquent, même dans le blé cultivé dans les zones arides (**Dendy et al., 2000 ; Belmehdi et Beddar, 2019**). Les espèces les plus fréquentes sont : *A. alternata* est connue par la production des mycotoxines ; *A. tenuissima* est capable de produire des toxines tel que l'acide ténuazonique (**Andersen et al., 2002**).

8.1.2. Le genre *Fusarium*

Qui ont à la fois des pouvoirs pathogènes et saprophytes (**Mahideb et Merrouche, 2015**). Les espèces rencontrées sont surtout : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae*. Les *Fusarium* ont la capacité de produire des mycotoxines (**Belmehdi et Beddar, 2019**) la pourriture de la tige et la brûlure de l'épi du blé peuvent causer par les deux espèces *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* (**Adams et al., 2008 ; Mahideb et Merrouche, 2015**).

8.2. Flore intermédiaire

Elle est une catégorie à comportement plus diversifié et regroupe des germes capables d'un développement limité, au début de stockage, en condition particulière et notamment sur grains insuffisamment secs. Les genres les plus rencontrés sont : *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Absidia* et *Mucor* (**Godon et al., 1997 in Mahideb et Merrouche, 2015 ; Belmehdi et Beddar, 2019**).

8.3. Flore de stockage

Les moisissures de blé stocké sont présentes sous forme de mycélium dormant sous le péricarpe ou spores en dormance sur la surface du grain. Cependant, un certain nombre de moisissures sont superficiellement associées aux grains stockés ; une pression sélective influençant la structure de la communauté et la dominance de quelques moisissures peuvent exercer par les facteurs environnementaux (**Magan et al., 2003**). Les principaux genres rencontrés sont :

8.3.1. Le genre *Aspergillus*

Y'a des conditions de développement pour Chaque espèce de moisissures de stockage (**Christensen et al., 1969**) quand la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées la multiplication des moisissures du genre *Aspergillus* passe plus rapide (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Belmehdi et Beddar, 2019**).

À une teneur d'humidité inférieure à 15% et une température d'environ 70°C l'espèce *Aspergillus restrictus* c'est l'espèce qui prédomine dans le blé stocké (**Belmehdi et Beddar, 2019**). Au-dessus de 15% d'humidité, d'autres espèces peuvent apparaître telles que : *Aspergillus repens*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus ruber* prédominant et conservent leurs prédominances même à des teneurs d'humidité supérieures à 18% (**Christensen et al., 1969 ; Belmehdi et Beddar, 2019**).

8.3.2. Le genre *Penicillium*

Les moisissures de ce genre sont moins fréquentes avant la récolte mais commencent à croître rapidement pendant le stockage, quand les conditions appropriées sont réunies. Elles se développent même lorsque la teneur en eau est relativement basse, mais elle doit être au-dessus d'un seuil de 14% environ et d'un taux d'humidité de 75% (**Neergaard, 1977**). Les espèces les plus communes sont essentiellement : *P. aurantiogriseum*, *P. cyclopium*, *P. hordei*, *P. freii*, *P. melanoconidium*, *P. polonicum*, *P. viridicatum*, *P. verrucosum*, *P. crustosum* (**Dijksterhuis et al., 2007 ; Mahideb et Merrouche, 2015**).

Chapitre 2 :
Généralité sur l'Aspergillus

1. Généralité sur le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (**Ben Bordi et Oubiri, 2019 ; Tabuc, 2007 ; Raper et Fennell, 1965**).

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique dans la nature, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud, grâce à leur capacité de produire un grand nombre de spores aéroportées et facilement transmissible par le courant d'air, de plus la majorité de ces espèces n'ont pas de besoins nutritionnels particuliers (**Bennoudia, 2016 ; Makhoulf, 2019 et Tabuc, 2007**). La plupart des *Aspergillus* sont saprobes, se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires et les céréales (**Belaib et Bouhala, 2016 ; Tabuc, 2007**). Ils colonisent les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou infestés par d'autres champignons. Ils sont aussi présents sur la surface des graines, dans les mauvaises conditions de stockage (**Bennoudia, 2016 ; Lahouar, 2016**).

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (**Raper et Fennell, 1965 ; Botton et al., 1990 ; Tabuc, 2007 ; Lahouar, 2016**). Plusieurs espèces de ce genre sont capables de produire des mycotoxines (**Bennoudia, 2016 ; Lahouar, 2016**). Parmi les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines, les ochratoxines et la Patuline, ont une incidence économique et sanitaire. Ces mycotoxines ont été identifiées la première fois chez *A.flavus*, *A. ochraceus* et *A. clavatus*, respectivement (**Smith et Moss, 1985**). Cependant, de récentes études ont montré que ces toxines peuvent aussi être produites par plusieurs autres espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Seule une partie de ces champignons mycotoxinogènes peut présenter un risque, car les autres n'en produisent que de très faibles quantités de toxines ou bien elles sont rarement rencontrées dans l'alimentation (**Riba, 2008**).

2. Les caractères morphologiques d'identification du genre *Aspergillus*

L'identification du genre *Aspergillus* se base sur la description des caractères morphologique macroscopique et microscopique.

2.1. Description macroscopique d'*Aspergillus*

Les caractéristiques macroscopiques des colonies permettent l'identification des *Aspergillus*. Selon **Raper et Fennell (1965)**, leur identification dépendra des paramètres suivants :

2.1.1. L'aspect de la colonie

La couleur de la partie aérienne est le premier critère de base qui permet de distinguer les espèces du genre *Aspergillus*. Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-30°C ; les espèces thermo tolérant (*A. fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C (**Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994**). La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces (**Figure 4**) :

- Gris vert pour *Aspergillus* section *Fumigati*(A)
- Brun cannelle pour *Aspergillus* section *Terrei* (B)
- Noir pour *Aspergillus* section *Nigri* (C)
- Blanche pour *Aspergillus* section *Candidi*(D)
- Vert-jaune pour *Aspergillus* section *Flavi*(E) (**Bennoudia, 2016**).

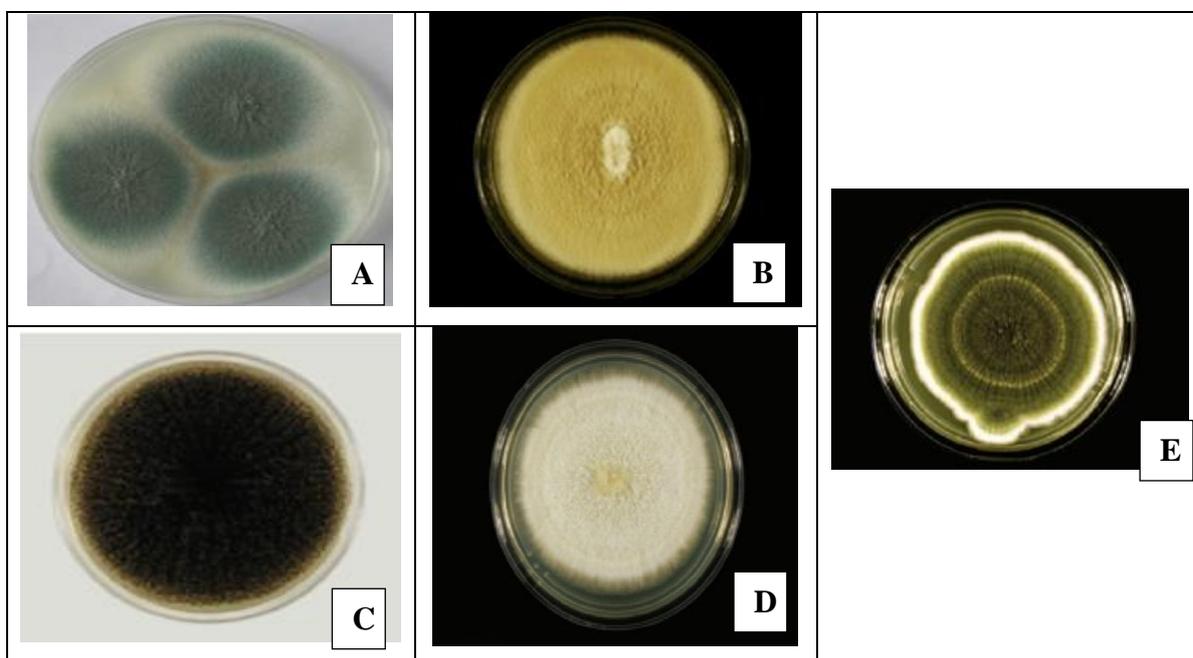


Figure 4: Aspect macroscopique de colonie des différentes sections d'*Aspergillus* (**Bioforma, 2002**) **A** : *A.fumigati*, **B** : *A.terrei*, **C** : *A.nigri*, **D** : *A.candidi*, **E** : *A.flavi*.

2.1.2. La texture de la colonie

Qui peut être floconneuse, veloutée, etc. Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge. Il peut parfois être caractérisé une espèce (**Bennoudia, 2016**).

2.1.3. La production des sclérotés

Certaines espèces d'*Aspergillus* ont la capacité de former des amas mycéliens compacts, souvent durs, globuleux, ellipsoïdaux ou allongés, appelés sclérotés, qui aident le champignon à survivre dans des conditions hostiles (**Wicklow et Shotwell, 1983**).

2.1.4. Vitesse de croissance

Pour une température et un milieu donnés, la croissance observée en un temps « t » ainsi que le diamètre atteint sur un milieu défini sont caractéristiques de chaque espèce. Une colonie d'*Aspergillus* développe en général entre 2 à 7 jours (**El-Khoury, 2007**).

2.1.5. Structure marginale des colonies

Les contours de la colonie varient : ils peuvent être épais, minces, lisses, rugueux et lobés (**El-Khoury, 2007**).

2.2. Morphologie microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif appelé thalle formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, cloisonnés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides (**Benadoud, 2014**). Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (**Figure 5**) (**Raper et Fennell, 1965 ; Badillet et al., 1987**). L'ensemble vésicule, métules, phialides et conidies constitue la tête *Aspergillaire* caractéristique du genre (**Lahouar, 2016**).

Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir (**Bendaoud-Tabet Aoul, 2014**).

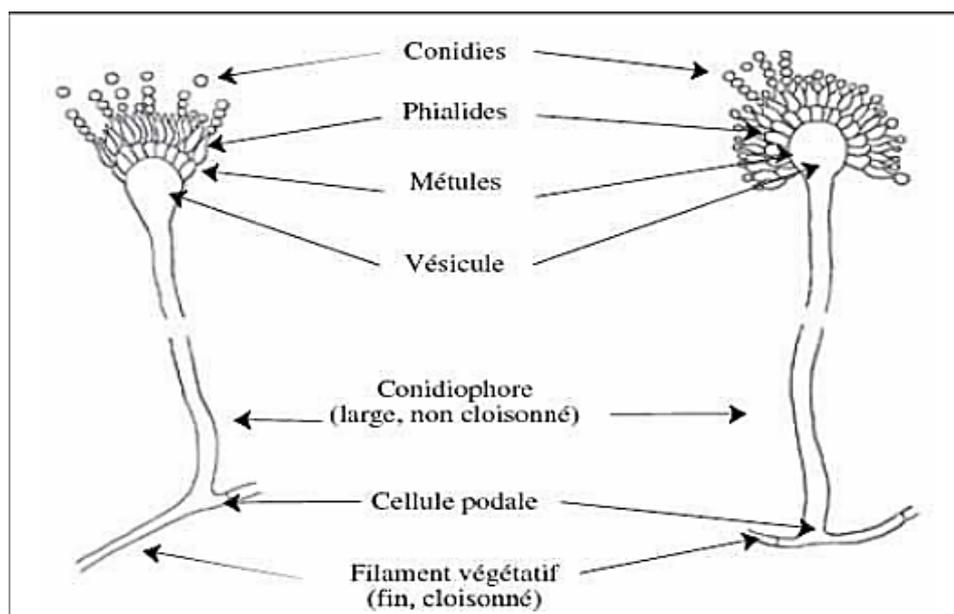


Figure 5: Caractéristiques microscopiques des espèces appartenant au genre *Aspergillus* (Ripert, 2013).

La structure porteuse de spores ressemblant à un aspergillum est le caractère microscopique le plus important utilisé dans la taxonomie *Aspergillus*. Au cours de la différenciation mycélienne, certaines cellules grossissent, développent une paroi cellulaire et forme des cellules de pied en forme de « T » ou « L » (qui ne sont pas des cellules séparées) qui produisent un conidiophore unique perpendiculaire au long axe de la cellule. Parfois, il est difficile de voir le « cellule » du pied, mais lorsqu'elle est visible, les morphologues la prennent comme preuve solide qu'un isolat est un *Aspergillus* espèce (Bennett, 2010).

3. Principales espèces du genre *Aspergillus*

3.1. *Aspergillus* section *Nigri*

Les champignons de cette section (les Aspergilles noirs) sont ubiquitaires, saprobes et omniprésents dans les sols à travers le monde, en particulier dans les régions tropicales. Ils sont capables de se développer à une température comprise entre 6 et 47°C avec une température optimale de 35-37°C (Ripert, 2013).

Les *Aspergillus* noirs sont les moisissures les plus impliquées dans la détérioration et la biodégradation des aliments dans le monde des champignons. Cette section comprend 6 espèces : *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. ellipticus*, *A. heteromorphus*, *A. niger* et *A. tubingensis*. Il est difficile de distinguer des deux dernières espèces et sont toutes les deux appelées communément *A. niger* ou *A. nigeraggregate*. Ont été récemment distinguées par

leur capacité à produire l'Ochratoxine A (OTA) ; malgré sa production par *A. niger* est peu commune et ne dépassant pas 1 à 2% des isolats malgré son incidence importante par rapport à *A. carbonarius*. Des rapports récents ont confirmé la capacité d'*A. niger* aggregates à produire la Fumonisine B2 et B4 par des souches *A. niger* et *A. awamorii* isolées à partir desraisins (Lahouar, 2016).



Figure 6: Aspect microscopique (droite) et macroscopique (gauche) d'*Aspergillus niger* (Abarca *et al.*, 2004).

3.2. *Aspergillus ochraceus*

Ce sont des champignons poussent rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques à une température de 25 à 30°C. La texture des colonies de cette espèce sont poudreuses ou granuleuses avec une couleur blanche au début, puis jaunes ou ocre-jaunes à chamois. Le revers de colonies est incolore au jaune pâle (Ripert, 2013).

Les têtes conidiennes sont bisériées. Les conidiophores sont rugueux, jaunes à brun pâle, longs atteignant 1,5 mm les vésicules sont globuleuses, hyalines, 30-50 µm en diamètre.

Les phialides (7-10 x 2-3,5 µm) sont portées par des métules, de dimensions variables. Les conidies sont sub-globuleuses à globuleuses. Elles mesurent 2,5-3 (3,5) µm de diamètre, sont finement échinulées ou lisses (Tabuc, 2007).



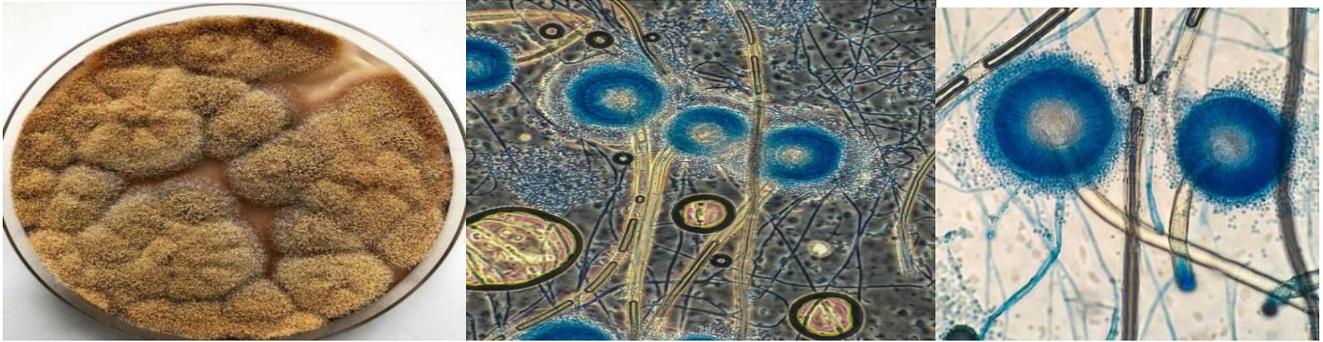


Figure 7: Aspect microscopique et macroscopique d'*Aspergillus ochraceus* (Atoui, 2006).

3.3. *Aspergillus fumigatus*

Ce champignon on distingue un mycélium à croissance rapide sur les milieux de culture classiques à 37°C (Lalgé, 1999 ; Ripert, 2013). *A. fumigatus* est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C ; la température optimale étant située aux alentours de 40 et 42°C. Cette espèce peut se développer jusqu'à 57°C. Cette espèce forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vert et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches et peut être incolore (Ben Bordi et Oubiri, 2019).

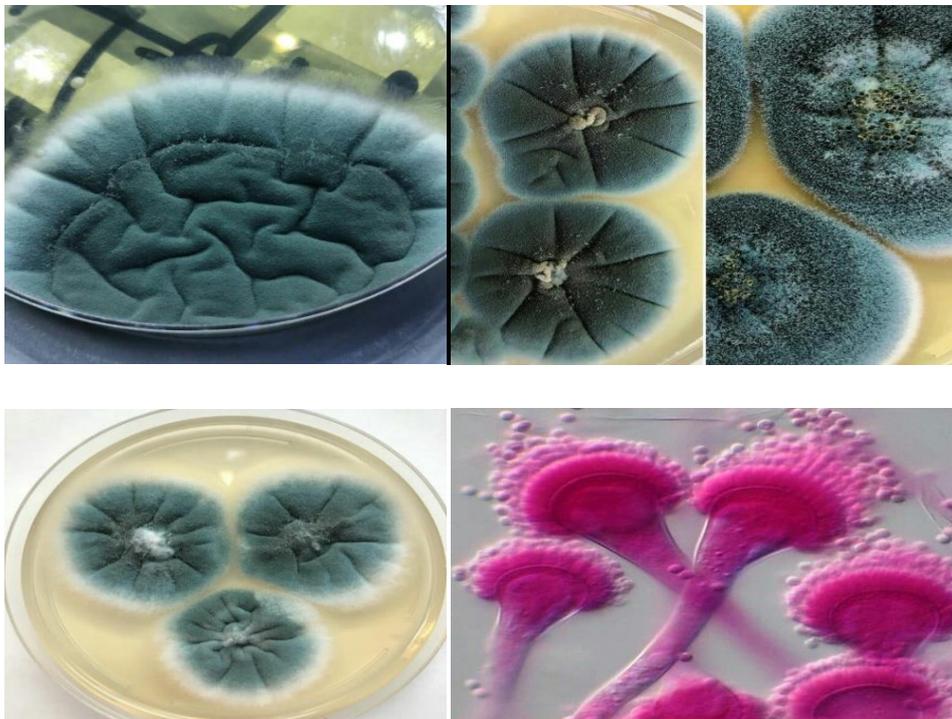


Figure 8: Aspect microscopique (droite) et macroscopique (gauche) *Aspergillus fumigatus* (Bioforma, 2002).

3.4. *Aspergillus oryzae*

Ce champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses aumalt et Sabouraud) à température entre 22-25°C. *A. oryzae* forme des colonies à une texture duveteuse à poudreuses, d'abord de couleur blanche, puis jaune, et enfin vert-jaunâtre à vert olive. Le revers peut être incolore ou jaunâtre (Belaib et Bouhala, 2016 ; Tabuc, 2007 et Ripert, 2013).

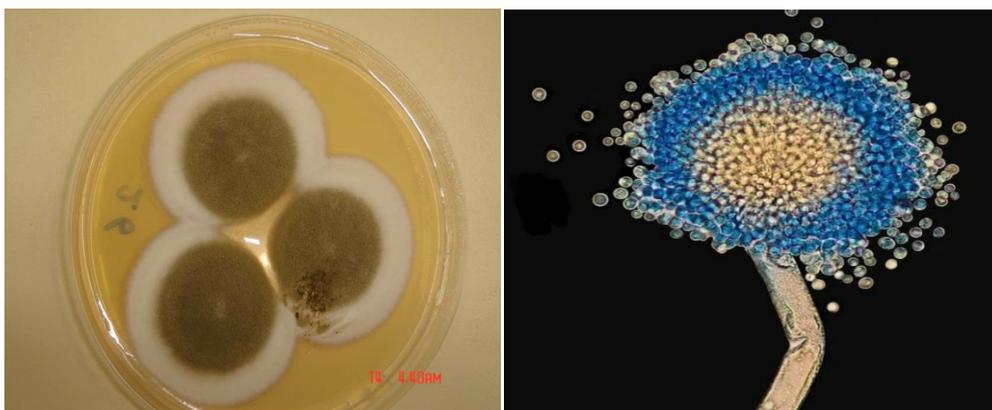


Figure 9: Aspect microscopique (droite) et macroscopique (gauche) d'*Aspergillus oryzae* (Dehghan *et al.*, 2008).

3.5. *Aspergillus* section Flavi

En général, les membres d'*Aspergillus* section Flavi (groupe d'*A. flavus*). Les espèces de cette section peuvent être présentes dans la nature soit comme des saprophytes dans le sol ou comme des parasites des plantes, des insectes et des animaux (Riba, 2008).

La section Flaviest d'une grande importance car elle regroupe les espèces capables de produire les aflatoxines. Depuis longtemps la section Flavi est composée de 3 espèces : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*. Les études plus récentes ont montré que cette section regroupait 33 espèces, qui peuvent être réparties selon 8 clades : *flavus*, *tamarisii*, *nomius*, *alliaceus*, *togoensis*, *leporis*, *avenaceus* et *bertholletius* en fonction de leurs caractéristiques moléculaires (Makhlouf, 2019).

Les principales espèces de cette section peuvent maintenant être classées plus en détail, c'est-à-dire qu'ils sont souvent isolés des aliments (Makhlouf, 2019).

3.5.1. Principales espèces de la section Flavi

A. *Aspergillus flavus*

En général, le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (gélose au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C. *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune (Belaib, 2016 ; Ben Bordi et Oubiri, 2019 ; Tabuc, 2007 ; Riper, 2013).

D'abord, les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, elles composent et reparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé (Ripert, 2013). Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. Les vésicules sont sub-globuleuses, et mesurent 25 (10-65) à 45 µm de diamètre. Les phialides (6-10 x 4-5,5 µm) sont insérées directement sur la vésicule (unisériées) ou portées par des métules. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de 3-6 µm de diamètre, de couleur verte pâle, verruqueuses (Tabuc, 2007).



A: aspect macroscopique

B : Aspect microscopique

Figure 10: Aspect microscopique et macroscopique d'*Aspergillus flavus* (Bioforma, 2002).

B. *Aspergillus parasiticus*

Les colonies d'*Aspergillus parasiticus* sont vert foncé, couleur lierre, plus floconneuses que celle d'*Aspergillus flavus* sur MEA. Les conidiophores sont incolores, de taille variable (300-700µm). Leur paroi est lisse ou rugueuse dans la partie distale. Les vésicules sont globuleuses (20-35µm), les phialides sont pour la plupart unisériées (>90%). Les conidies sont globuleuses, très échauffées voir épineuses (3,5-5,5 µm). Cette espèce produit les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, l'acide kojique, l'acide aspergillique mais pas l'acide cyclopiazonique (Makhlouf, 2019).



A: aspect macroscopique

B : Aspect microscopique

Figure 11: Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus parasiticus* (Hocking et al., 2006).

C. *Aspergillus nomius*

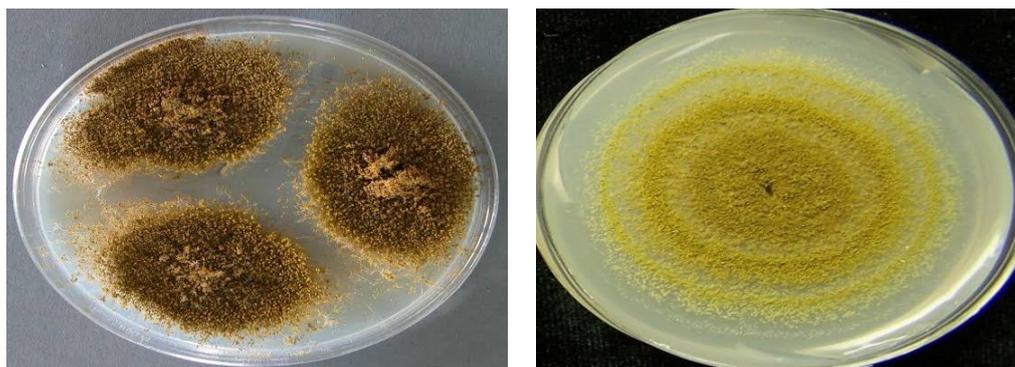
Les colonies de cette espèce d'*Aspergillus nomius* sont claires et très floconneuses. La sporulation sur MEA est faible (Makhlouf, 2019). Les conidiophores sont incolores (300-1100 μm). Leur paroi est échinulée. La forme des vésicules sont globuleuses à sub-globuleuses (25-65 μm). Les phialides sont bisériées. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses et échinulée. *Aspergillus nomius* produit les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, l'acide aspergillique, l'acide kojique mais pas l'acide cyclopiazonique (Ripert, 2013).



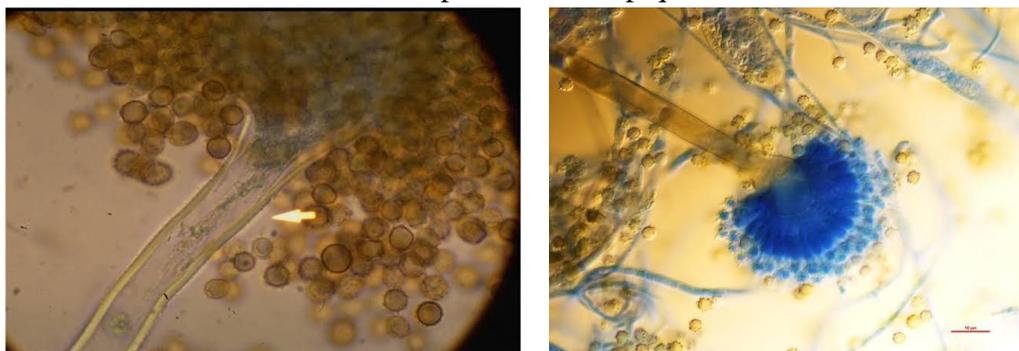
Figure 12: Aspect macroscopique de l'*Aspergillus nomius*, après culture sur MEA à 25°C pendant 5 jours (Makhlouf, 2019).

D. *Aspergillus tamari*

La couleur des colonies de cette espèce est vert bronze foncé, très sporulées avec un pourtour festonné. Le revers est jaune orangé. Les chaînes de spores festonnées sont portées sur les têtes aspergillaires. Il y a également quelques petites têtes en colonne. Les conidiophores sont longs, larges et rugueux. Les têtes sont radiées, uni ou bisériées. La vésicule est sphérique et les spores sont grosses, rondes, avec une paroi épaisse et échinulée. Le revers sur milieu AFPA est marron foncé (Makhlouf, 2019).



A : aspect macroscopique



B : Aspect microscopique

Figure 13: Aspect microscopique et macroscopique d'*Aspergillus tamaris* (Nyongesa *et al.*, 2015).

E. Aspergillus minisclerotigenes

Les colonies sont de couleur vert gris, moins sporulées que l'*Aspergillus flavus* mais plus profondes (Makhlouf, 2019). Les conidies sont subgloboses, échinulées ou bien lisses et les conidiophores sont rugueux. Les têtes peuvent être uni- ou bisériées avec des vésicules globoses à subgloboses. Cette espèce capable de produire les aflatoxines B1, B2, G1 et G2, L'acide cyclopiazo nique et l'acide aspergillique (Ripert, 2013).



Figure 14: Aspect microscopique (droite) et macroscopique (gauche) d'*Aspergillus minisclerotigenes* (Makhlouf, 2019).

3.5.2. Chémotype des différentes espèces d'*Aspergillus* section *Flavi*

Les différentes espèces de la section *Flavi* n'ont pas forcément la capacité de produire les différentes mycotoxines évoquées précédemment. En fonction de leurs capacités à produire les différentes aflatoxines et l'acide cyclopiazonique, ont proposé de classer les isolats en différents chémotypes : Chémotype I pour les souches produisant des aflatoxines B et l'ACP, Chémotype II pour les souches produisant des aflatoxines B, G et de l'ACP, Chémotype III pour les isolats produisant des aflatoxines B uniquement, Chémotype IV pour les souches ne produisant que de l'ACP et enfin, Chémotype V pour les souches ne produisant aucune de ces mycotoxines (Makhlouf, 2019).

3.5.3. *Aspergillus Flavi* et la production des aflatoxines

Trois souches de cette section sont principalement connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. *A. parasiticus* produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2). *A. flavus* produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2 alors qu'il ne produit habituellement ni l'aflatoxine G1 ni l'aflatoxine G2. Enfin, *A. nomius*, une souche rare très proche d'*A. flavus*, est capable de produire certaines aflatoxines (Faria *et al.*, 2017 ; El Khoury *et al.*, 2011).

4. Importance du genre *Aspergillus*

Étant donné son importance économique extrême liée à ses effets utiles et nuisibles, plusieurs ouvrages ont été consacrés au genre *Aspergillus* en général et à sa taxonomie et sa phylogénie en particulier (Riba, 2008). Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production de métabolites utiles (enzymes et acides organiques) (Belaib et Bouhala, 2016 ; Lahouar, 2016 ; Tabuc, 2007).

5. Potentiel toxigène

De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* (Tableau 4) sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines (Tabuc, 2007 ; Riba, 2008).

L'*Aspergillus flavus* et l'*A. parasiticus* sont les principaux producteurs d'aflatoxines. L'aflatoxine B1 est classée comme cancérigène chez l'homme et l'animal (Riba, 2008). Ainsi l'*Aspergillus fumigatus* synthétise plusieurs métabolites très toxiques comme la fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, les dérivés quinoniques, des alcaloïdes voisins de ceux de l'ergot de seigle. L'*Aspergillus niger* peut produire de l'acide oxalique, des

malformines et, certaines souches, des aflatoxines. Tandis que l'*Aspergillus ochraceus* est le principal producteur d'ochratoxine A. Il colonise lui aussi de très nombreux substrats. *Aspergillus terreus* excrète des substances antibactériennes, de toxicité variable (flavipine, terréine, citrinine, erdine et molécules voisines, clavacine) (Tabuc, 2007).

Tableau 4: Les *Aspergillus* producteurs de mycotoxines (Tabuc, 2007).

Espèces d' <i>Aspergillus</i>	Mycotoxines produites
<i>Aspergillus niger</i>	Malformine, naftoquinone.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Acide kojique, acide neoaspergillique, ochratoxine, acidepenicillique, acide sécalonique A.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavine, fumagiline, fumitoxine, fumitremorgine A et C, gliotoxine.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Acide cyclopiazonique, acide kojique.
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1 et B2, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, acide kojique.
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique, acide kojique.
<i>Aspergillus nomius</i>	Aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique.
<i>Aspergillus terreus</i>	Citréoviridine, citrinine, gliotoxine, patuline, terréine, acide terréique, terrétonine, territrem, terramide A.
<i>Aspergillus candidus</i>	Candiduline.
<i>Aspergillus carneus</i>	Citrinine.
<i>Aspergillus clavatus</i>	Acide kojique, patuline, xanthociline.
<i>Aspergillus sydowii</i>	Sterigmatocystine, griséofulvine.

6. Pouvoir pathogène

L'*Aspergillus* est des champignons pathogènes opportunistes ; nécessite des conditions locales favorables pour leur développement (cavernes tuberculeuses, cancer bronchopulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques obstructives, emphysèmes, mucoviscidose...). Les principales espèces responsables de mycoses (aspergilloses) sont (Tabuc, 2007) :

6.1. *Aspergillus fumigatus*

Considéré comme le principal agent d'aspergillose aviaire et humaine (représentant 80-90% des aspergilloses humaines).

6.2. *Aspergillus flavus*

Responsable d'aspergilloses pulmonaires ou généralisées principalement chez les patients immunodéprimés.

6.3. *Aspergillus niger*

Il peut provoquer des aspergilloses, des otites et des sinusites ; il est aussi à l'origine d'infections cutanées, pulmonaires et généralisées.

6.4. *Aspergillus sydowi*

Impliqué dans des cas d'endocardite humaine.

6.5. *Aspergillus terreus*

C'est un agent important d'aspergilloses pulmonaires et cérébrales chez les patients immunodéficients ; il est souvent isolé des expectorations chez les patients atteints de mucoviscidose, c'est aussi une espèce fréquemment isolée dans des prélèvements de peau et de phanères. Il est considéré comme le principal agent d'onychomycoses.

Chapitre 3:
Mycotoxine cancérogène

1. Généralité sur les mycotoxines

1.1. Définition

Le terme mycotoxine est une combinaison du mot Grec mykos (champignon) et du Latin toxicum (poison). Les mycotoxines sont des molécules capables d'induire un effet toxique à de faible concentration, (**Bourais et Amine, 2006 ; Ghezlen-Tebibel et al., 2016 ; Siefia et Derfalou, 2020**). Ces métabolites sont non-essentiels au cycle de vie du champignon mais une fois produits, ils pourraient lui conférer certains avantages compétitifs (**El Khoury, 2007 ; Siefia et Derfalou, 2020**) de plus sont très stables dans les milieux acides et aux températures élevées, peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants (**Siefia et Derfalou, 2020**).

L'exposition humaine aux mycotoxines se produit directement par l'ingestion de produits agricoles contaminés (céréales, maïs, fruits, etc...) ou indirectement par la consommation de produits d'origine animale (lait, œufs, etc.) (**Zinedine et Idrissi, 2007 ; Stepurska, 2016**).

Les mycotoxines sont synthétisées pendant la phase diophase après que les stades de reproduction et de croissance ont des structures chimiques très variables qui leur confèrent une bonne stabilité et donc les processus alimentaires normaux (cuisson, lyophilisation, congélation et irradiation) ne peuvent pas les détruire complètement (**Benaudia, 2016**). Leur durée de vie dans l'aliment est plus longue que celles des moisissures les ayant synthétisées (**Ghezlen-Tebibel et al., 2016**).

1.2. Les moisissures mycotoxinogènes

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures, dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène (**Reboux, 2006**). Plus de 150 moisissures mycotoxinogènes sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Claviceps* (**Pamel et al., 2010**). Parmi ces genres, seules certaines espèces et parfois, certaines souches au sein d'une espèce, sont capables d'excréter des mycotoxines (**Ruppel et al., 2004**).

Certaines mycotoxines sont étroitement liées à des espèces fongiques spécifiques alors que, d'autres sont élaborées par de nombreuses espèces appartenant à des genres différents (**Tab. 5**). Les mycotoxines sont produites soit, dans le champ lors du développement de la plante (toxines du champ) soit, après la récolte (toxine du stockage) (**Afssa, 2009**).

Tableau 5: Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées (Atoui, 2006).

Espèce fongique productrice	Mycotoxine associées
<i>Aspergillus sp.</i>	Gliotoxine, funagilline, acide helvolique, trypacidine, fumitrémorgines, fumiquinazolines, aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine.
<i>Alternaria sp.</i>	Alternariol, acide, ténuazonique.
<i>Claviceps sp</i>	Alcaloïde (ergotamine et dérivés).
<i>Fusarium sp</i>	Trichothécène (déoxynyvalénol, toxine T-2, diacétoxyscirpénol, nivalénol), zéaralénone, fumonisines, fusarine, moniliformine.
<i>Penicillium</i>	OchratoxineA, pénitrem, acide cyclopiazonique, patuline, citrinine

1.3. La nature et l'origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont des substances chimiques complexes. Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, salframine, gliotoxine, roquefortine, sporidesmine, Fumitrémorgines), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine A, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, déoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine)(Tab. 6)(Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005; Mahideb et Merouch, 2015 ; Bennoudia, 2016 ; Belmehdi et Beddar, 2019).

Tableau 6: Origine chimique des mycotoxines (Riba, 2008).

Mycotoxines dérivées des acides aminés	Mycotoxines dérivées des Polycétoacides	Mycotoxines dérivées des Terpènes
- Alcaloïdes de l'ergot.	- Aflatoxines.	- Diacétoxyscirpénol (DAS).
- Acide cyclopiazonique (CPA).	- Acide pénicillique.	- Déoxynivalénol.
- Acide aspergillique.	- Citrinine.	- Fusarénone.
- Fumitrémorgines.	- Ochratoxines.	- Roridines.
- Gliotoxine.	- Patuline.	- Toxine T2.
- Roquefortine.	- Rubratoxines.	- Verrucarines, etc.
- Slaframine.	- Stérigmatocystine.	
- Sporodesmine, etc.	- Zéaralénone, etc.	

À ce jour, 300 à 400 mycotoxines sont connues, (**Ruppel *et al.*, 2004 ; AFSSA, 2009**). Trois mécanismes différents sont possibles pour la formation des métabolites toxiques dans un substrat à la suite de leur attaque par des moisissures. Soit le champignon, en parasitant un végétal vivant, peut entraîner, une exacerbation de certaines réactions métaboliques de la plante, soit la formation par le végétal de produits toxiques n'existant pas dans la plante saine. Ou le champignon peut transformer un composé peu ou pas toxique en un produit toxique par le jeu des bioconversions (**Tabuc, 2007**).

1.4. Biogénèse des mycotoxines

Les mycotoxines sont produites par nombreuses moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène. Elles doivent cependant croître sur un substrat permettant l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines de ces champignons (**Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005**).

Les mycotoxines font partie des métabolites secondaires élaborées par diverses moisissures filamenteuses (à faible poids moléculaire $PM < 1000$ Da) (**Seifia et Derfalou, 2020**), en particulier par ceux qui appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps* (**El Khoury, 2007**). Qui ne jouent pas de rôle évident dans l'économie du microorganisme. Contrairement au métabolisme primaire, qui est fondamentalement le même pour tous les êtres vivants, le métabolisme secondaire dépend de l'espèce considérée, et très souvent de la souche. Le métabolisme secondaire, très important chez les moisissures, aboutit à une grande diversité de molécules, dont les mycotoxines.

Les métabolites secondaires sont très souvent élaborés par familles de produits chimiquement voisins (les aflatoxines, les trichothécènes, etc.). La nature de ces produits, très hétérogènes, dépend des caractères individuels de la souche et des conditions environnementales (**Tabuc, 2007**).

Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificité différente de celles du métabolisme primaire. La détermination des schémas métaboliques de biosynthèse de certaines mycotoxines a été rendue possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques et de précurseurs métaboliques (**Luchese et Harrigan, 1993 ; Steyn, 1980**).

La diversité de structure d'une mycotoxine à une autre résulte de la variabilité des voies de biosynthèse. Les différentes voies de synthèse des mycotoxines dérivent du coenzyme A (CoA). Celui-ci est ensuite acétylé en un polycétide ou polycétoacide via une

polycétide synthase (PKS), pour conduire à la synthèse des mycotoxines dérivées de polycétoacides (Gherras et El himer, 2017).

Les mycotoxines sont regroupées en fonction de leur origine biosynthétique en trois catégories principales, à savoir les terpènes, les polycétides et les peptides cycliques non-ribosomiques. En outre, une quatrième catégorie regroupant les peptides hybrides NRPS/PKS qui contiennent à la fois des unités peptidiques et polycétides, a été identifiée (Tannous, 2015).

Les mycotoxines ont trois origines biosynthétiques principales : la voie des polyacétates, celle des terpènes et celle des acides aminés (Fig. 15) (Tabuc, 2007). La Figure schématise les principales voies connues de biosynthèse des mycotoxines.

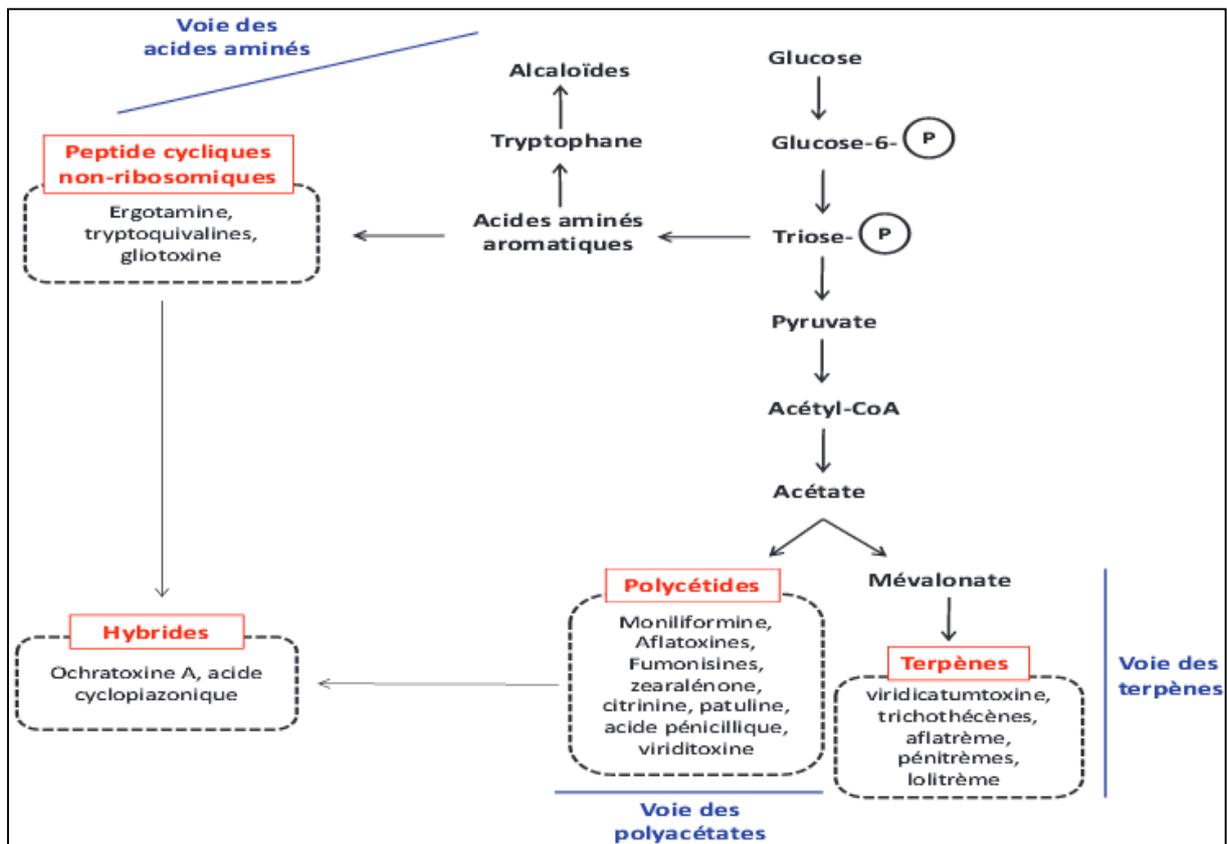


Figure 15: Voies de biosynthèse des mycotoxines (Tabuc, 2007).

1.5. Structure des mycotoxines

La diversité des voies de synthèse et des espèces productrices fait qu'il existe de très nombreuses molécules, de structure relativement différentes les unes des autres. Dans la plupart des cas, les **mycotoxines** sont de molécules de faible poids moléculaire : de 154 D

pour la patuline qui est l'une des plus petites, à 466 D pour la toxine T2 qui est l'une des plus grosses (Tabuc, 2007).

Les mycotoxines sont, pour la plupart, des composés hétérocycliques insaturés. La présence de doubles liaisons C = C joue souvent un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérigènes. C'est notamment le cas pour les aflatoxines dont la double liaison à l'extrémité des groupements furanes permet l'addition d'O₂ et la formation d'un cycle triangulaire époxyde extrêmement toxique (Bennett et Klich, 2003). Pour le déoxynivalénol (DON) et la toxine T2 qui sont des 12-13 époxytrichothécènes, le cycle époxyde est constitutif (Tabuc, 2007).

Un certain nombre de ces molécules sont fluorescentes sous lumière U.V. (aflatoxines B1, B2 et G1, G2, ochratoxine A, zéaralénone,...). Cette caractéristique est importante dans l'élaboration des méthodes de détection et de dosage (Tabuc, 2007).

2. La mycotoxinogénèse

2.1. Définition de la mycotoxinogénèse

La mycotoxinogénèse correspond à l'ensemble des conditions nécessaires au processus de synthèse et de sécrétion des toxines fongiques dans l'environnement. La production de toxines et le développement fongique sont intimement liés. Dès lors, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique joueront aussi un rôle sur la toxinogénèse. En revanche, les conditions idéales de toxinogénèse sont plus étroites que celles favorisant le développement fongique (Gauthier, 2016).

L'apparition de toxines fongiques dans un milieu est d'autant plus complexe qu'une même espèce de moisissure a la faculté de synthétiser plusieurs substances différentes selon les conditions environnementales. C'est le cas d'*Aspergillus flavus* qui peut sécréter, entre autres, des Aflatoxines, de l'acide cyclopiazonique (CPA) et de l'acide kojique. Inversement, une même toxine peut être produite par des espèces de moisissures différentes : l'Ochratoxine A est à la fois produite par *Penicillium verrucosum* et *Aspergillus ochraceus*. La synthèse des mycotoxines n'est donc pas seulement influencée par des paramètres environnementaux mais aussi par la croissance d'une moisissure spécifique. Par conséquent, l'identification d'une espèce de moisissure sur un substrat ne permet pas de prédire avec certitude la présence d'une mycotoxine dans ce substrat. D'autre part, la résistance des toxines aux facteurs physiques est telle que l'absence de moisissures sur une denrée ne signifie pas obligatoirement que celle-ci est dépourvue de mycotoxines (Gauthier, 2016).

2.2. Facteurs favorisant la mycotoxinogénèse

La sécrétion de métabolites secondaires toxiques par les moisissures dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques ou biotiques (liés à la souche fongique), extrinsèques ou abiotiques (conditions de l'environnement) (**Makhlouf, 2019 ; Bennoudia, 2016 ; Heit, 2015**) divers facteurs d'ordre physiques, chimiques et biologiques (**Gauthier, 2016**).

2.2.1. Facteurs intrinsèques ou biotiques

Ce sont l'ensemble des facteurs qui sont directement liés à la souche elle-même, comme la vitesse de croissance, la capacité de dissémination, la dispersion des spores ou encore la longévité des spores. Ce sont tous les facteurs qui constituent le potentiel infectieux fongique influençant la synthèse de toxines dans un milieu déterminé (**Gauthier, 2016**).

Le métabolisme secondaire n'est pas commun à toutes les espèces fongiques, mais spécifique d'une espèce, voire même d'une souche fongique et de ses caractéristiques génétiques (**Riba, 2008**). Au sein d'une espèce toxigène donnée, la capacité de production des mycotoxines n'est pas présente chez toutes les souches (**Duverger et al., 2011**).

Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces quelque fois appartenant à différents genres et une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines (**Le baras et al., 1987 ; Mahideb et Merrouche, 2015**) (ex. l'ochratoxine A produite par certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* (**Mitchell et al., 2004**), inversement, certaines souches d'*A. flavus* peuvent produire simultanément de l'AFB1, l'acide cyclopiazonique et de aspertoxine, etc., (**Riba, 2008**).

De plus au sein d'une même espèce toxigène, certaines souches sont fortement productrices de toxines alors que d'autres le sont mais à des degrés moindres (**Bennoudia, 2016**).

2.2.2. Facteurs extrinsèques ou abiotiques

A. Facteurs physiques

- **Température**

La température joue un rôle prépondérant de la croissance et la physiologie des moisissures et en outre sur la compétition entre les espèces (**Botton et al., 1990**) et donc de la production de toxines (**Northolt et al., 1979**). La plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant entre 25 °C et 35 °C (**Botton et al., 1990**). Les conidies

des espèces mésophiles ne germent pas en dessous de 5°C mais restent viables très longtemps, et des températures inférieures à -20°C ne tuent pas les conidies (**Pitt et Hocking, 1985**).

En général, la température optimale de croissance pour la plupart des champignons se situe vers 25°C (**Botton et al., 1990**). C'est le cas des champignons du genre *Aspergillus* dont l'intervalle de croissance correspond à une température allant de 12 °C à 39 °C avec un optimum se fixant à 24°C. D'autre part, certaines espèces de champignons sont psychrophiles ou psychrotolérantes et sont capables de se développer à des températures relativement basses comme les champignons du genre *Penicillium* dont l'intervalle de température varie de 4 °C à 31 °C avec un optimum vers 12°C (**El khoury, 2007**). À 5°C, *Aspergillus* ne peut produire ni les aflatoxines, ni l'OTA, alors que *Penicillium* et *Fusarium* sont capables de produire les mycotoxines (**Riba, 2008**).

La température permettant une toxigénèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance, pour la plupart des mycotoxines ; tout en demeurant légèrement inférieure (**El khoury, 2007**).

En ce qui concerne les *Aspergillus* de la section *Nigri*, de façon générale, la production d'OTA se fait dans un très large intervalle de température (**Esteban et al., 2004**).

En général, les mycotoxines peuvent être produites sur une large gamme de température. Celle-ci, peut aussi influencer la proportion des toxines produites par une souche susceptible de synthétiser plusieurs molécules (**Bennoudia, 2016 ; Pfohl– Leszkowicz et al., 2001**).

La température intervient aussi sur l'accumulation de toxines par son effet direct sur leur stabilité dans les aliments, cet effet est tout particulièrement important pour les toxines peu thermostables à la température (acide pénicillique, patuline, citrinine) (**El khoury, 2007**).

La croissance des moisissures est caractérisée par des températures minimales, optimales et maximales (**Tab. 7**). Trois types de moisissures se distinguent suivant leur température optimale de croissance :

- **Les espèces cryophiles, ou psychrophiles**, se développent à des températures relativement basses, inférieures à 5°C. C'est le cas de *Cladosporium herbarum* qui peut se développer à des températures négatives.
- **Les espèces mésophiles** : privilégient les températures allant de 5 à 35°C. La plupart des moisissures sont mésophiles, avec des températures idéales de croissance allant de 20 à 25°C. C'est notamment le cas de plusieurs espèces d'*Aspergillus* (**Botton et al., 1990**).

- **Les espèces thermophiles** : dont la croissance est optimale aux alentours de 35°C. Par exemple : *A. flavus* peut continuer de se multiplier au-delà de 50°C (Gauthier, 2016).

Tableau 7: Températures de croissance de quelques espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Gauthier, 2016).

Champignons	T min	T optimale	T max
<i>Aspergillus flavus</i>	15	35	44
<i>Aspergillus clavatus</i>	10	25	37
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	8	24	28
<i>Penicillium purpurogenum</i>	12	28	35
<i>Fusariumtricinctum</i>	5	25	35

Il convient de souligner que la grande majorité des moisissures est sensible aux traitements thermiques (pasteurisation, cuisson), contrairement aux mycotoxines qui sont thermorésistantes. De plus, la température interfère sur l'intégrité et la conservation de la denrée, favorisant alors l'apparition de moisissure (Gauthier, 2016).

- **Activité en eau (Aw)**

L'activité de l'eau, symbolisée par le sigle Aw (pour activity of water), est définie comme le rapport de la pression de vapeur d'eau d'un produit (p) sur la pression de vapeur de l'eau pure (p0), à une température donnée. La valeur de l'activité de l'eau s'établit de 0 à 1. Plus l'Aw est grand, plus la quantité d'eau disponible pour la croissance d'un micro-organisme est importante (Pitt et Hocking, 1985).

La teneur en eau libre dans un substrat est un paramètre dont l'influence est déterminante sur le développement des moisissures et sur la production de mycotoxines (Cairns – Fuller *et al.*, 2005). Pour favoriser la croissance des moisissures, les champignons doivent trouver de l'eau libre (disponible) pour soutenir leur croissance. Sans eau libre il ne peut y avoir diffusion des exo-enzymes fongiques dans l'environnement jusqu'au substrat. Dans les graines, les moisissures utilisent la vapeur d'eau présente dans les interstices entre les grains dont la concentration est déterminée par l'équilibre entre l'eau libre contenue dans le grain (la teneur en eau du grain) et l'eau présente sous forme de vapeur autour du grain (Ghezlen-Tebibel *et al.*, 2016 ; Amoura et Baz, 2014).

La croissance de tous les micro-organismes est caractérisée par des Aw minimum, optimum et maximum (Bellí *et al.*, 2004).

Tableau 8: Aw minimum et maximum de plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* (Bellí *et al.*, 2004).

Champignons	Aw minimum	Aw maximum
<i>Aspergillus niger</i>	0.90	0.98
<i>Aspergillus japonicus</i>	0.98	0.98
<i>Aspergillus flavus</i>	0.84	0.99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.83	0.87
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0.82	0.98
<i>Penicillium viridicatum</i>	0.83	0.86
<i>Penicillium cyclopium</i>	0.82	0.86

La plupart des moisissures préfèrent un aw compris entre 0.85 et 0.99 pour leur développement. L'aw optimal nécessaire à la toxinogénèse est généralement supérieur à celle qui est nécessaire pour la croissance fongique et la germination des spores (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

Le *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une aw de 0,85 ; par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque aw est ≥ 0.85 (Cairns – Fuller *et al.*, 2005). De même, si *A. flavus* peut se développer sur un milieu dont l'aw est de l'ordre de 0,75, la production des aflatoxines par cette espèce nécessite une valeur d'aw minimale comprise entre 0,83 et 0,87 (Astoreca *et al.*, 2012 ; Mohamad *et al.*, 2012 ; Schmidt *et al.*, 2009 ; Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Quelle que soit la nature de l'aliment, aucun micro-organisme ne peut se développer lorsque l'aw est inférieure à 0,65 (Bellí *et al.*, 2004) donc les produits alimentaires ayant une $aw \leq 0,6$ ne sont généralement pas altérés (El khoury, 2007).

Parmi les multiples interactions entre la température et les autres facteurs, le couple « température-humidité » revêt une importance particulière dans la croissance des champignons et par suite dans la production des mycotoxines (El khoury, 2007).

- **Endommagement des grains**

Les grains cassés, fissurés ou altérés par les insectes et les acariens constituent des foyers favorables pour le développement des moisissures qui, après leur envahissement libèrent les toxines (**Le baras et al., 1987**).

B. Facteurs chimiques

- **Acidité du milieu – pH**

Le pH du milieu est un facteur important pour la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La plupart des moisissures croissent dans des pH acides et peuvent tolérer des valeurs de pH très basses (**Le baras et al., 1987**). La gamme de pH permettant la toxigenèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. La plupart des moisissures se développent facilement dans une gamme de pH allant de 3 à 8 avec un optimum de 5 à 6 (**Weidenbörner, 1998**). L'échelle de pH est basée sur le pH de l'eau pure à 25°C :

- Elle est neutre lorsque son pH est égal 7.
- Elle est basique si le pH est supérieur à 7.
- Et elle est acide si le pH est inférieur à 7.

À l'instar du couple température/ A_w , l'intervalle de pH permettant une croissance fongique optimale est plus étendu que celui permettant la synthèse de toxines (**Blackwell et al., 1994**).

- **Tension d'oxygène**

Sans exception, les moisissures ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Mais pour beaucoup d'entre elles, le développement n'est pas ou peu affecté par des teneurs 10 fois plus faibles (2,1%) que celles de l'atmosphère. Les denrées conditionnées sous faible tension d'oxygène ne sont donc pas à l'abri des moisissures (**Ghezlen-Tebibel et al., 2016**).

Généralement la production des mycotoxines est plus sensible à la variation de composition de l'air que la croissance fongique. Une concentration en oxygène inférieure à 1% et des concentrations élevées de CO₂ empêchent l'élaboration de mycotoxines (**Cairns-Fuller et al., 2005 ; Keller et al., 1997**).

- **Composition gazeuse**

La disposition O₂/CO₂ est une ressource sélective pour la croissance fongique. La plupart des moisissures sont aérobies, c'est-à-dire que ces champignons ont besoin d'oxygène,

sous la forme de dioxygène (O₂), pour pouvoir se développer (**Paster et Bullerman, 1988**). La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ a un effet dépresseur important sur la toxigénèse (**Derache, 1986**).

La production de toxines fongiques est plus sensible à la variation de composition gazeuse que la croissance fongique. Une concentration en O₂ inférieure à 1 % et des concentrations élevées de dioxyde de carbone (CO₂) empêchent la synthèse de toxines (**Paster et Bullerman, 1988**), surtout, l'accroissement de la teneur en CO₂, ont un effet dépresseur bien plus important sur la toxinogénèse que sur la croissance chez les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (**Riba, 2008**).

Toutefois, après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxinogénèse (**Le bars et al., 1987**).

- **Nature du substrat**

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, se développant facilement sur des substrats organiques contenus dans les produits alimentaires de base (oléagineux, céréales, produits laitiers etc...) (**Le Bars, 1998**).

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène. Cependant la nature du substrat peut influencer l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines (**Reboux, 2006**).

Les nutriments, dont les champignons ont besoin pour pousser, sont élémentaires et proviennent de matières organiques en décomposition. Les enzymes catabolisent le substrat pour former les nutriments requis, qui seront ensuite absorbés au travers des membranes cellulaires des moisissures. Ces molécules sont des sucres simples, des fractions d'amidon, des peptides et des substances carbonées (comme les acides aminés). Les moisissures ne sont pas capables de proliférer sur n'importe quel substrat (**Madhyastha et al., 1990**). En outre, des souches au sein d'une même espèce ne disposent pas toute du système enzymatique requis pour la production des mycotoxines (**Nicholson et al., 2003**).

La composition qualitative et quantitative du substrat peut influencer l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines (**Reboux, 2006**). La présence de certaines molécules (sucres et/ ou de lipides) dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines (**Pfohl-Leskowicz, 2001**). Ainsi, l'acide phytique (souvent présent dans les céréales) diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline

stimule cette production. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (Pfohl-Leskowicz, 2001 ; Payne *et al.*, 1983).

En effet, les céréales et les oléagineux, plus riches en sucres et en lipides sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (Le Bars, 1998 ; Aziz *et al.*, 1997). Ainsi, la biogénèse des AFs, de l'OTA, est favorisée, tout d'abord, par la présence de glucides dans le substrat, puis de lipides et enfin la présence de protides qui ont une moindre influence (Lacey *et al.*, 1989 ; Lund *et al.*, 2003).

- **Traitements agricoles**

La production des mycotoxines dans le champ peut être influencée par plusieurs facteurs additionnels, il peut s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte (Lipps et Deep, 1991), les fongicides utilisés (Moss et Frank, 1985 ; Le baraset *al.*, 1987), la variété de la plante (Golinski *et al.*, 1996 ; Le baras *et al.*, 1987) et les différences géographiques (Langseth *et al.*, 1995). Selon Edwards (2003), en outre la culture biologique peut poser un risque pour la production accrue de mycotoxine.

La mauvaise maîtrise de l'utilisation d'acide propionique dans l'orge entraîne une augmentation de la production d'Aflatoxine B1 (AFB1), tandis que la croissance d'*Aspergillus flavus* est réduite (Al-Hilli et Smith, 1979) l'utilisation de fongicides doit donc être judicieuse (Gauthier, 2016).

2.2.3. Facteurs biologiques

- **Présence d'acariens et insectes ou prédateurs**

Insectes et acariens sont des vecteurs de dissémination de spores de moisissures, qu'ils introduisent à l'intérieur du grain par les dommages qu'ils créent. Une infestation par les insectes (asticots, larves de coléoptères) favorise la prolifération de micromycètes ainsi que la production de toxines (Farrar et Davis, 1991).

Les insectes détruisent l'enveloppe extérieure des grains, facilitant ainsi la pénétration de la souche à l'intérieur de la graine. Les acariens, vivant sur les céréales atteintes, récupèrent et transportent les spores de champignons sur leur corps et également dans leur tube digestif et déjections. Par conséquent, la contamination des grains sains se produit lorsque des acariens arrivent en contact avec ces grains (Le Bars, 1988).

La contamination de l'arachide, de coton et de maïs par *A.flavus*, avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes (**Le Bars, 1988 ; Murphy et al., 2006**). Ils interviennent aussi bien avant la récolte qu'au cours de la conservation (**Le Bars, 1988**).

Au cours de la conservation, des grains hébergeant des charançons révèlent une population fongique importante et parfois des mycotoxines (Aflatoxine B1, Ochratoxine A et Citrinine dans du maïs ou de l'orge) (**Murphy et al., 2006 ; El khoury, 2007**). Les oiseaux et les rongeurs agissent de manière similaire sur des réserves de céréales non protégées (**Le Bars, 1988**).

- **Interactions entre micro-organismes**

La présence simultanée, dans le même milieu, de micro-organismes dits de « concurrence » (bactéries ou champignons) perturbe le développement fongique et la synthèse de toxines. Cela s'explique par la possible destruction de la toxine par une autre souche et par la compétition pour le substrat. Certains micro-organismes peuvent aussi modifier les conditions environnementales, les rendant ainsi défavorables pour la toxinogénèse (**Lacey, 1986**). Ainsi, la quantité d'aflatoxine B1 produite est réduite quand une souche d'*Aspergillus flavus* est introduite dans une culture en même temps qu'une souche d'*Aspergillus parasiticus*, et ce, même si la souche d'*A. parasiticus* est une souche non toxigène (**Pfohl-Leskowicz et al., 2001**).

En 1988 Mislivec a démontré expérimentalement que la culture simultanée d'*Aspergillus parasiticus* et d'*Aspergillus flavus* ne modifie pas la production d'aflatoxines par ce dernier, alors que la présence d'espèces de *Penicillium* diminue la production de cette mycotoxine. Dans le même esprit, La production d'aflatoxines par *A.flavus* est inhibée lorsqu'*A.niger* est présent dans le même milieu (**Ghezlen-Tebibel et al., 2016 ; Horn et Wicklow, 1983**).

Bouraima et al. (1993) ont rapporté une compétition entre *A. flavus* et *A. ochraceus*. La présence de ces deux champignons conduit essentiellement vers la production de l'aflatoxine, les ochratoxines sont très peu produites ou totalement absentes. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans la biogénèse des aflatoxines, *A. flavus* utilise la phénylalanine du support sur lequel il se développe. Lorsqu'il est plus abondant, il détournerait à son profit toute la phénylalanine ; l'OTA, un analogue de la phénylalanine ne pourrait alors être produite.

2.3. Effets des mycotoxines

La grande diversité des espèces fongiques potentiellement productrices de toxines et leur particularité physiologique font que les mycotoxines sont des contaminants très fréquents des aliments destinés à l'homme et l'animal (**Makhlouf, 2019**). La FAO (Food and Agriculture Organisation) estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Ben Bordi et Oubiri, 2019 ; Krska, 2009**).

Des enquêtes plus récentes, utilisant des méthodes sensibles de détection montrent une fréquence de contamination encore plus élevée avec presque 70% des échantillons contaminés par des niveaux variables de toxines (**Makhlouf, 2019**).

L'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës ou chroniques nommées mycotoxicoses. Cependant, les intoxications aiguës sont rares, spécifiquement chez l'homme, en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. Mais, l'intoxication chronique est souvent à craindre et ce, à cause de l'effet cumulatif des doses fixées sur des organes cibles, tels que les intestins ou le foie (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Ben Bordi et Oubiri, 2019 ; Leclerc et al., 2005**). Les mycotoxines peuvent aussi avoir des effets cancérigènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (**Pamel et al., 2011**).

En outre, certaines mycotoxines peuvent altérer des réactions immunitaires et réduire ainsi, la résistance aux infections. Du coup, il est, maintenant, largement considéré comme leur effet le plus important, surtout dans les pays en développement (**Mahideb et Merrouche, 2015 ; Ben Bordi et Oubiri, 2019 ; Pamel et al., 2011**). Où des lésions organiques irréversibles peuvent être produites. Contrairement aux toxines bactériennes dont les effets sont immédiats (souvent entre 12 et 36 h après ingestion des aliments contaminés), les mycotoxines ont des effets insidieux, qui se manifestent à plus ou moins long terme (quelques mois à quelques années) (**Riba, 2008**).

Le tableau9 résume les effets et les mécanismes d'action des principales mycotoxines. Certaines d'entre elles sont reconnues ou suspectées d'être cancérigènes (**Pamel et al., 2010**).

Tableau 9: Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (AFSSA, 2006).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaire et moléculaire
- Aflatoxine B1 + M1	<ul style="list-style-type: none"> - Hépatotoxicité - Génotoxicité - Cancérogénicité - Immunomodulation 	<ul style="list-style-type: none"> - Formation d'adduit à l'ADN - Peroxydation lipidique - Bio-activation par cytochromes P450 - Conjugaison aux GS-transférases
- Ochratoxine A	<ul style="list-style-type: none"> - Néphrotoxicité - Génotoxicité - Immunomodulation 	<ul style="list-style-type: none"> - Impact sur la synthèse des protéines. - Inhibition de la production d'ATP - Détoxification par les peptidases
- Patuline	<ul style="list-style-type: none"> - Neurotoxicité - Mutagenèse in vitro 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition indirecte d'enzymes
- Trichothécènes - (Toxine T-2, DON,...)	<ul style="list-style-type: none"> - Hématotoxicité - Immunomodulation - Toxicité cutanée 	<ul style="list-style-type: none"> - Induction de l'apoptose sur progéniteur - Hématopoïétique et cellules immunitaires - Impact sur la synthèse des protéines - Altération des immunoglobulines
- Zéaralène	<ul style="list-style-type: none"> - Fertilité et reproduction 	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison aux récepteurs œstrogéniques - Bioactivation par des réductases - Conjugaison aux glucuronyltransférases
- Fumonisine B1	<ul style="list-style-type: none"> - Lésion du système nerveux central - Hépatotoxicité - Génotoxicité - Immunomodulation 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition de la synthèse de céramide - Altération du rapport sphinganine/sphingosine - Altération du cycle cellulaire

2.4. Les mycotoxines dans la chaîne alimentaire

On les retrouve tout au long de la chaîne alimentaire la contamination peut être directe par la consommation des produits alimentaires contaminés ou avec une intoxication indirecte par la consommation dans les tissus ou liquides biologiques des animaux ayant consommé des céréales ou des fourrages contaminés mais le risque de cette dernière est tout fois réduit puisque le taux de transfert entre l'aliment contaminé et le produit animal est faible, généralement inférieur à 1 % (Jouany *et al.*, 2006). Malgré que les matières premières et les aliments finis subissent des traitements technologiques, tout en laissant intactes les mycotoxines ce qui rend cette contamination fongique indétectable (Ghezlen-Tebibet *et al.*, 2016) le

pouvoir toxique de ces métabolites peut altérer la santé des consommateurs (Jouany *et al.*, 2006).

Tableau 10: Exemples de produits contaminés par des moisissures toxigéniques (El-Khoury, 2007).

Denrées	Espèces toxiques contaminants	Mycotoxines probables
Blé, Farine, pain, maïs, chips	<i>Aspergillus flavus, ochraceus, versicolor</i> <i>Penicillium citrinum, citréoviride, cyclopium, P. martensii, patulum, pubertum</i> <i>Fusarium moniliform</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, désoxynivalénol, zéaralénone, fumonisine
Arachide, noix	<i>Aspergillus flavus, ochraceus, versicolor ; Penicillium citrinum, cyclopium, expansum</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, trichothécènes, cytochalasines
tourte à la viande, viande cuite, fromage, cacao, houblon	<i>Aspergillus flavus, Penicillium viridicatum, roqueforti, patulum, commune</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique
Viandes, porc salé,fromage	<i>Aspergillus flavus, ochraceus, versicolor, Penicillium viridicatum, cyclopium</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, pénitrem.
Poivre noir et rouge, pâtes	<i>Aspergillus flavus, ochraceus</i>	Aflatoxines, Ochratoxine,
Fèves, orge, maïs, sorgho, soja	<i>Aspergillus flavus, ochraceus, versicolor , Alternaria, Fusarium moniliforme, Penicillium cyclopium, viridicatum, citrinum, expansum, islandicum, urticae</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, citrinine, griséofulvine, alternariol
Pâtisserie réfrigérée ou congelée	<i>Aspergillus flavus, versicolor, Penicilliumcyclopium, viridicatum, citrinum, martensii, citreo-viride, palitans,</i>	Aflatoxines, Ochratoxine, Stérigmatocystine, patuline, acide pénicillique, citrinine, penitrem

	<i>puberulum, roquefort, urticae</i>	
Denrée alimentaire (stockage domestique)	<i>Penicillium, Aspergillus, Fusarium oxysporum</i>	Aflatoxine, acide kojique, ochratoxine, pénitrem, patuline, acide pénicillique, trichothécènes
Pomme et produits dérivés de pomme	<i>Penicillium expansum.</i>	Patuline

3. Les principales mycotoxines

3.1. Les Aflatoxines

Le nom aflatoxine est un acronyme formé de la combinaison de la lettre « A » pour *Aspergillus* et « FLA » pour *flavus*. Ce nom est issu de l'espèce impliquée dans la contamination des aliments responsables de la Turkey « X » disease : *Aspergillus flavus*. On y associe le mot anglais « toxin » signifiant poison (**Rustom, 1997**). L'aflatoxine a été découverte en 1960 en Angleterre, suite à l'emploi sonnement massif de dindes nourries avec du tourteau d'arachide (**Wilson, 1995**).

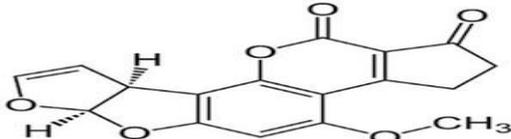
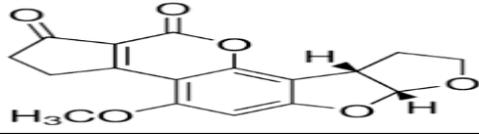
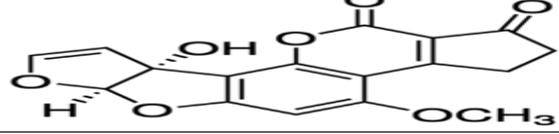
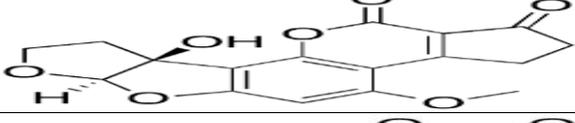
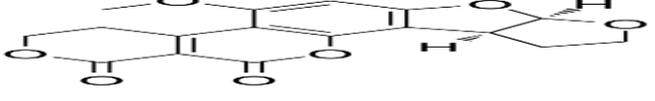
Les Aflatoxines (AF) sont des mycotoxines produites par les champignons saprophytes toxigènes de genre d'*Aspergillus*. Il y a quatre aflatoxines majeures (B1, B2, G1 et G2), les formes B étant 10 à 50 fois plus toxiques que les formes G. L'*A. flavus*, premier champignon identifié comme étant responsable de la sécrétion de ces toxines (**Asao et al., 1963**). Elle produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2, *A. parasiticus*, produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1, G2) et *A. nomius*, une souche rare, proche de *A. flavus*, est capable de produire des aflatoxines (**Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002**).

Elles ont été détectées dans différents types d'aliments dans différents pays du monde ; elles sont considérées comme de dangereux contaminants des aliments destinés à l'homme et aux animaux (**Zindine et Idrissi, 2007**). L'AFB1 est la substance la plus cancérigène parmi les substances d'origine naturelle. L'AFB1 a été classée par l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC) comme cancérigène humain du groupe 1 (**IARC, 2002**). En effet, les différentes études épidémiologiques ont impliqué les AF dans l'augmentation de l'incidence du cancer gastro intestinal et hépatique en Afrique, en Philippines et en Chine. Récemment, des cas d'intoxications aiguës affectant une large zone géographique au Kenya causant environ 123 cas de décès ont été reportés par le CDC d'Atlanta (**CDC, 2004**).

3.1.1. Structure

La structure d'aflatoxine est constituée de cycles bifurane coumarine-lactone/cyclopentanone (Nikiema, 1993). Les aflatoxines du type G possèdent un cycle lactone, tandis que celles du type B ont un cyclopentanone. Chaque type d'aflatoxines est subdivisé en deux groupes (1 et 2) ; les aflatoxines du groupe 1, à la différence de celles du groupe 2, sont caractérisées par la présence d'une double liaison en C8 (Schmidi et Esser, 1985). Les aflatoxines constituent un groupe de 18 composés structurellement proche ; ces structures diffèrent entre elles par la position de leurs radicaux sur le squelette de base (Gauthier, 2016).

Tableau 11: Les principales Aflatoxines (Bennoudia, 2016 ; Gauthier, 2016).

Dénomination	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Structure chimique
Aflatoxine B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3	
Aflatoxine B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3	
Aflatoxine M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	
Aflatoxine M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	
Aflatoxine G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	
Aflatoxine G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	

3.1.2. Propriétés physico-chimiques

Les aflatoxines sont des composés organiques de nature non protéique. Elles sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires. Très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et alcool méthylique) (Aissata *et al.*, 2017).

Les pH extrêmes, supérieurs à 10 et inférieurs à 3 et la température minimale de décomposition s'élève entre (237°C, 299°C) (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Les noms de ces AFs (B1, B2, G1, et G2) sont basés sur leur fluorescence sous la lumière UV (bleu « bleu pour B1 et B2 » ou vert « Green pour G1 et G2 ») et sur la mobilité chromatographique relative à leur séparation (Tableau 3). Par contre les AFs (M1 et M2) ont tenu leur appellation du fait de leur détection dans le lait « milk » des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (Seifia et Derfalou, 2020 ; Loic, 2008 ; Schmidt et Esser, 1985).

Les AF sont aussi dégradées par l'ammoniaque (NH₄OH) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl). Lors de cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B1 qui est directement génotoxique (Cole et Cox, 1981).

3.1.3. Les facteurs influençant la teneur en AFs dans les denrées alimentaires

Le taux et le degré de contamination dépendent étroitement de la température, de l'humidité, du sol, et des conditions de stockage. Ainsi, le stockage des aliments dans les conditions humides ou chaudes peut augmenter la synthèse d'AFs. Par exemple, les conditions les plus favorables pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines sont :

- Une activité en eau ($a_w > 0,83$) ;
- Une température comprise entre 25 et 40 °C ;
- La présence d'oxygène ;
- Le développement du champignon sur des plantes stressées ;
- La présence d'insectes et de graines abîmées ;
- Le stockage en milieu chaud et humide ;
- Le développement du champignon dans les tunnels de séchage des pâtes alimentaires (Bennoudia ; 2016).

La prolifération fongique et la production d'aflatoxines peuvent avoir lieu au champ et au cours du stockage. Au champ, les insectes attaquent la surface des grains facilitant ainsi l'accès de la moisissure aux structures internes qui contiennent les nutriments. Un tel scénario ne concerne pas seulement les zones tropicales et les cultures d'arachide mais aussi les zones tempérées lors de saisons exceptionnellement chaudes mais de plus en plus fréquentes pour certaines cultures comme le coton ou le maïs et les ensilages de maïs. Les aflatoxines sont peu sensibles aux traitements thermiques (stérilisation, pasteurisation, congélation) ou de séchage (déshydratation, lyophilisation) (Riba, 2008).

3.1.4. Toxicité

Principalement l'AFB1 est le composé présentant le potentiel toxique le plus important parce qu'il possède des propriétés cancérigènes, hépatotoxiques, tératogènes et immunotoxiques (**Belkour et Zerkaoui, 2016**). L'Aflatoxine B1 a été déclarée agent cancérigène pour l'Homme par le CIRC grâce à son rôle avéré dans l'apparition de certains cancers du foie (**Wogan, 2000**). La plupart des études épidémiologiques tendent à montrer qu'il existe une corrélation entre une exposition chronique à l'aflatoxine via le régime alimentaire et une prévalence du cancer (**AFSSA, 2006**). La toxicité aiguë varie d'une espèce animale à l'autre suivant l'âge, le sexe, l'état général et le mode de contamination.

Chez l'animal, l'intoxication aiguë se traduit par un malaise, une perte d'appétit, un ictère et le décès rapide de l'individu. Chez l'Homme, l'intoxication aiguë remontent aux débuts des années 2000 au Kenya, et ont été attribués à l'ingestion de maïs contaminés. À cause de des doses massives d'Aflatoxines entraîne un ensemble de symptômes : vomissements, ictère, douleurs abdominales, hépatomégalie et œdèmes (**Brochard, 2009**).

La toxicité chronique se manifeste par une diminution de la prise alimentaire, une asthénie voire un coma dans les cas très sévères et présente des lésions de fibrose et parfois de cirrhose. Outre son rôle dans l'apparition d'hépato-carcinomes, l'exposition chronique aux Aflatoxines semble être à l'origine de troubles de la reproduction et de malformations fœtales (**Gauthier, 2016**).

3.1.5. Mécanisme d'action

A. Formation d'adduits à l'ADN

Les effets cancérigènes et mutagènes de l'AFB1 sont dus à sa biotransformation par les CYP450, ayant pour résultat la formation d'AFB1-8,9-époxyde. C'est le principal métabolite génotoxique via sa fixation à l'ADN (**Gauthier, 2016**).

L'AFB1-8,9-époxyde va se lier de manière covalente à l'ADN, l'ARN et les protéines. La réaction d'addition de ces deux composés aboutit à la formation d'un adduit à l'ADN : le trans-8,9-dihydro-8 (7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1. C'est la présence de cet adduit qui est à l'origine des mutations (**Joubrane, 2011**). La mutation la plus fréquemment observée est la transversion G en T, c'est-à-dire le remplacement d'une base nucléique guanine par une thymine (**Brochard, 2009**). Les mutations les plus étudiées concernent les gènes suppresseurs

de tumeurs (gène p53, oncogène ras) et les gènes codant pour la glutathion-S-transférase, enzyme permettant la détoxification de l'AFB1-8,9-époxyde (**Brochard, 2009**).

B. Métabolisme des protéines

L'altération de la synthèse des acides nucléiques et des protéines semble par l'effet immunosuppresseur. Il a provoqué une diminution de la prolifération, de la maturation et de la production des lymphocytes et cytokines, une diminution de la capacité de phagocytose des macrophages et une diminution des fonctions neutrophile et inflammatoire (**Gauthier, 2016**).

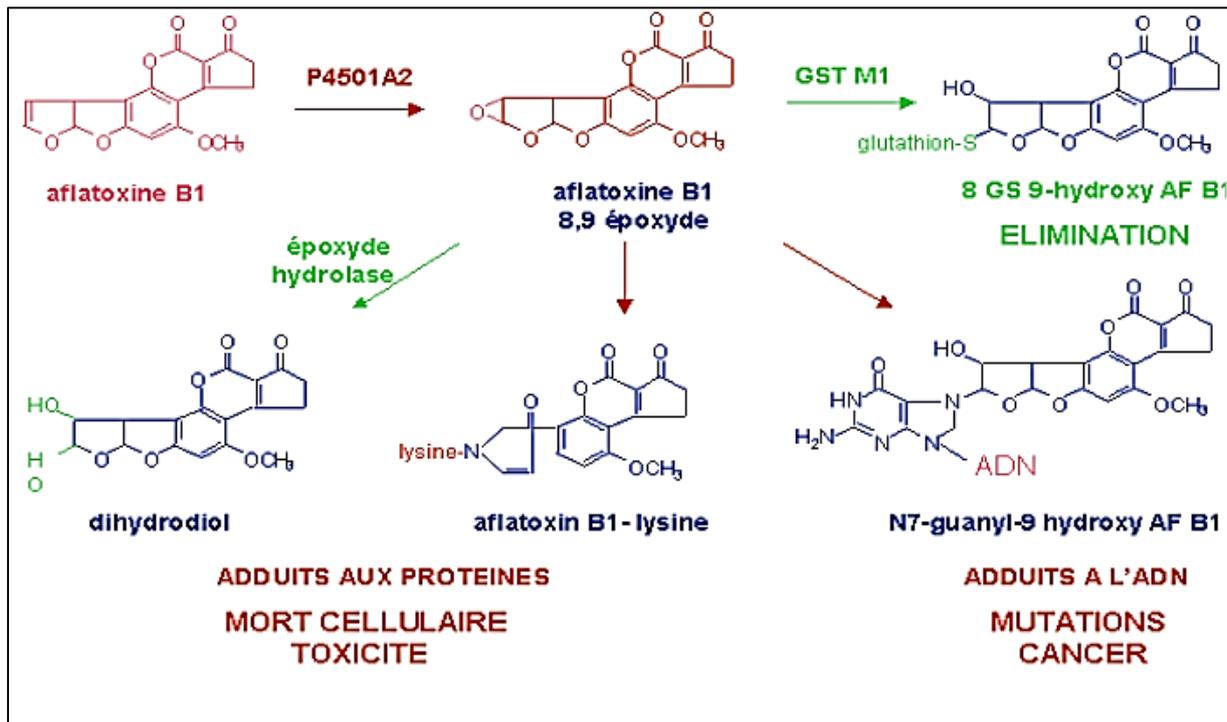


Figure 16: Mécanisme d'action AFB1 (**Guerre et al., 1996**).

3.2. Les Ochratoxines

Sont des mycotoxines produites par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* (**Labbé et al., 2001**). D'autres *Aspergillus* sont connus par leur capacité de produire cette toxine (*A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, *A. sulphureus*, *A. melleus*, *A. petrakii*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. carbonarius*, *A. albertensis*, *A. auricomus* et *A. wentii*) (**Zindine et Idrissi, 2007**).

Elles sont des métabolites secondaires toxiques et synthétisés dans le milieu dès la fin de la phase de croissance du champignon et durant toute la phase stationnaire. Le rôle de ces molécules pour la vie du champignon n'est pas connu, mais ce ne sont pas des déchets puisqu'elles ne sont pas synthétisées lorsque la croissance fongique est intense (**Mieuvre,**

1994). Cette toxine contamine aussi bien les céréales telles que le blé (Zindine et Idrissi, 2007). La production des Ochratoxines s'effectue même à des températures n'excédant pas 5°C (OMS, 1980).

L'ochratoxine A est le représentant le plus important et le plus toxique, a été isolé pour la première fois en 1965, par un groupe de chercheurs sud-africains à partir d'un isolat d'*A. ochraceus* (Van der- Merwe *et al.*, 1965) et a été identifiée dans les conditions naturelles, aux USA, en 1969 (Mahideb et Merrouche, 2015). Il a été démontré que l'OTA est néphrotoxique, carcinogène, immunotoxique, génotoxique et tératogène pour la santé (Tabuc, 2007).

3.2.1. Structure

Les Ochratoxine sont des dérivés de la phénylalanine, un acide aminé cyclique. Il existe plusieurs formes d'Ochratoxines comme l'Ochratoxine (B, C, α et β). Bien que les Ochratoxines A, B, et C aient des structures très proches entre elles, leur potentiel toxique respectif est différent (Bennoudia, 2016). Tous les structures des autres Ochratoxines sont similaires à celle de l'OTA qui est un métabolite secondaire constitué d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydrocoumarine couplée, par une liaison peptidique (Gauthier, 2016), ainsi l'Ochratoxine B (OTB) est le dérivé non chloré de l'OTA et l'Ochratoxine C (OTC) est son ester éthylique (Weidenburner, 2001). La formule brute de l'ochratoxine A est : $C_{20}H_{18}ClNO_6$ (Rouvier, 1977).

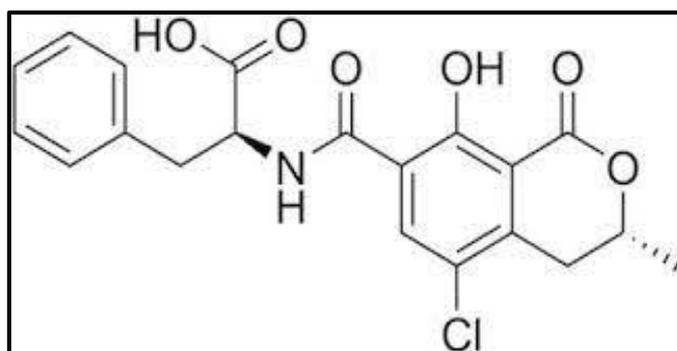
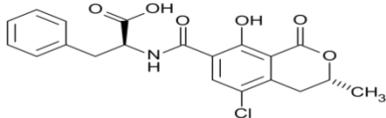
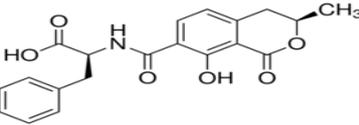
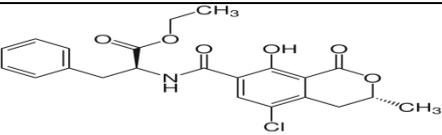


Figure 17: Structure chimique d'Ochratoxine (Mièvre, 1994).

Tableau 12: Les principales Ochratoxines (Mièvre, 1994).

Dénomination	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Structure chimique
Ochratoxine A	$C_{20}H_{18}ClNO_6$	403.8 g/mol	
Ochratoxine B	$C_{20}H_{19}NO_6$	369.4	
Ochratoxine C	-	-	

3.2.2. Propriétés physicochimique

Les Ochratoxines se présentent sous forme de cristaux incolores, obtenus par cristallisation de solutions benzéniques. Elles sont solubles dans les solvants organiques polaires, peu solubles dans l'eau, solubles dans les solutions aqueuses de bicarbonate de sodium (Mièvre, 1994). Elle possède une intense fluorescence en lumière UV, de couleur verte en milieu acide et de couleur bleue en milieu alcalin (Budavari, 1989). Les points de fusion de l'OTA cristallisée sont respectivement dans le benzène et le xylène de 90 et 169°C (Bertrand, 2002). Elles peuvent être conservées dans l'éthanol, au réfrigérateur, pendant plus d'une année, mais ces solutions doivent être protégées du rayonnement U.V pour éviter leur décomposition. Les toxines restent stables pendant plusieurs semaines dans les produits céréaliers où on les rencontre (Smith *et al.*, 1983).

3.2.3. Toxicité

Généralement l'Ochratoxine est reconnue pour sa toxicité rénale ; les signes d'une atteinte rénale apparaissent rapidement à faibles doses (Pohland et Nesheim, 1992). Toutefois, la toxicité de cette mycotoxine peut varier en fonction de l'espèce, du sexe, de la voie d'administration (Tabuc, 2007). D'*A. ochraceus*, ayant provoqué une atteinte rénale (oligurie et tubulonécrose) (Pohland *et al.*, 1992). L'OTA inhibe les mécanismes de transports anioniques des membranes des cellules tubulaires, par arrêt de la production d'adénosine triphosphate (ATP) par les mitochondries (Gauthier, 2016). L'OTA est classée comme cancérogène possible pour l'Homme (Brochard, 2009) par le centre international de

recherche sur le cancer (CIRC). Il est suspect d'être impliquée dans la néphropathie endémique des Balkans. Elle est classée dans le groupe 2B des molécules cancérigènes chez l'animal est possiblement cancérigènes chez l'homme (**Vrabceva et al., 2004**).

Au niveau immunitaire, l'OTA permet la déplétion cellulaire des organes lymphoïdes tels que la rate et le thymus (**Singh et al., 1992**). À cet aspect immunotoxiques s'additionne une atteinte de la moelle osseuse qui se traduit par une modification des différentes lignées de globules blancs et du nombre de cellules immunitaires (lymphopénie). L'OTA inhibe la prolifération des lymphocytes T et B, et empêche la production d'interleukine 2 (IL2) qui a pour rôle de stimuler la réponse immunitaire de l'organisme (**Lea, 1989**).

3.2.4. Mécanisme d'action

A. Formation d'adduits à l'ADN

À ce jour il existe plusieurs hypothèses uniquement parce que le mécanisme de l'effet génétique de l'Ochratoxine n'a pas été connu. La première hypothèse suggère que l'Ochratoxine A provoqué un flux de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Ce sont des espèces chimiques oxygénées rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés et la deuxième hypothèse propose la possibilité que l'OTA subisse une bio-activation menant à la formation d'espèces électrophiles, c'est-à-dire déficientes en électrons, qui réagiraient avec l'ADN par la formation d'adduits liés de manière covalente (**Faucet-Marquis, 2005**).

B. Métabolisme des protéines

Au niveau post-transcriptionnel (copie de l'ADN en ARN) s'effectue l'inhibition de la synthèse protéique la compétition entre l'OTA et la phénylalanine, lors de la réaction d'amino-acylation entre l'ARN de transfert et la phénylalanine, empêche l'élongation du futur peptide (**Creppy et al., 1983**).

Stratégies de prévention contre la contamination par les mycotoxines

Pour protéger les consommateurs contre les risques liés aux mycotoxines, il est important d'appliquer les règles pratiques permettant de limiter la survenue de ces contaminants (**Fellinger, 2006 ; Njobeh et al., 2010 ; Dieme et al., 2016**). Actuellement, en agriculture vouloir empêcher la contamination fongique relève de l'impossible, mais il est essentiel d'éviter une surinfection des graines et des fruits par des contacts avec le sol et du matériel souillé. En plus, ces contacts sont générateurs de blessures qui favoriseront ensuite la

pénétration des hyphes dans le végétal. Lorsque la contamination fongique ne peut être évitée, il est impératif d'inhiber la germination des conidies et le développement des hyphes (**Ghezlen-Tebibel *et al.*, 2016**). Bien que les facteurs environnementaux soient déterminants dans la survenue des contaminations par les moisissures et leurs mycotoxines, toutefois, la maîtrise des étapes pré-récolte, post-récolte et de stockage permet de réduire la contamination (**Lacey, 1989 ; Riba, 2008**).

4.1. Pratiques précédant la récolte

Il faut d'abord réduire autant que possible la présence d'inoculum à proximité de la plante en éliminant tous les restes des cultures précédentes, ainsi que tout substrat qui serait propice à la croissance de champignons producteurs de mycotoxines (**Pfohl-Leszkowicz, 1999**). Il faut souligner que les plantes stressées sont plus susceptibles à la contamination par les moisissures et les mycotoxines. La semaison, tout comme la récolte, doivent être effectuées à une période où ne sévissent pas des conditions de températures trop élevées ou des conditions de sécheresse, celles-ci contribuant au stress de la plante. Il est recommandé que le grain soit récolté à pleine maturité et que les dommages mécaniques, liés à la récolte, soient limités autant que possible (**Riba, 2008**).

4.2. Pratiques de stockage

En cas de contamination par des champignons d'une précédente récolte stockée, il est recommandé d'assainir les locaux par des traitements chimiques et d'équilibrer et d'abaisser la température ; au cours du stockage, la cellule doit être sèche et ventilée pour limiter la condensation (**Scudamore, 2005**). Les grains infectés seront séparés des grains sains et des prélèvements seront constitués pour analyse. Il faut cependant souligner que le suivi de ces bonnes pratiques agricoles n'est toujours pas suffisant pour empêcher la contamination. Des stratégies de décontamination se sont développées pour faire face à ce problème (**Riba, 2008**).

4.3. Méthodes scientifiques de lutte

Afin de réduire les contaminations des aliments par les moisissures et leurs mycotoxines, de nombreux procédés biologique, chimique et physique

4.3.1. Les méthodes chimiques

Les produits toxiques et « d'arôme anormal » utilisés dans les procédés de conservation et de détoxification ont conduit les scientifiques à chercher des fongicides naturels, sans risque et respectueux de l'environnement. Dans ces recherches menées en Afrique, l'extrait de la feuille de *Lippia multiflora* a montré un effet statique fongique sur *Aspergillus flavus* et *Fusarium verticillioides* (Anjorin *et al.*, 2008). Les huiles essentielles, l'ozone, la terre à diatomées et les antioxydants alimentaires tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT) et le parabène de propyle (PP) sont des options rentables non toxiques et prometteuses qui peuvent remplacer les conservateurs chimiques toxiques dans la lutte contre divers champignons y compris *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Chulze, 2010). Au Bénin par exemples une revue des écrits scientifiques publiés faite par (Ba *et al.*, 2015) a révélé une large gamme de produits chimiques utilisés pour inhiber la production d'aflatoxine dans les stocks de maïs en y limitant la prolifération des moisissures. Parmi ces produits nous pouvons noter l'acide propionique (0,1–0,5 %), l'ammoniac (0,5%), le Copper sulfate (0,5–1%) et l'acide benzoïque (0,1–0,5%) qui inhibent complètement la croissance de *A. parasiticus* ; le benzoate de sodium quant à lui, a un effet antimicrobien sur la croissance de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*. L'hypochlorite de sodium (0,1–0,5%) expose une propriété antifongique (68–4%). Il a été démontré dans cette revue que les extraits de plante comme les composants du neem (*Azadirachta indica*) et la scopolétine qui est extraite à partir de plusieurs plantes principalement dans *Nicotiana glauca*, *Lycium chinense*, *Angelica dahurica* et les racines de *Trigonella foenum-graecum*, ont des propriétés antifongiques et inhibent aussi la production d'aflatoxine. Les huiles essentielles peuvent être aussi appliquées sous forme de vapeur, ce qui rend l'application particulièrement pratique et convenable pour une utilisation dans des entrepôts fermés (Chulze, 2010 ; Dieme *et al.*, 2016)

4.3.2. Méthodes biologiques

L'une des stratégies les plus prometteuses à long terme en matière de lutte contre les aflatoxines est le développement de variétés résistantes. Certaines techniques de prise en charge post-récolte des céréales ont permis d'y réduire la concentration d'aflatoxine (Kaaya et Kyamuhangire, 2010) ont montré lors de leur étude sur l'effet des séchoirs à convecteurs naturels chauffés par la biomasse dans l'amélioration de la qualité des céréales en Ouganda (Dieme *et al.*, 2016)

4.3.3. Méthodes physiques

Les méthodes physiques sont nombreuses. Elles sont basées en général sur le lavage, le séchage, le broyage, le tri manuel, la séparation mécanique ou le traitement thermostable et elles résistent à tous les procédés utilisés pour l'élimination des microorganismes (chauffage et stérilisation) (**Peers et Linsell, 1975**). L'irradiation a été considérée longtemps comme une solution possible de lutter contre les microorganismes (**Dieme *et al.*, 2016**)

4.3.4. Norme HACCP

HACCP est une abréviation en anglais de « hazard analysis critical control point » qui signifie en français par « analyse des dangers – points critiques pour leur maîtrise » (**Harami, 2009**). C'est un système qui permet d'identifier le ou les dangers spécifiques, de les évaluer et d'établir les mesures préventives pour les maîtriser (**Lee *et al.*, 2010**).

Elle est largement reconnue comme étant le moyen le plus efficace de garantir la sécurité alimentaire tout au long de la chaîne alimentaire, depuis la production primaire jusqu'à la consommation finale. Il s'agit donc d'une démarche conduisant à identifier le ou les dangers significatifs par rapport à la salubrité, spécifique à un produit alimentaire, à évaluer et à établir les mesures préventives permettant à les maîtriser. Aujourd'hui, l'analyse HACCP inspirée du codex est exigée pour le commerce international des denrées alimentaires ; ce n'est pas pour autant la panacée pour tous les problèmes liés à la sécurité sanitaire. Elle doit être liée à des programmes préalables efficaces. La combinaison des systèmes BPA/BPH/BPF et HACCP est particulièrement avantage en ce sens qu'une application rigoureuse des premiers permet au système HACCP d'être centré sur les déterminants cruciaux de la sécurité sanitaire des aliments (**AFNOR, 2003**).

Les entreprises alimentaires peuvent faire la preuve d'une approche systémique de la qualité et de la sûreté de leurs produits en appliquant une démarche fondée sur l'analyse HACCP (**FAO, 2005 ; OMS, 2005**).

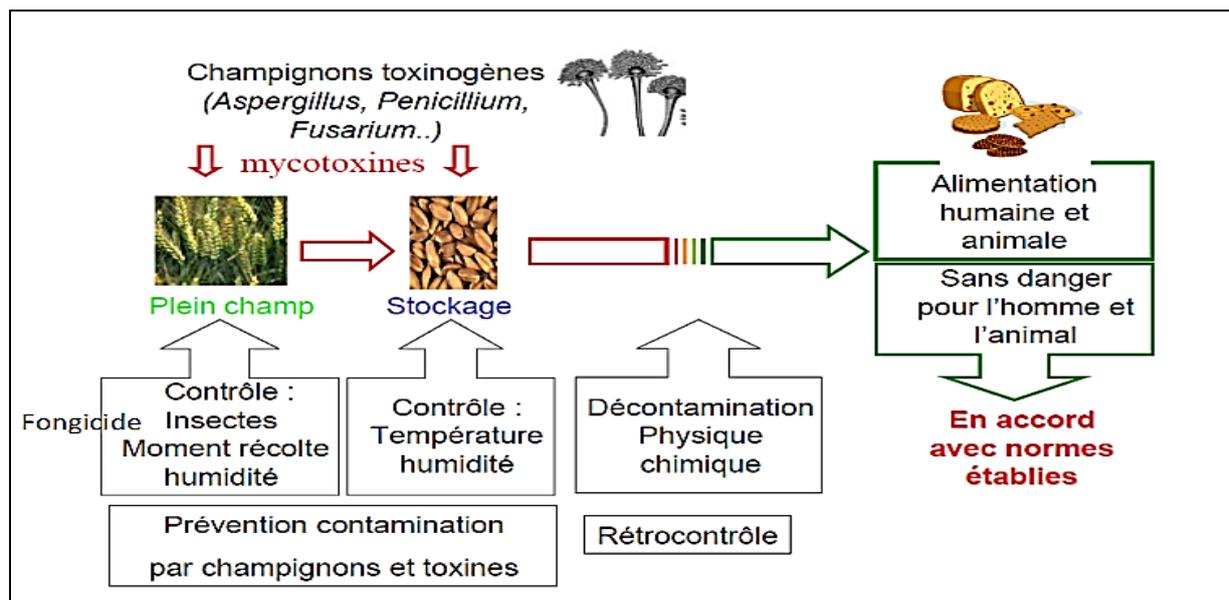


Figure 18: Stratégies de prévention contre la contamination par les mycotoxines (Kouloughli, 2019).

Chapitre 4:
Profil toxicologique

1. Impacts sanitaire

La contamination des aliments par des mycotoxines peut provoquer un certain nombre de maladies. Il peut y avoir un effet spécifique toxique sur un organe bien déterminé, cependant la plupart provoquent des lésions graves d'un seul tissu ou de plusieurs tissus. Les organes et tissus cibles sont très divers : foie, reins, peau, système immunitaire, système nerveux, glandes endocrines, etc. D'autres effets tels les gastro-entérites, les hémorragies et les paralysies peuvent également apparaître (**Bennoudia, 2016**). Selon leurs effets toxiques, les mycotoxines sont généralement classées en quatre groupes :

- Les mycotoxines mutagènes ;
- Les mycotoxines cancérogènes ;
- Les mycotoxines tératogènes ;
- Immunotoxicité.

1.1. Mutagenèse

Le phénomène de mutagenèse résulte d'interactions entre des agents mutagènes et le matériel génétique des organismes (**El himer et Gherras, 2017**). L'action se traduit par des mutations génétiques et/ou des modifications chromosomiques, les gènes se situant en un point précis d'un chromosome. Les mutations au niveau du gène correspondent à des modifications au niveau des molécules d'ADN. Le gène peut être morcelé ou recombiné au niveau des segments d'ADN (**El himer et Gherras, 2017**). Les modifications chromosomiques correspondent à des anomalies de nombre (augmentation ou diminution) ou de structure (délétions, duplications, translocations) des chromosomes (**El himer et Gherras, 2017**).

1.2. Cancérogénèse

L'ADN des chromosomes du noyau cellulaire est la cible privilégiée des agents cancérogènes (produits chimiques, radiations ionisantes). Processus pathologique entraînant l'apparition de cellules malignes, envahissant progressivement les tissus et capables de migrer en provoquant l'apparition de foyers secondaires (métastases) (**El himer et Gherras, 2017**).

1.3. Tératogénèse

Ce sont des substances qui agissent principalement sur l'embryon à des stades bien précis de son développement et qui induisent une ou des anomalies, se manifestant par des malformations (**El himer et Gherras, 2017**).

1.4. Immunotoxicité

Modification du nombre de cellules du système immunitaire. Il se manifeste selon deux types d'effets :

- L'immunosuppression : augmente la sensibilité aux infections.
- L'immunostimulation : se manifeste par le développement d'une maladie auto-immune ou par un syndrome allergique.

Les aflatoxines touchent aussi les cellules rénale (Néphrotoxicité) et considéré comme substance qui cause des dommages au foie (hepatotoxicité) (**El himer et Gherras, 2017**).

2. Profil toxicologique

2.1. Évaluation du risque lié à l'Aflatoxine B1

Les aflatoxines comptent parmi les substances naturelles ayant un potentiel cancérigène et mutagène le plus élevé. L'AFB1 est considérée comme étant le plus puissant cancérigène naturel connu pour l'homme (**C.I.R.C, 2002**). L'AFB1 est suivie, par ordre décroissant de toxicité par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. La toxicité des aflatoxines G1, B2 et G2 sont respectivement 50, 80 et 90 % moindre que celle de l'AFB1 (**Tabuc, 2007**).

Les aflatoxines ont également des propriétés hépatotoxiques, tératogènes et immunotoxiques très marquées qui ont été mises en évidence dans les études sur les animaux. La consommation de fourrage contaminé par les animaux peut également entraîner des symptômes d'immunosuppressions, des hémorragies, une réduction du poids et le cancer du foie. Chez l'homme, les risques liés à la consommation d'aflatoxine ont été bien étudiée, et le C.I.R.C a classé l'aflatoxine comme agent cancérigène du foie. Les études épidémiologiques réalisées dans le monde ont montré que les risques liés au développement du cancer du foie sont 30 fois plus élevés chez les individus ayant des antécédents d'hépatites B (**Riba, 2008**).

L'exposition alimentaire aux doses massives d'aflatoxines peut, dans certains cas, provoquer une aflatoxicose aiguë, dont le tableau clinique ressemble à celui d'une hépatite aiguë avec des vomissements, des douleurs abdominales, l'ictère, l'hépatomégalie, des œdèmes et dans certains cas, le décès (**Riba, 2008**).

2.1.1. Hépatotoxicité

Chez l'homme, les risques liés à la consommation d'AFs ont été bien étudiée et l'Agence Internationale de Recherches sur Le Cancer (AIRC) a classé l'AFB1 comme agent cancérigène du foie (**Wogan, 2000**).

2.1.2. Immunotoxicité

Les études ont démontré que des doses relativement importantes en aflatoxine (0,3 - 6 mg / kg de poids corporel), provoquent une dépression de la réponse immunitaire. L'AFB1 supprime l'activité du complément C4 et diminue la production des interleukines. Elle provoque aussi une hypoplasie du thymus (**Pier et al., 1980**). Une exposition à de faibles doses chroniques d'AFB1 augmente la sensibilité de l'individu aux infections (**JAKAB et al., 1994**).

2.1.3. Tératogénicité

Les aflatoxines sont tératogènes à une dose de 4mg/kg de poids corporel. Durant la gestation, elle conduit à une forte proportion de malformations, voire à des avortements (**Arora et al., 1981**).

2.1.4. Génotoxicité et mutagénicité

L'adduction des aflatoxines au niveau cellulaire se fait, soit à l'ADN d'origine animale ou humaine, soit à des oligonucléotides. Le site privilégié d'adduction est la guanine (**Bennoudia, 2016 ;Gacem, 2011**).

D'autres études effectuées sur le rat ont montré également que l'aflatoxine se lie à l'albumine plasmatique (**Wild et al., 1986**).

2.1.5. Effets antibactériens

L'AFB1 est considérée par plusieurs auteurs comme un antibiotique vu ses propriétés d'inhibition de la croissance bactérienne. L'AFB1 bloque la multiplication cellulaire chez les espèces sensibles à des concentrations létales. Alors qu'à des concentrations sublétales, elle produit des aberrations morphologiques et physiologiques (**Jakab et al., 1994**). Les aflatoxines inhibent la croissance des bactéries par inhibition de la synthèse ou blocage de la réplication de l'ADN et par blocage de la synthèse protéique (**Gacem, 2011**).

2.2. Évaluation du risque lié à l'Ochratoxine A

Le statut toxicologique de l'Ochratoxine A a été examiné de nombreuses fois et a fait l'objet d'une monographie complète par le CIRC (centre international de recherche sur le cancer) en 1993 (**IARC, 1993**). À la suite de la découverte des néphropathies spontanées humaines et animales, des études expérimentales ont été menées afin de démontrer l'implication de l'OTA dans ces maladies. Des études toxicologiques réalisées sur des

animaux de laboratoire (**Zimmerli et Dick, 1996 ; Delage et al., 2003 ; Da Rocha Rosa et al., 2002 ; Shephard et al., 2003 ; Visconti et al., 1999 ; Otteneder et al., 2000**) ont montré que cette toxine peut avoir plusieurs effets, tel que des effets néphrotoxiques, génotoxiques, immunosuppresseurs, tératogènes, neurotoxiques et cancérigènes. Sa toxicité reste cependant très variable et dépend du sexe, de l'espèce et du type cellulaire (**El khoury, 2007**).

2.2.1. Néphrotoxicité

La néphropathie est l'effet toxique majeur de l'Ochratoxine A (**El khoury, 2007**). L'OTA a été associée à la néphropathie des humains (**Lopez De Cerain et al., 2002 ; Blesa et al., 2004**) et est suspectée en particulier être la cause de la maladie humaine fatale connue sous le nom de néphropathie endémique des Balkan (NEB). Il s'agit d'une tubulonéphrite interstitielle chronique affectant la population dans certaines régions du Sud-Est Européen, Croatie, Bosnie, Bulgarie et Roumanie (**Visconti et al., 1999 ; Blesa et al., 2004 et Tozlovanu, 2008**). Elle serait également mise en cause dans la Néphropathie Tunisienne (TCIN) affectant la population en Tunisie (**El khoury, 2007**).

2.2.2. Génotoxicité

Si l'OTA a longtemps été considérée comme non génotoxique, les tests de mutagenicité donnant des résultats négatifs ou peu concluants. Dès la fin des années 1990, une théorie différente est adoptée. La compréhension de la génotoxicité de l'OTA et les recherches expérimentales ont contredit cette affirmation (**El khoury, 2007**).

En 1991, **Henning et al.**, ont mis en évidence une activité mutagène importante de l'OTA métabolisée par des hépatocytes sur des souches bactériennes, ainsi que sur des lymphocytes humains (in vitro).

La preuve de la génotoxicité de l'OTA a été formellement démontrée par l'utilisation de systèmes in vivo. Ont été observées des aberrations chromosomiques sur le chromosome X de lymphocytes humains cultivés en présence de 15 mM d'OTA. Ce type d'aberration se retrouve chez les patients souffrant de la NEB (**El khoury, 2007**).

Les adduits à l'ADN causés par l'OTA ont été mis en évidence dans plusieurs études de génotoxicité. D'autres travaux publiés confirment que l'activité cytotoxique de l'OTA conduiraient à des lésions de l'ADN (**Gautier et al., 2001 ; Zepnik et al., 2001**).

2.2.3. Cancérogenèse

Plusieurs études ont porté sur le développement de cancers expérimentaux chez des animaux nourris pendant quelques semaines avec des doses d'OTA variables. Il s'agit de tumeurs hépatiques mais surtout rénales (**El khoury, 2007**). Il a été rapporté qu'une alimentation contaminée par cette toxine induit des adénomes rénaux et des carcinomes hépatocellulaires chez les souris et les rats, et elle est suspectée d'avoir des effets homologues chez les êtres humains surtout que sa durée de vie chez ces derniers est dix fois plus longue que chez les rats. Suite à ces études, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé en 1993, l'OTA comme une molécule cancérigène possible pour les humains (groupe 2B) (**IARC, 1993**).

2.2.4. Immunotoxicité

L'OTA présente, dans certaines conditions, un effet immunosuppresseur puissant. Cet effet est observé à faible ou à forte dose. Des nécroses des tissus lymphoïdes ont été rapportées, indiquant la grande sensibilité de ces tissus à l'OTA, mais aussi une atteinte de l'immunité humorale et cellulaire a été mise en évidence (**Gacem, 2011**).

Chapitre 5:
Règlementation et législation

1. Réglementation et législation

Les mycotoxines sont très résistantes et ne peuvent être réduites ni par la cuisson, ni par d'autres procédés quelconques, ce qui implique que les denrées alimentaires infestées doivent être détruites (**Ben Bordi et Oubiri, 2019**). L'organisation mondiale de la santé (O.M.S) a récemment reconnu que la contamination des produits d'alimentation par les mycotoxines constitue une source importante de maladies d'origine alimentaire (**OMS, 2002**).

1.1. Valeurs toxicologiques des mycotoxines

Depuis une dizaine d'années la prise de conscience du risque sanitaire associé à la présence de conscients de ces effets graves que peuvent avoir ces toxines naturelles, plusieurs pays ont établi ou proposé des limites réglementaires concernant les mycotoxines dans les aliments et les concentrations maximales admises en alimentation humaine et animales (**Tab. 13**) (**Bennoudia, 2016 ; Guezlane-Tebibel *et al.*, 2016**).

Tableau 13: Principale mycotoxines et leurs valeurs toxicologiques de référence (**Tannous, 2015**).

Mycotoxines	Dose journalière tolérable par Kg de poids corporel SCF/JECFA
- Ochratoxine A	0,005/0,0143µg/kg/jour.
- Fumonisines	2 µg/kg/jour.
- Trichothécènes (DON)	1 µg/kg/jour.
- Patuline	0,4 µg/kg/jour.

1.2. Limites réglementaires

Les premières limites pour les mycotoxines ont été fixées à la fin des années 60 pour les aflatoxines. À la fin de 2003, une centaine de pays avaient élaboré des limites spécifiques pour les mycotoxines dans les aliments et leur nombre continue de progresser (**Fig. 19**)(**F.A.O, 2004**). En général, les maximums admissibles sont très différents d'un pays à l'autre (**Tebibel *et al.*, 2016**).

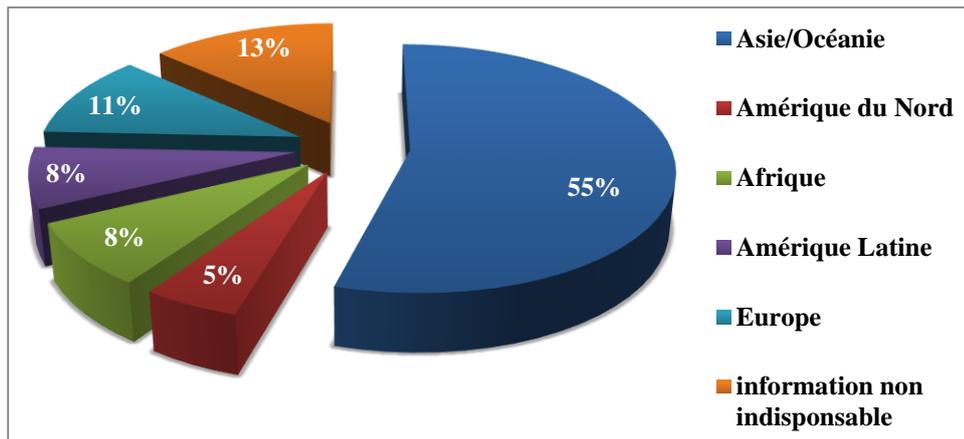


Figure 19: Pourcentage de la population mondiale protégée par des réglementations sur les mycotoxines (O.M.S, 2003).

1.2.1. L'union européenne

La stratégie intégrée de l'union européenne (EU) vise à assurer un niveau élevé de sécurité alimentaire, de préserver la santé des animaux et la lutte contre les pathologies des plantes au sein des pays de l'UE par des mesures cohérentes et une surveillance adéquate. L'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) est la structure de l'UE responsable de l'évaluation des risques relatifs à la sécurité des aliments destinés à la consommation humaine et animale (Van Egmond *et al.*, 2007).

Cette évaluation du risque se fait à deux niveaux, au niveau européen, cette évaluation est réalisée par le comité scientifique de l'alimentation humaine (CSAH) afin d'établir la toxicité des mycotoxines, des facteurs de sécurité et émettre les avis qui serviront pour les législations applicables en Europe. Au niveau international, cette évaluation est réalisée par JECFA (joint expert committee of food and additives) qui analyse également la toxicité des mycotoxines et élabore les recommandations au niveau du Codex Alimentarius (Van Egmond *et al.*, 2007).

Il existe un certain nombre de publications axées sur les limites et réglementations pour les mycotoxines (Resnik *et al.*, 1991 ; Boutrif et Canet, 1998 ; Rosner, 1998). L'établissement de réglementations en matière de mycotoxines est une opération très complexe, dans laquelle de nombreux facteurs entrent en jeu. En effet, plusieurs facteurs, d'ordre scientifique et socioéconomique, peuvent avoir une incidence sur l'établissement de valeurs limites et de réglementations concernant les mycotoxines. Il s'agit des facteurs suivants :

- Disponibilité de données toxicologiques ;

- Disponibilité de données sur la présence de mycotoxines dans divers produits ;
- Connaissance de la répartition des concentrations de mycotoxines dans un lot ;
- Disponibilité de méthodes d'analyse ;
- Législation des pays avec lesquels des contacts commerciaux existent ;
- Nécessité d'un approvisionnement alimentaire suffisant (**Riba, 2008**).

Selon **A.F.S.S.A (2006)**, le classement établi par le centre international de recherche sur le cancer (préambule des monographies C.I.R.C –19 Janvier 1999) est textuellement le suivant :

- **Groupe 1** : L'agent (le mélange) est cancérigène pour l'homme. Les circonstances d'exposition donnent lieu à des expositions qui sont cancérigènes pour l'homme.
- **Groupe 2** : L'agent (le mélange, les circonstances d'exposition) ne peut être classé quant à sa cancérigénicité pour l'homme. Les études ne peuvent pas être interprétées en termes de présence ou d'absence d'effet cancérigène en raison de limites qualitatives ou quantitatives importantes, ou aucune donnée expérimentale de cancérigénicité n'est disponible.
- **Groupe 3** : L'agent (le mélange) n'est probablement pas cancérigène pour l'homme.

1.2.2. En Afrique

En Afrique, quinze pays sont connus pour avoir des réglementations spécifiques de mycotoxines dont la plupart concernent les aflatoxines (**Lahouar, 2016**).

La Tunisie a mis en place un niveau maximal tolérable d'aflatoxines dans diverses denrées alimentaires et qui correspond à 2 ng/g (**Lahouar, 2016**). En Égypte, la limite tolérable pour l'AFB1 a été fixée à 5 µg/kg dans les céréales (sauf le maïs) et 10 µg/kg dans le maïs, alors que pour les aflatoxines totales, la limite tolérable a été fixée à 10µg/kg pour toutes les céréales à l'exception du maïs dont la teneur maximale tolérable a été fixée à 20 µg/kg. La teneur maximale en AFB1 tolérée en Algérie est 10 µg/kg (**FAO, 2004**). Le Maroc est le pays où les réglementations sur les mycotoxines sont les plus précises (**O.M.S, 2003**).

Dans la plupart des pays Africains, il n'existe (probablement) aucune réglementation spécifique. Néanmoins, le fait que les pays ne disposent pas de limite réglementaire spécifique pour les mycotoxines ne signifie qu'ils ignorent ce problème. Plusieurs d'entre eux, conscients des problèmes posés par les mycotoxines, conviennent dans leur réponse qu'ils devraient élaborer des réglementations (**O.M.S, 2003**).

La question des mycotoxines en Afrique doit toutefois être envisagée dans le contexte de la situation locale en matière de sécurité sanitaire des aliments, de santé et d'agriculture (O.M.S, 2003).

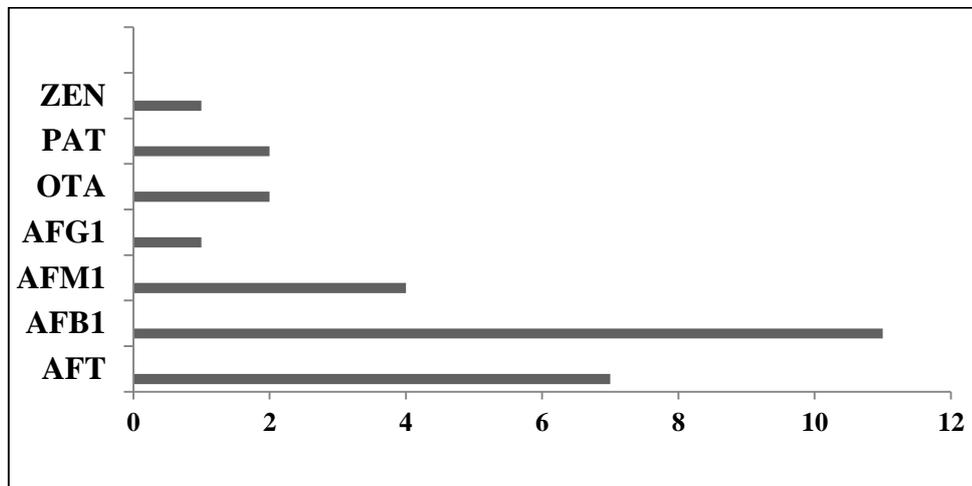


Figure 20: Mycotoxines présentes dans l'alimentation humaine réglementée en Afrique (O.M.S, 2003).

1.3. Réglementation des aflatoxines

En l'état actuel, les connaissances scientifiques et techniques ne peuvent assurer l'élimination totale des moisissures et en conséquence, la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires (Riba, 2008).

Le nombre des pays qui réglementent les aflatoxines augmente sensiblement au fil des ans. Les réglementations concernant les aflatoxines sont détaillées et applicables à des produits d'alimentation humaine, à des produits laitiers ou à des produits d'alimentation animale spécifiques (FAO, 2004 ; Riba, 2008).

Il n'existe pas un seuil pour lequel il ne peut pas y avoir un risque. C'est pourquoi, il est difficile de fixer de dose journalière tolérable (DJT) pour les aflatoxines (A.F.S.S.A, 2006). Il y'a donc lieu de fixer des limites au niveau le plus bas possible afin de réduire l'exposition à un niveau aussi faible qu'il soit raisonnablement possible de l'être. C'est le principe ALARA (As Low As Reasonably Achievable), défini comme le niveau le plus faible d'un contaminant qui ne peut pas être éliminé d'un aliment (Riba, 2008).

Dans les pays industrialisés, les qualités maximales admissibles (limite, maximale de résidus ; LMR) sont fixées comme suit : (Highley *et al.*, 1994).

Tableau 14: Qualités maximales admissibles d’Aflatoxine (**Highley et al., 1994**).

Marchandise	Quantités maximales d’Aflatoxines admissibles (ug/Kg)
- Alimentation humaine	5 à 30
- Aliments pour bébés	5 à 20
- Aliments pour bétail laitier, jeune bétail	5 à 20
- Aliments pour porcins et volaille	10 à 30
- Aliments pour bovins et caprins	20 à 300

1.3.1. À l’échelle nationale

En Algérie, l’arrêté correspondant au 11 octobre 2006 rendant obligatoire la méthode de dosage de l’aflatoxine B1 et la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les céréales et produits alimentaires (**Journal officiel, 2006**). En fixent les limites maximales de résidus (LMR) dans les produits d’alimentation humaine (**Tab.15**) (**Chetatha, 2013**).

Tableau 15: Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale (**Journal officiel, 2003 ; F.A.O, 2004**).

Produits	Somme mycotoxines	Les Limites (µg/kg)	Méthodes d’échantillonnage	Méthode d’analyse
Produits d’alimentation humaine				
Arachide	Aflatoxine B1	10	non officielle	Officielle
Fruits à coque				
Céréales	AFs: B1B2 G1 G2	20		(DZ1)
Produits d’alimentation animale				
Aliments pour bétail	Aflatoxines B1	20	Non officielle	Officielle (DZ2)

⚠ **NB.** Les données ont été fournies par le ministère du commerce Algérien’

DZ1: AOAC (1990). 986.22. Aflatoxins in peanuts and peanuts products –CB method

Food and Drug Laboratories –Canada –Best food method.

DZ2: NF-VF (1980). Animal feed – aflatoxins measurement B1, June 1980:18-200.

1.3.2. À l'échelle internationale

Les pays de l'Union Européenne ont édité un règlement pour limiter la présence des aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale (**Tab. 16**) (**Siefia et Derfalou, 2020**).

Tableau 16: Les teneurs maximales en AFs exprimées en µg/kg dans l'alimentation humaine et animale dans l'Union Européenne (**Réglementation (CE) No 1881, 2006 ; Siefia et Derfalou, 2020**).

Alimentation	Mycotoxine	Denrée alimentaire	Teneur maximale en µg/Kg
Humaine	Aflatoxine B1	- Arachides + autres graines + fruits sec.	2.5-8 (selon le produit et son stade de transformation).
		- Certaines épices. - Préparation à base de céréale et aliments pour nourrissons et - Enfants en bas âge.	5 0.1
Humaine	Aflatoxines B1+ B2+ G1+ G2	- Arachides + autres graines + fruits sec.	4.1-15 (selon le produit et on stade de transformation).
		- Céréales. - Certaines épices. - Lait.	4-10 (selon le produit et son stade detransformation). 10 0,05
Animale	Aflatoxine B1	- Aliment complet - Complémentaire.	5-20 (selon les espèces animales).

1.4. Réglementation relative à l'Ochratoxine A

En 1990, le JECFA a décidé d'établir une dose journalière tolérable hebdomadaire de 112 ng d'OTA par kilo de poids corporel, cette valeur ayant été déterminée sur la base des données de néphropathies porcines.

Le conseil supérieur d'hygiène publique de France, sur la base des études de carcinogénicité, a proposé une exposition journalière tolérable de 5ng/kg pc/jour, ce qui implique une contamination maximale dans les céréales de 5µg/kg (**El-khoury, 2007**).

Le comité Scientifique de l'alimentation Humaine a estimé dans son avis sur l'OTA du 17 septembre 1998, qu'il serait prudent de réduire autant que possible l'exposition à l'OTA, en veillant à ce que les expositions se situent près de la fourchette inférieure des expositions tolérables (comprises entre 1,2 et 14 ng/kg de poids corporel et par jour), soit par exemple en dessous de 5 ng/kg de poids corporel et par jour (**El-khoury, 2007**).

En ce qui concerne les produits dérivés de céréales, la contamination est limitée à 3µg/kg. Le règlement CE N° 683/2004 du 13 avril 2004 modifiant le règlement N°466/2001 a inclus une directive limitant la contamination en OTA à 0,5µg/kg d'aliment dans les préparations à base de céréales et aliments pour bébés, destinés aux nourrissons et enfants en bas âge, ainsi que dans les aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales pour les nourrissons (**Tab. 17**)(**El-khoury, 2007**). Il inclut une nouvelle directive vise également à limiter la contamination en OTA dans le café ; celle-ci fixe le taux maximal en OTA à 5µg/kg dans les grains de café torréfiés et à 10µg/kg dans le café soluble (**El-khoury, 2007**).

Tableau 17: Teneurs maximales en Ochratoxine A dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg (**Règlement (CE) No 1881, 2006**).

Denrée alimentaire	Teneur maximale (µg/kg)
- Grains de céréales brutes (y compris le riz brut et le sarrasin).	5
- Produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation directe).	3
- Préparation à base de céréales pour enfants en bas âgedestinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons.	0,5
- Raisins secs (Corinthe, sultanines et autres raisins secs).	10
- Grains de café torréfié et café torréfié moulu.	5
- Café soluble (instantané).	10
- Vin (rouge, blanc et rosé et autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins).	2
- Jus de raisin, ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons, y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué.	2

Le règlement CE N° 466/2001 rappelle qu'il est interdit de mélanger des produits conformes aux limitations avec des produits non-conformes, afin d'en abaisser le taux de contamination, et que l'utilisation de produits non conformes aux teneurs établies pour la préparation d'autres aliments est interdite. Il est également interdit d'utiliser des traitements chimiques pour la décontamination en OTA des produits destinés à l'alimentation humaine.

Le mode d'échantillonnage, ainsi que les méthodes d'analyses, pour la détermination de la teneur en OTA dans les denrées alimentaires, sont décrits dans la directive 2002/26/CE, publiée au Journal Officiel n°L 075. Ces directives visant à estimer et à limiter la présence d'OTA dans divers aliments, impliquent la mise en place de plans ayant pour objectif de réduire la contamination des denrées par cette mycotoxine (**El-khoury, 2007**).

La plupart des réglementations existantes en matière de mycotoxines en Afrique se rapportent aux Aflatoxines. L'Algérie n'a, à notre connaissance, pas encore fixé les teneurs maximales en Ochratoxine A dans les aliments (**Bennoudia, 2016 ; Riba, 2008**).

Deuxième partie :

Étude expérimentale

Chapitre 6:

Matériel et méthodes

1. Objectif du travail

La modélisation de la croissance des mycètes et la production des mycotoxines sous l'influence des facteurs écologiques est une étape primordiale permettant de comprendre la physiologie de ces microorganismes, de prédire les niveaux finaux de contamination par les champignons ou les mycotoxines et de déterminer les conditions de stockage et la durée de conservation. La mycologie prédictive est un outil très utile pour la prise de décision et la mise en place des solutions pertinentes afin de prévenir les risques pour la santé humaine.

Dans le cadre de ce travail nous avons réalisé les travaux suivants :

- Étude de l'influence des facteurs écologiques essentiellement la température et le pH sur la croissance des moisissures et la production des mycotoxines au cours du temps.
- Suivi par une étude mycologique, donc l'étude de la composition de la flore fongique du blé et l'isolement et le dénombrement des champignons de stockage des grains de blé.

2. Matériel

2.1. Blé et dérivés

Dans cette étude nous avons utilisé des variétés de blé dur et de blé tendre et leurs produits transformés (farine, semoule). Selon les cas, les échantillons de blé sont prélevés le mois d'avril 2021 à partir des sites de stockage dans des silos en béton armé au niveau des coopératives des céréales et des légumes secs (CCLS) et dans des unités de transformation des céréales (meunerie et semoulerie) et quelques maisons à divers endroits de la ville de Guelma.

2.2. Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés pour les isollements et l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques sont les suivants:

- Milieu de potato dextrose agar (PDA), utilisé pour la conservation des souches et pour l'isolement et le dénombrement des moisissures et des levures des produits alimentaires **(Raper et Fennell, 1965)**.
- Milieu Gélose de Sabouraud au chloramphénicol utilisé pour la croissance et isolement de levures et moisissures et inhibe la croissance des bactéries.
- Milieu Gélose Hecktoen, utilisé pour détecter l'utilisation du lactose et saccharose par les entérobactéries.
- Milieu Gélose de Chapman au mannitol, utilisé pour la culture des staphylocoques. La composition chimique de ces milieux est donnée en Annexe I.

2.3. Produits et appareillages

Tous les produits et appareillages utilisés au cours de notre travail sont cités dans l'Annexe II.

3. Site d'étude et échantillonnage

3.1. Période et lieu du travail

Ce travail a été initié et réalisé dans le laboratoire de microbiologie et de mycologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université 8 Mai 1945 Guelma pendant 2 mois durant la période d'Avril jusqu'au mai 2021.

3.2. Échantillonnage

3.2.1. Précautions d'échantillonnage

Avant toute analyse, il convient de prélever un échantillon représentatif du produit à analyser. Néanmoins, les techniques de prélèvement habituellement recommandées pour d'autres analyses ne sont guère probantes quand il s'agit d'analyses microbiologiques. En général, sur les produits secs, granuleux et pulvérulents, la microflore est toujours répartie de façon très hétérogène (**Dunoyer, 1989**).

A ce titre, il faut noter que les résultats des examens microbiologiques n'ont de valeur que si certaines précautions d'échantillonnage ont été respectées :

- Prises d'échantillons avec des instruments stériles ;
- Mise de l'échantillon dans des récipients ou sachets stériles;
- Respect des règles d'hygiène générale pour la personne effectuant le prélèvement ;
- Rapidité de l'acheminement des échantillons dans l'attente de leurs analyses ;
- Conservation des échantillons dans un endroit frais et sec (8 à 15°C) mais jamais à des températures négatives (**Dunoyer, 1989**).

Sutra et al (1998), stipulent que les échantillons doivent être prélevés rigoureusement au hasard, en évitant les biais (par exemple, éviter des prélèvements systématiques en début ou en fin de production).

La répartition très hétérogène des mycotoxines dans le champ, dans les silos et dans les graines elles-mêmes laisse entrevoir des doutes sur les résultats de dosage et de détection de ces toxines. Ces doutes proviennent de l'échantillonnage. À cet égard, **Ugrinovits et Zuckeranalysen (2002)**, recommandent de constituer un échantillon de grain assez grand, à partir des divers petits prélèvements dans la masse en mouvement.

3.2.2. Collecte des échantillons

La collecte des échantillons a été réalisée durant la période allant du début du mois d’Avril 2021. Dans cette étude et afin d’avoir un échantillon représentatif, nous avons prélevé dix (10) échantillons de blé dur et tendre. Le prélèvement des échantillons s’est effectué à l’aide d’une louche en inox bien stérile utilisée à cet effet pour atténuer les risques de contamination, ou la modification du degré d’humidité. L’échantillon a été prélevé se composent de:

- Trois échantillons de blé stocké dans les silos. Les prélèvements ont été effectués par le personnel de CCLS dans les deux régions suivantes:
 - Région de Guelma, deux échantillons de blé stocké dans les silos durant six mois, un échantillon de blé dur (variété GTA) et un autre de blé tender (variété ANZA).
 - Région de Chelghoum l’aïd, un échantillon de blé dur de la récolte de 2020 stocké durant 12 mois. Le blé stocké correspond à des mélanges de variétés de blé dur provenant des différentes récoltes de chaque région.
- Trois échantillons de grains de blé dur stocké dans les maisons collectés dans de différentes régions de wilaya de Guelma en avril 2021 afin d’obtenir une hétérogénéité des prélèvements. Le blé stocké est de défirrent variété connu de chaque région. Tous les échantillons ont été conservés à 4°C dans des sacs stériles jusqu’à l'analyse.
- Pour enrichisse notre recherche on prendre deux échantillonnes de blé dur et deux autre de blé tender a partir des produit commerciale dirige a la consommation. Les informations détaillées de chaque échantillon sont présentées dans les **tableaux18**.

Tableau 18: Caractéristiques des échantillons de blé et dérivés

Echantillons	Variété de blé	Lieu du prélèvement	Date de prélèvement	Nombre d'échantillon
- Blé dur	GTA	CCLS de Guelma	8/04/2021	1kg
	Mélange de variétés	CCLS de Chelghoum l'aïd	7/04/2021	1kg
	Vitron	Selawa	8/04/2021	1kg
	Simeto	Bouhegouf	8/04/2021	1kg
	Simeto	Roknia	8/04/2021	1kg
- Blé tender	ANZA	CCLS de Guelma	8/04/2021	1kg
- Farine Mama	Blé tendre	Vendeur d'alimentation	8/04/2021	1kg
- Farine Thika	Blé tendre	Vendeur d'alimentation	8/04/2021	1kg
- Semoule Amor ben Amor	Blé dur	Vendeur d'alimentation	8/04/2021	1kg
- Semoule	Blé dur	Semoulerie Héliopolis	8/04/2021	1kg



A. CCLS de Guelma

B. CCLS de Chelghoum l'aïd (Mila)

Figure 21: Siège de coopération des céréales et des légumes secs de la wilaya de Guelma et Chelghoum l'aïd (Mila).

Les prélèvements ont été pris au hasard et bien mélangés. Tous les échantillons sont conservés dans lieu sec et frais et mis dans des sacs en plastique propres (stériles) à double épaisseur, étiquetés puis acheminés directement au laboratoire du département des sciences de la nature et de la vie, Université 8 Mai 1945 (Guelma). Où ils sont soumis à des analyses physicochimiques, microbiologiques.

Elles ont été conservées au laboratoire à température et humidité ambiante (entre 10 et 39°C et 48 à 83 %) dans des sacs en papier pour assurer les échanges avec le milieu extérieur.



a. Blé tender.

b. Blé dur.

Figure 22: Les échantillons de blé dur et tender.

4. Méthodes

Pour respecter les conditions d'asepsie et éviter toute contamination, les expérimentations sont réalisées à proximité d'un bec benzène conférant une zone de stérilité d'environ 20 cm de diamètre autour de la flamme. Avant toute manipulation, le matériel et les verreries sont rincés à l'eau distillée puis à l'éthanol. Ils sont ensuite stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

4.1. Étude de la qualité physicochimique

4.1.1. Détermination du taux d'humidité relative

C'est une méthode d'étuvage qui consiste à effectuer un séchage d'une prise d'essai de chaque échantillon à une température de 105 ± 2 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Par la suite l'humidité de chaque échantillon est mesurée par la formule suivante (**Multon, 1982 ; Gacem et al., 2011**):

$$\text{Le pourcentage de taux d'humidité} = \frac{\text{Le poids humide} - \text{Le poids sec}}{\text{Le poids humide}}$$

$$H\% = ((P0-Pt) - (P1-Pt)) / (P0-Pt) \times 100.$$

H% : humidité en (%).

Pt : poids de la tare.

P0 : poids de la tare avec échantillon.

P1 : poids constant après séchage multiple

4.1.2. Détermination du pH

Avec une activité de l'eau élevée, les champignons sont en compétition avec les bactéries comme agents d'altération des aliments, et là c'est le pH qui joue un rôle décisif (**Pitt et Hoching, 2009**). Nos échantillons sont subits une analyse pour la détermination du pH en se référant à la technique suivante :

- Prélever 10 g de chaque échantillon ;
- Mélanger 10 g d'échantillon broyé avec 90 ml d'eau distillée;
- Agiter le mélange et laisser le en repos ;
- Mesurer le pH à l'aide d'un pH mètre.

4.2. Étude mycologique des grains de blé

4.2.1. Isolement de la flore fongique

Pour isoler la myco-flore des échantillons de blé considérés, nous avons utilisé deux méthodes, une méthode directe et une méthode indirecte.

4.2.1.1. Méthode directe

a. Méthode directe d'ulster (M.U)

C'est une méthode de mise en évidence des moisissures de surface et de profondeur des grains étudiés. Tapisser la boîte de pétrie par PDA. Afin de crée une atmosphère humide dans la boîte et on dépose 5 graine de blé par boîte (5 graines / boîtes). L'incubation se fait à 28°C pendant 5 à 7 jours. Cette méthode et préconisée dans le cadre de la détermination de la

flore de surface d'un aliment pour juger l'efficacité de tel ou tel mode de stockage (**Laouid et Neftia, 2007**). Nous avons fermé les boîtes cultivées dès le début de localisation jusqu'à dernière étape par para film pour éviter tout risque de contamination.

b. Méthode d'Ulster modifiée

La méthode d'Ulster (**M.U.M**) est une méthode de mise en évidence des moisissures de profondeur des grains étudiée. Les gains de chaque échantillon de blé (30 grains de chaque échantillon, pris au hasard) ont été désinfectés en surface dans l'eau de javel (5%) puis dans l'éthanol, pendant une minute. Après deux rinçages à l'eau distillée stérile, les grains ont été séchés avec du papier filtre stérile à l'approche du bec benzène pour être ensuite ensemencés (**Pacin et al., 2002 ; Ghiasian et al., 2004**).

Sous des conditions aseptiques, les grains désinfectés ont été placés directement, à l'aide d'une pince stérile (à chaque fois passé à la flamme du bec benzène), dans des boîtes de pétri contenant les milieux de culture : le milieu PDA (**Figure 23**), le milieu Sabouraud au Chloramphénicol, Hecktoen et Gélose Chapman au mannitol à raison de 5 grains par boîte (5 grains/ boîtes). Les boîtes de PDA et Sabouraud sont incubés à 28°C pendant 5 à 7 jours et les boîtes de Chapman et Hecktoen incubées à 37 °C (**Pacin et al., 2002 ; Ghiasian et al., 2004**). On ferme les boîtes aseptiquement à l'utilisation de para film.

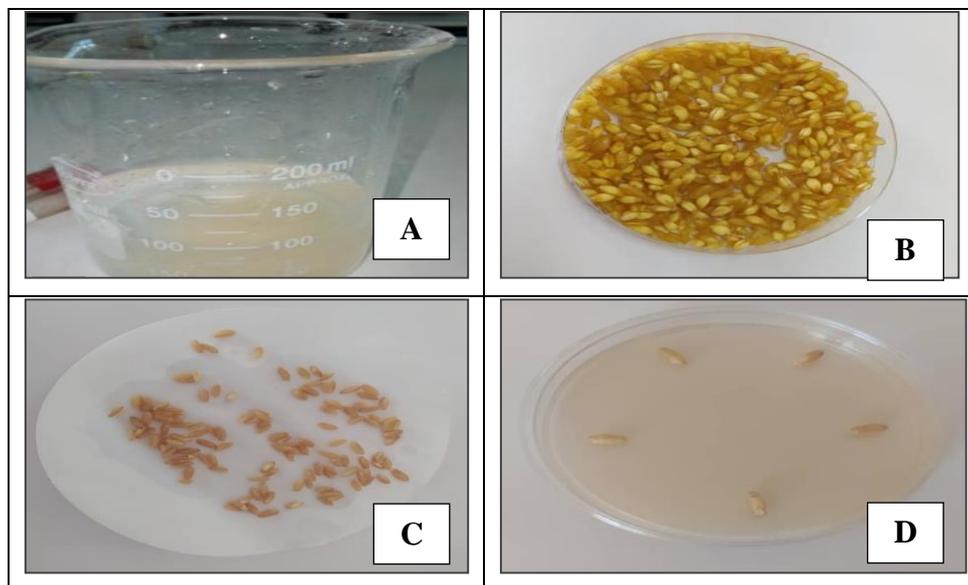


Figure 23: Isolement des moisissures sur le milieu PDA par la méthode d'Ulster modifiée. A) désinfection superficielle, B) rinçage, C) séchage, D) ensemencement.

4.2.1.2. Méthode indirecte ou de dilution

Lorsqu'il s'agit d'étudier l'évaluation dynamique d'une flore fongique pour juger l'efficacité de tel ou tel mode de stockage, un dénombrement de la flore totale ou limité à

certain espèces peut suffire. C'est la méthode de dilutions classique qui concerne les aliments fractionnés.

Elle consiste à dénombrer les microorganismes des grains de blé. De chaque échantillon, 10g des grains de blé broyées ou de produit fini (semoule, farine) sont additionnés à 90 ml d'eau physiologique dans un flacon de 250 ml, ce qui correspond à la solution mère (10^{-1}). A partir de dilution mère 10^{-1} , des dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3}) ont été réalisées pour chaque échantillon de blé prélevé dont le but est de faire diminuer la charge et d'avoir de colonies isolées pour pouvoir les purifier. Deux boîtes pour chaque dilution sontensemencées avec 0.1 ml d'inoculum étalé en surface des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (**Figure 24**) (**King et al., 1979 ; Gacem, 2011**). L'incubation a été faite à 28°C pendant 5 à 7 jours.

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que les propagules fongiques sont dénombrées à partir de la même suspension mère et qu'elles intègrent la flore interne et externe (**Multon, 1982**).

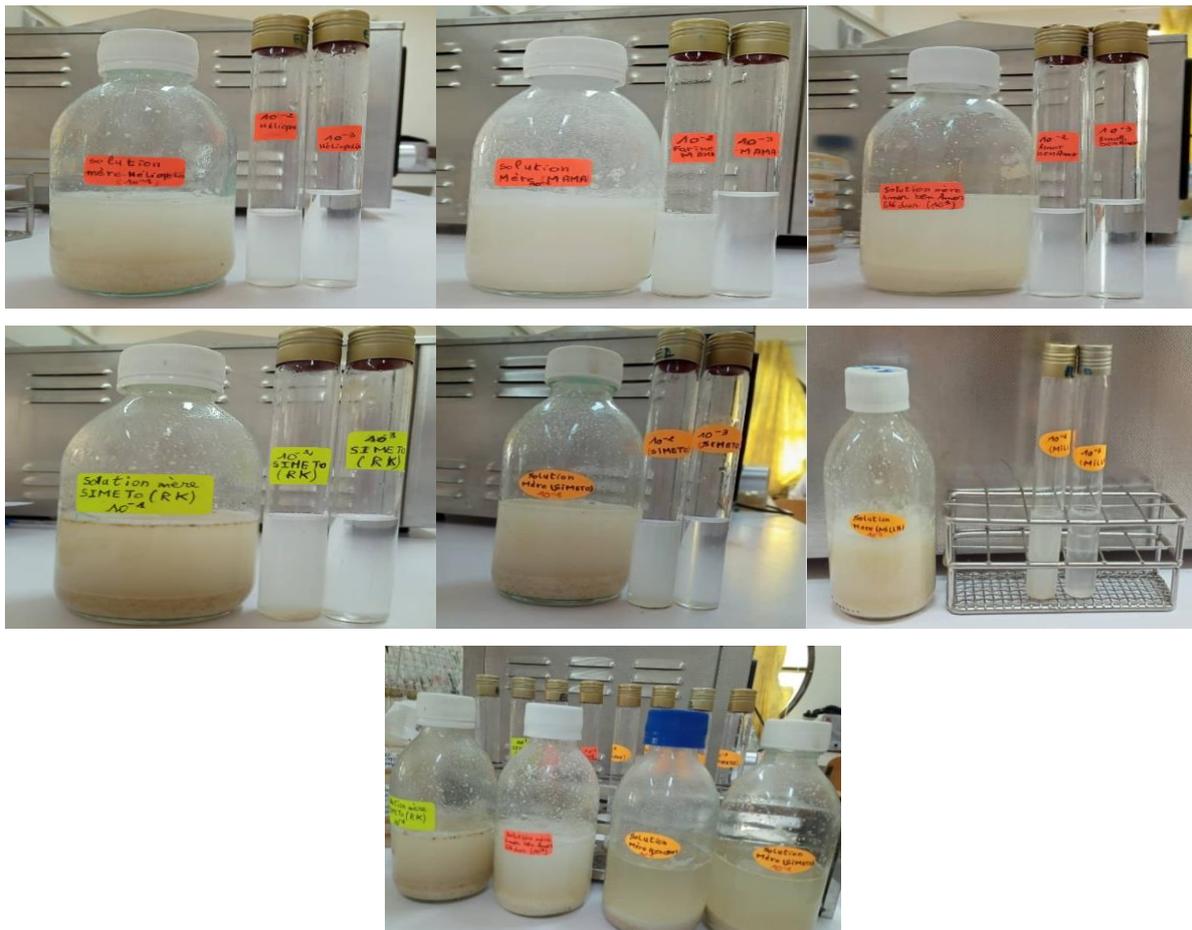


Figure 24: Isolement des moisissures par la méthode de dilution.

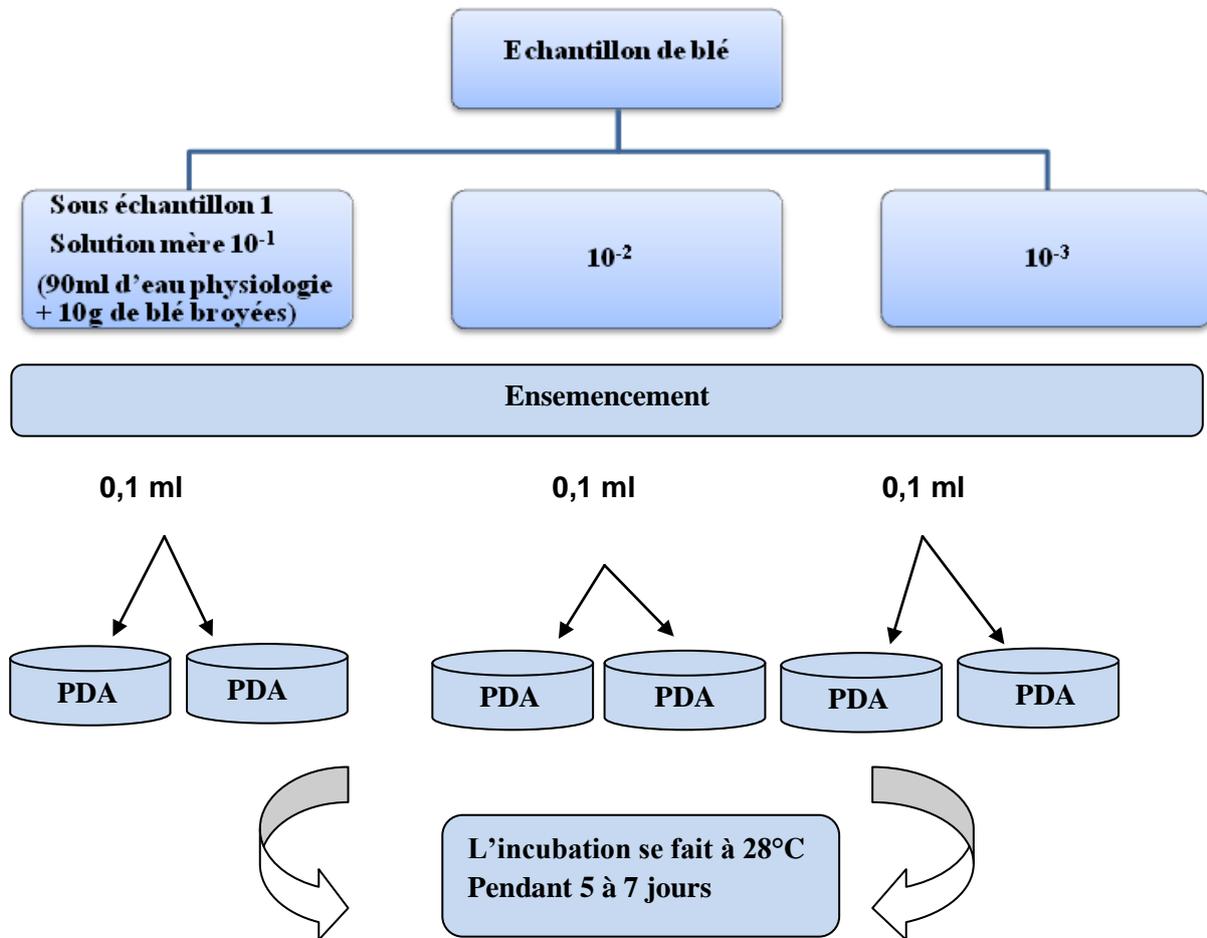


Figure 25: Techniques d'isolement des souches fongiques isolées à partir des grains de blé par la méthode indirecte.

4.2.2. Identification des isolats fongiques

L'identification des moisissures est basée sur les caractères culturaux (observation macroscopique) et l'observation microscopiques ainsi que des propriétés biochimiques (Botton *et al.*, 1990).

4.1.1.2. Étude des caractères macroscopiques

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'œil nu puis à la loupe binoculaire dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus*, d'un *Penicillium*, ou d'un autre genre en fonction de l'aspect morphologique macroscopique(El Khoury, 2007 ; Bennoudia, 2016).

L'observation macroscopique est réalisée sur la face et le revers de la boîte. L'étude des caractères morphologique macroscopiques à portée sur tous les groupes de moisissures isolées. Les caractères étudiés sont basées sur le :

- Au niveau du mycélium : la couleur et la texture du thalle (veloute, laineux, etc.), la couleur du revers de la colonie, le contour de la colonie, la vitesse de croissance apicale et l'odeur (Djossou, 2011 ; Belmehdi et Beddar, 2019).
- Au niveau des spores : la densité sur le thalle, l'aspect des spores (granuleux, poudreux), l'uniformité de la couleur des spores, la présence de pigment diffusible et les exsudats. (Djossou, 2011).

Parmi les champignons en croissance, les moisissures de genre *Aspergillus* sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques (Bennoudia, 2016).

Les champignons du genre *Aspergillus* caractérisent par des colonies mycéliennes poudreuses qui atteignent 2 à 3 cm de diamètre après 5-7 jours d'incubation. Les teintes diffèrent selon les espèces. Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête sphérique ou ovoïde. Suivant l'espèce, une ou deux rangées de stérigmates prend naissance sur les têtes. Sur ces stérigmates se forment et s'accumulent les spores en de très longues chaînes (El Khoury, 2007).

Les espèces aflatoxinogènes appartenant au groupe des *Aspergillus* Flavi sont *A. flavus* (généralement bisériée) et *A. parasiticus* (généralement unisériée). Elles sont caractérisées par des colonies de couleur verte jaune à vert foncé. Les caractères morphologiques de chaque espèce sont résumés dans le tableau 19.

Tableau 19: Caractères morphologiques des espèces d'*Aspergillus* Flavi (El Khoury, 2007).

Espèces	Tête conidienne	Présence de sclérotés	Diamètre des conidies (µm)	Formes et ornementation des conidies	Conidiophores
<i>A. flavus</i>	Unisériée et bisériée	Production par certains isolats	3.5-4.5µm	Globuleuses échinulées	400-1000µm à paroi échinulée
<i>A. parasiticus</i>	Unisériée	Occasionnellement	4-6µm	sphériques	250-500 µm à paroi échinulée

4.1.1.2. Identification microscopique

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les méthodes les plus utilisées sont celles du ruban adhésif et la méthode de lactophénol (Belmehdi et Beddar, 2019).

a. Méthode de ruban adhésif

La technique de scotch est une technique astucieuse peut parfois être utilisée. Elle consiste à effectuer le prélèvement à l'aide d'un morceau de ruban adhésif transparent que l'on plaque légèrement à la surface de la culture jeune et au bord de la colonie fongique (méthode directe ou la méthode de dilution), puis que l'on colle sur une lame de microscope. L'observation microscopique se fait au grossissement X10, X40 et X100 à l'aide d'un microscope optique (**Bennoudia, 2016 ; Belmehdi et Beddar, 2019**).

A partir des mêmes cultures on prend un autre fragment de scotch et on le recolle sur une lame préalablement étalée par une goutte de bleu de méthylène diluée avec deux gouttes de l'eau physiologique (**Ghezlen-Tebibel *et al.*, 2012**).



Figure 26: Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de scotch.

b. Méthode de lactophérol bleu de coton

Un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant de lactophérol bleu de coton (**Annexe I**) dont le but est de gonfle des filaments des moisissures et permettent une bonne observation microscopiques, ensuite recouvrir avec une lamelle couvre-objet qui fait écrasée la préparation (**Belmehdi et Beddar, 2019**). Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements x10, x40 et x100.

Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, mode de ramification, différenciation des thallospores,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois, groupement en chaînes, etc...) (**Belaib et Bouhala, 2016**).

4.3. Analyses mycotoxiques

Toutes les souches *d'Aspergillus flavus* et *d'Aspergillus ochraceus* identifiées à partir des prélèvements analysés sont cultivées sur milieu PDA acidifié pendant 5 jours à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pour pouvoir rechercher la capacité de ces souches à produire des mycotoxines.

4.3.1. Détection visuelle des souches productrices de mycotoxine

Les souches *d'Aspergillus flavus* et *d'Aspergillus ochraceus* sont réensemencées sur des boîtes de Pétri contenant 20 ml de milieu CEA (Coconut Extract Agar) et le désoxycholate de sodium à raison de 0,8%. Les boîtes de Pétri sont incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 7 jours. Des boîtes de Pétri en verre non fluorescent ont été utilisées. Les zones de diffusion d'aflatoxine et d'ochratoxine sont détectées en utilisant une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm (Lemke *et al.*, 1989).

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

Les souches *d'Aspergillus flavus* et *d'Aspergillus ochraceus* sont réensemencées séparément sur milieu YES (Yeast Extract Sucrose) ; riche en vitamines du groupe B complexes, ce milieu favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes conduisant à la production des mycotoxines. L'incubation se fait à $27 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 14 jours.

Après 14 jours d'incubation, la biomasse formée est éliminée en filtrant le milieu YES à travers du papier filtre type Wattman N° 01. Les 50 ml du filtrat obtenu sont additionnés à 100ml de chloroforme, le mélange est rigoureusement agité pendant 10 min puis laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation. Cette opération est répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation.

La phase chloroformique ainsi obtenue est filtrée sur du papier Wattman N° 01 puis concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor type (Heidolph laborota 4000 efficient) jusqu'à l'obtention d'un volume de 2 à 3 ml (indice d'une évaporation achevée).

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification avec une bonne précision. Elle se fait sur une plaque de silicagel (gel de silice 60 F254) sur laquelle est déposé un spot de 20 μl et un autre de 40 μl de chaque chloroformique concentré. 5 μl de chaque solution standard d'aflatoxine et d'ochratoxine sont déposés sur la même ligne droite (ligne de dépôt). La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de

solvant d'élution constitué de toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (5 : 4 : 1) respectivement (**Multon, 1982**).

Après migration et évaporation du produit d'élution à sec, la plaque est examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence d'aflatoxine et d'ochratoxine se traduit par des fluorescences caractéristiques aux spots standards et d'un même RF (facteur de rétention) que l'étalon.

5. Précaution de manipulation et décontamination du matériel utilisé

Les mycotoxines et surtout les aflatoxines sont des substances très toxiques, leur pouvoir à introduire le cancer a été confirmé (**IARC, 1993**). Leur manipulation doit se faire avec le maximum de précaution. Le manipulateur doit porter des gants de protection en évitant tout contact cutané. En cas de contact laver abondamment avec de l'eau. Toute manipulation de ces standards doit être effectuée avec le maximum de précaution sous une hotte de sécurité chimique.

La décontamination du matériel contaminé par les mycotoxines est faite selon les procédures internationales de l'IARC. A la fin de chaque série d'analyse, tout le matériel utilisé doit être décontaminé par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) pendant toute la nuit sous une hotte de sécurité chimique. Un lavage normal par un détergent suivi par un rinçage avec de l'eau distillée doivent être effectués après décontamination.

Chapitre 7 : Résultats et discussion

Résultats

1. Résultat de l'étude de la qualité physicochimique du blé

1.1. Résultat de la détermination du taux d'humidité

L'humidité est la principale clé d'un stockage sain, puisque n'importe quelle activité biologique des champignons ne se déroule qu'en présence de l'humidité. L'humidité représente l'un des facteurs importants aux développements des champignons sur les grains de blé au cours de stockage. Ce qui influe sur leur activité. Pour cela, nous introduisons la détermination de taux d'humidité des échantillons étudiés.

Les pourcentages de taux d'humidité (**tableau 20**) compris entre (11,57%) et (15,50%).

Tableau 20: Analyse physico-chimique des grains de blé dur et tendre.

Code	Echantillon	Pourcentage de l'humidité	pH	Région
B1	Blé tender	11,57%	6,60	CCLS de Guelma
B2	Blé dur Mila	12,20	6,71	CCLS de Chelghoum l'aïd
B3	Blé dur GTA	15,50%	6,79	CCLS de Guelma

D'après les résultats affichés sur la **figure 26**, les variétés de blé dur et blé tendre révèlent des taux d'humidités plus ou moins importantes. Les valeurs moyennes des deux types de blé sont plus ou moins proches mais avec un léger avantage pour le blé dur (GTA) (B1). Elles sont respectivement de l'ordre de 11,57%, 12,2% et 15,50% pour celui du B1, B2 et B3.

L'échantillon de blé tender (B1) présente un taux d'humidité bas (11,57%) par rapport à celui de deux échantillons de blé dur (B2) (B3), (12,20%) (15,50%).

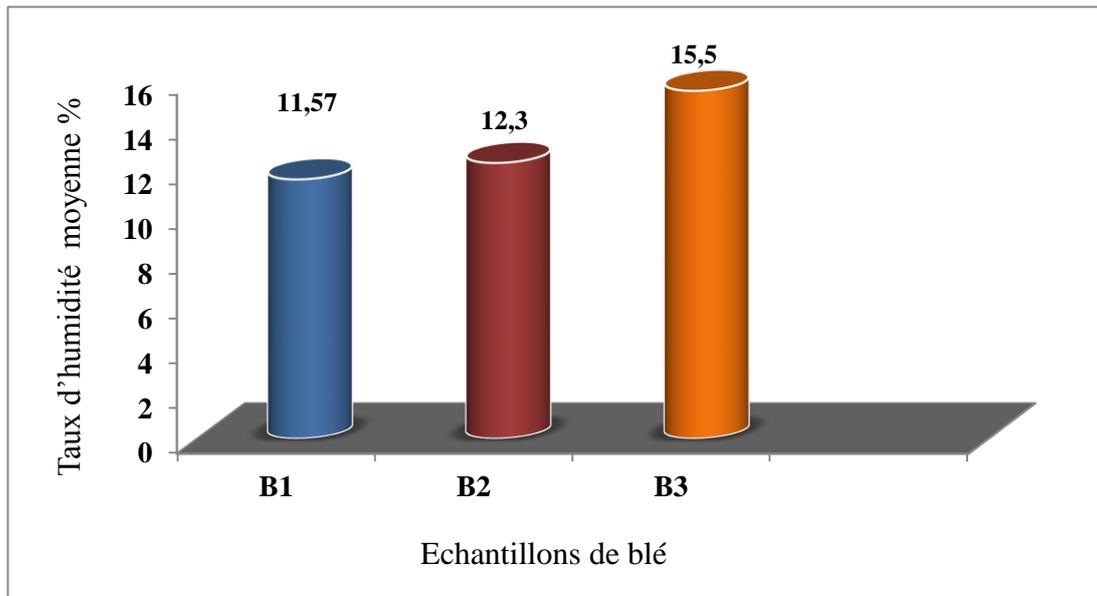


Figure 27: Humidité moyenne des échantillons de blé.

1.2. Résultat de la détermination du pH

Les valeurs moyennes du pH de différents échantillons du blé illustrées sur la **figure 27** démontrent que l'ensemble des échantillons présente un pH légèrement acide avec des valeurs de pH de 6.79 pour le blé dur (B3), 6,71 pour le blé dur (B2) et de 6.60 pour le blé tendre (B1).

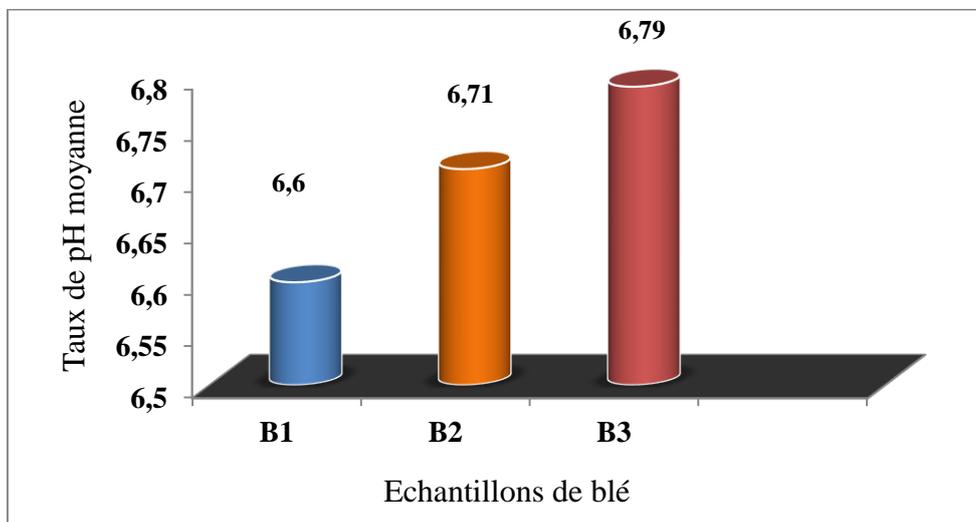


Figure 28: pH moyen des échantillons de blé.

2. Résultats des analyses mycologiques des grains de blé

Le danger potentiel que présente la mycoflore des grains, dépend essentiellement des conditions de conservation (**Multon, 1982**). Dans les analyses effectuées sur les échantillons étudiés, nous avons révélé la présence de plusieurs moisissures avec différent taux de contamination.

Les analyses mycologiques réalisées sur les différents échantillons du blé, ont révélé la présence de levures et des moisissures avec une dominance de cette dernière. La recherche de la mycoflore totale concerne l'ensemble de moisissures présentes au niveau des grains de blés. A cet effet les isollements sont effectués sur des grains entières désinfectés et non désinfectés méthode direct (méthode d'Ulster et Ulster modifié), et sur la méthode classique de dénombrements sur différents milieux (méthodes de dilution sur milieux PDA).

2.1. Isolement la flore fongique

2.1.1. La méthode directe

C'est une méthode d'isolement et de numération directe, respectant la structure particulière du substrat poli et permettant la localisation des espèces responsables d'un potentiel de pollution.

2.1.1.1. Méthode d'ulster (M.U)

L'isolement des moisissures a été réalisé par la méthode d'ulster(A) ou la méthode directe de **Botton et al., (1990)** qui repose sur le principe de stimulation du développement des moisissures par incubation des grains directement déposés sur une surface des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA.

Pour l'identification des genres, nous avons examiné les caractères cultureux et morphologiques (**Bouchet., 2005**). En effet, pour les caractères cultureux nous avons: vitesse de croissance; couleur des colonies; texture du thalle; présence ou absence de mucorale; couleur et changement de la couleur du milieu; présence ou absence d'odeurs caractéristiques (**Figure 28**).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les échantillons de blé analysés sont contaminés par les moisissures. L'utilisation du milieu PDA a permis de révéler 6 souches fongiques dans les 4 échantillons de blé à des taux différents. Après la phase d'incubation, 4 isolats fongiques ont été prélevés et purifiés à partir d'échantillons de blé dur et tendre. Après identification, il s'est avéré que les 4 isolats fongiques appartiennent à 6 genres :

- *Aspergillus*
- *Alternaria*
- *Fusarium*
- *Rhizopus*

- *Curvularia*
- *Microdochium albescens*.

On a pu constater que le taux de contamination les plus élevée était dans le blé tender **E4** avec les genres *Aspergillus spp.*, *Curvularia*, *Fusarium graminearum*, *Microdochium albescens*, *Alternaria*, et moins contaminée dans **E1**, **E2**, avec deux genre *Rhizopus* et *Aspergillus niger* pour **E1** et *Curvularia*, *Microdochium albescens* pour **E2**. Concernant l'échantillon **E3** présente un résultat similaire et faible avec le genre *Rhizopus*.



Figure 29: Colonies obtenues dans les graines contaminées de blé par la méthode d’ulster.

Tableau 21: Les échantillons de blé analysé par méthode d’Ulster et leurs codages.

Code	Echantillon	Milieu	Région
E1	Bd	PDA	Guelma
E2	Bd	PDA	Roknia
E3	Bd	PDA	Chelghoum l’aïd
E4	Bt	PDA	Guelma

Bd : blé dur. **Bt** : blé tendre.

2.1.1.2.Méthode d’Ulster modifiée

Les résultats de cette analyse ont révélé une contamination par les moisissures dans les échantillons analysés par la méthode d’Ulster modifié (Méthode B).

On a pu constater que le taux de contaminationde mycoflore étudié par la méthode B variés d’un échantillon a un autre, les plus élevée était dans les échantillons **G1**, **V1**, **S1**, **D1**,**T1** avecet moins contaminée en **G2**, **V2**, **S2**, **D2**, **T2**.

A partir des résultats de l'isolat, la plupart des espèces des champignons qui sont apparus sur le (PDA), sont apparus sur le (Sabouraud). En plus, le milieu (PDA) a montré des résultats extraordinaires en ce qui concerne l'identification, surtout la vitesse de croissance en plus de l'hétérogénéité, à l'appariation des spores en particulier.

Les genres *Rhizopus*, *Alternaria*, *Ulocladium* et *Fusarium* détectés sur le blé tendre appartiennent à la flore du champ et la flore intermédiaire. Pour le *Cladosporium*, confirment clairement qu'il est difficile de identifier ce genre à cause de son aspect cultural.

Les résultats de l'isolement et le diagnostic des champignons qui accompagnent les graines de blé dur et de graines de blé tendre dans le **tableau 22** :

Tableau 22: Les échantillons de blé analysé par la méthode d'Ulster modifié et leurs codages.

Variété de blé	Code	Milieu	Variété de blé	Code	Milieu
Bd GTA	G1	PDA	Bt	T1	PDA
	G2	Sabouraud		T2	Sabouraud
	G3	Hektoene		T3	Hektoene
	G4	Chapman		T4	Chapman
Variété de blé	Code	Milieu	Variété de blé	Code	Milieu
Bd Vitron	V1	PDA	Bd Simeto	S1	PDA
	V2	Sabouraud		S2	Sabouraud
	V3	Hektoene		S3	Hektoene
	V4	Chapman		S4	Chapman
Variété de blé	Code	Milieu			
Bd	D1	PDA			
	D2	Sabouraud			
	D3	Hektoene			





Figure 30: Colonies obtenues dans les graines contaminées de blé par la méthode d'Ulster modifiée.

Une comparaison a été effectuée entre le taux de contamination par la flore fongique révélées par la méthode A, et par la méthode B de chaque échantillon analysé. Cette comparaison permet de conclure que la flore fongique externe et profonde révélée par la méthode A dans tous les échantillons analysés est supérieure en la comparant avec la flore fongique profonde dénombrée par méthode B. La désinfection par l'eau de javel des grains de blé analysé durant la méthode B a fait éliminer la majorité de la mycoflore externe.

2.1.2. Méthode de dilution

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que les microorganismes sont dénombrés à partir de la même suspension mère; elle intègre de ce fait les flores internes et externes; elle permet d'analyser des échantillons importants, ce qui est favorable sur le plan de la représentativité statistique (fréquence abondance).

L'exploitation des résultats obtenus par cette méthode permet l'appréciation moyenne du degré de pollution (taux de contamination), tout en donnant une image de la flore contaminant de tous nos échantillons.

Une biodiversité fongique est assez importante (moisissure et levure) a été relevée, après effectuée une analyse mycologique de nos échantillons sur milieu PDA est illustrée ci dessous dans **la figure 30** (différentes souches fongiques obtenues sur milieu PDA).

Dans cette partie un total de 10 échantillons de blé et dérivés a été analysé. Dans un premier temps nous avons prélevé 10 échantillons de blé collectés dans la wilaya de Guelma et les régions voisines et dans la région de Mila, composés de blé stocké dans les maisons, de blé stocké dans les silos et de blé transformé en semoule et en farine. L'objectif était d'analyser la flore fongique et de rechercher les champignons dans la filière blé. Ces 10 échantillons représentent différentes variétés de blé dur et de blé tendre prélevées dans

différentes localités. Cet échantillonnage répond à un double objectif, celui de comparer les résultats de blé dur et tendre et celui d'évaluer la distribution des champignons toxigènes en fonction du climat, des variétés de blé et des localités.

Les taux de contamination un peu élevé enregistré pour le type de blé (**R2, R3, R4**) et justifier que ces mélanges sont stocké dans les maisons et peu due aussi aux quantités d'humidité relative qui influence sur la prolifération des moisissures.

Les résultats de l'isolement et le diagnostic des champignons qui accompagnent les graines de blé dur et de graines de blé tendre dans le **tableau 23**:

Tableau 23: Résultats de la recherche de la flore fongique de blé par la méthode indirect.

Code	Variété de blé	Résultat						Milieu de culture	Région
		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³			
		b1	b2	b1	b2	b1	b2		
R1	Bd GTA	+	+	+	+	+	-	PDA	Guelma
R2	Bd Simeto	+	+	+	+	+	-	PDA	Bouhegouf
R3	Bd Vitron	+	+	+	+	+	+	PDA	Selawa
R4	Bd Simeto	+	+	+	+	-	-	PDA	Roknia
R5	Bd	+	+	+	-	+	-	PDA	Chelghoum l'aïd
T*1	Bt ANZA	+	-	+	+	-	-	PDA	Guelma
S*1	Semoule	+	+	+	+	+	+	PDA	Héliopolis
S*2	Semoule Amor ben Amor	-	-	+	+	-	-	PDA	Guelma
F1	Farine Mama	+	+	+	-	+	+	PDA	Guelma
F2	Farine Thika	+	-	+	+	+	-	PDA	Guelma

b1= boîte n°1 **b2**= boîte n°2 **Bd**= Blé dur **Bt**= Blé tender

(+)= culture positive (-)= culture négative

La mycoflore de stockage est la plus abondante avec une dominance de l'espèce *Aspergillus*, suivie par la mycoflore intermédiaire (*Cladosporium sp* et *Curvularia sp*).

On remarque que le genre prédominant est l'*Aspergillus*, il regroupe les espèces suivantes: *A.flavus*, *A.niger*, suit le genre *Penicillium*. Enfin les genres: *Alternaria*, *Rhizopus*, *Fusarium*.

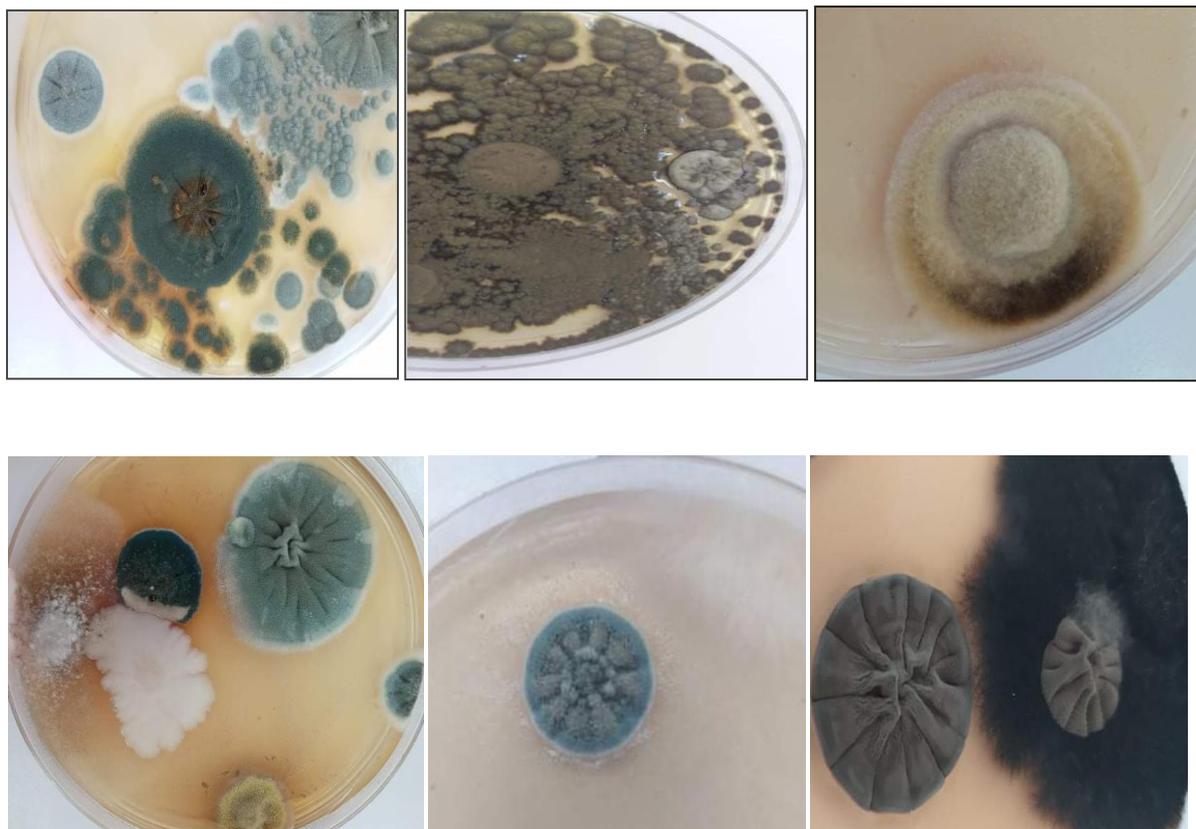


Figure 31: Colonies obtenues dans les graines contaminées de blé par la méthode de dilution.

2.2. Identification

Après la phase d'incubation des colonies fongiques on poussées autour des échantillons(**Photographie**). L'identification des genres fongiques a été réalisée selon les clés de détermination de **Botton (1990)**, **Rémi (1997)**, **Leyral et al., (1998)**, **Chabasse et al., (2002)** et **Nasraoui (2006)**. En se basant sur les caractères macroscopiques des colonies et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores.

2.2.1. Identification macroscopique

L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation, à l'œil nu, des caractères cultureux (aspect de la colonie, couleur, contour, revers, et la vitesse de la croissance). Les résultats obtenus, ont été rassemblés dans les **tableaux (24,25 et 26)** ci-dessous.

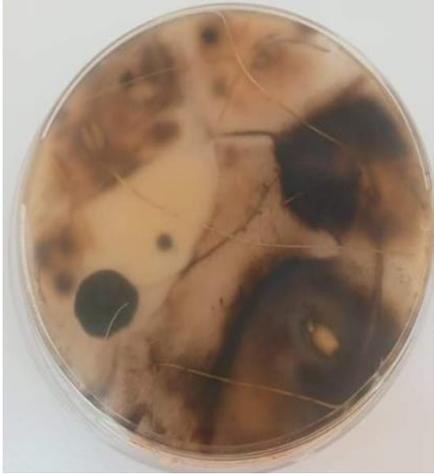
Tableau 24: Caractères macroscopiques des souches isolées de blé dur et tendre par méthode d’ulster (M.U).

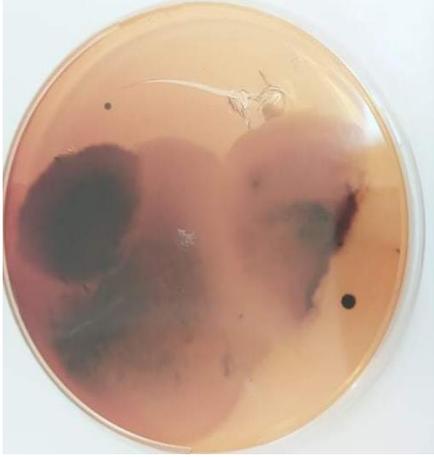
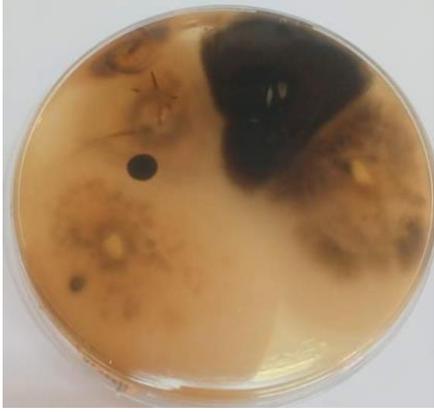
Code de la souche	Aspect macroscopique des isolats		Aspect macroscopique	Genres et /ou espèces
	Surface	Revers		
E1			<p>Vitesse de Croissance : rapide.</p> <p>Recto : Texture laineuse et sèche.</p> <p>Les colonies sont mixte (2 colonie).</p> <p>Couleur de mycélium : blanches au départ, puis grises et noire.</p> <p>Verso : incolore.</p>	<p><i>Rhizopus</i> +</p> <p><i>Aspergillus niger</i></p>
E2			<p>Vitesse de croissance : rapide.</p> <p>Recto : colonie duveteuse à laineuse, de couleur marron jaunâtre, noire et blanche.</p> <p>Verso : marron jaunâtre</p>	<p><i>Curvularia</i> +</p> <p><i>Microdochium albescens</i></p>
E3			<p>Vitesse de Croissance : rapide.</p> <p>Recto : Texture laineuse et sèche</p> <p>Couleur de mycélium : blanches.</p> <p>Verso : incolore.</p>	<p><i>Rhizopus</i></p>

E4			<p>Vitesse de croissance rapide. Recto : colonie Cotonneuse très abondant, dense de couleur rosâtre. Colonie duveteuse à laineuse de couleurs vert foncé et blanche plus des colonies duveteuse à poudreuse de couleur vert-jaune. Verso : colonie beige, brun et rose</p>	<p>-<i>Aspergillus spp.</i> -<i>Curvularia graminearum</i> <i>Microdochium albescens</i> -<i>Alternaria</i></p>
----	---	---	---	--

Tableau 25: Caractères macroscopiques des souches isolées de blé dur et tendre par méthode d'ulster modifié.

Code de la souche	Aspect macroscopique des isolats		Description
	Surface	Revers	
G1			<p>Vitesse de Croissance rapide. Recto : colonie duveteuse à poudreuse de couleur blanche, colonie cotonneuse et sèche de couleur marron jaunâtre, noire. Verso : jaune-marron.</p>
G2			<p>Vitesse de croissance lente. Recto : colonie duveteuse, plate de couleur marron jaunâtre, Colonie poudreuse, cotonneuse de couleur, blanche et vert bleuâtre. Verso : marron jaunâtre.</p>

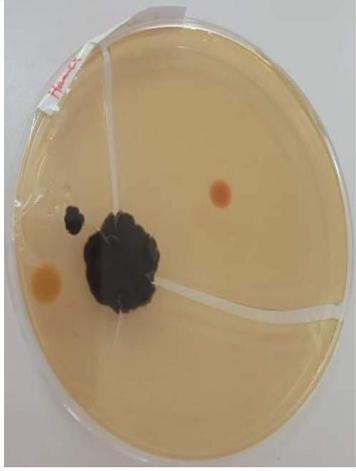
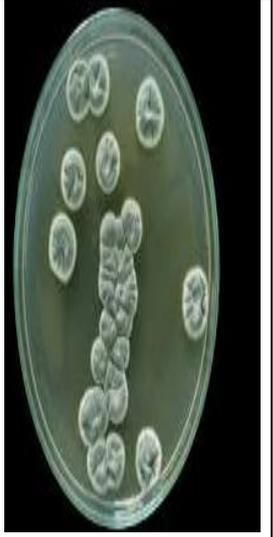
<p>T1</p>			<p>Vitesse de croissance rapide. Recto : Colonie poudreuse a laineuses, cotonneuse, centre bombé, de couleur blanche neige au périphérique, brun au centre. Verso : marron clair.</p>
<p>T2</p>			<p>Vitesse de croissance rapide. Recto : Colonie cotonneuse à laineuse et gouttelée. Couleur blanche, vert et marron clair. Verso : marron jaunâtre.</p>
<p>V1</p>			<p>Vitesse de croissance très rapide. Recto : colonie floconneux de couleur vert, et colonie poudreuse, laineuse de couleur blanchâtre et marron. Verso : beige, marron jaunâtre.</p>

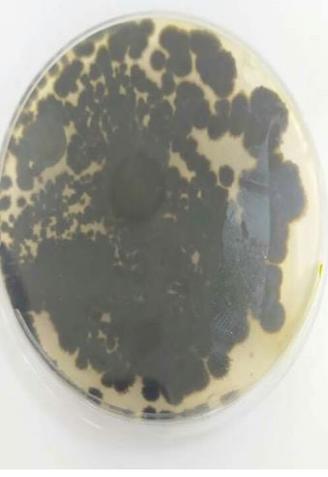
<p>V2</p>			<p>Vitesse de croissance lente.</p> <p>Recto : Colonie simple, duveteuse, plate, sèche, lisse et poudreuse de couleur blanche et marron jaunâtre.</p> <p>Verso : jaune marron.</p>
<p>S1</p>			<p>Vitesse de croissance très rapide.</p> <p>Recto : Colonie poudreuse a laineuses, cotonneuse, centre bombé, de couleur blanche salée, marron claire et noir.</p> <p>Verso : marron clair.</p>
<p>S2</p>			<p>Vitesse de croissance lente.</p> <p>Recto : Colonie simple cotonneuse à laineuse de couleur marron jaunâtre et noire.</p> <p>Verso : marron jaunâtre.</p>
<p>D1</p>			<p>Vitesse de croissance rapide</p> <p>Recto : colonie duveteuse poudreuse à laineuse de couleur marron et blanchâtre, colonie beige crémeuse et lisse.</p> <p>Verso : beige, marron</p>

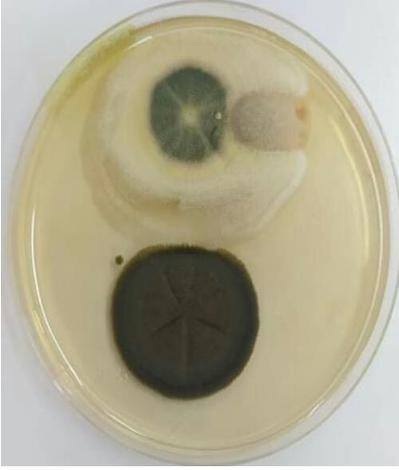
			jaunâtre.
D2			Vitesse de croissance lente. Recto : Colonie simple duveteuse, plate, plâtreuse et sèche de couleur marron et un colonie plissée en dôme de couleur noire. Verso : marron jaunâtre et incrusté.

Tableau 26: Caractères macroscopiques des souches isolées de blé dur et tendre par méthode de dilution.

Code de la souche	Aspect macroscopique des isolats		Description	Photo de référence(Bioforma, 2002)
	Surface	Revers		
R1			Vitesse de croissance lente. Recto : colonie plissée en dôme simple et duveteuse de couleur grise et noir. Verso : noir	
			Vitesse de croissance lente. Recto : colonie plissée en dôme simple,duveteuse de couleur grise et noir. Verso : noir.	

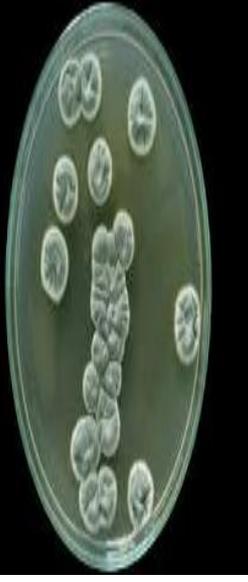
			<p>Vitesse de croissance lente Recto : colonie plissée duveteuse, laineuse et sèche de couleur blanche, verte et grise. Verso : jaunâtre et noir.</p>	
			<p>Vitesse de croissance rapide Verso : colonie aérienne centre bombé de couleur blanchâtre et verte. Recto : jaunâtre incrusté.</p>	
<p>S*1</p>			<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie aérienne, poudreuse et gouttelettée de couleur blanchâtre et verte. Verso : jaunâtre</p>	

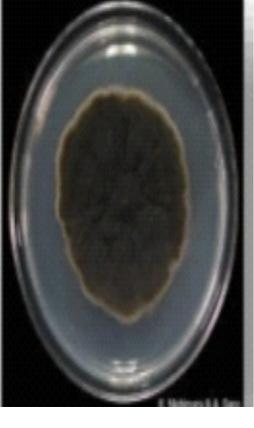
			<p>vitesse de croissance rapide Recto : Colonie poudreuse à laineuses et cotonneuse, de couleur blanche, verte et noir. Verso : marron clair et noir.</p>	
			<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie poudreuse à laineuse et cotonneuse de couleur blanche et verte. Verso : marron jaunâtre</p>	
<p>S*1</p>			<p>Vitesse de croissance : rapide Recto : colonie plate, poudreuse et plissé de couleur noir Verso : noir et incrusté.</p>	

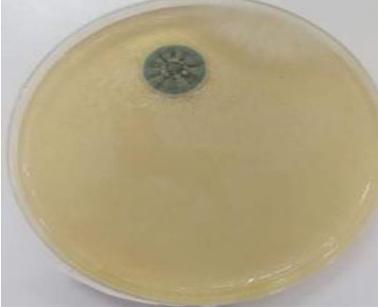
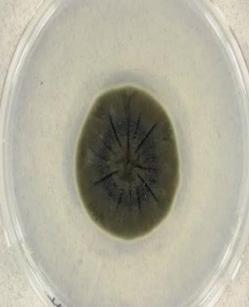
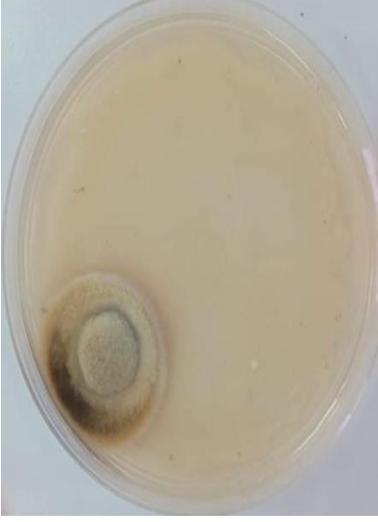
			<p>Vitesse de croissance rapide Verso : colonie simple, duveteuse à laineuse de couleur verte, noir et blanche. Recto : noir et brune incrusté.</p>	
<p>R3</p>			<p>Vitesse de croissance lente. Recto : colonie simple, poudreuse et laineuse de couleur blanche et noir. Verso : noir et brune.</p>	
			<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie cotonneuse à poudreuse dense de couleur grise à noir. Verso : marron jaunâtre.</p>	

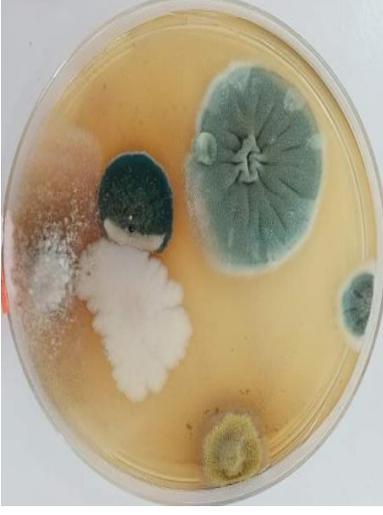
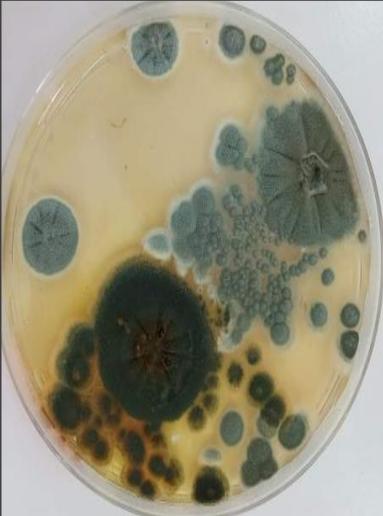
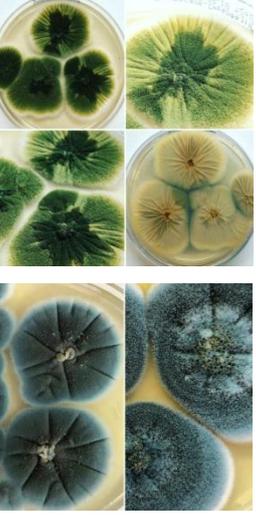
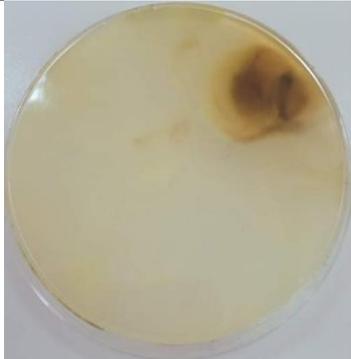
		<p>Vitesse de croissance lente Recto : colonie simple, laineuse de couleur blanche, noir et verte. Verso : brune.</p>	
		<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie plate et duveteuse et sèche de couleur verte foncée. Verso : brune, noir au centre.</p>	
		<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie, plate et duveteuse de couleur verte, noir. Verso : noir, brune et incrusté.</p>	
		<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie duveteuse à laineuse de couleur blanche, grise et marron. Verso : marron jaunâtre.</p>	

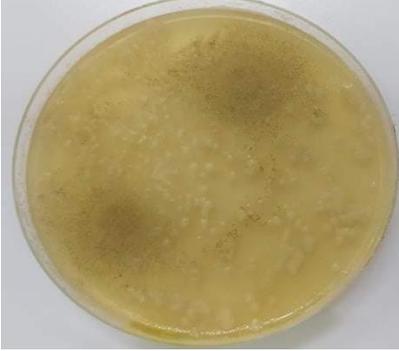
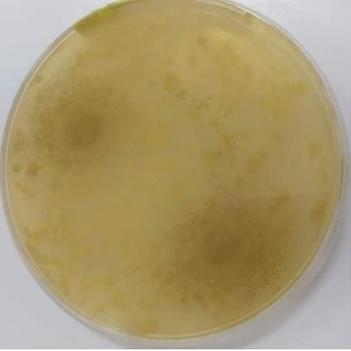
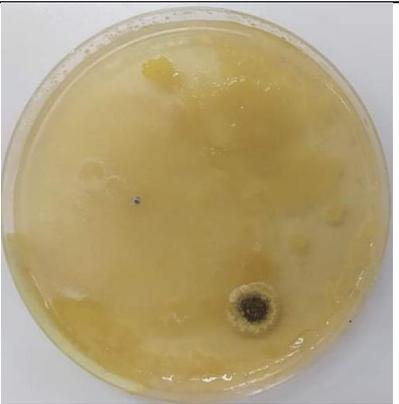
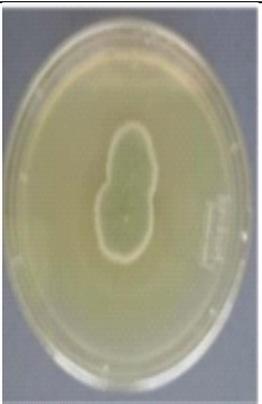
R4

		<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie laineuse, cotonneuse bombé au centre et sèche de couleur blanche, verte et noir. Verso : marron jaunâtre et brun.</p>	
		<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie laineuse, cotonneuse de couleur blanche, verte et noir Verso : marron jaunâtre.</p>	
		<p>Vitesse de croissance rapide Recto : colonie cotonneuse, centre bombé et plissée de couleur blanche, verte et beige Verso : brune et incrusté.</p>	

			<p>Vitesse de Croissance rapide texture laineuse couleur blanc Verso incolore.</p>	
R5			<p>Vitesse de croissance lente. Recto : colonie simple, duveteuse, laineuse, de couleur blanche neige et verte foncé. Verso : noir.</p>	
			<p>Vitesse de croissance lente Recto : colonie simple duveteuse et sèche, de couleur noir. Verso : noir et brune.</p>	
			<p>Vitesse de croissance lente colonie simple aérienne et laineuse Verso beige.</p>	

<p>T*1</p>			<p>Vitesse de croissance lente. Colonie simple, granuleuse et laineuse de couleur blanche, marron et verte Verso : jaune marron.</p>	
			<p>Vitesse de croissance rapide. Recto: colonie plissée couleur vert olive. Verso: brun.</p>	
			<p>Vitesse de croissance lente. Colonie simple cotonneuse plissée centre bombé, couleur blanche, marron clair au périphérique Verso beige.</p>	

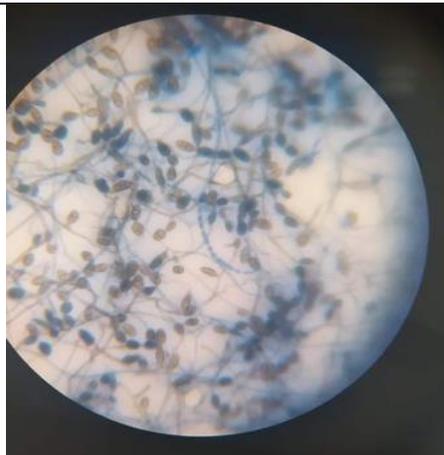
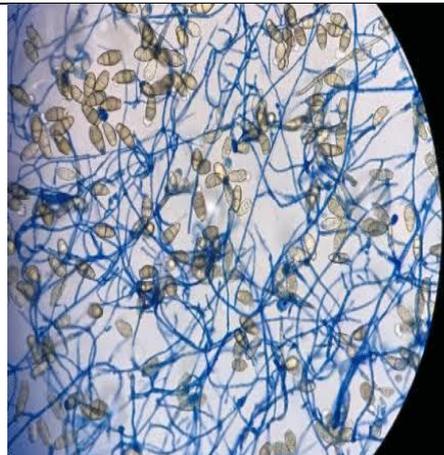
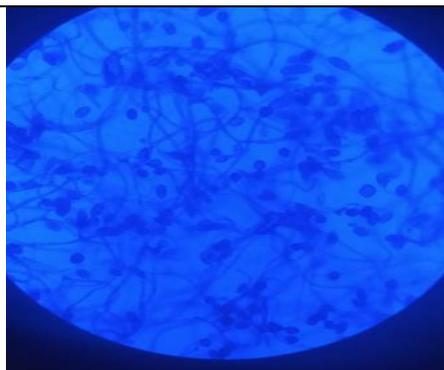
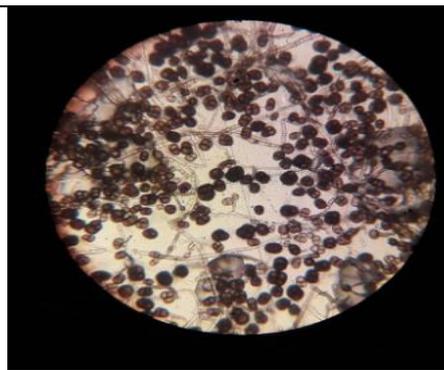
<p>F1</p>			<p>Vitesse de croissance rapide. Colonie plissée, centre déprimé et plat, poudreuse et gouttelettée, couleur vert olive. Verso: jaune marron pigmenté.</p>	
			<p>Vitesse de croissance rapide. Colonie plissée, centre déprimé et plat, poudreuse et gouttelettée, couleur vert olive, vert foncé. Verso: jaune, beige incrusté.</p>	
			<p>Vitesse de croissance lente. Colonie simple aérienne et cotonneuse. Couleur blanche. Verso : jaune.</p>	

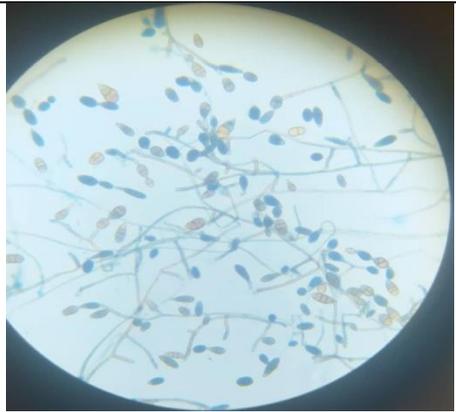
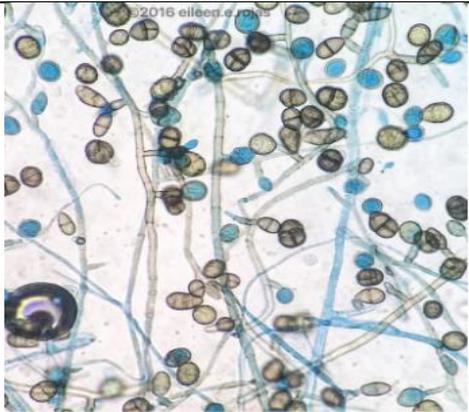
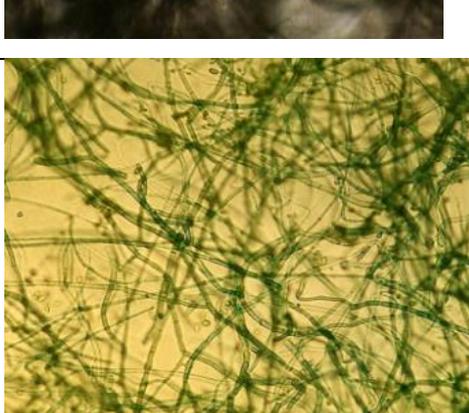
			<p>Vitesse de croissance rapide Colonie simple plat laineuse et sèche, couleur blanchâtre. Verso : jaune marron.</p>	
F2			<p>Vitesse de croissance lente. Colonie simple poudreuse à laineuse gouttelettée. Verso : incolore.</p>	
			<p>Vitesse de croissance lente. Colonie aérienne simple gouttelettée de couleur beige, marron au centre. Verso : jaune</p>	
			<p>Vitesse de croissance lente. Colonie simple aérienne et cotonneuse couleur blanche neige et noir. Verso : noir et jaunâtre</p>	

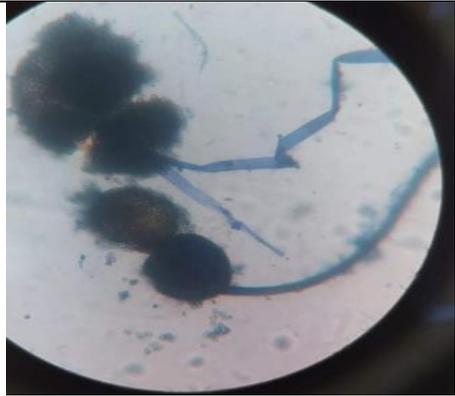
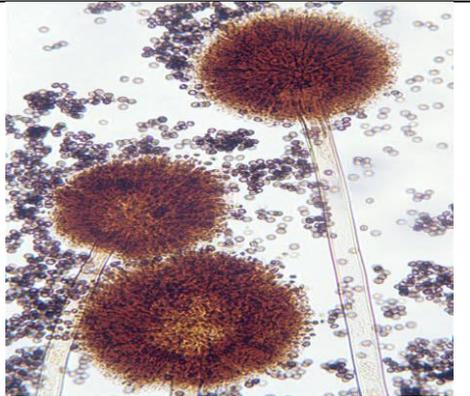
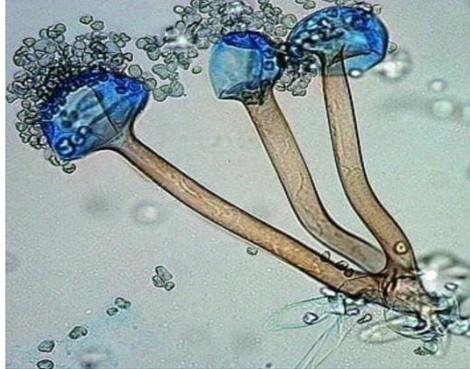
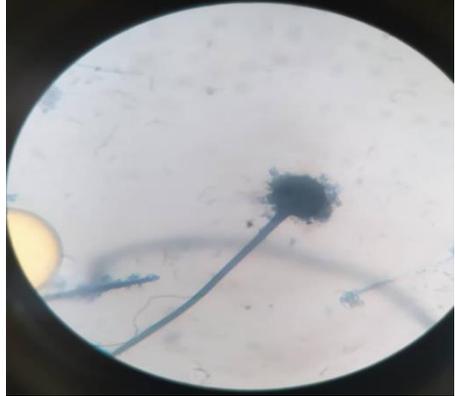
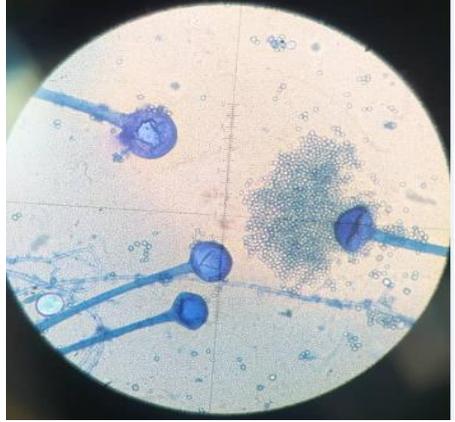
2.2.2. Identification microscopique par la méthode de Scotch et de lactophérol bleu de coton

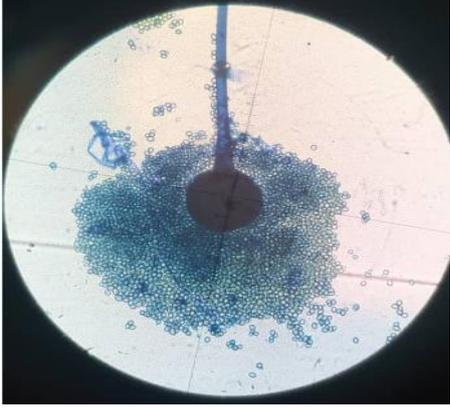
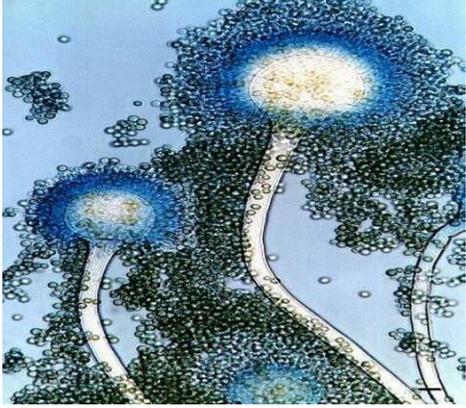
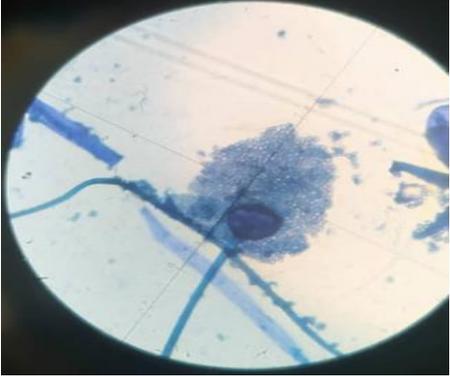
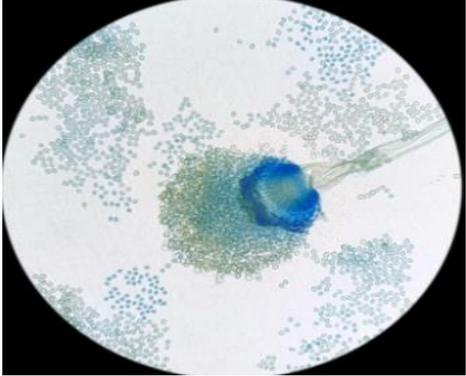
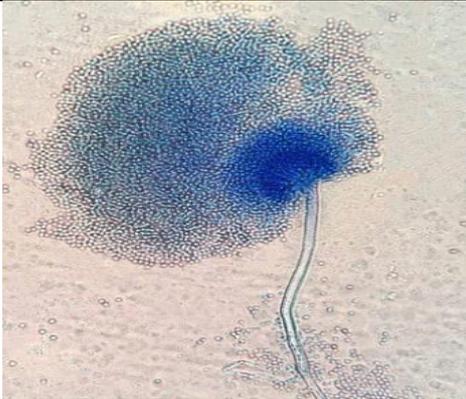
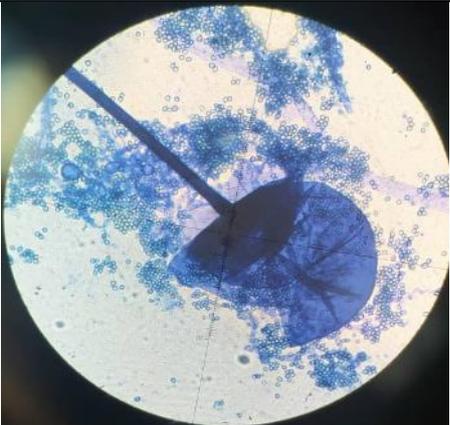
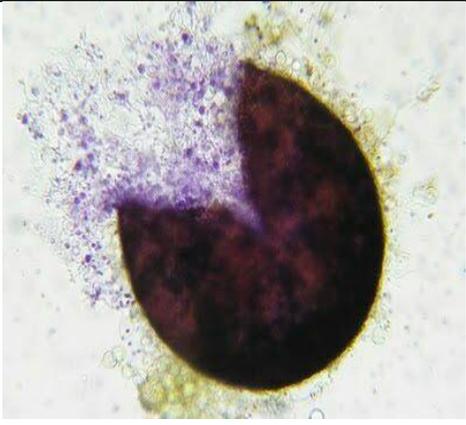
Toutes les moisissures isolées ont été soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement X40 et X100. Cette identification étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores ou des conidies (forme, couleur, texture de parois, forme des organes de fructification, etc.). Les résultats obtenus ont été rassemblés dans les tableaux (27 et 28) ci-dessous.

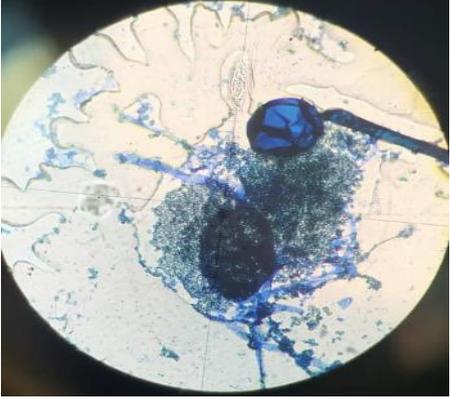
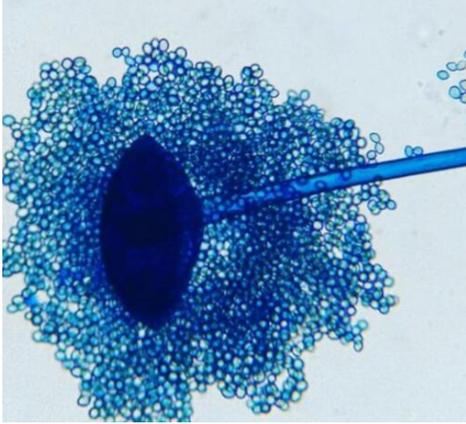
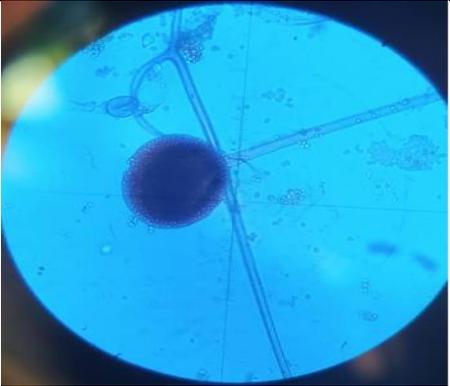
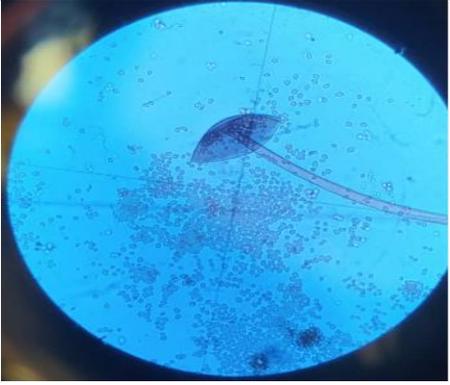
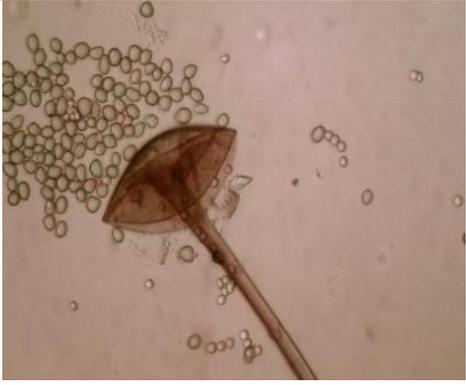
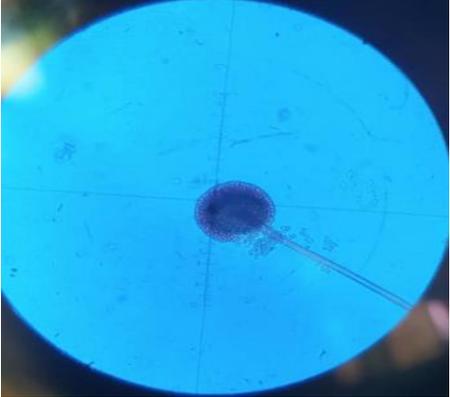
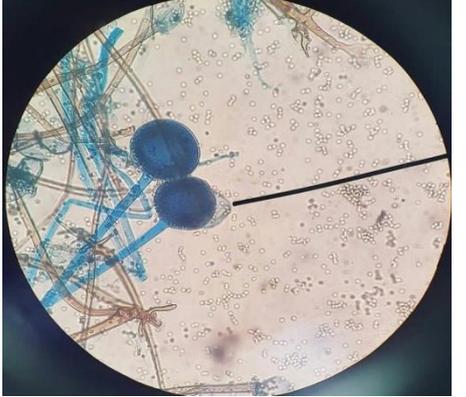
Tableau 27: Identification microscopiques des souches isolées des grains de blé par la méthode de Scotch et de lactophérol bleu de coton.

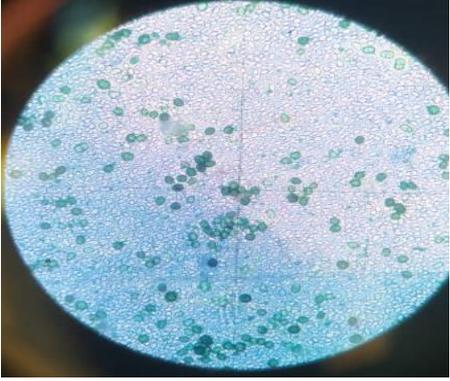
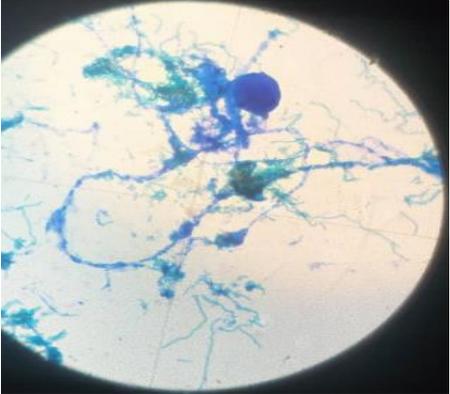
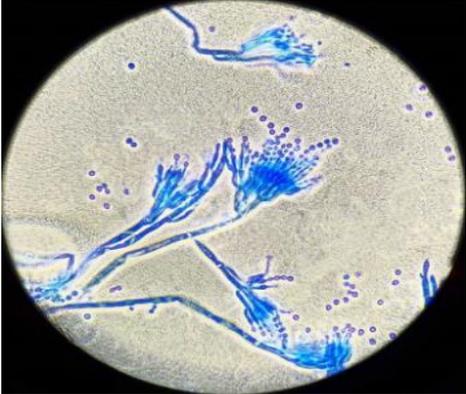
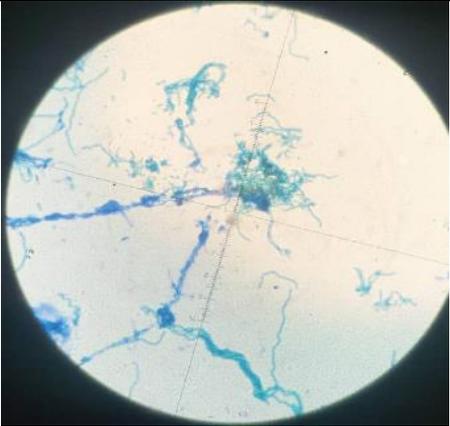
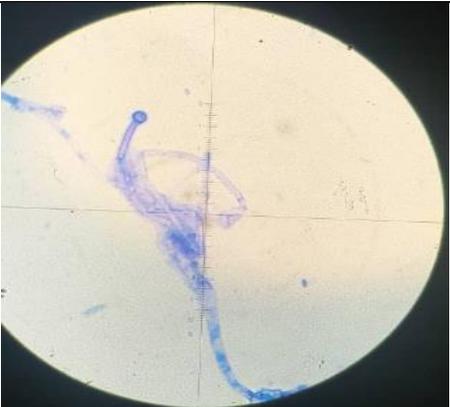
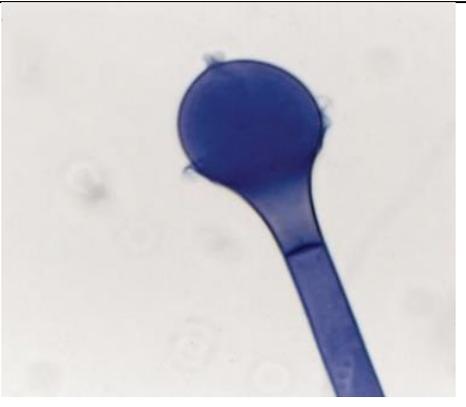
Aspect microscopique obtenu (nos résultats)	Photo microscopique de référence (Dehghan <i>et al.</i> , 2008).	Genre identifié
		<i>Alternaria sp.</i>
		<i>Ulocladium sp.1</i>

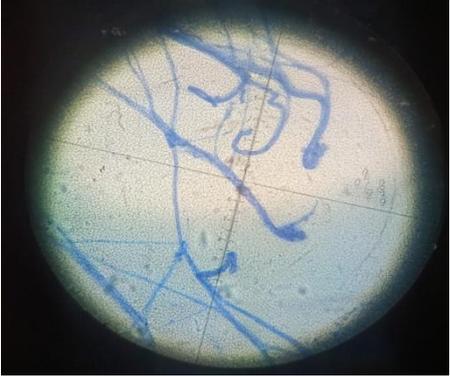
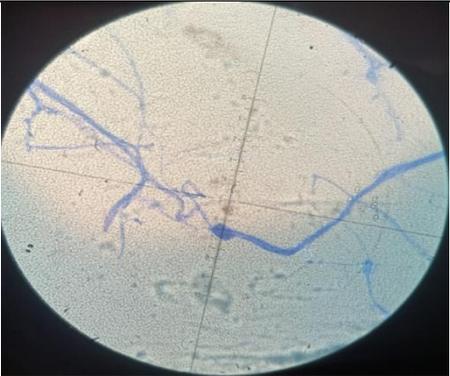
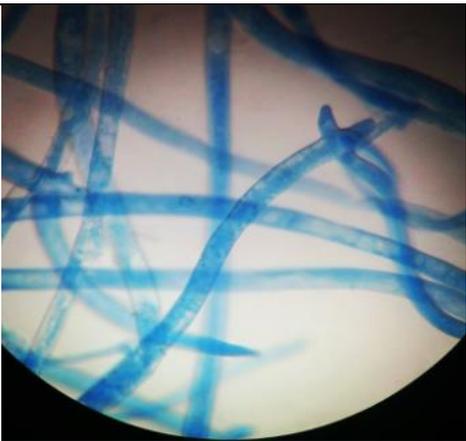
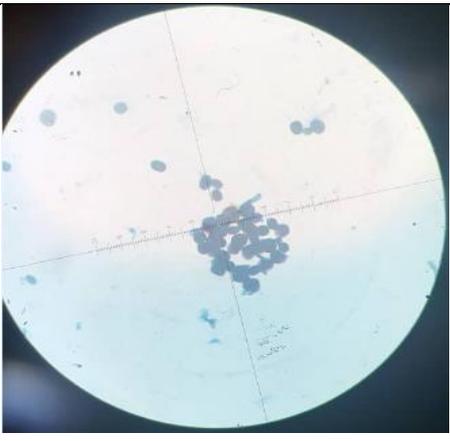
		<p><i>Alternaria sp</i></p>
		<p><i>Ulocladium sp.</i></p>
		<p><i>Alternaria sp.</i></p>
		<p><i>Rhizomucor sp</i></p>

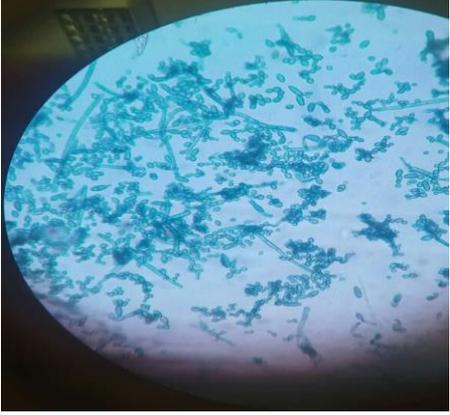
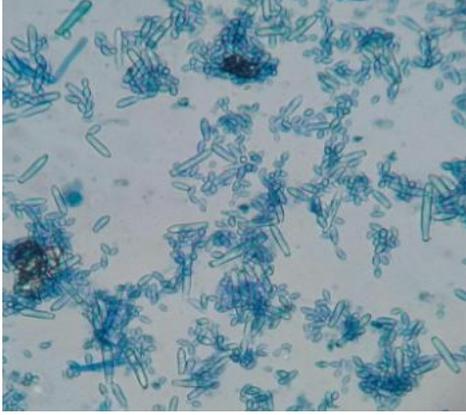
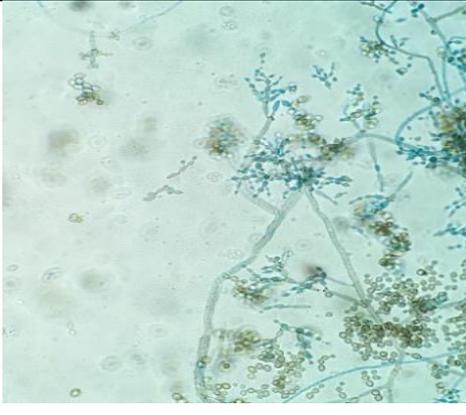
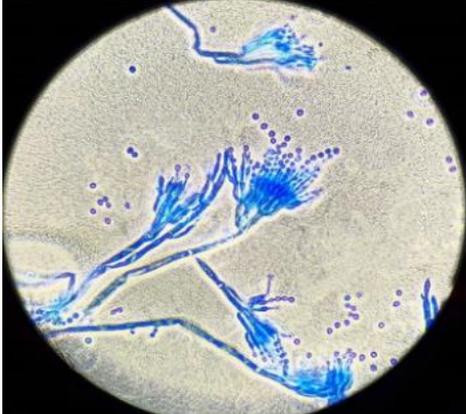
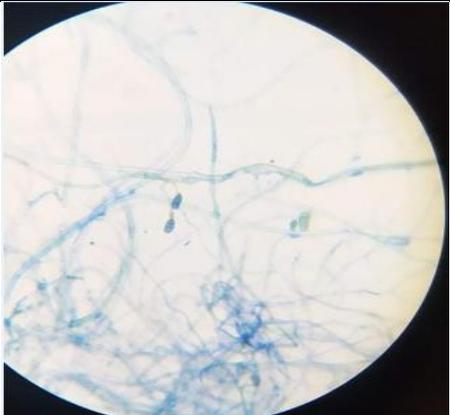
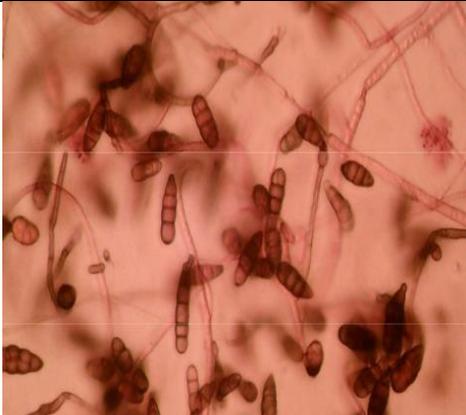
		<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
		<p><i>Rhizopus sp</i></p>
		<p><i>Mucor spp.</i></p>
		<p><i>Aspergillus flavus.</i></p>

		<p><i>Aspergillus sp.</i></p>
		<p><i>Aspergillus fumigatus.</i></p>
		<p><i>Aspergillus sp</i></p>
		<p><i>Aspergillus sp.</i></p>

		<i>Aspergillus sp.</i>
		<i>Rhizopus sp.</i>
		<i>Rhizopus sp.</i>
		<i>Rhizomucor sp.</i>

		<i>Nd.</i>
		<i>Penicillium sp</i>
		<i>Penicillium sp.</i>
		<i>Absidia sp.</i>

		<i>Nd</i>
		<i>Nd</i>
		<i>Trichoderma sp.</i>
		<i>Epicoccum sp.</i>

		<p><i>Cladosporium</i> <i>sp.1</i></p>
		<p><i>Cladosporium</i> <i>sp.2</i></p>
		<p><i>Penicillium</i></p>
		<p><i>Alternaria sp.</i></p>

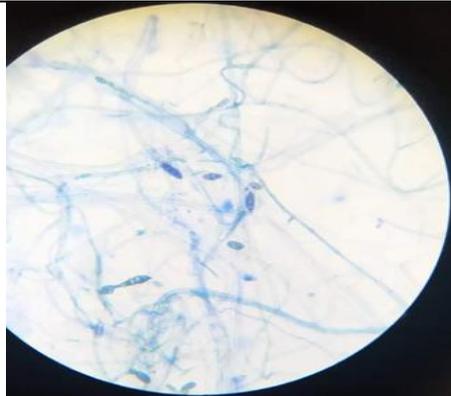
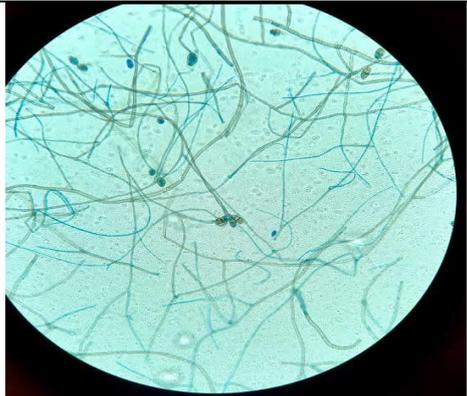
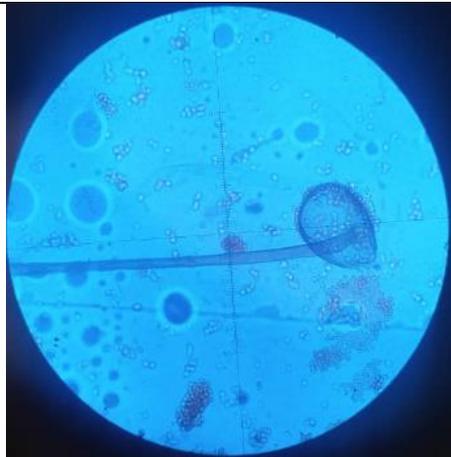
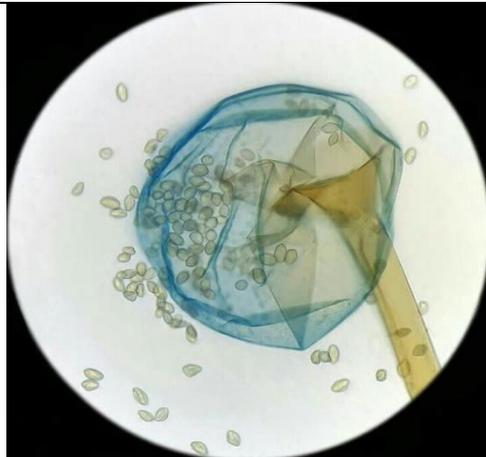
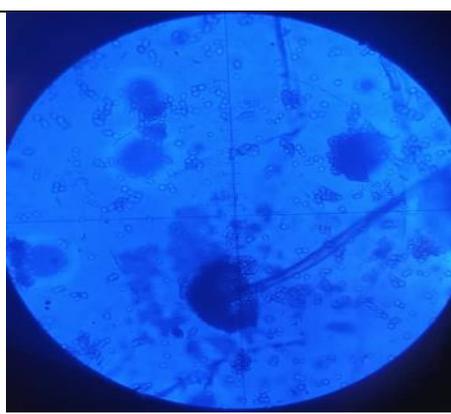
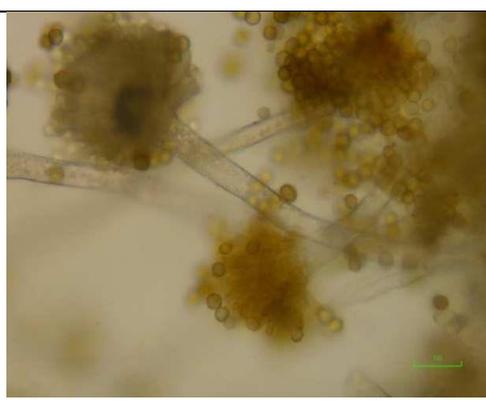
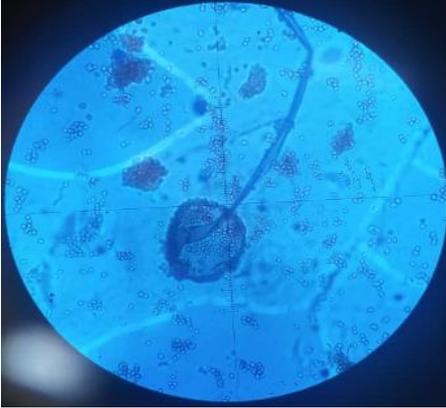
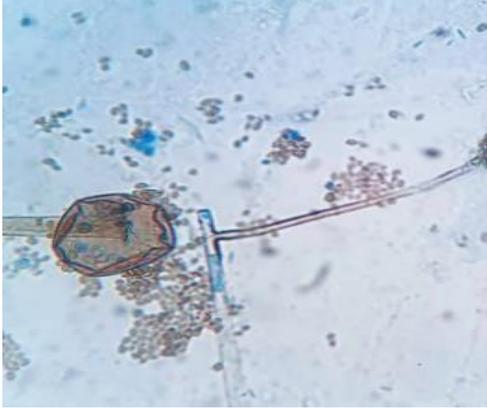
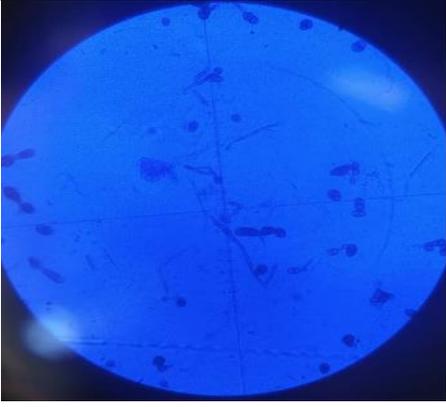
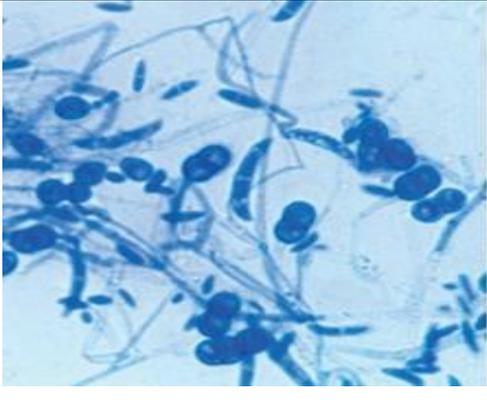
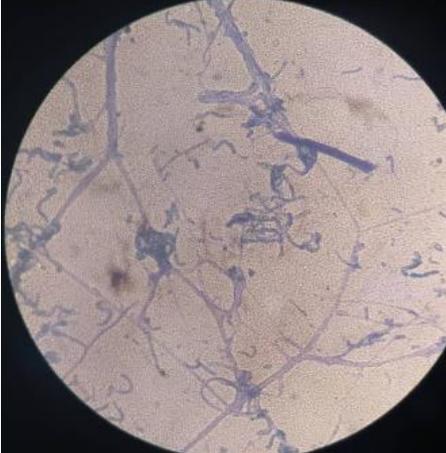
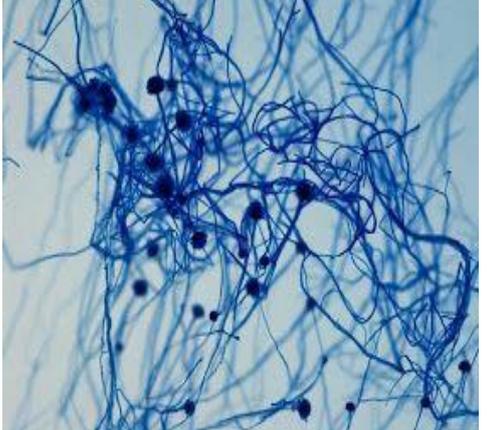
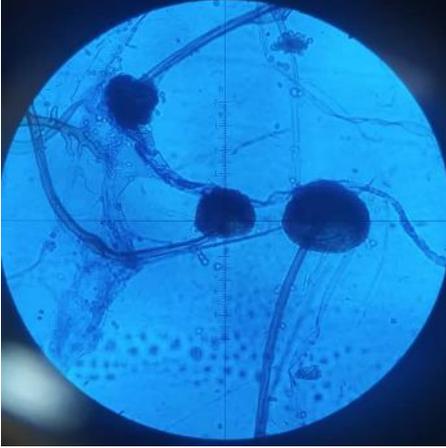
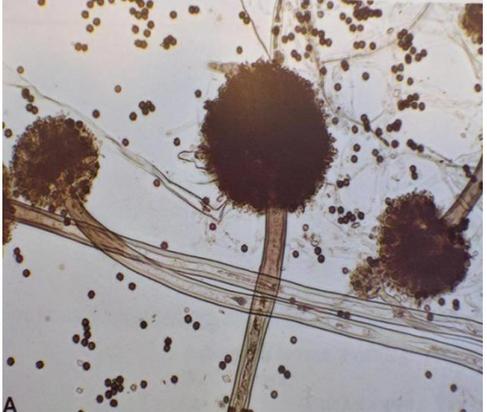
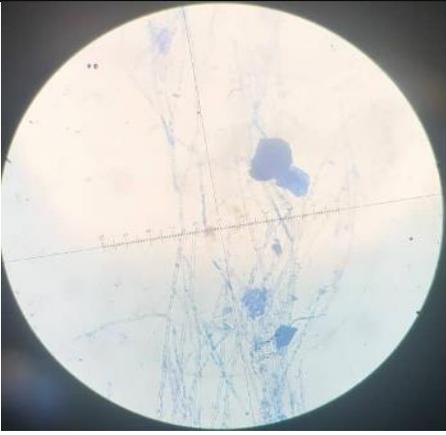
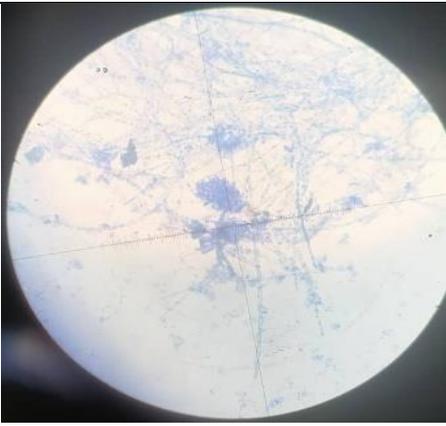
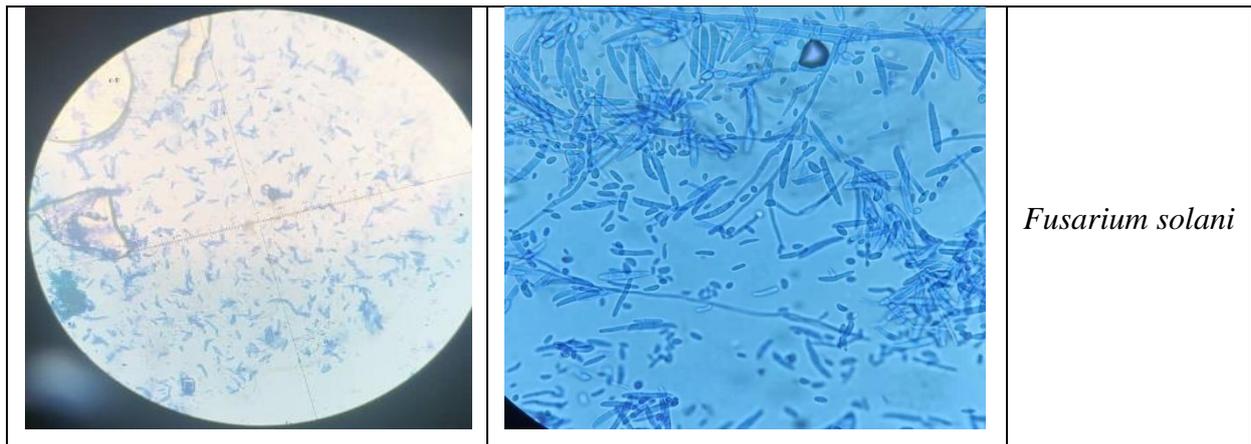
		<p><i>Alternaria sp.</i></p>
---	--	------------------------------

Tableau 28: Caractères microscopiques des souches isolées des grains de blé par la méthode A

Aspect microscopique obtenu (nos résultats)	Photo microscopique de référence	Genre identifié
		<p><i>Rhizopus sp.1.</i></p>
		<p><i>Aspergillus tamarii.</i></p>

		<i>Rhizopus sp</i>
		<i>Fusarium sp</i>
		<i>Trichoderma sp</i>
		<i>Aspergillus sp.</i>

		<p><i>Rhizopus + Mucor</i></p>
		<p><i>Aspergillus niger</i></p>
		<p><i>Aspergillus sp</i></p>
		<p><i>Penicillium sp.</i></p>



2.2.3. Reconnaissance des genres et des espèces

Selon **Barnett et Hunter (1972)** et en se basant sur l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques des souches fongiques isolées, nous avons identifié plusieurs genres.

Les principaux genres fongiques identifiés au cours de cette étude sont *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Ulocladium* et *Trichoderma*. Ils ont été identifiés selon les caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et de la texture de la colonie, sur le milieu d'isolement (PDA), ainsi que les structures micromorphologiques permet généralement de faire la distinction entre les principaux genres.

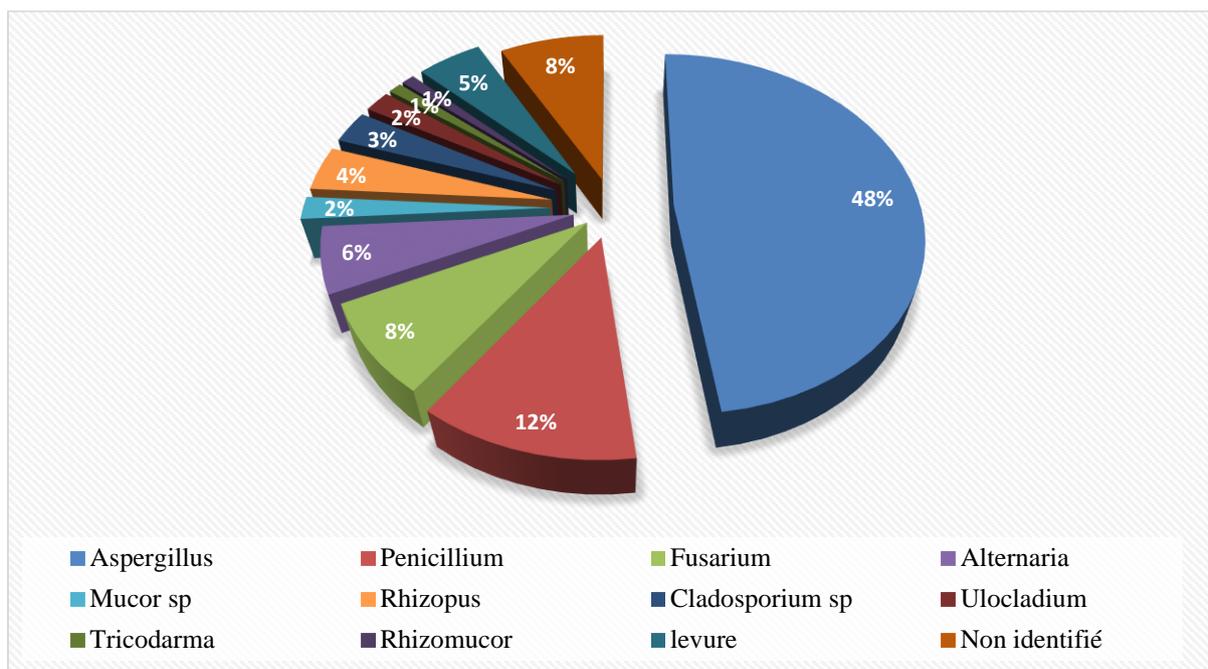


Figure 32: Répartition fongique globale.

Le genre *Aspergillus*: les caractères morphologiques de ce genre ont déjà été décrits dans la partie bibliographique consacrée aux généralités sur les *Aspergillus*.

Le genre *Penicillium*: les colonies sont généralement de couleur bleu-vert ou plus rarement blanc. Les spores, extrêmement nombreuses, sont produites en chaînes par des phialides groupées en pinceau (d'où le nom de *Penicillium*). Entre le stipe et les phialides peuvent s'intercaler des cellules intermédiaires qui donnent lieu à des formes complexes. En général, on distingue les *Penicillium* monoverticillés dont les phialides sont portées directement sur le stipe, les biverticillés dont les phialides sont portées sur une rangée (verticille) de cellules intermédiaires (métules) et les terverticillés avec un troisième niveau de ramification. Ces caractères servent à la différenciation des groupes et des espèces. Les conidies sont disposées en de longues chaînes et sont globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres.

Le genre *Fusarium*: les cultures de ce genre sont d'aspects et de couleurs variés. La reconnaissance du genre *Fusarium* est surtout basée sur l'observation des conidies de forme très caractéristiques, les microconidies et les macroconidies portées par des phialides. Les espèces de *Fusarium spp*, isolées au cours de cette étude développent sur milieu PDA des colonies de couleur blanc-rosé, blanc-beige à mauve pâle et un revers brun jaune à brun pourpre. Les colonies sont floconneuses ou rases et d'aspect muqueux ou velouté selon les isolats. La plupart des isolats produisent des microconidies et des macroconidies et chez certains des chlamydospores ont été observées.

Le genre *Alternaria*: les cultures d'*Alternaria* se présentent sous forme de colonies grises à noirâtres et veloutées. Les colonies sont de croissance rapide. La texture est duveteuse à laineuse. A la loupe, on observe des chaînes ramifiées de spores allongées à pyriformes. Les conidiophores, foncées, sont simples ou ramifiés, produisant à leurs extrémités des chaînes de conidies. Ces dernières sont brunes, pluricellulaires, divisées par des cloisons transversales, longitudinales ou obliques, très caractéristiques.

Le genre *Mucor*: il est caractérisé par des colonies à croissance très rapide. Le thalle aérien, de 2 à 20 mm de hauteur, est au début blanc, devenant brun gris en vieillissant. Les filaments larges peu ou pas septés. Ce genre se caractérise par la présence de sporangiophores longs ou courts, ramifiés ou non et portant des sporocystes arrondis à columelles elliptiques ou rondes.

Rhizomucor : Les colonies à croissances très rapide, ont une texture cotonneuse. De couleur brun pale au départ, deviennent brun sombre en vieillissant, le verso est incolore. Ces caractères microscopique sont: un rhizoïde court et des sporocystophores à ramification subterminale.

Les *Rhizomucor* diffèrent des *Mucor* par la présence de rhizoïdes, et par leur thermophile (température maximale 54°C) (**Chabasse et al., 2002**).

Rhizopus sp : Les colonies à croissances très rapide, ont une texture cotonneuse. Les colonies sont blanches au départ, deviennent grises et foncées en vieillissant. Le genre comprend une quinzaine d'espèces (**Botton et al., 1990**) .

Cladosporium : Ce genre est mondialement répandu. Il comprend plus de 30 espèces parasites de végétaux ou saprophytes très communs (**Botton et al., 1990**) .

Ulocladium sp : L'observation macroscopique révèle des colonies noires et semi bombées. Son caractère microscopique présente des hyphes septés et des conidiophores bruns érigés, simples ou ramifiés.

Thricodarma sp : Cet isolat se caractérise par un thalle à croissance rapide, d'abord blanc puis vert olive. Cependant, l'aspect microscopique montre des conidiophores très ramifiés avec des phialides ampuliformes et des conidies sub-globuleuses lisses et vertes. Les chlamydospores sont globuleuses.

Les principaux caractères d'identification d'*Aspergillus flavus*, d'*Aspergillus fumigatus* et d'*Aspergillus niger* ont été décrits dans le chapitre consacré au genre *Aspergillus*. Les espèces non identifiées sont désignées par *Aspergillus spp.*

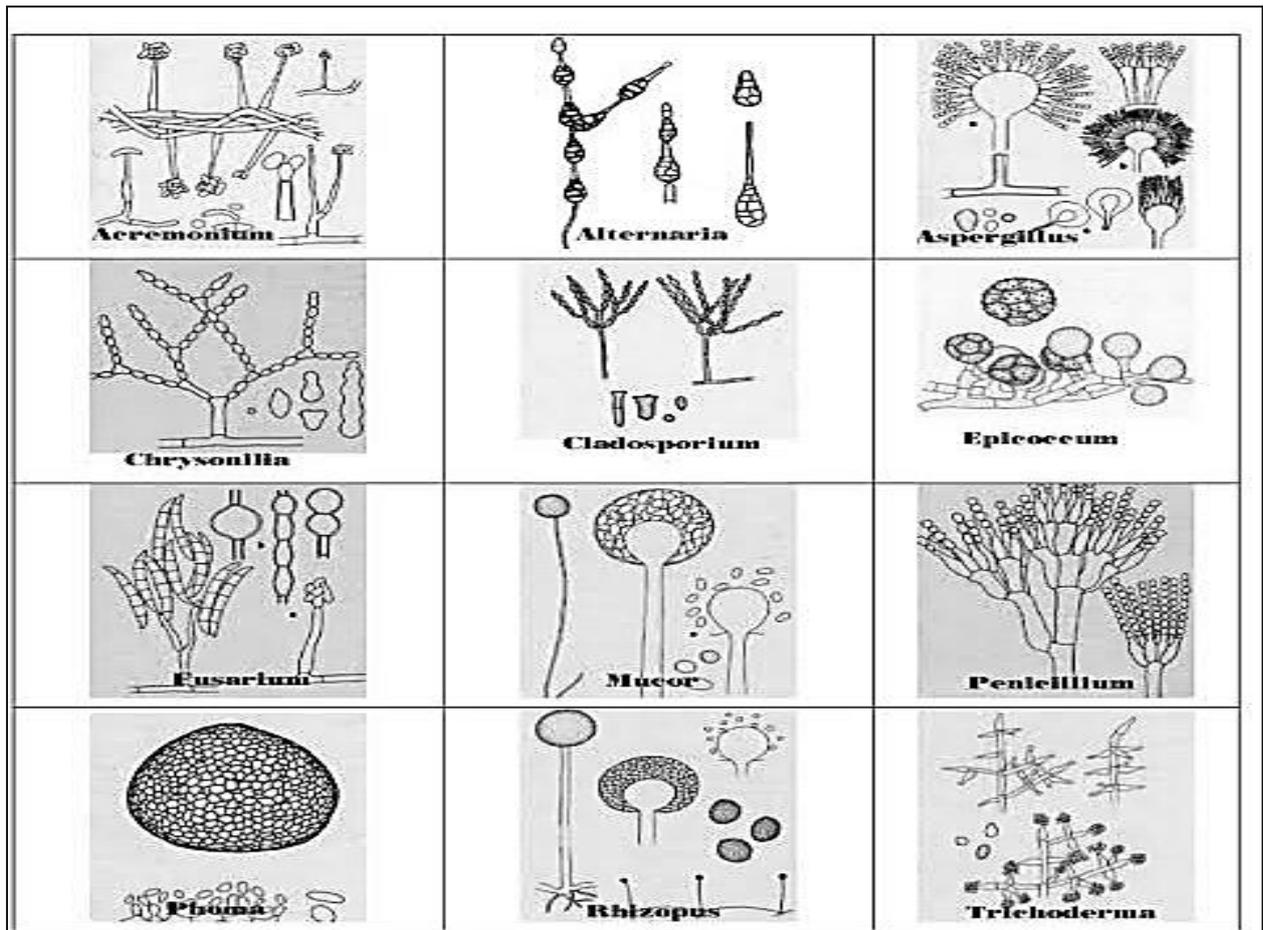
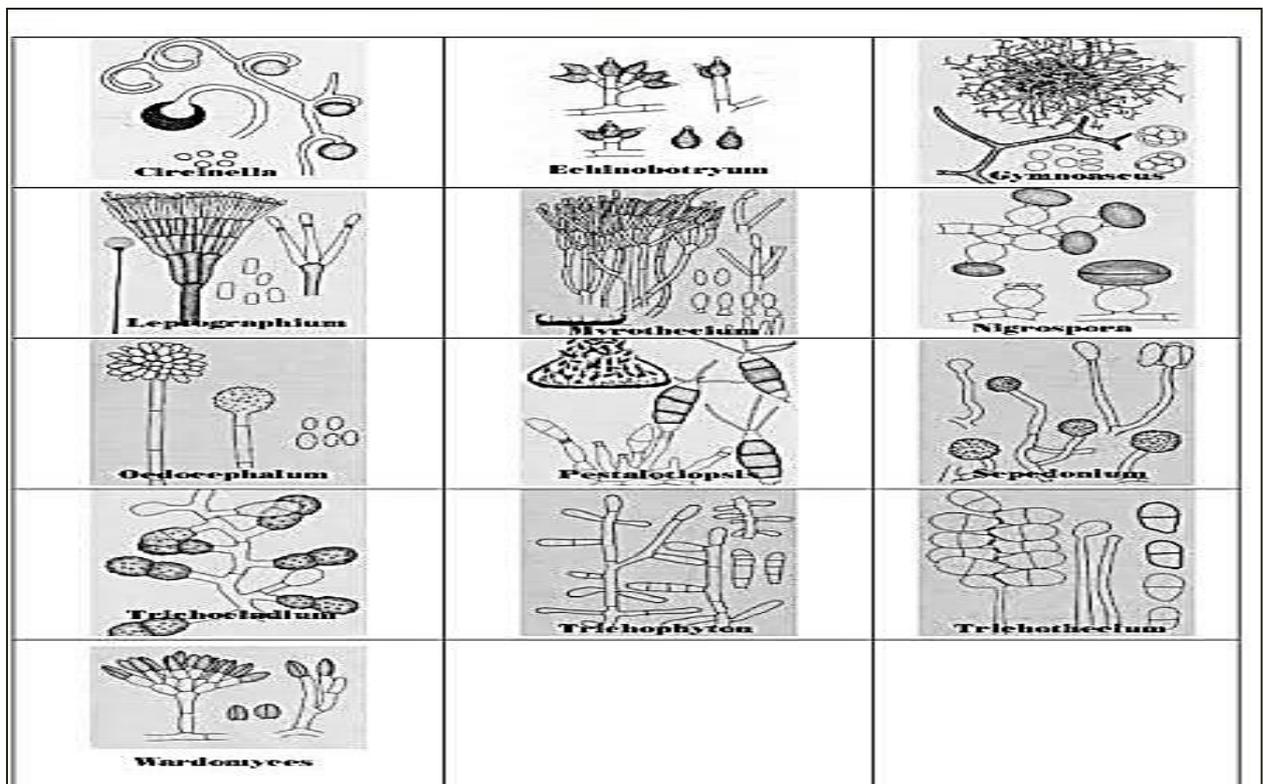
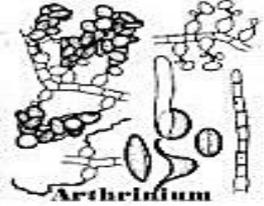
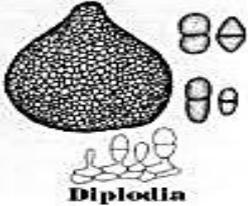
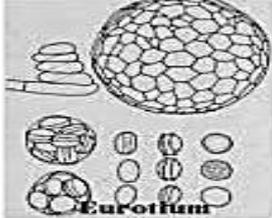
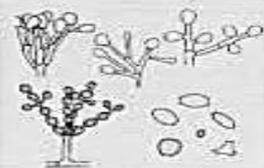
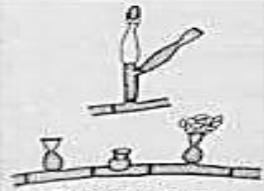
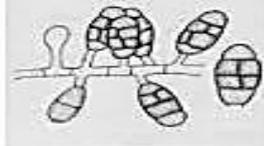
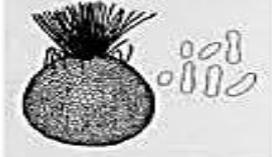
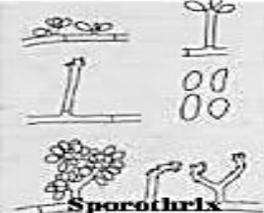
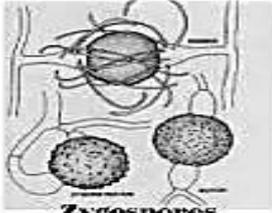


Figure 33: Structures micromorphologiques des moisissures photo de référence (Riba, 2008).



 <p>Arthrospium</p>	 <p>Diplodia</p>	 <p>Eurotium</p>
 <p>Geomyces</p>	 <p>Microsphaeropsis</p>	 <p>Oidiodendron</p>
 <p>Phialophora</p>	 <p>Pithomyces</p>	 <p>Pyrenochaeta</p>
 <p>Sporothrix</p>	 <p>Tabernaemontana</p>	 <p>Zygosporangium</p>

Discussion

Les céréales sont considérées comme des matières principales pour la consommation humaine. Elles forment aussi un milieu adéquat pour le développement des microorganismes, surtout les moisissures et principalement: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Geotrichum*, surtout lorsqu'elles sont gardées dans des mauvaises conditions de stockage (Agris, 1994).

Dans les pays en voie de développement comme l'Algérie on a un problème de conservation où on voit un manque de surveillance est remarqué surtout que le stockage est assurée par les coopératives des céréales et de légumes Secs (CCLS) qui ont un faible système d'aération donc les risques liés à la contamination par les champignons toxigènes sera plus élevé.

L'altération des céréales stockés a fait l'objet de nombreuses études ayant mis en évidence que la contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des grains de céréales expliquée par des variations dans les paramètres technologiques du grain et par les pertes considérables (Atalla *et al.*, 2003 ; Molinie *et al.*, 2005).

La contamination des grains par les différentes espèces fongiques peut les rendre non consommables. Et aussi la gravité de la présence des champignons se manifeste par la sécrétion des mycotoxines dangereuses, qui provoquent des maladies périlleuses pour l'homme, ou de nombreux champignons de stockage produisent des substances toxiques, par conséquent, elles sont considérées comme d'importants problèmes de pollution alimentaire et leur apparition sur les grains lors de stockage est considérée comme un véritable signal de la détérioration de la qualité des graines.

L'environnement a une grande influence sur les grains, même s'elles sont de bonne qualité originale, surtout pour ce qui concerne l'humidité et la température.

Lors de la contamination du blé, les paramètres régulant la croissance fongique et permettant la production de toxines sont nombreux. On cite principalement la charge initiale en mycoflore, la présence de grains brisés, le taux d'humidité relative élevé, le pH et la température de stockage des grains (Zia-Ur-Rahman, 2006).

Taux d'humidité et pH des échantillons

En général, le pH des produits céréaliers est proche de la neutralité. Cela peut être dû à l'effet tampon exercé par les protéines. Les résultats attribués à la qualité physico-chimique indiquent que les prélèvements analysés du blé dur et tendre renferment un pH neutre à

légèrement acide. Selon **Bourgeois (1990)** et **Duron (1999)**, les champignons peuvent se développer à des pH compris entre 3 et 8 avec un optimum de croissance compris entre 5 et 6, de ce fait, nos échantillons constituent un milieu favorable pour le développement des champignons. Certaines moisissures tolèrent ce pendant des pH beaucoup plus acides ou très alcalins (**Bourgeois, 1990**).

Selon **Poisson et Cahagnier (1982)** et **Richard Molard (1991)**, les grains de blé et leurs dérivés constituent un milieu riche qui influe sur la croissance des moisissures et la synthèse des mycotoxines.

L'humidité relative est un paramètre d'une très grande importance qui conditionne le démarrage des manifestations microbiologiques. Elle explique les différents comportements grains microflores, reflète les conditions de stockage et nous permet de connaître, enfin, la quantité d'eau présente dans l'échantillon.

L'humidité relative qui est la quantité d'eau libre disponible dans l'échantillon est responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique de l'aliment notamment mycologique (**Belli et al., 2004**). Notant que beaucoup de produits pauvres en eau libre non altérables par les bactéries peuvent donc être altérés par les champignons (**Duron, 1999**).

L'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures ; non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation, mais plus particulièrement sur la germination des spores. Cependant, la majorité des moisissures préfèrent une activité de l'eau (*aw*) plus élevée, de 0,80 à 0,95 (**Bourgeois, 1990**).

Selon **Moussaoui (1994)**, et sachant que l'optimum de l'humidité de la croissance des moisissures est compris entre 11% et 13%, cela est observé pour tous les échantillons analysés (**Boulal et al., 2011**).

Les résultats sur le taux d'humidité ont montré que le taux d'humidité le plus élevé est enregistré sur l'échantillon de blé dur stocké dans les silos au niveau de CCLS de Guelma (échantillon (B3) 15,50%, on trouve que l'échantillon de blé tendre (échantillon (B1)) au taux d'humidité bas 11,57%. Ces valeurs restent toujours inférieures aux normes algériennes (14,5%).

Le taux d'humidité relative enregistré pour le blé dur (B2) 12,20% peut être dû au transport des échantillons et les conditions climatiques de la région de Chelghoum l'aïd (**Duron, 1999**).

L'humidité de la graine est de deux types, humidité entrant dans la composition des cellules de la graine, et eau libre qui se propage sur la surface, il y'a une relation simple entre la teneur en eau de la graine et entre l'humidité relative dans l'atmosphère environnant, il se produit entre les deux un état d'équilibre.

Ce que nous pouvons indiquer pour les échantillons stockés dans de silo qui ne connaissent pas de renouvellement d'air, et que l'humidité relative dans l'air du silo est très élevée; alors la graine absorbe l'humidité de l'atmosphère c'est ce qui est constaté dans l'échantillon de blé dur (B3) et le contraire pour l'échantillon de blé dur (B2) transporté (qui nous ont été fournis par CCLSD de Chelghoum l'aïd), la graine perd énormément de son humidité :

Comme nous avons trouvé dans le silo un taux d'humidité relative de 55-57%. Le taux d'humidité de la graine fut de 15,50% en considérant le taux de 55-57% comme humidité relative élevée et proche du taux d'humidité bas aidant à la croissance de champignons de stockage (65%).

Pour cela, on ne peut pas dire qu'il y'a un degré d'humidité sur pour la graine d'un côté de stockage, mais il y'a des degrés d'humidité qui permettent de stocker les grains, sans produire, aucun type de pourrissement et ceci est lié en grande partie à la température du silo. Or si la température augmente, il faut que le taux d'humidité de la graine diminue (**Becharah, 1994**).

L'augmentation de la température dans le silo à blé dur (B3) et le non renouvellement de l'air a conduit à l'augmentation de taux d'humidité des grains avec 15,50% c'est un taux qui produit l'apparition de champignons.

Nous pouvons interpréter cette augmentation de taux d'humidité des échantillons par :

- La récolte avant maturation ou après des jours pluvieux ou à forte humidité.
- L'exposition des grains à l'eau de pluie ou au brouillard ou la rosée.
- Transport des grains d'une région sèche à une région humide et le contraire.
- Hétérogénéité des grains c'est-à-dire le mélange de types de grains précoces et d'autre tardive c'est que l'on a constaté lors du prélèvement des échantillons.

Les silos à air non renouvelé sont caractérisés par l'humidité élevée qui engendre l'augmentation soudaine de température, ce qui est connu sous le terme; réchauffement des grains. Ce phénomène se produit dans les grains à taux d'humidité élevé pour les grains secs. Ce phénomène se produit par deux facteurs. Les opérations d'oxydations dues à la respiration de grains vus que n'importe quel facteur activant la respiration des grains augmentent leur

température et le premier facteur est l'augmentation du taux d'humidité de la graine. Et a présence des germes fongiques sur la surface externe des grains (**Agrios, 1994**), en tant qu'indication importante, l'augmentation du taux d'humidité avant le stockage augmente le taux d'humidité lors du stockage ce qui cause la croissance de champignons latentes dans les grains, en plus de leur température élevée ce qui est observé au niveau des échantillons étudiés. Vu que le champignon secrète lors de sa croissance sur la graine, des enzymes qu'influencent sur les composants du grain, les carbohydrates, les protéines les lipides et cause aussi l'augmentation de l'acidité (**Agrios, 1994**).

D'un autre coté, les grains de blé peuvent être conservés intacts et pour une durée considérable (4-9 mois) et ce, à condition que le taux d'humidité soit bas ou moyen et ceci ne se fait qu'à travers le dessèchement vu que l'on peut diminuer son taux d'humidité de 3%, 5%, avant le stockage et ainsi aucun champignon affectant dans le champ peut continuer à croître et à causer des maladies lors ou après que le blé soit humidifié à nouveau.

Les températures élevées dans la wilaya de Guelma généralement sont pertinentes pour le blé infectées à taux d'humidité élevé. Au fur et à mesure que le taux d'humidité dépasse 14% dans le blé, l'activité de champignons augmente à son tour.

Discussion des résultats d'isolement et d'identification

Sur la base des résultats obtenus dans le présent travail qui a été porté à l'étude de la flore fongique de différentes variétés de blé (dure et tendre) et de caractériser les espèces responsables à la production des mycotoxines dans le blé, les analyses mycologiques des échantillons réalisés au moyen de deux milieux de culture différents.

L'étude de la qualité microbiologique du blé (dur et tendre) a révélé un taux de contamination totale diffère d'une variété à une autre. Le blé tendre importé présente un taux considérablement élevé sur le milieu organique et minéral par rapport au blé tendre local, ce qui était rapporté dans les travaux de **Tahani et al (2008)**.

La différence de contamination fongique entre les deux variétés de blé peut être expliquée par la composition biochimique différente du blé et les différentes variétés de chaque région. Cette différence est influencée parfois par les conditions climatiques, les conditions de stockage (humidité, température et système de ventilation) et l'installation d'une charge fongique importante, ce qui peut entraîner une modification qualitative et quantitative de la mycoflore (**Le Bars et Le Bars, 1987**). **Miller (2002)**, **Wilson et al.,**

(2002), rapportent que la contamination fongique des céréales au champ ou pendant le stockage est directement lié aux conditions hydrothermiques.

De plus, la variété stockée dans les silos présente un taux d'humidité élevé et selon **Benmansour-Brixi (2005)**, les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant 10 à 18 % d'humidité, avec un optimum de croissance compris entre 11 et 13 %. **Multon (1982)**, **Berthier et Valla (1998)**, indiquent que ce développement fongique est favorisé par la relation entre la température et l'humidité.

La nature de la microflore dans les graines dépend des conditions environnementales, de récolte, de stockage. Et de la manière d'analyse de l'échantillon (**Bennoudia, 2016**). Dans notre cas, on a pris les résultats des analyses de différentes méthodes ces résultats sont mentionnés dans les tableaux des caractères macroscopiques et microscopique des souches isolées de blé dur et tendre. La méthode directe d'ulster (A) c'est une méthode de mise en évidence des moisissures de surface et de profondeur des grains étudiée où on observe une très forte contamination fongique dans les boîtes de cette méthode. Méthode d'Ulster modifiée (B) une méthode de mise en évidence des moisissures de profondeur des grains étudiée où on observe une faible contamination fongique dans les boîtes de cette méthode par à port au boîte d'autres méthodes. Méthodes indirecte (méthodes de dilution) une méthode de mise en évidence des moisissures endogène et superficielle où on observe une forte contamination fongique dans les boîtes de cette méthode. Les résultats de notre travail montré une forte contamination par les moisissures de produits fini (produits commercial envoyé à la consommation) et de matière première analysé des différents échantillons de la région de Guelma et la même chose pour la région de Chelghoum el aid.

Donc, la mycoflore externe est plus abondante que la mycoflore interne, ces résultats sont confirmés par **Weidenborner (2001)** et **Jianqiang et al 1999** qui à montré une différence assez nette entre le taux de contamination des grains non désinfectés mycoflore externe et celui des grains désinfectés (mycoflore interne).

Les milieux PDA et Sabouraud nous ont donné une croissance variable, cela est peut être expliqué par la différence dans la composition des deux milieux de cultures et le choix des substrats préférés par les souches fongiques, tel que rapporté par l'organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes (**OEPP, 2003**), que le milieu PDA est préparé à base d'élément organique et le milieu Sabouraud est préparé à base d'élément minéral.

En vérité le nombre important des isolats purs des champignons cultivés sur le milieu (PDA), explique que le (PDA) est un milieu adéquat par sa convenance à la plupart des champignons, en plus de l'identification de son espèce précise d'une façon claire, la répartition et la propagation des spores.

La flore fongique mise en évidence dans nos différents lots analysés est comparable à celle identifiées sur les grains de blé depuis des années par plusieurs chercheurs notamment (**Levi et al., 1974; Tsubouchi et al, 1984; Micco et al.,1989;. Studer-Rohr et al., 1995et Pitt et Hocking., 2009**) c'est une mycoflore diversifiée que nous avons classée en trois catégories: mycoflore pathogène, mycoflore intermédiaire et mycoflore de stockage, en accord avec les résultats de **Fayret et al (1996)** qui montrent que dans tous les lots analysés, les agents saprophytes et intermédiaire sont prédominant par rapports aux agents pathogènes **Fayret et al (1996)** expliquent ce pourcentage élevé des saprophytes par leur compétition trophique vis-à-vis des pathogènes qui défavorisent, voir empêchent leur développement.

La flore fongique totale du blé (dur et tendre) stocké est constituée essentiellement de moisissures filamenteuses, très sporulantes, dotées d'un grand pouvoir de dissémination dont les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus rencontrés.

C'est genres de moisissures que nous avons pu identifier sont des contaminants des denrées alimentaires maltraitées mais surtout mal conservées, ils sont considérés comme contaminants de stockage des céréales et leurs dérivés (**Multon, 1982**).

Notre décompte des 10 genres de champignons: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus* ; *Mucor* ; *Cladosporium* ; *Trichoderma* ; *Ulocladium* et *Rhizomucor* montre la domination du genre *Aspergillus* ; la domination apparaît avec la répartition des tous suivants descendant.

Aspergillus 48,03% ; *Penicillium*11,97% ; *Fusarium*8% ; *Alternaria*6% ; *Mucor*sp2% ; *Rhizopus* 4% ; *Cladosporium*sp 3% ; *Ulocladium*2% ; *Thricodarma*1% ; *Rhizomucor*1% ; *levure*5% ; *Nonidentifié* 8%.

Le genre de champignon le plus répandu internement et exterenement est l'*Aspergillus*, et ceci est compatible avec une étude faite précédemment à l'université de Blida en 2005/2006 (**Bendjeklil et Ghribi, 2006**).

La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminant des céréales a été reportée dans plusieurs travaux (**Riba et al., 2005 ; Le Bars et Le Bars, 1987**). Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage (**Withlow et Hagler, 2001**).

Les genres les moins répandus sont *Alternaria* et *Rhizopus*, ces dernières sont obtenues au niveau des échantillons étudiés et avec des taux moindre.

Les espèces d'*Aspergillus* rencontrées dans cette étude sont *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. Il a été rapporté dans la littérature que les espèces appartenant au genre *Aspergillus* à grande dominance sont *Aspergillus fumigatus* suivi d'*Aspergillus flavus*. Cette fréquence de contamination importante est accompagnée aussi par une production de mycotoxines. Si cette présence de flore fongique est surprenante, ce n'est pas la première fois qu'une telle contamination est observée. En effet, des enquêtes récentes menées en Italie ont démontré la présence de flore productrice de mycotoxine dans les certaines matières premières et aliments (**Pietri et al., 2004**).

La prédominance des champignons de stockage tel que *Aspergillus*, *Penicillium* est due au fait que les échantillons ne sont pas fraîchement récoltés

Les autres souches isolées des échantillons analysés appartiennent aux genres *Rhizopus*, *Alternaria* et *Fusarium* sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et dans le sol (**Withlow et Hagler, 2001**). La forte fréquence du genre *Alternaria* dans les trois échantillons (blé tender, blé dur de Bouchegouf et semoule de Héliopolis) semble être due à l'humidité élevée de cet échantillon (**Weindenbörner, 2000**).

Les genres *Cladosporium* et *Ulocladium* obtenus dans cette étude ont été également isolés à partir du blé dur dans la localité de Guelma. Les genres isolés dans cette étude, retrouvés sur les deux variétés de blé dur et tendre appartiennent à la flore de champ ou à la flore intermédiaire et la flore de stockage.

Le genre *Fusarium* est retrouvé sur plusieurs variété de blé analysé, ce qui confirme ce résultat les travaux de **Curtui et al., (1998)**. Ce résultat est aussi en accord avec ceux obtenus dans les pays du nord de l'Europe comme le nord de la France, l'Allemagne, la Norvège, la Belgique, la Pologne ou les Pays-Bas (**Isebaert et al., 2005 ; Krysinska-Traczyk et al., 2007 ; Schollenberger et al., 2006**).

Le taux de l'altération extrême reste une caractéristique de *Aspergillus* et *Penicillium*, et ainsi on peut dire que l'altération extrême est le résultat de l'activité des genres de stockage, et ceci est totalement compatible avec ce qu'on fait (**El-Shaeieb et al., 1984**) lorsqu'il a trouvé que les espèces des champignons vénéneux appartenaient aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*.

Les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium* sont considérées comme des moisissures de stockage (**Christensen et al., 1977**). Leur développement nécessite une humidité élevée du grain et un stockage de longue durée. Cependant, comme l'ont reporté **Pitt et Miscamble, (1995)**, une très forte humidité peut parfois défavoriser la croissance des *Penicillium* en faveur de celle des *Aspergillus* qui les dominent. La dominance du genre *Aspergillus* dans les denrées stockées dans les régions à climat chaud est très connue (**Pitt et Hocking, 1997**). *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation (**Gourama et Bullerman, 1995**) et il est par conséquent très répandu dans la nature et tout particulièrement dans les régions à climat chaud (**Mantle, 2002 ; Hocking et Pitt, 2003**).

Les *Aspergillus* et les *Penicillium* sont responsables de moisissures nuisibles au stockage, altèrent la qualité des grains en produisant éventuellement les mycotoxines telles que les aflatoxines, les ochratoxines, l'acide penicillique, la citrinine, la patuline,...etc. Nos résultats confirment le statut de flore de « stockage » de ces deux genres qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage.

Pholfleszkowicz et Monilié (2003) révèlent qu'il existe une corrélation significative entre la contamination par les moisissures et les conditions climatique, d'après (**Cahagnier et Richard-Molard, 1998**) l'humidité et la température sont les principaux facteurs physiques ayant une influence considérable sur la croissance et la production des mycotoxines.

Ces différences entre les résultats obtenus au cours de notre étude et ceux mentionnés par d'autres chercheurs peuvent être dues à des différences de la structure des milieux et de la disponibilité des nutriments.

On appelle un champignon vénéneux, tout champignon possédant dans sa souche des toxines en état de latence, et avec la présentation du champignon dans les graines, amplex aux conditions de stockage comme la température l'augmentation du taux d'humidité.

Le champignon commence son activité enzymatique à travers des processus de métabolismes secondaires jusqu'à la synthèse des toxines avec les quelles il peut pourrir les graines de stockage (**Agrios, 1994 ; Reymond *et al.*, 1986**).

La plupart des champignons dans les régions sèches se caractérisent par l'éloignement de la température de croissance de celle de la production de la toxine, ce qu'a noté (**Hill *et al.*, 1985**).

Nos résultats confirment le statut de flore de « stockage » de ces deux genres qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage. Par ailleurs, nous avons pu observer au cours de notre étude que le stockage dans les silos peut influencer considérablement la composition de la flore fongique des grains de blé dans le blé stocké plus de 6 mois. Les graines après récolte et au cours de stockage jusqu'au produits fini peuvent être produits les mycotoxines (**Pfohl-Leszkowicz 1999**) cette production influencé par une large variété de facteurs biotiques (microflore, insectes, acariens et rongeurs) et abiotiques (températures, humidité, activité de l'eau, etc.). La biodisponibilité de l'eau (aw) et la température représentent les deux paramètres les plus importants qui influencent à l'évolution de la flore fongique de grains réputés secs comme le blé (**Botton *et al.*, 1990**).

Hanak *et al.*, 2002 rapportent que les conditions de conservations mal contrôlées, et la durée de stockage ont une grande influence sur le développement de la flore fongique et la contamination en mycotoxine.

Le nombre des genres obtenues dans les échantillons étudiés est de **10** et de là on peut dire que la dégradation des graines des échantillons étudiés, apparaît moindre de loin en comparaison avec les régions humides, mais en contrepartie le taux d'altération et de contamination, sont apparents dans les échantillons analysé.

Nous remarquons dans les échantillons étudiés aussi que le taux de dégradation des graines de blé est plus interne qu'externe. Ces résultats expliquent l'absence de contrôle générale dans le choix des graines pour la culture locale et traditionnelle.

Pour cela nous pouvons relater les propositions suivantes:

- Le choix des graines de bonne qualité pour la culture locale (les germes ne doivent pas contenir des atteintes aux champignons vénéneux).

- L'utilisation du stockage de son bon conditionnement car celle-ci est considérée à moindre coût et plus efficace pour combattre les champignons.
- L'utilisation des insecticides et des fongicides.
- Le bon contrôle et la révision des prescriptions de la qualité pour les graines importées de l'étranger et les graines stockées pour une durée dépassant deux mois, en d'autres régions de l'Algérie, connaissant des écarts de températures et l'humidité relative de l'atmosphère pour la région de Guelma.

Dans l'ensemble, le taux de contamination élevé, ainsi que la biodiversité assez importante constatés dans les différentes variétés du blé (dur et tendre) peuvent être expliqués probablement par la qualité, la durée et les conditions de stockage (**Davis et Diener, 1987**).

Dans l'analyse de la mycoflore, malgré la présence de toute une gamme d'agents fongiques dans tous les lots examinés, la totalité sont indemnes de mycotoxines. Ces données sont en accord avec les conclusions d'observations rapportées par de nombreux auteurs notamment (**Chapeland-Leclerc, 2005 et Pholf-Leszkowicz, 1999**) qui ont montré que la présence d'agent fongiques ne signifie pas nécessairement la production des mycotoxines et que la production de ces dernières est conditionnée par la présence d'un champignon bien spécifique. Ainsi les conditions permettant la toxinogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique (**Pholf-Leszkowicz, 2002**).

Conclusion et perspectives

Conclusion

Ce modeste travail s'ajoute à beaucoup des travaux réalisés en Algérie sur les mycotoxines contaminants les différentes denrées alimentaires Food et Feed, tel que les céréales: blé dure et blé tendre, maïs, ... par **M. Sabaou** (Ecole Normale Supérieure de Kouba), **M. Bouznade** (ENSA El Hararch), **M. Guermouche** (la Fac Central d'Alger), **M. Moussaoui** (Université de Béchar), ... ce qui a confirmé la présence des aflatoxines, les ochratoxines et d'autres mycotoxines en fortes concentrations. Qui a fait augmenter nos contraintes et soucis vis-à-vis de ces métabolites secondaires. Et selon l'étude FAO concernant les réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003, l'Algérie fixe les teneurs maximales tolérées dans les produits d'alimentation humaine pour les: arachides, fruits à coque et les céréales en Afla B1 de 10 µg/kg et en aflatoxines totaux Afla (B1, B2, G1, G2) de 20 µg/kg, et pour les aliments pour bétail juste en Afla B1 de 20 µg/kg. Et cela est jugé comme insuffisant et ne couvre pas la totalité des produits alimentaires importés en Algérie.

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale (**Slama et al., 2005**). Parmi ces céréales, le blé occupe la première place pour la production mondiale.

D'après l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, environ 25% des récoltes mondiales des produits alimentaires sont contaminées par les mycotoxines (**FAO 2004**). De nombreuses denrées d'origine végétales, dont les céréales, les fruits, les épices, les légumes, secs et les fourrages, ainsi que, les aliments issus de ces filières, sont exposés aux contaminations par les mycotoxines (**Azzoune, 2011**).

Les grains de céréales forment un excellent substrat pour les moisissures ou la flore fongique de stockage constitue un facteur important de détérioration et de sécrétion de mycotoxines. Selon l'analyse mycologique des échantillons de blé (dur et tendre), plusieurs souches ont été détectées. L'étude de la mycoflore des grains analysés a montré que le taux de contamination du blé est très élevé.

Selon les analyses mycologiques, et après la purification et l'identification des souches isolées ont donné la possibilité d'identifier 10 genres de moisissures: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Ulocladium*, *Mucor* et *Rhizomucor* ; avec une dominance du genre *Aspergillus* dans les échantillons, suivi de

Penicillium, *Fusarium* et *Alternaria* qui sont peu fréquents et enfin, les genres *Rhizopus* *Cladosporium* qui est le moins fréquent.

Le genre *Aspergillus* représenté par trois espèces (*A.flavus*, *A.niger* et *A.fumigatus*) été retrouvé dans les échantillons analysés avec une fréquence et une abondance élevée. Ces trois espèces ont été révélées productrices de mycotoxines.

La présence des agents fongiques ne signifie pas nécessairement la production des mycotoxines et que la production de ces dernières est conditionnée par les facteurs endogène et exogène. L'absence de champignon responsable de la production d'AFs dans un échantillon s'expliquerait par sa disparition suite à un stress. Les facteurs conduisant à l'imprégnation mycotoxique d'une denrée sont liés non seulement à la souche fongique mais également à l'ensemble des conditions écologiques. Mais il est généralement admis que plus le taux initial de la contamination par des espèces toxigènes est important, plus les risques d'imprégnations toxiques sont élevés.

La consommation du blé contaminé par les mycotoxines, notamment l'aflatoxine B1, pourrait mettre en danger la santé des consommateurs, et même provoquer des dégâts économiques graves.

Les mycotoxines sont la résultante des mauvaises conditions de stockage des grains. Elles sont la cause principale de la dépréciation de la valeur nutritionnelle et commerciale des produits finis. Toutefois, ces mycotoxines constituent de par leur cancérogénicité et leurs propriétés toxicologiques générales un risque majeur pour la santé humaine et animale.

Depuis la récolte jusqu'au son arrivé aux silos de stockage, plusieurs paramètres doivent être pris en compte tels que les moyens de transport, les conditions de stockage, le lieu de stockage, le nettoyage des grains, les traitements effectués au niveau des silos et enfin la durée de stockage. Tous ces paramètres influent considérablement sur le taux des contaminants en particulier les moisissures surtout lorsqu'il s'agit d'un pH qui tend vers l'acidité et d'une humidité relative élevée. La possibilité d'avoir des souches productrices de mycotoxines est toujours présente. Il est donc évident qu'en l'absence de contrôles d'hygiène suffisants, le blé peut être contaminé par les mycotoxines, ce qui représente un danger potentiel de santé publique.

En général, la précaution doit être toujours maintenue et la démarche assurance qualité doit être suspectée lors de toutes les étapes de la production céréalières depuis la récolte

jusqu'au produit fini et surtout au niveau du stockage, la phase la plus sensible et la plus longue favorisant le développement des champignons.

Il serait intéressant, en perspective, d'effectuer les travaux suivants :

- Etendre l'étude sur un grand nombre d'échantillons ;
- Compléter l'identification morphologique et chimique par une identification moléculaire ;
- Etudier d'une manière approfondie l'écologie des champignons toxigènes ;
- Effectuer d'autres études plus approfondies et élargies sur tout le territoire national ;
- Introduire les analyses mycotoxicologiques (AFB1), comme paramètre d'analyse permanent et de routine à l'échelle nationale ;
- Appliquer les techniques moléculaires afin d'identifier d'une manière plus précise les isolats toxigènes ;
- Evaluer le dosage d'AFs, par HPLC dans les échantillons, et de tous les extraits afin de déterminer d'une manière plus précise le potentiel aflatoxinogène des souches isolées ;
- Recherche des techniques plus faciles, avec des résultats plus fiables et précis pour la détection des AFs ;
- Maintenir un bon niveau de contrôle des aliments (céréales, café, maïs, blé, etc.). Surtout lorsque les aliments importent en grandes quantités et contiennent une valeur nutritionnelle élevée ;
- Faire un plan de surveillance et contrôle orienté, en ciblant par exemple une région suivie sur plusieurs années, permettra de surveiller l'évolution des teneurs en aflatoxines dans les matières premières végétales en fonction des conditions climatiques ; surtout les conditions climatiques sont favorables aux contaminations par les moisissures (au champ ou au stockage) ;
- Réalisation d'une étude toxicologique avant l'application des extraits au niveau des silos de stockage.
- Nous appelons à une réflexion sérieuse et urgente sur l'élaboration de normes algériennes relatives à la contamination par les mycotoxines.
- Enfin il est indispensable d'élargir l'étude sur d'autres matrices alimentaires et d'autres régions d'Algérie afin de disposer d'avantage de renseignements sur ce type de contamination.

En vue d'une lutte biologique contre les champignons toxigènes, il serait intéressant de:

- Etudier l'influence de la compétition ou la synergie entre les champignons qui partagent les mêmes niches écologiques, notamment le genre *Aspergillus*, sur la production des mycotoxines ;
- Rechercher des champignons qui peuvent se nourrir de mycotoxines ;
- Sélectionner génétiquement des plantes résistantes à l'invasion de ces mycotoxines.

A titre préventif, il faut prendre en compte certains conseils pour réduire les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation :

- Vente des aliments comme le blé tendre dans des bacs opaques et qui se ferment hermétiquement cette technique réduit le contact direct entre les épices et l'humidité de l'air, ce qui évite la contamination par les mycotoxines.
- Il est impératif de veiller au respect de règles d'hygiène telles les conditions de récolte, d'emballage, d'entreposage, de stockage et du suivi tout au long de la chaîne alimentaire. A cet effet, des laboratoires spécialisés doivent être mis en place sur tout le territoire du pays.
- Puisque peu de traitements permettent de décontaminer les aliments, il est fortement recommandé de multiplier les contrôles microbiologiques et toxicologiques des denrées alimentaires susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines.
- Recommander l'établissement d'une réglementation fixant la quantité maximale des mycotoxines tolérées dans chaque produit alimentaire locale et importé, ainsi que la sensibilisation de la population algérienne sur le danger de ces mycotoxines.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. et Cabanes, F.J. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, **86(1)**, 33–49.

Adams Martin, R., et Moss Maurice, O.,(2008). *Food Microbiology* (3e ed., Vol. 429). RSC Publishing. The Royale Society of Chemistry.

Afnor, S., (1986). Céréales et produit céréaliers. Recueil de normes françaises, 2emeEd, Lavoisier TEC et DOC, Paris, p: 250-263.

Afnor, (2003). L'association française de normalisation. Guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application de l'HACCP poissons fumés et/ou salé et/ou marinés.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), (2006). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, 181p.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments),(2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final. Maisons-Alfort.308p.

Agrios, G.N.,(1994). *Plant pathology*. 5ème edition. Academy Press. New York. p 60-75.

Aidani, H., (2015) .Effet des attaques de Capucin des grains (*Rhizopertha dominica*) sur les céréales stockées « Estimation sur la perte pondérale et le pouvoir germinatif Cas de blé dur dans la région de Tlemcen ». Mémoire de master en Agronomie Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen : 15p.

Al-Hilli,A.L., Smith,J.E., (1979). Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *FEMS Microbiol. Lett*, **6(2)**, 367-370.

Amoura, A., Baz, S., (2014). Identification des souches fongiques productrices des protéases, isolées à partir de source chaude. Mémoire de Master : Microbiologie. Université Constantine 1. Constantine.67p.

Andersen, B., Kroger, E., et Roberts, R. G., (2002).Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Europe PMC*, 182.

Anjorin, S., Makun, H., et Ihenacho, H., (2008). Effects of *Lippia multiflora* leaf extract

and *Aspergillus flavus* on germination and vigour of *Sorghum bicolor* (Moench). International Journal of Tropical Agriculture and Food Systems, 2(2).

A.O.A.C, (1990). 986.22. Aflatoxins in peanuts and peanuts products- CB method Food and Drug Laboratories- Canada- Best food method.

Arora, R.G., Frolen, et Nilsson, A., (1981). Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. Acta Vet Scand 22(3-4), 638-641.

Asao, T., Büchi, G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., et Wogan, G.N., (1963). Aflatoxins B and G. Journal of American Chemical Society. 85-1706.

Asma, N., Louhichi B., (2016). Effet du stockage sur la vigueur et la viabilité des semences de deux variétés de blé dur (*Triticum durum*, Desf) Rev. Sci. Technol., Synthèse 32: 22 -29.

Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Ramos, A.J., Marín, S., 2012. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. Int. J. Food Microbiol. 156(1): 60-67

Atalla, M.M., Mohamed-Hassanein, N., Atef-Elbeih, A. et Yoysef, A., (2003). Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergillus* in relation to different relative humidity and storage periods. Food Nahrung 47(1), 6-10.

Atoui, A.,(2006). Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: étude moléculaire et physiologique. Thèse de doctorat d'université : Microbiologie et biocatalyse industrielles. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 245p.

B

Ba, R., Monteiro, N. M. F., Koudjega, H., Adjagbo, C., Kohoude, J., Djinadou Igue, F., Gbaguidi, F., Mensah, G. A., et Baba Moussa, L., (2015). Synthèse bibliographique sur l'utilisation de la scopolétine pour la réduction des aflatoxines du maïs en stock au Bénin. Ann. Sci. Agronom, 201-211.

Badillet, G., Brieve, C., et Gheho, E., (1987). Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique. Ed. Varia, Paris. 228p.

Bajji, M., (1999). Étude des mécanismes de résistance au stress hydrique chez le blé dur : caractérisation de cultivars différant par leurs niveaux de résistance à la sécheresse et de variantes somaclonales sélectionnées In vitro. Thèse de doctorat. Univ. Louvain.

- Bannette, J. W.,(2010).** Aspergillus : molecular biology and genomics. Caister. Published.
- Bauer, J. et Gareis, M., (1987).**Ochratoxin A in the food chain. Journal of Veterinary Medicine **34(8)**, 613p.
- Becharah, A., 1994.**Des études sue la nature des infections fongiques. Université de Halab. Faculté d'agronomie. Syra. 40-70p.
- Belaib, M., et Bouhala, I.,(2016).** Etude de l'effet antihépatotoxique d'une plante médicinale du genre *lycium*. Mémoire de Master : Biotechnologie des Mycètes, Fermentation et Production de Substances Fongiques. Université des Frères Mentouri Constantine 1. Constantine.73p.
- Belaid, D., (2014).**Agriculture Algérie - stockage céréales. Agriculture Algérie.
- Belli, N., Marin, S., Sanchis, V. et Ramos, A.J., (2004).**Influence of water activity and temperature on growth of isolates of Aspergillus section Nigri obtained from grapes. International Journal of Food Microbiology **96 (1)**, 19-27.
- Belmebdi, S.,et Beddar, G., (2019).** Etude des moisissures productrices des mycotoxines isolée à partir des grains de blé dur. Mémoire de Master : Toxicologie. Université Mohamed el Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arreridj. 53p.
- Belyagoubi, L.,(2006).** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de Magistère. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.108p.
- Ben Bordi, I., et Oubiri, F.,(2019).** Determination des mycotoxines d'Aspergillus : caractérisation et réduction da la toxicité. Mémoire de Master, Toxicologique. Université Echahid Hamma Lakhdar EL-OUED. EL-OUED. 71p.
- Bendaoud-Tab, et Aoul, S., (2014).** Isolement de souches fongiques de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), de Ain Franine et Cap Carbon du littoral oriental oranais. Mémoire de Magister. Université d'Oran.148p.
- Bendjeklil,S.,et Ghribi R., (2006).** Etude de la contamination de l'arachide de bouche locale par les moisissures aflatoxinogènes et ochratoxinogènes et la caractérisation biologique des isolats collectés, Thèse: Ing. D'état Agro. Blida.

- Benmansour-Brixi, G.N., (2005).** Étude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs physiques sur l'aflatoxinogénèse. Thèse de magister de biologie, Université de Djillali liabes de Sidi Bel Abbés, Algérie.
- Bennett, J.W., Klich M., (2003).** Mycotoxins. *Clinical. Microbiology. Review.*, **16(3)**, 497-516.
- Bennett, J.W., (2010).** An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus: molecular Biology and genomics*. 1-17.
- Bennoudia, O., (2016).** Isolement et identification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes contaminant la farine de blé tendre commercialisées en Algérie. Mémoire de master,. Université Saad Dahlab-Blida. Blida.
- Blackwell, B.A, Miller, J.D.,et Savard, M.E., (1994).** Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture. *J Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* pp. 506-511.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., et Mañes, J., (2004).** Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *Journal of Chromatography A*. **1054(1-2)**, 397-401.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P.H., Larpent, J.P, Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., et Veau, P., (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ième Ed. Masson. 512p.
- Bouchafaa, B., et Kherchi Medjden, H., (2015).** Essai de modélisation de la demande de blé en Algérie. *Revue d'économie et de statistique*. **12(1)**, 72-81.
- Bouraima, Y., Ayi-Fanou, L.,et Kora, I., (1993).** Mise en évidence de la contamination des céréales par les aflatoxines et l'ochratoxine A au Bénin, dans : Creppy E.E, Castegnaro M, Dirheimer G. (Eds) *Human ochratoxicosis and its pathologies*, 231, 101-110.
- Bourais, I., et Amine, A., (2006).** Aflatoxines toxiques redoutables dans nos aliments. *Technologies de Laboratoire*. Imist. Published.
- Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. et Zucca, J., (1996).** *Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et la qualité des aliments (Tome 1)*. Paris : Tec et Doc(Lavoisier), 958p.
- Bourras, L., (2001).** Effet du stress hydrique sur les composantes du rendement de quelques génotypes de blé dur. Thèse de Magistère .Alger : IN A El Harrach, 189p.
- Boutrif E., et Canet C., (1998).** Mycotoxin prevention and control, FAO programmes. *Revue de médecine vétérinaire*, **149(6)**, 681–694.

Budavari, S., et Ed., (1989). The Merck Index, 11th Ed., Rahway, NJ, Merck & Co., pp. 30-31.

Brochard, G., (2009). Le Bacle C. Mycotoxines en milieu de travail. I. Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. Document pour le médecin du travail, DMT n°129, Septembre 2009.

Bruneton, J., (1990). pharmacognosie- Phytochimie -Plantes médicinales. (3 éd., Vol. 1120). Technique&Documentation

C

Cairns-Fuller, V., Aldred, D., et Magan, N., (2005).Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of General Applied Microbiology*. **99(5)**, 1215-1221.

Castegnaro, M., et Pfohl-Leszkowicz A., (2002). Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.

CDC, (2004). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of aflatoxins poisoning eastern and central provinces, Kenya, January—July 2004. *MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report)* 3, 790-79.

Chabasse, D., Bouchra, J.P., Gentile, L., Brun, S., et Penn, P., (2002).Cahier de formation Biofarma: les moisissures d'intérêt medical. Labo Analy De biomédicale.

Chapeland-Leclerc, F., Papon, N., Noël, T., et Villard, J., (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires*;373:61–6.

Chetatha, M., (2013). Contribution à l'étude mycologique et mycotoxicologique du café commercialisé dans la région de Laghouat. Mémoire magister Option: Maitrise de la qualité microbiologique et du développement microbien. L'université Abou Bekr Belkaid. Béchar, Algérie.

Chimieanalytique, (2020).Chromatographie Liquide Haute Performance HPLC.chimieanalytique.com.

Christensen Clyde, M., et Kaufmann Henry, H., (1969).Grain Storage : The Role of Fungi in Quality Loss (Vol. 153). Minnesota Archive Editions.

Christensen, C.M., (1974). Storage of cereal grains and their products, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA.

Christensen, C.M., Mirocha, C.J. et Meronuck, R.A., (1977). Molds Mycotoxins and Mycotoxicoses. Agricultural Experiment Station Miscellaneous Report 142. University of Minnesota, St. Paul, MN.

Chulze, S. N., (2010). Les stratégies visant à réduire les niveaux de mycotoxines dans le maïs pendant le stockage. Food Additives and Contaminants, 651-657.

C.I.R.C, (2002). Centre International de Recherche contre le Cancer. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, World Health Organization. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Summary of Data Reported and Evaluation, vol. 82. Lyon, pp. 171–175.

Cole, R.J et Cox R.H., (1981). Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York. Commission Regulation (E.C.) (2002).- Commission Regulation N° 472/2002 of 12 march 2002. Official Journal of European Communities, **L75** (18), 16/03/2002.

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

Counil, E., (2005). Approches épidémiologiques de l'évaluation du risque sanitaire lié à l'exposition alimentaire à l'Ochratoxin A. Thèse Doctorat. Institut National Agronomique Paris. Grignon.

Creppy E.E., Kern D., Steyn P.S., (1983). Comparative study of the effect of ochratoxin a analogues on yeast aminoacyl tRNA, synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. Toxicology Letters **(19)**, 217-224.

Curtui, V., Usleber, E., Dietrich, R., Lepschy, J., et Martlbauer, E., (1998), A survey of the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. Mycopathol **143**,97-103.

D

Darocho Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Rekson, A., Magnoli, C.E., et Dalcero, A.M., (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. Food and Additives Contaminants. **19(4)**, 408-414.

- Davis, N.D., et Diener, U.L., (1987).** Mycotoxins, in: Food and Beverage Mycology, 2nd Ed, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 517-570.
- Debiton, C., (2010)** .Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum L.*) Favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy. Thèse de doctorat Présentée à l'université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de docteur d'université, Clermont-Ferrand France : p1-132.
- Dehghan, P., Ziani, F., Rezaei, S., Jebali, A., Kordbacheh, P., et t Mahmoud, M., (2008).** Detection of Aflr and toxigenicity of *Aspergillus flavus* Group isolates from patients with fungal sinustits. Iranian Journal of Public Health **37(3)**, 134-141.
- Delage, N., d'Harlingue, A., Colonna, B., Ceccaldi ., et Bompeix, G., (2003).** Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wines. Food control. **14(4)**, 225-227.
- Dendy, D. A. V., et Dobraszczyk, B. J., (2000).** Cereals and Cereal Products : Technol.Chemistry. Springer; Springer.
- Derache, R., (1986).** Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation Lavoisier, Paris, p: 105-126, 299-321.
- DIEME, E., FALL, R., SARR, I., SARR, F., TRAORE, D., et SEYDI, M., (2016).** Contamination des céréales par l'aflatoxine en Afrique : revue des méthodes de lutte existantes. International Formulae Group., 2285-2299.
- Dijksterhuis, J., et Robert Samson, A., (2007).** Food Mycology A Multifaceted Approach to Fungi and Food (1re éd., Vol. 403). CRC press.
- Djabali, F.Z., et Fedghouche, N., (2016).** Identification des espèces d'*Aspergillus* section Flavi aflatoxinogènes isolés à partir de divers aliments de bétail. [Mémoire de master. université de Blida 1].Blida.
- Doumandji, A., Doumandji-mitiche, B., et Salaheddine, D., (2003).** Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, p: 1-22.
- Druvefors, U. A., (2004).** Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of *Pichia anomala* (Thèse). University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, Department of Microbiology
- Duron, B.S., (1999).** Le Transport Maritime des Céréales. Mémoire de D.E.S.S. Université d'Aix-Marseille, 81p.

Duverger, F., Bailly, S., Querin, A., Pinson-Gadais, L., Guerre, P., et Bailly, G.D., (2011). Influence of culture medium and incubation time on the simultaneous synthesis of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum*. *Revue Méd. Vét.* **162(2)**, 93-97.

E

Edwards, S.G., (2003). *Fusarium* mycotoxins in UK wheat. *Aspects of Applied Biology*, 68, 35-42.

El Hadeif, et El Okki, L., (2015). Valeurs d'appréciation de la qualité technologique et biochimique des nouvelles obtentions variétales de blé dur en Algérie. Mémoire de Magister en Agronomie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. Sétif. 97p.

El himer, N., et Gherras, S., (2017). Etude mycologique et identification des souches fongique toxigènes isolée des amandes et arachides –t.m. Mémoire de master. Université Aboubekr Belkaid. Tlemcen. 76p.

El-Khoury, A., (2007). Champignons mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1). Dans les vignobles libanais : Occurrence et origine. Thèse de doctorat : Génie des procédés et de l'environnement, De l'institut National Polytechnique De Toulouse. France. 213p.

El Khoury, A., Atoui, A., Rizk, T., Lteif, R., Kallassy, M., et Lebrihi, A., (2011). Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. *Journal of Food Science*, **76(4)**, M247-M253.

El-Shaeieb M.K., Tawfik K.A., et Sejing M., (1984). Studies on mycoflora of cereal grains in the Southern West of Saudi Arabia. Fungi associated with sonne cereal grain at post harvest and during storage. *Anal Agric. Sci Moshtohor.* 287-290p.

Esteben, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., et Cabanes, F.J., (2004). Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black *Aspergillus*. *Res. Microbiol.* **155(10)**, 861-866.

F

FAO, (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper 81. FAO, Rome.

FAO/OMS, (2005). Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture / Organisation mondiale de la santé. Assurer la qualité et la sécurité sanitaire des aliments dans les petites moyennes entreprises du secteur alimentaire, Botswana. 16p.

FAO, (2009). Principales and methods for the risk assesment of chemicals in food. (240).

Fangeat, L., (2008). Les mycotoxines chez les bovins. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire De Lyon. Université Claude Bernard-Lyon I (Médecine- Pharmacie).149p.

Faria, C. B., Santos, F. C. dos, Castro, F. F., Sutil, A. R., Sergio, L. M., Silva, M. V., Machinski Junior, M., et Barbosa-Tessmann, I. P., (2017). Occurrence of toxigenic *Aspergillus flavus* in commercial Bulgur wheat. Food Science and Technology, **37(1)**.

Farrar, J.J, et Davis R.M., (1991).Relationship among ear morphology, western flowers thrips and Fusarium ear rot of corn. Physiopathology, 81, 661-666.

Faucet-Marquis, V., (2005). L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de postmarquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. Sous la direction du Pr A. Pfohl-Leszkowicz. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 285p.

Feillet, P., (2000). Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA. Paris; p: 308.

Fellinger, A., (2006). Worldwide mycotoxin regulations and analytical challenges. World Grain Summit : Foods and Beverages, San Francisco, California, USA. Published.

Fleurat Lessard, F., (2003).Optimisation des conditions de stockage des blés - Nouveaux concepts pour la maîtrise de la qualité des grains stockés. Le développement technologique dans les filières "blé tendre" et "blé dur". Tunisie. Association africaine de microbiologie et d'hygiène alimentaires.

Fremy, J., et Thomann, C., (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. AFSSA.

G

Gacem, M. A., (2011). Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanoliques et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelques moisissures d'altération de blé tendre stocké (Doctoral dissertation). Mémoire de magister en Biologie. Université kasdi Merbah-Ouargla.149p.

Gacem, M.A., Ould El Hadj, K.A., et Gacemi B., (2011).Étude de la qualité physico-chimique et mycologique du blé tendre local et importé stocké au niveau de l'office algérien

interprofessionnel des céréales (OAIC) de la localité de Saida (Algérie). Algerian Journal of Arid Environment. **1(2)**: 67-76.

Gautam, A., et Bhaduria, R., (2013).Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder. African Journal of Biotechnology **11(104)**: 16814-16823.

Gauthier, A., (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse. Université de Bordeaux. 132p.

Gautier, J.C., Holzhaeuser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B., et Turesky, R.J., (2001). Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. Free Radic Biol Med. **30(10)**, 1089–1098.

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. et Samson, R.A., (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Stud Mycol **59**, 1-10.

Gengan, R. M., Chuturgoon, A. A., Mulholland, D. A., et Dutton, M. F., (1999). Synthesis of sterigmatocystin derivatives and their biotransformation to aflatoxins by a blocked mutant of *Aspergillus parasiticus*. Department of Chemistry, Faculty of Science, M.L. Sultan Technikon, Durban, South Africa. Published.

Ghiasian, S.A., et Maghsood, A.H., (2011). Occurrence of aflatoxigenic fungi in cow feeds during the summer and winter season in Hamadan, Iran. African Journal Of Microbiology Research **5(5)**, 516-521.

GODON, B., et LOISEL, W., (1997). Guide pratique d'analyses dans les industries de céréales (2e éd., Vol. 818). Technique et Documentation Lavoisier.

Guerre, P., Galtier, P., et Burgat, V., 1996. Les aflatoxicoses chez l'animal : Des manifestations cliniques aux mécanismes d'action. Revue de Médecine Vétérinaire. **147(7)**, 497-518.

Guezlane-Tebibel, N., Kahlouche, B., et Athmani-Guemouri, S., (2011). Microbiologie Travaux Pratiques 2ème année TCB et LMD, 5ème édition corrigée.

Guezlane-Tebibel, N., Bouras, N., et Ould El Hadj, M. D., (2016) . Les Mycotoxines: Un Danger De Santé public. Algerian journal of arid environment **6(1)**, 32-49.

H

Heit, S., (2015). Identification de *Fusarium* et détection des mycotoxines associées par

MALDI-TOF. Thèse de Doctorat : Science pharmaceutiques. Université de Lorraine. 129p.

Henning, A., Fink-Gremmels, J., et Leistner, L.,(1991).Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours* (M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky, and H. Bartsch, Eds.). IARC Scientific Publications, Vol.115, 255–260. International Agency for Research on Cancer, (Lyon).

Hill R.A., Wilson, D.M. et Milian, M.C., (1986). Ecologie des groupes d'*Aspergillus flavus* et formation des aflatoxines dans le groupe maïs. 79-94 pp.

Hocking, A. D., Pitt, J.I., Samson, R.A. et Thrane, U., (2006). *Advances in food mycology*. Springer, Softcover Reprint Of Hardcover .388p.

Hocking, A.D. , et Pitt, J.I., (2003). Mycotoxigenic fungi, In: Hocking, A.D. (Ed.), *Food borne microorganisms of public health significance*, 6th Ed. Australian Institute, Sydney.

Hyghly, E., Enright, E.J., Banks, H.J.,et t Champ, B.R., (1994) . Stored product protection. Proceeding of the international working conference on Stored Product Protection. Volume 2. CAB International. Canberra, Australia : 969-1083.

I

IARC (International Agency for Research on Cancer),(1993). IARC Monograph on evaluation of carcinogenic risks to humans : some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Vol. 56,489-521 (Lyon : IARC).

IARC, (2002). International Agency for Research on Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol. 82. World Health Organization, IARC, Lyon, France.

Interchim, (2019). Guide : La chromatographie sur Couche Mince (CCM).

IPEMED, (2017).Rapport d'activité : Pour un avenir commun dans la région AME.

Isebaert, S., Haesaert, G., Devreese, R., Maene, P., Fremaut, F. E., et Vlaemynck, G., (2005), *Fusarium spp and Fusarium mycotoxins in maize: a problem for Flanders*. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci **70(3)**, 129-136.

J

Jakab, G.J., Hmielski, R.R., Zarba, A., Hemenway, D.R. et Groopman, J.D., (1994) .Respiratory aflatoxicosis: suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **125(2)**, 198-205.

Jouany, J. P., et Yiannikouris, A., (2002).Les mycotoxines dans les aliments des ruminants,

leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA, 3-16.

Jouany, J. P., Morgavi, D., et Boudra, H., (2006). Le risque mycotoxique dans la chaîne alimentaire en France. Cahier de Nutrition et de Diététique, 41(3).

Joubrane, K., (2011). Evaluation du risque lié aux champignons pathogènes producteurs d'Ochratoxine A et Aflatoxine B1 au niveau de la production de blé au Liban. Sous la direction de Khoury A, Maroun R. Thèse de doctorat de l'université Saint Joseph de Beyrouth. 231p.

Journal officiel de l'Union européenne,(2006). Fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Règlement (CE) No 1881/2006, 19 décembre 2006 n° L 364/13.

Kaaya, A. N., et Kyamuhangire, W., (2010). Drying Maize Using Biomass-Heated Natural Convection Dryer Improves Grain Quality During Storage. Journal of Applied Sciences, 10, 967-974.

K

Keller, S.E., Sullivan, T.M., et Chirtel, S., (1997). Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. Indust. Microbiology, Biotechnology, **19(4)**, 305-309

Krysinska-Traczyk, E., Perkowski, J.T., et Dutkiewicz, J., (2007). Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland. Ann. Agric. Environ. Med **14(1)**, 159-167

L

Labbé Ronald, G., et García S., (2001). Guide to food borne pathogens. Wiley; p: 400.

Lacey, J., (1989). Prevention of Mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. eds. Mycotoxins and phycotoxins. Elsevier, Amsterdam. 88:161-168

Lahouar, A., (2016). Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les grains de sorgho commercialisé en Tunisie: Incidence et profils écophysiologicals. Thèse de doctorat en sciences biologiques et biotechnologie et santé. Institut Supérieur de biotechnologie de Monastir. Université de Lleida. 225p.

Langseth, W., Hoie, R., et Gullord, M., (1995). The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985-1990. Acta Agriculturae

Scandinavica, Section B: Soil and Plant Science, 45, 63-67.

Laouid, A., et Neftia, H., (2007). Isolement et identification des champignons de stockage des arachides cultivés à Oued-souf. Mémoire d'études supérieures en biologie. Université de Kasdi Merbah- Ouargla. 95p.

Latgé, J.P., (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev **12(2)**, 310-50.

Lea, T., (1989). Mechanism of ochratoxin A induce immunosuppression. Mycopathologia. 107, 153-159.

Lee, R., Lovatelli, A., et Ababouch, L., (2010). Purification des coquillages bivalves : aspects fondamentaux et pratiques. FAO fiche technique sur les pêches, Rome.

Le Bars, J., et Le Bars, P., (1987). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section Midi Pyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987, (cf. Bulletin de l'Association des Anciens élèves de l'Institut Pasteur, 4e trimestre 1987).

Le Bars, J., et Le Bars, P., (1998). Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing, Rev. Med. Vet., **149(6)**: 493 -500.

Leclerc, F.C., Papon, N., Noel, T., et Villard, J., (2005). Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoles). Revue Francophone des Laboratoires. 373:61-66.

Lesage, V., (2011). Contribution à la validation fonctionnelle du gène majeur contrôlant la dureté/tendreté de l'albumen du grain de blé par l'étude de lignées quasi isogéniques. Thèse de doctorat présenté à l'université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de docteur d'université : p17-18.

Leyral, G., et Vierling, E., (2003). Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires .Lavoisier Tec et Doc, France. p:154-158.

Lipps, P.E., et Deep, I.W., (1991) . Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot and recovery of Fusarium and Trichoderma spp from corn. Plant Disease, 75, 828-833.

Lopez de Cerain, A., Gonzalez-Penas, E., Jimenez, A.M., et Bello, J. (2002). Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. Food and Additives Contaminants. **19(11)**, 1058-1064.

Louze, H. et Hadjaissa, F., (2018). Isolement et identification des moisissures de stockage du blé tendre (*Triticum aestivum* L) et blé dur (*Triticum durum* L). Mémoire de Master.

Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi (OMB).57p.

Luchese, R.H., et Harrigan, W.F., (1993). Biosynthesis of Aflatoxin – the role of nutritional factors, *J. Appl. Bacteriol.*, **74(1)**, 5-14.

Lund, F., et Frisvad,J.C., (2003). *Penicillium verrucosum* in cereals indicates production of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 1117–1123.

M

Madhyastha, S.M, Marquadt, R.R, Frolich, A.A, Platrord, G., et Abramson, D., (1990). Effects of different cereal and oilseed substrate on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J. Agric. Food. Chem* **38(7)**, 1506-1510.

Magan, N., et Lacey, J., (1988). Ecological determinants of mould growth in stored grain. : Rothamsted Research. *International Journal of Food Microbiology*. Les moisissures d'intérêt médical (N°25 éd.). (2002). Cahier de formation Bioforma

Magan, N., Hope R., Cairns, V., et Aldred D.,(2003). Post – harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and Mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* **109(7)**:723-730.

Mahideb, N., et Merrouche, H., (2015.) Etude des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines isolées à partir des grains de blé dur (traités et non traités). Mémoire de Master, Biotechnologie des Mycètes. Université des frères Mentouri Constantine. Constantine.107p.

Makhlouf, J., (2019). Caractérisation de la biodiversité des souches d'*Aspergillus* de la section *Flavi* isolées d'aliments commercialisés au Liban: approche moléculaire, métabolique et morphologique. Thèse de Doctorat de L'Université de Toulouse : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition. Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP).142p.

Mantle, P.G., (2002). Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **50**,143-146.

Mazoyer, M., (2002). Pourquoi est-il vital pour les agriculteurs d'ici et d'ailleurs de comprendre les agricultures du monde.

Micard, V., Petitot, C., Barron, C., Larré, C., et Morel M., (2009). Modification of pasta structure induced by high drying temperatures. Effects on the in vitro digestibility of protein and starch fractions and the potential allergenicity of protein hydrolysates.

- Miller, J.D., (2002).** Aspects of the ecology of Fusarium toxins in cereals. *Adv. Exp. Med. Biol* 504, 19-27.
- Mills, J.T., (1990)** .Mycotoxins and toxigenic fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **68(7)** ,982-986.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D.et Magan,N., (2004).**Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, **97(2)**: 439–445.
- Mitchell, J.P., Neil Macrae, C.,et T Banaji, M.R., (2005).** Forming impressions of people versus inanimate objects: Social-cognitive processing in the medial prefrontal cortex. *Neuroimage* **15(1)**, 251-257.
- Mohamed, S., Mo, L., Flint, S., Palmer, J., et Fletcher, G.C.,(2012).** Effect of water activity and temperature on the germination and growth of *Aspergillus tamaris* isolated from “Maldivian fish”. *International journal of food microbiology*, **160(2)**, 119-123.
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., et Pfohl-Leszkowicz, A., (2005).** Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their contents for OTA, Citrinin and Fumonisin B1: Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food chemistry* **92(3)**, 391-400.
- Morin, O.,(1994).** *Aspergillus et aspergillose : biologie*. Techniques Encyl.Elsevier, Paris, 8(10).
- Morin, O., (2004).** *Aspergillus et aspergillose : biologie*. EMC - Maladies infectieuses, 1(1), 1-7.
- Moss, M.O., et Frank, J.M., (1985).** Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of the British Mycological Society*, 84,585-590.
- Moss M.O., et Franck M., (1987).**Prevention effects of biocides and other agents on mycotoxin production, in Watson D.H, ed, *Toxicants in foods*. Chichester: Ellis Horwood, pp 231-251.
- Multon, J.L., (1982).***Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux*. Technique et Documentation Lavoisier, Paris 105-130.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., et Bryant, C.M., (2006).***Food mycotoxins, an*

update. *Journal of Food Science*, **71(5)**, 51–65.

N

Ndayisaba, D., (2010). Effets de la supplémentation de l'antimycose sur la toxicité de l'aflatoxine b1 chez le poulet de chair. Mémoire de master II en productions animales et développement durable. Ecole Inter-états des sciences et médecine vétérinaires (EISMV) de Dakar. Université cheikh Diop de Dakar. Sénégal.

Nicholson, T.P., Rudd, B.A.M., Dawson, M., Lazarus, C.M., Simpson, T.J., et Cox, R.J., (2003). Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chem. And Biol.*, 8:157-178.

Nikiéma, P. A., (1993). Etude des aflatoxines au Burkina Faso : Détermination quantitative et qualitative des aflatoxines de l'arachide par des tests biochimiques et immunologiques [Université de Ouagadougou].

Njobeh, B., Dutton, F. M., et Makun, H. A.,(2010). Mycotoxins and human health : Significance, prevention and control prevention. *Smart Biomol. Medicine*, Edited by Ajay K. Mishra, Ashutosh Tiwari, and Shivani B. Mishra, 133-166.

Norholt, M.D., Van Egmond, H.P., et Paulsch, W.E., (1979). Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*. **42(6)**, 485-490.

Nyongesa, B.W., Okoth, S. et Ayugi, V., (2015). Identification Key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi County, Kenya. *Advances in Microbiology* **5(4)**, 205-229.

O

OEPP, (2003) ,protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. Normes OEPP Bulletin 33, 245–247.

OMS, (1980). Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11. Publications. De l'OMS Genève. p: 142.

O.M.S (Organisation Mondiale pour la Santé), (2002). Evaluation de certaines mycotoxines dans les aliments. Rapport de la cinquante–sixième réunion du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires, Série de rapports techniques de l'OMS no 906, Organisation mondiale de la santé (OMS), Genève, Suisse.

O.M.S (Organisation Mondiale pour la Santé), (2003). Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentations humaine et animal. Etude FAO alimentation et nutrition. Genève-La Suisse.

Otteneder, H., Majerus, P.,(2000) .Occurrence of ochratoxin A in wines : influence of the type of wine and its geographical origin. Food and Additives Contaminants. **17(9)**, 793-798.

P

Pamel, E.V., Vlaemynck, G., Heyndrickx, M., Herman L., Verbeken, A., et Daeseleire, E., (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. Mycotox. Res. p: 1-11.

Paster,N., et Bullerman, L.B., (1988).Mould spoilage and mycotoxin formation in grain as controlled by physical means. Int. J. Food. Microbiol **7(3)**, 257-265.

Payne, G.A, et Hagler,W.M., (1983). Effect of specific amino acids on *Aspergillus flavus* in defined media. Appl. Environ. Microbiol **46(4)**, pp. 805-812.

Peers, F. G., et Linsell, C. A.,(1975).Aflatoxin contamination and its heat stability in Indian cooking oil. Trop. Sci. Published.

Pfohl-Leszkowicz, A., (1999). Ecotoxicogénèse. In : Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risqué, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 17—35.

Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., et Castegnaro, M. (2001).Balkan endemic nephropathy and associated Urinary tract tumours: a Review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. Food additives and Contaminants, **19(3)**, 282-302.

Pfohl-Leszkowicz, A., et Castegnaro, M., (1999). L'Ochratoxine A dans: Mycotoxines: Evaluation et gestion du risqué, chapitre 9, Lavoisier, Tec & Doc, (Paris). 249-278.

Pier, A.C., Richard, J.L. et Cysewski, S.J., (1980).The implications of mycotoxins in animal disease. J. Am. Vet. Med. Assoc **176(8)** ,719-725.

Pietri, A., Bertuzzi,T., Pallaroni, L., et Piva,G.,(2004). Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northernItaly. Food Addit. Contam **21(5)**: 479-487.

Pitt, J.I., et Hocking, A.D., (1985). Fungi and food spoilage. Sydney: Academic Press.

Pitt, J.I., et Hocking, A.D.,(1997). *Aspergillus* and related teleomorphs. In Fungi and food

spoilage (pp.339-416).Springer, Boston, MA.

Pohland, A.E, Nesheim,S., et Friedman, L., (1992). Ochratoxin A : A Review. Pure and Appl. Chem. 64.

Pomerayn, Z., (1988) .Wheat chemistry and technology. Am Assoc Cereal Chem St Paul : p4794.

Poisson, J. et cahagnier,B., (1982). Effet des procédés de «stabilisation» des grains. In Multon J.L. «conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés »Vol.1.

R

Raper, K. et Fennell, D.J., (1965).The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.686p.

Reboux, G., (2006). Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique. 46: 208–212.

Règlement (CE) n° 1425/2003 de la Commission du 11 août 2003 modifiant le règlement (CE) n° 466/2001 en ce qui concerne la patuline. 95.

Règlement(CE) n° 472/2002 de la Commission du 12 mars 2002 modifiant le règlement (CE) n° 466/2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.96.

Règlement (CE) n° 455/2004 de la Commission du 11 mars 2004 modifiant le règlement (CE) n° 466/2001 en ce qui concerne la patulin.

Règlement (CE) No 1881/2006 DE LA COMMISSION du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). (2006). [EUR-Lex -32006R1881 -EN -EUR-Lex].

Resnik, S., Costarrica, M.L., et Pacin, A., (1991).Mycotoxins in Latin America and the Caribbean. Food Control, **6(1)** ,19–28.

Reymond,P. et Fevre ,M.,(1986).Recombination following protoplast fusion of *Penicillium* strains used in the dairy industry. Enzyme microb. Ed. AC. Press. New York.

Riba, A., (2008). Recherche sur les champignons producteurs d'Aflatoxines et d'Ochratoxine A dans la filière blé en Algérie. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 190p.

Riba, A., Sabaou,N., Mathieu, F., et Lebrihi,A., (2005). Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium

Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques chimiques et la sécurité alimentaire, Fès.

Richard-Molard, D., (1991). Microbiologie des céréales et farines. In Godon B. et Willm C. «Les industries de première transformation des céréales». Ed. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris. France. Pp. 177-190.

Ripert, C.,(2013). Mycologie médical (Vol. 690). Lavoisier Tec et Doc.

Roberts, T. A.,(2005). Microorganisms in foods. Microbial Ecology of food Commodities. (2e éd., Vol. 776). Springer.

Rodrigues, P.C., Santos1, A., Venancio, A., et Lima, N.,(2011).Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds Using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *J Appl Microbiol* **111(4)**: 877-892.

Rosner, H.,(1998). Mycotoxin regulations, an update. *Revue de médecine vétérinaire(France)*, **149(6)** ,679–680.

Ruppol, P., Delfosse, Ph et Hornick, J.L.,(2004).La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Ann. Méd. Vét.* 148: 141-146.

Rustom, I. Y. S., (1997). Aflatoxin in food and feed: Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 59: 57-67.

S

Sauer, D. B., Storey, C. L., Ecker, O., et Fulk, D. W.,(1982). Fungi in U.S. Export wheat and corn. *Postharvest Pathology and Mycotoxins. PHYTOPATHOLOGY*, 1449.

Schmidt, F. R., et Esser, K., (1985). Aflatoxins: medical, economic impact, and prospects for control. *Proc. Biochem.* 167-174.

Schmidt-Heydt, M., Abdel- Hadi, A., Magan, N., et Geisen, R.,(2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* **135(3)**: 231–237.

Schollenberger, M., Muller, H.M., Ruffle, M., Suchy, S., Plank, S., et Drochner, W., (2006), Natural occurrence of 16 *Fusarium* toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany, *Mycopathologia* **161 (1)**, 43-52.

Scudamore, K. A., (2005). Prevention of ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds. *Food Additives & Contaminants*, 17-25.

Seifia, A., et Derfalou., 2020. Recherche d'AFB1 et de la Caféine dans le café dans la région de Constantine par chromatographie sur couche mince. Mémoire de Master : Biochimie Appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra. 80p.

Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockenstrom, S., Mshicileli, N., et Sewram, V., (2003). Quantitation of ochratoxin A in south African wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **51(4)**, 1102-1106.

Smith John, E., et Moss, M.O., (1985). *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*. Wiley; p : 148 P.

Stepurska, K., (2016). Développement d'une procédure originale pour la multi-détection de composés toxiques utilisant des biocapteurs à base d'acétylcholinestérase. Thèse de Doctorat.L'université de Lyon .France.

Steyn, P.S., (1980).The biosynthesis of mycotoxins: a study of secondary metabolism, Academic Press, INC.

Surget, A., et Barron,C., (2005). Histologie du grain de blé. *Industrie des céréales* 145 : 37.

T

Tabuc, C. (2007). Flore Fongique De Différents Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Pathologie, Mycologie, Génétique Et Nutrition. Toulouse : L'institut National Poly Technique Et De L'université De Bucarest. France.190 p.

Tahani, N., Elamrani, A., Serghini-Caid, H., Ouzouline, M., et Khalid, A., (2008). Isolement et Identification de souches de moisissures réputées toxigènes. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* **2(01)**, 81-91.

Tannous, J., (2015). Patuline, mycotoxine de *penicillium expansum*, principal pathogène post-récolte des pommes: nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d'approche préventive. Thèse du doctorat de l'université de Toulouse (INP de Toulouse).208p.

Tozlovanu, M., (2008). Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérigènes (notamment l'ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. Thèse de doctorat Présentée à l'institut national polytechnique de Toulouse. France

Tranchant, J., (1996). Chromatographie en phase gazeuse. *Chromatographie et Techniques Séparatives base documentaire* : Published.

Turner, N. W., Subrahmanyam, S., et Piletsky, S. A., (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins : a Review. Centre for Organic Electronics, University of Newcastle, Callaghan, NSW, Australia. Published.

V

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., de Scott, B., et Theron, J.J., (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* with *Nature*. (205),1112-1113.

Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., et Jonker, M.A., (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. Analytical and Bioanalytical Chemistry **389(1)**, 147-157.

Van Hoi, B.,(2013). Contribution à l'étude de la présence et du devenir des résidus pharmaceutique dans les compartiments aquatiques. Thèse de Doctorat. University of Science and Technology of Ha Noi. Vietnam.

Visconti, A., Pascale, M., et Centoze, G. (1999). Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. **864(1)**, 89-101.

Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Grosso F., Nikolov, I., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., et Dragacci, S., (2004). Analysis of Ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study, *J Agric Food Chem.*, **52 (8)**, 2404-2410.

W

Weidenbörner, M., (1998). Lebensmittel- Mykologie B.Behr's Verlag GmbH und Co.1 ISBN 3-86022-457-3.

Weidenbörner, M., (2000). Whole wheat and white wheat flour; the mycobiota and potential mycotoxins. Food Microbiology **17(1)**, 103-107.

Weidenborner, M., (2001). Pine nuts: The mycobiota and potential mycotoxins. Canadian journal of microbiology **47(5)**:460-464.

Wilson, D.M., Mubatanhema, W., et Jurjevic, Z., (2002). Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. Adv. Exp. Med. Biol **504**, 3-17.

Wogan, G. N., (2000). Impacts of chemicals on liver cancer risk. Seminars in Cancer Biology, **10(3)**, 201–210.

Whitlow, L.W. et Hagler, W. M., (2001). Mycotoxin contamination of feedstuffs-An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ, Québec.

Wicklow, D. T., et Shotwell, O. L.,(1983). Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. AGRIS : International Information System for the Agricultural Science and Technology.

Wild, C.P., Garner, R.C., Montesano, R. et Tursi, F., (1986).Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. *Carcinogenesis* **7(6)**, 853-858.

Z

Zepnik, H., Schauer., et Dekant, W., (2001).Ochratoxin A-induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites? *Toxin Sci.* **59(1)**, 59-67.

Zettal, Y., (2017). Le blé : importance, santé et risque.

Zia-Ur-Rahman, (2006). Storage effect on nutritional quality of commonly consumed cereals. *Food Chemistry* **95(1)** ,53-57.

Zillinsky, F. J., (1983). Common diseases of small grain cereals : a guide to identification. CIMMYT. V°141.

Zimmerli, B., et Dick, R., (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants.* **13(6)**, 655–668.

Zinedine, A., et Idrissi, L., (2007). Présence et réglementation des mycotoxines dans aliments au Maroc: Situation actuelle et perspective. Laboratoire de toxicologie alimentaire. Institut National d'Hygiène, Rabat, Maroc ,10(7).

Résumé

Ce travail a visait à la rechercher des *Aspergillus* Flavi, l'isolement et identification des moisissures potentiellement productrice des mycotoxines présentes dans les grains de blé dur et tendre. L'étude de trente-six 36 échantillons de différents variétés de blé dur et tendre prélevé dans la région de (Guelma et Chelghoum l'aide) est réaliser a l'aide de la méthode d'Ulster(A), Ulster modifié (B) et la méthode de dilution, l'étude montre que la flore fongique externe et profonde révélée par la méthode A dans tous les échantillons analysés est très supérieure par à port à la flore fongique profond révélée par la méthode B ,donc la désinfection par l'eau de javel éliminer la flore externe. Le taux de contamination élevé dans certains échantillons stocké dans les maisons (R2, R3, R4) étudié par la méthode de dilution confirmer l'influence des conditions de stockage (humidité, ph, aération...). Notre décompte des 10 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus* ; *Mucor* ; *Cladosporium* ; *Trichoderma* ; *Ulocladium* et *Rhizomucor* montre la domination du genre *Aspergillus* ; la domination apparaît avec la répartition des tous suivants descendant. *Aspergillus* 48,03% ; *Penicillium* 11,97% ; *Fusarium* 8% ; *Alternaria* 6% ; *Mucor* sp 2% ; *Rhizopus* 4% ; *Cladosporium* sp 3% ; *Ulocladium* 2% ; *Thricodarma* 1% ; *Rhizomucor* 1% ; levure 5% ; Nonidentifié 8%. Nous avons enregistré également des isolements non identifié. Le résultat de détermination du taux d'humidité des 3 type de blé montre que L'échantillon de blé tendre (B1) possède un taux d'humidité bas (11,57%) par rapport à celui de deux échantillons de blé dur (B2) (B3), (12,20%) (15,50%), les résultats de détermination de taux de pH montrent un pH légèrement acide. Les mycotoxines (Aflatoxines, Ochratoxine...) produisent par la flore fongique peuvent causer des effets néfaste sur la santé tel que cancérogènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, allergiques, œstrogéniques, nécrosants, neurotoxiques et néphrotoxiques sur la santé humaine, nous avons proposé des solutions pour limiter et éliminer les risques de la flore fongique.

Mots clés : blé dur, blé tendre, moisissures, mycotoxines, Aflatoxine, *Aspergillus*.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى البحث عن *Aspergillus flavus* ، وعزل وتحديد الفطريات التي من المحتمل أن تنتج السموم الفطرية الموجودة في حبوب القمح الصلب واللين ، ودراسة ستة و ثلاثون عينة من أصناف مختلفة من القمح الصلب واللين مأخوذة من المنطقة (قالمة و شلغوم العيد) يتم تنفيذ البحث باستخدام طريقة الستار (أ) ، والستار المعدلة (ب) وطريقة التخفيف ، أظهرت الدراسة أن الفطريات الخارجية والعميقة التي كشفت عنها الطريقة (أ) في جميع العينات التي تم تحليلها تفوق بكثير النباتات الفطرية العميقة التي كشفت عنها الطريقة (ب) فالتطهير عن طريق ماء الجافيل يقضي على الفطريات الخارجية. ارتفاع معدل التلوث في بعض العينات المدروسة بطريقة التخفيف (R2 ، R3 ، R4) المخزنة في المنازل تؤكد تأثير ظروف التخزين ، لدينا 10 أجناس من الفطريات، *Aspergillus*، *Penicillium*، *Fusarium*، *Alternaria*، *Rhizopus* ؛ *Mucor* ؛ *Cladosporium* ؛ *Trichoderma* ؛ *Ulocladium et Rhizomucor* يُظهر هيمنة جنس *Aspergillus*؛ تظهر الهيمنة معتوزيع كما يلي: *Aspergillus* 48.03%؛ *Penicillium* 11.97%؛ *Ulocladium* 2%؛ *Cladosporium* 3%؛ *Rhizopus* 4%؛ *Mucor sp* 2%؛ *Alternaria* 6%؛ *Fusarium* 8%؛ *Trichoderma* 1%؛ *Rhizomucor* 1%؛ *levure* 5%؛ غير معروف 8%.. أظهرت نتائج تحديد محتوى الرطوبة لثلاثة أنواع من القمح أن عينة القمح الطري (B1) تحتوي على محتوى رطوبة منخفض (11.57%) مقارنة مع عينتين من القمح القاسي (B2) (B3) ، (12.20%) (15.50) ، أظهرت نتائج تحديد مستوى الحموضة أن درجة الحموضة الحمضية للعينات (Aflatoxines ، Ochratoxine ...) التي تنتجها النباتات الفطرية يمكن أن تسبب آثارًا ضارة على الصحة مثل المواد المسرطنة والمطفرة والمواد المسخية ومثبطات المناعة والحساسية والاستروجين والنخر والتسمم العصبي والتسمم الكلوي على صحة الإنسان ، وقد اقترحنا حلولاً للحد من المخاطر والقضاء عليها من النباتات الفطرية.

الكلمات المفتاحية : القمح الصلب، القمح اللين، الفطريات، الميكوتوكسينات، *Aspergulus* ، Aflatoxine .

Abstract

This work aimed to research *Aspergillus flavi*, the isolation and identification of molds potentially producing mycotoxins present in the grains of hard and soft wheat. The study of thirty six 36 samples of deferent varieties of hard and soft wheat taken in the region of (Guelma and Chelghoum l'aid) is carried out using the method of Ulster (**A**), Modified Ulster (**B**) and the dilution method. The study shows that the external and deep fungal flora revealed by method **A** in all the samples analyzed is much superior compared to the deep fungal flora revealed by method **B** in disinfection by bleach eliminate the external flora. The high contamination rate in certain samples studied by the dilution method stored in the houses confirm the influence of storage conditions (humidity, pH, ventilation, etc.). Our count of the 10 genera of fungi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus*; *Mucor*; *Cladosporium*; *Trichoderma*; *Ulocladium* and *Rhizomucor* show dominance of the genus *Aspergillus*; domination appears with the distribution of all following descending. *Aspergillus* 48.03%; *Penicillium* 11.97%; *Fusarium* 8%; *Alternaria* 6%; *Mucor sp* 2%; *Rhizopus* 4%; *Cladosporium sp* 3%; *Ulocladium* 2%; *Thricodarma* 1%; *Rhizomucor* 1%; yeast 5%; Unidentified 8%. The results of the moisture content determination of the 3 types of wheat show that the tender wheat sample (**B1**) has a low moisture content (**11.57%**) compared to that of two hard wheat samples (**B2**) (**B3**), (**12.20%**) (**15.50%**), the pH level determination results show a slightly acidic pH for the samples are respectively. The mycotoxins (Aflatoxins, Ochratoxine ...) produced by the fungal flora can cause harmful effects on health such as carcinogens, mutagens, teratogens, immunosuppressants, allergic, estrogenic, necrotizing, neurotoxic and nephrotoxic on human health, we have proposed solutions to limit and eliminate the risks of fungal flora.

Keywords: hard wheat, soft wheat, molds, mycotoxins, *Aspergillus*, Aflatoxin.

Glossaire

Activité en eau (aw) : Part de l'eau libre dans un produit, c'est-à-dire disponible par exemple pour la croissance de micro-organismes. Plus l'aw est élevée, plus il y a d'eau disponible pour le développement de ces micro-organismes. La mesure de l'aw est comprise entre 0 et 1.

Spore : Organe de dispersion et de multiplication caractéristique du règne végétal, et constitué par une très petite diaspore, aux cellules généralement haploïdes, et très souvent unicellulaire.

Conidie : Bouture unicellulaire de champignon, jouant le rôle d'une spore dans la dispersion de l'espèce. Elle assure la multiplication asexuée.

Mycélium : est l'appareil végétatif des champignons ou de certaines bactéries filamenteuses comme les Actinomycètes. Il est composé d'un ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, appelés hyphes, que l'on trouve dans le sol ou le substrat de culture. Il est formé de cellules très allongées et cloisonnées.

Saprobe : tout organisme, en particulier un champignon ou une bactérie, qui vit et se nourrit de matière organique morte. Appelé aussi : saprobiont.

Sclérote : est un organe de conservation présent chez certains champignons. C'est un amas de filaments mycéliens très serrés, qui sert à stocker des nutriments. C'est une sorte de « mode d'hibernation » utilisé par certaines espèces afin de cumuler l'énergie nécessaire pour pouvoir fructifier lorsque les conditions environnementales seront plus favorables.

Dérivés terpéniques : Se dit d'une résine synthétique obtenue par polymérisation ou polycondensation des terpènes ou de leurs dérivés, les terpènes sont des hydrocarbures mais de nombreux dérivés (alcools, aldéhydes, cétones, acides), Ils sont présents dans les végétaux.

Thermorésistante : Se dit d'un microorganisme qui résiste à une température élevée.

Les moisissures filamenteuses : est une catégorisation morphologique et non taxonomique, Elle désigne de manière générale tout champignon (parasite et/ou saprophyte) qui présente un aspect cotonneux lors de sa croissance (ces filaments ou hyphes, étant composés de matière organique).

Les conditions aseptiques : distingue ce qui est aseptisé, sans infection, stérile, qui est dépourvu de micro-organismes ou encore qui n'est pas dû à un micro-organisme.

Annexes

Annexe I

Composition des milieux de cultures utilisés

Milieu Agar Dextrose Potatoes (PDA)

Ce milieu est recommandé pour l'isolement et le dénombrement des moisissures et des levures des produits alimentaires (**Botton *et al.*, 1990**) Il est à noter que la stérilisation, destinée à détruire tous les germes présents au départ dans le milieu, est réalisée dans un autoclave par de la vapeur d'eau sous pression, à haute température. La stérilisation a été pratiquée à 121°C pendant 20min (**Botton *et al.*, 1990**).

➤ Composition

Pomme de terre.....	200g.
Glucose.....	20g.
Agar-agar.....	20g.
Eau distillée.....	1000ml. (Larpen, 1997).

➤ Préparation

- Pour la préparation de l'extrait, laver et couper en petits cubes 200 g de pommes de terre non pelée, vieilles de préférence.
- Les mettre dans 1 litre d'eau et porter à l'ébullition pendant 1 heure, Ecraser, filtrer et compléter à 1 litre.
- Dissoudre l'agar à chaud dans l'extrait, puis ajouter le glucose. Compléter à 1 litre. Stériliser à 110C° pendant 30 minutes.

En cas de dépôt, agiter le milieu avant de le répartir (**Botton *et al.*, 1990**).

Gélose Sabouraud Chloramphénicol

La gélose Sabouraud est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de levures et moisissures. L'addition de chloramphénicol inhibe la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif.

➤ Composition

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone de caséine.....	5, 00.
Peptone de viande.....	5,00.
Glucose monohydraté.....	40, 00.
Chloramphénicol.....	0,50.

Agar.....15,00

PH final à 25°C: 5, 6 ± 0, 2

➤ Préparation

- Mettre en suspension 65,5 grammes dans 1 litre d'eau pure.
- Porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1minute.
- Répartir en tubes ou flacons.
- Autoclaver à 115°C pendant 15 minutes (**indicia, 2012**).

Milieu de Chapman au Mannitol

Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement des Staphylocoques pathogènes qui donnent des colonies jaunes par fermentation du mannitol et virage du rouge de phénol. Sa forte teneur en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des autres espèces.

➤ Composition

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptones.....10, 00.

Extrait de viande de bœuf.....1,00.

D-mannitol.....10, 00.

Chlorure de sodium.....75, 00.

Rouge de phénol.....0, 025.

Agar.....15, 00

PH final à 25°C: 7, 4 ± 0, 2

➤ Préparation

- Verser 111 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave (**indicia.2012**).

Milieu Gélose Hektoene

La gélose Hektoene est un milieu sélectif différentiel des bactéries entéro-pathogènes, particulièrement de Salmonella et de Shigella. La composition du milieu permet la

différenciation des colonies fermentant rapidement un des 3 sucres (virage du bleu au rouge-saumon) et/ou produisant de l'H₂S (centre noir).

➤ **Composition**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Protéose peptone.....	12
Extrait de levure.....	3
Chlorure de sodium.....	5
Thiosulfate de sodium.....	5
Sels biliaires.....	9
Citrate de fer ammoniacal.....	1, 5
Salicine.....	2
Lactose.....	12
Saccharose.....	12
Fuchsine acide.....	0, 1
Bleu de bromothymol.....	0,065
Agar.....	14
PH final	7, 5 ± 0, 2

➤ **Préparation**

-Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

-Mettre 75 grammes de milieu déshydraté dans un litre d'eau fraîchement distillée

-Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

-Laisser refroidir à 50°C avant répartition en boîtes de Pétri ou en flacon (**indicia.2010**).

Bleu coton au lactophénol

-Phénol en cristaux.....	20 g
-Acide lactique (commercial concentré).....	20 g
-Glycérine.....	40 g
-Eau bidistillée.....	20 g
-Bleu de méthyle.....	0,5 g

Annexe II

Les Produits et les appareils utilisés dans cette étude sont

- Etuve
- Balance de précision
- Autoclave
- Micropipette (1ml, 0.1ml)
- Microscope optique
- Broyeur (Warring-blendor)
- Spatule
- Verrerie : boîtes de Pétri, Erlenmeyers, béchers, tubes à essais, pipettes.
- Hotte à flux laminaire
- Scalpel
- Papier filtre stérile
- Bec bunsen
- Sac de stockage
- Etiquette
- Pelle à mesurer
- Bain marie
- Réfrigérateur
- Agitateur magnétique avec plaque chauffante
- Des lames à observation
- Eau distille
- Eau physiologique
- Eau de javel
- Ethanol
- Lactophénol bleu de coton
- Les gants de laboratoire.
- Les bavettes