

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE
CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude

*Présenté pour l'obtention du diplôme de
Master : EN SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire*

Sujet

**Isolement et identification des espèces d'*Aspergillus*
section *Flavi* aflatoxinogènes contaminant la farine
de blé tendre commercialisées en Algérie**

Réalisé par : M^r. BENNOUDIA OMAR

Devant le jury composé de :

M^{me} BELKOUR
M^{me} ZERKAOUI A.

M.A.A USDB
M.A.A USDB

Promotrice
Co-Promotrice

Promotion : 2015- 2016

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

LISTE DES ABREVIATIONS

INDEX DES TABLEAUX ET DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE.....1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPIRE I : GENERALITES SUR LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINES

Les moisissures.....3

Les mycotoxines : origine et conditions de toxinogénèses.....5

1. Les mycotoxines.....5

2. Origine.....6

3. Conditions de toxinogénèses.....6

3.1. Facteurs intrinsèques.....7

3.2. Facteurs extrinsèques.....7

3.3. Facteurs physiques.....7

3.4. Facteurs chimique.....8

3.5. Facteurs biologiques.....10

4. Impacts sanitaire et économique.....10

CHAPIRE II : MOYENS DE LUTTE CONTRE LES MYCOTOXINES

Moyens de lutte contre les mycotoxines.....12

1. Généralités.....12

2. Lutte avant récolte.....12

3. Lutte au moment de la récolte.....12

4. Lutte et décontamination après
récolte.....12

Principaux mycotoxine.....13

1. Les champignons producteurs d'aflatoxines

Le Genre Aspergillus.....16

1. Définition.....	16
2. Les caractères morphologiques d'identification du genre <i>Aspergillus</i>	16
3. Systématique des espèces d' <i>Aspergillus</i>	18
4. <i>Aspergillus</i> section Flavi.....	19
5. Les espèces de la section Flavi et leurs mycotoxines.....	19

CHAPITRE III : LES AFLLATOXINES ET OCHRATOXINE

1. Les aflatoxines.....	24
1.1. Origine.....	24
1.2. Structures et propriétés physico-chimiques.....	24
1.3. Contamination en AFs des denrées alimentaires.....	26
1.4. Les facteurs influençant la teneur en AFs dans les denrées alimentaires...28	
1.5. Profil toxicologique des aflatoxines.....	28
1.6. Effets toxiques des aflatoxines.....	29
2. Les ochratoxines.....	30
2.1. Origine.....	30
2.2. Structure et propriétés physico chimique.....	31
2.3. Contamination des aliments.....	31
2.4. Effets toxiques des ochratoxines.....	35
2.4.1. Acide cyclopiazonique (CPA).....	37
3. Réglementation.....	37
3.1. Réglementation des aflatoxines.....	38
3.2. Réglementation relative à l'ochratoxine A.....	39

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL.....	40
1.1. La farine du blé tendre.....	40
1.2. Les milieux de cultures.....	40
1.3. Souches de références.....	41
1.4. Appareillage et solvants.....	41
1.5. Les standards analytiques.....	41
2. MÉTHODES.....	41
2.1. Collecte des échantillons et méthode de prélèvements.....	41
2.2. Processus de production.....	45
2.3. Nature des prélèvements effectués.....	46
2.4. Analyses physico-chimiques.....	47

2.5. Isolements et dénombrement de la flore fongique.....	47
2.6. Identification morphologique des isolats fongiques.....	50
2.7. Étude du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A.....	53
2.8. Détection des aflatoxines sur CCM.....	56
2.9. Analyse quantitative par estimation visuelle.....	56

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

1. RESULTATS

1.1. Analyse de la flore fongique totale et les principaux genres.....	57
1.2. Reconnaissance des genres et des sections.....	67
1.3. Étude du pouvoir producteur d'AFs par les isolats d'Aspergillus section Favi.....	74
1.4. Caractérisation des Aspergillus section Flavi.....	79

2. DISCUSSION.....

86

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....

91

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES I

ANNEXES II

Liste des abréviations

AIRC	Agence Internationale de Recherches sur le Cancer.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
AFB1	Aflatoxine B1.
AFs	Aflatoxines.
AFT	La somme des 4 AFs totales (B1+B2+G1+G2)
AOAC	Association of Official Analytical Chemists.
AFPA	milieu <i>Aspergillus flavus</i> and <i>parasiticus</i> agar
<i>A_w</i>	Activité de l'eau.
CLHR	Chromatographie Liquide à Haute Résolution
CAM	Coconut Agar Medium.
CE	Commission Européenne
CPA	acide cyclopiazonique
CYA	Czapeck Yeast Extract Agar.
CCM	Chromatographie à couche mince
CFU	Unité Formant de Colonie.
DRBC	Agar. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol
FAO	Food and Agriculture Organization.
O.M.S	Organisation Mondiale pour la Santé.
OTA	Ochratoxine A.
PDA	Potato, Dextrose, Agar
pH	potentiel d'hydrogène
UV	Ultra-Violet.
µg	microgramme (10⁻⁶g).
YES	Yeast Extract Sucrose
ZEA	Zéaralénone.

Liste des tableaux

Tableau I . Principales mycotoxines et les moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Bennet et Klich., 2003).....	4
Tableau II. Origine chimique des mycotoxines (Riba, 2008).....	6
Tableau III. Production d'AFs B et G, de CPA et d'autres métabolites par les espèces d'Aspergillus section Flavi (D'après Pildain et al, 2008).....	21
Tableau IV. Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines (Dutton et al, 1985).....	26
Tableau V. Présence des aflatoxines dans des matières premières et des produits d'origine végétale pour différents pays.....	27
Tableau VI. Présence de l'ochratoxine A dans les grains de céréales pour différents pays.....	33
Tableau VII. Présence de l'ochratoxine A dans des produits végétaux.....	35
Tableau VIII. Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003), (F.A.O, 2004) a.....	39
Tableau IX. Les différents d'échantillons prélevés.....	47
Tableau X. Aspect macroscopique et microscopique des principales espèces fongique.....	52
Tableau XI. Distribution de la flore fongique totale obtenus par la méthode A, et B dans les différentes échantillons.....	58
Tableau XII. Distribution de la flore fongique totale externe, profonde et fréquences d'Aspergillus, Penicillium, Aspergillus section Flavi, et Aspergillus section Nigri, et Aspergillus section Terrei, et Aspergillus sp dans les différents échantillons analysées.....	62
Tableau XIII. Répartition des 24 isolats aflatoxinogènes d'Aspergillus section Flavi en fonction de l'intensité de fluorescence sur CCM.....	78

Tableau XIV. Répartition des 13 isolats producteurs d'AFs d'Aspergillus section Flavi en différents groupes (morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB, d'AFG et de sclérotés.....83

Tableau XV. Caractéristiques des 24 isolats d'Aspergillus section Flaviaflatoxinogènes issus d'amandes analysées.....83

Listes de figures

Figure 01. (A): Les zygomycètes, (B): Les ascomycètes, (C): les basidiomycètes.....	14
Figure 02. Principaux caractères morphologiques des Aspergillus (Azzoune 2009).	18
Figure 03. Photo des espèces : (a), Aspergillus parasiticus, et (b) A. flavus sur les milieux standards d'identification au 7ème jour, milieu CYA : Czapek yeast extract agar, 37°C ; milieu G25N : 25% glycerol nitrate agar, 25°C ; milieu MEA : Malt extract agar, 25°C ; (M) aspect microscopique d'Aspergillus flavus (Gr.x40) (Chetatha, 2013).....	23
Figure 04 .Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2 (Dutto netal., 1985).....	25
Figure 05. Structures chimiques de CPA (Riba, 2008).....	37
Figure 06. Le stockage d'aliment composé farine dans des sacs en carton au niveau D'usine AMOUR préparé pour la commercialisation.....	40
Figure 07.les échantillons mis dans des sacs étiquetés et acheminés au laboratoire (Bureau d'hygiène-Blida-).....	42
Figure 08. Prélèvement de blé sale tendre par canal d'aspiration.....	42
Figure 09. Prélèvement de blé sale tendre après premier repos de silos.....	43
Figure 10. Prélèvement de blé sale tendre après 1er et 2eme repos puis prêt à broyage.....	43
Figure 11. Prélèvement de matière première après 3eme étape de broyage de tuyauterie.....	43
Figure 12. Prélèvement de matière première après 4eme étape de broyage tuyauterie.....	44
Figure 13. Prélèvement de matière première après 5eme étape de broyage tuyauterie.....	44

Figure 14. Prélèvement du son de farine tuyauterie.....	44
Figure 15 : Représentation des échantillons (Produits finis).....	45
Figure 16. Technique de dénombrement par étalement en surface.....	48
Figure17. Méthode d'ensemencement direct des grains sur le milieu DRBC (blé tendre).....	50
Figure 18. Les étapes de préparation les plaquesCCM dans laboratoire.....	55
Figure 19. Représentation schématique d'un chromatogramme sur couche mince.	56
Figure 20. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A) de chaque échantillon analysé.....	59
Figure 21. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A) d'échantillon analysé.....	60
Figure 22. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A), et profonde (méthode B) de de chaque échantillon analysé.....	61
Figure 23. Fréquence du genre Aspergillus, et Penicillium dans les échantillons analysées.....	64
Figure24. Fréquence du genre Aspergillus dans les échantillons analysés.....	65
Figure 25. Fréquence du genre Penicillium dans les échantillons analysés.....	65
Figure 26. Fréquence d'Aspergillus section Flavi et d'Aspergillus section Nigri dans les échantillons d'amandes analysés par rapport au total d'Aspergillus.....	66
Figure 27. Aspect macroscopique des différents genres poussant sur milieu DRBC après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C.....	68
Figure 28. Aspect macroscopique et microscopique d'Aspergillus section Flavi.....	69
Figure 29. Aspect macroscopique des sclérotés de type « L » d'Aspergillus section Flavi sur milieu CYA a 28°C.....	69
Figure 30. Aspect macroscopique d'Aspergillus section Nigri.....	70

Figure 31. Aspect macro et microscopique d'Aspergillus section Fumigati.....	71
Figure 32. Aspect macro et microscopique d'Aspergillus section Terrei.....	72
Figure 33. Aspect macro et microscopique d'Aspergillus sp.....	73
Figure 34. Aspect macro et microscopique du genre Penicillium sp.....	74
Figure 35. (%) Taux de production d'AFs par les isolats d'Aspergillus section Flavi déterminée par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM, et sur CCM.....	76
Figure 36. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par Aspergillus section Flavi sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).....	76
Figure 37. Images sous UV 365 nm montrant la fluorescence bleue de la production des d'aflatoxines produites par les isolats aflatoxinogènes sur CCM....	77
Figure 38. Fréquence (%) des isolats d'Aspergillus section Flavi producteurs d'AFs en fonction de type d'échantillon.....	79
Figure 39. Les différents types d'isolats d'Aspergillus section Flavi dans les échantillons analysés.....	80
Figure 40. Aspect macroscopique d'Aspergillus section Flavi sur milieu CYA au 7ème jour. (A, B) : Aspergillus flavus; (C) : Aspergillus parasiticus.....	81
Figure 41. Aspect microscopique (Grx100) d'Aspergillus flavus (photo original) (1) : Conodiophore (stipe), (2) : Vésicule, (3) : Métule, (4) : conidies, (5) : Phialide.....	81
Figure 42. Présentation de deux types d'isolats producteurs des sclérotés de type « S » et « L » « S » (sclérote <400 µm), « L » (sclérote >400 µm).....	82

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous tenons à remercier le bon Dieu de nous avoir donné le courage de terminer ce travail.

*Nous voudrions signifier notre gratitude au **M. Djamel Taffahi** et **M. Benacer Hmida** et **M. Sid Ali** du Laboratoire D'hygiène de la wilaya de Blida qui nous a bien accueillis et mis à notre disposition le matériel nécessaire à la réalisation de nos expériences et aussi de nous avoir énormément encouragé.*

*Nous exprimons aussi notre respect sans égal à notre promotrice **Boulkour** Co-promotrice **A. Zarkaoui** ; Maître de conférences, à l'USD pour nous avoir suivi de très près tout au long de la partie expérimentale et qui nous a appris les méthodes d'analyse nécessaires de laboratoire pour ce travail. Nous la remercions vivement pour son soutien, et pour le fait de nous avoir fait partager son expérience. et nos remerciements les plus vifs pour toute l'attention particulière qu'elle a porté à la rédaction de ce mémoire, pour son soutien, sa gentillesse, ses encouragements et sa sympathie.*

Nous remercions également :

*Mme **BENBAIBECHE H**, professeur à l'USD qui nous a fait l'honneur de présider notre Jury et accepté d'apprécier ce travail.*

Nous lui somme très reconnaissant pour ses judicieuses suggestions.

*Mme **AMMAR A**. Maitre de conférences A à l'Université Blida-1- d'avoir accepté d'examiner notre mémoire et de faire partie de notre*

Jury de soutenance.

*A toute l'équipe du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse à l'E.N.S de **Kouba**, et du **Laboratoire D'hygiène de la wilaya de Blida** pour leur aide précieuse. Enfin, nous tenons à remercier vivement et exprimer notre reconnaissance et notre profond respect à tous les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

A tous ceux qui nous ont soutenus, nous dirons merci

INTRODUCTION GENERALE

D'après l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, environ 25% des récoltes mondiales des produits alimentaires sont contaminés par les mycotoxines (FAO, 2004). De nombreuses denrées d'origine végétale, 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. Ces substances issues du métabolisme secondaire de certaines espèces de moisissures qui se développent sur un aliment sont répandues à tous les stades de la chaîne alimentaire. Parmi les 400 mycotoxines repertoriées, les aflatoxines et l'ochratoxine A produites par le genre *Aspergillus*, présentent une importance considérable sur le plan sanitaire et agro-économique en raison de leurs effets hautement toxiques et de leurs fréquences élevées. En effet, ces substances présentent des propriétés cancérigène, mutagène, hépatotoxique, tératogène et immunotoxique. L'aflatoxine B1 (AFB1) est considéré comme étant le plus puissant cancérigène naturel pour l'homme (C.I.R.C, 2002)

Afin d'analyser les risques de contamination par les mycotoxines et de définir les mesures permettant de les maîtriser, il est nécessaire d'étudier d'une manière approfondie les espèces fongiques potentiellement toxigènes, d'évaluer leurs capacités de production des mycotoxines et de doser ces mycotoxines dans les produits. Le genre *Aspergillus* est à l'origine de la contamination de nombreuses denrées d'origine végétale par les aflatoxines et l'ochratoxine A. En Algérie, les premiers travaux réalisés sur les mycotoxines ont porté sur la recherche de ces deux mycotoxines dans la filière blé (Riba, 2008). la présente étude se veut être une continuation des travaux précédant et qui vise à étudier les champignons producteurs de ces mycotoxines dans le blé commercialisés.

Ce travail est divisé en trois parties dont la première est consacrée à une analyse bibliographique sur la contamination des denrées alimentaires par les moisissures et leurs mycotoxines. Dans cette partie, une description détaillée de la taxonomie et de l'écologie des champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A sera également donnée.

La deuxième partie est consacrée au matériel et méthodes utilisés dans cette étude. La démarche globale consiste à isoler et dénombrer les moisissures contaminant le blé en utilisant la technique des suspensions- dilutions et ensemencement sur milieu gélosé. Les principaux genres potentiellement toxigènes sont ensuite identifiés morphologiquement. La

INTRODUCTION GENERALE

capacité de production in vitro des aflatoxines et de l'ochratoxine A des isolats appartenant au genre *Aspergillus* est ensuite déterminée par analyse chromatographique.

Dans la troisième partie, nous présentons les principaux résultats et discussions et nous terminons avec une conclusion et des perspectives.

I. GENERALITES SUR LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINES :

I.1. Les moisissures :

Les moisissures sont des champignons microscopiques filamenteux, ubiquitaires (**Pitt et al, 2000**). Au sein du règne des champignons renfermant suivant les auteurs 65000 à 100.000 espèces différentes, les moisissures constituent un ensemble hétérogène d'environ 20.000 espèces. Ces microorganismes eucaryotes appartiennent en majorité à trois classes : zygomycètes, ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes (**Berthier et Valla, 2001**). Les moisissures peuvent devenir visibles, lorsque leur développement est important, ce sont de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères, capables de se développer sur des substrats nutritifs variés et tout particulièrement sur les denrées alimentaires, il s'agit d'organismes hétérotrophes.

Ces microorganismes microscopiques produisent une grande variété de métabolites secondaires, certains d'entre eux sont très utiles à l'homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé, etc). Ainsi certains de ces microorganismes sont utilisés dans les processus biotechnologiques pour la synthèse des différents acides, comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes (protéases et pectinases) (**Perry et al., 2004**). D'autres sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire, pour l'affinage des fromages et l'amélioration des qualités organoleptiques de certains produits alimentaires (saucisse). Dans le domaine pharmaceutique, les moisissures sont utilisées surtout pour la production d'antibiotiques (pénicillines, céphalosporines etc) (**Botton, 1990**). Environ 22% des antibiotiques identifiés et 40% des enzymes produites industriellement sont élaborés par les espèces fongiques (**Strohl, 1997**).

A côté de ces intérêts bénéfiques, les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Leur développement indésirable sur les aliments peut entraîner de nombreux problèmes tel que la modification de l'aspect des produits alimentaires, altération de qualités organoleptiques (odeur et flaveur), réduction qualitative et quantitative de la valeur alimentaire, une baisse de rendement des récoltes et des pertes économiques dues au rejet des produits contaminés (**Pitt et al., 2000**). Cependant l'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est lié à la synthèse de substances toxiques : les mycotoxines. Parmi les 300 métabolites d'origine fongique, seule une trentaine est connue pour être des mycotoxines

CHAPIRE I : GENERALITES SUR LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINES

(Bhatnagar et al.,2002). Plusieurs types de ces mycotoxines peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires, dont les principales sont représentées dans le (tableau 1).

Tableau 1. Principales mycotoxines et les moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Bennet et Klich., 2003).

Mycotoxines	Champignons	Denrées
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> et <i>A. ochraceoroseus</i> .	Arachides, céréales, graines de coton, épices et fruits.
Ochratoxines A, B, C.	<i>Aspergillus ochraceus</i> et <i>Penicillium viridicatum</i> .	Légumes, céréales et graines de café.
Zéaralénone.	<i>Fusarium graminearum</i> et <i>F. sporotrichoïdes</i> .	Maïs, blé, orge, etc.
Fumonisines.	<i>Fusarium moniliforme</i> .	Maïs et autres céréales.
Trichothécènes (Toxine T-2).	<i>Fusarium</i> spp.	Maïs et blé.
Alcaloïde de l'ergot.	<i>Claviceps purpurea</i> et <i>C. paspali</i> .	Blé et dérivés et seigle.
Patuline.	<i>Aspergillus</i> spp. et <i>Penicillium</i> spp. <i>Penicillium rubrum</i> , <i>P.</i>	Fruits (pommes, prunes, pêches, poires, abricots).
Citrinine.	<i>purpurogenum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> et <i>Aspergillus ochraceus</i> .	Orge, blé, riz, soja et seigle.

I.2. Les mycotoxines : origine et conditions de toxinogénèses

I.2.1. Les mycotoxines :

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaires toxiques, élaborés par quelques moisissures. Elles sont issus principalement de 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994).

Les mycotoxines sont synthétisées pendant la phase diophase après les stades de multiplication et de croissance. Elles ne jouent pas de rôle évident dans l'économie du microorganisme. Il est admis que la production des mycotoxines n'est pas liée à la croissance cellulaire mais répond généralement à des signaux issus de l'environnement du champignon (elles doivent cependant croître sur un substrat permettant l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines) (Yiannikouris et Jouany, 2002).

Les mycotoxines possèdent des structures chimiques leur conférant une bonne stabilité et de ce fait, les procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation et irradiation) ne peuvent pas les détruire totalement (Park et al., 2002).

I.2.2. 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, Fumitremorgines), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine A, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine). (Tableau 2).

Tableau 2. 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.	

I.2.3. Conditions de toxinogénèse :

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Elles peuvent survenir au champ (avant, récolte), lors du transport, pendant le stockage ou au cours de la transformation. La mycotoxine peut aussi être présente alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de la mycoflore, soit du fait de traitements technologiques. La sécrétion de métabolites toxiques par les moisissures dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (liés à la souche fongique), extrinsèques (conditions de l'environnement).

I.2.3.1. Facteurs intrinsèques :

Concernant la nature de la souche, certaines moisissures sont toxigènes mais d'autres ne le sont pas. 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. La toxinogénèse d'une moisissure peut dépendre du stade de développement de la souche productrice.

I.2.3.2.Facteurs extrinsèques :

Les facteurs de l'environnement qui contrôlent le développement de la toxinogénèse des moisissures sont nombreux à savoir la teneur en eau, l'humidité relative, le pH, la température ambiante, la composition du substrat en éléments nutritifs et sa richesse en graisses ou en azote et la compétition entre les différents micro-organismes :

I.2.3.3.Facteurs physiques :

I.2.3.3.1.Activité en eau (A_w) :

La teneur en eau libre dans un substrat appelée activité de l'eau (a_w) est un paramètre dont l'influence est déterminante sur le développement des moisissures et sur la production de mycotoxines. La plupart des moisissures préfèrent un a_w compris entre 0.85 et 0.99 pour leur développement. L' a_w optimal nécessaire à la toxinogénèse est généralement supérieur à celle qui est nécessaire pour la croissance fongique et la germination des spores. Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une a_w de 0,85 ; par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque a_w est ≥ 0.85 (Cairns – Fuller *et al.*, 2005). Certaines moisissures xérophiles (*Aspergillus flavus* ou *A.xérophilus*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, charcuterie sèches à des a_w allant de 0.65–0.75. Certains facteurs, tels que la pression osmotique, le substrat et la température, en réduisant l'humidité relative, peuvent conditionner l' a_w dans le milieu. Quelle que soit la nature de l'aliment, aucun micro-organisme ne peut se développer lorsque l' a_w est inférieure à 0,6, donc les produits alimentaires ayant une $a_w \leq 0,6$ ne sont généralement pas altérés (El khoury, 2007).

I.2.3.3.2.pH :

Pour l' a_w aussi, la gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 2,5 à 9,9 avec un optimum de 4,5 à 6,5 et la production des mycotoxines a lieu aux voisinages des pH optimum de croissance (Weidenbörner, 1998). La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 5,5 à 9 avec un a_w entre 0,85 à 0,98, à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C (Reboux, 2006).

I.2.3.3. Température :

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance. La plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant entre 25 °C et 35 °C (El khoury, 2007). D'autre part, certaines espèces de champignons sont psychrophiles ou psychrotolérants, et sont capables de se développer à des températures relativement basses comme les espèces du genre *Penicillium* dont l'intervalle de température varie de 4°C à 31°C avec un optimum vers 12°C (El khoury, 2007).

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. Par exemple, *Fusariumgraminearum* peut produire préférentiellement de la zéaralénone à 25 °C alors que c'est la déoxynivalenol qui sera majoritairement produite à 28 °C (Pfohl– Leszkowicz, 2001).

I.2.3.4. Facteurs chimique :

I.2.3.4.1. Présence d'oxygène :

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).

I.2.3.4.2. Composition du substrat :

La composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) peut influencer la production de mycotoxines. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi, l'acide phytique 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-Leszkowicz, 2001).

I.2.3.4.3. Interactions microbiennes :

La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu entraîne une diminution de la production de mycotoxines par chacun des microorganismes producteurs.

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'*Aspergillus parasiticus* est une souche non toxigène (Pfohl-Leskowicz, 2001).

La présence de *Fusarium verticilloides* sur les épis protège le maïs d'une contamination ultérieure avec l'*Aspergillus flavus* et réduit la quantité d'aflatoxine produite (Zummo et Scott, 1992).

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* diminuent la production de cette mycotoxine (Mislivec et al., 1988). Dans le même esprit, la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* est inhibée par la présence d'*Aspergillus niger* (Horn et Wicklow, 1983).

I.2.3.4.4. Traitements agricoles :

Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans le champ. Il peut s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte (Lipps et Deep, 1991), l'emploi des fongicides (Moss et Frank, 1985), et les différences géographiques (Langseth et al., 1995). En outre la culture biologique peut poser un risque pour la production accrue de mycotoxine comme cela a été proposé par Edwards (2003).

I.2.3.5. Facteurs biologiques :

Les insectes et acariens sont des vecteurs de spores de moisissures introduits à l'intérieur même du grain par des lésions qu'ils créent. La contamination d'arachide, de coton et de maïs par *A. flavus* et/ou par les AFs avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Durant le stockage, les échantillons de grains hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (l'AFB1, l'OTA, la CIT dans le maïs ou l'orge) (El khoury, 2007)

Les échantillons envahis par une seule espèce présentent généralement une imprégnation toxique bien plus importante que les échantillons ayant une mycoflore complexe. Par contre, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part par la compétition de substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine. Ainsi, la quantité d'aflatoxine B1 produite est réduite quand une souche d'*A. flavus* est introduite dans une culture en même temps qu'une souche d'*A. parasiticus* (Pfohl – Leszkowicz, 2001). La culture simultanée d'*A. parasiticus* et d'*A. flavus* ne modifie pas la production d'AFs par ce dernier, alors que la présence des espèces de *Penicillium* diminuent la production de cette mycotoxine (Mislivec et al., 1988). Dans le même esprit, la production d'AFs par *A. flavus* est inhibée par la présence d'*A. niger* (Horn et Wicklow, 1983).

I.2.4. Impacts sanitaire et économique :

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.

Selon leurs effets toxiques, les mycotoxines sont généralement classées en trois groupes :

- les mycotoxines mutagènes ;
- les mycotoxines cancérigènes ;
- les mycotoxines tératogènes.

L'impact financier des mycotoxines concerne non seulement les risques pour la santé de l'homme et les animaux domestiques, mais aussi la dégradation de la qualité des produits agricoles commercialisés tant pour le marché intérieur que pour l'exportation. En général les pertes économiques importantes des mycotoxines peuvent être résumées comme suit :

- La perte de la qualité marchande des produits agricoles ;
- La diminution des niveaux des exportations en particulier des produits endommagés
- La perte de la valeur nutritionnelle des aliments ce qui augmente la fréquence d'apparition des maladies nutritionnelles ;

CHAPIRE I : GENERALITES SUR LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINES

- La perte de fertilité chez les animaux de la ferme ce qui entraîne une diminution de la productivité animale ;
 - La nécessité d'investissement en matière de contrôle alimentaire (laboratoire, équipement, formation du personnel qualifié etc.) ;
 - La nécessité de prise en charge des personnes atteintes de maladies chroniques probablement dues aux effets toxiques des mycotoxines, ce qui implique de lourds investissements financiers dans le domaine médical pour répondre à ce besoin. (Zinedine, 2009)

II.MOYENS DE LUTTE CONTRE LES MYCOTOXINES

II.1.Moyens de lutte contre les mycotoxines :

II.1.1.Généralités :

Pour lutter contre les moisissures et les mycotoxines, il faut savoir à quel moment elles se développent. Ainsi, il est possible de définir six moments privilégiés au cours de l'élaboration d'un produit : lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation, de l'alimentation des animaux et enfin lors de la consommation par l'être humain (**Pfohl-Leszkowicz, 1999**).Plusieurs procédés ont été étudiés afin de prévenir la contamination des matières premières par les mycotoxines. Chaque essai doit non seulement réduire la concentration des toxines mais aussi éviter que les produits de dégradation ne soient toxiques ou détériorent la qualité nutritionnelle des aliments traités.

Selon **Lopez-Garcia et Park (1999)** un système de lutte intégré contre les mycotoxines doit se concevoir à trois niveaux de production :

II.1.2.Lutte avant récolte :

La prévention au champ consiste en l'utilisation raisonnée d'insecticides, et ce dans le but de diminuer les lésions des plantes et réduire de ce fait les portes ouvertes à l'envahissement par les moisissures ou l'utilisation de fongistatiques inhibant la croissance des moisissures et empêchant la toxinogénèse. La lutte contre les infestations d'insectes peut donc aider à éviter la prolifération des spores et la production ultérieure des mycotoxines. Cependant ces essais sont très difficiles à mettre au point et restent peu concluants.

II.1.3.Lutte au moment de la récolte :

Pendant cette période, deux facteurs sont à contrôler : le lavage et le séchage. Ces deux pratiques jouent un rôle important dans la prolifération fongique pendant l'entreposage.

II.1.4.Lutte et décontamination après récolte :

Les procédures appliquées au cours de la période d'entreposage constituent une barrière importante pour éviter l'exposition des consommateurs aux mycotoxines. Les procédés de décontamination doivent être efficaces sans rendre impropres à la consommation les denrées traitées. Ils doivent être simples à mettre en œuvre et peu coûteux puisque le traitement peut concerner des tonnages importants.

Afin de réduire les contaminations des aliments par les moisissures et leurs mycotoxines, de nombreux procédés biologique, chimique et physique ont été proposés (Doyle et al., 1982 ; O.M.S, 2002). Un procédé de décontamination des mycotoxines dans les denrées alimentaires doit permettre la destruction ou l'élimination de la toxine sans pour autant laisser de résidus toxiques et sans modifier la qualité nutritive et les propriétés technologiques de façon significative du produit (Park, 1993).

II.2.Principaux mycotoxines :

II.2.1.Les champignons producteurs d'aflatoxines :

II.2.1.1.Classification des champignons :

Les "Mycota" correspondent au règne fongique actuel au sens strict ayant une reproduction sexuée et produisant des spores non (ou uni) flagellées. D'après Hawksworth et al., In « Dictionary of Fungi (1995) », le règne des champignons est divisé en quatre divisions « phylum »: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, et Basidiomycota.

- Les Chytridiomycota produisent des spores mobiles uniflagellées.
- Les Zygomycota ont des spores non flagellées, et à thalle siphonné (Trichomycètes et Zygomycètes). Ils sont caractérisés par leur aptitude à fusionner leur mycélium pour former une gamétangie qui donnera des zygospores (Figure 1A).
- Les Ascomycota produisent des spores non flagellées sexuées, à thalle septé et formant en général 8 ascospores à l'intérieur dans des sacs appelés asques (8 ascospores de chaque asque). (Figure 1B).
- Les Basidiomycota produisent des spores non flagellées sexuées, à thalle septé et donnant en général 4 basidiospores à l'extérieur des sacs appelés basides (4 basidiospores de chaque baside). (Figure 1C).

La germination des ascospores ou des basidiospores donne des filaments cloisonnés. Ils ont également un mode de reproduction asexuée, qui implique la production de conidiospores.

Les Deuteromycota ou deutéromycètes "Champignons imparfaits" se reproduisent uniquement par voie végétative ne sont plus reconnus en tant que division autonome.

On place ces formes asexuées dans les divisions auxquelles appartiennent leurs phases sexuées (soit Ascomycota, ou Basidiomycota). Si la forme sexuée de ces divisions est inconnue, deux cas de figure se présentent :

- soit les données biochimiques ou moléculaires permettent d'attribuer ces champignons imparfaits à l'un ou l'autre de ces groupes ;
- soit on les conserve provisoirement dans un ensemble artificiel (sans valeur hiérarchique dans la systématique) dénommé "ensemble des champignons mitotiques".

II.2.1.2. Identification des moisissures :

L'identification des espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments est basée sur la comparaison des critères d'ordre morphologique (Caractères macroscopiques, et microscopiques), chimiotaxonomie, et écologique, après leur culture sur différents milieux appropriés (Guarro et al., 1999). L'identification moléculaire est souvent utilisée.

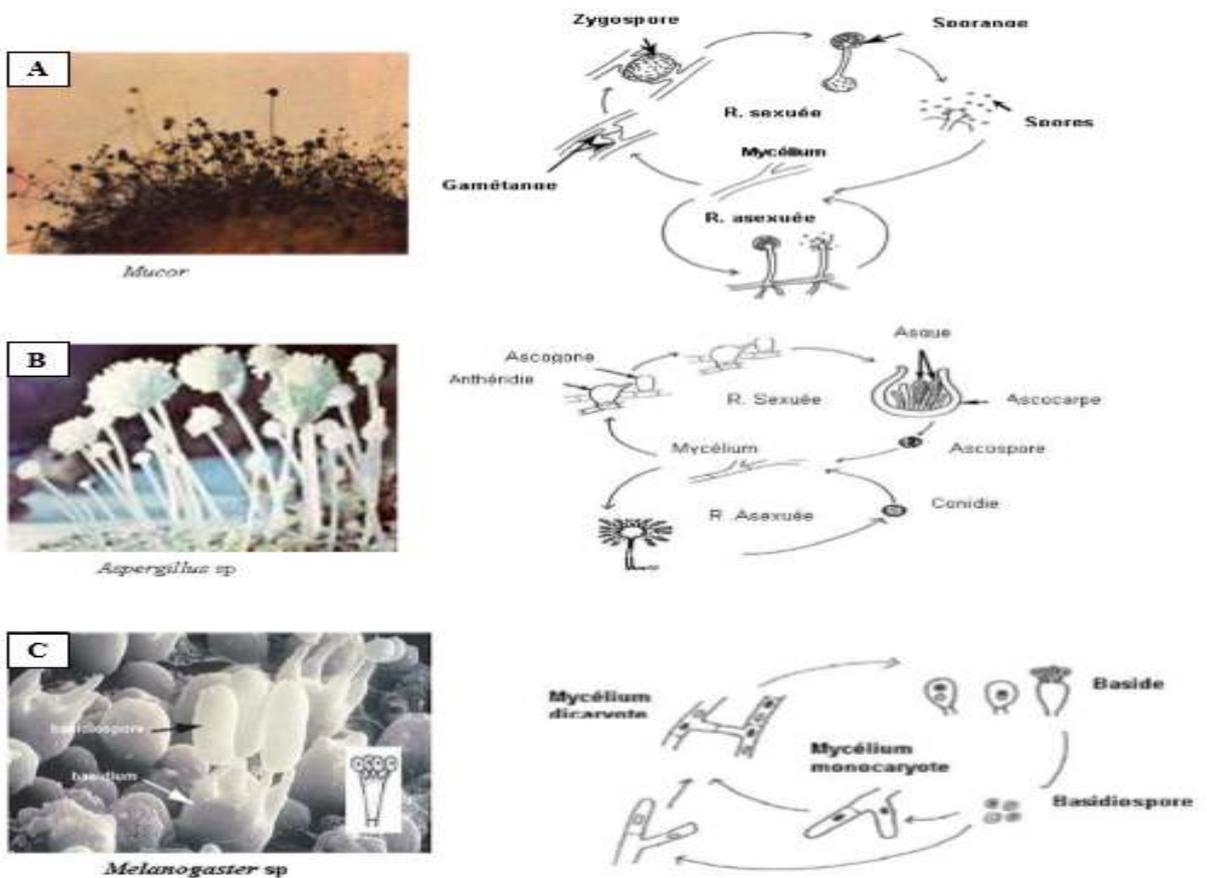


Figure 01. (A): Les zygomycètes, (B): Les ascomycètes, (C): les basidiomycètes (Azzoune 2009)

II.2.1.2.1. Caractères morphologiques :

L'observation de l'aspect de la colonie (couleur, texture), des septations, de la forme et du branchement des hyphes, des structures, de sporulation, et des spores sont une partie des caractères observés pour identifier correctement le champignon. Chaque espèce de champignon est caractérisée non seulement par sa couleur, son apparence et son mode de reproduction, mais aussi par ses exigences spécifiques d'ordre physiologique (ex. température de croissance) et écologique (substrat, conditions d'environnement). **(Riba, 2008)**

Cependant, ces critères ne suffisent pas à eux seuls pour identifier d'une manière précise certaines espèces de champignons toxigènes. C'est pourquoi, l'identification des principaux genres et espèces fongiques repose actuellement sur une approche de taxonomie polyphasique qui consiste à étudier non seulement les caractères morphologiques mais aussi les caractères chimiques (profil des métabolites), et moléculaires.

II.2.1.2.2. Caractères chimiques :

La détermination du contenu en métabolites secondaires notamment les types de mycotoxines produites font partie des critères étudiés pour l'identification des champignons toxigènes **(Samson et al., 2006; Frisvad et Samson, 2004; Varga et al., 2007)**. Dans les derniers travaux réalisés par **Pildain et al. (2008)** et publiés dans International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 12 métabolites ont été étudiés pour distinguer entre les différentes espèces du genre *Aspergillus* section Flavi. Ces métabolites sont: l'acide Kojique; AFB1; AFG1; CPA; acide aspergillique; asperfurane; parasiticolides; chrysogine; aflavarines; paspalinine et paspaline; aflatrems et aflavinines et nominine.

II.2.1.2.3. Caractères moléculaires :

Certaines espèces appartenant au même genre fongique ne peuvent être différenciées que par les outils moléculaires. Ainsi, depuis quelques années des méthodes d'identification basées sur des techniques de biologie moléculaire ont fait leurs preuves et se sont imposées par leur performance reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitent pas obligatoirement un examen morphologique **(Peterson, 2006 ; Hinrikson et al., 2005)**. Les méthodes moléculaires les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la région ITS La région ITS est formée de l'ITS1, de l'ADNr 5,8 et de l'ITS2. Elle est encadrée par les ARNr 18S et 28S **(Strachan et al., 1999)**

II.3. Le Genre Aspergillus :

II.3.1. Définition :

Les *Aspergillus* spp. Sont répartis dans la nature et ont une répartition géographique très large, mais ils sont plus souvent associés aux régions à climats chaudes (**Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002**). La plupart des *Aspergillus* sont des saprophytes, capables de se développer dans le sol, les débris, dans les composts et sur les végétaux malades. Ils contribuent à la biodégradation et le recyclage des matières organiques (**Scheidegger et Payne, 2003**). De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (**Morin, 1994**). *Aspergillus* colonise les végétaux déjà abîmés par des blessures, des piqûres d'insectes ou des attaques d'autres champignons, mais ils sont aussi présents sur les surfaces des graines, dans les mauvaises conditions de stockage. Plusieurs espèces de ce genre sont capables de produire des mycotoxines (**Scheidegger et Payne, 2003**).

Les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines (AFs), les ochratoxines (OTA) et la patuline. Ces mycotoxines ont été identifiées la première fois chez *A. flavus*, *A. ochraceus* et *A. clavatus*, respectivement (Smith et Moss, 1985). Actuellement 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 (**Pitt, 2000**).

II.3.2. Les caractères morphologiques d'identification du genre Aspergillus :

Les ouvrages intitulés «The genus *Aspergillus* » de **Raper et Fennell (1965)** et « Fungi and Food Spoilage » de **Pitt et Hocking (1997)**, constituent une référence pour l'étude des caractères morphologiques des *Aspergillus*. Ces champignons ont une forme caractéristique et des couleurs vives qui les rendent parfois aisément identifiables. L'identification morphologique des espèces appartenant au genre *Aspergillus* est basée sur l'observation des caractères macroscopiques et microscopiques.

II.3.2.1. Description macroscopique d'Aspergillus :

Selon **Raper et Fennell (1965)**, l'identification du genre *Aspergillus* est basée sur les critères suivants :

a)- 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 thermotolérant (*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 : gris-vert pour *Aspergillus* section *Fumigati*, vert-jaune pour *Aspergillus* section *Flavi*, brun cannelle pour *Aspergillus* section *Terrei*, jaune à ocre pour *Aspergillus* section *Circumdati*, noir pour *Aspergillus* section *Nigri* et blanche pour *Aspergillus* section *Candidi*

b)- La texture de la colonie : qui peut être floconneuse, veloutée, etc. Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. c)- Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (**Chermette, et Bussieras, 1993**). Il peut parfois être caractérisé une espèce.

c)- 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**). Les sclérotés ont de forme, de taille, et de couleur caractérisée.

d)-D'autres caractères d'ordre physiologique : comme la vitesse de croissance.

II.3.2.2. Description microscopique d'Aspergillus :

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. 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 2**) (**Raper et Fennell, 1965**). 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. L'ensemble vesicule + métules + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*.

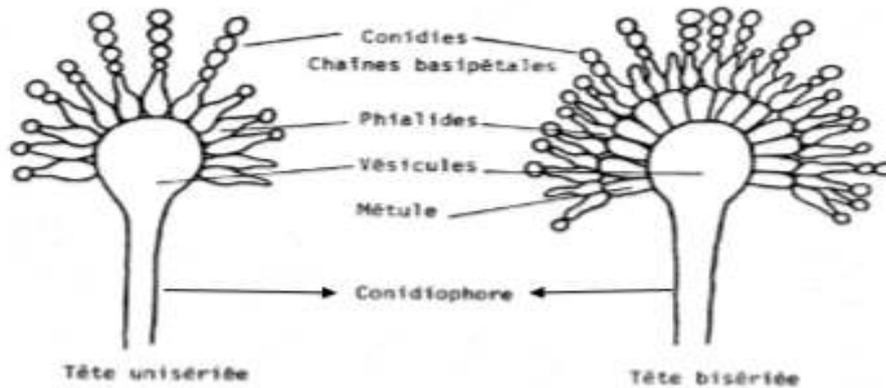


Figure 2. Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Azzoune 2009)

II.3.3. Systématique des espèces d'*Aspergillus* :

Aspergillus est un genre appartenant au phylum Ascomycota, Ordre des Eurotiales, famille des Trichocomaceae. Ce genre comprend des espèces asexuées et sexuées. Les formes sexuées (téléomorphes) sont classées parmi les ascomycètes et les espèces asexuées (anamorphes), parmi les deutéromycètes. L'étude des caractères physiologiques et biochimiques, ainsi que l'analyse des séquences d'ADN, ont permis de classer ces espèces asexuées parmi les formes sexuées correspondantes (Alexopoulos et al., 1996).

La classification du genre *Aspergillus* est actuellement organisée en sous genres et en groupes. Ces groupes ont été appelés «Sections» par Gams et al. (1985). Complétant les descriptions morphologiques (essentiels), l'analyse phylogénique des séquences de l'ADNr, entreprise par Peterson et al. (2000), a conduit à une classification aboutissant à un total de 18 sections (*Aspergillus*, *Restricti*, *Cervini*, *Terrei*, *Flavipedes*, *Nigri*, *Circumdati*, *Flavi*, *Cremeri*, *Candidi*, *Wentii*, *Fumigati*, *Clavati*, *Nidulantes*, *Versicolores*, *Usti*, *Sparsi*, *Ornatiet* « *Warcupiellagroup* ». Cette classification est la plus admise par la plupart des mycologues. Une analyse phylogénique des sections incluant les espèces productrices de mycotoxines (*Circumdati*, *Flavi*, *Nigri*, *Fumigati* et *Clavati*) a été effectuée par comparaison des séquences nucléotidiques du gène codant pour la protéine β -tubuline et pour l'ADNr.

Les résultats ont montré que des espèces phylogéniquement éloignées peuvent produire les mêmes mycotoxines (Varga et al. 2003, Samson et al., 2006). En effet, dans les conditions

de laboratoire, les AFs, l'OTA et la patuline sont produites par des espèces appartenant à des sections différentes. Sur la base de ces observations, il est permis de penser que le pouvoir producteur de mycotoxines serait perdu ou acquis plusieurs fois au cours de l'évolution.

II.3.4. Aspergillus section Flavi :

Les membres d'Aspergillus section Flavi occupent des niches écologiques très diverses. 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 (**Horn et Dorner,1998**). Les espèces de cette section sont capables de se développer à des températures comprises entre 10 et 48°C avec une température optimale de 30 °C (**Domsch et al., 1980**). Ils sont donc plus présents dans les régions tempérées chaudes comme les régions tropicales et subtropicales. Ces champignons peuvent se développer dans un milieu présentant une activité de l'eau (aw) située entre 0,78 et 0,80 avec un pH allant de 2,1 à 11,2 (**Ayerst, 1969 ; Olutiola, 1976**).

La section Flavi s'avère très importante en vue la diversité des denrées alimentaires qu'elle peut contaminer. Les AFs produites par les Aspergillus de la section Flavi sont généralement trouvées dans des nourritures en provenance de régions chaudes et humides ; elles ont été détectées dans les céréales, les produits à base de noix comestibles et de leurs dérivés (arachides, noix du Brésil, pistaches, amandes, noix, noix de pécan, noisettes), les graines d'oléagineux (coton, copra) et les produits qui en sont dérivés, les fruits secs, les figues et dans le lait.

II.3.5. Les espèces de la section Flavi et leurs mycotoxines :

Le groupe d'Aspergillus section Flavi renferme des espèces avec des têtes conidiennes de couleur jaune-vert à brun dont certaines produisent des sclérotés bruns foncés ou parfois jaunes ont décrit dans le groupe d'Aspergillus flavusneuf espèces et deux variétés. D'après **Samson et al. (2006)**, il y'a 18 espèces appartenant à la section Flavi. Ces espèces développent des couleurs allant du jaune-vert à brun. Seules trois espèces, *Petromycesalliaceus*, *P.albertensis* et *A. lanosus*, ont une morphologie semblable au groupe d'*A.ochraceus*avec des conidies jaunes à ocre. Ces trois (03) espèces ont été classées auparavant dans la section *Circumdati*mais les données de la biologie moléculaire ont permis leur reclassement dans la section Flavi.

La taxonomie des espèces de la section Flavi est compliquée de par : la grande similarité qui existe entre elles et en vue l'instabilité des différents caractères morphologiques qui caractérisent chacune d'elle. Donc, morphologiquement, il est très difficile de distinguer entre les différentes espèces appartenant à la section Flavi, c'est pourquoi la taxonomie de ce genre est actuellement basée sur une approche polyphasique (**Frisvad, et al., 2004**). Et sur les caractères moléculaires (séquençage de la région ITS1-ITS2, et β -tubulines). Ainsi, la caractérisation de certaines espèces nécessite l'étude des conditions de croissance, et du profil métabolique cité plus haut, Dans les derniers travaux réalisés **par Pildain et al. (2008)**, 12 métabolites ont été étudiés pour distinguer entre les différentes espèces du genre *Aspergillus* section Flavi. Ces métabolites sont : AFB1, AFG1, CPA, acide aspergillique, asperfurane, parasiticolides, chrysogine, aflavarines, paspalinine, aflatrems, nominine et l'acide Kojique (**Tableau 03**).

Tableau 03. Production d'AFs B et G, de CPA et d'autres métabolites par les espèces d'*Aspergillus* section Flavi (D'après Pildain et al., 2008).

Especies	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
<i>A. arachidicola</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>A. toxicartus</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>A. bombycis</i>	+	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. flavus</i>	+/-	-	+/-	+	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. minisclerotigenes</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>A. parvisclerotigenus</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+/-	-	-	+
<i>A. nomus</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>A. tamarii</i>	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. avenaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. leporis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. caelatus</i>	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

A: aflatoxine B1; *B*: aflatoxine G1; *C*: acide cyclopiazonique; *D*: acide aspergillique; *E*: asperfurane; *F*: parasiticolides; *G*: chrysogine; *H*: aflavarines; *I*: paspalinine; *J*: aflatremes; *K*: nominine. *L*: acide Kojique ; + : Présence ; - : Absence ; +/- : Présence ou Absence.

L'analyse des séquences ITS des isolats a montré qu'*Aspergillus* section Flavi forme 3 clades (*A. alliaceus*, *A. flavus*, et *A. tamarii*) qui peuvent être distingués par la couleur des colonies et leur composition en ubiquinones (Rigó et al., 2002; Samson et al., 2006). On peut distinguer morphologiquement deux catégories d'isolats d'*A. flavus*. La première catégorie produit des grands sclérotés, de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400 µm. La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de type « S » (Small), de diamètre inférieur à 400 µm

(Cotty, 1989). Selon Geiser et al. (1998, 2000), Et Vaamonde et al. (2003), *A. flavus* est divisé en deux groupes non distincts morphologiquement.

Le groupe I comprend les types « L » et « S » producteur d'aflatoxine B et le groupe II comprend uniquement le type « S » capable de produire les AFs B et G. Ces auteurs ont suggéré que les isolats de type « S » (groupe II) méritent d'être considérés comme une nouvelle espèce (Geiser et al., 2000). D'après Hua Sui-Sheng (2002), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le type « L » comprend des producteurs et des non producteurs.

Le CPA est composé dérivé des acides aminés produite par certaines souches d'*A. flavus* et par *Penicillium* spp. Dont il a été isolé pour la première fois. Le CPA est un indole acide tetramique (Figure 4) et est toxique pour l'homme et l'animal. Les AFs et le CPA peuvent être retrouvés dans les mêmes produits alimentaires.

La production de AFs est extrêmement variable (Horn et Dorner, 2002). Certaines isolats de type « S » peuvent produire en plus du CPA les 4 AFs (B1, B2, G1 et G2) (Geiser et al., 2000); Cordwell et Cotty, 2002). Par contre, *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent les quatre types d'AFs (B1, B2, G1 et G2) mais pas le CPA (Dorner et al., 1984; Varga et al., 2003).

Dans cette section, *A. flavus* et *A. parasiticus* retiennent le plus d'attention car elles sont non seulement pathogènes pour certaines plantes (arachides, maïs et coton), mais elles produisent les aflatoxines (Smith et Moss 1985). De plus, ce sont les espèces les plus fréquentes. Les espèces non productrices d'aflatoxines telles que *A. oryzae*, *A. sojae* et *A. tamarii* sont utilisées dans les processus de fermentation (Geiser et al., 1998).

II.3.5. 1. *Aspergillus flavus* :

Etant donné sa dominance et son importance dans la production d'aflatoxines, nous décrivons ci-après les caractères d'*A. flavus*. Cette espèce se caractérise par un thalle vert jaune à vert olive, floconneux, plus dense vers le centre, lâche en périphérie. Des colonies granuleuses sur Malt Agar (MA) montrant un revers incolore à beige clair, fertile sur toute la surface alors que sur milieu Agar (AFPA), un revers orange caractéristique est observé. Les têtes aspergillaires ont une vésicule hémisphérique (25 à 60µm de diamètre). Ces têtes sont uni ou bisériées, selon leur degré de maturation radiées, de couleur vert jaune à vert olive. La vésicule est sphérique entièrement recouverte ou au trois quart, donnant des phialides verdâtres, de dimensions (6-10 µm x 4-5.5µm) à disposition radiaire ou en colonne. Les

conidies gris pâle sont subsphériques à éllipsoïdales, échinulées et mesurent 3 à 4.5µm de diamètre. Les conidiophores sont longs (jusqu'à 1mm de longueur) et les plus âgés sont rugueux. Morphologiquement, on peut distinguer deux catégories d'isolats. La première catégorie produit les sclérotos, de type « L » et la seconde catégorie produit les sclérotos de type « S ».

II.3.5. 2. Aspergillus parasiticus :

Cette espèce se caractérise par un thalle vert jaune sombre, floconneux et des colonies granuleuses et denses sur Malt Agar (MA), au revers incolore à beige clair. Le conidiophore de taille de 250-500µm de couleur marron pâle à paroi échinulée. Les têtes aspergillaires sont majoritairement unisériées caractérisées par des vésicules sphériques de 30-35 µm de diamètre recouverte au trois quart, donnant des phialides verdâtres de 7-11µm portant des conidies sphériques de 4-6µm de diamètre à disposition radiaire ce qui la diffère parfois d'A.flavus caractérisée par des conidies plus petites. Les mycotoxines produites par cette espèce sont les AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 (Pitt et Hocking, 1997).

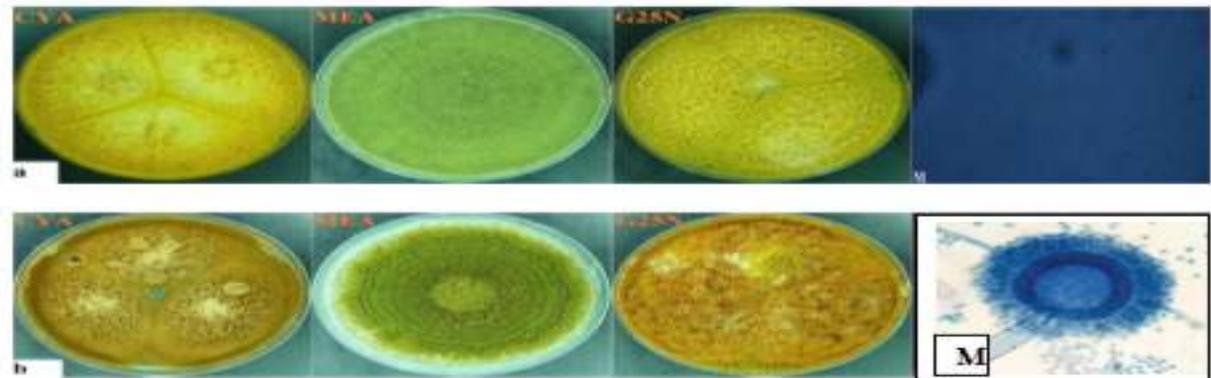


Figure 03. Photo des espèces : (a), *Aspergillus parasiticus*, et (b) *A. flavus* sur les milieux standards d'identification au 7ème jour, milieu CYA : Czapek yeast extract agar, 37°C ; milieu G25N : 25% glycerol nitrate agar, 25°C ; milieu MEA : Malt extract agar, 25°C ; (M) aspect microscopique d'*Aspergillus flavus* (Gr.x40) (Chetatha, 2013)

III.1. Les aflatoxines :

III.1.1. Origine :

En 1960, aux environs de Londres, des élevages de dindonneaux sont atteints d'une grave intoxication, appelée autrefois « maladie X des dindons », provoquée par l'ingestion de tourteaux d'arachide en provenance du Brésil (**Bradburn et al., 1994**). Pour la première fois, la relation a été établie entre une intoxication et la présence d'une moisissure produite par *Aspergillus flavus* colonisant les graines d'arachide. Ce fut le début d'une série de recherches qui aboutit en 1965 à l'isolement et à la caractérisation de la structure des AFs (**Asao et al., 1963 et 1965**). Cinq ans plus tard, la molécule d'OTA a été découverte en Afrique du Sud. Plus de 400 mycotoxines sont actuellement identifiées à l'échelle internationale, elles sont produites par quelques 200 variétés de champignons toxiques. (**Zinedine, 2009**)

A l'état actuel, on connaît, du point de vue structure, au moins 16 AFs (**Cole et Cox, 1981**) dont les principales sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, et AFM2. Les aflatoxines M1 et M2, dérivés respectifs des aflatoxines B1 et B2, apparaissent dans le lait et ses dérivés. Ces aflatoxines ont tenu leur appellation du fait de leur détection dans le lait « Milk » des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (**Jaquet, et al., 1982**). Certaines souches de moisissures sont capables de synthétiser les aflatoxines M directement dans une alimentation moisie (**Bullerman, 1978**). Il a été démontré que l'aflatoxine M1 peut contaminer le lait maternel humain (**El-nezami et al., 1995; Galvano et al., 1996**).

III.1.2. Structures et propriétés physico-chimiques :

La structure des AFs B1 et G1 ont été déterminés par **Asao et al., (1963 ; 1965)**. Les AFs sont des composés organiques de nature non protéique. Elles sont caractérisées au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (Aflatoxine B) ou des lactoeshexatomiques (Aflatoxine G). Toutes les AFs se rattachent à l'un de ces deux types de structure et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur les noyaux. (**El khoury, 2007**) Les AFs B2 et le G2 sont des dérivés dihydroxylés du même composé. (**Figure 4**)

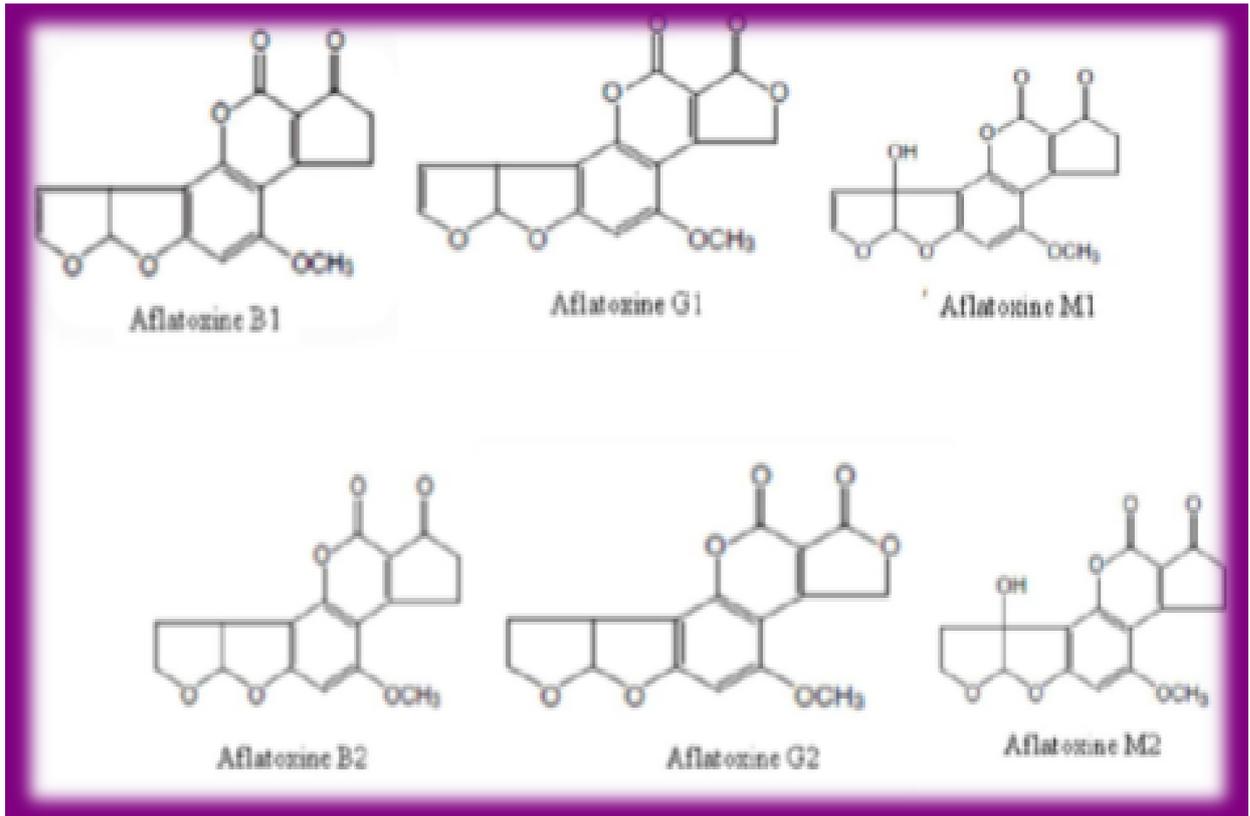


Figure4 .Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2 (Dutto netal., 1985).

Les AFs sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), leur stabilité est très variée : dans l'eau elles sont généralement peu solubles (10–20 mg /L) présentant une instabilité totale dans les solvants non polaires (Cole et Cox, 1981). Par contre elles sont très solubles dans les solvants organiques de polarité moyenne (CHCl₃, CH₃OH, DMSO) (Cole et Cox, 1981). Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous la lumière ultra-violette. La fluorescence intense des AFs, une fois exposées à des longueurs d'ondes ($\gamma = 365$ nm) de la lumière ultra-violette (U.V.), a pour avantage de détecter ces composés à des niveaux extrêmement bas (de l'ordre du nanogramme). L'aflatoxine de type B (AFB=AF <Bleue>) donne une fluorescence bleue, l'aflatoxine de type G (AFG=AF< green>), donne une fluorescence verte et l'aflatoxine M1 donne une fluorescence bleu-violette, cette fluorescence fournit la base pour pratiquement toutes les méthodes physico-chimiques de leur détection et leur quantification.

Les AFs se trouvent instables sous la lumière ultraviolette en présence d'oxygène avec des pH extrêmes (pH<3 ou pH>10). Par oxydation le cycle lactone des AFs devient sensible à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer. (Cole et Cox, 1981). Les

AFs sont aussi dégradés 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). Les propriétés physico-chimiques des principales AFs sont récapitulées dans le (tableau4).

Tableau 4. Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines (Dutton et al., 1985).

Aflatoxine	Formule brute	Masse molaire	Point de fusion	Absorption maximale a la lumière UV dans le méthanol	
				Coefficient d'extinction molaire à 265 nm	à 360- 362 nm
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3	268– 269	12 400	21800
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3	286– 289	12 100	24000
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	244– 246	9 600	17700
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	237– 240	8 200	17100
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	299	14 150	21250
M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12 100 (264 nm)	22900(375nm)
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230– 234	10 800 (261 nm)	14100 (325 nm)

III.1.3. Contamination en AFs des denrées alimentaires :

Les aflatoxines sont associées principalement à des denrées alimentaires d'origines subtropicale et tropicale. Elles contaminent surtout les arachides, les pistaches, les amandes, mais aussi les graines de coton et de tournesol, ainsi que certaines céréales (maïs, blé, sorgho) et leurs produits dérivés. Les aflatoxines peuvent également être retrouvées dans les épices (piment rouge, poivre), les fruits secs et le tabac (Vargas et al., 2001).

Dans le (Tableau 5) sont présentées quelques données concernant la contamination des aliments par les aflatoxines dans le monde.

Tableau 5. Présence des aflatoxines dans des matières premières et des produits d'origine végétale pour différents pays.

Pays	Produit	Toxine	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Argentine	maïs	AFB1	50	Nepote, 1997
		AFB2	30	
Bostwana	sorgho	aflatoxines	0,3	Siame, 1998
Brésil	maïs	AFB1	0,2-129	Vargas, 2001
Corée	riz	AFB1	4,3	Park, 2005
Etats Unis	maïs	aflatoxines totales	0-35	Abbas, 2002
Ethiopie	blé orge sorgho	AFB1	26	Ayalew, 2006
France	maïs	AFB1	4-34	Garon, 2006
Grand Bretagne	riz	AFB1	28	Scudamore,
Inde	maïs	AFB1	0-26,8	Janardhana, 1999
Indonesie	maïs	aflatoxines totales	119	Ali, 1998
Kenya	maïs	AFB1	52.91	Lewis, 2005
Nigeria	maïs	AFB1	22	Bankole, 2004
Pologne	avoine	aflatoxines totales	5-1140	Juszkiewicz, 1992
	blé maïs			
Turquie	avoine blé maïs orge seigle	aflatoxines totales	0.03–3.16	Baydar, 2005

	soja	AFB1	0,94	
Vietnam	maïs	28	28	Wang, 1995

L'aflatoxine B1 présente dans les aliments ingérés par des vaches laitières est partiellement métabolisée au niveau hépatique et transformée en son dérivé 4-hydroxy, connu sous le nom d'aflatoxine M1 qui est excrétée dans le lait. Cette molécule est stable et peut ensuite être retrouvée dans les produits à base de lait (yaourts, fromages).

III.1.4. 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'AFs 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. **(Zinedine, 2009).**

III.1.5. Profil toxicologique des aflatoxines :

L'AFB1 est la plus toxique suivie, par ordre décroissant de toxicité, par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2. La toxicité des AFs G1, B2 et G2 sont respectivement 50, 80 et 90 % moindre que celle de l'AFB1 **(Cole et Cox, 1981 ; Terao et Ueno, 1978)**. L'aflatoxine provoque des toxicités aiguës au niveau de cellules divulguées comme suit :

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

- 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., 1982**).
- 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 (**Kumagai et al., 1995**). D'autres études effectuées sur le rat ont montré également que l'aflatoxine se lie à l'albumine plasmatique (**Wild et al., 1986**).

III.1.6. Effets toxiques des aflatoxines :

Les aflatoxines comptent parmi les substances naturelles ayant un potentiel cancérigène et mutagène le plus élevé. Concernant la toxicité chronique, des études épidémiologiques réalisées dans le monde ont clairement établi l'implication de l'AFB₁ dans l'étiologie du cancer primaire du foie chez l'homme (**Wogan, 2000**). Ils ont montré aussi que les risques liés au développement du cancer du foie sont 30 fois plus élevés chez les individus ayant des antécédents d'hépatites B (**Henry & Bosch, 2001**). Cette situation est souvent rencontrée dans les pays en voie de développement, pour lesquels il n'existe pas de législation régulant les concentrations d'aflatoxines dans l'alimentation, et dans lesquels la vaccination contre l'hépatite B n'est pas appliquée de façon systématique pour des raisons économiques et/ou politiques.

D'après **Pfhol-Leszkowicz & Castegnaro (2002)**, l'AFB₁ est un très puissant cancérigène hépatique, alors que l'AFG₁ induit plutôt des tumeurs rénales. L'apparition de ce type de tumeurs paraît liée non seulement à l'ingestion de produits très contaminés, mais aussi à la sous-alimentation, aux carences vitaminiques et protéiques, ainsi qu'à l'hépatite B, fréquentes dans les populations concernées.

Bien que la toxicité aiguë des aflatoxines soit rarement observée chez l'homme, des épidémies suite à l'ingestion d'aliments fortement contaminés ont été rapportées récemment dans les pays d'Afrique, en Inde et en Malaisie. La dernière épidémie d'intoxication par des aflatoxines a eu lieu en 2004 au Kenya et a été attribuée à l'ingestion de maïs très contaminé (**CDC, 2004**).

En effet, les effets des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique de l'animal, le mode d'administration, la composition de l'alimentation. L' AFB_1 est la plus toxique suivie, par ordre décroissant de toxicité, par l' AFM_1 , l' AFG_1 , l' AFB_2 et l' AFG_2 . La toxicité des aflatoxines G_1 , B_2 et G_2 sont respectivement 50, 80 et 90 % moindre que celle de l' AFB_1 (Cole & Cox, 1981).

Ingérée en grande quantité, l'aflatoxine peut être responsable de toxicités aiguës. Elle se caractérise généralement par la mort rapide des animaux. Ils présentent alors un foie décoloré et augmenté de volume (hépatotoxicité), les reins présentent des signes de glomérulonéphrite et les poumons sont congestionnés. Les aflatoxines sont tératogènes (Arora *et al.*, 1981). L'effet tératogène est bien décrit chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de développement, une microcéphalie, une anophthalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (Vesely *et al.*, 1983).

L'exposition chronique aux aflatoxines est responsable du cancer chez diverses espèces animales. En effet, l' AFB_1 , mais également le mélange des quatre aflatoxines (B_1 , B_2 , G_1 et G_2) induisent des tumeurs hépatiques chez le canard, la truite, le saumon et le singe (AFSSA, 2006). Toutefois, la propriété toxique majeure de l' AFB_1 est son pouvoir cancérigène. En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez les hommes et les animaux. Le Centre international de la recherche sur le cancer a classé les aflatoxines (mélanges naturels des quatre aflatoxines) dans le groupe 1 (cancérogène humain) et l' AFM_1 dans le groupe 2B (cancérogène humain probable) (Autrup *et al.*, 1991) (CIRC, 2002 a).

III.2.Les ochratoxines :

III.2.1.Origine :

L'ochratoxine A a été isolée 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). L'OTA est un métabolite secondaire élaboré par diverses moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. La production d'OTA est liée aux conditions de température, d'humidité ambiante, et de teneur en eau du support contaminé (A_w) (Pitt, 1988). La température optimale de production de l'OTA par *A. ochraceus* est de 28 °C, alors que *P. viridicatum* produit dans une gamme de température qui varie de 4 à 30 °C (Mislivec & Tuite, 1970). Dans les régions froides, l'OTA est donc plutôt produite par des *Penicilliums*, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les *Aspergillus* qui la synthétisent (Miller, 1995;

Pohland *et al.*, 1992). En Europe et au Canada, *P. verrucosum* est considéré comme la principale moisissure productrice d'OTA dans les céréales (**JECFA, 2001**). L'OTA est produite dans le café ou les raisins par des *Aspergillus*.

III.2.2. Structure et propriétés physico chimique :

La famille des ochratoxines comprend une dizaine de molécules connues, mais l'ochratoxine A est le représentant le plus important. La formule brute de l'OTA est $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Elle est constituée d'une molécule de 3-méthyle-5-chloro-8-hydroxy-3,4 dihydro- isocoumarine liée par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyle en C7, au groupement amine de la L- β -phénylalanine. La structure chimique générale des ochratoxines et celle de l'OTA sont illustrées dans la figure 14. Le groupe

isocoumarine dans la molécule d'OTA est un squelette de pentakétide formé à partir d'acétate et de malonate par le biais du métabolisme des polycétones. La portion hétérocyclique est structurellement liée à la melléine, un métabolite fongique assez répandu. L'atome de chlore est incorporé dans le pentacétone par l'action d'une chloropeptidase. La L-phénylalanine provient du métabolisme de l'acide shikimique et est liée à la structure générale à travers le groupement carboxyle (**Moss, 1996**).

L'OTA de masse moléculaire de 403,8 g/mol est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1. A pH acide ou neutre, elle est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau. A pH alcalin, elle devient soluble et stable en solution aqueuse. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire (ϵ) de 5500 /mol/cm dans le méthanol. Son spectre d'absorption U.V. varie avec le pH et la polarité du solvant.

En raison de sa structure, l'OTA se révèle stable et résiste généralement aux procédés de transformations industrielles. Il existe d'autres 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. L'OTA étant à la fois la plus toxique et la plus répandue.

III.2.3. Contamination des aliments :

L'ochratoxine A est retrouvée essentiellement dans les céréales (blé, maïs, seigle, orge,avoine...), mais aussi dans le riz, le soja, le café, le cacao, les haricots, les pois, les

cacahuètes et les fruits secs (figues, raisins). Elle est présente aussi dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain, les pâtes (**Majerus *et al.*,1993**), dans la bière (**El-Dessouki, 1992**) et même dans le vin et les jus de raisin (**Zimerli et Dick, 1996**).

Contrairement aux aflatoxines, retrouvée plus souvent dans des céréales issus des régions chaudes, l'ochratoxine A est retrouvée dans les céréales de toutes les régions car elle peut être produite par l'*Aspergillus ochraceus* dans les régions chaudes et par les *Penicillium* dans les climats tempérés (**Tableau 6**).

L'ochratoxine A, se retrouve dans les aliments composés pour les animaux, conséquence d'utilisation de matières premières contaminées ou de mauvaises conditions de stockage. Cette mycotoxine a été retrouvée à des niveaux pouvant atteindre 30 µg/kg dans les aliments composés pour les porcs (Dalcero *et al.*, 2002) et jusqu'à 25 µg/kg dans les aliments composés pour les porcs, les volailles et les lapins produits en Argentine (**Magnoli *et al.*, 1998**).

Les produits alimentaires à base de céréales contiennent parfois de l'ochratoxine A ; les quantités retrouvées sont en générale faibles (**Ngundi *et al.*,2006**). Les *Aspergillus* et les *Penicillium* prolifèrent le plus souvent en surface des grains et une grande quantité de mycotoxine est éliminée pendant les processus technologiques.

Tableau 6. Présence de l'ochratoxine A dans les grains de céréales pour différents pays.

Pays	Echantillon	Niveau de Contamination (µg/kg)	Références
Corée	riz	3,9	Park, 2005
Côte d'Ivoire	Millet	3-1738	Sangare-Tigori, 2006
	maïs	9-92	
	riz	0,6-64	
Croatie	maïs	1,47	Domijan, 2005
Ethiopie	blé orge	54,1	Ayalew, 2006

CHAPITRE III : LES AFLLATOXINES ET OCHRATOXINE

	sorgho		
Etats Unis	Blé	60	Ngundi, 2006
	orge	85	
Grand Bretagne	maïs	2	Scudamore, 1998a
	riz	3-12	Scudamore, 1998b
	maïs	1,5	Scudamore, 2000
	blé orge avoine	5,2-231	MacDonald, 2004
Houngarie	blé	0,3-62,8	Fazekas, 2002
	maïs	1,9-8,3	
	orge	0,14-212	
Inde	maïs	0-20	Janardhana, 1999
Italie	blé	0-4,07	Castoria, 2005
Lituanie	blé	1,77-3,19	Baliukoniene, 2003
	orge	0,37-0,92	
Maroc	riz	0,02-32,4	Zinedine, 2007
Pologne	blé	0,5	Krysinska-Traczyk, 2001
Portugal	riz	0,09-3,52	Pena, 2005
Russie	blé, seigle, orge, avoine	200-33300	Aksenov, 2006
Turquie	blé	0,36-2,23	Baydar, 2005
	maïs	0,47	

	riz	0,27	
	soja	0,57	
	avoine	4,07	
	seigle	3,69	
	orge	3,45	

Les figues et raisins secs (*Zinedine et al., 2007b* ; *Tjamos et al., 2006*), les arachides

(*Zinedine et al., 2007b*), le café (*Fujii et al., 2006* ; *Fazekas et al., 2002*; *Robledo et al., 2001*) sont souvent contaminés par l'ochratoxine A. On trouve aussi des petites quantités de cette mycotoxine dans les pommes de terre et les lentilles (*Baydar et al., 2005*). Ces données de décontamination sont présentées dans le **Tableau.7**

Tableau 7. Présence de l'ochratoxine A dans des produits végétaux

Pays	Produit	Niveau de Contamination (µg/kg)	Références
Brésil	café	0,84-7,3	Fujii, 2006
Grèce	raisins	16-25	Tjamos, 2006
Hongrie	café	0,17-1,3	Fazekas, 2002
Maroc	figues séchés	0,01-1,42	Zinedine, 2007b
	raisins séchés	0,05-4,95	
	arachides	0,1-2,36	
Mexique	café vert	30,1	Robledo, 2001
Portugal	café	0,2-7,3	Martins, 2003
Tunisie	raisins	0,59-2,57	Lasram, 2007

Turquie	pommes de terre	0,32	Baydar, 2005
	lentilles	0,83	

L'ochratoxine A a aussi pu être retrouvée dans les abats et les viandes d'animaux recevant des aliments contaminés (**Jorgensen, 1998**). Elle a été mise en évidence dans le sang et les tissus des animaux d'élevage où elle s'accumule au niveau rénal et hépatique (**Terplan et Wenzel, 1993 ; Mac Donald *et al.*, 1993 ; Gareis, 1996**).

III.2.4.Effets toxiques des ochratoxines :

La présence d'OTA dans les aliments représente un danger pour la santé humaine et animale. Chez les animaux, l'OTA est clairement cancérigène au niveau du rein (**Pohland *et al.*, 1992 ; Marquardt & Frohlich, 1992**). Toutefois, la toxicité de cette mycotoxine peut varier en fonction de l'espèce, du sexe, de la voie d'administration. Plusieurs auteurs ont décrit un cas d'intoxication aiguë par inhalation d'*A. ochraceus*, ayant provoqué une atteinte rénale (oligurie et tubulonécrose) (**Di Paolo *et al.*, 1993 ; Pohland *et al.*, 1992; Marquardt & Frohlich, 1992**). L'OTA est aussi très facilement et rapidement absorbée par le tractus respiratoire (**Breitholz-Emanuelsson *et al.*, 1995**).

L'exposition à de faibles doses d'OTA est à l'origine de néphrotoxicité et de cancers des voies urinaires. L'OTA est potentiellement néphrotoxique chez toutes les espèces testées, à l'exception des ruminants adultes (**Ribelin *et al.*, 1978**). Des études effectuées au Danemark, en Hongrie, en Scandinavie et en Pologne, ont montré que l'OTA peut jouer un rôle majeur dans l'étiologie de la néphropathie porcine. Des lésions rénales chez le poulet ont aussi été associées à l'ingestion de cette mycotoxine (**Hamilton *et al.*, 1982**).

L'OTA administrée à divers animaux provoque des effets variables au niveau de la moelle osseuse et de la réponse immunitaire. Elle peut être à l'origine de lymphopénie, de régression du thymus et de suppression de la réponse immunitaire (**Singh *et al.*, 1990, Lea *et al.*, 1989, Luster *et al.*, 1987**). Cette molécule est tératogène chez l'animal. Elle provoque des anomalies morphologiques diverses chez le rat, la souris, le hamster, le porc et les embryons de poulet

Celles-ci incluent une mortalité foetale augmentée, des malformations foetales, une perte de poids des foetus, une proportion anormale de foetus présentant des hémorragies, une

réduction de la taille des portées et des retards de croissance, anomalies des viscères et du squelette (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Chez l'homme, l'OTA a été rapportée néphrotoxique, hépatotoxique, tératogène et immunosuppressive. Le mécanisme par lequel cette toxine induit des cancers n'est pas totalement élucidé. L'implication étiologique de l'OTA dans la néphropathie endémique des Balkans (NEB) a été évoquée dès 1976 (Petrova-Bocharova *et al.*, 1988 ; Krogh, 1987) et étudiée par diverses équipes de recherche. Cette affection semble être multifactorielle (Toncheva *et al.* 1998) et le rôle de l'OTA reste encore incertain (Pfohl-Leszkowicz *et al.* 2002). Des questions se posent toujours quant à l'origine et la signification toxicologique de la présence d'OTA à faible dose dans le sang humain et dans le lait maternel. L'OTA a été classée en 1993 par le CIRC comme "potentiellement cancérigène pour l'homme" (groupe 2B) (CIRC, 1993 b).

Néanmoins, l'OTA a été longtemps considérée comme non génotoxique car ne répondant pas au test classique de mutagénicité. En effet, les tests d'Ames, effectués sur différentes souches classiques de *Salmonella typhimurium* sont négatifs (Würgler *et al.*, 1991; Von Engel *et al.*, 1976). L'OTA n'induit pas d'inhibition de la croissance chez différentes souches de *Bacillus subtilis* testées (Ueno & Kubota, 1976) et aucune recombinaison mitotique n'est observée chez *Saccharomyces cerevisiae* après un traitement des cultures par l'OTA (Kuczuk *et al.*, 1978)

III.2.4.1. Acide cyclopiazonique (CPA) :

L'acide cyclopiazonique (CPA) est une toxine produite par certaines souches d'*A. flavus*. Le CPA est un indole acide tetramique (**Figure 5**) toxique pour l'Homme et l'animal. En effet, il provoque des lésions du foie, des reins, du pancréas et du coeur (Purchase, 1971). Les aflatoxines et le CPA peuvent être retrouvés dans les mêmes produits alimentaires. Ces deux mycotoxines ont d'ailleurs été isolés dans les tourteaux d'arachides ayant provoqué la « maladie X du dindon » (Dorner *et al.*, 1983; Horn et Dorner, 1999). *Aspergillus flavus* produit généralement les aflatoxines de type B1 et B2 et l'acide cyclopiazonique (CPA), mais la production de ces toxines est extrêmement variable (Horn et Dorner, 2002). Certaines isolats de type « S » peuvent produire également (en plus de B1 et B2) les aflatoxines G1 et G2 (Geiser *et al.*, 2000; Cardwell et Cotty, 2002). Par contre, *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent les quatre types d'aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) mais pas le CPA comme le montre le (tableau 4) (Dorner *et al.*, 1983; Horn *et al.*, 1996 ; Varga *et al.*, 2003).

Généralement, *A. parasiticus* est fortement productrice 13 d'aflatoxines, et des isolats non producteurs sont rares chez cette espèce (Horn *et al.*, 1996; Tran- Dinh *et al.*, 1999).

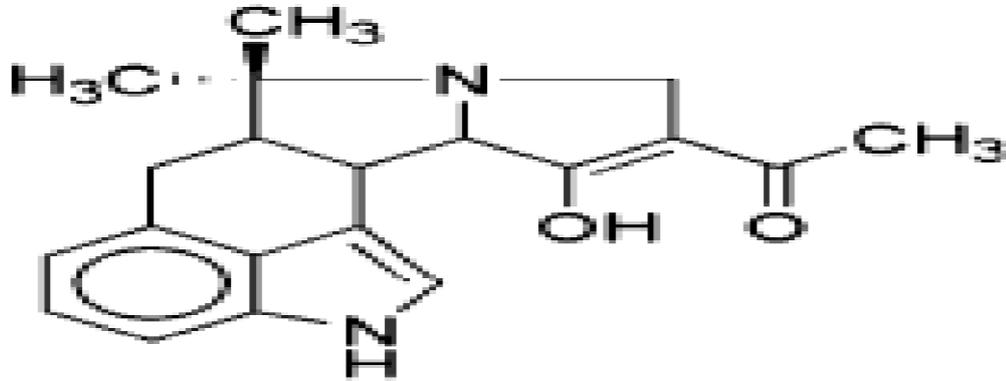


Figure 5. Structures chimiques de CPA (Riba, 2008).

III.3. Réglementation :

Depuis une dizaine d'années la prise de conscience du risque sanitaire associé à la présence de mycotoxines dans les aliments se généralise (Van Egmond, 1991). 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.

III.3.1. Réglementation des aflatoxines :

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, les fruits à coque et les produits dérivés (Journal officiel N°06/2007 du 11 octobre 2006). En fixent les LMR (limite maximale de résidus) dans les produits d'alimentation humaine et de 10µg/Kg pour l'aflatoxine B1 et de 20 µg/Kg pour la somme des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 (Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003, étude FAO alimentation et nutrition 81). Et d'après le directeur central des laboratoires au niveau de la DGCERF/Ministère du commerce Algérie, de la conférence du 3ème congrès maghrébin sur les toxi infections alimentaires (TIA3 avril 2013) à l'université de Constantine, à parler des risques liés aux mycotoxines vis-à-vis des produits alimentaire à large consommations et d'origine de l'importation c'est

pour cela qu'ils ont fixées les teneurs maximales de l'aflatoxine B1 de 20 µg/Kg dans les arachides et les amandes car ils sont la base de fabrication de beaucoup de gâteaux traditionnelles et de confiseries utilisés par les familles algérienne aux différents occasions des cérémonies et fêtes religieuse. Les limites maximales tolérées d'aflatoxines dans les produits d'alimentations humaine et animale en Algérie (FAO, 2004) sont données dans le (Tableau8).

Tableau 8. Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003), (F.A.O, 2004) a.

Produits	Somme des Mycotoxines	Limite (µg/kg)	Méthode d'échantillonnage	Méthode d'analyse
Produits d'alimentation humaine				
Arachides, fruits à coque, céréales	Aflatoxine B1	10	Non officielle	Officielle (DZ) ^b
	AFs B1, B2, G1 et G2	20		
Produits d'alimentation animale				
Aliments pour bétail	Aflatoxine B1	20	Non officielle	Officielle (DZ) ^c

^aLes données ont été fournies par le Ministère du commerce algérien.

BAOAC (1990). 986.22. Aflatoxins in peanuts and peanuts products – CB method Food and Drug Laboratories– Canada – Best food method.cDZ2 NF-VF (1980). Animal feed – aflatoxins measurement B1, June 1980:18-200

II.3.2. Réglementation relative à l'ochratoxine A:

Dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, des teneurs maximales ont été fixées pour l'OTA (tableau 7). La présence d'ochratoxine A a également été constatée dans, le cacao, produits de base de cacao et les épices. Certains signes

récents attestent qu'aucune mesure préventive et aucun contrôle officiel, ne sont en place pour contrôler la présence d'OTA dans ces produits. Dans un souci de protection de la santé publique, Il convient de poursuivre la surveillance de la présence d'OTA dans ces denrées alimentaires pour lesquelles aucune teneur maximale n'a été fixée et, si des teneurs en OTA anormalement élevées devaient être constatées de manière répétée, il pourrait être jugé opportun d'en fixer une. Il y a donc lieu de modifier le règlement (CE) n° 1881/2006 en conséquence. 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.

IV. MATERIEL ET METHODES :

IV.1.MATERIEL :

IV.1.1. La farine du blé tendre :

Dans cette étude nous avons travaillé sur des échantillons de la farine, matière première tel que le blé tendre, prélevés au niveau des unités de fabrication de semoulerie de l'usine AMOUR qui situe à **Mouzaia - Blida**. Durant une période de juin 2016-janvier 2017

Les produits est en majorité importés. L'Office National (pccls) étant l'unique importateur étatique à l'échelle Nationale et assure l'approvisionnement en matière première, relevant des Groupe Avicoles Centre, Est et Ouest. La matière première est acheminés en vrac vers les divers Unités. Cette matière première est stockée dans des silos, puis transformée en produits finis tels que farine supérieur et farine panifiable. Ces dernières sont commercialisés dans des sacs en carton de 1, 5, 25 et 50 kg (**Figure 06**).



Figure 06. Le stockage d'aliment composé farine dans des sacs en carton au niveau D'usine AMOUR préparé pour la commercialisation.

IV.1.2. Les milieux de cultures :

Les milieux de cultures utilisés pour les isolements et l'identification morphologique des principaux genres et espèces fongiques ainsi que pour la production des aflatoxines et de l'ochratoxine A sont les suivants :

- Milieu DRBC (Dichloran, Rose Bengale, Chloramphénicol), utilisé pour l'isolement et l'identification des champignons (**King *et al.*, 1979**).
- Milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar), utilisé pour la conservation des souches (**Raper et Fennell, 1965**).
- Milieu CAM (Coconut Agar Medium), utilisé pour la mise en évidence du pouvoir producteur d'AFs par les isolats *Aspergillus* section *Flavi*(**Davis *et al.*, 1987**).
- Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar), utilisée pour l'identification morphologique des principaux genres et sections fongiques ainsi pour la production d'OTA (**Pitt et Hocking, 1997**).

La composition chimique de ces milieux se trouve en annexe I.

IV.1.3. Souches de références :

Les études du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A des isolats a nécessité l'utilisation de souches de références: *Aspergillus parasiticus* CBS 100926^T et *A. ochraceus* NRRL 3174, fournies par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.

IV.1.4. Appareillage et solvants :

Tous les appareils et les solvants utilisés au cours de notre travail sont cités dans l'annexe II, ainsi que les solvants utilisés pour la détection des mycotoxines (aflatoxine et ochratoxine A).

IV.1.5. Les standards analytiques :

Les standards analytiques utilisés dans cette étude sont: l'AF B et G produite par *Aspergillus parasiticus* et l'OTA produite par *A. ochraceus* (souches appartenant au LBSM).

IV.2. MÉTHODES :

IV.2.1. Collecte des échantillons et méthode de prélèvements

La collecte des échantillons a été réalisée durant la période allant du début du mois d'Avril à Mai de l'année 2016, au niveau des unités de fabrication de semoulerie de l'usine AMOUR qui situe à mouzaia– Blida. Les échantillons étaient prélevés de chaque étapes de la chaîne de la production, ces derniers concernés par notre étude sont représentés dans le (**Tableau09**), 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 (**Figure 07**).

Nous avons prélevé 08 échantillons primaires au moment où le produit est passés par les processus de fabrication, une partie de la surface et d'autres des couches profondes du compartiment de stockage, de même des échantillons ont été prélevés sur les côtés ou les rebords du compartiment (endroits différents), qui sont plus propices à l'apparition de moisissures (**Tarr, 2003**). Les échantillons prélevés sont bien mélangés à raison de 100 g d'échantillon. Tous les échantillons sont conservés dans un lieu sec et frais et dans des sacs en plastique à double épaisseur, et étiquetés puis acheminés au laboratoire de bureau d'hygiène de wilaya de Blida.



Figure 07. les échantillons mis dans des sacs étiquetés et acheminés au laboratoire (Bureau d'hygiène-Blida-).

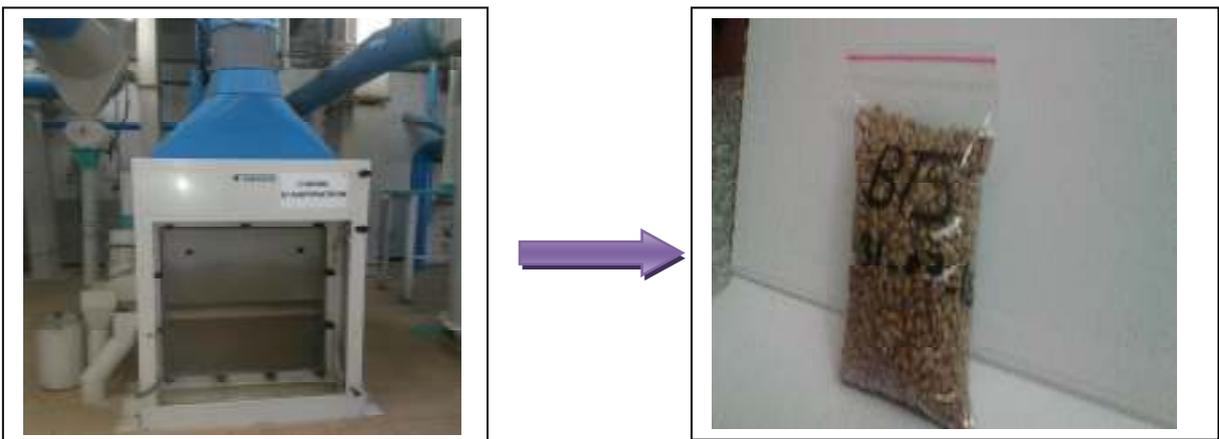


Figure 08. Prélèvement de blé sale tendre par canal d'aspiration



Figure 09. Prélèvement de blé sale tendre après premier repos de silos



Figure 10. Prélèvement de blé sale tendre après 1er et 2eme repos puis prêt à broyage



Figure 11. Prélèvement de matière première après 3eme étape de broyage de tuyauterie



Figure 12. Prélèvement de matière première après 4eme étape de broyage tuyauterie



Figure 13. Prélèvement de matière première après 5eme étape de broyage tuyauterie



Figure 14. Prélèvement du son de farine tuyauterie



Figure 15 : Représentation des échantillons (Produits finis).

IV.2.2.Processus de production :

IV.2.2.1.La fabrication de la farine suit les étapes suivantes :

- **Etape 1 : Stockage**

La sélection des variétés ou des mélanges étant réalisée, les lots de blés sont stockés de manière bien définie et sous-contrôle.

- **Etape 2 : Nettoyage**

Les opérations de nettoyage se divisent en 4 opérations :

A- Trieur magnétique : pour éliminer les impuretés métallique.

B- Nettoyeur : séparateur pour éliminer les impuretés et grains étrangers.

C- Epierreur : pour éliminer les matières minérales agglomérées.

D- Brosse : pour éliminer les brisures et déchets

- L'ensemble de ces opérations se réalise sous aspiration pour éliminer toutes les poussières et déchets légers.

- **Etape 3 : Humidification et repos**

Après humidification du blé à taux choisi et constant. Le blé est laissé au repos dans des silos à repos pendant un temps qui varie selon la qualité des graines.

- **Etape 4 : Moulin**

Les grains sont dirigés vers le moulin. Les opérations de transformation se divisent en passages successifs de broyage, claquage et convertissage. A chacune de ces opérations on intercale des opérations de blutage (tamisage) et pour certaines parties de broyage, l'objet de toutes ces opérations est d'obtenir une parfaite séparation entre l'enveloppe et l'amande.

- **Etape 5 : Produits drivés**

Les différents produits obtenus sont dirigés vers les silos de stockages pour les sous-produits, on réalise souvent une opération de granulation ou cubage. Les granulés sont utilisés dans l'industrie et l'alimentation animale.

- **Etape 6 : Préparation des farines**

On procède à des mélanges de farine pour obtenir des produits finis homogènes et adaptés à l'utilisation finale.

- **Etapas 7 : Ensachage**

Enfin, les postes d'ensachage peuvent être de 50, 25,10 et 5 Kg ou en sachet de 1 Kg pour l'utilisation des ménages, les livraisons des farines en vrac sont souvent aussi très répandues.

- **Produits finis :**

- **Sons**
- **Pellets**
- **Remoulage : deuxième farine triée du son séparé du gruau**
- **Farine basses**
- **Aliments pour animaux : Les déchets de la meunerie peuvent être soit traités sur place pour obtenir l'aliment des animaux, soit vendue comme matière première à des transformateurs fabricants d'aliments de bétail.**

IV.2.3. Nature des prélèvements effectués :

Pour procéder à des analyses afin de déceler la recherche des champignons Aflatoxinogènes et Ochratoxinogènes dans l'alimentation de vache laitière, il faut prélever des échantillons de l'aliment composé préparé et des ingrédients suspects, individuellement.

IV.2.3.1. La matière première et ses dérives :

La matière première est constituée par le blé tendre importé des différents pays (amériques, brésil, argentine et mexique) et locale (alger), Un ensemble d'échantillons était prélevé de chaque ingrédient, à partir des différentes unités de fabrication différentes(**Tableau 09**).

Tableau 9 : les différents d'échantillons prélevés :

Produits	Code	lieu	Date de prélèvement	poids
Blé tendre sale	B.T.S	UNITE DE FABRICATON DE SEMOULERIE AMOUR A MOUZAIA	31-07-2016	1 KG
Blé tendre après le repos	R1			1 KG
Blé tendre prêt à broyé	B1			1 KG
Blé tendre après broyage	B3			1 KG
Blé tendre après broyage	B4			1 KG
Blé tendre après broyage	B5			1 KG
Le son	SON			1 KG
Farine supérieur (produit fini)	F.S			1 KG
Farine panifiable (produit fini)	F.P			1 KG

IV.2.4. Analyses physico-chimiques :

IV.2.4.1. Détermination du taux d'humidité relative :

La détermination de la teneur en eau est effectuée à l'aide d'un humidimètre.

IV.2.4.2. 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 :

➤ **Mode opératoire**

- 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.

IV.2.5. Isolements et dénombrement de la flore fongique :

L'isolement et le dénombrement de la flore fongique associée à blé tendre a été réalisé en appliquant deux techniques de détection :

IV.2.5.1. La méthode de dilution (indirecte) :

Les isollements des moisissures dans les échantillons ont été réalisés selon la technique des suspension-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé DRBC dont la composition est donnée en annexe I. Ce milieu permet d'inhiber la croissance des champignons envahissant tel que les mucors et les rhizopus, et de réduire la taille de mycélium de façon à mettre en évidence la plus part des champignons contaminant le produit analysé.

Mettre 10g de chaque échantillon broyées dans un flacon de 250 ml contenant 90 ml d'eau distillée stérile additionnée de tween 80 à raison de 50 ul de tween par 5 ml d'eau (pour la dispersion des spores) et homogénéiser par agitation durant 15 min. Les dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3}) sont réalisées à partir de la solution mère qui présente la dilution 10^{-1} . Cent microlitres de chaque dilution sont étalés sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu DRBC (King *et al.*, 1979). Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours à l'obscurité (Figure 11). Deux répétitions sont réalisées par dilution. **(Figure 16)**

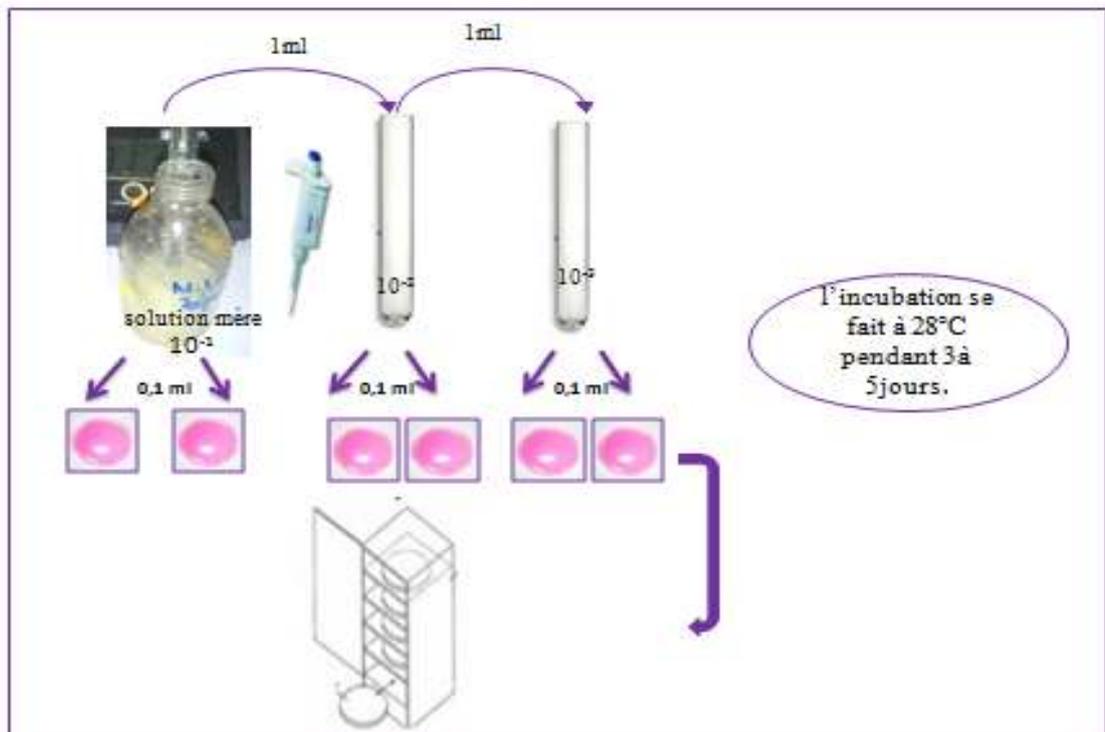


Figure 16. Technique de dénombrement par étalement en surface.

La numération est effectuée en choisissant les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 10 et 70 environ. Nombre de moisissures est exprimé en colonies formant unité par gramme d'échantillon (CFU/g).

IV.2.5.2. Méthode des grains (Direct Plating) :

Elle consiste à ensemercer les grains de blé tendre directement sur milieu d'isolement (DRBC). À raison de 10 grains par boîte (10 graines / boîtes) après désinfection superficielle, en utilisant l'hypochlorite de sodium (NaClO_3) afin d'éviter la contamination éventuelle par le milieu extérieur (poussières d'autres sources). 30 grains de chaque échantillon, pris au hasard, sont introduits dans l'eau de javel à 2 et 4% pendant 1 min, ensuite lavés avec de l'eau distillée stérile trois fois de suite. Après ensemencement les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours à l'obscurité(**Figure17**).

Le résultat de la méthode d'ensemencement direct des grains est exprimé en pourcentage(%) (Les grains infectés sur le totale des grains ensemencés dans la boîte de pétri).

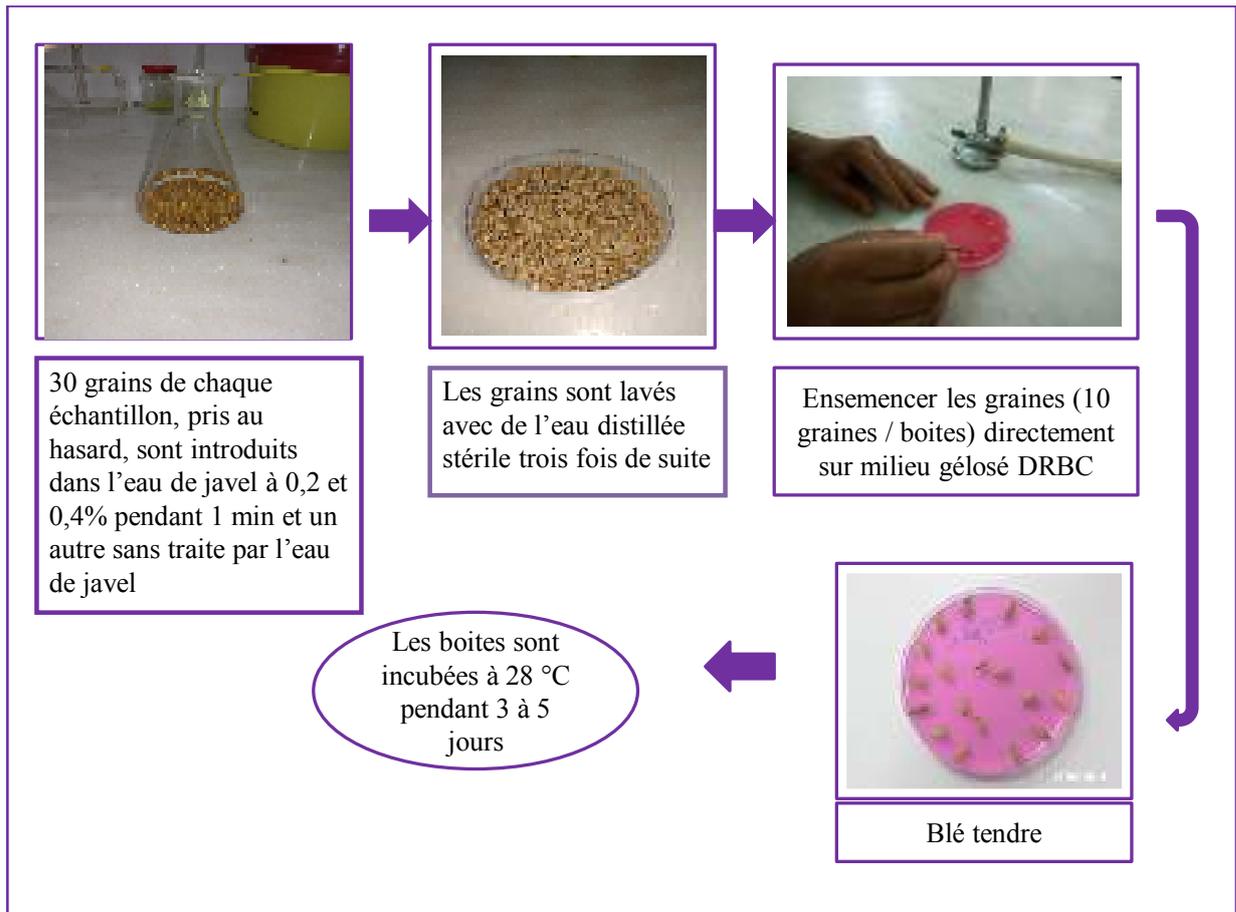


Figure17. Méthode d'ensemencement direct des grains sur le milieu DRBC (blé tendre).

IV.2.6. Identification morphologique des isolats fongiques :

IV.2.6.1. Identification macroscopique :

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'œil nue, 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 des caractères morphologiques du mycélium. 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.

IV.2.6.2. Identification microscopique :

L'observation microscopique se base sur le mode de groupement des conidies (spores) et l'ornementation, cela se fait par deux méthodes :

IV.2.6.2.1. Préparation microscopique ordinaire :

On utilise une aiguille d'inoculation pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie

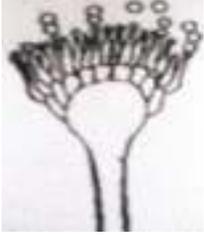
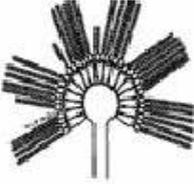
car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. Puis déposées sur une lame « mouillées » avec une goutte d'eau puis on pose une lamelle de couverture. On procède ensuite à l'examen au microscope photonique (X100, X400).

IV.2.6.2.2. Préparation microscopique à l'aide d'un ruban adhésif transparent :

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 et au bord de la colonie, puis que l'on colle sur une lame de microscope, l'observation microscopique se fait au grossissement (X100 et X400).

Les moisissures sont identifiées d'après leurs caractères morphologiques, l'aspect des colonies, leur couleur ainsi que les renseignements retenus lors de l'observation au microscope photonique relie au microordinateur pour la prise des photos.

Tableau 10. Aspect macroscopique et microscopique des principales espèces fongique

Espèces	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>
Schéma					
Aspect macroscopique	velouté avec ou sans touffes blanches de mycélium aérien couleur Gris-bleuâtre	Beige à Cannelle Revers jaune à brun sale thalle velouté ou parfois floconneux	Surface poudreuse irrégulière Couleur jaune verdâtre thalle à revers incolore	granuleuse à broussailleuse couleur brun foncé noirâtre	Aspect velouté, blanche au début puis de couleur très variable, le plus souvent bleu vert Revers jaunes à oranges
Aspect microscopique	Conidiophores Lisses, hyalins	Conidiophores Lisses, hyalins	Conidiophores hyalins, verruqueux et renflés en vésicule	Lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure	Conidiophores ramifiés, aspect en "pinces" phialides divergents à l'extrémité des ramifications

IV.2.6.3. Repiquage des souches d'*Aspergillus* sp. :

Parmi les champignons en croissance, les moisissures de genre *Aspergillus* (seuls genres potentiellement producteurs) sont repérées visuellement à la surface de l'agelose par leur forme et leur couleur caractéristiques.

Le repiquage consiste à transférer aseptiquement la souche identifiée (*Aspergillus* sp.) Le prélèvement des souches se fait aléatoirement et à partir de toutes les boîtes de pétri même celles qui contiennent un nombre de colonies inférieur à 10. Après l'incubation de 3 à 5 jours à une température de 28°C, les isolats sont conservés à 4°C pour des analyses ultérieures.

IV.2.7. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A :

Les aflatoxines et l'ochratoxine A possèdent une fluorescence propre qui permet de les détecter généralement sous U.V à une longueur d'onde de 365 nm.

La fluorescence des métabolites donne des couleurs différents qui permettent la reconnaissance des types des mycotoxines par exemple : bleue pour les aflatoxines B, verte pour les aflatoxines G et bleu-mauve pour l'aflatoxine M1 et pour l'ochratoxine A la fluorescence est bleu verdâtre (dans un solvant spécifique de séparation).

Le criblage des isolats d'*Aspergillus* producteurs d'aflatoxines est réalisé par détection de la fluorescence sur milieu de culture à base de noix de coco (CAM), selon la technique décrite par Davis *et al.*(1987) et Fente *et al.* (2001) et par chromatographie sur couche mince (CCM) selon Calvo *et al.* (2004).

IV.2.7.1. Détection de la fluorescence d'aflatoxine sur milieu de culture :

Le milieu favorable pour la détection de la fluorescence des aflatoxines est la gélose à base d'extrait de noix de coco déshiqueté (CAM), additionné de 0,3% de β -cyclodextrine qui permet d'améliorer nettement l'intensité de la fluorescence. L'ensemencement des souches fongiques sur CAM se fait par point central (une souche par boîte). La méthode consiste à cultiver les isolats sur milieu CYA, favorable à la production d'OTA, pendant 7 jours à 28°C. Dans le milieu CAM, les aflatoxines, combinées aux matières grasses de la noix de coco, donnent une fluorescence visible sous lumière U.V. (365 nm) surtout sur le revers de la colonie (Davis *et al.*, 1987). En effet, après 48 à 72 h d'incubation à 28°C, les isolats producteurs d'aflatoxines B et G développent autour de la colonie une fluorescence bleue et

verte respectivement, visibles sous la lumière U.V. (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour.

IV.2.7.2. Extraction d'aflatoxines et d'ochratoxine A :

En vue d'une confirmation de la production des aflatoxines par CCM, les cultures des isolats sur milieu CAM (aflatoxines) et CYA (ochratoxines) ont subi une extraction au méthanol (ou chloroforme) selon la méthode décrite par Calvo *et al.* (2004).

- Après 7 jours d'incubation, quatre rondelles (6mm de diamètre) de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boîte de pétrie, les carottes découpées sont pesées puis introduites dans des tubes Eppendorf de 2 ml ;
- l'extraction des aflatoxines et d'ochratoxine est réalisée par l'addition de 1 ml de méthanol, toute en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction.
- Après incubation pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours/min puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une micropipette puis injecté dans un autre tube Eppendorf, le filtrat est conservé à l'abri de la lumière et à une température de +4 °C pour une analyse ultérieure.

IV.2.7.3. Détection et confirmation de la production d'AFs et d'OTA par CCM :

Tous les extraits obtenus à partir de milieu CAM et CYA sont analysés par une chromatographie sur couche mince (CCM). La méthode utilisée pour la détection des AFs par CCM est celle décrite par l'A.O.A.C (Official Methods of Analysis) (2000), Plusieurs protocoles ont ainsi été développés par l'A.O.A.C (1995) (Official Methods 973.37 et 975.38), notamment pour la recherche de l'OTA.

La méthode de CCM consiste à déposer un spot de 10 à 15 µl (aspiré par une micro-seringue) de l'extrait à analyser sur les plaques (20 x 20 cm, 0,25 mm d'épaisseur) de gel de silice. A cet effet, les spots sont déposés à 1,5 cm du bord. Dans chaque plaque 10 à 11 échantillons sont déposés, espacés de 1,5cm. La séparation est effectuée, dans une cuve en verre fermée (20 x 20 cm), par le contact de la plaque avec la phase mobile. Le solvant de développement est le chloroforme-acétone (90:10 v/v) pour les aflatoxines et toluène- acétate d'éthyle-acide formique à 90% (50:40:10, v/v/v) pour l'ochratoxine A.

IV.2.7.3.1. Préparation des plaques :

Les plaques de gel de silice sont préparées par un mélange vigoureux de 25 g de gel de silice (Kieselgel 60 GF254) dans 70 ml d'eau distillée. La pâte obtenue est étalée immédiatement d'une manière uniforme sur des plaques en verre propre (20x20cm) à l'aide de l'étaleur de Desaga réglé pour obtenir une couche fine de 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques sont séchées à 40°C pendant une nuit et régénérées à 105°C pendant 1h juste avant utilisation (Figure18).

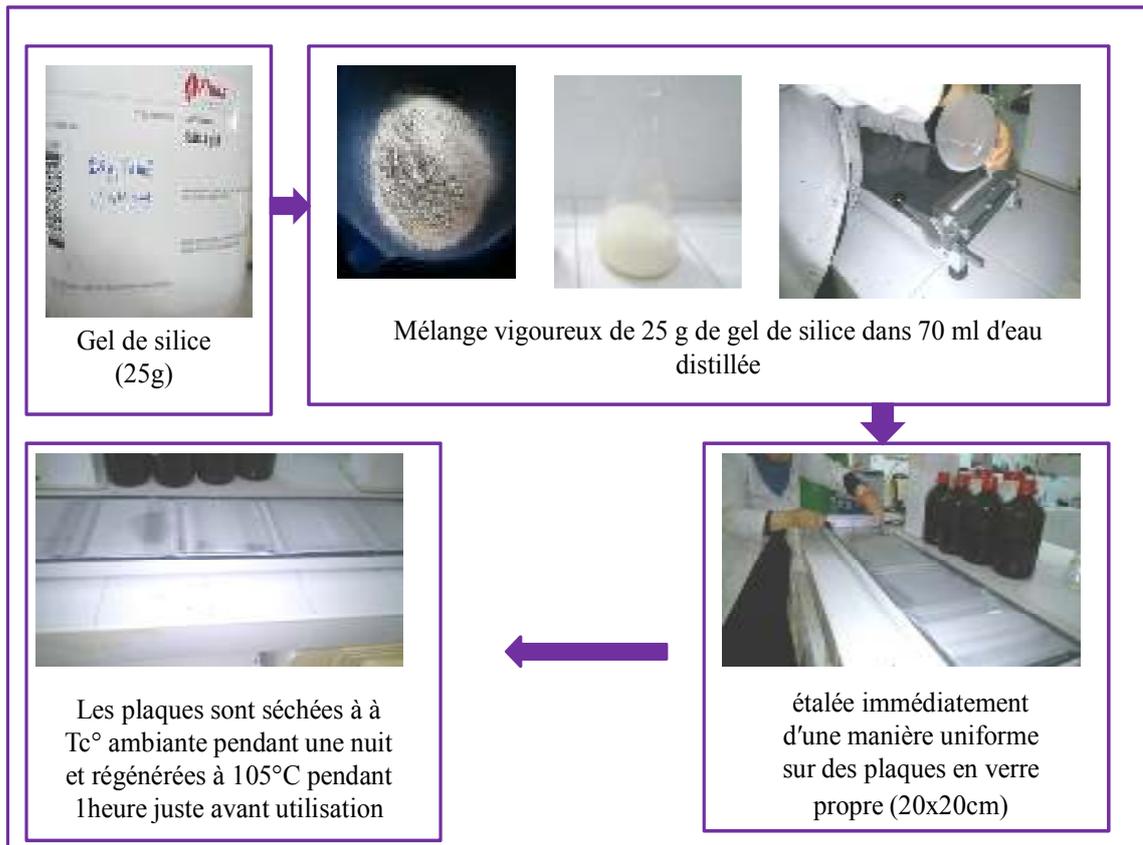


Figure 18. Les étapes de préparation les plaquesCCM dans laboratoire.

IV.2.7.3.2. Dépôt des extraits et analyse :

- A l'aide d'une règle, tracer des points éloignés de 2 cm au bord de la plaque, et espacés entre eux de 1,5 cm (11 points par plaque).
- Aspirer par une micro-seringue 15 µl de l'extrait à analyser et le déposer soigneusement sur le point tracé sur la plaque de CCM, en évitant d'abîmer la surface de la plaque. Pour éviter d'avoir de grosses taches sur la plaque, le volume à déposer est spoté délicatement à petites gouttes puis séchées à l'aide d'un séchoir.
- Un témoin contenant une solution standard (AF ou OTA) est déposé sur chaque plaque.

- Saturer la cuve de la CCM, en déposant une feuille de papier imbibée par la phase mobile sur la paroi de cette cuve.
- Déposer les plaques verticalement dans la cuve qui contient la phase mobile de la séparation. Le solvant migre jusqu'à ce qu'il atteigne la ligne limite du bord supérieur. Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher à température ambiante pendant 15 à 20 minutes.
- Pour la détection des aflatoxines et d'ochratoxine A, placer les plaques sous lumière UV (365 nm). Les AFs B sont caractérisés par une tache bleue et les AFs G par une tache verte.

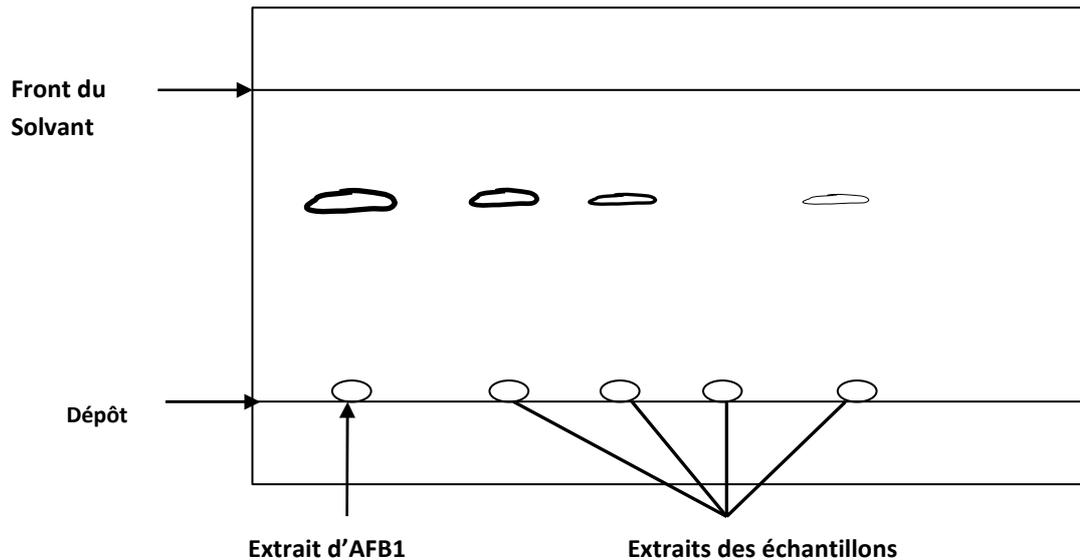


Figure 19. Représentation schématique d'un chromatogramme sur couche mince.

IV.2.8. Détection des aflatoxines sur CCM :

L'observation des plaques sous UV (à 365nm) permet de visualiser l'aflatoxine B1 sous forme d'une tache bleue et l'aflatoxine G1 tache verte. Une comparaison des rapports frontaux (Rf) des extraits avec ceux des standards et de l'intensité de la fluorescence des taches permet de confirmer la présence d'AFs avec un $R_f = 0,42$ pour l'aflatoxine B1, et $R_f = 0,34$ pour l'aflatoxine G1.

IV.2.9. Analyse quantitative par estimation visuelle :

La quantité d'aflatoxine produites peut être estimée en comparant la taille et l'intensité de la tache par rapport à un standard dont la concentration en aflatoxine B1 est connue.

V. 1.RESULTATS :

V.1.1. Analyse de la flore fongique totale et les principaux genres :

V.1.1.1. Evaluation de la mycoflore dans des différents échantillons analysés :

La recherche de la mycoflore totale concerne l'ensemble de moisissures présentes au niveau des grains de blé tendre. A cet effet les isolements sont effectués sur des grains entières désinfectés superficiellement par un trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (0,4%) pendant une minute à température ambiante (méthode B), et non désinfectés (méthode A), par la méthode classique de dénombrement (méthode de dilution sur milieu DRBC).

Globalement, malgré l'apparence saine de la variété des échantillons prélevés, et l'absence d'odeur moisie, l'étude de la qualité microbiologique a révélé la présence des moisissures dans cette dernière. L'analyse fongique de blé tendre montre qu'un taux de contamination total diffère d'un échantillon à un autre.

D'après les résultats obtenus figurer dans (**Tableau 10**) montrent un taux de contamination de la matière première et le produit finis sont élevés par rapport le **B3, B4, B5 et le son**.

Le taux de contamination externe et profonde est compris entre **12,27.10²** et **34,54.10² cfu/g** de produit. L'échantillon farine panifiable s'avère le plus contaminé (**34,54.10² cfu/g**) (**25,52%**) par rapport aux autres échantillons. La matière première a montré également un taux de contamination moins élevé (**21,35.10² cfu/g**) (**15,82%**) par rapport la farine panifiable, cela peut expliquer par la durée du stockage qui peut aller jusqu'à un 1 mois et plus.

Concernant les échantillons **B3, B4, B5, et le son** présentent des résultats similaires et faible par rapport la matière première et farine panifiable respectivement de (**17,27.10² cfu/g**) (**12,79%**) ; (**16,85.10² cfu/g**) (**12,48%**) ; (**16,30.10² cfu/g**) (**12,27%**) et (**16,36.10² cfu/g**) (**12,12%**)

Il semble que le taux de contamination externe et profonde enregistré est considérablement très élevé soit (**97,29%**) (**134,94.10² cfu/g**) par rapport taux de contamination profonde soit (**2,71%**) (**3,75.10² cfu/g**). Les résultats sont consignés dans (**le tableau 13**) et (**la figure 10**)

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 11. Distribution de la flore fongique totale obtenus par la méthode A, et B dans les différents échantillons.

Les échantillons	flore fongique totale (ufc /g) par la méthode A (grains désinfectés)	flore fongique totale (ufc /g) par la méthode B (grains non désinfectés)
Matiere Premiere (B.T.S+B1+R1)	$3,75.10^2$	$21,35.10^2$
B3	/	$17,27.10^2$
B4	/	$16,85.10^2$
B5	/	$16,30.10^2$
Le Son	/	$16,36.10^2$
Farine Superieur (Produit Finis)	/	$12,27.10^2$
Farine Panifiable (Produit Finis)	/	$34,54.10^2$
TOTALE	$3,75.10^2$	$134,94.10^2$

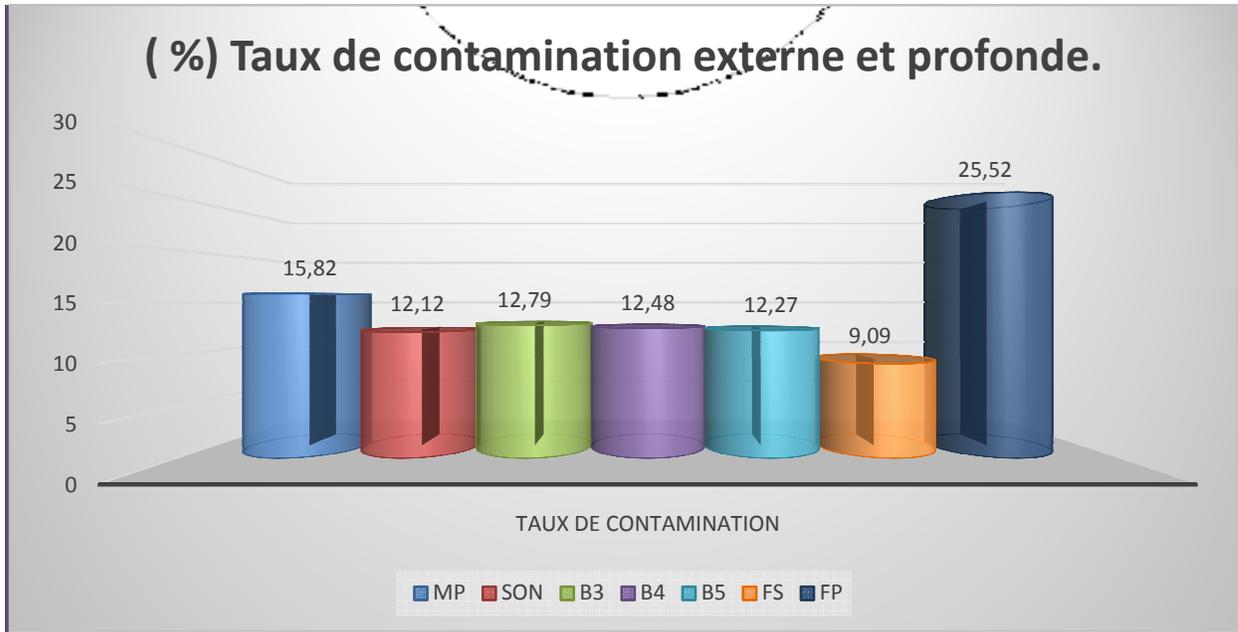


Figure 20. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A) de chaque échantillon analysé.

Il ressort aussi de (tableau x), et de (figure x), que la mycoflore totale des produits finis sont très élevée que le son et la matière première. Elle est respectivement de $97,23.10^2 \text{ cfu/g}$ (71,59%), et $16,36.10^2 \text{ cfu/g}$ (12,12%), et $21,35.10^2 \text{ cfu/g}$ (15,82%). Le taux de contamination fongique dans les produits finis est plus élevé presque 5 fois que celui de la matière première et presque 6 fois que celui du son.

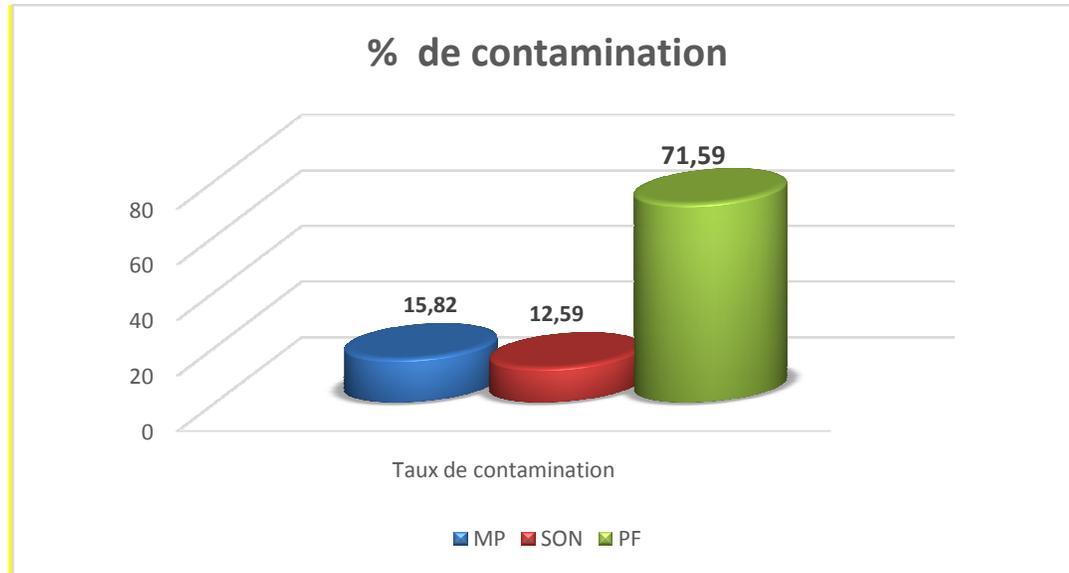


Figure 21. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A) d'échantillon analysé.

La comparaison effectuée entre la flore fongique révélées par la méthode A, et par la méthode B de chaque échantillon analysé permet de conclure que la flore fongique profonde dénombrée sur milieu DRBC révélée par la méthode B est très inférieure en la comparant avec la flore fongique externe et profonde révélée par la méthode A dans tous les échantillons analysés. La densité de la flore fongique par cette méthode est comprise de **375 cfu/g** de produit. Donc le nombre de cfu/g révélé dans les échantillons analysés par la méthode (B) est inférieur à **10³ cfu/g**. Les taux de contamination profonde ne dépassent pas **2%** ce qui explique que la désinfection par la solution d'hypochlorite de sodium (**0,4%**) des grains de blé tendre a fait éliminer totalement et approximativement de la mycoflore externe. (**Figure 13**)

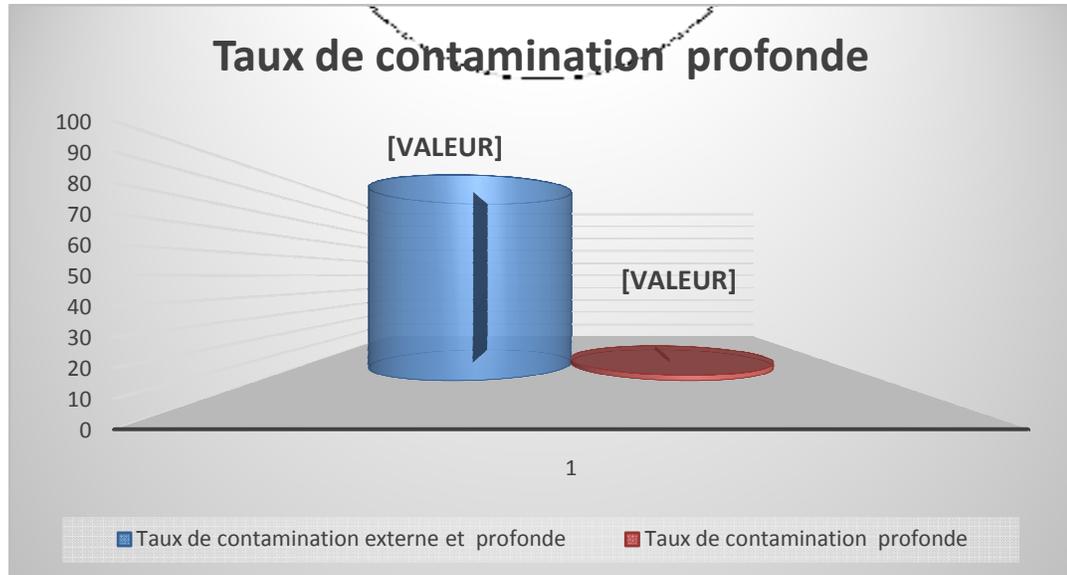


Figure 22. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A), et profonde (méthode B) de de chaque échantillon analysé.

V.1.1.2. Évaluation de la mycoflore dans des différents échantillons analysés :

Le taux de contamination externe et profonde varie considérablement d'un échantillon à un autre. Il oscille entre $(12,27.10^2 \text{ cfu/g})$ et $(34,54.10^2 \text{ cfu/g})$ de produit. Les plus fortes densités ont été enregistrées dans l'échantillon de la farine panifiable $(34,54.10^2 \text{ cfu/g})$ $(25,52\%)$,

On a enregistré un taux de contamination de la matière première $(21,35.10^2 \text{ cfu/g})$ $(15,82\%)$, Les échantillons prélevés de **B3, B4, B5** et **le son** sont presque similaire dont on a enregistré respectivement les taux suivants : $(17,27.10^2 \text{ cfu/g})$ $(12,79\%)$, $(16,85.10^2 \text{ cfu/g})$ $(12,48\%)$. $(16,30.10^2 \text{ cfu/g})$ $(12,27\%)$, et $(16,36.10^2 \text{ cfu/g})$ $(12,12\%)$.

La densité la plus élevée de la mycoflore a été trouvé dans le son notamment les espèces *Penicillium* soit $8,36.10^2$, *Aspergillus* section *Flavi* soit 3.10^2 , et *Aspergillus* section *Nigri* soit 2.10^2 , et *Aspergillus* section *Terrei* soit 2.10^2 , et *Aspergillus* sp soit 1.10^2

Cependant la farine supérieur présente une faible densité de la mycoflore ; dont on cite *Penicillium* soit 10.10^2 et *Aspergillus* section *Flavi* soit $2,27.10^2$ ces résultats obtenus de la farine

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

supérieur peuvent s'expliquer que cet échantillon est préparé par des traitements thermiques qui réduisent l'humidité relative qui influence sur la prolifération des moisissures. (Tableau 12).

Tableau 12. Distribution de la flore fongique totale externe, profonde et fréquences d'Aspergillus, Penicillium, Aspergillus section Flavi, et Aspergillus section Nigri, et Aspergillus section Terrei, et Aspergillus sp dans les différents échantillons analysés.

Les différentes variétés des Échantillons	Flore fongique totale (cfu/g)	Penicillium (cfu/g)	Aspergillus (cfu/g)	Aspergillus section Flavi (cfu/g)*	Aspergillus section Nigri (cfu/g)*	Aspergillus section Terrei (cfu/g)*	Aspergillus SP
Matière première	21,35.10 ²	00	21,35.10 ²	11,25.10 ²	7,10.10 ²	3.10 ²	00
B3	17,27.10 ²	12,17.10 ²	5,10.10 ²	5,10.10 ²	00	00	00
B4	16,85.10 ²	13,60.10 ²	3,25.10 ²	3,25.10 ²	00	00	00
B5	16,30.10 ²	13,30.10 ²	3.10 ²	3.10 ²	00	00	00
le son	16,36.10 ²	8,36.10 ²	8.10 ²	3.10 ²	2.10 ²	2.10 ²	1.10 ²
Farine supérieur	12,27.10 ²	10.10 ²	2,27.10 ²	2,27.10 ²	00	00	00
Farine panifiable	34,54.10 ²	24,5.10 ²	10,04.10 ²	7,03.10 ²	3,01.10 ²	00	00
TOTALE	134,94.10²	81,93.10²	53,01.10²	34,9.10²	12,11.10²	5.10².10²	1.10²

* par rapport au total d'Aspergillus

Globalement, une hétérogénéité a été observée dans la densité de la flore fongique au sein des échantillons du blé tendre. Cette fluctuation est liée précisément aux conditions, et durée de stockage. (**Figure15**)

V.1.1.3. Reconnaissance les principaux genres :

Les résultats de l'analyse fongique des **09**échantillons de blé tendre analysés obtenus montrent que les genres dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Ils ont été identifiés selon les caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et la texture de la colonie, sur le milieu (DRBC), ainsi que les structures micromorphologiques permettent généralement de faire la distinction entre ces deux genres. Ces deux genres fongiques représentent respectivement **(36%) et (64%)** de la flore fongique totale. La quasi-totalité des échantillons sont contaminés par ces deux types de champignons, ce qui fait que la mycoflore de stockage est la plus abondante par rapport à la mycoflore de champ (*Alternaria*, *Cladosporium* et *Fusarium*) dans les amandes. Nos résultats confirment le statut de la flore de stockage de ces deux genres qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage.

Les résultats relatifs illustrés sur (**la figure16**) témoignent la dominance du genre *Aspergillus* dans la matière première (**87,3%**). Le taux de contamination par le *Penicillium* est plus élevé dans les échantillons **B3, B4, B5**, farine supérieure (**F.S**) et farine panifiable (**F.P**) sont respectivement **(70,46%) et (80,71%) et (81,59%) et (81,49%)**. Par contre le son montre des taux identiques entre *Aspergillus* et *Penicillium* (**50,1%**) et (**49,9%**)

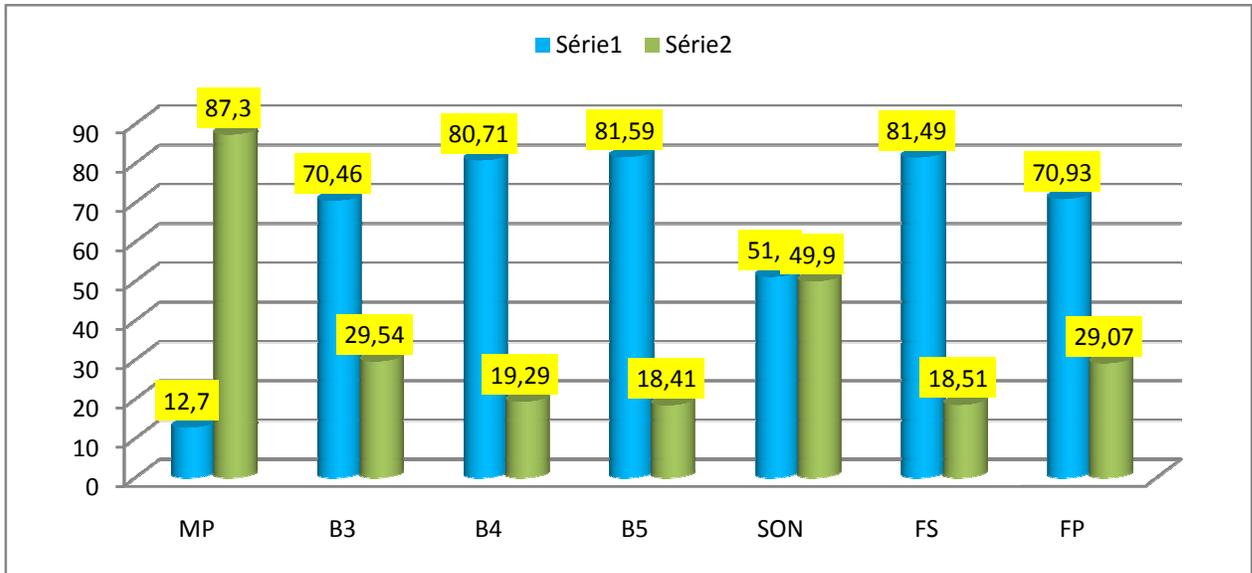


Figure 23. Fréquence du genre *Aspergillus*, et *Penicillium* dans les échantillons analysés.

La figure démontre la dominance de genre *Aspergillus* dans 7 échantillons analysés, dont la valeur la plus élevée se trouve dans la matière première avec un taux d'*aspergillus* (**87,3%**) ; des fréquences moins élevées sont enregistrées par rapport cette dernière notant une valeur de (**81,59%**) et (**81,49%**) respectivement dans **B4** et la farine supérieur (**F.S**), les autres échantillons prélevés présentent des taux plus moins variable soit (**70,93%**) et (**70,46%**) et (**51,1%**) obtenus dans les échantillons la farine panifiable **F.P** et **B3** respectivement.. **Figure 17.** La **figure 18.19** montre la dominance des isolats d'*Aspergillus* section Flavi et d'*Aspergillus* section Nigri et d'*Aspergillus* section terreii et d'*Aspergillus* section SP poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.

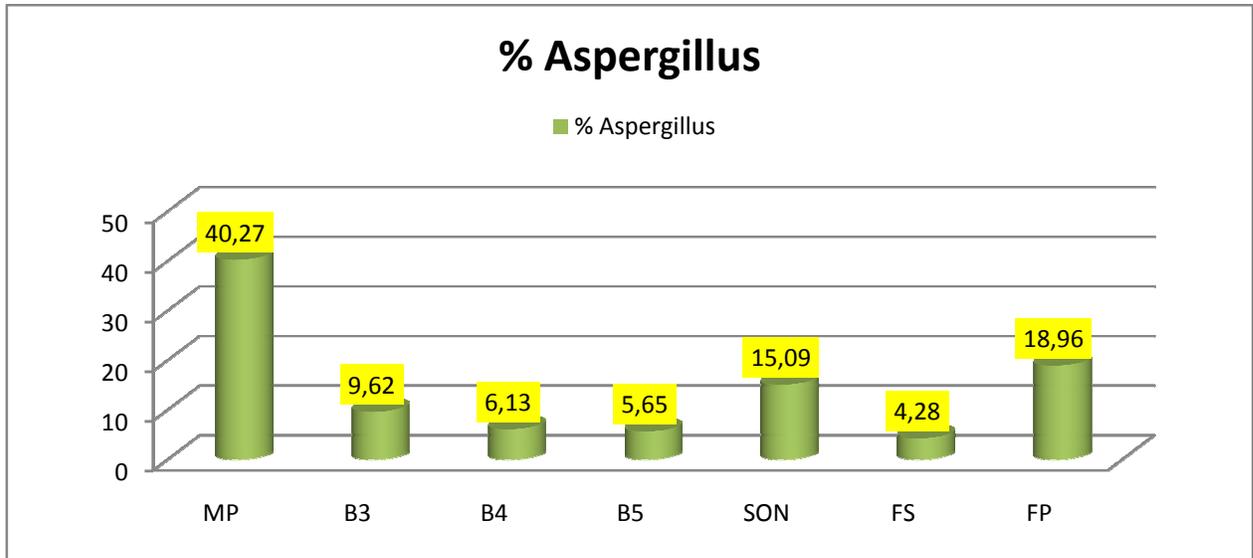


Figure24. Fréquence du genre Aspergillus dans les échantillons analysés

Le genre Penicillium a été aussi isolé à des proportions très variables allant de **(59,73%)** à **(95,72%)**, soit une moyenne de **(85,76%)**. Ce genre est dominant dans tous les échantillons analyses. Il est dominant surtout dans les échantillons la farine supérieur **(F.S)(95,72%)**, **B5 (94,35%)**, **B4 (93,87%)**, **B3 (90,38%)**, dans Les échantillon son, la farine panifiable **(F.P)** le Penicillium représente % de la flore fongique moins élevé que les précédents soit **(84,91%)**et **(81,4%)** respectivement. L'échantillon de la matière première **(M.P)** est le moins contaminé par Penicillium avec des pourcentages **(59,7%)**.(Figure 20).

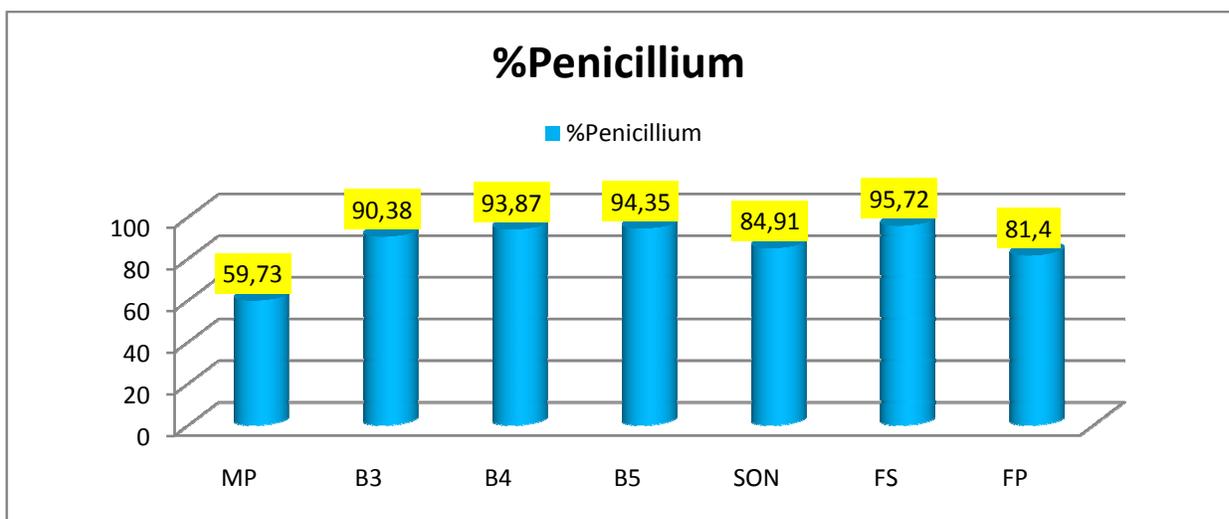


Figure 25. Fréquence du genre Penicillium dans les échantillons analysés.

V.1.1.4. Distribution des isolats d'Aspergillus section Flavi et d'Aspergillus section Nigri :

Dans ce travail nous nous sommes particulièrement intéressés au genre *Aspergillus* dont certaines espèces produisent les aflatoxines (AFs). Il faut rappeler que la plupart des espèces appartenant à la même section, selon la classification actuelle, ne se distinguent pas morphologiquement. La notion d'espèce employée ici désigne plutôt le groupe voire la section.

Parmi les espèces d'*Aspergillus*, *Aspergillus* section Flavi et *Aspergillus* section Nigri, *Aspergillus* section terrei *Aspergillus* S.P sont les plus dominantes dans la majorité des échantillons analysés. Ces 4 sections ont été isolées dans tous les échantillons, ce qui correspond à un taux de contamination de **80,02%** et **29,41%** et **19,53%** et **12,5%** du nombre total d'*Aspergillus* respectivement.

La plus forte incidence d'*Aspergillus* section Flavi est enregistrée dans les échantillons suivants **B3, B4, B5** et la farine supérieur (**F.S**) avec des taux égaux de **100%** du total d'*Aspergillus*. Dans les échantillons la farine panifiable (**F.P**) et le son et la matière première (**M.P**) cette section représente des taux relativement faible soit (**52,69%**), (**35,7%**), (**70,01%**) respectivement.

Cependant, *Aspergillus* section Nigri a été isolé à des teneurs moyennes dans les échantillons la farine panifiable (**M.P**) et le son et la farine panifiable (**F.P**) avec des valeurs (**33,25%**) et (**25%**) et (**29,99%**) respectivement (**figure 23**).

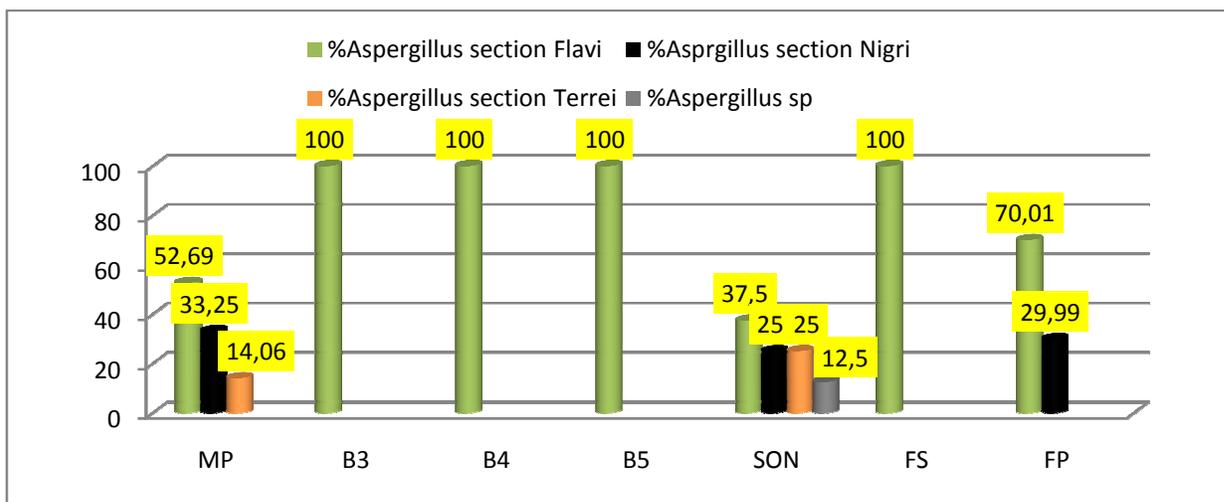


Figure 26. Fréquence d'Aspergillus section Flavi et d'Aspergillus section Nigri dans les échantillons analysés par rapport au total d'Aspergillus

Concernant Aspergillus section terreii a été isolé à des proportions faibles dans les échantillons le son et la matière première (M.P) avec des pourcentages (25%) et (14,06%) respectivement (figure23).

Le seul échantillon où on a isolé aspergillus sp est dans le son soit une teneur très faible (12,5%)(figure23).

Globalement le taux de contamination le plus dominant est celui aspergillus section Flavi avec une moyenne de (100%) (figure23).

V.1.2.Reconnaissance des genres et des sections :

V.1.2.1. Reconnaissance des genres :

Les principaux genres fongiques identifiés au cours de cette étude sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. 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 (DRBC), ainsi que les structures micro-morphologiques permet généralement de faire la distinction entre les principaux genres.

➤ **Le genre *Aspergillus***

Les champignons de ce genre se caractérisent par des colonies mycéliennes poudreuses qui atteignent 2 à 3 cm de diamètre après 5-7 jours d'incubation sur milieu DRBC. Les teintes diffèrent selon les sections (figure20). 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 (unisérié ou bisérié) (figure21).



Figure 27. Aspect macroscopique des différents genres poussant sur milieu DRBC

après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C.

A= *Aspergillus* section *Flavi*, B= *Aspergillus* section *Terrie* ,

D = *Aspergillus* section *Nigri*, E=Legenre *Penicillium* F=*Mucor*

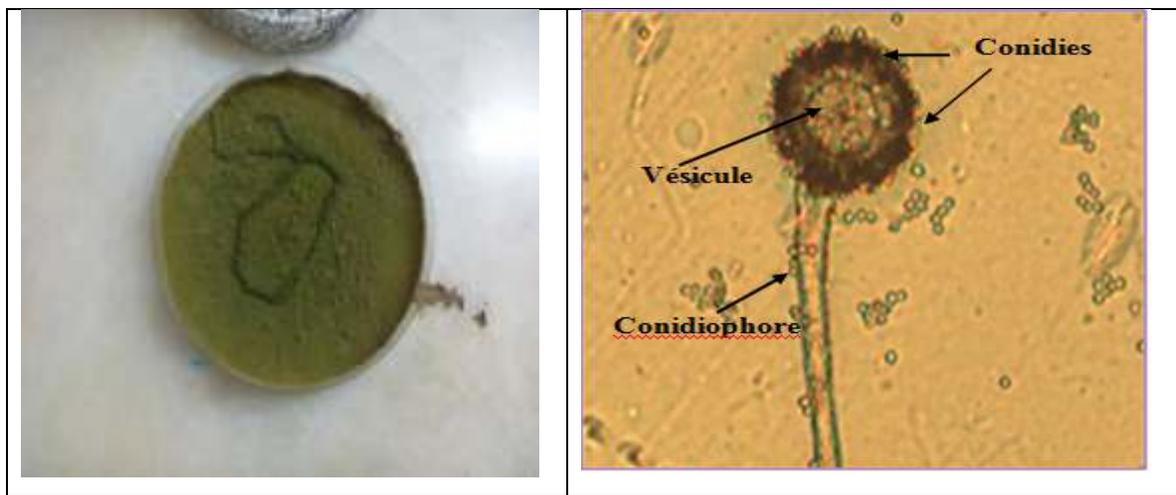
V.1.2.2. Reconnaissance des sections du genre *Aspergillus* :

Au cours de cette étude nous avons identifié cinq sections du genre *Aspergillus*. En effet, l'identification basée sur les caractères morphologiques ne suffit pas pour distinguer entre certaines espèces de la même section. Avant de présenter les résultats relatifs à la distribution des genres et des sections, nous donnons ci-après la liste des principales sections isolées et leurs caractères morphologiques : *Aspergillus* section *Flavi*, *Aspergillus* section *Nigri*,

Aspergillus section *Terrei*, *Aspergillus* section *Fumigati* et *Aspergillus* section *clavati*. Les caractéristiques des groupes d'espèces identifiées dans cette étude sont les suivantes :

➤ *Aspergillus* section *Flavi* :

Cette section a une croissance rapide à 28°C sur le milieu de culture CYA, elle forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. *Aspergillus* section *Flavi* ont des têtes unisériées ou bisériées, ils produisent des conidies de forme et de taille variables (figure 24).



Aspect macroscopique

Aspect microscopique (GX400).

Après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C.

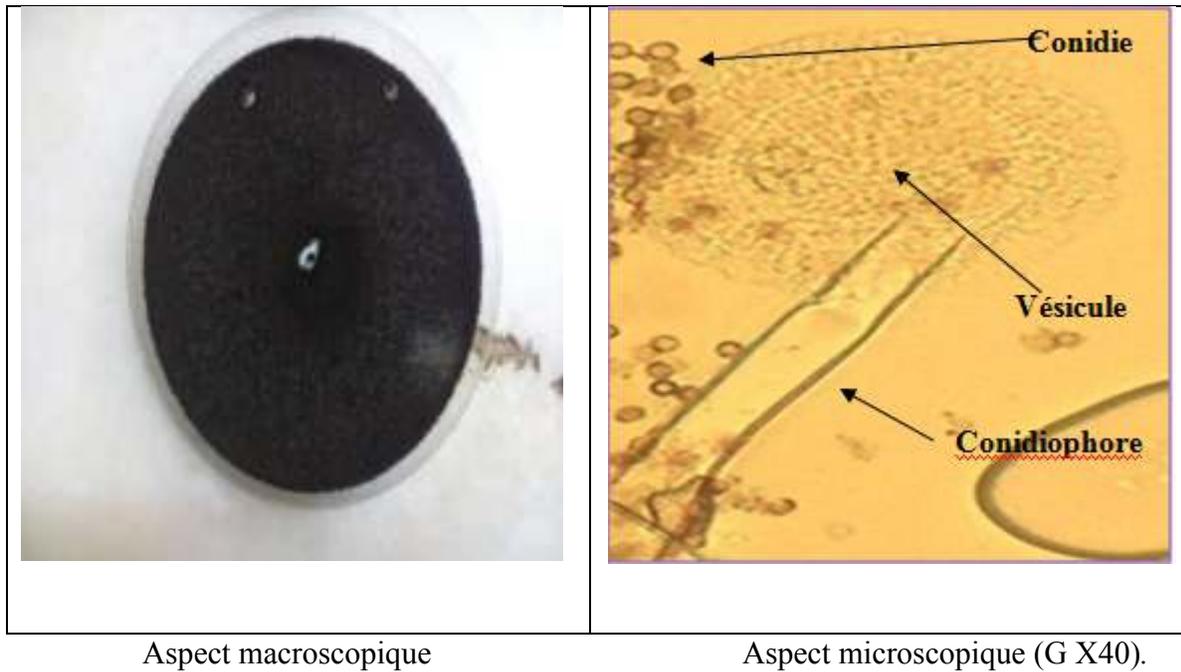
Figure 28. Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus* section *Flavi*.



Figure 29. Aspect macroscopique des sclérotés de type « L » d'*Aspergillus* section *Flavi* Surmilieu CYA a 28°C.

➤ *Aspergillus section Nigri* (*A. niger*) :

Sur le milieu CYA, la colonie a un diamètre de 6cm ou plus, envahit souvent toute la surface de la boîte de Pétri (**figure 26**). Elle est plate, duveteuse, avec des têtes unisérié ou bisérié avec des conidies noires.

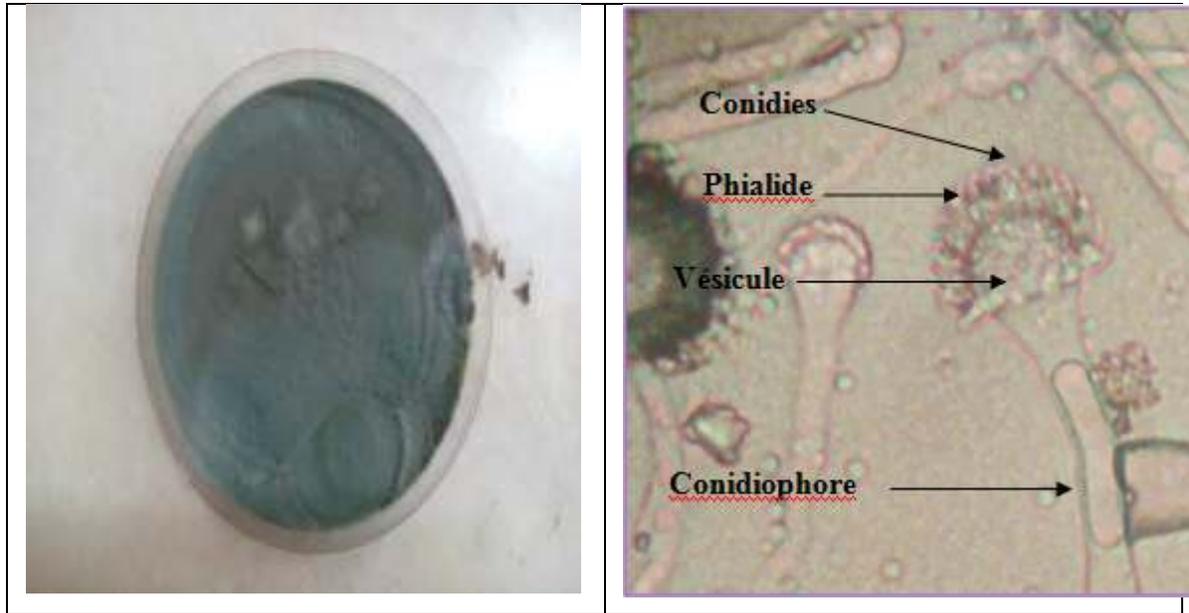


Après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C°.

Figure 30. Aspect macroscopique d'*Aspergillus section Nigri*.

➤ *Aspergillus section Fumigati* :

Forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre (**figure 27**). A un diamètre de 3cm, le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches. Au microscope : têtes unisériées, vésicules piriformes allongées très caractéristiques avec des phialides portées sur la moitié supérieure.



Aspect macroscopique

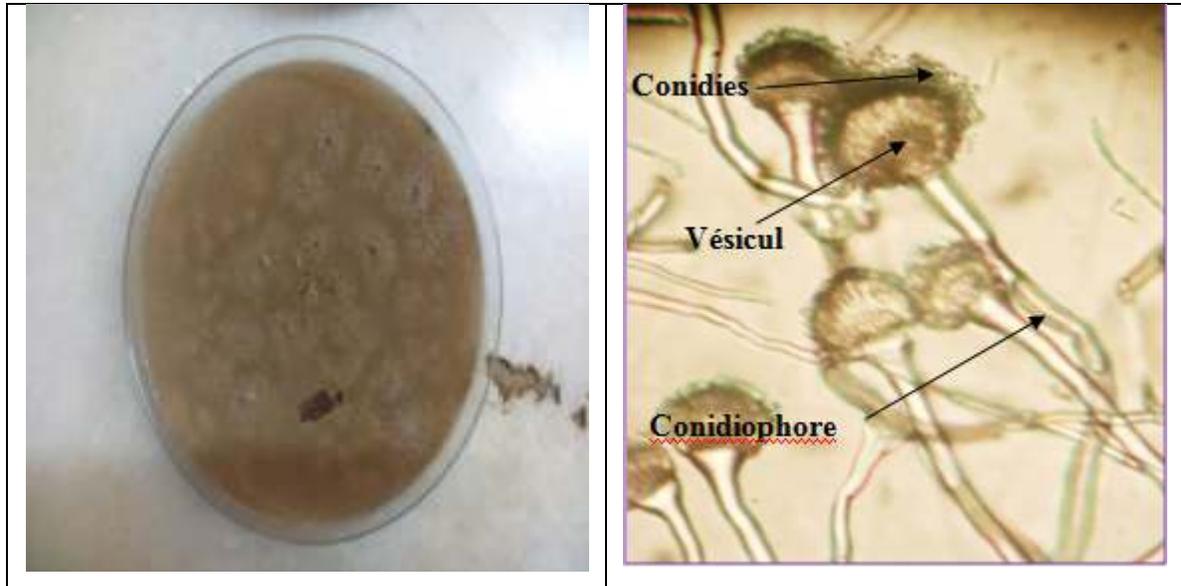
Aspect microscopique (G X40).

Après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C°.

Figure 31. Aspect macro et microscopique d'*Aspergillus* section *Fumigati* .

➤ *Aspergillus* section *Terrei* :

Sur le milieu CYA, a un diamètre de 5cm, colonie brune-beige à brune-orangé (**figure 28**). L'aspect microscopique des espèces appartenant à cette section tient la forme d'un éventail, avec têtes conidiennes bisériées en forme de longues colonnes, la vésicule est globuleuse et les conidies sont très petites.



Aspect macroscopique

Aspect microscopique (G X400).

Après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C°.

Figure 32. Aspect macro et microscopique d'*Aspergillus* section *Terrei*.

➤ *Aspergillus* section *Fumigati* :

Forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre (**figure 27**). A un diamètre de 3cm, le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches. Au microscope : têtes unisériées, vésicules piriformes allongées très caractéristiques avec des phialides portées sur la moitié supérieure.



Aspect macroscopique

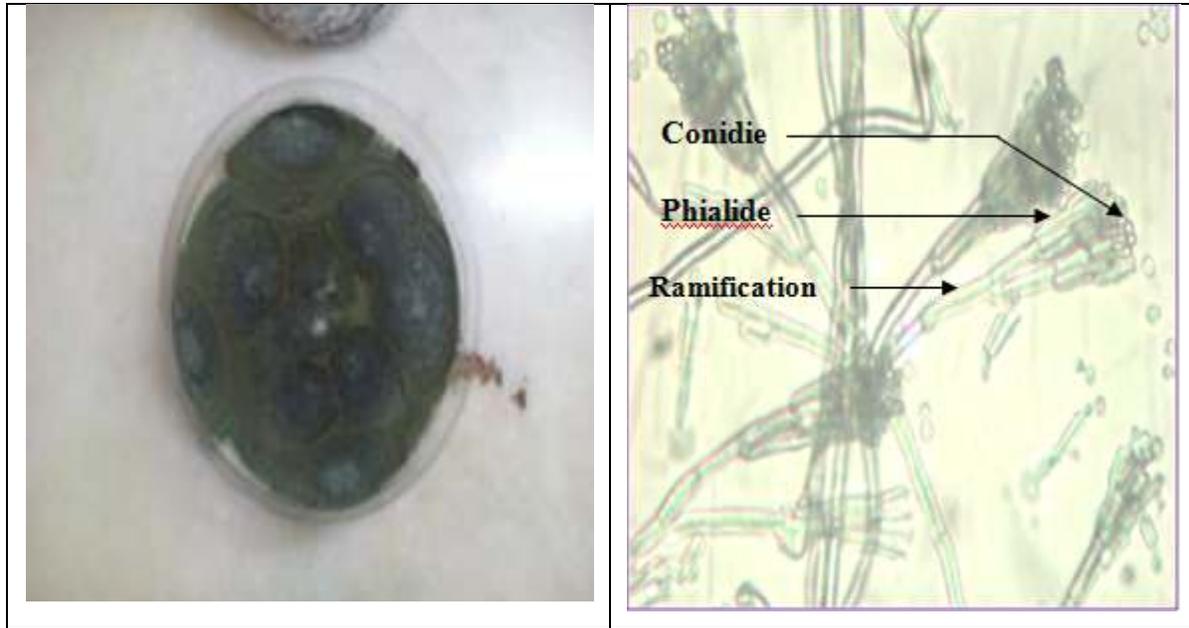
Aspect microscopique (G X40).

Après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C°.

Figure 33. Aspect macro et microscopique d'*Aspergillus sp.*

➤ Le genre *Penicillium*

Sur le milieu CYA la colonie a un diamètre de 3cm, et caractérisé par des conidiophores (ou stipes) qui s'élèvent un à un du mycélium portant des phialides groupées en pinces (d'où le nom de *Penicillium*), Ces genre est facilement reconnaissable à l'œil nu ou à la loupe tout d'abord par sa teinte verte ou bleutée puis par ses caractéristiques morphologiques. Les colonies mycéliennes sont généralement peu développées. En effet, au bout desquels les spores s'accumulent en chaîne. Ils sont nombreuses, claires ou faiblement colorées, sphériques ou ovales (**figure 22**).



Aspect macroscopique

Aspect microscopique (G X400).

Après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C°.

Figure 34. Aspect macro et microscopique du genre *Penicillium* sp.

V.1.3. Etude du pouvoir producteur d'AFs par les isolats d'Aspergillus section Favi :

V.1.3.1. Production d'AFs sur milieu CAM et par CCM :

Au cours de cette étude, **29** souches d'Aspergillus section Flavi isolées des échantillons ont fait l'objet d'une identification morphologique et de l'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines.

Le criblage des isolats aflatoxinogènes a été réalisé sur la mise en évidence de la fluorescence bleue sous U.V à 365 nm sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM). Le pouvoir producteur des isolats ayant donné une fluorescence bleue et un revers du milieu CAM jaune orangé. La production d'AFs est ensuite confirmée par la chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant un standard d'AFB1, et l'extrait de la souche de référence *A.parasiticus* qui produit les deux types d'aflatoxines B et G. L'analyse de CCM a été réalisée au laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse (LPBVB) à l'E.N .S. Kouba (Alger).

Les résultats ont révélé un taux de production de **(24,13%)** et **(44,82%)**, respectivement sur milieu CAM et sur CCM. L'analyse par CCM des différents extraits obtenus indique un taux de production plus élevé (**Figure 24**). 5 isolats faiblement producteurs s'avèrent être de faux négatifs sur CAM. Ce qui démontre que la chromatographie sur couche mince (CCM) est plus performante que la détection par cette méthode simple de screening CCM.

On note que toutes les souches ayant montré une fluorescence sur milieu CAM ce sont avérés aflatoxinogènes sur CCM et l'intensité de cette dernière est liée à la concentration des aflatoxines produites par la souche. Ainsi, lorsqu'un isolat est hautement producteur, une fluorescence des aflatoxines est visible après trois jours d'incubation, alors qu'un isolat faiblement producteur n'émet une fluorescence qu'après 6-7 jours d'incubation.

L'analyse par CCM nous a permis de détecter une production d'aflatoxines chez les souches faiblement productrices. Cette différence indique que la détection de la production d'aflatoxines sur milieu CAM n'est efficace que lorsqu'on a affaire à des isolats qui produisent une quantité d'aflatoxine plus ou moins élevée. Dans le cas contraire le passage par la méthode CCM est nécessaire afin d'apporter des résultats supplémentaires. La fluorescence des AFs sur milieu CAM est illustrée sur la (**Figure 25**) et par CCM sur la (**Figure 25**) Le résultat concernant le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes doit prendre en compte le seuil limite de détection. Car ce pourcentage a été déterminé sur la base de la mise en évidence de la fluorescence sur CAM et CCM. Ce pourcentage peut être revu à la hausse avec si les isolats sont analysés par HPLC avec un seuil de détection plus sensible. Riba et al. (2010) ont montré que le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes calculé sur milieu CAM et par HPLC est de **30%**, et **72%**, respectivement.

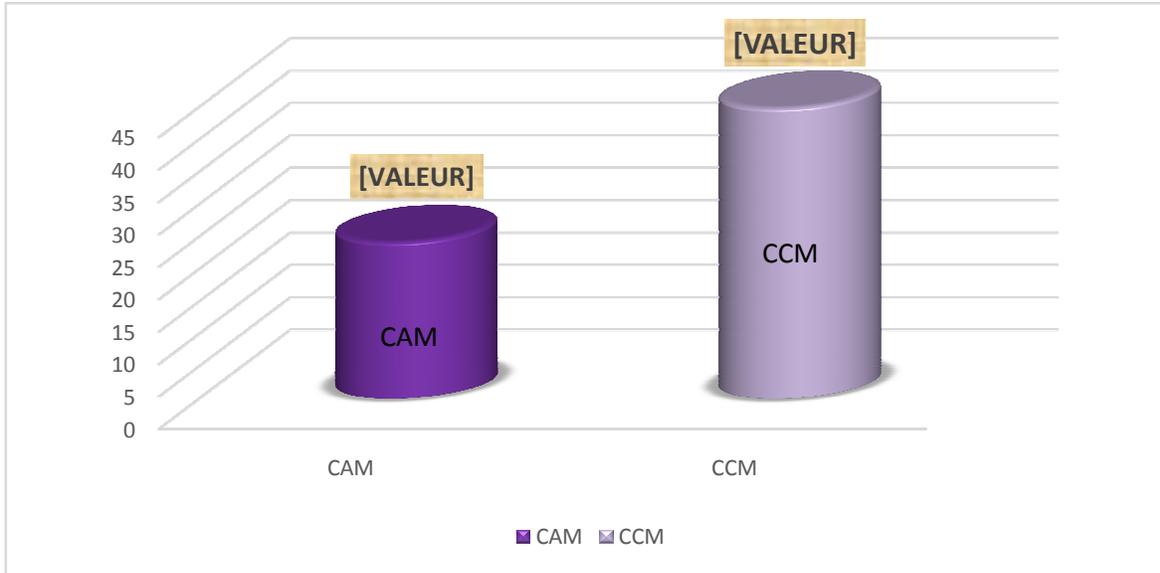


Figure 35. (%) Taux de production d'AFs par les isolats d'Aspergillus section Flavi déterminée par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM, et sur CCM

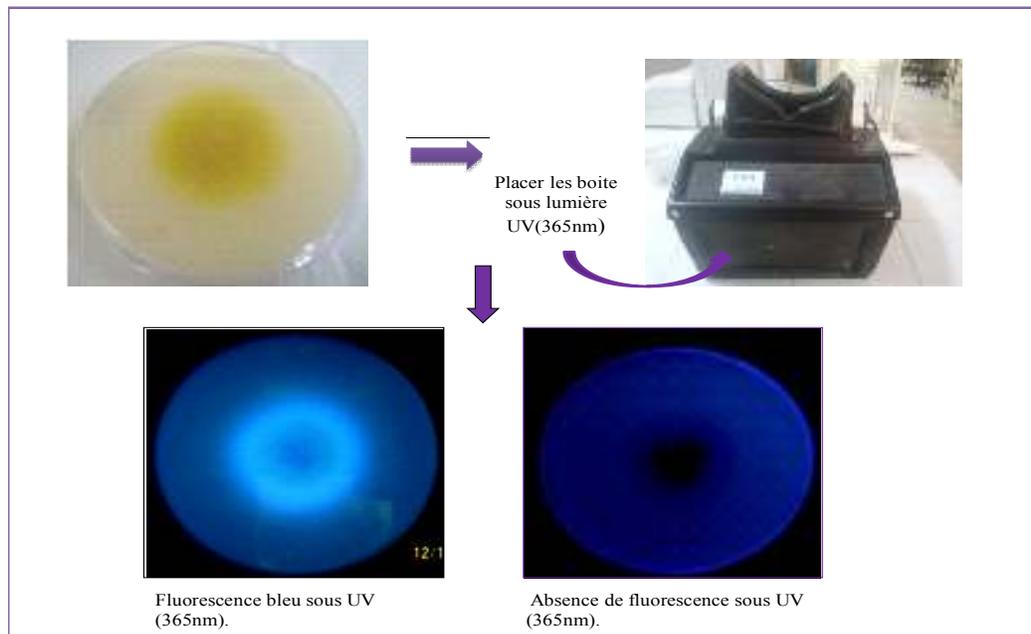
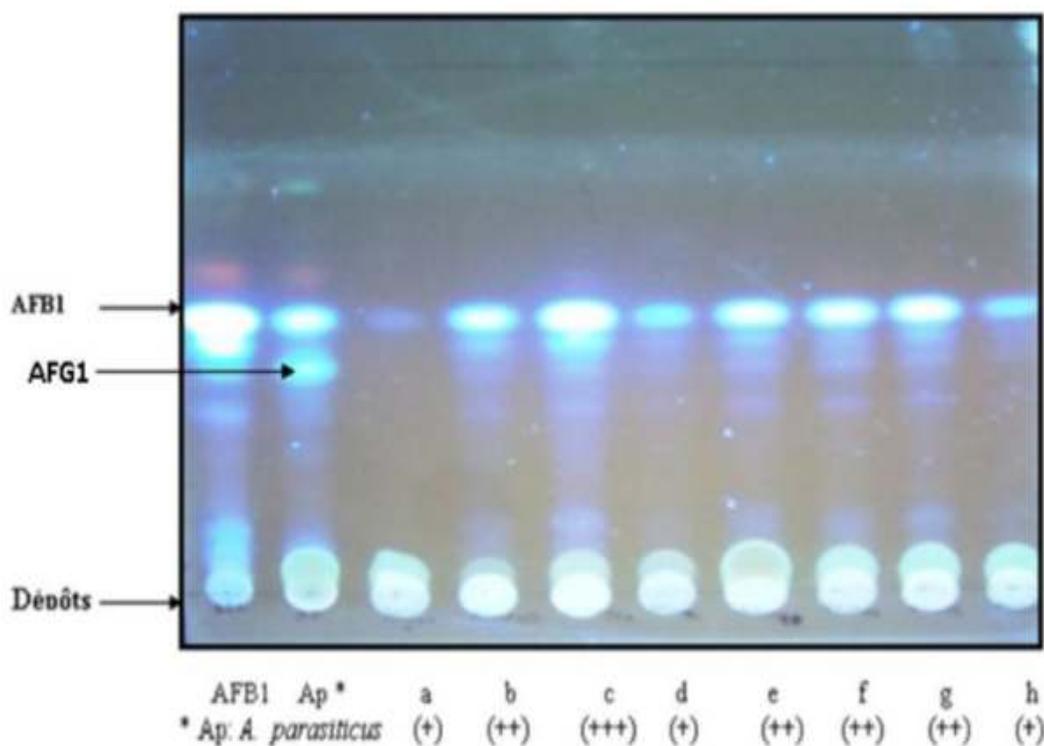


Figure 36. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par Aspergillus section Flavi sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM)



Fluorescence intense (+++), fluorescence moyenne (++), fluorescence faible (+)

Figure 37. Images sous UV 365 nm montrant la fluorescence bleue de la production des d'aflatoxines produites par les isolats aflatoxinogènes sur CCM

V.1.3.2. Souches aflatoxinogènes isolées de blé tendre :

L'estimation de la quantité d'aflatoxine (par CCM) dans les extraits des **13** isolats a montré des quantités d'AFB1 très variables. Ainsi, les isolats aflatoxinogènes peuvent être divisés en fonction de l'intensité de la fluorescence en trois catégories : **(17,24%)** des isolats sont faiblement producteurs, les isolats moyennement producteurs représentent **(13,79%)** et les isolats fortement producteurs **(13,79%)**.

Les résultats consignés dans le **(Tableau13)** montrent que la farine panifiable est la plus contaminée par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs **(30,79%)** suivies la matière première **(25%)**. Le son est moins contaminé par les isolats aflatoxinogènes

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

(15, 38%). Et enfin les produits suivants présentent une très faible contamination **B3, B4, B5 et la farine supérieur** soit (7,69%).

Tableau 13. Répartition des **13** isolats aflatoxinogènes d'Aspergillus section Flavi en fonction de l'intensité de fluorescence sur CCM.

Les variantes des échantillons	Nombres totaux d'isolats testé	Nombres d'isolats aflatoxinogène	Intensité			Moyenne des Isolats aflatoxinogènes (%)
			+++	++	+	
Matière Première (B.T.S+B1+R1)	7	3	2	1	0	23,07%
B3	2	1	0	0	1	7,69%
B4	2	1	0	0	1	7,69%
B5	2	1	0	0	1	7,69%
Le Son	5	2	0	1	1	15,38%
Farine Supérieur (Produit Finis)	4	1	0	1	0	7,69%
Farine Panifiable (Produit Finis)	7	4	2	1	1	30,79%
TOTALE	29	13	4	4	5	100%
		44,82%	13,79%	13,79%	17,24%	

Fluorescence intense (+++), fluorescence moyenne (++) et fluorescence faible (+)

Nous remarquons que l'échantillon le son est le plus contaminé par les isolats d'Aspergillus section Flavi producteurs d'AFs (**23,07%**) suivie des échantillons la farine supérieur **F.S** et farine panifiable **F.P** avec un pourcentage de 15,38%. Les échantillons **BTS**, **B1**, **R1**, **B3**, **B4** et **B5**, sont moins contaminés par les isolats aflatoxinogènes avec un pourcentage égal de **7,69 %**.

(Figure27)

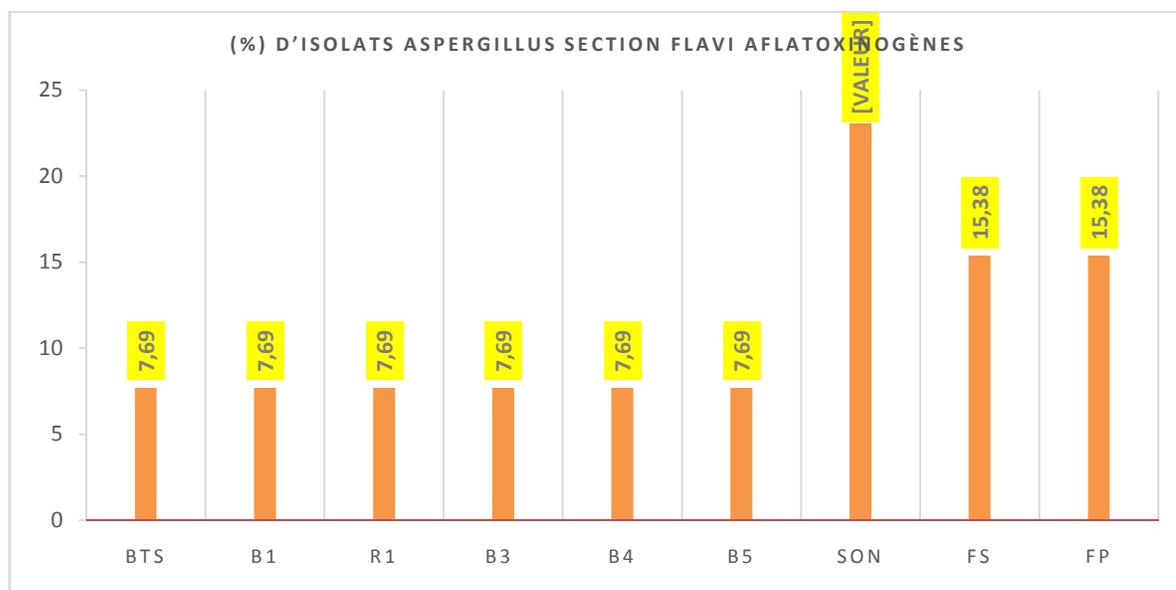


Figure 38. Fréquence (%) des isolats d'Aspergillus section Flavi producteurs d'AFs en fonction de type d'échantillon

V.1.4. Caractérisation des Aspergillus section Flavi :

Au cours de cette étude, **13** isolats d'Aspergillus section Flavi ont fait l'objet d'une identification. La caractérisation des espèces de cette section repose sur une taxonomie polyphasique à savoir l'étude des caractères morphologiques, des caractères moléculaires, la production de certains métabolites signalés dans la partie bibliographique et la production de sclérotés. Dans le cadre de ce travail nous n'avons pas pu faire l'analyse de tous ces métabolites et nous nous sommes limités aux productions d'AFs, et des sclérotés, en plus des caractères morphologiques. Ceci ne nous permet évidemment pas de faire une délimitation très précise de nos isolats.

V.1.4.1. Distribution des espèces d'Aspergillus section Flavi dans le blé tendre :

Parmi 29 isolats, on trouve 9 isolats présentant les caractères du groupe d'Aspergillus flavus. Ce groupe est formé de 6 isolats (20,68%) ne produisent pas de sclérotés, 2 isolats (6,89%) produit les sclérotés de type « S » (<400 µm), et un isolat (3,44%) produisent les sclérotés de type « L » (>400 µm). Nous reviendrons plus loin sur la taxonomie de ces isolats d'une manière plus détaillée. 1 isolat (3,44%) présentait des conidies rugueuses et un mycélium d'aspect poudreux et de couleur verte olive tirant sur le brun (vert kaki) caractéristique d'A. tamarii. En plus, ces isolats ne poussent pas à 42 °C, caractère qui les distingue également des autres espèces d'Aspergillus section Flavi (Ehrlich et al., 2007). Ils sont ainsi rattachés à cette espèce. Un isolat sur les 29 (3,44%) ayant la couleur vert-foncée, produisant l'AFB1, et l'AFG1 est rattaché à Aspergillus parasiticus. Les principaux résultats sont présentés dans (la Figure 28.29.30.31).

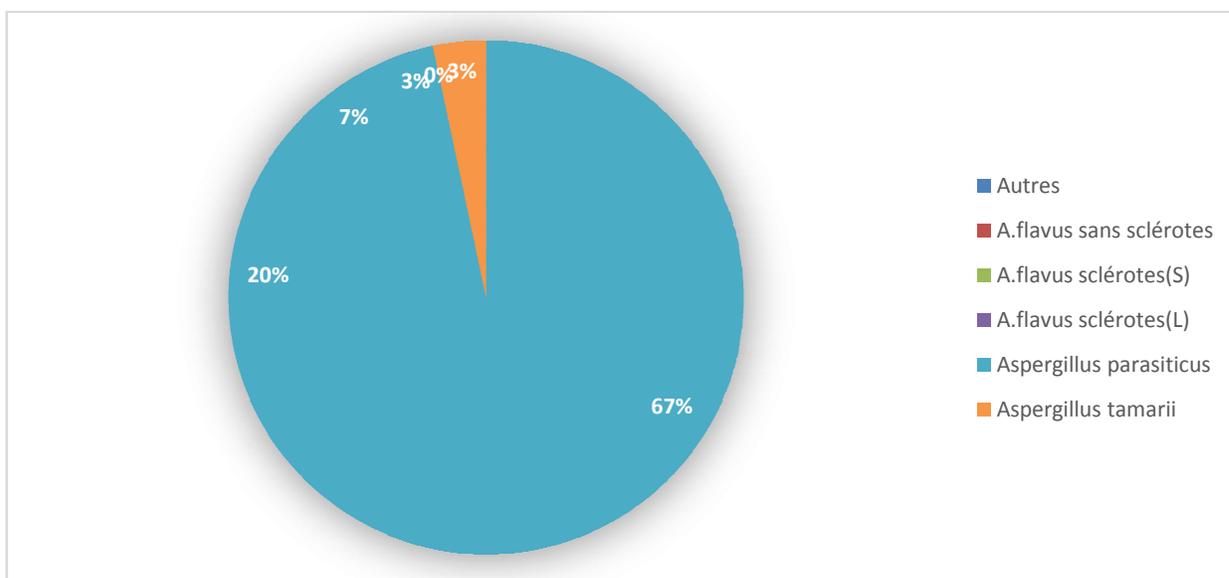


Figure 39. Les différents types d'isolats d'Aspergillus section Flavi dans les échantillons analysés.

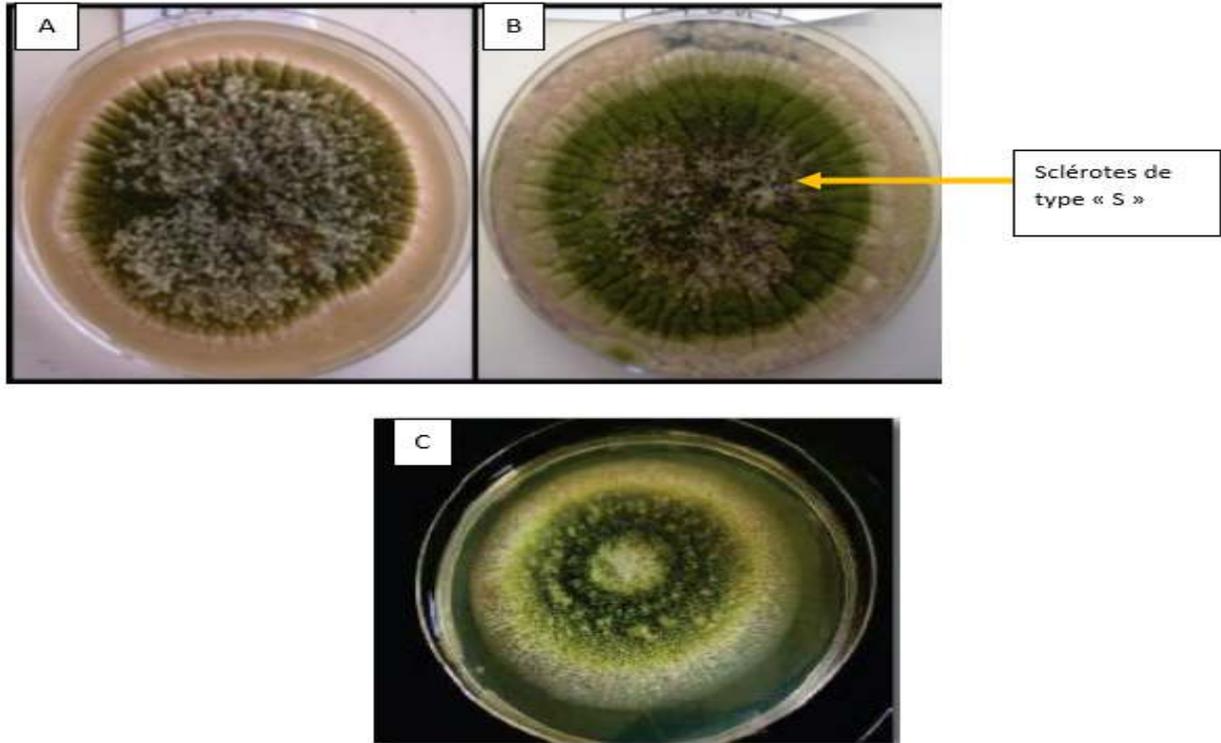


Figure 40. Aspect macroscopique d'Aspergillus section Flavi sur milieu CYA au 7ème jour. (A, B) : *Aspergillus flavus*; (C) : *Aspergillus parasiticus*

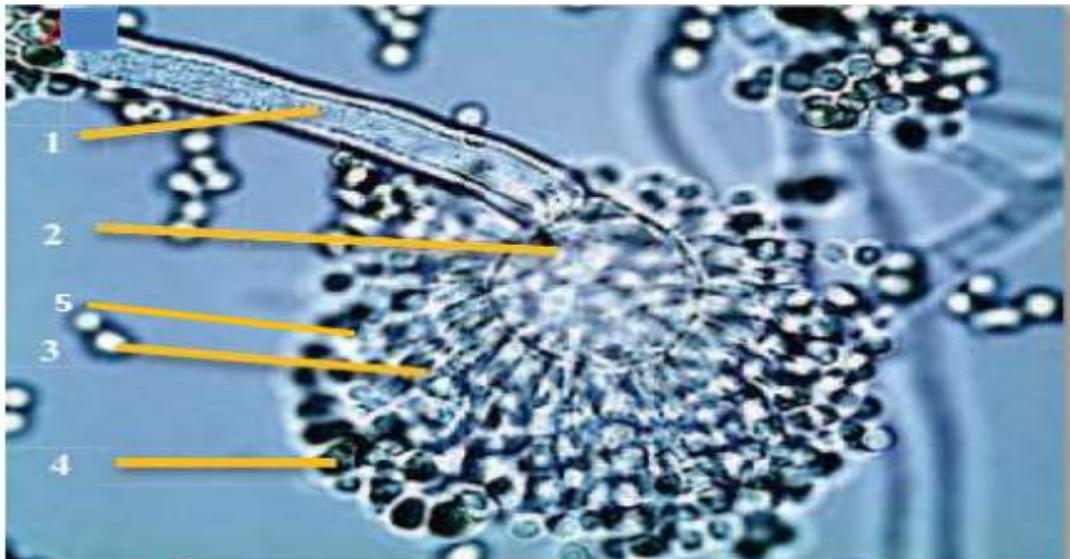


Figure 41. Aspect microscopique (Grx100) d'*Aspergillus flavus* (photo original) (1) : Conodiophore (stipe), (2) : Vésicule, (3) : Métule, (4) : conidies, (5) : Phialide.

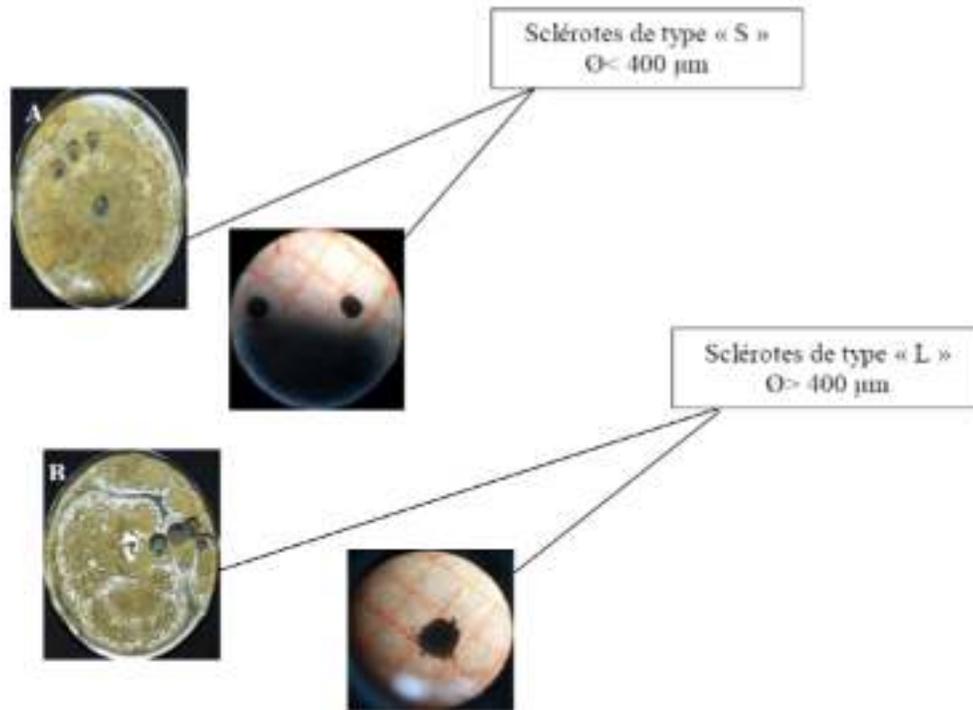


Figure 42. Présentation de deux types d'isolats producteurs des sclérotes de type « S » et « L »

« S » (sclérote <400 µm), « L » (sclérote >400 µm)

V.1.4.2. Distribution des espèces d'Aspergillus section Flavi aflatoxinogènes

Sur la base du profil d'aflatoxines, acide cyclopiazonique (CPA), et les sclérotes produits, en plus des caractères morphologiques, les isolats aflatoxinogènes appartenant à la section Flavi ont été subdivisés en sept (07) groupes. Malheureusement, au cours de cette étude, nous n'avons pas testé la production d'acide cyclopiazonique en raison de l'indisponibilité de standard de CPA dans le laboratoire.

- Le groupe I est constitué d'isolats produisant l'AFB, le CPA mais pas l'AFG et de sclérotes.
- Le groupe produit l'aflatoxine de type B, le CPA et de sclérotes de type "L" mais pas l'AFG.
- Le groupe III, inclue les isolats produisant l'AFB, et les sclérotes de type « L » mais pas l'AFG, et de CPA.

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

- Le groupe IV, produit uniquement l'AFB. Les isolats du groupe I, II, III, et IV appartiendraient vraisemblablement à *A. flavus* typique.
- Le groupe V représente les isolats ayant la capacité de produire l'AFB, le CPA et les sclérotés de type « S ». Ces isolats pourraient appartenir au groupe atypique d'*A. flavus*. Ces cinq groupes présentent les chimio-morphotypes d'*A. flavus*.
- Le groupe VI (le type II d'*A. flavus*), inclue les isolats produisant les aflatoxines de type B et G, le CPA, et les sclérotés de type « S ». Ces isolats sont rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus*.
- Le groupe VII produit les deux types d'aflatoxines B et G, mais pas de CPA et de sclérotés. Ce type d'isolats peut être assimilé à *A. parasiticus* ou à *A. nomius*. Cette dernière, morphologiquement est très proche d'*A. flavus*, et elle est fréquente dans le sol et parasite les insectes (Kurtzman et al., 1987; Peterson et al., 2000).

Parmi les **13** isolats aflatoxinogènes, **11** isolats (**84,61%**) sont rattachés à *A. flavus* typique, produisent l'AFB, mais pas l'AFG, et de sclérotés. Ces isolats peuvent appartenir au groupe I (producteurs de CPA) ou au groupe IV (non producteurs de CPA). Un seul isolat (**7,69%**) appartient au groupe V s'il produit de CPA. le groupe VII représente (**7,69%**) des isolats aflatoxinogènes testés. La caractérisation des 13 isolats d'*Aspergillus* section Flavi aflatoxinogènes en fonction de la production d'AFB, AFG, de CPA et de sclérotés sont récapitulés dans le (**tableau 14**)

Tableau 14. Répartition des **13** isolats producteurs d'AFs d'*Aspergillus* section Flavi en différents groupes (morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB, d'AFG et de sclérotés.

Groupe	AFB	AFG	CPA	S ^a	L ^a	Nombre d'isolats	Pourcentage (%) ^b
I	+	-	+	-	-	11	84,61
II	+	-	+	-	+	-	-
III	+	-	-	-	+	-	-

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

IV*	+	-	-	-	-	*	*
V	+	-	+	+	-	1	7,69
VI	+	-	+	+	-	-	-
VII	+	-	-	-	-	1	7,69
Total (%)	84,61	7,69	NT	7,69	-	13	100%

a Pourcentage par rapport à 13 isolats testés. AFB : aflatoxine B1 ; AFG : aflatoxine G1 ; CPA : acide cyclopiazonique ; - : absence ; NT : non testée ; * : les isolats du groupe IV sont regroupés avec les isolats du groupe I le type II d'*A. flavus* correspond soit à *A. minisclerotigenes* soit à *A. parvisclerotigenus*, selon la dernière classification proposée par Pildain et al. (2008).

Tableau 15. Caractéristiques des 13 isolats d'*Aspergillus* section Flavi aflatoxinogènes issus d'amandes analysées.

N°	Souches	Fluorescence Sur CAM	CCM		Sclérotés	Espèce probable
			AFB1	OTA		
1		+	++	-	-	<i>A. flavus typique</i>
2		-	++	-	-	<i>A. flavus typique</i>
3		+	++	-	-	<i>A. flavus typique</i>

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

4		-	+	-	-	<i>A. flavus typique</i>
5			++	-	-	<i>A. flavus typique</i>
6		++	+++	-	s	<i>A. flavus typique</i>
7		+	++	-	-	<i>A. flavus typique</i>
8		-	+	-	-	<i>A. flavus typique</i>
9		-	+	-	-	<i>A. flavus typique</i>
10		++	+++	-	-	<i>A. flavus typique</i>
11		++	+++	-	s	<i>A. flavus typique</i>
12		+	++	-	-	<i>A. flavus typique</i>
13		-	+	-	s	<i>A. flavus typique</i>

+ : Présence ; - : Absence

V.2. Discussion :

Les résultats de l'analyse fongique ont montré une forte contamination des échantillons de blé tendre analysé par les moisissures. Plusieurs travaux ont également signalé qu'un grand nombre de champignons peuvent être isolés des arachides et de fruits secs comme les amandes (**Hedayati et al. 2007**). Les fruits secs notamment les amandes et les graines oléagineuses constituent un substrat propice au développement des moisissures (**Groopman et Donahue, 1988**). Ce sont les conditions humides et chaudes des pays africains, sud asiatiques et sud-américains qui favorisent le plus la croissance des moisissures toxigènes. En effet, Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquistes qui s'épanouissent dans des atmosphères humides (>85%) et peu ventilées (**Jarvis, 2002**). **Shelton et al, (2002)** ont mis en évidence des variations saisonnières dans la densité fongique parmi les espèces d'*Aspergillus*. Les espèces du genre *Penicillium* se développent à des températures basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées (**D'Mello et Macdonald, 1998**). Par contre le genre *Aspergillus* est rencontré beaucoup plus dans les pays caractérisés par un climat chaud comme l'Algérie. La répartition des agents fongiques isolés dans toutes les parties de la graine fait apparaître une certaine hétérogénéité de contamination. La mycoflore externe est plus abondante que la mycoflore interne (profonde), ces résultats sont confirmés par **Weidenborner (2001) et Jianqiang et al 1999** qui a montré une différence assez nette entre le taux de contamination des grains non désinfectés (mycoflore externe) et celui des grains désinfectés (mycoflore profonde). Dans cette étude nous avons révélé une très forte contamination produit finis (**71,59%**), et une moins faible contamination matière première (**15,82%**) suivie le son avec un taux de (12,59%) . 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 mycotoxines.

En outre, la farine supérieure faiblement contaminées (**9,9%**) par rapport à la farine panifiable (**25,52%**), s'expliquerait probablement par plusieurs passages de conversion et leur traitement particulier. Plusieurs traitements thermiques sont appliqués pour la fabrication des produits finis. Ils subissent un conditionnement, avant l'emballage.

Dans notre travail on a constaté que la plus forte contamination a été notée dans la farine panifiable (**25,52%**), ce résultat est en accord avec les travaux de nombreux auteurs notamment

Cahagnier et Richard-Molard, (1998) qui ont révélé que l'humidité et la température sont les principaux facteurs physiques ayant une influence considérable sur la croissance et la production des mycotoxines.

L'inventaire réalisé et le calcul de la fréquence de l'abondance de chaque agent fongique, révèlent que la mycoflore est dominée par les genres *Aspergillus* et *Penicillium* pour la totalité des échantillons de blé tendre analysées. Ces deux genres fongiques représentent **(14,27%)** et **(85,76%)**, des résultats différentes ont été trouvés par plusieurs auteurs (**Weidenbörner, 2000 ; Magan et Aldred, 2005**). La matière première est beaucoup plus contaminée par le genre *Aspergillus* **(87,3%)** que *Penicillium*. Par contre Le taux de contamination par le *Penicillium* est plus élevé chez **B3, B4, B5, F.S et F.P** sont respectivement **(70,46%) (80,71%) (81,59%) (81,49%) (70,93%)**.le taux de contamination du son est identique entre les deux genres fongiques. La prévalence de *Penicillium* dans le blé tendre n'a pas été signalée dans la bibliographie. Elle peut toutefois s'expliquer par une forte installation de ce genre fongique aux dépends des autres moisissures lors de stockage.

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.

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 dominant. 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**).

Une grande hétérogénéité a été observée dans la densité de la flore fongique au sein des échantillons prélevés de blé tendre. Cette fluctuation n'est pas liée à un paramètre particulier. En effet, la qualité du grain après récolte est influencé par une large variété de facteurs biotiques (microflore, insectes, acariens et rongeurs) et abiotiques (températures, humidité, activité de l'eau, etc.). Le grain stocké est lui-même considéré comme un écosystème particulier (**Magan et Aldred, 2005**).

Cette étude a démontré la prédominance d'Aspergillus section Flavi, et d'Aspergillus section Nigriet d'Aspergillus section terrie, avec des taux de **47,36%** et **26,31%** et **21,5%** du nombre total d'Aspergillus respectivement. La plupart des échantillons prélevés sont contaminés par les espèces de la section Flavi et section Nigri et section terre. Toutefois leurs fréquences est moins importante dans **B3, B4, B5 et le son**. Dans les échantillons **B3, B4, B5, F.S et F.P** nous retrouvons pratiquement autant de Flavi (**54,54%** et **45,45%**) que des penicilliumssp.

Nos résultats ont également montré une très forte contamination de **la matière première(33,25%)**, et de la **farine panifiable(29,99%) et du son (25%)** par Aspergillus section Nigri. Les isolats d'Aspergillus section Nigri peuvent constituer une source d'ochratoxine A dans ces denrées. Selon les études menées dans les régions à climat chaud, les espèces de cette section et de la section Flavi sont les plus fréquemment isolées dans les graines de céréales et d'autres graines d'arachides et de fruits secs (**Riba et al., 2008, 2010; Abarca et al., 2001; Magnoli et al., 2003**).

La nature de la microflore dans les graines dépend des conditions environnementales, de récolte, de manutention et de stockage. Et de la manière d'analyse de la mycoflore. Dans notre cas, nous n'avons pas pris les résultats de l'analyse des grains désinfectés. Donc, la flore fongique comprend la mycoflore endogène et superficielle. Par contre, dans la bibliographie on parle souvent des graines préalablement désinfectées.

Cependant, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie et qui signalent la dominance d'A. flavus dans les céréales les arachides et les fruits secs (**Pitt et al. 1993**).

Aspergillus flavus est très répandue dans les climats chauds et occupe des niches écologiques très

diverses (**Wilson et al. 2002**). Cette espèce vit dans le sol à l'état saprophyte mais est capable de provoquer le pourrissement des grains (**Horn et Dorner, 1998**).

Le résultat concernant le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes calculé sur milieu CAM et par CCM est de **(24,13%) et (44,82%)** respectivement. Nos résultats montrent que sur **29** isolats seulement 13 isolats producteurs d'AFs, **4** isolats sont fortement producteurs, **4** sont isolats moyennement producteurs, et **5** isolats sont faiblement producteurs. En effet, on peut rencontrer une large gamme d'isolats allant de très fortement producteurs au non producteurs d'AFs (**Pitt, et al. 1993 ; Horn et al. 1996**). **Abarca et al, (1988)** ont montré que l'absence de fluorescence ne signifie pas forcément l'absence de production d'aflatoxine. De même certains travaux ont indiqué que la fluorescence des isolats sur milieu CAM n'est pas toujours un signe de production d'aflatoxines (**Giorni et al., 2007; Scherm et al., 2005**).

Ces données sont en accord avec les conclusions d'observations rapportées par de nombreux auteurs notamment (**Chapeland-Leclerc F, 2005 et Pholf-Leskowicz, 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-Leskowicz, 2002**).

La production des mycotoxines par les champignons est une conséquence combinée de la propriété génétique de la souche et de son environnement (**Blumenthal, 2004**), et dans une seule et même espèce, des différences de niveaux de production peuvent être observées (**Vining, 1990**). Dans les milieux YES, le taux d'aflatoxine B1 dans le filtrat de culture est élevé par rapport à celui détecté dans les grains. Les chercheurs en particulier **Abbas et al., (2006)** expliquent cette variation par l'existence d'une possible interaction compétitive entre les souches non toxinogènes et les souches toxinogènes. Selon **Wicklowsky et al (1980), et Pitt et Hocking, (2006)** l'*Aspergillus flavus* produit moins d'aflatoxine lorsqu'*Aspergillus niger* est présent.

Sur 13 isolats aflatoxinogènes, **11** isolats (**84,61%**) produisent l'AFB₁, mais pas l'AFG₁, et de sclérotés. Cette catégorie d'isolats appartiendrait vraisemblablement à *A. flavus* typique (groupe I producteurs de CPA) ou (groupe IV non producteurs de CPA). (Samson et al. 2004).

Un isolat (7,69%) appartient au groupe V (groupe d'*A. flavus* atypique), s'il produit de CPA, et un seul isolat de groupe VII (7,69%).

Ce type d'isolats peut être assimilé à *A. parasiticus* ou à *A. nomius*.

Nos résultats ont révélé que le pouvoir producteur d'AFs varié considérablement d'un isolat à l'autre. Il est connu qu'*A. flavus* produit généralement les AFs de type **B1 et B2 et le CPA**, mais cette production est extrêmement variable (**Richard et al., 1992; Horn et Dorner , 1999**). En effet, on peut rencontrer une large gamme d'isolats allant de très fortement producteurs au non producteurs d'AFs (**Pitt, et al., 1993; Horn et al., 1996**). De nombreux auteurs soulignent une corrélation positive entre la production d'AFs de type B et la production de CPA. Ainsi, **Pildain et al. (2008)** soulignent que le CPA est produit non seulement chez les souches productrices d'aflatoxine B comme *A. flavus* et occasionnellement chez *A. pseudotamarii* mais aussi chez *A. minisclerotigenes* et *A. parvisclerotigenus* productrices des deux types d'AFs (AFB et AFG). Les isolats produisant l'AFB, l'AFG et le CPA sont rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus* sont rares.

Dans une étude sur les *Aspergillus* section Flavi des sols de culture de maïs en Iran, **Mehdi et al. (2006)** soulignent, comme nous, une dominance d'*A. flavus* et une forte proportion d'isolats ne produisant pas les AFs, le CPA, et les sclérotés (groupe I). **Giorni et al. (2007)** trouvent que 70% des souches d'*A. flavus* isolées du maïs d'Italie sont aflatoxinogènes et la moitié produit également le CPA.

Nos résultats montrent que parmi les 29 isolats, 2 isolats (6,89%) d'entre eux non producteurs d'AFs, produisent des sclérotés de type « L », et un isolat (3,44%) produit des sclérotés de type « S ». Cet isolat est fortement producteur d'AFB1 révélée sur CCM. Le type « S », signalé pour la première fois par **Hesseltine et al. (1970)** est rarement rencontré (**Vaamonde et al., 2003; Barros et al., 2005; Giorni, 2007**). Selon **Carwell et Cotty (2002)**, les isolats de type « S » sont rencontrés fréquemment dans des régions à températures élevées et à faible pluviométrie. Ces auteurs pensent que la production de sclérotés de type « S » est une forme de survie aux fluctuations climatiques. Saito et **Tsuruta (1993)** ont classé auparavant le type « S » comme une variété d'*A. flavus*, qui produit uniquement l'aflatoxine B. **Frisvad et al. (2005)**, l'ont considéré comme une nouvelle espèce dont certains isolats produisent les AFs B et G. Les derniers travaux

sur la taxonomie des *Aspergillus* section *Flavi* rattachent ce type d'isolat soit à espèces *A. minisclerotium* soit à *A. parvisclerotigenus* qui diffèrent en elles du point de vue métabolites produits (**Pildain et al. 2008**). Il faut signaler aussi que l'incidence des isolats aflatoxinogènes est aussi liée à la nature du substrat (**Horn, 2003**). Par exemple, le nombre d'isolats aflatoxinogènes est plus élevé dans les arachides (69%) que dans le blé (13%) (**Vaamonde et al. 2003**). Des résultats ont montré que 54 isolats (30%) des 180 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* produisent des sclérotés après incubation sur l'agar, les sclérotés étaient tous de type « L », et aucune isolat d'*A. parasiticus* produit les sclérotés (**Arianne Costa Baquião et al 2013**). En outre, des différences dans la capacité de production des AFs peuvent être associées à la taille des sclérotés (**Cotty, 1989 ; Criseo et al. 2001**). D'après **Hua Sui-Sheng (2002)**, tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le morphotype « L », le plus fréquent, comprend des producteurs et des non producteurs. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie.

En ce qui concerne la contamination des amandes par les isolats aflatoxinogènes, les résultats ont révélé des concentrations assez importantes des isolats producteurs d'AFs dans la farine panifiable (**30,79%**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

Ce travail fait suite 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). Ces travaux nous permettent de fournir des informations sur la qualité des produits alimentaires, et de confirmer la présence des mycotoxines en fort concentrations, qui a fait augmenter nos contraintes et soucis vis-à-vis à ces métabolites secondaires. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier les espèces aflatoxinogènes dans le blé tendre en Algérie.

Les résultats obtenus montrent que le blé tendre (produits finis) sont fortement contaminées (**71,59%**) par les moisissures dont les genres *Aspergillus* (**14,27%**) et *Penicillium* (**85,76%**) sont les plus dominants. Nous avons également noté la dominance du genre *Aspergillus* dont les espèces appartenant aux sections *Flavi* (**47,36%**) et *Nigri* (**26,31%**) et *Terrei* (**26,31%**), dans tous les échantillons analysés. Les résultats de la production des AFs ont montré que (**44,82%**) (**13/29**) isolats appartenant à *Aspergillus* section *Flavi* produisent les aflatoxines. Ces isolats ont été classés en sept groupes différents dont la majorité présentait les caractères d'*A. flavus* typique (**84,61%**).

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 toxinogènes est important, plus les risques d'imprégnations toxiques sont élevés.

Bien que les pourcentages des isolats aflatoxinogènes dans la plupart des échantillons analysés soient inférieurs, mais les quantités d'AFs sécrétées peuvent être considérées comme un véritable risque pour la santé humaine. Car les effets chroniques (exposition répétée à des faibles doses) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires ainsi que du pouvoir de rémanence de ces toxines.

Sur le plan de la sécurité sanitaire des aliments, notre travail est une contribution à une analyse des risques liés à la contamination par les AFs de blé tendre. Il convient de noter que l'étude ne représente pas une large gamme de situations. Il serait intéressant, en perspective, d'effectuer les travaux suivants :

- Etendre l'étude sur un grand nombre d'échantillons ;
- Etudier d'une manière approfondie l'écologie des champignons toxinogènes et l'influence des conditions de stockage (température, humidité) sur la toxinogénèse;
- Appliquer les techniques moléculaires afin d'identifier d'une manière plus précise les isolats toxinogènes ;

- 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 ;

- Enfin il est indispensable d'élargir l'étude sur d'autres matrices alimentaires et d'autres régions d'Algérie, et sur d'autres champignons toxinogènes, afin de disposer d'avantage de renseignements sur ce type de contamination.

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

- D'étudier l'influence de la compétition ou de la synergie entre 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 ;
- Sélection génétique 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 ble 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 multiplié 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.

Partie bibliographie

-  **Arienne Costa Baquião, , Maitê Martins Melo de Oliveira, Tatiana Alves Reis, Patricia Zorzete, Danielle Diniz Atayde, Benedito Correa,2013** Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts 1127– 1132
-  **Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabañ es, F.J. (2001).** Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of food protection*, 64, 903-906.
-  **Abdel-Gawad, K.M., et Zohri, A.A. (1993)** -Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia*. 124, 55-64.
-  **Ayerst, G. 1969.** The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi, *Journal of Stored Products Res.* 5,127-14
-  **Asao, T., Büchi,G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. (1963).**Aflatoxins B and G. *Journal of American Chemical Society*. 85, 1706.
-  **Asao, T., Büchi,G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. 1965.**Structures of aflatoxins B and G1. *Journal of American Chemical Society*. 87, 822826.
-  **Alexopoulos, C.J., Mims C.W., et Blackwell, M. (1996).** - *Introductory Mycology*. 4th ed. New York, John Wiley and Sons, Inc.
-  **Abbas H.K., Williams W.P., Windham G.L., Pringle H.C. 3rd, Xie W., Shier W.T., (2002),** Aflatoxin and fumonisin contamination of commercial corn (*Zea mays*) hybrids in Mississippi, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (18), 5246-5254
-  **Ayalew A., Fehrmann H., Lepschy J., Beck R., Abate D., (2006),** Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia, *Mycopathologia*, 162 (1), 57-63

- ✚ **Ali N., Sardjono, Yamashita A., Yoshizawa Y., (1998)**, Natural co-occurrence of aflatoxin and Fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn from Indonesia, *Food Addit. Contam.*, 15 (4), 377-384
- ✚ **Arora, r.g., Frolen, H. & Nilsson, a., 1981**. Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. *Acta Vet Scand* 22, 638-641
- ✚ **Autrup, J.L., Schmidt, J., Seremet, T. and Autrup, H. (1991)**. Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B1 adducts to serum albumin. *Scand. J. Work Environ. Health* 17 : 436-440
- ✚ **A.F.S.S.A (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.
- ✚ **A.O.A.C (2000)**. - Association of Official Analytical Chemists. 17th end, 2000 Chapter 49, subchapter 1 Mycotoxins/subchapter 2 Aflatoxins.
- ✚ **Aksenov I.V., Eller K.I., Tutelyian V.A., (2006)**, Ochratoxin A contamination of cereal grain harvested in 2003 and 2004 years, *Vopr Pitan.*, 75 (1), 43-47
- ✚ **Berthier, J. et G. Valla (2001)**- Moisissures-Mycotoxines et aliments : du risque a la prévention. Université Claude Bernard Lyon I.
<http://handy.univlyon1.fr/service/cours/mycot/mycot.html>.
- ✚ **Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990)**, Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris
- ✚ **Bhatnagar D, Yu J, Ehrlich KC. 2002**. Toxins in filamentous fungi. In: Breitenbach M, Crameri R, Lehrer SB (Eds.), *Fungal Allergy and Pathogenicity*. Chem. Immunol. Basel, Karger 81:167-206.
- ✚ **Bennett J.W. et Klich M. (2003)**.-Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, 16, 497– 516.
- ✚ **Badillet G., de Briève C., Guého E., (1987)**, Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris.

- ✚ **Bradburn N., Coker R. D. & Blunden G., 1994.** The Aetiology of Turkey X Disease. *Phytochemistry*, 35 (3): 817
- ✚ **Bullerman, L.B. (1978).** -Significance of mycotoxins to food safety and human health. *Journal of Food Protection*, 42: 65-86.
- ✚ **Bankole, S.A.; Mabekoje, O.O. 2004.** - Occurrence of aflatoxin and fumonsin in preharvest maize from south-western Nigeria, *Food Addit. Contam.*, 21 (3), 251-255.
- ✚ **Baydar T., Engin A.B., Girgin G., Aydin S. et Sahim G. 2005.-** Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medical*, 12, 193–197.
- ✚ **Baliukoniene V., Bakutis B. and Stankevicius H. (2003).** Mycological and Mycotoxicological evaluation of grain, *Ann. Agric. Environ. Med.* 10 : 223–22
- ✚ **Breitholtz-Emanuelsson, A., Fuchs, R. and Hult, K. (1995).** Toxicokinetics of ochratoxin A in rat following intratracheal administration, *Natural Toxins* 3 : 101-103
- ✚ **Bayman P., Baker, J.L., Doster M.A., Michailides T.J. et Mahoney, N.E. (2002).**- Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2326–2329
- ✚ **Blumenthal CZ. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei* (2004) ;:** justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol Pharmacol.* 39:214–228
- ✚ **Bottalico A, Logrieco A. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Italy. In: Logrieco A, 2001 editor.** Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feeds in Europe. European Commission, COST Action 835, EUR 19695;. pp. 69–104
- ✚ **Barros, G., Torres, A. et Sofia Chulze, S. (2005).** - *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *Journal of Science Food and Agriculture*, 85, 2349–2353.

- ✚ **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.
- ✚ **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, 1215-1221.
- ✚ **Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., (2002),** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc
- ✚ **Chermette R., Bussieras J., (1993),** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort
- ✚ **Cotty P. J. (1989).**- Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. 79, 808–814
- ✚ **Cardwell, K.F., ET Cotty, P.J. (2002).** - Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Benin West Africa. *Plant Diseases*, 86, 434–439
- ✚ **Chetatha, M, 2013.** Contribution à l'étude mycologique et mycotoxicologique du café commercialisé dans la région de Laghouat du diplôme de Magister en sciences biologiques Option: Maitrise de la qualité microbiologique et du développement microbien. Soutenue 24/09/2013 à Université de Béchar, Algérie
- ✚ **Cole, R.J., et Cox, R.H. (1981).** - Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of General Applied Microbiology*, 99, 1215-1221.
- ✚ **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, 790–793
- ✚ **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. 171–17
- ✚ **Castoria R., Lima G., Ferracane R., Ritieni A., (2005)**, Occurrence of mycotoxin in Farro samples from southern Italy, *J Food Prot.*, 68 (2), 416-420
 - ✚ **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
 - ✚ **Cahagnier B., Richard-Molard D., (1998)**, Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-15
 - ✚ **Cotty P. J. (1989).**- Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology.* 79, 808–814.
 - ✚ **Criseo, G., Bagnara, A., et Bisignano, G. (2001).** - Differentiation of aflatoxin–producing and non–producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 291–295.
 - ✚ **Chapeland-Leclerc, F., Papon, N., Noël T., et Villard, J. (2005).** - Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue. Française. Laboratoires*, 373, 61–6
 - ✚ **Cardwell, K.F., ET Cotty, P.J. (2002).** - Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Benin West Africa. *Plant Diseases*, 86, 434–439.
 - ✚ **Doyle, M.P., Appelbaum, R.S., Brackett, R.E. et Marth, E.H. (1982).** - Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *Journal of Food Protection*, 45, 964–971
 - ✚ **Domsch, K.H., Gams, W., ET Anderson, T.-H. (1980).** -"Compendium of Soil Fungi".Academic Press (London).
 - ✚ **Dorner, J.W., Cole, R.J. ET Diener, U.L. (1984).** - The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid.*Mycopathologia*, 87, 13–15.
 - ✚ **Dutton, M. F., Ehrlich, K., ET Bennett, J. W. (1985).** - Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1392–139

- ✚ **Dalcero A., Magnoli C., Hallak C., Chiacchiera S.M., Palacio G., Rosa C.A., (2002)**, Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina, *Food Addit Contam.*, 19(11), 1065-1072
- ✚ **Domijan A.M., Peraica M., Jurjevic Z., Ivic D., Cvjetkovic B., (2005)**, **Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia**, *Food Addit Contam.*, 22 (7), 677-680
- ✚ **Domijan A.M., Peraica M., Cvjetkovic B., Turcin S., Jurjevic Z., Ivic D., (2005)**, Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharm.* 55, 349-356.
- ✚ **D'Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C. 1998**. Fungal toxins as disease elicitors. In J. Rose, ed. *Environmental toxicology: current developments*, pp. 253-289. Amsterdam, the Netherlands, Gordon and Breach Science Publishers
- ✚ **El khoury, A. (2007)**. Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1(AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Diplôme de Docteur en sciences de la vie. 200p. Option : Génie des procédés et de l'environnement. Soutenu le 3/07/2007 à l'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- ✚ **Edwards, S.G. (2003)**. - *Fusarium* mycotoxins in UK wheat. *Aspects of Applied Biology*, 68, 35-42.
- ✚ **El-nezami HS, Nicoletti G, Neal GE, Donohue DC et Ahokas J (1995)**. - Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem Toxicol*, 33:173179
- ✚ **El-Dessouki, S., (1992)**. Ochratoxin A in bier, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 11, 354, 355. Elgerbi A.M., Aidoo K.E., Candlish A.A., Tester R.F, (2004), Occurrence of aflatoxin M1 in randomly selected North African milk and cheese samples, *Food Addit. Contam.* 21 (6), 592-597
- ✚ **Fazekas B., Tar A.K., Zomborszky-Kovács M., (2002)**, Ochratoxin a contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001, *Acta Vet Hung.*, 50 (2), 177-188

- ✚ **Fujii S., Ribeiro R.M., Scholz M.B., Ono E.Y., Prete C.E., Itano E.N., Ueno Y., Kawamura O., Hirooka E.Y., (2006),** Reliable indirect competitive ELISA used for a survey of ochratoxin A in green coffee from the North of Paraná State, Brazil, *Food Addit Contam.*, 23 (9), 902-909
- ✚ **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.
- ✚ **Frisvad J.C., Skouboe P, Samson R.A. (2004).** - A new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3–O–methylsterigmatocystin: *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 442–453.
- ✚ **Frisvad, J. C., Thrane, U., et Samson, R. A. (2007).** -Mycotoxin producers. In J. Dijksterhuis et R. A. Samson (Eds.), *Food mycology. a multifaceted approach to fungi and Food* (pp. 135–159). Boca Raton: CRC Press.
- ✚ **Guarro J., Gené J. et Stchigel A.M. (1999).** - Developments in fungal taxonomy. *Clinical and Microbiological Review*, 12 (3), 454–500.
- ✚ **Gams ,W.,Christensen,M .,Onions A .H.S.,Pitt,J.I.et Samson,R.A.(1985).** – Infrageneric taxonomy of *Aspergillus*.In: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, R. A.Samson,Pitt,J.I.(eds),Plenum Press ,New York,pp. 55-61
- ✚ **Geiser D.M., Dorner J.W., Horn B.W. et Taylor J.W. (2000).** - The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 169–179.
- ✚ **Geiser D.M., Frisvad J.C. et Taylor J.W. (1998).**- Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial beta–tubulin and hydrophobin DNA sequences.*Mycologia*, 90, 831– 845
- ✚ **Galvano F, Galofaro F ET Galvano G (1996).** -Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: a worldwide review. *Journal of Food Protection*, 59: 1079- 1090
- ✚ **Groopman, J.D. and Donahue, K.F. (1988)** Aflatoxin, a human carcinogen: determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *J AOAC Int* 71, 861–867

- ✚ **Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P., 2007.** Studies on Aspergillus Section Flavi isolated from maize in northern Italy. International Journal of Food Microbiology 113, 330–338
- ✚ **Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., ET Denning, D. W. (2007).**Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer.
- ✚ **Horn, B.W., ET Wicklow, D.T., (1983).** Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by Aspergillus niger, Can. J. Microbiol., 29, 1087-1091.
- ✚ **Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. ET Pegler D.N. (1995).** - Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed.Cambridge, CAB International Mycological Institute,Egham, United Kingdom
- ✚ **Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L., Morrison C.J. (2005),** Molecular methods for the identification of Aspergillus species, 43 (1), 129-137
- ✚ **Horn B.W. et Dorner J.W. (1998).**-Soil populations of Aspergillus species from section Flavi along a transect through peanutgrowing regions of the United States. Mycologia, 90, 767–776.
- ✚ **Hua Sui Sheng T. (2002).** - Biocontrol of Aspergillus flavus by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin: and 16th Aflatoxin Elimination Workshops. October 13–15, 2003 Savannah,Georgia USA.intergeneric transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. Journal of General Applied Microbiology, 48, 9–16.
- ✚ **Henry, S.H. and Bosch, F.X. (2001).** Foodborne disease and mycotoxin epidemiology, in Foodborne Disease Handbook, 2nd ed., Hui, Y.H., Smith, R.A. & Spoerke, Jr., D.G., Eds., Marcel Dekker, New York^I
- ✚ **Hamilton, P.B., Huff, W.E., Harris, J.R. and Wyatt, R.D. (1982).** Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. Poult. Sci. 61: 1832-1837
- ✚ **Hanak.E, Boutrif.E, Fabre.P, Pineiro. M, 2002.** Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l'atelier international, CIRAD-FAO. Cédérom du CIRAD, Montpellier, France

- ✚ **Hocking A.D. ET Pitt J.I. (2003).** - Mycotoxigenic fungi, In: Hocking, A.D. (Ed.), Foodborne microorganisms of public health significance, 6th Ed. Australian Institute, Sydney
- ✚ **Horn B.W. ET Dorner J.W. (1998).** - Soil populations of *Aspergillus* species from section Flavi along a transect through peanutgrowing regions of the United States. *Mycologia*, 90, 767–776.
- ✚ **Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith, M., Ellis, J. J., Vandegraft, E. et Shannon, G.(1970).**- Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. Pages 202–210 In: Toxic Micro–organisms. M. Herzberg, ed. U. S. Gov. Print. Office, Washington, D.C.
- ✚ **Haydar, M., Benelli, L., ET Brera, C. (1990).** - Occurrence of aflatoxins in Syrian foods and foodstuffs: A preliminary study. *Food Chemistry*, 37, 261–268

- ✚ **Jakab, G.J., Hmielski, R.R., Zarba, A., Hemenway, D.R. & Jaquet, J., Lafont, J., et Lafont, P. (1982).** -Sur la contamination du lait par les aflatoxines.*Revue laitière française*, 42 : 63-67
- ✚ **Janardhana G.R., Raveesha K.A., Shetty H.S., (1999),** Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India), *Food Chem. Toxicol.*, 37, 863-868
- ✚ **Juszkiewicz T., Piskorska-Pliszczynska J., (1992),** Occurrence of mycotoxins in animal feeds, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 11 (4), 211-215
- ✚ **Jakab, G.J., Hmielski, R.R., Zarba, A., Hemenway, D.R. & Jaquet, J., Lafont, J., et Lafont, P. (1982).** -Sur la contamination du lait par les aflatoxines.*Revue laitière française*, 42 : 63-6
- ✚ **JECFA, (2001),** Safety evaluation of certain mycotoxins in food, Fifty-six report. WHO Technical Report Series, Geneva, 47
- ✚ **Jorgensen K., (1998),** Survey of pork, poultry, coffee, bier and pulses for ochratoxin A, *Food Addit. Contam.*, 5, 550-554.
- ✚ **Jarvis B.B. et Miller J.D. (2005).** - Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 67–372

- ✚ **Jianqiang, L., Xili, L. Feng, W. and Muhai, Z., 1999.** Microscopy and scanning electron microscopy of black embryo of wheat seed and the seed borne fungi. *Acta phytopathologica sinica* 29(1) 22-26.
- ✚ **Jimenez M., Mateo R., Querol A., Huerta T., Hernandez E. (1991).**- Mycotoxins and
- ✚ **Juan, C., Zinedine, A., Moltó , J. C., Idrissi, L., et Mañ es, J. (2008).** - Aflatoxins levels indried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control*, 19, 849–853.
- ✚ **Keller, S.E., Sullivan, T.M., et Chirtel, S. (1997).**Factors affeting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Indust. Microbiology, Biotechnology*, 19, 305-309
- ✚ **Kumagai, S., Bintvihok, A., Kono, M., Iwaki, M., Sugita-Konishi, Y., Ito, Y. & Kato, M., 1995.** In vitro aflatoxin B1-DNA binding by microsomes and its modulation by cytosol: comparison of various mammalian and avian livers in relation to species differences in susceptibility. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 36, 365-374.
- ✚ **Kuczuk, M.H., Benson, P.M., Health & H., Hayes, W. (1978)** Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 53: 11-20
- ✚ **Kuczuk, M.H., Benson, P.M., Health & H., Hayes, W. (1978)** Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res.* 53: 11-20
- ✚ **Krogh, P. (1987).** Ochratoxin A in food. *Mycotoxin in Food*. Academic Press, San Diego, 97-121
- ✚ **Krysinska-Traczyk E., Kiecana I., Perkowski J., Dutkiewicz J., (2001),** Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms in Eastern Poland, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 8 (2), 269-274
- ✚ **Kurtzman C.P., Horn, B.W. ET Hesseltine, C.W. (1987).** - *Aspergillus nomius*, a new

- ✚ **Lipps, P.E., 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
- ✚ **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.
- ✚ **Lopez-Garcia, R., Park, D.L., et Gutierrez de Zubiaurre, M.B. (1999).** - Procédés pour réduire la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires. In : *Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque*, TEC & DOC, 387-408
- ✚ **Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Luber G., Kieszak S., Nyamongo J , Backer L , Dahiye A D , Misore A , De Cock K, Rubin C., (2005),** Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya, *Environ. Health Perspectives*, 113, 1763-1767
- ✚ **Lea, T., Steien, K. and Stormer C., (1989).** Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression, *Mycopathologia* 107: 153-159
- ✚ **Luster, M.I., Germolec, D.R., Burleson, G.R., Jameson, C.W., Ackermann, M.F., Lamm, K.R. and Hayes, H.T. (1987).** Selective immunosuppressions in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A, *Cancer Res.* 47: 2259-2263
- ✚ **Lasram S., Bellí N., Chebil S., Nahla Z., Ahmed M., Sanchis V., Ghorbel A., (2007),** Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard, *Int J Food Microbiol.*, 114 (3), 376-379
- ✚ **Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., ET Perrone, G. (2003).** Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645-667.
- ✚ **Miller, J.D. et Trenholm, H.L. (1994).** - *Mycotoxins in grain: compounds other than Aflatoxin.* Eagan press, st Paul, Minnesota, USA.

- ✚ **Mislivec, P.B., Trucksses, M.W., et Stoloff, L. (1988).** -Effect of other toxigenic mold species on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in sterile broth shake culture, *Journal of Food Protection*, 51, 449-451.
- ✚ **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
- ✚ **Morin O. (1994),** *Aspergillus et aspergilloses: biologie*, Ed. *Techniques Encyl. Med. Chir.*(Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10
- ✚ **Mislivec, P.B. and Tuite, J. (1970).** Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dentcorn kernels. *Mycologia* 62: 75-88
- ✚ **Miller, J.D. (1995).** Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research* 31: 1–16
- ✚ **Moss, M.O. (1996).** Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 13S: 5–9
- ✚ **Majerus, P., Cutko, I., Dreyer, A., El-Dessouki, S., Eyrich, W., Reusch, H., Schurer, B. and Waiblinger, H.U. (1993).** Zur Belastungssituation von Ochratoxin A, in *Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs*, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 89: 112-113
- ✚ **Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. and Dalcero, A. (2003).** Mycoflora and ochratoxin–producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 37: 179–184
- ✚ **Martins M.L., Martins H.M., Gimeno A., (2003),** Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*), *Food Addit Contam.*, 20 (12), 1127-1131
- ✚ **Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1992).** A review of recent advances in understanding ochratoxicosis, *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988
- ✚ **Magan, N. ET Aldred, D. (2005).** - Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, S1, 10–16.

- ✚ **Mantle P.G. (2002).** - Risk assessment and the importance of ochratoxins. International
- ✚ **Magan, N. ET Aldred, D. (2005).** - Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. Food Additives and Contaminants, S1, 10–16
- ✚ **Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. ET Dalcero, A. (2003).** - Mycoflora and ochratoxin–producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. Letters in Applied Microbiology, 37, 179–184.
- ✚ **Molyneux, R. J., Mahoney, N., Kim, J. H., ET Campbell, B. C. (2007).** - Mycotoxins in edible tree nuts. International Journal of Food Microbiology, 119, 72–78.
- ✚ **Mehdi Razzaghi-Abyaneh¹, Masoomeh Shams-Ghahfarokhi², Abdolamir Allameh², Amirmohammad Kazeroon-Shiri³, Shahrokh Ranjbar-Bahadori³, Hasan Mirzahoseini⁴ & Mohammad-Bagher Rezaee⁵.(2006)** A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: Population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production
- ✚ **Nepote M.C., Piontelli E., Saubois A., (1997),** Occurrence of *Aspergillus flavus* strains in corn from Santa Fe, Argentina, Arch. Latinoam. Nutr., 47 (3), 262-264
- ✚ **Ngundi, M.M., Shriver-Lake, L.C., Moore, M.H., Ligler, F.S. and Taitt, C.R. (2006).** Multiplexed detection of mycotoxins in foods with a regenerable array, J Food Prot. 69 (12): 3047-3051
- ✚ **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,
- ✚ **Olutiola, P.O. (1976).** Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. Trans Br Mycol Soc. 67, 265–268.
- ✚ **Pitt J.I., Basilico J.C., Abarca M.L et Lopez C. (2000).**-Mycotoxins and toxigenic fungi. Medical Mycology, 38, 41–46.
- ✚ **Perry, J. J., Staley J. T., and S. Lory. (2004).** Microbiologie. Dunod. France.

- ✚ **Park, J.W., Kim, E.K., Shon, D.H. ET Kim, Y.B. (2002).** - Natural co-occurrence of Aflatoxin B1, Fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Additives and Contaminants*, 19, 1073–1080
- ✚ **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. (2001).** -Définition et origines des mycotoxies in : *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, 3-1
- ✚ **Park, D.I. (1993).** - Perspectives on mycotoxin decontamination procedures. *Food Additives and Contaminants*, 10, 49–60
- ✚ **Pildain M.B., Frisvad J. C., Vaamonde G., Cabral, J. Varga D. and Robert A. Samson.(2008)**-Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 725-735
- ✚ **Peterson S.W. (2006)**, Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* species, *Rev. Iberoam Micol.*, 23(3), 134-8
- ✚ **Pitt J.I., Basilico J.C., Abarca M.L et Lopez C. (2000).**-Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38, 41–46.
- ✚ **Pitt J.I., Hocking, A.D. (1997).** - *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and
- ✚ **Peterson, S.W. (2000).** - In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification*, Harwood Academic, and the Netherlands pp. 163–178
- ✚ **Pildain M.B., Frisvad J. C., Vaamonde G., Cabral, J. Varga D. and Robert A. Samson.(2008)**-Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 725-735
- ✚ **Park, J.W.; Choi, S.Y.; Hwang, H.J.et Kim Y.B. 2005.** - Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans, *Int. J. Food Microbiol.*, 103 (3), 305-314.
- ✚ **Pier, A.C., Richard, J.L. & Cysewski, S.J., 1980.** The implications of mycotoxins in animal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc* 176, 719-725

- ✚ **Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. & Castegnaro, M. (2002).** Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food additives and Contaminants*, Vol. 19, No. 3, (2002), pp.282-302, ISSN 0265-203X
- ✚ **Pitt J.I., (1988).** Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor, London
- ✚ **Pohland, A.E., Nesheim, S. and Friedman, L., (1992).** Ochratoxin A, a review, *Pure, Appl. Chem.* 64:1029-1046
- ✚ **Pena A. , Cerejo F. , Lino C. , Silveira I., (2005),** Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal Bioanal Chem.*, 382 (5), 1288-129
- ✚ **Petrova–Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. and Castegnaro, M. (1988).** Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives and Contaminants* 5: 299–30
- ✚ **Peterson, S.W. (2000).** - In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Harwood Academic, and the Netherlands pp. 163–178
- ✚ **Pitt, J I and Miscamble, B F (1995)** Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Jornal of Food Protection*, 58, 86-90
- ✚ **Pitt J.I., Hocking, A.D. (1997).** - *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and
- ✚ **Pildain M.B., Frisvad J. C., Vaamonde G., Cabral, J. Varga D. and Robert A. Samson.(2008)**-Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 725-735
- ✚ **Paula Rodrigues , Armando Venâncio , Zofia Kozakiewicz , Nelson Lima (2009)** A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds *International Journal of Food Microbiology* 129 (2009) 187–193.

- ✚ **Purcell, S. L., Phillips, D., and Mackey, B. E. 1980.** Distribution of *Aspergillus flavus* and other fungi in several almond-growing areas of California. *Phytopathology* 70:926-929
- ✚ **Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G., 2004.** Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. *Food Additives and Contaminants* 21, 479–487.
- ✚ **Riba, A. (2008).** -Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans la filière céréales en Algérie. Diplôme de Docteur en sciences biologiques. 190p. Option : Microbiologie. Soutenu le 13/12/2008 à l'UMMTO, Algérie
- ✚ **Reboux, G. (2006).** -Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46, 208–212.
- ✚ **Raper K. et Fennell D.J. (1965).**-The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore
- ✚ **Rigó , K., Varga, J., Toth B., Téren J., Mesterhazy A. et Kozakiewicz Z. (2002).** Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences on the intergeneric transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *Journal of General Applied Microbiology*, 48, 9–16.
- ✚ **Robledo M.L., Marin S., Ramos A.J., (2001),** Contamination natural con micotoxinas en maiz forrajero y granos de café verde en el Estado Nayarit (Mexico), *Rev. Iberoam. Micol.*, 18, 141-144
- ✚ **Ribelin, W.E., Fukushima, K. and Still P. (1978).** The toxicity of ochratoxin A to ruminants *Canadian J. Comp. Med.* 42: 17217
- ✚ **Riba A. (2008).** Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines A dans la filière blé en Algérie, thèse de doctorat
- ✚ **Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi A. et Sabaou, N. (2010).** *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2772–2777.
- ✚ **Riba, A., Matmoura A, Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi A. ET Sabaou, N. (2013).** Investigations on aflatoxigenic fungi and aflatoxins contamination in

- some nuts sampled in Algeria. African Journal of Microbiology Research pp. 4974-4980, ISSN 1996-0808
- ✚ **Richard, J.L., Bhatnagar, D., Peterson, S. ET Sandor, G. (1992).** -Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia*, 120,183–188
 - ✚ **Strohl, W. R. (1997).** Industrial antibiotics: today and the future. In WR (ed). *Bio/technology of antibiotics*, 2nd edn. Marcel Dekkr. New York. 1-47.
 - ✚ **Samson R.A., Hong S.B. et Frisvad J.C. (2006).**- Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, 133–148.
 - ✚ **Samson R.A., Houbraken J.A., Kuijpers A.F.A., Frank M.J. et Frisvad J.C. (2004).** - New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50, 45–61.
 - ✚ **Strachan T. & Read A. P., 1999.** *Human Molecular Genetics 2*. Taylor and Francis Books. 674p.
 - ✚ **Scheidegger K.A. et Payne G.A. (2003).**-Unlocking the secrets behind secondary metabolism,A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, 22, 427–463.
 - ✚ **Smith J.E. ET Moss M.O. (1985).** - *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*, John Wiley ET Son, Chichester.
 - ✚ **Samson R.A., Hong S.B. ET Frisvad J.C. (2006).** - Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, 133–148.
 - ✚ **Siame B.A., Mpuchane S.F., Gashe B.A., Allotey J., Teffera G., (1998),** Occurrence of aflatoxins, fumonisin B1 and zearalenone in foods and feeds in Bostwana, *J. Food Prot.*, 61 (12), 1670-1673
 - ✚ **Scudamore K. A. (1999).** *Mycotoxins, and independent assessment of MAFF–funded applied research and surveillance 1993– 1996. Report of studies commissioned by the Food Contaminants Division of the UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, PB 4045*
 - ✚ **Scudamore, K.A. and Livesey, C.T. (1998).** Occurence and significance of mycotoxins in forage crops and silage, a review. *J. Sci. Food Agr.* 77: 1-7

- ✚ **Sangare-Tigori B., Dem A.A., Kouadio H.J., Betbeder A.M., Dano D.S., Moukha S., Creppy E.E., (2006),** Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002, *Hum Exp Toxicol.*, 25 (4), 211-216
- ✚ **Singh, G.S., Chauhan, H.V., Jha, G.J. and Singh, K.K. (1990).** Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks, *Pathol* 103: 399-410
- ✚ **Shelton, A. M., J.-Z. Zhao, and R. T. Roush. 2002.** Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 845-881.
- ✚ **Schade, J. E.; McCreevy, K.; King, A. D.; Mackey, B.; Fuller, G.** Incidence of Aflatoxin in California Almonds. *Appl. Microbiol.* 1975, 29, 48-53.
- ✚ **Schatzki, T. F. Distribution of Aflatoxin in Almonds. J. Agric. Food Chem.** 1996, 44, 3595-3597.
- ✚ **Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A., Migheli, Q. (2005).** Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse-transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology* 98, 201–210
- ✚ **Samson R.A., Houbraken J.A., Kuijpers A.F.A., Frank M.J. et Frisvad J.C. (2004).**- New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50, 45–61
- ✚ **Saito, M. et Tsuruta, O. (1993).**- A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proc of the Japanese Association of Mycotoxicology* *Mycotoxicology*, 37, 31–36.
- ✚ **Terao, K., ET Ueno, Y. (1978).** -Morphological and functional damage to cells and tissues in: Uruguchi, K and Yamazaki, M., eds. *Toxicology. Biochemistry and Pathology of mycotoxins.* John Wiley & Sons, (New York), 189-197
- ✚ **Tran-Dinh, N., Pitt, J. I. ET Carter, D.A. (1999).** - Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research*, 103, 1485–1490.

✚ TIA3 avril 2013

- ✚ **Toncheva, D., Dimitrov, T. and Tzoneva, M. (1998).** Cytogenetic studies in Balkan endemic nephropathy. *Nephron* 48(1): 18– 21
- ✚ **Tjamos S.E., Antoniou P.P., Tjamos E.C., (2006),** *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece, *Int J Food Microbiol.*, 111 (1), 61-66
- ✚ **Terplan G., Wenzel S., (1993),** Untersuchungen zum einfluss des Mykotoxins Ochratoxin A auf die Tiergesundheit und auf das Rückstandsverhalten beim Schwein und aus daraus hergestellten Wurstwaren, *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 44, 129-152.
- ✚ **The Almond Board of California, 2002:** Results of aflatoxin tests on raw and semi- processed almonds between 1993-2000. *ABC Surveillance Data.* pp 1-3.
- ✚ **Ueno, Y. and Kubota, K. (1976).** DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Res.* 36: 445-45
- ✚ **Varga, J., Kocsubé, S., Tó th, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson,R.A. (2007).** -*Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world–wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1925–1932
- ✚ **Varga J., Rigo K., Toth B., Teren J. ET Kozakiewicz Z. (2003).** Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 29–36.
- ✚ **Vaamonde G., Patriarca A., Fernandez Pinto V., Comerio, R. ET Degrossi C. (2003).**-Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section Flavi from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 79–84.
- ✚ **Vargas E.A., Preis R.A., Castro L. et Silva C.M., (2001).**- Co–occurrence of aflatoxins B1, B2,G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. *Food Additive and Contaminants*, 18,981–986

- ✚ **Vesely, D., Vesela, D. and Jelinek, R. (1983).** Comparative assessment of the aflatoxin B1, B2, G1, G2 and M1 embryotoxicity in the chick embryo, *Toxicol. Letters* 15: 297-302
- ✚ **Van Egmond, H.P. (1991).** regulatory aspects of mycotoxins in asia and africa in *champ*: B.R., Highly, E, HOCKING, A.D & Pitt J.J. *Fungi mycotoxins in stored products: proceeding of an international conference, Bangkok, Thailand 23 -26 April 1991, ACIAR: proceeding 36: 198 -204*
- ✚ **Van der Merwe KJ, Steyn PS, et Fourie L (1965)** *Mycotoxins, Part II. The constitution of ochratoxins A, B and C, metabolites of Aspergillus ochraceus* *willh. J chemical Society*, 5:7083-7088.
- ✚ **VINING, L. C. 1990.** Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 395-427
- ✚ **Vaamonde G., Patriarca A., Fernandez Pinto V., Comerio, R. et Degrossi C. (2003).**-Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section
- ✚ **Weidenbö rner, M. (1998).** - *Lebensmittel-Mykologie* B.Behr's Verlag GmbH und Co.1 ISBN 3-86022-457-3.
- ✚ **Wicklow D.T., ET Shotwell O.L. (1983)** - Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and selerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 1–5.
- ✚ **Wang D.S., Liang Y.X., Nguyen T.C., Le D.D., Tanaka T., Ueno Y., (1995),** Natural cooccurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B1 in corn for feed in north Vietnam, *Nat. Toxins*, 3 (6), 445-449
- ✚ **Wogan, G. N. (2000).** - Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Seminars in Cancer Biology*, 10(3), 201–210.
- ✚ **Wild, C.P., Garner, R.C., Montesano, R. & Tursi, F., 1986.** Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats
- ✚ **Würgler, F.E., Friederich, U. and Schlatter, J. (1991).** Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cnestin in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.* 261: 209-216

- ✚ **Weidenborner, M., 2001.** Pine nuts: The mycobiota and potential mycotoxins. Canadian journal of microbiology 47(5):460-464
- ✚ **Weidenbö rner, M., Wieczorek, C., Appel, S., K u n z,B. (2 0 0 0).**- W h o l e w h e a t a n d w h i t e w h e a t f l o u r " t h e m y c o b i o t a a n d p o t e n t i a l m y c o t o x i n s . Food Microbiology, 17 ,103-107
- ✚ **Wilson, D.M., Mubatanhema, W. ETJurjevic, Z. (2002).** - Biology and ecology of mycotoxigenic Aspergillus species as related to economic and health concerns, Advances Experimental and Medical Biology, 504, 3–17.Carcinogenesis 6, 853-858.
- ✚ **Wicklow, D.T., Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Adams, G.L., 1980.** Interference competition and aflatoxin levels in corn. Phytopathology 70, 761-764.
- ✚ **Yiannikouris, A. ET Jouany, J.P. (2002).** - Mycotoxins in feeds and their fate in animals, a review. Animal Research, 51, 81–99
- ✚ **Zummo N, Scott GE, (1992),** Interaction of Fusarium moniliforme and Aspergillus flavus on kernel infection and aflatoxin contamination in maize ears, Plant. Dis., 76, 771-773
- ✚ **Zinedine, A., (2009).** -Détermination des mycotoxines dans les aliments commercialisés au Maroc et étude sur les bactéries lactiques et leur pouvoir de conservation et de biotransformation.Diplôme d’habilitation à Diriger des Recherches. INRA, Toulouse, France.
- ✚ **Zimmerli, B. and Dick, R. (1996).** Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment, Food Addit. Contam 13 : 655-668

ANNEXE I

Composition des milieux de cultures utilisés :

Milieu d'isolement DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar) :

Glucose.....	10g
Peptone.....	5g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0.5g
Rose Bengale.....	25mg
Dichloran (2, 6 dichloro-4-nitroaniline).....	2g
Chloramphénicol	100mg
Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000g
PH final	5,6±0.2

Le rose Bengale est additionné sous forme solubilisée à raison de 0,5 ml/litre de milieu d'une solution de 5% dans l'eau.

Le dichloran est additionnée sous forme solubilisée à raison de 1ml/litre de milieu d'une solution de 0.2% dans l'éthanol.

Milieu PDA (Pomme de Terre,Dextrose,Agar) :

Pomme de terre.....	200g
Agar.....	15g
Glucose	20g
Eau dis.....	1000ml
PH final	5,6±0.2

Milieu à base d'extrait de noix de coco gélosé (Coconut Agar Medium)

(CAM) :Cent grammes (100g) de la noix de coco déchiquetée sont homogénéisés pendant 5 minutes avec 300ml d'eau distillée portée à ébullition. Le mélange est filtré à l'aide du tissu en mousseline. Le pH final est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 2N. Le filtrat est additionné de 20g d'agar puis complété à 1000 ml par l'eau distillée.3g de β -cyclodextrine (β -cyd) sont ajoutés à un litre de milieu.

Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar):

Saccharose.....	30g
-----------------	-----

Extrait de l'5g
Czapek concentré.....10ml
K₂HPO₄.....1g
Agar.....15g
Eau distillée.....1000ml
PH final 5,6±0.2

N.B. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage durant 15 min à 120°c.

ANNEXE II

1. Les appareils utilisés dans cette étude sont :

- Agitateur (Yellow, line)
- Agitateur magnétique
- Autoclave
- Balance de précision
- Becbenzen
- Centrifugeuse (SIGMA)
- Contour de colonies (FUNKE GERBER)
- la cuve
- Distillateur
- Etuve (Mettler)
- La Hotte
- Micro-onde
- Micro-seringue
- Micropipette (1ml, 0.1ml)
- Microscope optique (MOTIC, type 102M)
- plaques de gel de silice-60 (plaque de CCM)
- Réfrigérateur (LG)
- UV radiation (254 nm; 365 nm)

2. Les solvants:

Acide chlorhydrique (HCl) à 4%,

Le méthanol (CH₃OH),

Éthanol (C₂H₅OH),

Acétonitrile (C₂H₃N),

Chloroforme (CHCl₃).

Résumé

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*. Les mycotoxines ont des structures chimiques et des effets toxiques très variés. Chez les animaux d'élevage, l'exposition aux mycotoxines peut se traduire par une baisse des performances zootechniques et l'altération de la santé animale. A cela, il faut ajouter un problème de sécurité alimentaire suite au passage de certaines mycotoxines et/ou de leurs métabolites dans les productions animales, notamment le lait. Dans ce contexte l'objectif de ce travail est d'isoler et déterminer la flore fongique dans **09** échantillons de la farine blé tendre et d'identifier les espèces toxigènes du genre *Aspergillus* ainsi que son pouvoir producteur des aflatoxines et d'ochratoxine A dans les souches étudiées.

L'analyse de la flore fongique de **09** échantillons, (**01 de chaque produit : BTS, B1,R1, B3,B4,B5,le son, farine supérieur et farine panifiable**), par la méthode (directe) et (indirecte) montre une contamination par les genres *Aspergillus*, *Penicillium*. La méthode des grains désinfectés s'avère plus intéressante et permet de détecter le pourcentage de contamination interne (profonds). Les taux de contamination profonde ne dépassent pas **2%** dans tous les échantillons analysés. Les principaux genres fongiques dominants isolés sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Ils ont été retrouvés dans toutes les variétés analysées avec des taux de **(36%)(64%)** respectivement de la flore totale identifiée. Les principales espèces isolées appartiennent aux sections Flavi, Nigri et Terrie du genre *Aspergillus*, ces dernières étant les plus dominantes avec **(80,02%), (29,41%), (19,53%) et (12,5%)**, respectivement du total d'*Aspergillus*. La production d'AFs des isolats d'*Aspergillus* section Flaviaflatoxinogènes pour **19** isolats a été réalisée sur milieu CAM. La production est confirmée par CCM. Les résultats obtenus sur milieu CAM/CCM ont révélé un taux de **(24,13%)/ (44,82%)** respectivement. L'ensemble des résultats relatifs à l'étude des caractères morphologiques et chimiotypiques des isolats d'*Aspergillus* section Flaviaflatoxinogènes indique que cette section est dominée par l'espèce *A. flavus* typique **(84.61%)**, un isolat **(7,69%)** d'*A. parasiticus* a été isolé, et la présence d'un isolat **(7,69%)** d'*A. flavus* atypique, s'il produit de CPA.

Mots clés : aflatoxines, farine de blé tendre, *Aspergillus* section Flavi, Algérie

Summary

Mycotoxins are secondary metabolites secreted by molds belonging mainly to the genus *Aspergillus*, *Penicillium*. Mycotoxins have a variety of chemical structures and toxic effects. In livestock, exposure to mycotoxins may result in decreased zootechnical performance and impaired animal health. To this must be added a problem of food safety following the passage of certain mycotoxins and / or their metabolites in animal production, in particular milk. In this context, the aim of this work is to isolate and determine the fungal flora in **09** samples of the common wheat flour and to identify the toxinogenic species of the genus *Aspergillus* and its production capacity of aflatoxins and ochratoxin A in strains studied.

The analysis of the fungal flora of **09** samples (**01 of each product: BTS, B1, R1, B3, B4, B5, bran, upper flour and bread flour**), by the (direct) and (indirect) a contamination by the genera *Aspergillus*, *Penicillium*. The method of disinfected seeds is more interesting and allows to detect the percentage of internal contamination (deep). Deep contamination rates did not exceed **2%** in all samples analyzed. The main dominant fungal genes isolated are *Aspergillus* and *Penicillium*. They were found in all varieties analyzed with rates of **(36%) (64%)** respectively of the total flora identified. The main isolated species belong to the Flavi, Nigri and Terrie sections of the genus *Aspergillus*, the latter being the most dominant species with **(80.02%), (29.41%), (19.53%) and (12.5%)**, respectively, of the *Aspergillus* total. The AFs production of the *Aspergillusflavia* aflatoxinogenic isolates for **19** isolates was performed on CAM medium. Production is confirmed by CCM. The results obtained on CAM / TLC medium revealed a rate of **(24.13%) and (44.82%)**, respectively. The results of the study of the morphological and chemotypical characteristics of the *Aspergillusflavia* aflatoxinogenic isolates indicate that this section is dominated by the typical *A. flavus* species **(84.61%)**, an isolate **(7.69%)**. *A. parasiticus* was isolated, and the presence of an atypical *A. flavus* isolate **(7.69%)**, if it produces CPA.

Keywords: aflatoxins, wheat flour, *Aspergillus* section Flavi, Algeria

ملخص

تعتبر السموم الفطرية مركبات ثانوية تفرزها فطريات تنتمي أساسا إلى أجناس *Aspergillus*, *Penicillium*. تمتلك هذه السموم تراكيب كيميائية وآثار سمية متعددة. إن تعرض حيوانات المزارع لهذه السموم يؤدي إلى تدهور صحتها وانخفاض في إنتاجها. إضافة إلى هذا يمثل انتقال هذه السموم إلى المواد الغذائية ذات الأصل الحيواني التي تشكل خطر علي صحة الإنسان. وفي هذا السياق، كان الهدف من هذا العمل عزل و تحديد الفطريات في 09 عينات لمسحوق القمح اللين و كشف انواع السموم من نوع *أسبرجيلوس* و قدرته علي انتاج *أفلاتوكسين* و *اكراتوكسين* أ في سلالة المدروسة .

تحليل الفطري من 09 عينات، 01 كل من B5، B4، B3، R1، B1، BTS، والنخالة، والدقيق الممتاز والدقيق لصناعة الخبز من خلال طريقة (المباشرة) والبرامج (غير المباشرة) تلوث من قبل الأجناس *أسبرجيلوس* ، *البنسليوم*. طريقة البذور المطهرة هي أكثر إثارة للاهتمام ويسمح للكشف عن نسبة التلوث الداخلي (عميق). لم تتجاوز معدلات التلوث العميق 2% في جميع العينات التي تم تحليلها. الجينات الفطرية الرئيسية المهيمنة معزولة هي *أسبرجيلوس* و *البنسليوم*. تم العثور عليها في جميع الأصناف التي تم تحليلها بمعدلات (36%) (64%) على التوالي من مجموع النباتات المحددة. الأنواع الرئيسية المعزولة تنتمي إلى أقسام *فلافي*، و *تيري نيقري* من جنس *أسبرجيلوس* ، وهذه الأخيرة هي الأكثر المهيمنة مع 80.02%، 29.41%، 19.53% و 12.5% على التوالي من إجمالي *أسبرجيلوس*. وقد تم إنتاج A.F.s من *أسبرجيلوس فلافي* العزلات الأفلاتوكسينوجين ل 19 العزلات على الوسط C.A.M. يتم تأكيد الإنتاج عن طريق CCM. وكشفت النتائج التي تم الحصول عليها في وسط CAM/CCM معدل 24.13% و 44.82% على التوالي. النتائج المحصل عليها تركزت علي دراسة المميزات المورفولوجية و النمط الكيميائي لنوع *أسبرجيلوس* يعزل *Flaviaflatoxinogenese* تشير إلى أن هذا القسم يهيمن عليها نوع *أسبرجيلوس فلافس* نموذجي (84.61%)، وعزل (7.69%). تم عزل *أسبرجيلوس الطفيلية*، ووجود عزل (7.69%) *أسبرجيلوس فلافس* غير نمطية ، إذا كان ينتج CPA.

الكلمات الرئيسية: الأفلاتوكسين، دقيق القمح اللين، قسم *أسبرجيلوس فلافي* ، الجزائر