

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

FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES VETERINAIRES ET BIOLOGIQUES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



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 champignons
mycotoxinogènes à partir de riz stocké dans une
Coopérative des Céréales et des Légumes Sec (CCLS) de
Blida.*

Soutenu le : 03/10/2013

Réalisé par :

M^{elle}. LEKHAL MAHMOUD Amina & M^{elle}. MERSELLEM Nadia

Devant le jury composé de :

M ^{me} ZARKAOUI A.	M.C.A	USD Blida	Président
M ^{elle} KADRI F.	M.A.A	USD Blida	Examinatrice
M ^{me} LAMARI L.	M.A.A	ENS Kouba	Examinatrice
M ^{elle} MEKLAT A.	M.A.A	USD Blida	Promotrice
M ^{me} AZZOUNE N.	M.A.A	UMB Boumerdès	Co-Promotrice

Promotion : 2012 - 2013

Avant-propos

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de biologie des systèmes microbiens (LBSM) de l'École normale supérieure de Kouba d'Alger, dirigé par le professeur **Sabaou N.** Nos sincères remerciements pour son accueil bienveillant au sein de laboratoires, pour la confiance qu'il nous a constamment témoignée et de nous avoir donné la chance d'accomplir ce mémoire. Nos remerciements vont en particulier à :

Madame **Meklat A.**; maître de conférences B à l'université de Blida. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude pour nous avoir initié à la recherche. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance et nos remerciements les plus vifs pour toute l'intention particulière qu'elle a portée à la rédaction de ce mémoire, pour son soutien, sa gentillesse, ses encouragements et sa sympathie.

Madame **Azzoune N.**; maître assistante A à l'université de Boumerdes, pour nous avoir suivi de très près tout au long de notre partie expérimentale et qui nous avons appris les méthodes d'analyse de laboratoire nécessaires pour ce travail. Nous la remercions vivement pour son soutien, et pour le fait de nous avoir fait partager son expérience.

Nombreux sont ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Nous adressons nos remerciements à :

Madame **Zarkaoui A.**, maître assistante A à l'USD de Blida, d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail. Nous lui sommes très reconnaissant pour ces judicieuses suggestions.

Madame **Kalri F.** maître assistante A à l'USD de Blida et madame **Lamari L.** maître de conférences à l'ENS de Kouba, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur **Bouras N.**; maître de conférence à l'ENS de Kouba nous le remercions pour ses conseils précieuses et ses critiques qui nous ont aidés au sein de laboratoire. Nous lui sommes très reconnaissant pour toute l'intention particulière qu'il a portée à la correction de ce mémoire.

Monsieur **Mahdi A.** maître de conférences à l'ENS de Kouba, nous le remercions pour sa gentillesse, son soutien et ses conseils, sa collaboration et son aide durant la période expérimentale.

Monsieur **Riba A.** maître de conférences à l'Université de Boumerdès, nous adressons à lui nos vifs remerciements pour son aide précieuse, ses encouragements et son soutien, il serait impossible d'oublier.

Mesdames **Zebiri S.** et **Bouti K.** ; maîtres de conférences à l'ENS de Kouba, nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à tout les deux, pour toute l'attention que vous nos avez accordée, et surtout pour les services rendues au cours de travail expérimentale.

Nous remercions également **toute l'équipe de la Coopérative des Céréales et des Légume Secs (CCLS) de Blida**, du directeur jusqu'à le dernier travailleur, pour sa gentillesse et ses collaboration.

Nous aimons également exprimer nos vifs remerciements à **tous nos enseignants**, du primaire à l'université, particulièrement nos enseignants de lycée de Malek Ben Nabi de Mouzaïa.

Dédicace

Avec l'aide de dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Mon père « Mohamed »

Ma mère « Malika »

*Qui sont toujours présents et continuent de l'être pour faire mon
bonheur.*

Mes sœurs : Nabila, Hanane et Sara, et Mes frères : Bilal et

Abdelkader.

*Les fleurs de la famille : Youssouf, Abdelrahime, Ala'e et
Ishake.*

Ma grande famille.

Mes amis : Nadia, Rima, Baya, Samia, Asma.....

Les étudiants de Microbiologie et Toxicologie Alimentaire.

A tout ce que j'aime.

. Amina

Dédicace

Je dédie ce travail à

Mon père Mohamed, pour ses encouragements incessants et son soutien moral aux moments difficiles.

Mon adorable mère Yamina, qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour être sacrifiée pour que ces enfants grandissent et prospèrent. Que dieu la protège et lui donne bonne santé et qu'elle trouve ici la preuve de ma reconnaissance infinie.

Mes sœurs Rabia, Amira, Karima, Djamila, Nabila.

Ewch'la ite, que dieu les protège et leurs donne une vie pleine de réussite et de bonheur

A tous mes amis

.Nadia.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN:** Acide désoxyribonucléique.
- ADNr:** Acide désoxyribonucléique ribosomale.
- AFB1:** Aflatoxine B1.
- AFs:** Aflatoxines.
- AFSSA:** Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
- AIRC :** Agence Internationale de Recherches sur le Cancer.
- AOAC:** Association of Official Analytical Chemists.
- aw:** Activity of water.
- CAM:** Coconut Agar Medium.
- CCLS:** Coopérative des Céréales et de légumes Secs.
- CCM:** chromatographie sur couche mince.
- CFU:** Unité Formant de Colonie.
- CYA:** Czapeck Yeast Extract Agar.
- DJT:** Dose Journalière Tolérable.
- DRBC:** Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar.
- FAO:** Food and Agriculture Organization.
- FFT:** Flore Fongique Total.
- HPLC:** High Performance liquid Chromatography.
- ISO:** International Organization for Standardization.
- LBSM :** Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens.
- MEA:** Malt Extract Agar.
- NEB :** Néphropathie Endémique des Balkans.
- OAIG :** Organisme Algérienne de l'Importation des Grains.
- O.M.S :** Organisation Mondiale pour la Santé.
- OTA:** Ochratoxine A.
- PDA:** Potato, Dextrose, Agar.
- UV:** Ultra-Violet.
- ZEA:** Zéaralénone.

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 01. Classification des champignons.....	03
Tableau 02. Les <i>Aspergillus</i> producteurs de mycotoxines.....	05
Tableau 03. Caractères morphologiques des espèces d' <i>Aspergillus Flavi</i>	08
Tableau 04. Présence des <i>Aspergillus</i> dans les céréales des différents pays.....	10
Tableau 05. Les principales mycotoxines et les conditions d'apparition.....	11
Tableau 06. Données sur les échantillons de riz prélevés au niveau de CCLS de Lida.....	20
Tableau 07. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 6 échantillons de riz stocké au CCLC depuis 2010.....	33
Tableau 08. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 2 échantillons de riz stocké au CCLC depuis 2011.....	34
Tableau 09. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 8 échantillons de riz stocké au CCLC depuis 2012.....	35
Tableau 10. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 7 échantillons de riz stocké au CCLC depuis janvier 2013.....	36
Tableau 11. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 23 échantillons de riz stocké au CCLS depuis 2010, 2011, 2012 et 2013.....	37
Tableau 12. Distribution des sections d' <i>Aspergillus</i> isolées des échantillons de riz stocké au CCLC depuis 2010, 2011, 2012 et 2013.....	39
Tableau 13. Les isolats aflatoxinogènes appartenant à la section <i>Flavi</i> (<i>A. flavus</i>).....	43
Tableau 14. La Distribution des isolats ochratoxinogènes appartenant a section <i>Terrei</i>	44
Tableau 15. détection et quantification par HPLC d'AFs dans 6 isolats <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	46
Tableau 16. Les milieux des cultures utilisés.....	62
Tableau 17. Les appareils utilisés.....	63
Tableau 18. Résultats de l'évaluation du pouvoir producteur d'AFs chez tous les isolats <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	65
Tableau 19. Résultats de l'évaluation du pouvoir producteur d'OTA chez tous les isolats <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> , <i>Nigri</i> et <i>Terrei</i>	66

INDEX DES FIGURES

Figure 01. Caractères macromorphologiques du genre <i>Aspergillus</i>	07
Figure 02. Les conditions toxigènes.	12
Figure 03. Description et caractérisation de riz.....	15
Figure 04. Le stockage de riz au niveau de CCLS de Blida (à gauche), riz blanc <input type="checkbox"/> décortiqué (à droite).....	18
Figure 05. Technique de dénombrement par étalement en surface.	20
Figure 06. Méthode d'ensemencement direct des grains sur le milieu DRBC.....	21
Figure 07. Représentation schématique de la procédure expérimentale de l'extraction d'aflatoxine et d'ochratoxine.....	24
Figure 08. Représentation schématique de la procédure expérimentale de la réalisation de chromatographie sur couche mince pour la détection de fluorescence de l'aflatoxine et de l'ochratoxine.....	26
Figure 09. Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus</i> n. poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.....	28
Figure 10. Aspect microscopique de l'aire <i>Aspergillus</i> (GX40).....	28
Figure 11. Aspect macroscopique de genre <i>Penicillium</i> sur milieu DRBC et CYA après 7 jours d'incubation à 28°C.....	29
Figure 12. Aspect microscopique de <i>Penicillium</i> (G X40).....	29
Figure 13. Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	30
Figure 14. Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA.....	31
Figure 15. Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C.....	31
Figure 16. Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Terri</i> après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C.....	32
Figure 17. Fréquence du genre <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dans les 23 échantillons de riz analysés selon les méthodes utilisées.....	38
Figure 18. La fréquence des sections d' <i>Aspergillus</i> isolés dans tous les échantillons de riz stocké selon les années de stockage et la méthode utilisée pour leur isolement.....	40
Figure 19. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production	

des AFs par <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).....	41
Figure 20. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> sur CCM.....	42
Figure 21. Fréquence (%) des isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> producteurs d'aflatoxine selon les années de stockage	42
Figure 22. Fréquence (%) des isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Terrei</i> producteurs d'OTA selon les années de stockage.....	45
Figure 23. Résultats de la chromatographie sur couche mince des isolats aflatoxigènes de section <i>Flavi</i>	64

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier la flore fongique en particulier le genre *Aspergillus* qui contamine les échantillons de riz stocké au niveau de la Coopérative des Céréales et des Légumes Sec (CCLS) de Blida. La démarche générale qui a été adoptée consiste l'isolement et le dénombrement des moisissures. Les principaux genres et espèces potentiellement toxigènes sont identifiés morphologiquement et la fréquence du genre *Aspergillus* a été déterminée, et le pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A des isolats appartenant à ce genre a été évalué.

L'analyse de la flore fongique de 23 échantillons de riz stocké depuis 2010, 2011, 2012 et 2013, par deux méthodes montre une forte contamination par les genres *Aspergillus* et *Penicillium*. La méthode de dilution affirme une nette dominance du genre *Aspergillus* (69,5%) suivi du genre *Penicillium* (24,9%), contrairement à la méthode des grains qui démontre la dominance de genre *Penicillium* (58,2%) suivi par le genre *Aspergillus* (38,2%). Quatre sections différentes d'*Aspergillus* ont été identifiées dont *Aspergillus* section *Flavi* est la plus dominante, ce résultat a obtenu par les deux méthodes.

Le pouvoir producteur d'aflatoxines pour 59 isolats (tous sont des *Aspergillus* section *Flavi*) et d'ochratoxine A pour 34 isolats (*Aspergillus* section *Terrie*, *Fumigati* et *Nigri*), a été déterminé par CCM.

L'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines a révélé un taux d'isolats aflatoxinogènes de 44,1% sur milieu à base d'extrait de noix de coco, ce résultat a été confirmé par CCM qui montre que tous les isolats sont producteurs d'aflatoxine de type B. L'analyse par la chromatographie démontre que 46,2% des isolats se sont révélés moyennement producteur, 26,9 % fortement producteur et 26,9 % sont faiblement et très faiblement producteur. Par ailleurs, 6 isolats d'*Aspergillus* section *Falvi* ont fait l'objet d'une analyse pour leur pouvoir producteur d'AF par HPLC équipée d'une cellule de dérivation KOBRA Cell. Les quantités d'aflatoxine B1 produites par ces isolats sont comprises entre 5,6 et 10639,8 ppb. Par ailleurs, l'analyse par chromatographie sur couche mince a montré que 26,5 % des isolats produisent l'OTA (sont des isolats appartenant à section *Terrie*).

Mots clés: riz, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., aflatoxine, ochratoxine A.

Abstract

The objective of this work is to study the fungic flora in particular the *Aspergillus* genus which contaminates the rice samples stored on the level of the Cooperative of Cereals and the Vegetables Dryness (CCLS) of Blida. The general step which was adopted consists the insulation and the enumeration of the moulds. The principal genera and species potentially toxigenic were identified by the study of the morphological features and the frequency of the *Aspergillus* genus was given, and the producing capacity of aflatoxins and ochratoxin A isolates belonging to this genus was evaluated.

The analysis of the fungic flora of 23 rice samples stored since 2010, 2011, 2012 and 2013, by two methods shows a strong contamination by the genus *Aspergillus* and *Penicillium*. The method of dilution affirms a clear predominance of the genus *Aspergillus* (69,5%) followed genus *Penicillium* (24,9%), contrary to the method of the grains which shows the predominance of genus *Penicillium* (58,2%) followed by the genus *Aspergillus* (38,2%). Four sections different of *Aspergillus* were identified whose *Aspergillus Flavi* section is most dominant, this result obtained by the two methods.

The producing capacity of aflatoxins for 59 isolates (all are of *Aspergillus Flavi* section) and of ochratoxin A for 34 isolates (*Aspergillus* section *Terrie*, *Fumigati* and *Nigri*), was determined by CCM.

The study of the producing capacity of aflatoxins revealed a rate of isolates aflatoxinogènes of 44,1% on medium containing coconut extract, this result was confirmed by CCM which shows that all the isolates are producers of aflatoxin of the type B. the analysis by the chromatography shows that 46,2% of the isolates appeared producer fairly, 26,9% strongly producing and 26,9% are slightly and very slightly producing. In addition 6 isolates of *Aspergillus* section *Falvi* were the subject of an analysis them producing capacity of AF by HPLC equipped with a cell of derivation KOBRA Cell. The quantities of aflatoxin B1 (AFB1) produced by these isolates lie between 5,6 and 10639,8 ppb. In addition, the analysis by thin layer chromatography showed that 26,5% of the isolates produce OTA (are isolates belonging to *Terrie* section).

Key words: rice, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., aflatoxin, ochratoxin A.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة الفطريات، خاصة الجنس *Aspergillus*، التي تلوث عينات الأرز المخزن من طرف التعاونية للحبوب و الخضر الجافة بالبلدية. المسعى العام يقتضي عزل و إحصاء الفطريات، أهم الأجناس و الأصناف الأكثر سما نتعرف عليها من خلال الشكل، كما تحدد نسبة الجنس *Aspergillus* و تقيم القدرة الإنتاجية ل aflatoxine و ochratoxine نوع A للعزلات التي تنتمي إلى هذا الجنس.

التحليل الفطري ل 23 عينة من الأرز المخزن منذ 2010، 2011، 2012 و 2013، بطريقتين يبين تلوثها الكبير بالجنس *Aspergillus* و *Penicillium*. طريقة التخفيف تثبت سيطرة الجنس *Aspergillus* (69,5%) متنوع بالجنس *Penicillium* (24,9%) و بالعكس طريقة الحبوب تؤكد سيطرة الجنس *Penicillium* (58,2%) متنوع بالجنس *Aspergillus* (38,2%). نعرفنا على أربعة أقسام من *Aspergillus* من بينها القسم *Flavi* هو الأكثر سيطرة، هذه النتيجة تحصلنا عليها بكلتا الطريقتين.

القدرة الإنتاجية ل aflatoxine ل 59 عزلة (الكل ينتمي إلى *Aspergillus* قسم *Flavi*) و ochratoxine نوع A ل 34 عزلة (*Aspergillus* قسم *Terrie*، *Nigri* و *Fumigati*) توضح بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).

دراسة القدرة الإنتاجية ل aflatoxine تظهر نسبة 44,1% من العزلات المنتجة له فوق وسط يرتكز على مستخلص جوز الهند، هذه النتيجة هي مؤكدة بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التي تثبت أن جميع العزلات منتجة ل aflatoxine ذات النوع B. التحليل بالكروماتوغرافيا يؤكد أن 40,2% من العزلات هي متوسطة الإنتاج، 26,9% قوية الإنتاج و 26,9% هي ضعيفة و ضعيفة جدا إنتاجيا. من جهة أخرى 6 عزلات ل *Aspergillus* قسم *Flavi* أكد إنتاجها ل aflatoxine بتقنية كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) المراد بخلية اشتقاق KOBRA Cell. كميات ال aflatoxine المنتجة من طرف هذه العزلات محصورة بين 5 و 639,8 ppb.

من منطلق آخر التحليل بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أكد أن 26,5% من العينات تنتج OTA (العينات تنتمي إلى القسم *Terrie*).

كلمات مفتاحية: أرز، *Aspergillus* sp.، *Penicillium* sp.، aflatoxine، ochratoxine نوع A.

Table des matières

INTRODUCTION	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. LES CHAMPIGNONS MYCOTOXINOGENES.....	3
1. Définition	3
2. Classification des champignons.....	3
3. Isolement et dénombrement des champignons toxinogènes.....	4
4. Identification des champignons toxinogènes.....	4
II. LES CHAMPIGNONS PRODUCTEURS D'AF LATC AINE ET D'OCHRATOXINE	
1. Le genre <i>Aspergillus</i>	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Les caractères morphologiques d'identification du genre d'aspergillus.....	5
1.2.1. Description macroscopique d' <i>Aspergillus</i>	6
1.2.2. Description microscopique d' <i>Aspergillus</i>	6
1.3. Systématique des espèces d' <i>Aspergillus</i>	7
1.3.1. <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	8
1.3.2. <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	9
1.4. La contamination des céréales par les espèces de genre <i>Aspergillus</i>	9
III. LES MYCOTOXINES.....	11
1. Les conditions de toxino gène.....	12
2. Les principales mycotoxines produites par <i>Aspergillus</i>	13
2.1. Les Aflatoxine.....	13
2.1.1. Contamination des aliments par les aflatoxines	13
2.1.2. Les effets toxiques d' aflatoxine	13
2.2. Ochratoxine A (OTA).....	13
2.2.1. Contamination des aliments par l'ochratoxine A	14
2.2.2. Les effets toxiques d'ochratoxine.....	14

IV. LE RIZ.....	14
1. Origine botanique.....	15
2. Contamination de riz par les mycotoxines.....	16
3. Evaluation de risque des aflatoxines et d'ochratoxine A.....	16
4. Réglementation sur les aflatoxines et l'ochratoxine A dans le riz.....	17
MATERIEL ET METHODES	
I. MATERIEL	18
1. Le riz stocké.....	18
2. Les milieux de cultures.....	18
3. Souches de références	19
4. Appareillage, produits chimiques.....	19
5. Les standards analytiques.....	19
II. MÉTHODES.....	19
1. Collection des échantillons	19
2. Isolements et dénombrement de la flore fongique.....	20
2.1. Méthode de dilution	20
2.2. Méthode des grains (Direct Plating).....	21
3. Identification morphologique de isolats fongiques.....	21
3.1. Identification microscopique.....	21
3.2. Identification microscopique.....	21
3.2.1. Préparation microscopique ordinaire.....	22
3.2.2. Préparation microscopique à l'aide d'un ruban adhésif transparent.....	22
3.3. Repiquage des souches d' <i>Aspergillus</i> sp.....	22
4. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A.....	22
4.1. Détection de la fluorescence d'aflatoxine sur milieu de culture.....	23
4.2. Extraction d'aflatoxine et d'ochratoxine A du milieu de culture.....	23
4.3. Détection et confirmation de la production d'AFs et OTA par CCM.....	24
4.3.1. Préparation des plaques.....	25
4.3.2. Dépôt des extraits à analyse.....	25
4.4. Confirmation et quantification des aflatoxines par HPLC.....	26

RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS.....	27
1. Analyse de la flore fongique des échantillons de riz stocké.....	27
1.1. Reconnaissance des genres et des sections.....	27
1.1.1. Reconnaissance des genres.....	27
1.1.2. Reconnaissance des sections du genre <i>Aspergillus</i>	30
2. Distribution des genres fongiques dans les échantillons analysés.....	32
2.1. Echantillons de riz stocké depuis 2010 au CCLS.....	33
2.2. Echantillons de riz stocké depuis 2011 au CCLS.....	34
2.3. Echantillons de riz stocké depuis 2012 au CCLS.....	34
2.4. Echantillons de riz stocké depuis 2013 au CCLS.....	35
2.5. Fréquence des champignons de stockage dans les échantillons analysés.....	36
3. Distribution des sections d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons de riz stocké.....	38
4. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par les isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	40
5. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A par les isolats d' <i>Aspergillus</i>	44
6. Quantification par HPLC des AFs produites par les isolats aflatoxinogènes.....	45
II. DISCUSSION.....	47
CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....	51
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	54
ANNEXES.....	6

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Les céréales sont des aliments de base de l'alimentation humaine et animale dans plusieurs pays du monde dont le riz est fortement consommé. Les aspects qualitatifs et sanitaires sont très importants. Un des critères importants de la qualité sanitaire des céréales en particulier le riz, est la contamination en mycotoxines. La présence de moisissures et de toxines dans les aliments est devenue un sujet de préoccupation pour les professionnels de la santé ainsi que pour le commerce mondial.

Ces organismes microscopiques produisent une grande variété de métabolites secondaires, certains d'entre eux sont très utiles à l'Homme. Les moisissures sont utilisées industriellement dans de nombreux domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé...). Les souches utilisées sont inoffensives et utilisées comme auxiliaires technologiques. Par exemple, *Penicillium roquefortii* et *P. camemberti* sont utilisées pour la production de fromages. D'autres moisissures sont utilisées pour la production des enzymes (protéases produits par *P. chrysogenum*). *Fusarium graminearum* est utilisé pour produire une mycoprotéine vendue comme aliment protéique d'origine végétale (Jard, 2009). Cependant en marge de cet aspect bénéfique, certaines moisissures peuvent devenir nuisibles en altérant non seulement les qualités organoleptiques et nutritionnelles des denrées alimentaires mais aussi leurs qualités sanitaires par synthèse de métabolite secondaire (mycotoxine) (Olivier, 2007), dans des conditions propices de température, humidité, pH et composition des substrats.

L'entrée de mycotoxines dans la chaîne alimentaire s'effectue soit par des denrées consommées directement (arachides, pistaches, amandes, fruits secs...) soit indirectement par des produits dérivés (par ex: produits issus de la panification, céréales de la petite-déjeuner...). Les procédés de conservation (stérilisation, pasturisation, lyophilisation, congélation...), s'ils agissent sur les moisissures, ne permettent pas de détruire, ou très peu les mycotoxines (Billerman et Bianchini, 2007).

Les mycotoxines sont produites principalement par 5 types de champignons: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller et Trenholm, 1994). Plusieurs sortes de mycotoxines sont retrouvées dans les aliments, seulement certains contaminent

l'alimentation humaine et sont toxiques pour la santé humaine les plus importantes étant: trichothécènes, l'ochratoxine, les aflatoxines, la stréigmatocystine, la zéaralénone, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique les fumonisines (D'Mello et McDonald, 1977 ; Scudamore et Livesey, 1998).

Toutefois, il n'existe pas de relation directe entre espèce fongique et mycotoxine. En effet une molécule peut être produite par plusieurs espèces fongiques et, au sein d'une espèce toxigène. Toutes les souches n'ont pas forcément la capacité de produire la (les) mycotoxine(s) (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Par conséquent, l'évaluation du risque lié à la contamination fongique des aliments de l'homme et des animaux nécessite, d'une part d'identifier les espèces susceptibles de contaminer ce substrat (Tarruc, 2007).

En Algérie, la première étude effectuée sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A isolés à partir de blé algérien, est réalisée par Riba en 2008. Suivi par quelques travaux (Azzoune, 2010 ; Matmoura, 2010...) basé sur la contamination par ces mycotoxines dans des autres produits commercialisés en Algérie (arachides, épices, légumes secs...).

L'objectif de ce travail consiste à isoler et identifier la flore fongique présente dans le riz (provenant des USA) stocké au niveau de la Coopérative des Céréales et des Légumes Secs (CCLS) de Blida, et d'étudier le pouvoir de production des aflatoxines et d'ochratoxine A par des souches fongiques isolées, appartenant au genre *Aspergillus*.

Ce travail de mémoire est présenté comme suit :

- ❖ Bibliographie sur les champignons mycotoxinogènes, les mycotoxines et le riz.
- ❖ Matériels et méthodes utilisés au sein de la partie expérimentale.
- ❖ Résultats et discussion.
- ❖ Conclusion et perspectives.

I. LES CHAMPIGNONS MYCOTOXINOGENES

1. Définition

Le règne des champignons renfermant selon les auteurs 65 000 à 100 000 espèces différentes et les moisissures constituent 20 000 espèces. Le terme moisissure est communément utilisé pour désigner des champignons microscopiques filamenteux (Guarro *et al.*, 1999). La plupart des moisissures sont des saprophytes, mais certaines peuvent être pathogènes pour les végétaux et les animaux. Les moisissures sont caractérisées par leur paroi cellulaire, riche en chitine ; la reproduction par spores sexuées ; la présence de glycogène, comme substance de réserve et l'absence de la chlorophylle.

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes dépendants d'une source de carbone organique (Tabuc, 2007). Ces microorganismes sont responsables de la production de plusieurs métabolites secondaires (comme les mycotoxines), qui sont pathogènes pour l'homme et l'animale.

2. Classification des champignons

Les "Mycota" correspondent au règne fongique à avoir une reproduction sexuée et produisant des spores non (ou uni) flagellées. D'après Hawksworth *et al.*, (1995), le règne des champignons est divisé en quatre divisions (phylums) : *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, et *Basidiomycota* (Tableau 01).

Tableau 01. Classification des champignons (Hawksworth *et al.*, 1995).

<i>Chytridiomycota</i>	<i>Zygomycota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>
produisant des spores mobiles uni-flagellées.	à spores non flagellées et à thalle siphonné.	à spores non flagellées, à thalle septé et formant en général 8 ascospores à l'intérieur de chaque asque.	à spores non flagellées, à thalle septé et donnant en général 4 basidiospores à l'extérieur de chaque baside.

Les autres champignons qui ne montrent pas de phase sexuelle sont habituellement classés parmi les Deutéromycètes (*Deutéromycota*). La majorité de Deutéromycètes sont des formes imparfaites d'Ascomycètes.

3. Isolement et dénombrement des champignons toxigènes

Dans le cadre d'une gestion s'appuyant sur la prévention, il est indispensable d'évaluer le nombre des champignons toxigènes présents dans les produits alimentaires. Les méthodes conventionnelles, basées sur la technique des suspensions-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé, sont généralement les plus employées pour l'analyse fongique des produits alimentaires. Après ensemencement et incubation à température optimale (25-30°C) pendant 5 à 10 jours, les colonies sont dénombrées et analysées (ISO, 1987).

D'après Pitt *et al.*(1997), une autre méthode dite « direct plating » est également employée pour la recherche des champignons toxigènes dans les aliments. Celle-ci consiste à ensemercer les particules d'un aliment (graines, noyaux, etc.) directement sur un milieu de culture solide. Les résultats de cette technique d'isolement et de dénombrement sont généralement exprimés en pourcentage de particules infectées. Cette méthode permet beaucoup plus une analyse qualitative que quantitative.

4. Identification des champignons toxigènes

L'identification de très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique. Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères culturels et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique (identification macroscopique et microscopique), qui reste la base de l'identification.

II. CHAMPIGNONS PRODUCTEURS D'AFATOXINE ET D'OCRATOXINE A

1. Le genre *Aspergillus*

1.1. Définition

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes. L'appareil végétatif, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965). Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990 ; Roquebert, 1998). Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et

Pfohl-Leszkowicz, 2002). La plupart des *Aspergillus* sont des saprophytes, capables de se développer dans le sol, les détritux, dans les composts et sur les végétaux malades, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont consignées dans le tableau 02, connues par leur capacité à produire de(s) mycotoxine(s) responsables de pathologies animales et humaines.

Tableau 02. Les *Aspergillus* producteurs de mycotoxines (Tabuc, 2007).

Espèces d' <i>Aspergillus</i>	Mycotoxines produites
<i>Aspergillus candidus</i>	Candiduline
<i>Aspergillus carneus</i>	Citrinine
<i>Aspergillus clavatus</i>	acide kojique, patuline, xanthociline
<i>Aspergillus flavus</i>	aflatoxines B1 et B2, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, acide kojique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	fumigaclavine, fumagiline, fumitoxine, fumitremorgine A et C, gliotoxine
<i>Aspergillus niger</i>	malformine, naftoquinone
<i>Aspergillus nomius</i>	aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique
<i>Aspergillus ochraceus</i>	acide kojique, acide neoaspergillique, ochratoxine, acide penicillique, acide sécalonique A
<i>Aspergillus oryzae</i>	acide cyclopiazonique, acide kojique
<i>Aspergillus parasiticus</i>	aflatoxines B1 et B2, G1 et G2, acide aspergillique, acide kojique
<i>Aspergillus nidulans</i>	stérigmatocystine, griséofulvine
<i>Aspergillus terreus</i>	citréoviridine, citrinine, gliotoxine, patuline, terréine, acide terréique, terréonine, territrem, terramide A
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystine
<i>Aspergillus wentii</i>	acide kojique

1.2. Les caractères morphologiques d'identification du genre d'*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 suivants:

1.2.1. Description macroscopique d'*Aspergillus*

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

- 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*.
- La texture de la colonie qui peut être floconneuse, veloutée, etc.
- La couleur du revers de la colonie qui peut parfois être caractéristique d'une espèce.
- La production des sclérotes (masse à paroi épaisse composée de cellules Parenchymateuses de forme, de taille et de couleur caractéristiques).

1.2.2. Description microscopique d'*Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif 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 la quelle 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 01) (Raper et Fennell, 1965). Les conidies, seches, 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 (Tabuc, 2007).

L'ensemble vésicule ± métules + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*.

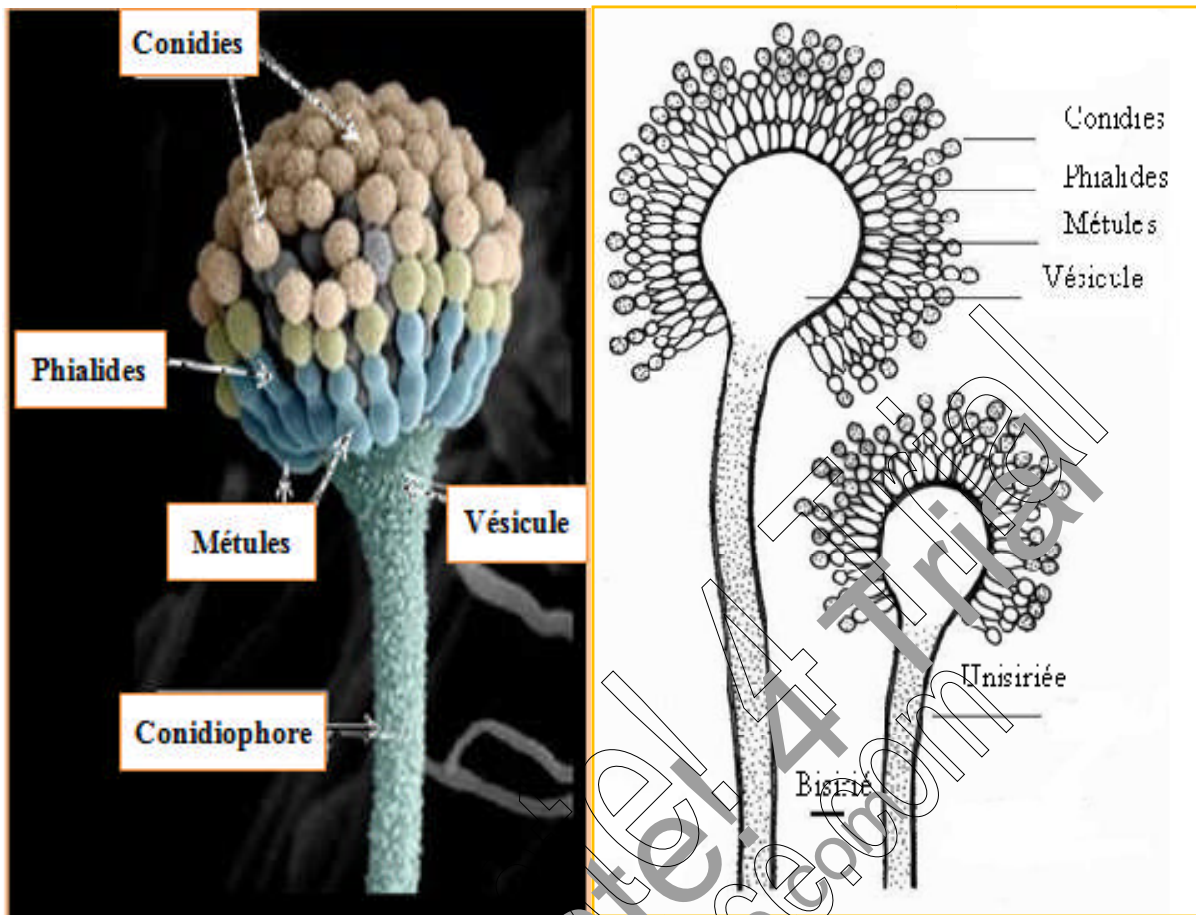


Figure 01. Caractères micro-morphologiques du genre *Aspergillus*
 (www.thegoodsource.com/mold/into.shtml).

1.3. Systématique des espèces d'*Aspergillus*

Ce genre comprend des espèces asexuées et sexuées. Les formes sexuées (téleomorphes) sont classées parmi les Ascomycètes et les espèces asexuées, 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 sections. Environ 18 sections sont classées par Peterson *et al.* (2000), (*Aspergillus: Restricti, Cervini, Terrei, Flavipedes, Nigri, Circumdati, Flavi, Cremei, Candidi, Wentii, Fumigati, Clavati, Nidulantes, Versicolores, Usti, Sparsi, Ornati* et « *Warcupiella group* ». Cette classification est la plus admise par la plupart des mycologues.

En effet, les sections *Flavi, Circumdati* regroupent les plus importantes espèces d'*Aspergillus* du point de vue économie, santé et industrie agroalimentaire (Cotty *et al.*, 1994).

1.3.1. *Aspergillus* section *Flavi*

D'après Samson *et al.* (2006), il y'a 18 espèces appartenant à la section *Flavi*. Morphologiquement, *Aspergillus* section *Flavi* comprend les espèces avec des têtes conidiennes de couleur jaune-vert à brun dont certaines produisent des sclérotés brun foncé ou parfois jaunes. Les critères d'identification de ces espèces sont actuellement basés sur la morphologie, le profil des mycotoxines produites et l'analyse des séquences de l'ADNr (Ito *et al.*, 2001 ; Varga *et al.*, 2003 ; Samson *et al.*, 2006). 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.

➤ *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*: ont en commun une croissance rapide aux deux températures 25 et 37°C, et la couleur de leurs conidies est vert-jaune clair (Nguyen, 2007). Les caractères morphologiques de chaque espèce sont résumés dans le tableau 03.

Tableau 03. Caractères morphologiques des espèces de *Aspergillus Flavi* (El Khoury, 2007).

Espèces	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>
Tête conidienne	Unisériée et bisériée	Unisériée
Présence de sclérotés	Produit par certains isolats	Occasionnellement
Diamètre des conidies (µm)	2,5-4,5	4-6
Forme et orientation des conidies	Conidies de forme et taille variable, dont la paroi est relativement mince, pouvant être lisse ou légèrement rugueuse	Conidies sphériques et ont la paroi épaisse et rugueuse
Vésicule	Plus grandes, avec un diamètre allant jusqu'à 50 µm, elles portent souvent des métules.	Ne dépassent que rarement 30 µm de diamètre et des métules peu fréquentes
Conidiophore	400-1000 µm à paroi échinulée	250-500µm à paroi échinulée

1.3.2. *Aspergillus* section *Circumdati*

Historiquement, *Aspergillus* section *Circumdati* (groupe d'*Aspergillus ochraceus*) inclue les espèces à têtes conidiennes bisériées à couleur jaune à ocre et des sclérotés de couleur brun clair à brun foncé. Ce groupe est particulièrement bien connu pour sa production de l'ochratoxine A (Van der Merwe *et al.* 1965). L'espèce type de la section *Circumdati* est *Aspergillus ochraceus* très toxigène par la production d'ochratoxines ou l'acide penicillique.

➤ *Aspergillus ochraceus*: Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques à une température de 25 à 30°C. Les colonies de *ochraceus* sont poudreuses ou granuleuses, blanches au début, puis jaunes ou ocre-jaunes à chamois. Le revers de colonies est incolore au jaune pâle. Les têtes conidiennes sont bisériées. Les conidiophores sont rugueux, jaunes à brun pâle, longs atteignant 1,5 mm. Les vésicules sont globuleuses, hyalines, 30-50 µm en diamètre. Les phialides sont portées par des métules, de dimensions variables. Les conidies sont sub-globuleuses à globuleuses (Tabuc, 2007).

1.4. La contamination des céréales par les espèces du genre *Aspergillus*

Les céréales sont sans doute les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les moisissures productrices des mycotoxines. La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, du stockage et après transformation des graines. Si de très nombreuses études sont disponibles concernant la contamination mycotoxique des céréales, les enquêtes sur la contamination fongique de ces matières premières sont plus rares. De manière schématisée, elles mettent en évidence une relation entre la flore fongique et les conditions climatiques pendant le développement et/ou le stockage des grains (Tabuc, 2007).

Ainsi, les *Aspergillus* sont souvent retrouvés dans les céréales issues des régions chaudes, parfois à des fréquences très élevées: 82,3% des échantillons d'orge en Espagne, 76,4%, 78% et 82,3% des échantillons de maïs produits respectivement au Ghana, en Argentine et au Venezuela ont été trouvés contaminés par des *Aspergillus*. Une forte fréquence d'*Aspergillus* est enregistrée aussi dans les échantillons de blé avec un taux de 76,5% en Pologne, et les échantillons de riz en Vietnam avec une proportion de 40%. Les principaux résultats concernant la contamination des céréales par les *Aspergillus* sont regroupés dans le Tableau 04.

Tableau 04. Présence des *Aspergillus* dans les céréales des différents pays.

Pays	Céréales	Espèces identifiés	Nombre d'échantillons	Fréquence de Contamination (%)	Références
Argentine	maïs	<i>A. flavus</i>	Nd	78	Etcheverry, 1999
		<i>A. parasiticus</i>		21	
Brésil		<i>Aspergillus</i> spp.	150	27,7	Ono, 1999
Espagne		<i>Aspergillus</i> spp.	60	14,19	Afin, 2007
Etats Unis		<i>A. ochraceus</i>	85	68,4	Trucksses, 1999
Ghana		<i>Aspergillus</i> spp.	50	76,4	Kpodo, 2000
Inde		<i>A. flavus</i>	197	55,9	Janardhana, 1999
		<i>A. candidus</i>		30-33	
		<i>A. fumigatus</i>		18-33	
		<i>A. terreus</i>		10-11	
Iran		<i>Aspergillus</i> spp.	50	8,7	Ghiasian, 2004
Nigeria		<i>A. flavus</i>	8	19,4	Bankole, 2004
Venezuela		<i>A. flavus</i>	14	80	Medina-Martinez, 2000
		<i>A. parasiticus</i>			
Lituanie	Blé	<i>Aspergillus</i> spp.	33	1,4-3	Baliukoniene, 2003
Pologne		<i>Aspergillus</i> spp.	20	76,5	Krysinska-Traczyc, 2001
Espagne	orge	<i>Aspergillus</i> spp.	184	82,3	Medina, 2006
Etats Unis	seigl	<i>A. ochraceus</i>	85	93,6	Trucksses, 1999
Lituanie		<i>Aspergillus</i> spp.	22	6,3-6,8	Baliukoniene, 2003
Corée		<i>A. candidus</i>	88	26	Park, 2005
		<i>A. flavus</i>		17	
	<i>A. niger</i>		18		
	<i>A. ochraceus</i>		7		
	<i>A. versicolor</i>		20		
Vietnam	<i>A.s flavus</i>	25	40	Tran, 2001	
	<i>A. fumigatus</i>		23		
	<i>A.oryzae</i>		11		

Nd: Non déterminé.

III. LES MYCOTOXINES

Connues depuis des siècles, les mycotoxines sont des toxines naturelles produites par des moisissures. Elles peuvent contaminer une large gamme de denrées alimentaires, des matières premières aux produits transformés. Les mycotoxines exercent un pouvoir toxique réel pour le consommateur un foie introduites par inhalation ou par ingestion même en faibles concentrations (Eskola, 2002). La contamination inévitable des produits alimentaires par les mycotoxines constitue une source importante de maladie d'origine alimentaire et constitue un problème très actuel de qualité et de sécurité sanitaire des aliments (OMS, 2002). L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO, 2004) estime qu'environ un quart des récoltes mondiale est significativement contaminé par les mycotoxines. Celles-ci se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales, les fruits à coque, les grains, les fourrages ainsi que leur dérivés. On peut aussi classer les mycotoxines plus simplement selon leurs principaux effets toxiques. On distingue les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agro-alimentaire et sanitaire le déoxynivalénol, les fumonisines, la zéaralénone et les trichothécènes et tout spécialement les aflatoxines, les ochratoxines (AFSSA, 2009). Les conditions d'apparition de ces mycotoxines sont très variables, on note que le groupe des Zéaralénones et des Trichothécènes sont omniprésentes lorsque les moisissures productrices de ces mycotoxines sont ubiquistes, tandis que la production des autres types des mycotoxines est en relation avec des conditions de climat spéciales (tableau 05).

Tableau 05. Les principales mycotoxines et les conditions d'apparition (AFSSA, 2009).

Groupes de mycotoxines	Types de mycotoxines	Conditions d'apparition
Aflatoxines	Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	Climats tropicaux et subtropicaux
Ochratoxines	Ochratoxines A, B, C et D	Climats frais et tempérés En cours de stockage
Zéaralénone	Zéaralénone	Moisissures ubiquistes
Trichothécènes	Vomitoxine (DON), Nivalenol, Fusarenone X (Trichothécènes B)	Moisissures ubiquistes
	T2 toxine, HT2 toxine, Diacetoxyscirpenol (Tricho. A)	
Fumonisines	Fumonisines	Climats tempérés et climats chauds

1. Les conditions de toxinogènes

Tout au long de la chaîne alimentaire, depuis le champ jusqu'à l'assiette du consommateur ou la mangeoire de l'animale, tel ou tel groupe de moisissures est susceptible de se développer et de produire des toxines si les conditions écologiques, notamment l'humidité, lui sont favorable. La contamination des aliments ou des graines peut avoir lieu avant ou pendant le stockage (Pfohl-Leszkovicz, 1999). Du point de vue écologique, deux groupes de champignons toxinogènes peuvent être distingués (Christensen *et al.*, 1977): les champignons de « champs » qui contaminent les produits agricoles avant ou pendant la récolte, principalement *Fusarium* et *Alternaria*, mais aussi des *Aspergillus* dans le cas des régions à climat chaud, et les champignons de « stockage » (*Penicillium* et *Aspergillus*) qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage.

La formation des mycotoxines (mycotoxinogénèse) est conditionnée préalable par la croissance des champignons. La synthèse de ces métabolites secondaires et leur quantité ne sont pas seulement influencées par des paramètres environnementaux et nutritionnels au moment de la production, mais surtout par la croissance et le développement d'un champignon bien particulier. Certains facteurs et notamment les insectes peuvent favoriser la contamination (Sinha, 1961 et 1969 ; Dunlop, 1988). Le développement des moisissures dépend énormément de la température et du degré d'humidité. Pendant le stockage, les céréales perdent de leur qualité et sont de ce fait plus sensibles à l'infection par des champignons. Les facteurs influençant la formation des mycotoxines incluent l'humidité, la température, le temps, l'intégrité des graines, l'oxygène, le dioxyde de carbone, la composition de substrat, le taux de champignon, la prévalence d'espèces toxinogènes, les interactions microbiennes et les insectes (figure 02).

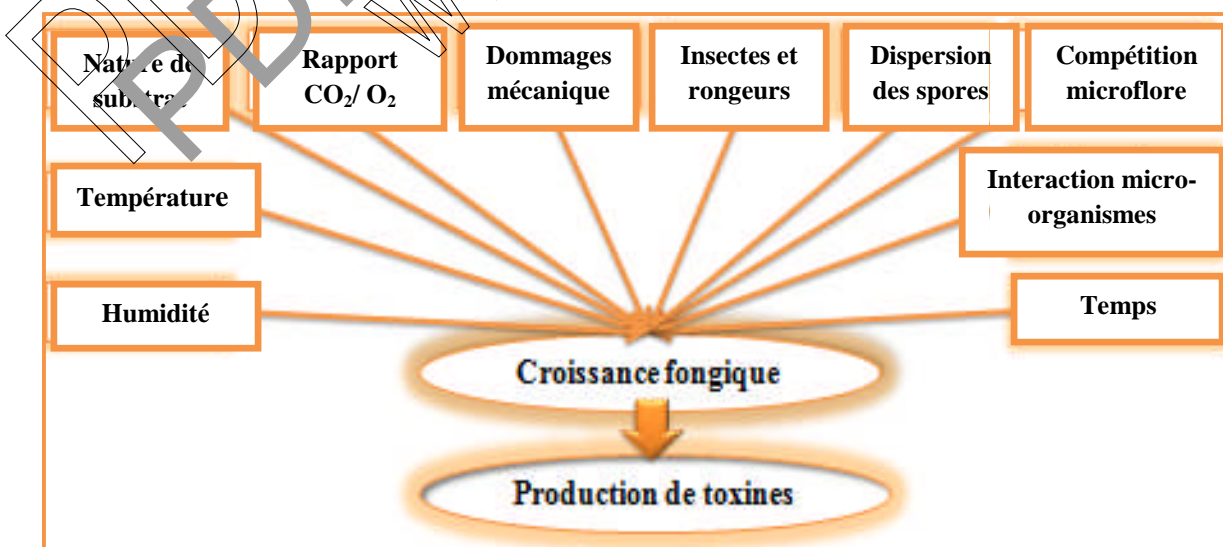


Figure 02. Les conditions de toxinogènes.

2. Les principales mycotoxines produites par les espèces d'*Aspergillus*

2.1. Les Aflatoxines

C'est en 1960 que, pour la première fois, a été établie la relation entre une intoxication dans un élevage de dindons et la présence d'une moisissure (*Aspergillus flavus*) parasitant les arachides. Ce sont les anglais qui ont isolé une des molécules responsables, l'aflatoxine (Adams *et al.* 2002 ; Chapland-Leclerc *et al.*, 2005). Les Aflatoxines (AFs) sont des mycotoxines produite par les souches toxigènes d'*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*, elles ont été détectées dans différents types d'aliments dans différents pays du monde ; elles sont considérées comme de dangereux contaminants des aliments destinés à l'homme et aux animaux (Zinedine et Idrissi, 2007).

2.1.1. Contamination des aliments par les aflatoxines

La présence des AFs dans l'alimentation humaine et animale est le résultat d'une contamination par des espèces aflatoxinogènes. Les aflatoxines sont généralement trouvées dans des aliments en provenance de régions chaudes et humides (Amérique de sud, Afrique, Asie). Elles ont été détectées dans les céréales (maïs, blé, orge, avoine, seigle, riz), les produits à base de céréales, des oléagineux (soja), des noix et leurs dérivés, arachides, beurre d'arachide, pistache, des légumes (pommes de terre, lentilles, piments) et fruits secs et bière (Tabuc, 2007).

2.1.2. Les effets toxiques d'aflatoxine

Les AFs comptent parmi les substances naturelles ayant un potentiel cancérigène et mutagène le plus élevé. Chez l'homme, les risques liés à la consommation d'AFs ont été bien étudiée et l'Agence Internationale de Recherches sur le Cancer (AIRC) a classé l'AFB1 comme agent cancérigène du foie (Wogan, 2000). 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 aflatoxines G1, B2 et G2 sont respectivement 50, 80 et 90% moindre que celle de l'AFB1 (Cole et Cox, 1981).

2.2. Ochratoxine A (OTA)

Les ochratoxines sont des métabolites de moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* ou *Penicillium*. Leur présence est liée au climat, particulièrement lors de la récolte, et aux conditions de stockage après récolte. Parmi les ochratoxines, seules l'ochratoxines A et très rarement l'ochratoxine B ont été retrouvées sur des produits végétaux. compte tenue de la prévalence et de la toxicité de l'ochratoxine A (OTA), seule cette dernière sera traitée.

L'OTA a été isolée pour la première fois à partir d'*Aspergillus ochraceus* par van der Merwe *et al.* (1965). Par la suite, elle a été identifiée comme contaminant du maïs aux USA en 1969, plus dans l'ensemble du monde. L'ochratoxine A est produite sous les climats froids et tempérés par *Penicillium verrucosum* et par *Aspergillus carbonarius* et en régions chauds tropicales par *Aspergillus ochraceus*. *Penicillium verrucosum*, spécifiquement associé aux céréales stockées, est très commun en Europe du nord et au Canada. *Aspergillus ochraceus* est le champignon le plus commun dans le café vert et les épices. Il est également retrouvé sur les graines de cacao, le soja, les cacahuètes, le riz et le maïs (AFSSA, 2009).

2.2.1. Contamination des aliments par l'ochratoxine A

Les infections fongiques peuvent avoir lieu avant et après récolte, la synthèse de l'ochratoxine A se fait surtout lors du stockage. Les denrées alimentaires à haut risque de contamination par l'ochratoxine sont les céréales (maïs, orge, blé, sorgho, avoine et riz). D'autres denrées peuvent être contaminées comme les graines de cacao, le vin, le jus de raisin, la bière, des épices et la viande de porc. Les aliments pour animaux peuvent être contaminés par l'ochratoxine A, les abats (sang, rognons) d'animaux ayant consommé de tels aliments peuvent alors présenter des résidus d'OTA (AFSSA, 2009).

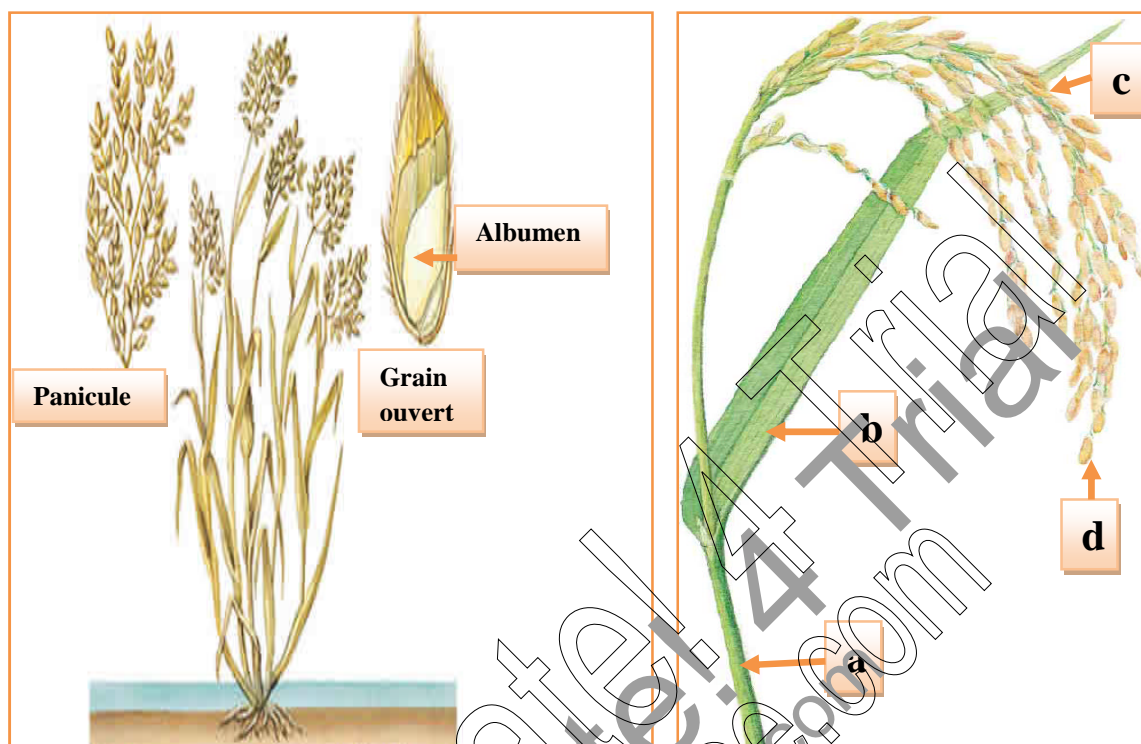
2.2.2. Les effets toxiques de l'ochratoxine A

L'ochratoxine A est connue pour sa néphrotoxicité. Elle serait l'un des facteurs potentiels à l'origine de trouble rénaux chez l'homme connus sous le nom de Néphropathie Endémique des Balkans (NEB). Elle s'avère également immunotoxique, tératogène et neurotoxique. Son pouvoir cancérogène est établi chez l'animal, mais les preuves sont encore insuffisantes chez l'homme (AFSSA, 2009).

IV. LE RIZ

Le riz est une des plus anciennes plantes vivrières cultivées. C'est une céréale annuelle à paille. Comme le blé, le maïs ou le sorgho, le riz appartient à la famille des graminées appelées aujourd'hui Poacées (*Poaceae*). La tige est un chaume creux et strié. Elle s'élève de 50 cm à 2 m selon les variétés et peut atteindre 5 m pour les variétés de riz flottant. La feuille, en forme de lance, est large de 5 à 15 mm. Elle comporte une gaine qui forme un tube autour de la tige. Les fleurs du riz sont groupées en panicule, chaque fleur donnera un seul grain. Ce dernier est un caryopse (fruit sec indéhiscent). Il se compose d'une enveloppe de plusieurs couches cellulaires dont le péricarpe, qui est coloré ou non, d'un albumen essentiellement

constitué d'amidon donnant au « grain blanchi » son aspect translucide ou vitreux et d'un germe ou embryon qui donnera naissance à une autre plante (figure 03) (Cirad, 2002).



a: tige ; b: feuille ; c: inflorescence (panicule) ramifiée plus ou moins large et dense, d: fleur (épillet) contenant une seule graine (caryopse).

Figure 03. Description et caractérisation de riz.

Le riz est une source de magnésium ; il contient de la niacine, de la vitamine B6, de la thiamine, du phosphore, du zinc et du cuivre ainsi que des traces d'acide pantothénique de potassium et du fer chez certaines variétés. Mais le riz blanc est un des céréales les plus pauvres en protéines (certaines variétés améliorées en fournissent cependant jusqu'à 14 g de protéines par 100 g de riz).

1. Origine botanique

Selon Cirad en 2002, le riz le plus cultivé aujourd'hui appartient à l'espèce *sativa*. L'espèce *sativa* s'est différenciée en deux sous-espèces, *indica* et *japonica* :

- *indica* pousse en conditions aquatiques sous climat équatorial et tropical ;
- *japonica* pousse en conditions aquatiques majoritairement sous climat tempéré et en conditions pluviales sous climat tropical.

Le « riz sauvage » appartient à un genre voisin: la zizanie (*Zizania aquatica* L.) originaire du nord des États-Unis et du Canada (Dukerschein et Langrehr, 2000).

Le riz est la deuxième céréale après le maïs en termes de surface cultivée (153 Mha en 2004) et de quantité produite (608 Mt en 2004), avec un rendement moyen de 4,0 t/ha qui masque de très importantes disparités (World Rice Statistics, 2005). C'est, en revanche, la première céréale pour l'alimentation humaine. Elle représente la base de l'alimentation de plus de 2,5 milliards de personnes dans les pays en voie de développement avec des consommations annuelles très importantes dépassant dans certains pays les 100 kg/habitant. Les grands pays producteurs (Inde, Chine, Indonésie, Bangladesh, Thaïlande, Vietnam) sont également les principaux consommateurs. Ils se suffisent désormais à eux-mêmes, aussi une part assez minime de la production est-elle échangée sur le marché mondial (6 % de la production), essentiellement du fait de quelques pays gros exportateurs (Vietnam, Thaïlande, États-Unis, Inde, Pakistan) (Courtois, 2006).

2. Contamination de riz par les mycotoxines

Les céréales sont les principaux vecteurs de mycotoxines car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Elles peuvent être contaminées à plusieurs moments (en plein champ ou lors du stockage). Ce sont dans les pays aux conditions climatiques chaudes et humides (et donc en particulier les pays d'Afrique, d'Asie du Sud et d'Amérique du Sud) que la croissance des champignons toxigènes (surtout ceux produisant les aflatoxines) est la plus favorisée. Ainsi, le riz aliments de base des populations de ces pays, sont souvent contaminés par les aflatoxines (Nguyen, 2007). 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.

Selon les études et les résultats des travaux des chercheurs sur les champignons et les mycotoxines dans les céréales en particulier le riz stocké, les aflatoxines et les ochratoxines sont les principaux contaminants lors de stockage.

3. Évaluation de risque des aflatoxines et d'ochratoxine A

Issues d'une contamination généralement reconnue comme d'origine végétale, les mycotoxines constituent un problème très actuel de qualité et de sécurité sanitaire des aliments.

Le risque mycotoxique est d'origine naturelle, l'homme n'en maîtrisant pas la survenue qui est liée aux conditions climatiques notamment. Le risque est pernicieux car la contamination fongique est difficilement contrôlable et peut être multiple en raison de la présence possible de plusieurs mycotoxines dans le même produit ou la même ration alimentaire. Selon AFSSA

(1999), Pour caractériser les dangers, une Dose Journalière Tolérée (DJT) est fixée grâce aux études toxicologiques. Pour qu'il n'y ait pas de risque pour la santé, il faut que la quantité à laquelle un individu est exposé par jour (l'exposition) soit inférieure à la DJT.

En effet, la dose journalière tolérable d'ochratoxine A est de 120 µg/kg p.c ./j. Tandis que, Il n'a pas été fixé de DJT pour les aflatoxines, car ces substances présentent des effets cancérogènes génotoxiques sans seuil.

4. Réglementation sur les aflatoxines et l'ochratoxine A dans le riz

À l'échelle mondiale, en 2003, 99 pays au moins, disposaient de réglementation concernant les mycotoxines présentes dans les produits d'alimentation humaine et/ou animale, soit une hausse d'environ 30% par rapport à 1995. Au total, ces pays regroupent près de 87% des habitants de la planète. En fait, tous les pays qui étaient dotés d'une réglementation relative aux mycotoxines en 2003 disposaient, au minimum, de limites réglementaires pour l'aflatoxine B₁ ou pour la somme des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ dans les produits d'alimentation humaine et/ou animale. Le nombre de pays qui réglementent les mycotoxines a considérablement augmenté au fil des ans.

En Algérie, la limite des aflatoxines (B₁, B₂, G₁, G₂) dans l'alimentation humaine (les céréales: riz, blé...) est de 20 µg/kg, tandis que l'aflatoxine B₁ seulement est de 10 µg/kg, et dans l'alimentation animale est de 20 µg/kg (AFSSA, 2003).

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

1. Le riz stocké

Dans la présente étude nous avons travaillé sur des échantillons de riz stockés au niveau de Coopérative des Céréales et des Légumes Secs (CCLS) de Blida et provenant des USA.

Les États-Unis ou USA (United States of America) est le principal exportateur de riz à grains blancs décortiqués depuis 2005 vers plusieurs pays du monde, parmi lesquelles l'Algérie, le fournisseur est l' OAIG (Organisme Algérien de l'Importation des Grains).

L'entrée de produit importé est au niveau du port de la ville de Mostaganem, ensuite est transporté dans des sacs de plastique de 50 kg vers Blida pour le conserver au niveau de CCLS (Figure 04).



Figure 04. Le stockage de riz au niveau de CCLS de Blida (à gauche), riz blanc décortiqué (à droite).

La destination de riz est surtout pour la consommation de la première région militaire de Blida et la quantité qui reste est conditionné dans des petits sacs de 1 Kg et destiné aux consommateurs.

2. Les milieux de cultures

Les milieux de cultures utilisés pour les isollements 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 Bengal, 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 est donnée en annexe I.

3. Souches de références

Les études du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A des isolats, nécessitent l'utilisation de souches de références: *Aspergillus parasiticus* CBS 100926 et *A. ochraceus* NRRL 3174, fournies par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.

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).

5. Les standards analytiques

Les standards analytiques utilisés dans cette étude sont, l'AFB1 produite par *Aspergillus parasiticus* et l'OTA produite par *A. ochraceus* (souches appartenant de LBSM).

II. MÉTHODES

1. Collection des échantillons

La collecte des échantillons a été réalisée durant la période allant du début du mois de Mars au mois d'Avril de l'année 2013, au niveau de CCLS de Blida. Environ 200 g de chaque échantillon sont prélevés aléatoirement à partir d'un sac de 50 kg et sont mis dans des sacs en plastique et acheminés au laboratoire de biologie de système microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba, dans les heures qui suivent le prélèvement. Le tableau suivant représente des données sur le riz stocké.

Tableau 06. Données sur les échantillons de riz prélevés au niveau de CCLS de Blida.

Origine	Date d'entrée en Algérie	Nombre d'échantillons
USA	Juin 2010	6
	Août 2011	2
	Novembre 2012	8
	Janvier 2013	7
Nombre totales d'échantillons		23

2. Isolements et dénombrement de la flore fongique

2.1. La méthode de dilution

Les isolations des moisissures dans les échantillons ont été réalisées 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.

Vingt gramme de chaque échantillon de grains de riz broyées sont mis dans un flacon de 250 ml contient 80 ml d'eau stérile additionnée à tween 80 à raison de 50 ul de tween par 5 ml d'eau pour la désorption des spores) et homogénéisé par agitation durant 15 min. Les dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3}) sont réalisées à partir de la solution mère. Cent microlitres de chaque dilution sont ensemencés sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu DRBC (King *et al.*, 1979). Deux répétitions sont réalisées par dilution (figure 5).

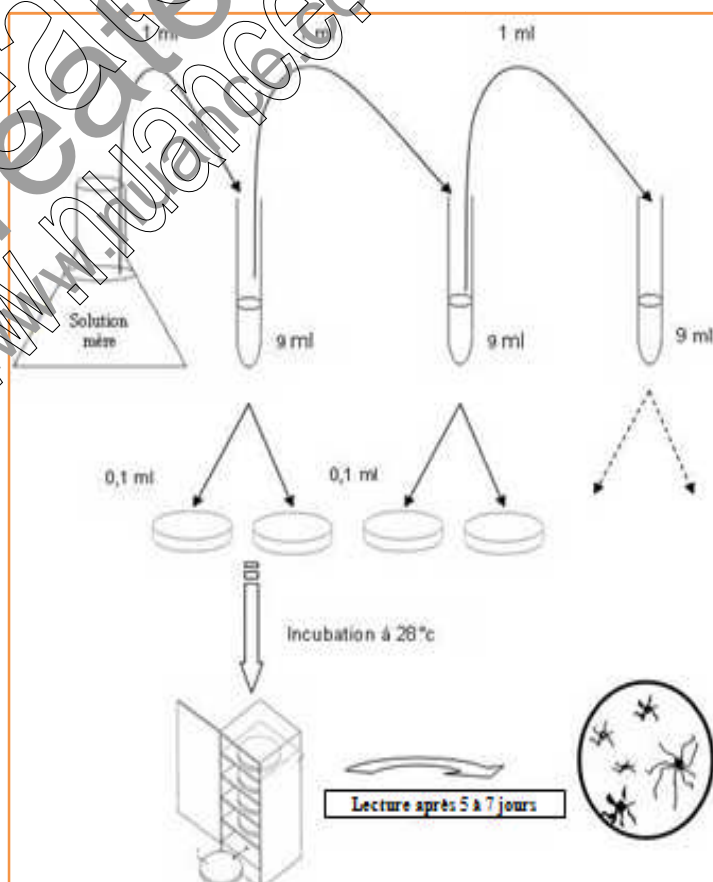


Figure 05. Technique de dénombrement par étalement en surface.

La numération est effectuée en choisissant les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 10 et 60 environ, le nombre de moisissures est exprimé en colonies formant unité par gramme d'échantillon (CFU/g).

2.2. La méthode des grains (Direct Plating)

Elle consiste à ensemercer les grains de riz (15 grains / boîtes) de chaque échantillon directement sur la gélose DRBC (figure 06). L'incubation a lieu à 28°C pendant 5 à 7 jours à l'obscurité. Le résultat de la méthode d'ensemencement direct des grains est exprimé en pourcentage (les grains infectés sur le totales des grains ensemenés dans la boîte de pétri).

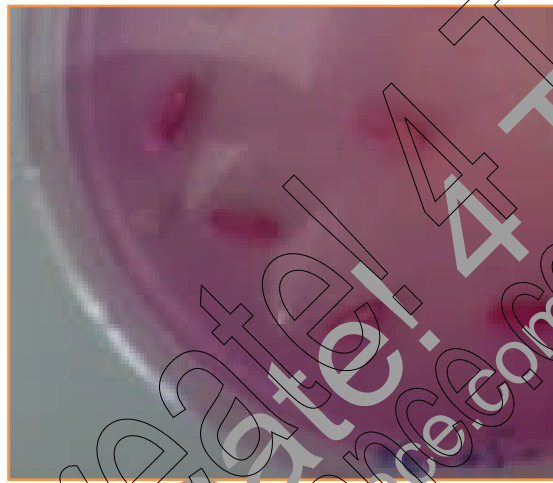


Figure 06. Méthode d'ensemencement direct des grains sur le milieu DRBC (à droite).

3. Identification morphologique des isolats fongiques

3.1. Identification macroscopique

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'œil nu puis à la loupe binoculaire dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus*, d'un *Penicillium*, ou d'un autre genre en fonction 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. Seuls ces champignons sont alors repiqués sur un milieu de purification (PDA) et incubés pendant 7 jours à 28°C.

3.2. Identification microscopique

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

3.2.1. 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 (X40, X100).

3.2.2. 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, puis que l'on colle sur une lame de microscope, l'observation microscopique se fait au grossissement X40 et X100.

Les moisissures sont identifiées d'après leurs caractères morphologiques, l'aspect des colonies, leur couleur ainsi que les renseignements recueillis lors de l'observation au microscope photonique.

3.3. 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 la gélose par leur forme et leur couleur caractéristiques. Seul ces champignons sont alors purifiés puis repiqués dans des tubes à essai contenant le milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar).

Le repiquage consiste à transférer aseptiquement la souche identifiée (*Aspergillus* sp.) dans des tubes de PDA stériles. 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 2 à 3 semaines à une température de 28°C, les isolats sont conservés à 4°C pour des analyses ultérieures.

4. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A

Les aflatoxines et les ochratoxines A possèdent une fluorescence propre qui permet de les détecter généralement par une lampe à U.V. Elles sont fluorescentes 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 (bien sur dans un solvant spécifique de séparation).

La criblage des isolats d'*Aspergillus* producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A est réalisés 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) et par HPLC.

4.1. 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 déchiqueté (CAM), additionné de 0,3% de β -cytotoxicine qui permet d'améliorer nettement l'intensité de la fluorescence. L'ensemencement des souches fongiques sur CAM se fait par point centrale (une souche par boîte).

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.

4.2. Extraction d'aflatoxines et d'ochratoxine A

En vue d'une confirmation de la production des aflatoxines par CCM et par HPLC (de quelque isolats), 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, trois rondelles (10 mm 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 aflatoxine 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 (figure 07).

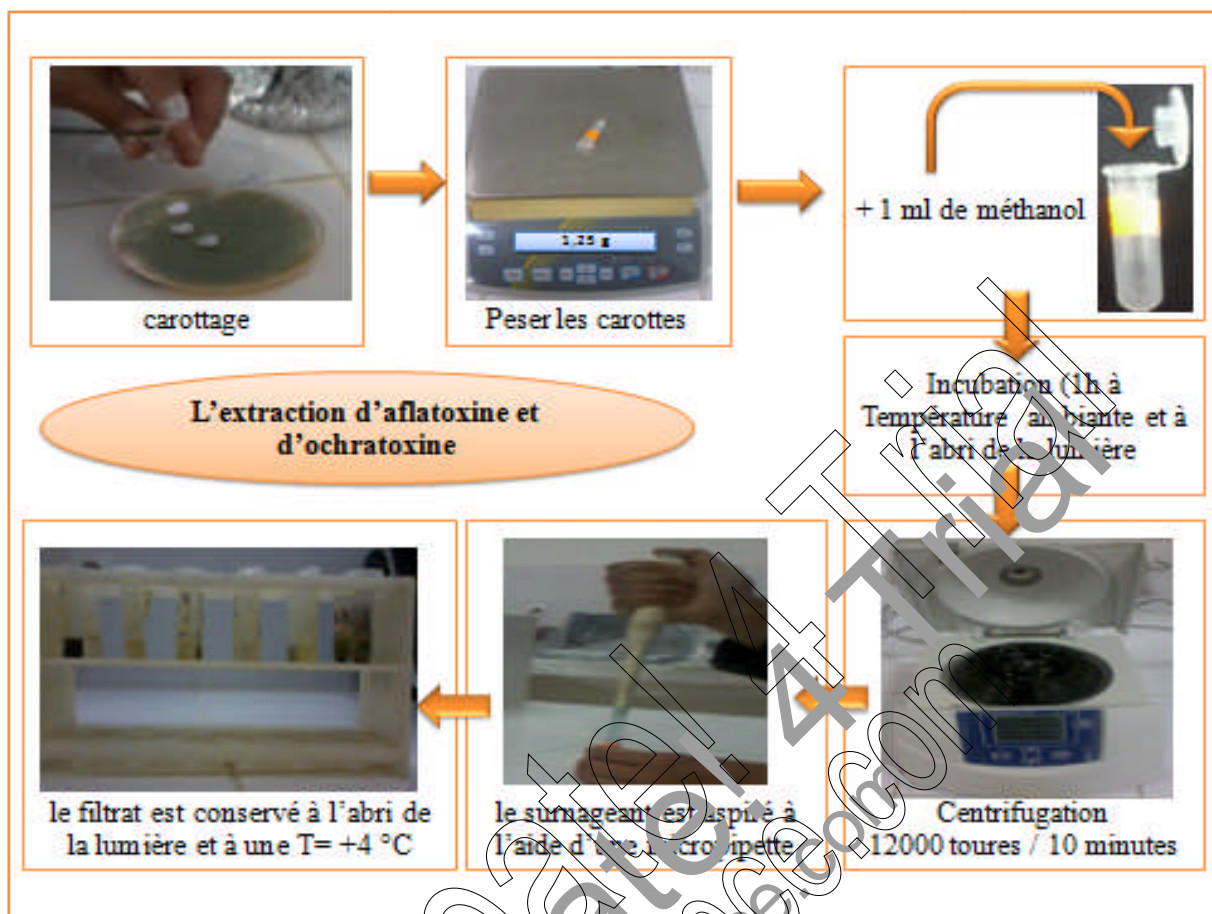


Figure 07. Représentation schématisée de la procédure expérimentale de l'extraction d'aflatoxine et d'ochratoxine A.

4.3. 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 μ l (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 2 cm du bord. Dans chaque plaque 7 à 8 échantillons sont déposés, espacés de 2,5 cm. 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-éthyle acétate-acide formique à 90% (50:40:10, v/v/v) pour les ochratoxines.

4.3.1. 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.

4.3.2. 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 2,5 cm (7 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 soit, 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 aflatoxine et des ochratoxine A, placer les plaques sous lumière UV (365 nm). Les AFs B caractérisés par une tache bleue et pour les AFs G par une tache verte.

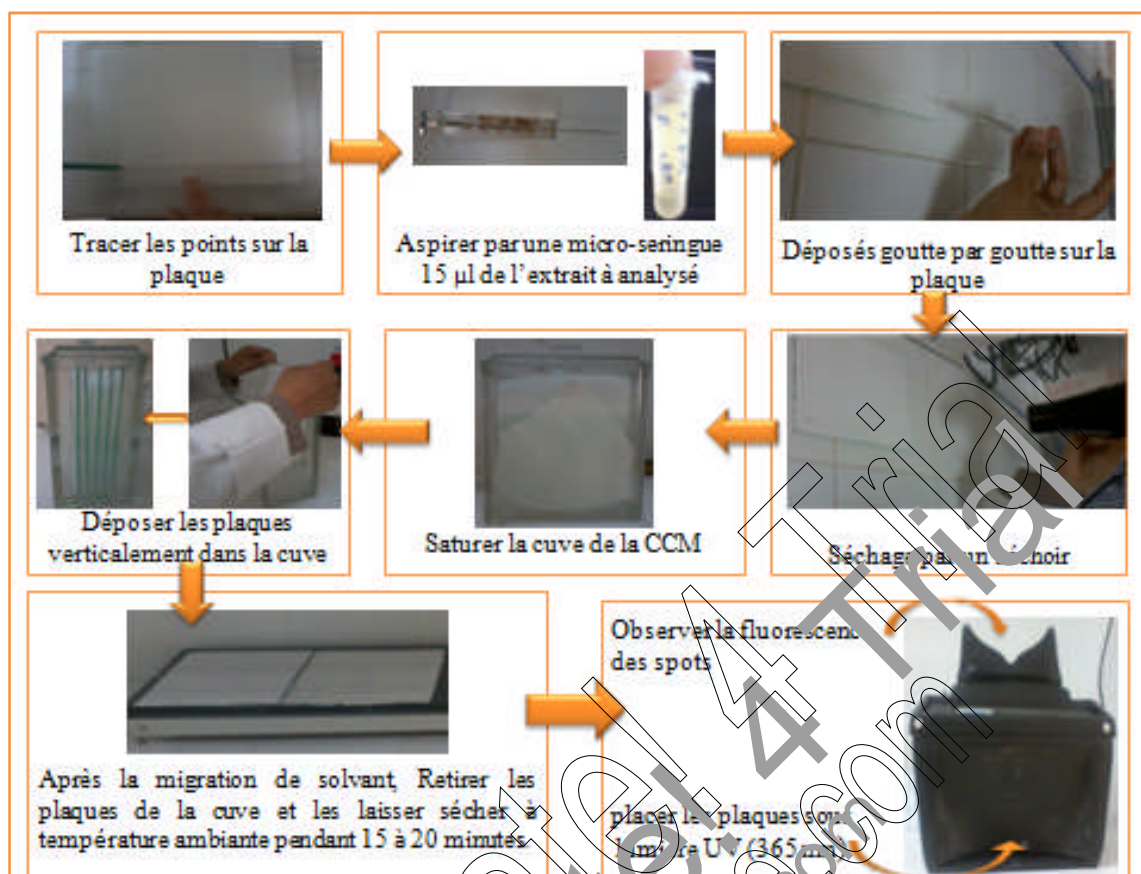


Figure 08. Représentation schématique de la procédure expérimentale de la réalisation de chromatographie sur couche mince pour la détection de fluorescence de l'aflatoxine et de l'ochratoxine

4.4. Confirmation et quantification des aflatoxines par HPLC

Une confirmation et une quantification des aflatoxines par HPLC munie d'une cellule électrochimique de dérivation au brome « KOBRA Cell » a été également réalisées au Laboratoire de Génie Chimique (LGC) de l'INSAT de Toulouse.

Les aflatoxines ont été analysées sur un chromatographe de marque Shimadzu LC-10 (Kyoto, Japon). La phase mobile est composée de méthanol-acétonitrile-eau (20:20:60 v/v). Pour la dérivation, à un litre de phase mobile, 119 mg de bromure de potassium et 350 µl d'acide nitrique 4M sont ajoutés (selon le manuel KOBRA Cell®). Le débit est réglé à 0,5 ml/min. Un volume de 20 µl d'échantillon est injecté manuellement à l'aide d'une microseringue. L'analyse est réalisée en condition isocratique. Des solutions standards de l'aflatoxine B1 et B2 pure de concentrations connues sont injectées intercalées parmi la série d'échantillons. La détection est réalisée en réglant l'onde d'excitation à 362 nm et des filtres d'émission à 425 nm pour B1 et B2. L'enregistrement et l'analyse des chromatogrammes sont effectués par un logiciel adapté (Normasoft).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS

1. Analyse de la flore fongique des échantillons de riz stocké

Cette étude a été conduite dans le but d'isoler et d'identifier la microflore fongique qui contamine le riz stocké et de rechercher les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A (en particulier les champignons appartenant au genre *Aspergillus*). Après 7 jours d'incubation, nous avons observé des colonies différentes, identifiées selon les critères d'identifications macroscopiques et microscopiques.

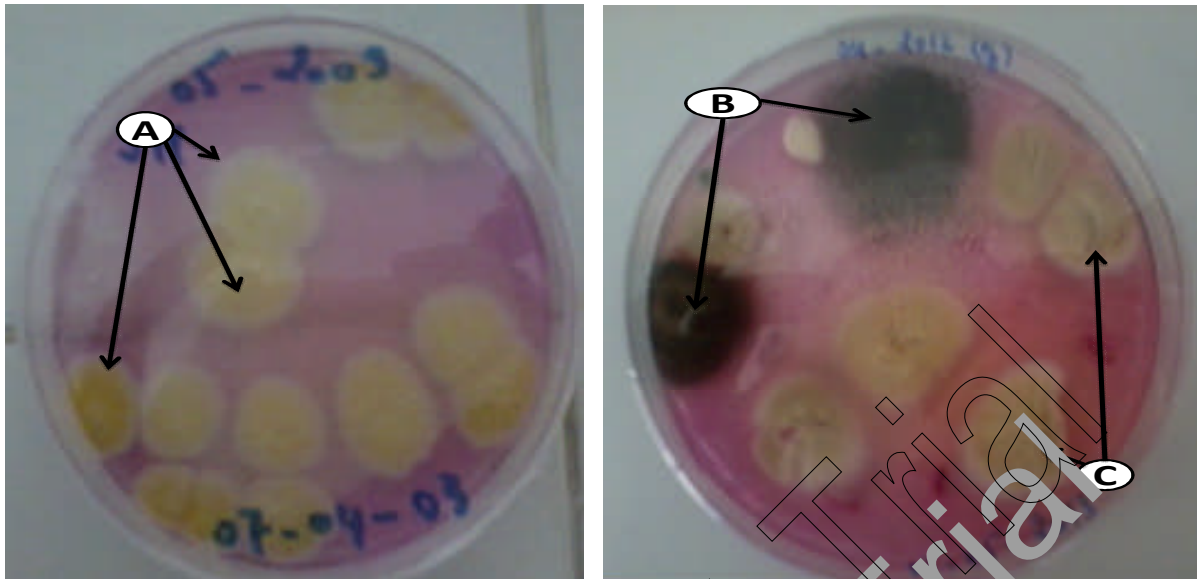
1.1. Reconnaissance des genres et des sections

1.1.1. Reconnaissance des genres

Les principaux genres fongiques identifiés au cours de cette étude sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Mucor*. 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 7 jours d'incubation sur milieu DRBC. Les teintes diffèrent selon les sections (figure 09). Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête sphérique ou ovoïde. Selon l'espèce, une ou deux rangées de stérigmates prend naissance sur les têtes (unisérié ou bisérié). Sur ces stérigmates se forment et s'accumulent les spores en de très longues chaînes (figure 10). Les caractères morphologiques de ce genre ont déjà été décrits dans la partie bibliographique (page 06 et 07, Figure 1).



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

Figure 09. Aspect macroscopique d'*Aspergillus* sp. poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.

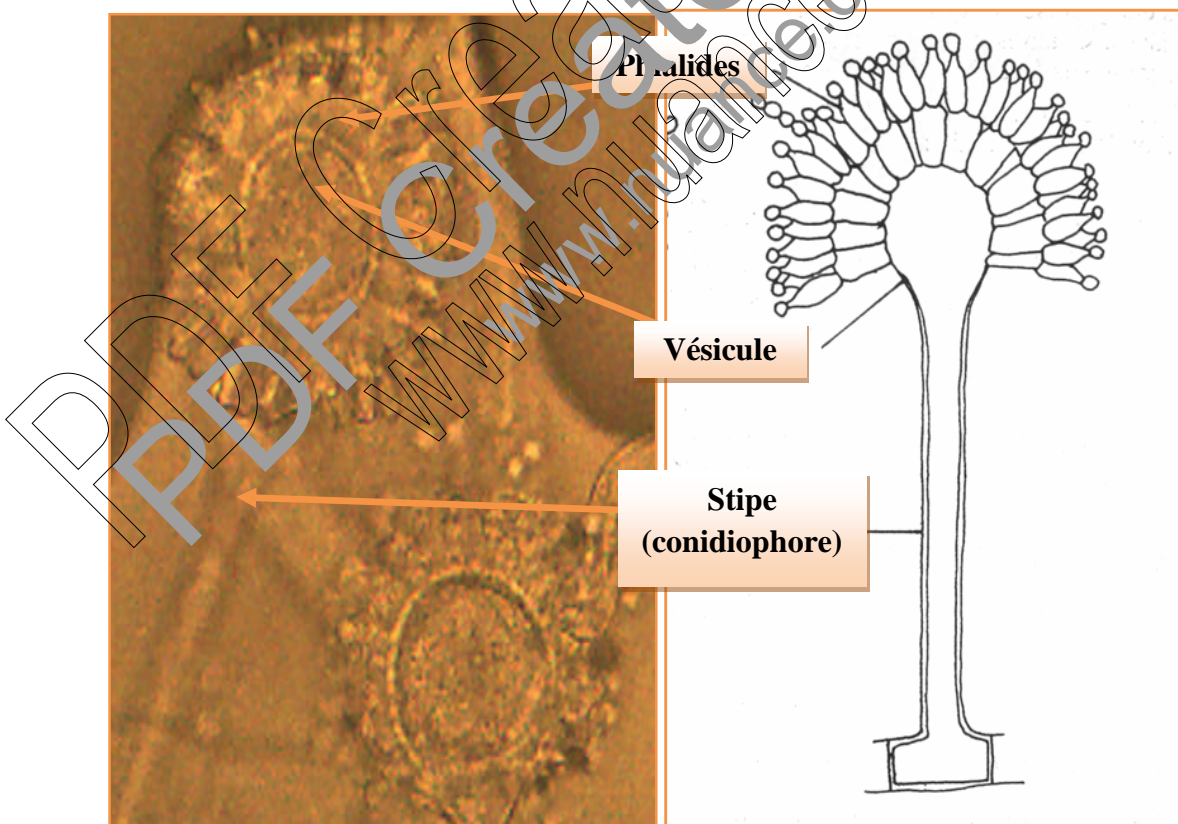


Figure 10. Aspect microscopique de genre *Aspergillus* (G X40).

➤ **Le genre *Penicillium* :**

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, 0,5 à 2 cm de diamètre après 5-7 jours de culture sur milieu DRBC (figure 11). En effet, le *Penicillium* est caractérisé par des conidiophores (ou stipes) qui s'élèvent un à un du mycélium portant des phialides groupées en pinceaux (d'où le nom de *Penicillium*) au bout desquels les spores s'accumulent en chaîne. Ils sont nombreuses, claires ou faiblement colorées, sphériques ou ovales (figure 12).



Penicillium sp. poussé sur le milieu DRBC

Penicillium sp. poussé sur le milieu CYA.

Figure 11. Aspect macroscopique du genre *Penicillium* sur milieu DRBC et CYA après 7 jours d'incubation à 28°C.

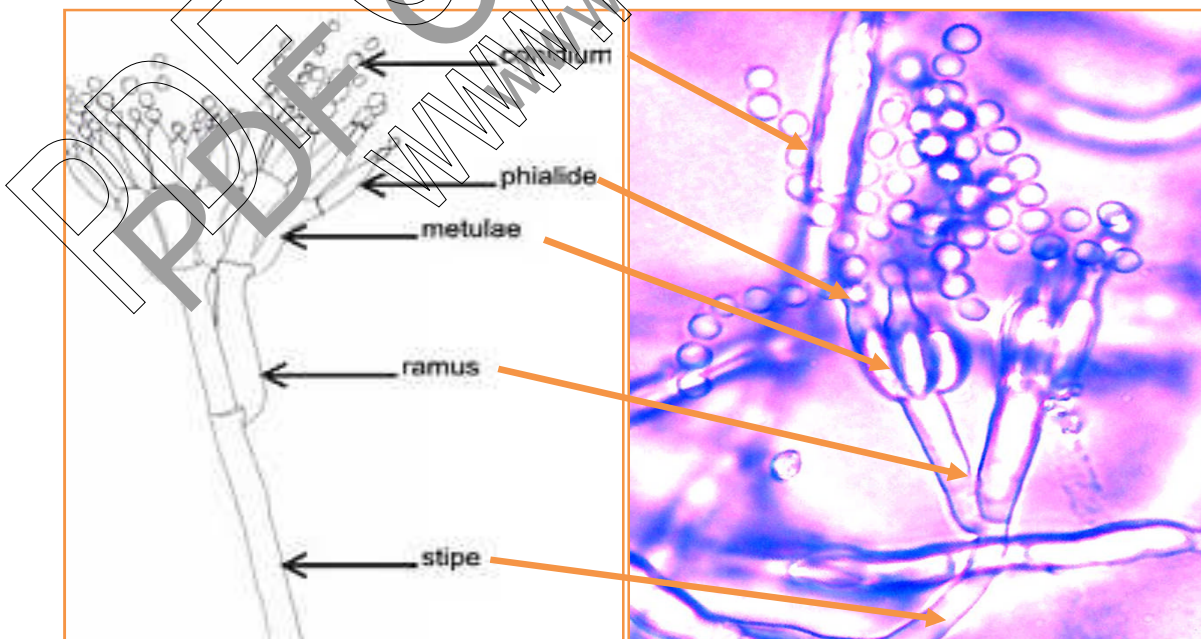


Figure 12. Aspect microscopique de genre *Penicillium* (G X40).

➤ **Le genre *Mucor* :**

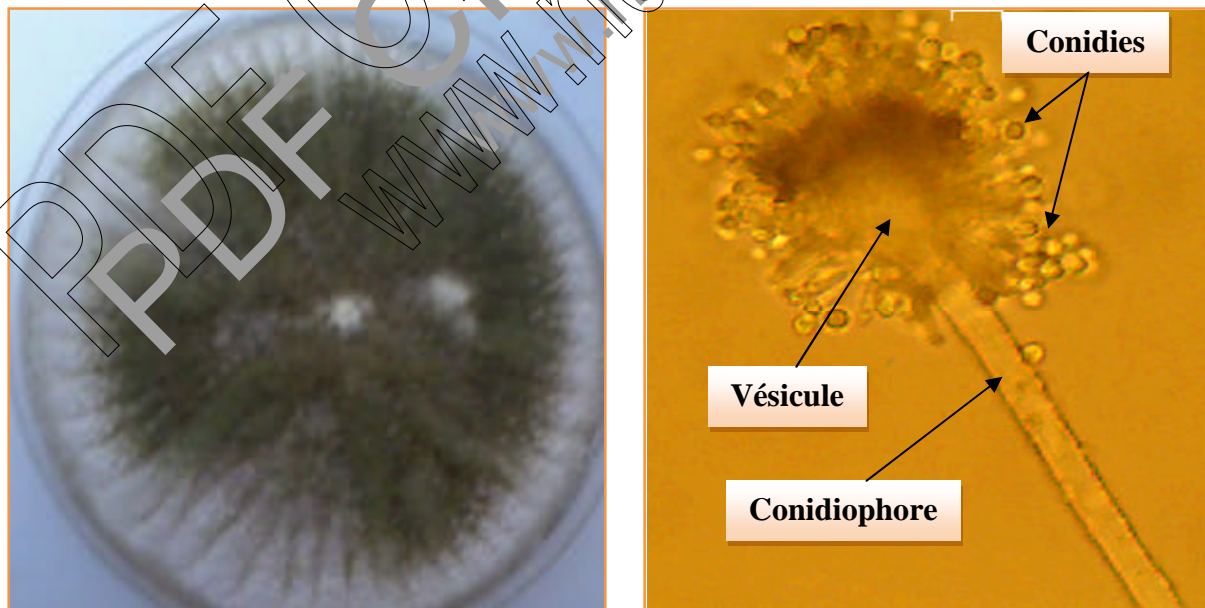
Il est caractérisé par des colonies à croissance très rapide. Le thalle aérien, 2 à 20 mm de hauteur, est au début blanc, devenant brun gris en vieillissant. Ce genre se caractérise par la présence de sporangiophores longs ou courts, ramifiés ou non et portant des sporocystes arrondis à columelles elliptiques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

1.1.2. Reconnaissance des sections du genre *Aspergillus*

Au cours de cette étude nous avons identifié quatre 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*. Les caractéristiques des groupes d'espèces identifiées dans cette étude sont les suivantes:

➤ ***Aspergillus* section *Flavi*** (*A. flavus* et *A. parasiticus*)

A une croissance rapide à 28°C sur le milieu de culture, *Aspergillus* section *Flavi* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaune. *Aspergillus* section *Flavi* ont des têtes unisériées ou bisériées, ils produisent des conidies de forme et taille variables (figure 13).



Aspect macroscopique
après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C°.

Aspect microscopique (G X40).

Figure 13. Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus* section *Flavi*.

➤ ***Aspergillus section Nigri*** (*A. niger* et *A. carbonarius*)

Sur le milieu CYA, la colonie a un diamètre de 60 mm ou plus, envahit souvent toute la surface de la boîte de Pétri (figure 14). Elle est plate, duveteuse, avec des têtes unisérié ou bisérié avec des conidies noires.



Figure 14. Aspect macroscopique d'*Aspergillus section Nigri* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C.

➤ ***Aspergillus section Fumigati***

Forme des colonies d'abord blanches, puis bleu vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre (figure 15). 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.



Figure 15. Aspect macroscopique d'*Aspergillus section Fumigati* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28°C.

➤ ***Aspergillus section Terrei***

Colonie brune-beige à brune-orangé (figure 16). 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.



Figure 16. Aspect macroscopique d'*Aspergillus section Terrei* après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 25°C.

2. Distribution des genres fongiques dans les échantillons de riz analysés

Cette étude a été réalisée dans le but d'isoler et d'identifier la microflore fongique qui contamine le riz stocké, pour cette raison nous avons analysé 23 échantillons de riz (stockés depuis 2010, 2011, 2012 et 2013) conservés au niveau de la Coopérative des Céréales et des Légumes Secs (CCLS) de Blida. Après l'identification et le dénombrement des champignons, tous les résultats de l'analyse fongique sont consignés dans les tableaux 7, 8, 9 et 10. La densité de la flore fongique varie considérablement d'un échantillon à un autre.

Les méthodes utilisées dans cette étude sont la méthode de dilution qui donne les résultats par l'unité formant des colonies (UFC/g) et la méthode des grains (ensemencement direct des grains sur le milieu DRBC) qui donne les résultats par le pourcentage (%). Ces méthodes démontrent qu'il y'a une variabilité dans les résultats données.

Globalement, la plus forte densité est enregistré dans les échantillons de riz stocké depuis 2010 par un taux de $1,5 \cdot 10^5$ UFC/g de riz. La majorité de ces échantillons ont révélé des taux de contamination observables par la méthode de dilution par rapport à la méthode des grains, qui a montré une contamination identifiable dans les échantillons de riz stocké depuis 2012 et 2013, avec des proportions variables.

2.1. Échantillons de riz stocké depuis 2010 au CCLS

Les six échantillons de riz conservés depuis 2010 au sein de CCLS de Blida sont contaminés par les champignons avec une fréquence variable selon les méthodes utilisées et les échantillons analysés.

Selon les résultats obtenus par la méthode de dilution, quatre échantillons sont contaminés en particulier par *Aspergillus* avec un taux allant de 66,7 à 92,8 % de la flore fongique totale. Nous avons noté la présence d'autres champignons, que nous n'avons pas identifiés, avec des taux relativement faibles par rapport à *Aspergillus*.

En revanche, la méthode des grains a révélé la contamination de 2 échantillons (N° 2 et 4) par *Aspergillus* et *Penicillium*. Ce dernier genre n'a pas été révélé par la méthode de dilution. La dominance de genre *Aspergillus* est marquée dans un échantillon seulement avec un taux de 57,2 %, et le genre *Penicillium* est enregistré dans l'autre échantillon avec un taux de 66,5 % de la contamination globale (tableau 07).

Tableau 07. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 6 échantillons de riz stocké au CCLS depuis 2010.

Méthode utilisée	N°	FFT	<i>Aspergillus</i> sp. (%)	<i>Penicillium</i> sp. (%)	<i>Mucor</i> sp. (%)	Autres (%)
Méthode de dilution (UFC/g)	1	<10	/	/	/	/
	2	17,10	91,4	/	/	8,6
	3	1,5 . 10 ⁵	66,7	/	/	33,3
	4	<10	/	/	/	/
	5	0,5 . 10 ⁵	90	/	/	10
	6	0,07 . 10 ⁵	92,8	/	/	7,2
Méthode des grains (%)	1	/	/	/	/	/
	2	20	33,5	66,5	/	/
	3	/	/	/	/	/
	4	46,7	57,2	42,8	/	/
	5	/	/	/	/	/
	6	/	/	/	/	/

N°= numéro d'échantillon, FFT = Flore Fongique Totale ; / = absence

2.2. Échantillons de riz stocké depuis 2011 au CCLS

Parmi les 23 échantillons, nous avons analysé deux échantillons de riz conservés depuis 2011 au niveau de CCLS de Blida. Les résultats analytiques de ces échantillons montrent que, l'échantillon N°1 est contaminé par le genre *Penicillium* uniquement (résultat démontré par la méthode des grains). Tandis que la méthode de dilution révéla la contamination de l'échantillon N°2 seulement par le genre *Aspergillus*. Nous avons remarqué aussi l'absence de *Mucor* et des autres champignons dans ces échantillons (tableau 08).

Tableau 08. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 2 échantillons de riz stocké au CCLS depuis 2011.

Méthode utilisée	N°	FFT	<i>Aspergillus</i> sp. (%)	<i>Penicillium</i> sp. (%)	<i>Mucor</i> sp. (%)	Autres (%)
Méthode de dilution (UFC/g)	1	<10	/	/	/	/
	2	0,08 . 10 ⁵	100	/	/	/
Méthode des grains (%)	1	20	/	100	/	/
	2	/	/	/	/	/

N°= numéro d'échantillon ; FFT = Flore Fongique Totale ; / = absence.

2.3. Échantillons de riz stocké depuis 2012 au CCLS

Tous les échantillons de riz conservés depuis 2012 au niveau de CCLS de Blida sont relativement sains sur la base des résultats de la méthode des dilutions, qui ne présente aucune contamination de ces échantillons contrairement à la méthode des grains, qui a révélé une propagation importante d'*Aspergillus* et *Penicillium* dans 7 échantillons parmi 8 analysés.

Selon la méthode des grains, la grande contamination est marquée dans l'échantillon N°3 avec un taux de 100% (les 15 grains analysés sont tout infectés par *Aspergillus* et *Penicillium*). Les fréquences d'*Aspergillus* sont relativement élevées par rapport au genre *Penicillium* qui est dominant dans l'échantillon N°3 seulement avec un taux de 60%, et absent dans l'échantillon N°2 (tableau 09).

Tableau 09. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 8 échantillons de riz stocké au CCLS depuis 2012.

Méthode utilisée	N°	FFT	<i>Aspergillus</i> sp. (%)	<i>Penicillium</i> sp. (%)	<i>Mucor</i> sp. (%)	Autres (%)
Méthode de dilution (UFC/g)	1	<10	/	/	/	/
	2	<10	/	/	/	/
	3	<10	/	/	/	/
	4	<10	/	/	/	/
	5	<10	/	/	/	/
	6	<10	/	/	/	/
	7	<10	/	/	/	/
	8	<10	/	/	/	/
Méthode des grains (%)	1	/	/	/	/	/
	2	60	100	0	/	/
	3	100	40	60	/	/
	4	46,7	85,7	14,3	/	/
	5	60	88,8	11,2	/	/
	6	46,7	71,5	28,5	/	/
	7	53,3	82,5	37,5	/	/
	8	4	66,8	33,2	/	/

N°= numéro d'échantillon ; FFT = Flore Fongique Totale ; / = absence.

2.4. Échantillon de riz stocké depuis janvier 2013 au CCLS

Le riz de ces échantillons est arrivé et conservé depuis le début de janvier 2013 au niveau de CCLS de Bida. Les résultats analytiques de 7 échantillons montrent que sont tous contaminés par les champignons avec des taux variables selon l'échantillon et la méthode utilisée.

Trois échantillons parmi 7 (N°1, 2 et 6) sont contaminés par *Aspergillus* et *Penicillium* seulement, isolés par la méthode de dilution avec une dominance du genre *Penicillium* avec un taux allant de 55,6 à 91,9%.

La méthode des grains a montré que tous les échantillons sont contaminés par les deux champignons *Aspergillus* et *Penicillium* avec des fréquences variable sauf l'échantillon N°3 est contaminé par le genre *Penicillium* uniquement.

Ainsi le *Mucor* est enregistré dans un échantillon seulement (N°7) avec une fréquence de 64,3 % (tableau 10).

Tableau 10. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 7 échantillons de riz stocké au CCLS depuis janvier 2013.

Méthode utilisée	N°	FFT	<i>Aspergillus</i> sp. (%)	<i>Penicillium</i> sp. (%)	<i>Mucor</i> sp. (%)	Autres (%)
Méthode de dilution (UFC/g)	1	0,07 . 10 ⁵	42,9	57,1	/	/
	2	0,09 . 10 ⁵	44,4	55,6	/	/
	3	10>	/	/	/	/
	4	10>	/	/	/	/
	5	10>	/	/	/	/
	6	0,135 . 10 ⁵	8,1	91,9	/	/
	7	10>	/	/	/	/
Méthode des grains (%)	1	86,7	23,1	76,9	/	/
	2	93,3	35,7	64,3	/	/
	3	20	100	/	/	/
	4	26,7	75	25	/	/
	5	46,7	42,9	57,1	/	/
	6	/	42,9	57,1	/	/
	7	93,3	21,4	14,3	64,3	/

N° = numéro d'échantillon ; FFT = Flore Fongique Totale ; / = absence.

2.5. Fréquence des champignons de stockage dans les échantillons de riz analysés

Les genres les plus observées dans les 23 échantillons analysés sont les champignons de stockage, *Aspergillus*, *Penicillium* et avec une très faible fréquence le genre *Mucor* et d'autres champignons qui sont enregistrées uniquement dans les échantillons de riz stocké depuis 2013 et 2010 respectivement. Les deux premiers champignons sont isolés dans la majorité des échantillons de riz stocké (figure 17).

Globalement, les résultats obtenus par la méthode de dilution montrent une dominance relative du genre *Aspergillus* surtout dans les échantillons de riz conservé depuis 2010 et 2011 avec un taux de 83,1% et 100% respectivement, les échantillons de riz stocké depuis 2012 ne représentent aucune contamination par cette méthode. Tandis que la méthode

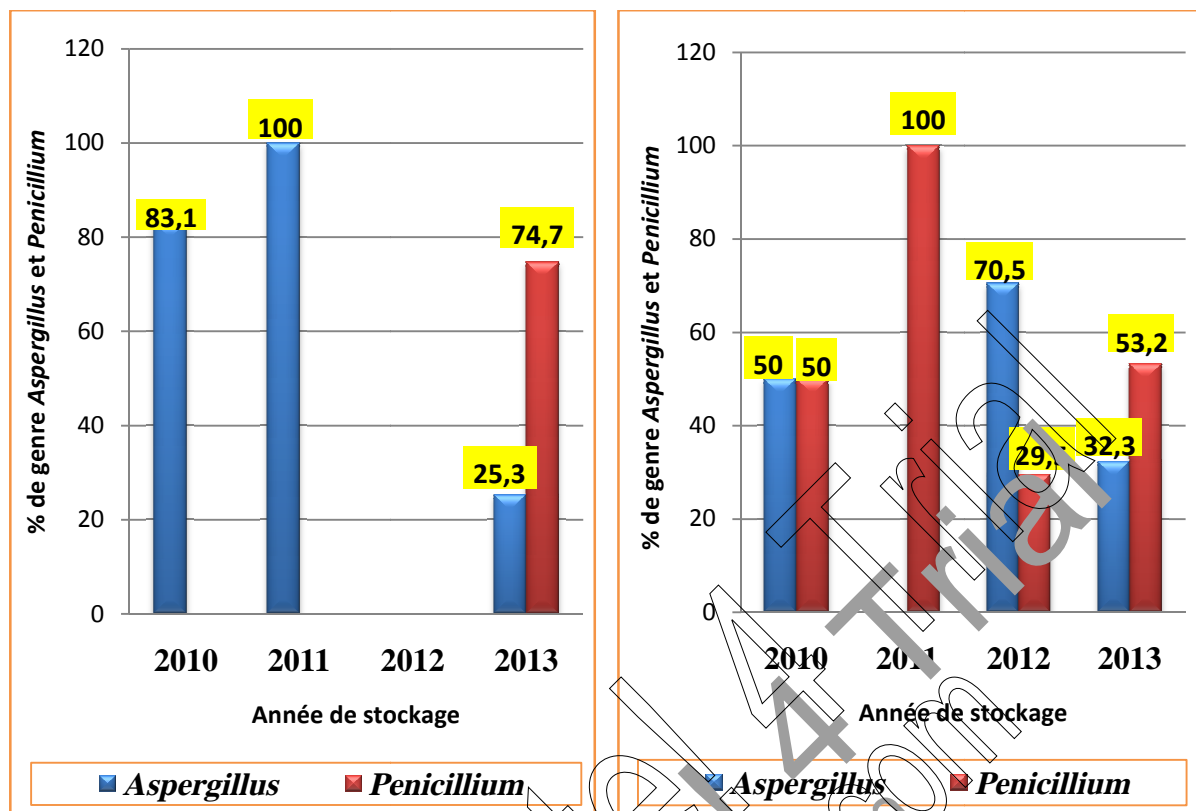
d'ensemencement direct des grains montre une dominance de genre *Aspergillus* dans les échantillons conservés depuis 2012 avec un taux de 70,5% et une absence totale de ce genre est observée dans les échantillons stockés depuis 2011 (tableau 14).

Le genre *Penicillium* est dominant surtout dans les échantillons de riz stockés depuis 2013, cependant une absence totale de ce genre est observée par la méthode de dilution, dans les échantillons stockés depuis 2010, 2011 et 2012. La méthode d'ensemencement direct des grains démontre la présence de ce genre dans tous les échantillons analysés, mais la dominance de *Penicillium* est remarquée dans les échantillons de 2011 et 2013, avec un taux de 100% et 53,2% respectivement (tableau 11).

Tableau 11. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés des 23 échantillons de riz stocké au CCLS depuis 2010, 2011, 2012 et 2013.

Méthode utilisée	Année de stockage	N	FFT (le moyen)	<i>Aspergillus</i> sp. (%)	<i>Penicillium</i> sp. (%)	<i>Mucor</i> sp. (%)	Autre (%)
Méthode de dilution (UFC/g)	2010	6	$0,37 \cdot 10^5$	83,1	/	/	16,9
	2011	2	$0,04 \cdot 10^5$	100	/	/	/
	2012	8			/	/	/
	2013	7	$0,04 \cdot 10^5$	25,3	74,7	/	/
Méthode des grains (%)	2010	6	10	50	50	/	/
	2011	2	10		100	/	/
	2012	8	50,8	70,5	29,5	/	/
	2013	7	53	32,3	53,2	14,5	/

N = nombre d'échantillons ; FFT = Flore Fongique Totale ; / = absence.



Selon la méthode de dilution.

Selon la méthode des grains.

Figure 17. Fréquence du genre *Aspergillus* et *Penicillium* dans les 23 échantillons de riz analysés selon les méthodes utilisées.

Selon les échantillons analysés, les deux méthodes donnent des fréquences très variables, par exemple pour les échantillons stockés depuis 2012, ils ne représentent aucune contamination par la méthode de dilution, tandis que la méthode d'ensemencement direct des grains a révélé une forte contamination par les genres *Aspergillus* et *Penicillium*. D'autre part, nous avons observé la dominance de genre *Aspergillus* par la méthode de dilution dans les échantillons stockés depuis 2011, cependant l'autre méthode a montré la dominance de genre *Penicillium*, qui est mieux isolé par cette dernière méthode.

3. Distribution des sections d'*Aspergillus* dans les échantillons de riz stocké

Parmi les sections d'*Aspergillus* identifiées, *Aspergillus* section *Flavi*, est la plus dominante dans les 23 échantillons de riz stocké, et à un degré moindre *Aspergillus* section *Terrie*, *Nigri* et *Fumigati* (figure 18).

Nous rappelons que les échantillons de riz de stocke de 2012 sont sains selon la méthode des dilutions et les échantillons de 2011 ne sont pas contaminés par le genre *Aspergillus* selon la méthode des grains.

➤ *Aspergillus* section *Flavi* est isolée à partir de la majorité des échantillons de riz analysé. Nous avons noté une contamination totale du riz par cette section pour les échantillons de 2010, 2011 et avec un taux de 70,6% pour les échantillons de 2013. La méthode des grains a révélé également des fréquences très élevées d'*Aspergillus* section *Flavi* par rapport aux autres sections, une forte proportion est enregistrée par les échantillons de 2010 (80%), suivi par un taux de 45% et 37,2% dans les échantillons de riz stocké depuis 2013 et 2012 respectivement (tableau 12).

➤ *Aspergillus* section *Terrie* est la deuxième section qui a une valeur observable dans les échantillons de 2012 et 2013 uniquement, avec un taux de 48,8 et 30% respectivement selon la méthode des grains. Tandis que, la méthode de dilution démontre la présence de cette section avec une très faible fréquence (5,9%) dans les échantillons de 2013 seulement (tableau 12).

➤ *Aspergillus* section *Nigri* est isolé par la méthode des grains seulement avec des fréquences faibles. Elle est présente dans les échantillon de riz stocké depuis 2010, 2011 et 2013 avec des taux 20%, 14% et 25% respectivement (tableau 12).

➤ *Aspergillus* section *Fumigati*, cette section n'est pas présente dans tous les échantillons de riz analysés à l'exception des échantillons conservé depuis 2013 qui sont contaminé avec un taux de 23,5% (tableau 12).

Tableau 12. Distribution des sections d'*Aspergillus* isolées des échantillons de riz stocké au CCL depuis 2010, 2011, 2012 et 2013.

Méthode utilisée	Année de stockage	N	<i>Aspergillus</i> sp.	A. section <i>Flavi</i> (%)	A. section <i>Terrie</i> (%)	A. section <i>Nigri</i> (%)	A. section <i>Fumigati</i> (%)
Méthode de dilution (UFC/g)	2010	6	$0,3 \cdot 10^5$	100	/	/	/
	2011	2	$0,04 \cdot 10^5$	100	/	/	/
	2012	8	/	/	/	/	/
	2013	7	$0,01 \cdot 10^5$	70,6	5,9	/	23,5
Méthode des grains (%)	2010	6	50	80	/	20	/
	2011	2	/	/	/	/	/
	2012	8	70,5	37,2	48,8	14	/
	2013	7	32,3	45	30	25	/

N = nombre d'échantillons.

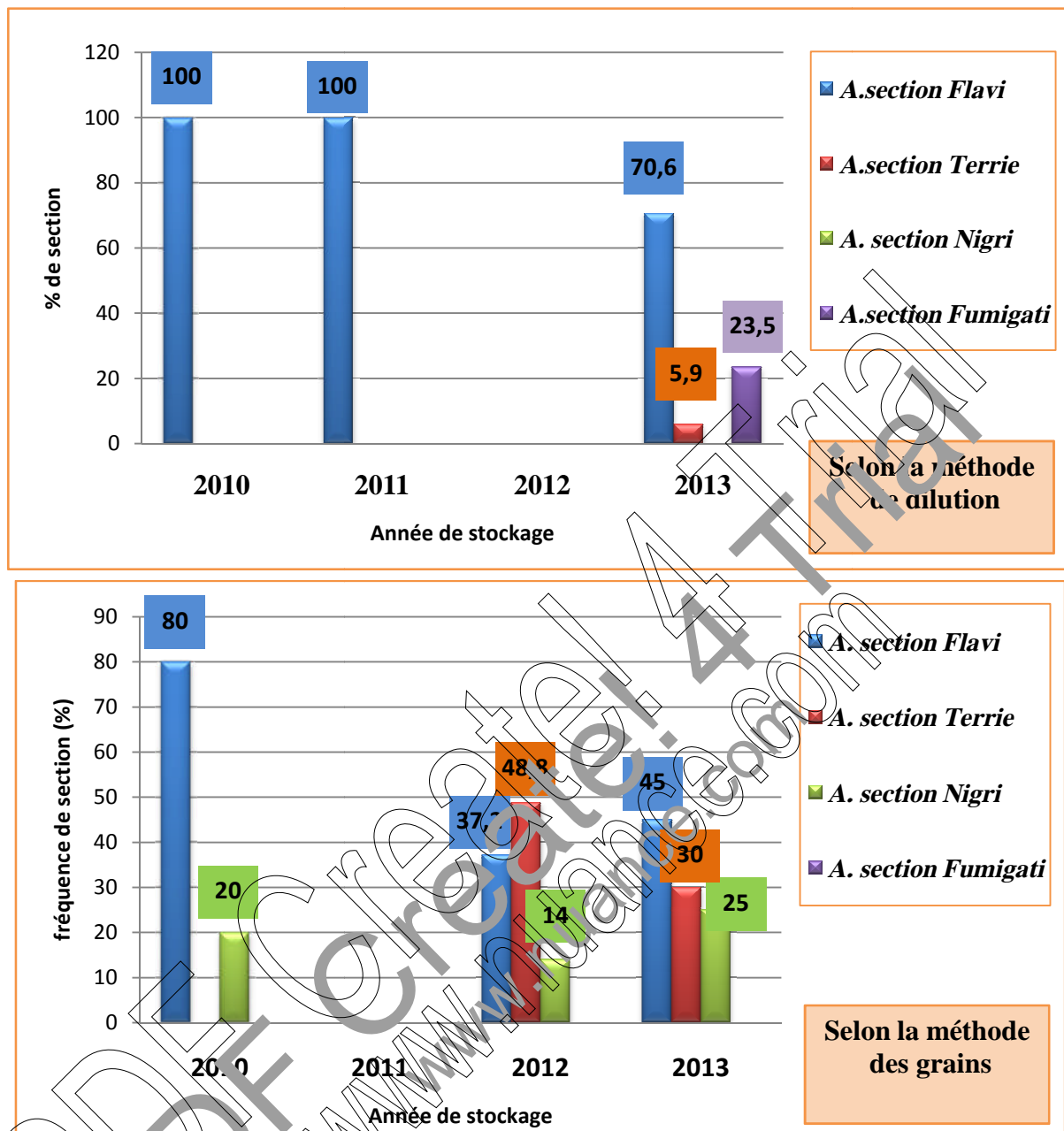


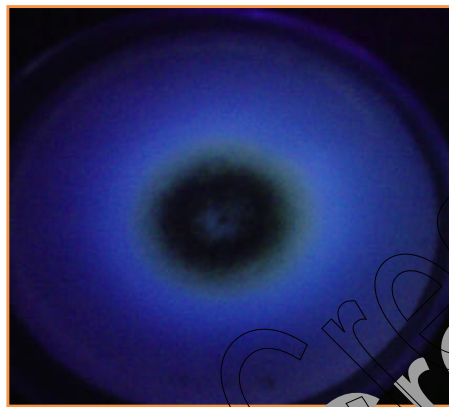
Figure 16. La fréquence des sections d'*Aspergillus* isolées dans tous les échantillons de riz stocké, selon les années de stockage et la méthode utilisée pour leur isolement.

4. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*

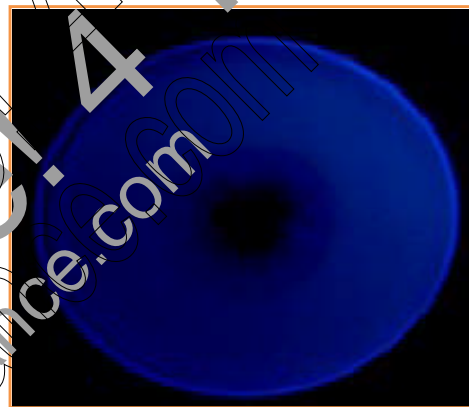
Nous avons étudié le pouvoir producteur d'aflatoxine de 59 souches appartenant à la section *Flavi* sélectionnées aléatoirement sur les boîtes d'isolement (26 isolats de stocke 2010, 11 isolats de stocke 2011, 8 isolats de stocke 2012 et 14 isolats de stocke 2013). Les résultats de l'évaluation de pouvoir producteurs des 59 souches d'*Aspergillus* section *Flavi* testées sont rapportés dans le tableau 18 de l'annexe IV.

Le criblage des souches aflatoxinogènes est basé sur la mise en évidence de la fluorescence sous U.V.(356 nm) sur un milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et par chromatographie sur couche mince (CCM), figure 19 et 20 respectivement. Ces tests ont montré la même fréquence des isolats producteurs d'aflatoxine qui est de 44,1% (26/59). En effet la totalité des isolats provenant des échantillons de 2011 sont producteurs d'aflatoxines et représentent un taux de 42,3% (11/26), suivie de ceux isolés des échantillons de 2013 avec une fréquence de 38,5% (10/26). Tandis que les isolats de stocke de 2010 et 2012 ont révélé une proportion relativement très faible (figure 21).

On note que tous les isolats produisent l'aflatoxine B mais aucun ne produit l'aflatoxine G (résultat montré par le test de CCM). Les résultats de la chromatographie sur couche mince des isolats aflatoxinogènes (sur les plaques) sont donnés en annexe III.



Fluorescence bleu sous UV (365nm).

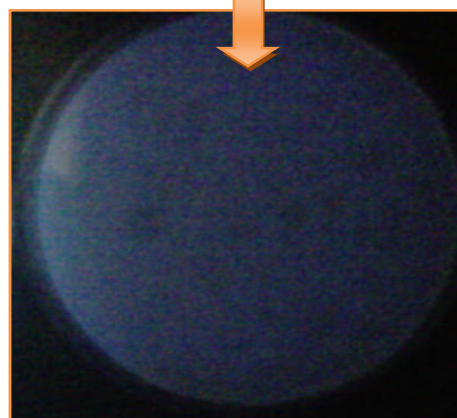


Absence de fluorescence sous UV (365nm).



Rever de la boîte sous UV (365 nm).

Isolat producteur d'AFs



Rever de la boîte sous UV (365 nm).

Isolat non producteur d'AFs

Figure 19. 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).

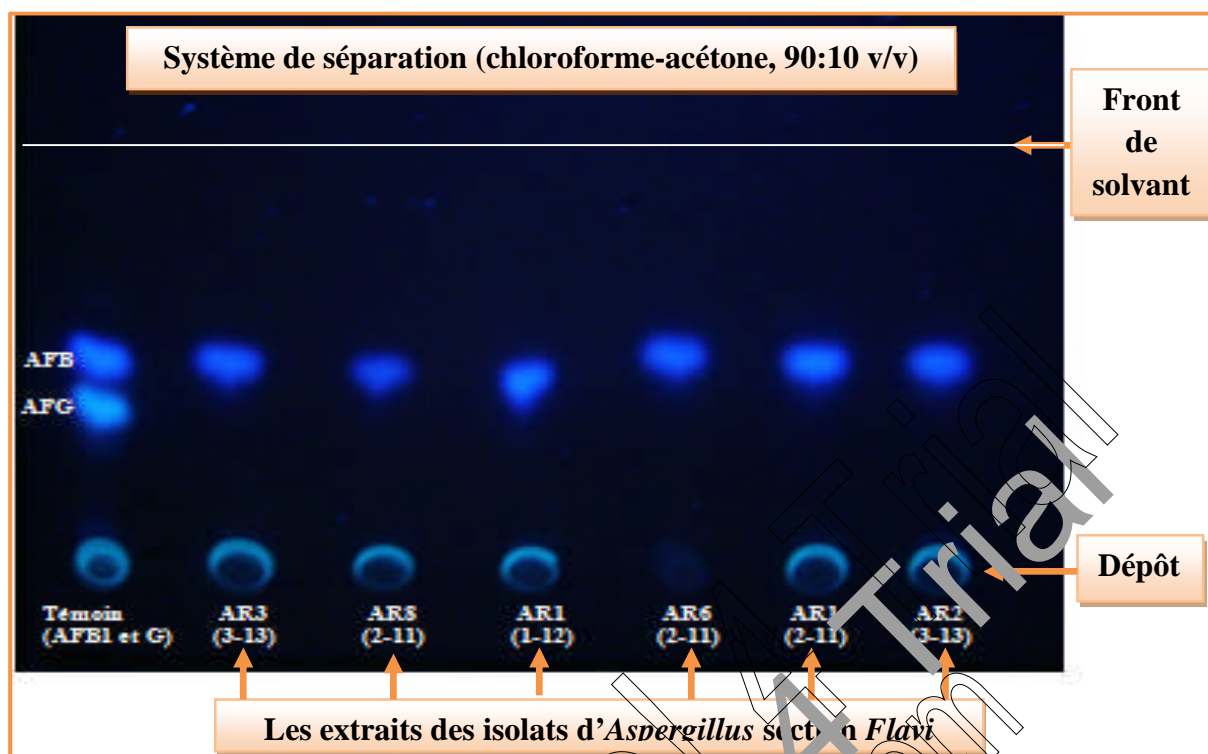


Figure 20. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V.(365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus* section *Flavi* sur CCM (AFB: aflatoxine B, AFG: aflatoxine G).

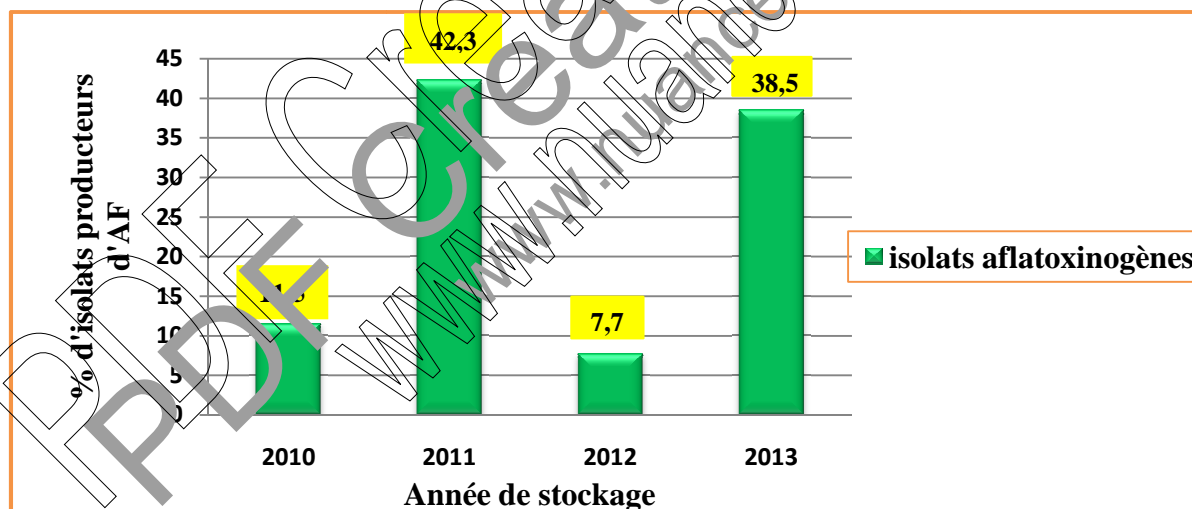


Figure 21. Fréquence (%) des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'aflatoxine selon les années de stockage.

L'intensité de la production d'aflatoxine varie d'un échantillon à un autre. La détection sur le milieu CAM montre une forte fréquence des isolats faiblement (+) et très faiblement producteurs (±) d'aflatoxine B, avec un taux de 84,6% (22/26 isolats), ainsi les isolats moyennement producteurs (++) et fortement producteurs (+++) représentent un taux de 11,5% et 3,9% respectivement.

En revanche, la détection par chromatographie sur couche mince (CCM) a démontré que le taux des isolats fortement producteurs (+++) d'aflatoxine B est de 26,9%, et les isolats moyennement producteurs (++) ont une proportion de 46,2%, ainsi les isolats qui ont une fluorescence faible (+) et très faible (\pm) ont révélé une fréquence de 26,9%. Ces résultats montrent que le test de CCM est très sensible par rapport à la détection des aflatoxines sur le milieu CAM. Tous les résultats de la production d'aflatoxines par les isolats de section *Flavi* et leurs intensités de la fluorescence sont montrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 13. Les isolats aflatoxinogènes appartenant à la section *Flavi* (*A. flavus*).

L'année de stockage	Nombre d'isolats	Numéro d'échantillon	Les isolats	Détection sur CAM	Détection par CCM
2010	3	3	AR ₁ (3-10)	\pm	++
			AR ₂ (3-10)	\pm	\pm
		5	AR ₄ (5-10)	\pm	\pm
2011	11	1	AR ₁ (1-11)	+	++
			AR ₁ (2-11)	++	++
		2	AR ₂ (2-11)	+	+
			AR ₃ (2-11)	++	+++
			AR ₄ (2-11)	++	+++
			AR ₅ (2-11)	\pm	++
			AR ₆ (2-11)	+	++
			AR ₇ (2-11)	\pm	++
			AR ₈ (2-11)	+	++
			AR ₉ (2-11)	\pm	+++
AR ₁₀ (2-11)	\pm	++			
2012	2	1	AR ₁ (1-12)	+++	+++
		4	AR ₃ (7-12)	+	+++
2013	10	3	AR ₂ (3-13)	+	++
			AR ₃ (3-13)	\pm	++
			AR ₄ (3-13)	+	++
		4	AR ₅ (3-13)	\pm	++
			AR ₅ (4-13)	\pm	+++
		5	AR ₂ (5-13)	\pm	+
			AR ₄ (5-13)	\pm	+++
		6	AR ₂ (6-13)	+	+
AR ₄ (6-13)	\pm		\pm		
AR ₆ (6-13)	+		+		

+++ : fluorescence très intense (fortement producteur); ++ : fluorescence intense (moyennement producteur); + : fluorescence faible (faiblement producteur); \pm : fluorescence très faible (très faiblement producteur).

5. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A par les isolats d'*Aspergillus*

L'étude du pouvoir de production de l'OTA a été réalisée sur milieu de culture CYA (Czapek Yeast Agar), pour un total de 34 isolats appartenant au genre *Aspergillus* issus des échantillons stockés depuis 2010, 2011, 2012 et 2013. Les isolats appartiennent à trois sections : 13 isolats de section *Terrei*, 11 isolats de section *Nigri* et 10 isolats de section *Fumigati*. Les extraits au méthanol de ces souches ont été analysés par CCM à 365nm sous U.V. (les résultats de CCM de tous les isolats testés sont consignés dans le tableau 19 dans l'annexe IV).

Les résultats de CCM montrent que tous les isolats sont négatifs à l'exception des certains isolats appartenant à la section *Terrei*, 9 parmi 13 isolats qui sont producteurs d'OTA, mais avec une faible densité.

La fréquence des isolats producteurs d'OTA est de 26,5% (9/34). Le taux d'isolats ochratoxinogènes est plus élevé dans les échantillons de stocke 2013 avec une fréquence de 78% (7/9), que ceux de stocke de 2012 qui ont révélé une proportion de 22% (2/9), cependant les isolats de 2010 et 2011 ne sont pas producteurs d'OTA (Figure 22).

La détection sur chromatographie à couche mince (CCM) montre que les isolats ochratoxinogènes ont une faible à très faible intensité de la fluorescence, les résultats de la production d'ochratoxine A sont illustrés dans le tableau suivant:

Tableau 14. La Distribution des isolats ochratoxinogènes appartenant à section *Terrei*.

L'année de stockage	Nombre des isolats	Numéro d'échantillon	Les isolats	Détection sur CCM
2012	7	1	AR ₄ (1-12)	+
		4	AR ₃ (4-12)	+
			AR ₄ (4-12)	+
			AR ₅ (4-12)	+
			AR ₆ (4-12)	±
			AR ₈ (4-12)	+
		5	AR ₃ (5-12)	+
2013	2	5	AR ₃ (5-13)	±
		6	AR ₃ (6-13)	+

+ : fluorescence faible (faiblement producteur) ; ± : fluorescence très faible (très faiblement producteur).

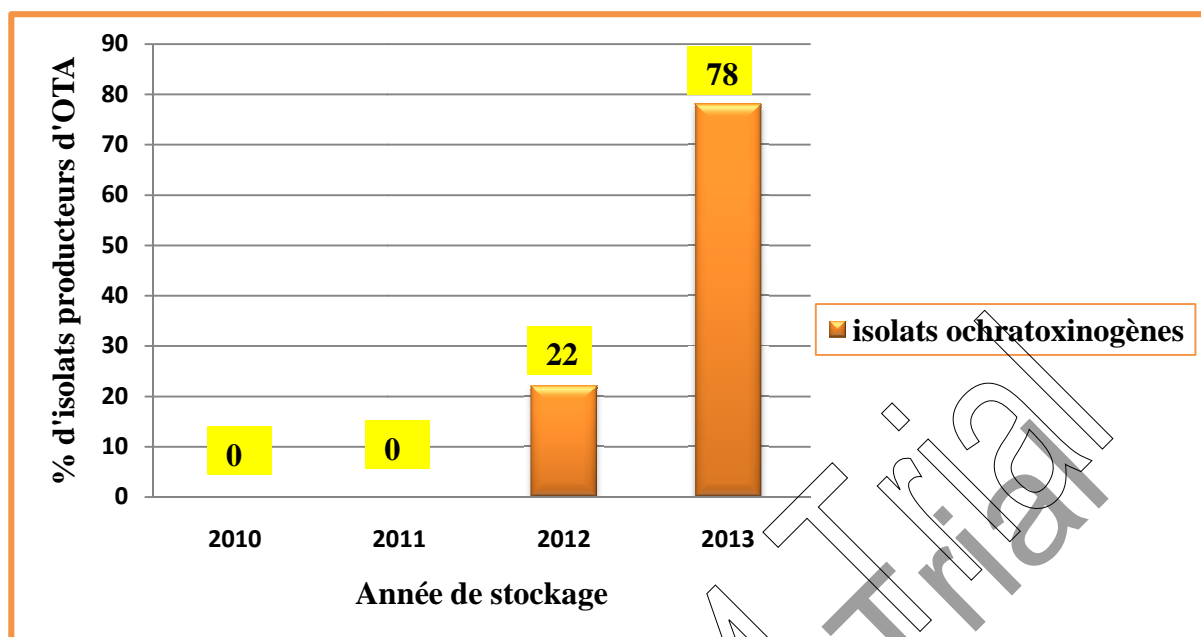


Figure 22. Fréquence (%) des isolats d'*Aspergillus* section *Terrei* producteurs d'OTA selon les années de stockage.

6. Quantification par HPLC des AFs produites par les isolats aflatoxinogènes

Le but de cette analyse était surtout de savoir les quantités et les types de mycotoxine produites par les isolats. Il aurait été souhaitable d'analyser systématiquement tous les isolats. Toutefois, en raison du coût élevé de analyses par HPLC, la quantification de la production d'AFs, a été réalisée pour 6 isolats de section *Fluvi* seulement. L'analyse a été effectuée au laboratoire de Génie Chimique de l'INSA de Toulouse.

Parmi les isolats aflatoxinogènes analysés, quatre isolats ayant montré une fluorescence sur milieu CAM et sur CCM [AR₄ (5-10), AR₂ (2-11), AR₉ (2-11) et AR₄ (5-13)], deux autres isolats représentent les non producteurs sur milieu CAM et sur CCM [AR₂ (2-10) et AR₁ (3-12)].

La quantification d'aflatoxine par HPLC montre que tous les isolats sont producteurs d'aflatoxine de type B seulement, ce qui confirme le résultat obtenu par la CCM. On note que les quantités d'aflatoxine de type B1 est plus élevées par rapport à l'aflatoxine de type B2 dans tous les isolats analysés. Une forte densité d'AFB (B1 + B2) est observée dans l'isolat AR₄ (5-13) suivi par l'isolat AR₉ (2-11), qui ont une fluorescence très intense dans la chromatographie sur couche mince (CCM) et très faible sur CAM. Cependant les isolats non producteurs sur CAM et CCM, ont révélé la présence d'AFB1 uniquement et avec une faible densité dans l'isolat AR₂ (2-10), et l'aflatoxine de type B1 et B2 révélée aussi avec une faible

densité dans l'isolat AR₁ (3-12). Les résultats de la quantification d'aflatoxine par HPLC sont enregistrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 15. Détection et quantification par HPLC d'AFs dans 6 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*.

Isolats aflatoxinogènes	CAM	CCM	Quantification par HPLC (ppb)	
			AF B1	AF B2
AR ₂ (2-10)	-	-	7,8	1,5
AR ₄ (5-10)	±	±	183,34	5
AR ₂ (2-11)	±	+	2877	35,8
AR ₉ (2-11)	±	+++	71,9	127,2
AR ₁ (3-12)	-	-	5,6	1,6
AR ₄ (5-13)	±	++	10639,8	107,2

+++ : fluorescence très intense (fortement producteur); ++ : fluorescence intense (moyennement producteur); + : fluorescence faible (faiblement producteur); ± : fluorescence très faible (très faiblement producteur) ; - : absence de fluorescence.

A l'issus de ces résultats, on peut dire que la technique de l'HPLC est très sensible et donne des résultats précis par rapport aux tests de détection de fluorescence sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM), et par la chromatographie sur couche mince (CCM).

II. DISCUSSION

L'objectif de ce travail est d'étudier les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans le riz stocké. Pour cela, nous avons analysé 23 échantillons de riz stocké depuis 2010, 2011, 2012 et 2013, conservé dans la CCLS de Blida. Les céréales (maïs, riz) consommées dans les régions tropicales sont souvent contaminées par des mycotoxines produites par des moisissures du genre *Aspergillus* ou *Penicillium* (Nguyen, 2007). Nos résultats confirment le statut de flore de « stockage » de ces deux genres qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage. Contrairement aux champignons de « champ », *Alternaria*, *Cladosporium* et *Fusarium*, qui exigent une forte humidité. La contamination des denrées alimentaires par les moisissures peut survenir tout au long de la filière : production, stockage, transport, transformation et conditionnement (Doré *et al.*, 2002). Ainsi, des champignons du sol ou des débris des plantes pourront disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage si les conditions sont favorables.

Nos résultats obtenus par la méthode de dilution montrent que la fréquence de contamination par *Aspergillus* dans les 23 échantillons est élevée (69,5%) par rapport au *Penicillium* (24,9%). La dominance du genre *Aspergillus* dans les denrées stockées dans les régions à climat chaud est très connue (Fitt et Hocking, 1997). *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation (Gourama et B. Norma, 1995) et il est très répandu dans la nature (Pařenicová *et al.*, 2000) et tout particulièrement dans les régions à climat chaud comme l'Algérie (Mantle, 2002; Hocking et Fitt, 2003). Ainsi, la plupart des enquêtes menées dans ces régions ont mis en évidence la prédominance des espèces fongiques du genre *Aspergillus* dans les céréales (Riba, 2008). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés sur les grains de céréales et d'autres graines (Varga *et al.*, 1996; Berghofer *et al.*, 2003; Accensi *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2007), notamment le riz (Nguyen, 2007).

Tandis que, les résultats obtenus par la méthode des grains montrent la dominance de genre *Penicillium* (58,2%) suivi par *Aspergillus* (38,2%). La méthode directe est la méthode préférée pour détecter, évaluer et isoler des mycètes des nourritures particulières telles que des grains et des noix. Dans cette méthode, des particules de nourriture sont placées

directement sur des milieux. Ce processus est plus efficace pour étudier la qualité mycologique inhérente, et permet également une bonne évaluation de la présence potentielle des mycotoxines (Nguyen, 2007). D'une façon globale, on peut dire relativement que la méthode d'ensemencement direct des grains c'est une méthode complémentaire, lorsqu'elle représente la flore fongique superficielle des grains et permet d'obtenir un résultat sur la contamination, si nous n'avons pas une propagation par la méthode de dilution.

En outre, la dominance d'*Aspergillus* section *Flavi* (par la méthode de dilution avec un taux de 90,2% et par la méthode des grains avec un taux de 54,1%) par rapport aux autres sections d'*Aspergillus* identifiées dans le riz analysé, est signalée dans les études menées dans les régions à climat chaud, les espèces de cette section sont les plus fréquemment isolées dans les graines de céréales (Riba, 2008). *Aspergillus flavus* est l'espèce type de cette section, elle 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). C'est un agent principale qui provoque la production d'aflatoxine de type B seulement.

Une grande distinction a été observée dans la densité de la flore fongique au sein des échantillons de riz de même origine. Ce balancement n'est pas lié à un paramètre particulier. En effet, la qualité du grain après récolte est influencée par une large variété de facteurs biotiques (microflore, insectes, acariens et rongeurs) et abiotiques (températures, humidité, activité de l'eau, etc.) (Riba, 2008). Le grain stocké est lui-même considéré comme un écosystème particulier (Magan et Aldred, 2005).

Généralement, les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont des contaminants typiques des céréales de stockage. Dans les mauvaises conditions de stockage, ces champignons peuvent évoluer et devenir des parasites (El khoury, 2007). L'étude des conditions de stockage de nos échantillons de riz a montré que la température de conservation de ces grains est située entre 20 et 27°C, avec un taux d'humidité de 12,4 à 12,5%, ces deux paramètres probablement favorisent la multiplication des champignons de stockage. Selon Pfohl-Leszkowicz (1999), les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables se développer à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, et selon Benmansour-Brixi (2005), les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant 10 à 18% d'humidité, avec un optimum de croissance compris entre 11 et 13%. Ainsi la conservation de riz dans des sacs

perméable pourrait probablement être un facteur de contamination, puisque ces derniers sont en contact direct avec l'humidité de l'aire. En outre, les fréquences de la distribution des champignons selon les années de stockage montrent que la durée de conservation de nos échantillons de riz probablement n'est pas un facteur principal de la contamination, ou peut être le nombre des échantillons analysés n'est pas représentatif.

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 si les isolats sont analysés par HPLC avec un seuil de détection plus sensible. Ribot *et al.* (2010) ont montré que le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes calculé sur milieu CAM et par HPLC est de 30 et 72%, respectivement.

Dans cette étude, nos résultats relatifs à la production d'aflatoxine révèlent la présence d'aflatoxine de type B1 et B2 uniquement. Ce résultat montre que le producteur de ces deux types est l'*Aspergillus flavus*. L'absence d'aflatoxine de type G (montré par la méthode de CCM) et relativement en relation avec l'absence de *A. parasiticus* et *A. nomius* dans tous les échantillons de riz analysés. Selon Matmoura (2008) *Aspergillus parasiticus* est rencontrée plutôt dans les arachides, mais est rarement rencontrée dans les autres denrées. Elle est plus limitée géographiquement par rapport à *A. flavus* (Frisvad *et al.*, 2004).

La contamination par les isolats aflatoxinogènes des échantillons de riz analysés est enregistrée par une forte fréquence dans les échantillons de stocke 2011 et 2013, contrairement aux échantillons de stocke de 2010 et de 2012 qui ont des taux de production d'aflatoxine B très faible. Cette hétérogénéité peut être expliquée probablement par la contamination initiale de produit et la variation dans les conditions de stockage. Ainsi d'après Nguyen (2007), Le niveau de contamination du riz par ces mycotoxines est fortement influencé par les saisons au cours de l'année. La saison des pluies constitue un facteur de risque favorisant le développement de l'AFB1.

A l'inverse des autres mycotoxines l'OTA est présente en plus grande quantité lors de la saison sèche comparé à la saison humide (Nguyen, 2007), celui-ci explique les résultats relatifs à la production d'OTA de nos échantillons. En effet une faible fréquence est enregistrée dans le riz stocké depuis 2012 et 2013, tandis qu'une absence totale d'ochratoxine est marquée dans les stocks de 2010 et 2011. Selon Riba (2008), les principales espèces impliquées dans la production d'OTA dans le blé algérien sont surtout *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A.*

carbonarius, et à un degré moindre *A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor* et *Penicillium verrucosum*. Ceci s'explique sans doute par le fait que les agents responsables de la formation d'OTA sont différents. Dans les régions chaudes les producteurs d'OTA appartiennent au genre *Aspergillus* alors que dans le Nord de l'Europe il s'agit plutôt du genre *Penicillium* (Nguyen, 2007). En outre, dans notre travail la seule productrice d'OTA dans le riz stocké est l'*Aspergillus* section *Terrie* qui est isolée dans les échantillons de 2012 et 2013. La production d'OTA par *A. terreus* a été rapportée par Ueno *et al.* (1991), Riba (2008) et Azzoune (2010).

Il faut souligner que la capacité de production *in vitro* par certaines souches ne traduit pas obligatoirement les mêmes capacités *in vivo*. En effet, il peut y avoir des souches capables de produire la mycotoxine dans les conditions naturelles mais pas dans les conditions de laboratoire et inversement (Mantle, 2002; Medina *et al.*, 2005).

En résumé, la contamination d'échantillons de riz originaire de l'USA (stocké au niveau de CCLS de Blida) par l'AFB et l'OTA est signalée au si dans les travaux réalisés sur le riz commercialisé aux cinq provinces de la région centrale du Vietnam, par Nguyen (2007). Nos échantillons ont révélés une forte contamination par l'AFB par rapport à l'OTA. La distinction entre la fréquence de production d'AFB et d'OTA dans le riz et les différents produits céréaliers est sous l'influence de nombreux facteurs biotiques et abiotiques composant « l'écosystème » du grain. Mais il est généralement admis que plus le taux initial de la contamination par des espèces toxigènes est important et plus les risques d'imprégnations toxiques sont élevés.

**CONCLUSION
ET PERSPECTIVES**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés mais seuls une trentaine possèdent de réelles propriétés toxiques préoccupantes. Parmi ces trentaines, les plus toxiques sont l'aflatoxine B1 et l'ochratoxine A produites par différentes espèces fongiques du genre *Aspergillus* et *Penicillium*. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier la flore fongique et les espèces aflatoxinogènes et ochratoxinogènes appartenant au genre *Aspergillus* qui contamine le riz stocké au niveau de la coopérative des céréales et des légumes sec (CCLS) de Blida.

Les résultats analytiques de la flore fongique obtenus par les deux méthodes utilisées pour l'isolement et le dénombrement des champignons montrent que la majorité des échantillons sont contaminées principalement par les genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Ceci affirme le statut de flore de stockage de ces deux genres fongiques. La méthode de dilution démontre une forte contamination par le genre *Aspergillus* (69,5%) suivi par le genre *Penicillium* (24,9%), nous avons également noté la dominance d'*Aspergillus* sections *Flavi* avec un taux de 90,2% du genre *Aspergillus* et à un degré moindre en *Aspergillus* section *Terrei* (2%) et *Fumigati* (7,8%). Tandis que, la méthode des grains confirme la dominance de genre *Penicillium* avec un taux de 58,2% suivi par le genre *Aspergillus* 38,2%, la section *Flavi* été isolé ainsi par ce méthode avec une fréquence très élevé (54,1%) par apport aux sections *Terrei* (26,2%) et *Nigri* (19,7%).

La mise en évidence du pouvoir producteur d'aflatoxines (AFs) par détection de la fluorescence sur milieux de culture à base d'extrait de noix de coco, a permis de montrer que cette technique, qui présente l'avantage d'être simple et moins coûteuse, est aussi performante que la détection par CCM. Ainsi, on peut préconiser l'utilisation du milieu à l'extrait de noix de coco comme méthode rapide de détection des isolats producteurs d'AFs tout en tenant compte du seuil de détection. Cependant, la CCM et l'HPLC peuvent être utilisées pour la quantification et la confirmation des résultats obtenus sur milieu à base d'extrait de noix de coco.

Nos résultats ont montré que près de 44,1% des isolats appartenant à *Aspergillus* section *Flavi* produisent les aflatoxines. Les quantités de production des 6 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* testés par HPLC varient entre 5,6 et 10639,8 ppb. Les résultats relatifs à la production d'ochratoxine A par CCM ont montré que près de 26,5% des isolats appartenant au genre *Aspergillus* section *Terrie* (*A. terreus*) produisent cette mycotoxine.

A la lumière de ces résultats, nous pouvons dire qu'*Aspergillus* section *Flavi* et *Terrie* constituent les principales sources d'aflatoxines et d'ochratoxines respectivement, dans les échantillons de riz analysés.

La contamination par les isolats aflatoxinogènes et ochratoxinogènes des échantillons de riz analysés donne des fréquences différentes d'un stocke à l'autre. En effet, 10 sur 23 échantillons sont contaminés par l'aflatoxine B. tandis que, 5 sur 23 échantillons (de stocke 2012 et 2013 seulement) sont touchés par l'ochratoxine A.

Sur le plan de la sécurité sanitaire des aliments, notre travail est une contribution à une analyse des risques liés à la contamination du riz noté par les aflatoxines et l'ochratoxine A en Algérie. Avant toute extrapolation de nos résultats, il faut noter que ce travail est une étude préliminaire ne représentant pas une large gamme de situations. Pour cela, il serait intéressant, en perspective, d'effectuer les travaux suivants:

- Elargir la gamme de aliments à analyser (produits à base de riz, produits destinés aux enfants et aux hébés...);
- Rechercher d'autres toxine pour réactualiser les connaissances sur la contamination des aliments algériens par les mycotoxines ;
- Etudier l'influence des conditions de stockage (température, humidité, composition en gaz) sur les champignons toxigènes et la production des mycotoxines ;
- Appliquer les techniques moléculaires dans l'optique de mieux connaître la diversité génétique des isolats toxigènes.

Au plan préventif, il convient d'émettre un certain nombre de recommandations pour réduire les risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation :

- Au niveau de champ : c'est le premier stade de contamination de riz par les champignons toxigènes, qui sont développés au moment de stockage ultérieur de ces grains, si les

conditions sont favorables. Pour cela il faut réduire les seuils de contamination au champ par les applications suivantes :

- Attaquer les insectes: les grains endommagés par les insectes facilitent l'infestation par des champignons comme *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*.
 - Utilisation d'antifongiques: c'est un traitement efficace pour réduire le niveau de contamination en moisissures.
- Pendant le stockage : le riz, c'est une plante non cultivée en Algérie, mais il est importé en notre pays et stocké dans des coopératives spéciales de la conservation des céréales. Pour éviter l'altération de ces grains par les champignons toxigènes, il faut appliquer les bonnes pratiques de conservation en contrôlant trois principaux facteurs: la température, la teneur en eau du grain (a_w), la durée du stockage. Ces facteurs influencent la croissance de la flore (microorganismes et insectes) présente sur le grain. Il est préconisé de respecter certaines normes telles que:
 - la teneur en eau, qui doit être inférieure à 14%;
 - L'élimination de diverses impuretés (grain étranger, grains avariés)
 - Le contrôle régulier de la température tout en évitant les élévations trop importantes en utilisant des systèmes de ventilations
 - L'irradiation : des études récentes ont prouvé que la technologie des rayonnements s'avère efficace, pour l'élimination des mycotoxines éventuellement présentes dans les denrées alimentaires.

L'application de bonnes pratiques agricoles et d'hygiène au stade de la production, de la transformation et de la distribution des denrées alimentaires, améliore la sécurité sanitaire des aliments tout en réduisant les pertes de produits, contribuant ainsi à accroître les approvisionnements et la sécurité alimentaire au niveau national et international.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Références

- **Accensi, F.; Abarca, M.L. et Cabanes, F.J. 2004.** - Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce OTA. *Food Microbiology*, **21**, 623–627.
- **Adams, M.R. et Moss, M.O. 2002.** - Toxingenic fungi. In “Food microbiology”. RSC, UK, 282-301.
- **AFSSA (Association Française de Santé et Sécurité Alimentaire). 2009.** Evaluation de risque liées à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale, coordination rédactionnelle : Jean Marc Fremy, coordination éditoriale : Carole Thomann ; 46, 47.
- **AFSSA (Association Française de Santé et Sécurité alimentaire). 2003.** – Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003.
- **Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. et Blackwell, M. 1996.** - Introductory Mycology. 4th ed. New York, John Wiley and Sons, Inc.
- **A.O.A.C, 2000.** - Association of Official Analytical Chemists. 17th end, 2000 Chapter 49, subchapter 1 Mycotoxins/subchapter 2 Aflatoxins.
- **A.O.A.C, 1995.** - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods 973.37 et 975.38 (16th ed. pp. 1–32). Arlington, Virginia, USA.
- **Arino, A., Juan, T.; Estopanan, G. et Gonzales-Cabo, J.F. 2007.** - Natural Occurrence of *Fusarium* species, Fumonisin Production by Toxingenic Strains, and Concentrations of Fumonisins B1 and B2 in Conventional and Organic Maize Grown in Spain, *J. Food Prot.*, **70** (1), 151-156.
- **Azzoune, N. 2010.** - Etude des populations du genre *Aspergillus* et de leurs mycotoxines isolée des épices et des légumes secs. Option: Biochimie et Microbiologie Appliquée. p109.
- **Baliukoniene, V.; Bakutis, B. et Stankevicius, H. 2003.** - Mycological and Mycotoxicological evaluation of grain, *Ann. Agric. Environ. Med.*, **10**, 223–227.

- **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.
- **Benmansour-Brixi, G.N. 2005.** - Étude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs physiques sur l'aflatoxinogénèse. Thèse de magister de biologie, Université de Djillali liabes de Sidi Bel Abbés, p241.
- **Berghofer, L.K.; Hocking, A.D.; Miskelly D. et Jansson E. 2003.** - Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, **85**, 137–149.
- **Botton, B. ; Breton, A. ; Fèvre, M. ; Gauthier, S. ; Guy, P. ; Harpen, J.P. ; Raymond, P. ; Sanglier, J.J. ; Vayssier, Y. et Veau, P. 1990.** - Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris.
- **Bullerman, L.B. Bianchini, A. 2007.** - Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.*, 119, 140-146.
- **Calvo, A.M.; Bok, J.; Brooks, W. et Keller, R.P. 2004.** - *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4733–4739.
- **Castegnaro, M. et Pichl-Ležkovic, A. 2002.** - Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, *dans la sécurité alimentaire du consommateur*.
- **Chapelud-Eclec, F. ; Papon, N. ; Noël, T. et Villard, J. 2005.** - Moisissures et risques alimentaires (mycotoxines). *Revue Française des laboratoires*, 373.
- **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.
- **Cirad (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement). 2002.** - Le riz qui nourrit le monde. Article sous la coordination de Anne Hébert Pascale et Ammar-Khodja, avec la collaboration des chercheurs du programme Plantes annuelles du Cirad.

- **Cole, R.J. et Cox, R.H. 1981.** - Handbook of Toxic Fungal Metabolites, New York, Academic Press.
- **Cotty, P.J. ; Bayman, P. ; Egel, D.S et Elias, D.S. 1994.** - Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. : 127 In : POWELL,K.A.; FENWICK, A. & PEBERDY,J.F. (Eds) "Diagnosis of Mycotoxicoses of "Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- **Courtois ,B. 2006 .** - Une brève histoire de l'amélioration génétique du riz Cirad, UMR1096, TA40/03, 34398 Montpellier Cedex 5, France.
- Davis, N. D. ; Iyer, S. K. et Diener, U. L. 1987.** - Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**, 1593–1595.
- **D'Mello et Mcdonald, A.M.C. 1997.** - Mycotoxins, *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.
- **Doré T., Le Bail M., et Verger P. 2002.** - Pratiques agricoles et sécurité sanitaire des aliments en production végétale. *Cahiers Agricultures*, **11**(13) 177–185.
- **Dukerschein T. et Langrehr H., 2000.** Distribution of wild rice (*Zizania aquatica* L.) before and after the flood of 1993 in Pool 8 of the Upper Mississippi River.
- **Dunkel, F.V. 1988.** - The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. *Int. food Microbiol*, **7** 227-24.
- **El Khoury 2007.** - Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B₁ (AFB₁) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Spécialité : Génie des procédés et de l'environnement. P200.
- **Eskola, M. 2002.** - Study on trichothecenes, Zearalenone and Ochratoxin A in finnish cereals: Occurrence and Analytical Techniques, Academic dissertation.
- **Etcheverry, M.; Nesci, A.; Barros, G.; Torres, A.et Chulze S. 1999.** - Occurrence of *Aspergillus* section *flavi* and aflatoxin B₁ in corn genotypes and corn meal in Argentina, *Mycopathologia*, 147 (1), 37-44

- **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.
- **Fente, C. A. ; Ordaz, J. J. ; Vazquez, B. I. ; Franco, C. M. et Cepeda, A. 2001.** - New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(48), 58–62.
- **Frisvad, J.C. et Samson, R.A. 2004.** - *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing stérigmatocystine and aflatoxin B1. *System Applied Microbiology*, **27**, 672–680.
- **Gao, J. ; Liu, Z. et Yu, J. 2007.** - Identification of *Aspergillus* section *Flavi* in maize in northeastern China. *Mycopathologia*, **11**, 91–95.
- **Ghiasian ,S.A.; Kord-Bacheh ,P.; Rezayat, S.M.; Marzouq, A.H. et Taherkhani H. 2004.** - Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000, *Mycopathologia*, **158** (1), 113-121.
- **Guarro, J.; Gené, J. et Stchigel A.M. 1999.** - Developments in fungal taxonomy. *Clinical and Microbiological Review*, **12** (3), 454–501.
- **Gourama , H. et Bullerman, L.B. 1995.** - *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, aflatoxigenic fungi of concern in foods and feed – a review. *Journal of Food Protection*, **58**, 1395–1404.
- **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*.
- **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.

- **I.S.O (International Organization for Standardization). 1987.** - Microbiology-General guidance for enumeration of yeast and moulds-Colony count technique at 25°C International Standard 11-2. ISO 7954.
- **Ito, Y.; Peterson, S.W.; Wicklow, D.T. et Goto, T. 2001.** - *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi* . *Mycological Research*, **105**, 233-239.
- **Janardhana ,G.R.; Raveesha, K.A. et Shetty H.S. 1999.** - Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India), *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 863-868.
- **Jard, G. 2009.** Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales : Absorption et Biotransformation (page 17).
- **King, A.D.; Hocking, A.D. et Pitt, J.I. 1979.** - Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, 959-964.
- **KOBRA Cell. 2005.** - Cellule électrochimique pour la dérivation des aflatoxines par HPLC. R- Biopharm, France.
- **Kpodo, K.; Thrane, U. et Hale B. 2000.** - Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins, *Int. J. Food Microbiol.*, **61** (33), 147-157.
- **Krysinska-Tracz, E.; Kiecana, I.; Perkowski, J. et 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.
- **Manti, P.G. 2002.** - Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **50**, 143-146.
- **Matmoura, A. 2010.** - Recherche des *Aspergillus* aflatoxinogènes et des aflatoxines dans les arachides et les fruits secs commercialisés en Algérie. Diplôme de magister en microbiologie (102). Option microbiologie appliquée.
- **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.

- **Medina, A.; Valle-Algarra, F.M.; Mateo, R.; Gimeno-Adelantado, J.V.; Fernando Mateo F. et Jiménez M. 2006.** - Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*, *Int J Food Microbiol*, 108 (2), 196-203.
- **Medina-Martinez, M.S.; Martinez, A.J. 2000.** - Mold occurrence and aflatoxin B (1) and Fumonisin B (1) determination in corn samples in Venezuela, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (7), 2833-2836.
- **Miller, J.D. et Trenholm, H.L. 1994.** - Mycotoxins in grain, compounds other than aflatoxin. Eagan press, St Paul, Minnesota, USA.
- **Nguyen, M.T., 2007.** - Identification des espèces de moisissure, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Spécialité: Génie des procédés et de l'environnement. p 37, 38.
- **Olivier, P. 2007.** - Bases moléculaires de la voie de biosynthèse de la patuline, mycotoxine produite par *Byssochlamys nivea* et *Penicillium griseofulvum*, p 2.
- **Ono, E.Y.; Sugiura, Y.; Homechir, M.; Kamogae, M.; Vizzoni, E.; Ueno, Y. et Hirooka E.Y. 1999.** - Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, 147 (3), 139-148.
- **OMS, (Organisation Mondiale pour la Santé). 2002.** - Evaluation de certaines mycotoxines dans les aliments. Rapport de la cinquante-sixième réunion du comité FAO OMS d'experts des additifs alimentaires. Série de rapports technique de l'OMS no 906, Organisation mondiale de la santé (OMS), Genève, Suisse.
- **Parenicova, L. ; Skouboe, P. ; Samson, R. A. ; Rossen, L. et Visser, J. 2000.** - Genotypic and phenotypic variability among black Aspergilli. In: Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds), Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. (pp 413-424). Harwood Academic Publishers, Amsterdam the Netherlands.
- **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.

- **Peterson, S.W. 2000.** - In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification*, Harwood Academic, The Netherlands pp. 163–178.
- **Pfohl-Leschkovicz, A. 1999.** - *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion de risque*, p 4, 5.
- **Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997.** - *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.
- **Raper, K.; Fennell, D.J. 1965.** - *The genus *Aspergillus**, Williams and Wilkins editors, Baltimore.
- **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. 2008.** -Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans la filière céréales en Algérie. Option: microbiologie. Soutenu le 13/12/2008 à l'UMMTO, Algérie. p 155, 135, 136.
- **Roquebert, M.F. 1998.** - Taxonomie de moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification , in "*Moisissures des aliments peu hydratés*", Ed. Tec & Doc, 39-95.
- Samson, R.A.; Hocking, S.B. et Frisvad, J.C. 2006.** - Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, **44**, 133–148.
- Scudamor, K.A. et Livesey, C. 1998.** - Occurrence and significance of mycotoxins in forage corn and silage: a review. *J. Sci. Food Agri*, **77**, 1-17.
- Smith J.E. et Moss M.O. 1985.** - *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*, John Wiley et Son, Chichester.
- **Sinha, R.N., Wallace, H.A.H, et Chebib, F.S. 1969.** - Principal-component analysis of interrelations among fungi, mites and insects in grain bulk ecosystem. *Ecology*, **50**, 536-547.
- **Sinha, R.N. 1961.** - Insects and mites associated with hot spots in farm stored grain. *Can. Entomol*, **93**, 609-621.

- **Tabuc, T. 2007.** - Flor fongique de différents substrats et condition optimale de production des mycotoxines. Spécialité : Pathologie, Mycologie, Génétique et Nutrition, p 12, 14, 26, 66.
- **Tran, Sy Tung, Bailly J.D. ; Querin, A. ; Le Bars, P. et Guerre, P. 2001.** - Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice, *Rev. Méd. Vét.*, 152, 7, 555-560.
- **Trucksses, M.W.; Giler, J.; Young, K.; Whitw, K.D. et Page, S.W. 1999.** - Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee, *J.A.O.A.C.*, 82 (1), 85-89.
- **Ueno, Y.,; Kawamura, O.; Sugiura,Y.; Horiguchi, K.; Nakajima, M.; Yamamoto, K. et Sato, S. 1991.** - Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. In: Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I. N. and Bartsch, H., (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours*, (pp 71-75). IARC-Science Publ., Lyon, France.
- **Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie J. et Scott B. et Theron J.J. 1965.** - Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Willh. *Nature*, 205, 1112- 1113.
- **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*, 11, 29-34.
- www.thegourdserv.com/mold/mto.shtml
- **Wilson, P.M. ; Mubatanhema, W. et Jurjevic Z. 2002.** - Biology and ecology of mycotoxicogenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns, *Advances Experimental and Medical Biology*, 504, 3-17.
- **World Rice Statistics .2005.** - IRRI, Los Baños, Philippines, [http:// www.irri.org/science/ricestat/](http://www.irri.org/science/ricestat/)
- **Wogan, G.N. 2000.** - Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Seminars in Cancer Biology*, 10(3), 201-210.
- **Zinedine,A. ; Idrissi, L. 2007.** - Presence et réglementation des mycotoxines dans les aliments au maroc : situation actuelle et perspectives.

ANNEXES

ANNEXE I

Tableau 16. Les milieux des cultures utilisés.

Milieu de culture	Composition de milieu
Milieu d'isolement DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol Agar) (King <i>et al.</i>, 1979)	Glucose.....10 g Peptone5 g KH ₂ PO ₄1 g MgSO ₄ , 7H ₂ O.....0,5 g Rose Bengale.....25 mg Dichloran (2, 6 dichloro-4-nitroaniline).....2 mg Chloramphénicol.....100 mg Agar15 g Eau distillée.....1000 ml PH final 5,6 ± 0,2 - Le rose Bengal 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 additionné 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) (Raper et Fennell, 1965)	Pomme de terre200 g Agar15 g Glucose20 g Eau distillée.....1000 ml pH final 5,6 ± 0,2
Milieu à base d'extrait de noix de coco gélosé (Coconut Agar Medium) (CAM) (Davis <i>et al.</i>, 1987)	Cent grammes (100 g) de la noix de coco déchiquetée sont homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée portée à ébullition. Le mélange est filtrée 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 20 g 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 CZA (Czapek Yeast Extract Agar) (Pitt et Hocking, 1997)	Saccharose30 g Extrait de levure5 g Czapek concentré10 ml K ₂ HPO ₄1 g Agar15 g Eau distillée1000 ml pH final= 6,2 ± 0,2
Milieu Czapek concentré (Pitt et Hocking, 1997)	NaNO ₃30 g KCl5 g MgSO ₄ , 7H ₂ O5 g Fe SO ₄ , 7H ₂ O0,1 g Zn SO ₄ , 7H ₂ O0,1 g Cu SO ₄ , 5 H ₂ O0,05 g Eau distillée100 ml

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

ANNEXE II

1. les appareils

Les appareils utilisés dans cette étude sont écrites dans le tableau suivant :

Tableau 17. Les appareils utilisés.

Appareil	Marque
Mixeur	/
Agitateur	Yellow, line
PH-mètre	HANNA, instruments
Autoclave	/
Etuve	Memmert
Microscope optique	MOTIC, type 102 M
Micro-onde	KINWOOD
Balance	KERN, ABJ
UV radiation	CN-6, vilber-lourmat
Centrifugeuse	SIGMA
Micro-seringue	HAMILTON (THE MEASURE OF EXCELLENCE)

2. Les solvants

Méthanol, éthanol, chloroforme, acétone, toluène, éthyle acétate, acide formique à 90 %.

ANNEXE III

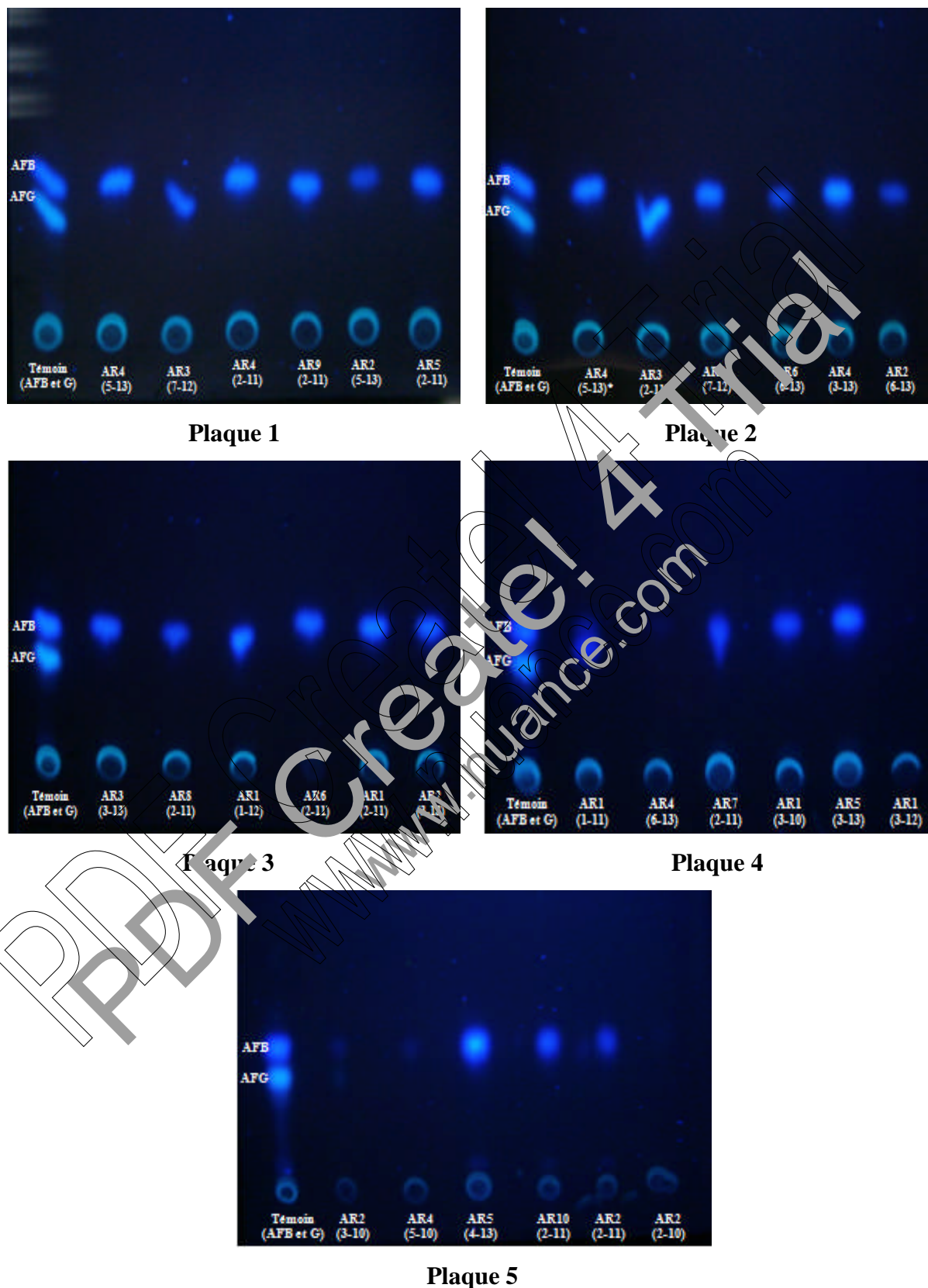


Figure 23. Résultats de la chromatographie sur couche mince des isolats aflatoxinogènes de section *Flavi*.

ANNEXE IV

Résultats de l'évaluation du pouvoir producteur d'AFs et d'OTA chez toutes les souches testées.

Tableau 18. Résultats de l'évaluation du pouvoir producteur d'AFs chez tous les isolats *Aspergillus* section *Flavi*.

Isolat	Détection sur CAM	Confirmation par CCM	Isolats	Détection sur CAM	Confirmation par CCM
AR ₁ (1-10)	-	-	AR ₄ (2-11)	++	++
AR ₂ (1-10)	-	-	AR ₅ (2-11)	±	++
AR ₃ (1-10)	-	-	AR ₆ (2-11)	+	++
AR ₂ (2-10)	-	-	AR ₇ (2-11)	-	++
AR ₃ (2-10)	-	-	AR ₈ (2-11)	+	++
AR ₄ (2-10)	-	-	AR ₉ (2-11)	±	+++
AR ₉ (2-10)	-	-	AR ₁₀ (2-11)	±	++
AR ₁₀ (2-10)	-	-	AR ₁₁ (2-11)	+++	+++
AR ₁₁ (2-10)	-	-	AR ₁ (2-12)	-	-
AR ₁ (3-10)	±	++	AR ₂ (2-12)	-	-
AR ₂ (3-10)	±	±	AR ₃ (2-12)	-	-
AR ₅ (3-10)	-	-	AR ₄ (2-12)	-	-
AR ₇ (3-10)	-	-	AR ₁ (3-13)	-	-
AR ₁ (4-10)	-	-	AR ₂ (2-12)	-	-
AR ₂ (4-10)	-	-	AR ₃ (7-12)	+	+++
AR ₃ (4-10)	-	-	AR ₁₀ (1-13)	-	-
AR ₄ (4-10)	-	-	AR ₂ (2-13)	-	-
AR ₅ (4-10)	-	-	AR ₂ (3-13)	+	++
AR ₁ (5-10)	-	-	AR ₃ (3-13)	±	++
AR ₂ (5-10)	-	-	AR ₄ (3-13)	+	++
AR ₃ (5-10)	-	-	AR ₅ (3-13)	±	++
AR ₄ (5-10)	±	±	AR ₃ (4-13)	-	-
AR ₅ (5-10)	-	-	AR ₄ (4-13)	-	-
AR ₆ (5-10)	-	-	AR ₅ (4-13)	±	+++
AR ₇ (5-10)	-	-	AR ₂ (5-13)	±	+
AR ₈ (5-10)	-	-	AR ₄ (5-13)	±	+++
AR ₁ (1-11)	+	++	AR ₂ (6-13)	+	++
AR ₁ (2-11)	++	++	AR ₄ (6-13)	±	±
AR ₂ (2-11)	±	+	AR ₆ (6-13)	+	+
AR ₃ (2-11)	++	+++			

+++ : fluorescence très intense; ++ : fluorescence intense; + : fluorescence faible ; ± : fluorescence très faible ; - : absence.

Tableau 19. Résultats de l'évaluation du pouvoir producteur d'OTA chez tous les isolats *Aspergillus* section *Fumigati*, *Nigri* et *Terrei*.

Isolat	Section	Confirmation par CCM	Isolat	Section	Confirmation par CCM
AR ₁ (2-10)	<i>Fumigati</i>	-	AR ₁ (5-12)	<i>Terrie</i>	-
AR ₅ (2-10)	<i>Nigri</i>	-	AR ₂ (5-12)	<i>Terrie</i>	-
AR ₇ (2-10)	<i>Fumigati</i>	-	AR ₃ (5-12)	<i>Terrie</i>	+
AR ₃ (3-10)	<i>Nigri</i>	-	AR ₁ (6-12)	<i>Terrie</i>	-
AR ₆ (4-10)	<i>Nigri</i>	-	AR ₅ (1-13)	<i>Nigri</i>	-
AR ₂ (1-12)	<i>Nigri</i>	-	AR ₆ (1-13)	<i>Nigri</i>	-
AR ₃ (1-12)	<i>Nigri</i>	-	AR ₈ (1-13)	<i>Nigri</i>	-
AR ₄ (1-12)	<i>Terrie</i>	+	AR ₆ (2-13)	<i>Terrie</i>	-
AR ₅ (1-12)	<i>Nigri</i>	-	AR ₁ (2-13)	<i>Fumigati</i>	-
AR ₆ (3-12)	<i>Terrie</i>	-	AR ₃ (2-13)	<i>Fumigati</i>	-
AR ₇ (3-12)	<i>Fumigati</i>	-	AR ₄ (2-13)	<i>Fumigati</i>	-
AR ₁ (4-12)	<i>Nigri</i>	-	AR ₁ (3-13)	<i>Fumigati</i>	-
AR ₃ (4-12)	<i>Terrie</i>	+	AR ₁ (6-13)	<i>Fumigati</i>	-
AR ₄ (4-12)	<i>Terrie</i>	+	AR ₃ (5-13)	<i>Terrie</i>	±
AR ₅ (4-12)	<i>Terrie</i>	+	AR ₃ (5-13)	<i>Terrie</i>	+
AR ₆ (4-12)	<i>Terrie</i>	±	AR ₂ (6-13)	<i>Nigri</i>	-
AR ₈ (4-12)	<i>Terrie</i>	+	AR ₂ (7-13)	<i>Fumigati</i>	-

+ : fluorescence faible ; ± : fluorescence très faible ; - : absence.