

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

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE
CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude

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

Sujet

**RECHERCHE DES CHAMPIGNONS DU GENRE
ASPERGILLUS PRODUCTEURS D'AFLATOXINE ET
D'OCHRATOXINE A DANS L'ALIMENTATION DE
LA VACHE LAITIÈRE EN ALGERIE**

Soutenu le : 23/10/2014

Réalisé par : M^{elle}. MIHOUBI Amina

Devant le jury composé de :

M ^{elle} Meklat A.	M.C.A	USD Blida	Président
M ^{elle} Matmoura A.	M.A.A	USD Blida	Examinatrice
M ^{me} ZEBIRI S.	M.A.A	ENS Kouba	Examinatrice
M ^{me} BOUTI K.	M.A.A	ENS Kouba	Promotrice

Promotion : 2013- 2014

Remerciement

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.** Mes sincères remerciements pour son accueil bienveillant au sein de laboratoires, pour la confiance qu'il m'a constamment témoignée et de m'avoir donné la chance d'accomplir ce mémoire. Mes remerciements vont en particulier à :

Madame **Bouti karima.** ; maîtres assistante A à l'ENS de Kouba pour m'avoir suivi de très près tout au long de ma partie expérimentale et qui m'a appris les méthodes d'analyse nécessaires de laboratoire pour ce travail. Je la remercie vivement pour son soutien, et pour le fait de m'avoir fait partager son expérience. et mes remerciements les plus vifs pour toute l'intention particulière qu'elle a porté à la rédaction de ce mémoire, pour son soutien, sa gentillesse, ses encouragements et sa sympathie.

Madame **Meklat A.** ; maître conférences 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 **Matmoura A.** ; maître assistante A à l'USD de Blida et madame **Zebiri S.** ; maître assistante A à l'ENS de Kouba, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie également Monsieur **Riba A.** ; maître de conférences A à l'Université de Boumerdès.

Monsieur **Mahdi A.** ; maître de conférences à l'ENS de Kouba.

Je voudrais également remercier : **Mme Houchati Z , M. Toumatia O, Mme Khebizi Noura**

Je souhaiterais également remercier mes autres collègues magistérants: **Reghioui H, Lahoum A, DIF G, Tata S, Laassami A, Bouznada K et Chaabane chaouch F.**

Je remercie toute l'équipe de l'Unité Aliment du Bétail d'Alger- Kouba (UAB) du directeur Monsieur **Aroudj** jusqu'à le dernier travailleur, pour sa gentillesse et sa collaboration, toute l'équipe de l'Office National de Alimentation de Bétail de Hatatba – Blida (ONAB) du directeur Monsieur **Seddiki** et (ONAB-TRADE) Unité laboratoire de

Alger- Kouba du directrice de l'unité **Mme Benacer S. et** chef département de l'unité **Mme Ragam.**

Et remercions également Directeur adjoint **Mme Mansouri W. de la Coopérative des Céréales et des Légume Secs (CCLS) de Afroun- Blida**, pour l'orientation, de conseil.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents, que dieu les garde pour moi, qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leurs grand soutien et leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voir réussir

Mes sœurs : Nabila, Fatima et Khadija

Mes frères : Abdelkarim, Ismail, Mohamed, Ibrahim et Bilal.

Les fleurs de la famille : Zakaria, Hamza, Manel, Israa, Rouaa Rinad, Hadil, Heil, Louai, et Mouad.

Ma grande famille.

Mes amis : Amina, Amina, Rima.

Les étudiants de Microbiologie et Toxicologie Alimentaire.

A tout ceux qui j'aime...

Amina .

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AFB1: Aflatoxine B1.

AFs: Aflatoxines.

AFSSA: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

AIRC : Agence Internationale de Recherches sur le Cancer.

AOAC: Official Methods of Analysis

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.

DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphénicol Agar.

ENS: Ecole Normale Supérieure

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.

NEB : Néphropathie Endémique des Balkans.

O.M.S : Organisation Mondiale pour la Santé.

ONAB : Office National d'alimentation de Bétail.

OTA: Ochratoxine A.

PDA: Potato, Dextrose, Agar.

SDG: Sarl Diam Grain.

UAB: Unité d'Aliment de Bétail.

UV: Ultra-Violet.

VL : Vache Laitière.

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 01. Les principales mycotoxines et les conditions d'apparition.....	04
Tableau 02. Répercussion possibles des différentes mycotoxines chez les ruminants.....	15
Tableau 03. Les <i>Aspergillus</i> producteurs de mycotoxines.....	23
Tableau 04. Présence des <i>Aspergillus</i> dans les céréales des différents pays.....	29
Tableau 05. Dates des prélèvements, poids, nombre et origine des échantillons de la matière première et d'aliment composé prélevés.....	36
Tableau 06. Taux de l'humidité relative et nombre des échantillons analysés.....	44
Tableau 07. Le pH de différents échantillons de matière première et aliment composé.....	44
Tableau 08. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés dans la matière première et l'aliment composé par la méthode dilution.....	46
Tableau 09. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés dans la matière première par la méthode directe.....	48
Tableau 10. Les isolats aflatoxinogènes appartenant au genre <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	61
Tableau 11. La Distribution des isolats ochratoxinogènes appartenant à section <i>fumigati</i> , <i>Nigri</i> , <i>Terrie</i> et <i>Clavati</i>	65
Tableau 12. Résultat du pH des différents échantillons de matière première et l'aliment composé.....	91

INDEX DES FIGURES

Figure 01. Les conditions toxino­gènes.....	06
Figure 02. Structures chimiques des 4 AFs (B1, B2, G1, G2, M1, et M2).....	08
Figure 03: Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie.....	12
Figure 04. Caractères micro-morphologiques du genre <i>Aspergillus</i>	25
Figure 05. Le stockage d'aliment composé farine dans des sacs en carton au niveau d'UAB d' Alger (à gauche) préparés pour la commercialisation, et Tourteaux de soja en vrac à SDG de Blida (à droite).....	30
Figure 06. Méthode de prélèvement a l'aide une sonde, des échantillons mis dans des sacs étiquetés et acheminés au laboratoire (LBSM).....	32
Figure 07. Fabrication de produit fini, sous forme de farine (moulu).....	33
Figure 08. Fabrication de produit fini, sous forme granulé.....	33
Figure 09. Stockage de matière première dans des silos (maïs et orge).....	34
Figure 10 : Représentation schématique des échantillons de (Matière première et l'aliment composé).....	35
Figure 11. Technique de dénombrement par étalement en surface	38
Figure 12. Méthode d'ensemencement direct des grains sur le milieu DRBC (Maïs et Orge).....	39
Figure 13. Les étapes de préparation les plaque CCM dans laboratoire.....	43
Figure 14. Densité de la flore fongiques totale (UFC /g) des différents échantillons de matières première et aliment composé.....	47
Figure 15. Fréquence des différents genres d' <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i> dans les échantillons de la matière première et aliments composés analysés.....	47
Figure 16. Taux de contamination des différents échantillons de Matières première (Maïs et orge).....	49
Figure 17. Fréquence des différents genres d' <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> et <i>Fusarium</i> dans les échantillons de la matière première analysés (Maïs et orge).....	49
Figure 18. Fréquence des différentes sections d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons de la matière première (tourteau de soja et son de blé) et l'aliment composé analysés (farine et granulé).....	51
Figure 19. Fréquence de différentes sections d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons de la matière première (maïs et orge).....	52
Figure 20. Aspect macroscopique des différents genres poussant sur milieu DRBC après 5 a 7	

jours d'incubation à 28°C.....	53
Figure 21. Aspect macro et microscopique du genre <i>Aspergillus sp.</i>	53
Figure 22. Aspect macro et microscopique de genre <i>Penicillium sp.</i>	54
Figure 23. Aspect macroscopique et microscopique de genre <i>Fusarium sp.</i>	55
Figure 24. Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>flavi</i>	56
Figure 25. Aspect macroscopique des sclérotés de type « L » d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> sur milieu CYA a 28°C.....	56
Figure 26. Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	57
Figure 27. Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus Fumigati</i>	58
Figure 28. Aspect macro et microscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Terrei</i>	59
Figure 29. Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus</i> section <i>clavati</i>	59
Figure 30. Répartition des isolats aflatoxinogènes d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction de l'intensité de fluorescence.....	61
Figure 31. 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)....	62
Figure 32. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V.(365 nm) de la production des AFs par <i>Aspergillus</i> section <i>Flavus</i> sur CCM	63
Figure 33. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V.(365 nm) de la production des <i>ochratoxine</i> sur CCM.....	66
Figure 34. Représentation schématique Les appareils utilisés dans Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.....	90
Figure 35. Résultats de la chromatographie sur couche mince des isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> aflatoxinogènes	92
Figure 36. Résultats de la chromatographie sur couche mince des isolats Ochratoxinogènes de section (<i>Nigri</i> , <i>Terri</i> et <i>Fumigati</i>).....	93

Résumé

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Les mycotoxines ont des structures chimiques et des effets toxiques très variés. Chez les animaux d'élevage, l'exposition aux mycotoxines peut se traduire par une baisse des performances zootechniques et l'altération de la santé animale. A cela, il faut ajouter un problème de sécurité alimentaire suite au passage de certaines mycotoxines et/ou de leurs métabolites dans les productions animales, notamment le lait. Dans ce contexte l'objectif de ce travail est d'isoler et déterminer la flore fongique dans 55 échantillons de matière première (grains de maïs, orge, tourteaux de soja et son de blé) et aliment composé (farine et granulé) et d'identifier les espèces toxigènes du genre *Aspergillus* ainsi que son pouvoir producteur des aflatoxines et d'ochratoxine A dans les souches étudiées.

L'analyse de la flore fongique de 55 échantillons, (43 de matières premières et 12 de l'aliment composé), par la méthode des grains (directe) et suspensions dilution (indirecte) montre une contamination par les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. La méthode de dilution démontre la dominance du genre *Aspergillus* (40,8%) suivi des genres *Fusarium* (19,45%) et le genre *Penicillium* (11,15%). La méthode des grains affirme une nette dominance du genre *Aspergillus* (73,9%) suivi des genres *Penicillium* (6,8%) et le genre *Fusarium* (5,77%). Six sections différentes d'*Aspergillus* ont été identifiées dont *Aspergillus* section *Flavi* est la plus dominante, ce résultat est obtenu par les deux méthodes.

Le pouvoir producteur d'aflatoxines pour 204 isolats (tous sont des *Aspergillus* section *Flavi*) et d'ochratoxine A pour 118 isolats (*Aspergillus* section *Terrie*, *Nigri*, *Fumigati*, *Clavati* et *Candidi*), a été déterminé par CCM.

L'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines a révélé un taux d'isolats aflatoxinogènes de 28% 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 49,2% des isolats se sont révélés moyennement à fortement producteur et 50,9% sont faiblement à très faiblement producteur. Par ailleurs, l'analyse par chromatographie sur couche mince a montré que 30,6% des isolats appartenant à la section *Terrie*, *Nigri*, *Fumigati*, *Clavati* produisent l'OTA.

Mots clés : alimentation de vache laitière, moisissures, aflatoxine B, ochratoxine A.

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites secreted by fungi belonging mainly to the kinds *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. The mycotoxins have very varied chemical structures and toxic effects. In the farm animals, the exposure to mycotoxins can result in a fall of the zootechnical performances and the deterioration of animal health. For that, it is necessary to add a food safety issue following the passage of certain mycotoxins and/or their metabolites in the livestock products, in particular milk. In this context the aim of this work is to isolate and to determine the fungal flora in 55 samples of raw material (grains of corn, barley, soya meal and wheat bran) and made up food (flour and granulated) and to identify the toxinogenes species of the genus *Aspergillus* and also the production ability of aflatoxines and ochratoxine in the studied strains.

Analysis of the fungal flora of 55 samples (43 of raw materials and 12 of composed feeding stuff), by the direct method and indirect watch a contamination by the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Method of dilution shows the predominance of the gender *Aspergillus* (40.8%) followed by *Fusarium* (19.45%) and *Penicillium* (11.15%). The method of the grains affirms a clear predominance of the gender *Aspergillus* (73.9%) followed by *Penicillium* (6.8%) and *Fusarium* (5.77%). Six sections different of *Aspergilli* were identified whose *AspergillusFlavi* section is most dominant, this result obtained by the two methods.

The producing capacity of aflatoxines for 204 isolates (all are of *AspergillusFlavi* section) and of ochratoxine A for 118 isolates (*Aspergillus* section *Terrie*, *Nigri*, *Fumigati*, *Clavati* and *Condidi*), was determined by TLC.

The study of the producing capacity of aflatoxines revealed a rate of aflatoxinogenes isolates of 28% on medium containing extract of coconut, this result was confirmed by TLC which shows that all the isolates are producers of aflatoxine of the type B. The analysis by the chromatography shows that 49.2% of the isolates appeared moderate producer to strongly producing and 50,9% are slightly to very slightly producing. The analysis by thin layer chromatography showed that 30.6% of the isolates produce OTA (belonging to section *Terrie*, *Nigri*, *Fumigati* and *Clavati*).

Key words: food of milk cow, Fungi, aflatoxine B, ochratoxine A

ملخص

تعتبر السموم الفطرية مركبات ثانوية تفرزها فطريات تنتمي أساسا إلى أجناس *Aspergillus*، *Penicillium* و *Fusarium*. تمتلك هذه السموم تراكيب كيميائية وآثار سمية متعددة. إن تعرض حيوانات المزارع لهذه السموم يؤدي إلى تدهور صحتها وانخفاض في إنتاجها. إضافة إلى هذا يمثل انتقال هذه السموم إلى المواد الغذائية ذات الأصل الحيواني خطرا على صحة الإنسان. وفي هذا السياق، كان الهدف من هذا العمل عزل وتوصيف الفطريات مع الكشف عن الأفلاتوكسينات في 55 عينة من علف البقر الحلوب (خليط العلف والمكونات الأولية: الذرة، الشعير، كسب فول الصويا و نخالة القمح) ، وتحديد نوع الفطريات *Aspergillus* مع اختبار قدرتها على إنتاج السموم الفطرية (الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين).

التحليل الفطري لـ 55 عينة، 43 عينة من المواد الأولية و 12 عينة من علف البقر الحلوب ، بالطريقة المباشرة (زرع الحبوب مباشرة وسط DRBC) وطريقة التخفيفات يبين تلوثها الكبير بالجنس *Aspergillus*، *Penicillium* و *Fusarium*. طريقة التخفيف تؤكد سيطرة الجنس *Aspergillus* (40,8%) متبوع بالجنس *Fusarium* (19,45%) و *Penicillium* (11,15%) أما بالطريقة المباشرة تثبت سيطرة الجنس *Aspergillus* (73,9%) متبوع بالجنس *Penicillium* (6,8%) و *Fusarium* (5,77%). تم التعرف على ست مجموعات من *Aspergillus* من بينها مجموعة *Flavi* هو الأكثر سيادة في كلتا الطريقتين.

القدرة الإنتاجية للأفلاتوكسين لـ 204 عذلة (الكل ينتمي إلى *Aspergillus* مجموعة *Flavi*) و للأوكراتوكسين A لـ 118 عذلة (*Aspergillus* مجموعة *Terrie*، *Nigri*، *Fumigati*، *Clavati* و *Condidi*). توضح بتقنية الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM).

دراسة القدرة الإنتاجية للأفلاتوكسين تظهر نسبة 28% من العزلات المنتجة له فوق وسط يركز على مستخلص جوز الهند، تم تأكيد هذه النتيجة بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التي تثبت أن جميع العزلات منتجة للأفلاتوكسين ذات النوع B. يؤكد التحليل بالكروماتوغرافيا ان 49,2% من العزلات متوسطة الإنتاج إلى قوية الإنتاج و 50,9% ضعيفة الإنتاج .

اما فيما يخص إنتاج الأوكراتوكسين فبين التحليل بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أن 30,6% من العينات متوسطة الإنتاج OTA (العينات تنتمي إلى مجموعة *Terrie*، *Nigri*، *Fumigati* و *Clavati*)

الكلمات مفتاحية: غذاء البقر الحلوب، فطريات، *ochratoxin A*، *afatoxine B*

Table des matières

INTRODUCTION	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. LES MYCOTOXINES	03
1. Les mycotoxines en alimentation humaine.....	04
2. Les mycotoxines en alimentation animal.....	05
3. Les conditions de toxinogènes.....	05
4. Les principales mycotoxines produites par les espèces d' <i>Aspergillus</i>	06
4.1. Les aflatoxines.....	06
4.1.1. Contamination des aliments par les aflatoxines	07
4.1.2. Les effets toxiques d' aflatoxine	07
4.2. l'Ochratoxine A (OTA).....	09
4.2.1. Contamination des aliments par l' ochratoxine A	09
4.2.2. Les effets toxiques d' ochratoxine.....	10
5. Bioconversion des mycotoxines chez le ruminant.....	10
5.1. Dans le rumen.....	10
5.2. Dans l'intestin, le foie et les reins.....	11
6. Voies d'élimination des mycotoxines	13
6.1. Excrétion urinaire et fécale	13
6.2. Excrétion dans le lait.....	13
6.2.1. La stabilité dans les produits laitiers	13
6.3. Dans les viandes.....	14
6.4. Effets des mycotoxines sur la santé des ruminants	14
7. L'exposition de l'homme.....	15
II. Réglementation et prévention	16
1. Réglementation des aflatoxines et d' ochratoxine A dans l'alimentation animale	16
2. Les conséquences économiques.....	16
3. Décontamination des produits laitiers.....	16
4. Traitements limitant les effets des mycotoxines.....	17

4.1. Méthodes physique.....	17
4.2. Méthodes chimiques.....	17

III : L'ALIMENTATION DU BETAIL EN ALGERIE.....18

1. Le secteur de l'élevage en Algérie.....	18
2. Les ressources fourragères	18
3. Importation d'aliment du bétail.....	18
4. La qualité de l'alimentation du bétail	18

IV. LES CHAMPIGNONS MYCOTOXINOGENES.....20

1. Définition	20
2. Classification des champignons.....	20
3. Identification des champignons	21

V. LES CHAMPIGNONS PRODUCTEURS D'AFATOXINE ET D'OCHRATOXINE

A

1. Le genre <i>Aspergillus</i>	22
1.1.Définition.....	22
2. Les caractères morphologiques d'identification du genre <i>Aspergillus</i>	23
1.2.1. Description macroscopique d' <i>Aspergillus</i>	24
1.2.2. Description microscopique d' <i>Aspergillus</i>	24
1.3. Systématique des espèces d' <i>Aspergillus</i>	25
1.3.1. <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	26
1.3.2. <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	27
1.4. La contamination des céréales par les espèces de genre <i>Aspergillus</i>	27

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL30

1. L'aliment de la vache laitière.....	30
2. Les milieux de cultures.....	31
3. Souches de références	31
4. Appareillage et produits chimiques.....	31
5. Les standards analytiques.....	31

II. MÉTHODES.....32

1. Collecte des échantillons et méthode de prélèvements.....	32
2. La région étudiée.....	33
3. Nature des prélèvements effectués.....	34
3.1. La matière première	34
3.2. L'aliment composé (farine et granulé).....	34
4. Analyses physico-chimiques.....	37
4.1. Détermination du taux d'humidité relative.....	37
4.2. Détermination du pH.....	37
5. Isollements et dénombrement de la flore fongique.....	37
5.1. Méthode de dilution (indirect)	37
5.2. Méthode des grains (Direct Plating).....	38
6. Identification morphologique des isolats fongiques.....	39
6.1. Identification macroscopique.....	39
6.2. Identification microscopique.....	39
6.2.1. Préparation microscopique ordinaire.....	39
6.2.2. Préparation microscopique à l'aide d'un ruban adhésif transparent.....	40
6.3. Repiquage des souches d' <i>Aspergillus</i> sp.....	40
7. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines et d'ochratoxine A.....	40
7.1. Détection de la fluorescence d'aflatoxine sur milieu de culture.....	41
7.2. Extraction d'aflatoxine et d'ochratoxine A du milieu de culture.....	41
7.3. Détection et confirmation de la production d'AFs et OTA par CCM.....	42
7.3.1. Préparation des plaques.....	42
7.3.2. Dépôt des extraits à analyser.....	43

RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS.....44

1. Analyses physicochimiques	44
1.1. Humidité relative.....	44
1.2. Le pH.....	42
2. Analyse de la flore fongique des échantillons de la matière première et l'aliment composé.....	45

2.1. Distribution des genres fongiques dans les échantillons de Matière première et l'aliment composé analysés.....	45
2.1.1. Résultats de la méthode de dilution.....	45
2.1.2. Résultats de la méthode directe.....	48
3. Distribution des sections d' <i>Aspergillus</i> dans les échantillons de matière première et aliment composé analysés par les deux méthodes.....	50
3.1. Résultats de la méthode de dilution.....	50
3.2. Résultats de la méthode directe.....	51
4. Reconnaissance des genres et des sections.....	52
4.1. Reconnaissance des genres.....	52
4.2. Reconnaissance des sections du genre <i>Aspergillus</i>	53
5. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par les isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	60
6. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A par les isolats d' <i>Aspergillus</i>	64
II. DISCUSSION.....	67
CONCLUSION ET PRESPECTIVE.....	72
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	74
ANNEXES.....	87

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

MATERIEL ET MÉTHODES

RÉSULTATS ET DISCUSSION



**CONCLUSION
ET PERSPECTIVES**

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

ANNEXES

Les événements récents qui ont touché à la sécurité alimentaire, comme la crise de la vache folle, les problèmes de nitrate, de pesticides, de dioxines dans les aliments ou encore les problèmes de listériose ou de salmonellose ont contribué à sensibiliser le consommateur ainsi que l'ensemble de la filière agroalimentaire aux risques potentiels de certains contaminants microscopiques. Parmi ces contaminants, il en existe certains moins connus du public. C'est le cas des mycotoxines, un contaminant produit naturellement dans les aliments par des moisissures et ayant des effets pathogènes tant chez l'homme que chez l'animal (Narbonne, 1999).

Les céréales sont des vecteurs importants de mycotoxines puisqu'elles sont universellement consommées par l'Homme et les animaux. A savoir que 25 à 40 % des céréales sont contaminées par des mycotoxines. Parmi les toxines les plus dangereuses, les aflatoxines issues d'*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*, qui sont des moisissures de stockage, et ils sont fréquemment présentes dans les céréales (Yiannikouris et Jouany, 2002). L'OTA peut être présente dans toutes les céréales. On la rencontre principalement dans le maïs, l'orge, l'avoine, le seigle, le blé, et les oléagineux, lorsque les produits ont été mal séchés avant leur stockage (AFSSA, 2009).

Les mycotoxines sont définies comme des substances d'origine fongique capables à faibles concentrations d'induire un effet toxique (Reboux, 2006). Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités chroniques et aiguës allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, ainsi que sur l'appareil digestif chez l'homme ou l'animal (Dao, 2005). Le risque carcinogène est beaucoup étudié, mais les mycotoxines peuvent avoir de nombreux autres effets : tératogènes, immunotoxiques, hémorragiques, oestrogéniques, hépatotoxiques ou neurotoxiques (Zain, 2010).

Ainsi, les mycotoxines et leurs métabolites notamment l'AFM1, présentent un risque potentiel pour le consommateur du fait de leur excrétion dans le lait chez la vache (Gremmels, 2008). La contamination de l'aliment distribué au bétail sera conditionnée par une série d'éléments. Il s'agit des sous-produits composants la ration, de leur condition de culture, de récolte et de conservation. Les composants entrant dans la ration détermineront le complexe

de mycotoxines ingéré par l'animal. Le processus de fabrication et les conditions de stockage de l'aliment seront autant de facteurs influençant la synthèse des mycotoxines (Ruppel *et al.*, 2004).

En Algérie, l'état de la présence des mycotoxines dans l'alimentation de vache laitière est mal connue ; peu d'études ont été réalisées et les conséquences restent actuellement sous estimées. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude se focalise sur :

- ✓ La détermination des section parmi le genre *Aspergillus* impliquées dans la production des aflatoxines et de l'Ochratoxine A dans l'alimentation de vache laitière;
- ✓ L'analyse qualitative et quantitative des populations fongiques potentiellement toxigènes dans le produit final et dans les matières premières de l'aliment de vache laitière ;
- ✓ L'étude du potentiel producteur d'aflatoxines et d'OTA par les isolats fongiques ;

Notre travail de mémoire se déroule comme suit :

- ❖ Partie bibliographique : sur les mycotoxines et l'alimentatin de la vache laitère et les champignons mycotoxinogènes,
- ❖ Une partie experimentale : qui s'interesse au Matériels et méthodes utilisés.
- ❖ Partie de résultats et discussion : concernant les résultats de notre travail au sein de laboratoire.
- ❖ Conclusion et perspectives.

I. LES MYCOTOXINES

Le terme mycotoxine vient du grec "mycos" qui signifie champignons et du latin "toxicum" qui signifie poison. Il désigne des métabolites secondaires de faible poids moléculaires toxiques, sécrétés par des moisissures. Elles sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Miller *et* Trenholm, 1994). La contamination inévitable des produits alimentaires par les mycotoxines constitue une source importante de maladies d'origine alimentaire et constituent 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 que environ un quart de récolte 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.

La production des mycotoxines peut survenir au champ, pré et post-récolte, lors du transport, pendant le stockage ou au cours de transformation. L'étalement dans le temps de la consommation et le transport à longue distance des aliments nécessite de plus en plus de stockage d'où le développement des moisissures à la surface et dans les produits destinés à l'alimentation (Chapeland-Leclerc *et al.* 2005). Il faut souligner que l'absence de la moisissure dans une denrée ne signifie pas forcément l'absence de la mycotoxine.

Les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agro-alimentaire et sanitaire sont : Le déoxynivalénol, les fumonisines, la zéaralénone et les trichothécènes et tout spécialement les aflatoxines et l'ochratoxines A (AFSSA, 2009).

Les conditions de l'apparition de ces mycotoxines sont très variables, on note que le groupe des Zéaralénone 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 01).

Les mycotoxines possèdent des structures chimiques leur conférant une bonne stabilité et de ce fait, les procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation et irradiation) ne peuvent pas les détruire totalement (Park, *et al.*, 2002). Quelques moisissures sont capables de produire plusieurs mycotoxines et quelques mycotoxines sont produites par différentes espèces fongiques (Hussein, *et* Brasel, 2001). Le type et la quantité de mycotoxine dépendent des espèces fongiques qui les produisent (Lacey, 1986). De la souche, et des conditions physicochimiques du milieu.

Tableau 01. Les principales mycotoxines et les conditions d'apparition (AFSSA, 2009).

Groupe 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 mycotoxines en alimentation humaine

Beaucoup d'aliments peuvent être contaminés par les mycotoxines notamment les produits d'origine végétale, comme les céréales et leurs produits dérivés. Les autres produits d'origine végétale susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines sont : les fruits secs (les noix, les amandes, les arachides, les pistaches, les raisins...), les légumes secs (graines oléagineuses, et haricotes ...), les épices, le café, le cacao, les fourrages, les jus et les produits de fermentation. Parmi les aliments et les produits d'origine animale, le lait, les produits laitiers, les œufs, les viandes et tout ce qui en dérive peuvent être souillés par les mycotoxines. L'entrée des mycotoxines dans la chaîne alimentaire de l'homme s'effectue; soit par des denrées consommées directement (arachides, pistaches, amandes, etc.). soit indirectement par des produits dérivés à partir desquels sont élaborés des aliments finis (semoule, farine, biscuits...). En outre, les mycotoxines peuvent se transmettre par des produits d'origine animale, si l'animal a consommé une nourriture contaminée par des mycotoxines (Billerman *et* Bianchini, 2007).

2. Les mycotoxines en alimentation animal

L'alimentation animale est essentiellement constituée de tourteaux oléagineux, de céréales, de fourrages ensilés, d'aliment concentré, etc., Tous ces substrats peuvent être contaminés soit par les spores qui se trouvent initialement dans les céréales, soit plus tard, pendant le stockage. Les données concernant la contamination fongique de produits alimentaires à base de céréales ne sont pas nombreuses. En effet, les recherches sont, en général, orientées directement vers l'analyse de la présence de mycotoxines dans ces produits.

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

En élevages industriels, les animaux reçoivent une ration équilibrée et relativement identique chaque jour, ce qui favoriserait chez des animaux, génétiquement très proches, des intoxications chroniques si l'alimentation renferme des mycotoxines (Tabuc, 2007).

3. Les conditions de toxino-gènes

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini (Pfohl -Leszkowicz, 1999). Elles peuvent survenir au champ (avant récolte), lors du transport, pendant le stockage ou au cours de la transformation.

La mycotoxine peut aussi être présente alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de la mycoflore, soit du fait de traitements technologiques. La sécrétion de métabolites toxiques par les moisissures dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (liés à la souche fongique), extrinsèques (conditions de l'environnement).

La formation des mycotoxines (mycotoxinogénèse) est conditionnée 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 ; Dunkel, 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 toxigènes, les interactions microbiennes et les insectes (figure 01).

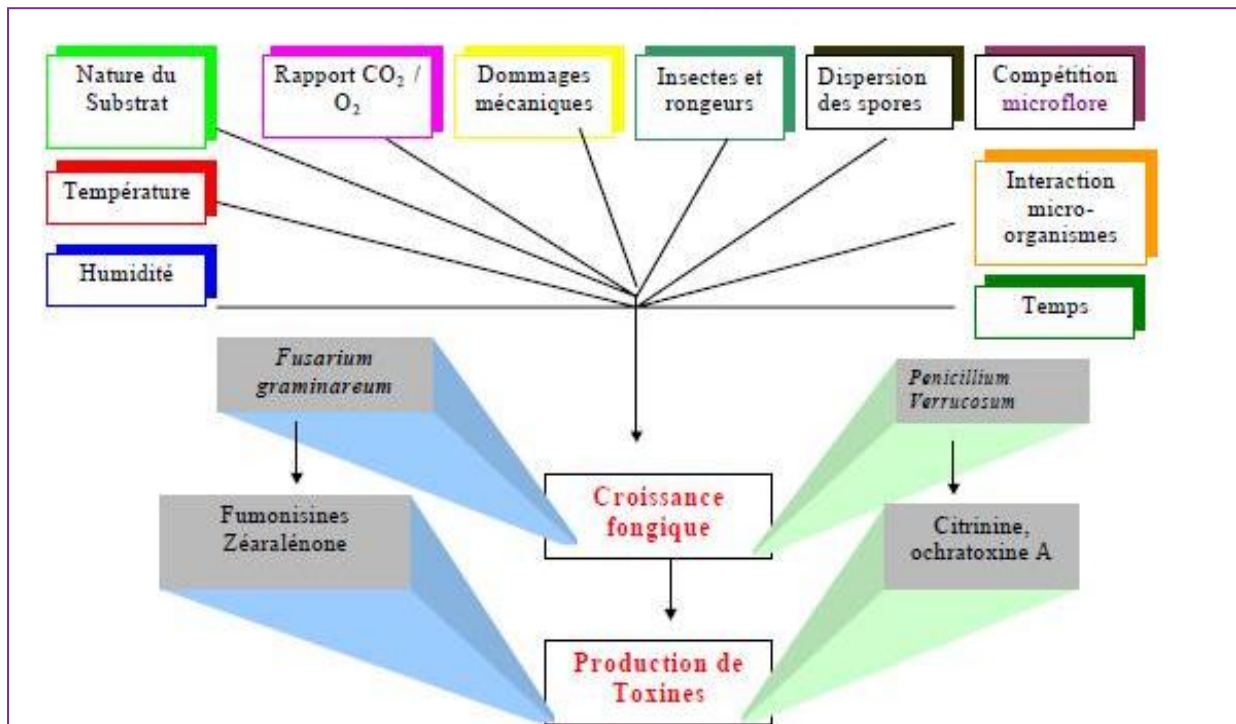


Figure 01. Les conditions toxigènes.

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

4.1. Les Aflatoxines

En 1960, aux environs de Londres, des élevages de dindonneaux sont atteints d'un grave intoxication, appelée autrefois « maladie X des dindons », provoquée par l'ingestion de tourteaux d'arachide en provenance du Brésil. Pour la première fois, la relation a été établie entre une intoxication et la présence d'une moisissure produite par *Aspergillus flavus* colonisant les graines d'arachide. Ce fut le début d'une série de recherches qui aboutit en 1965 à l'isolement et à la caractérisation de la structure des AFs (Asao *et al.*, 1963 et 1965).

Cinq ans plus tard, la molécule d'OTA a été découverte en Afrique du Sud. Plus de 400 mycotoxines sont actuellement identifiées à l'échelle internationale, elles sont produites par quelques 200 variétés de champignons toxiques. (Zinedine, 2009).

A l'état actuel, on connaît, du point de vue structure, au moins 16 AFs (Cole et Cox, 1981) dont les principales sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1 (Figure 02). Les AFs M1 et M2, dérivés respectifs des AFs B1 et B2, apparaissent dans le lait et ses dérivés. Les aflatoxines M1 et M2, dérivés respectifs des aflatoxines B1 et B2, apparaissent dans le lait et ses dérivés. Ces aflatoxines ont tenu leur appellation du fait de leur détection dans le lait « Milk » des vaches laitières nourries par une alimentation contaminée (Jaqu *et al.*, 1982).

4.1.1. 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), fruits secs et bière (Tabuc, 2007).

4.1.2. Effets toxiques d'aflatoxines

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 étudiés 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 ; Terau *et Ueno*, 1978).

Les AFs ont également des propriétés hépatotoxiques, tératogènes et immunotoxiques très marquées qui ont été mises en évidence dans les études sur les animaux. Les effets immunotoxiques concernent surtout les réactions immunitaires à médiation cellulaire. La consommation de fourrage contaminé par les animaux peut également entraîner des symptômes d'immunosuppressions, des hémorragies, une réduction du poids et le cancer du foie (Miller *et Wilson*, 1994 ; Wogan, 2000).

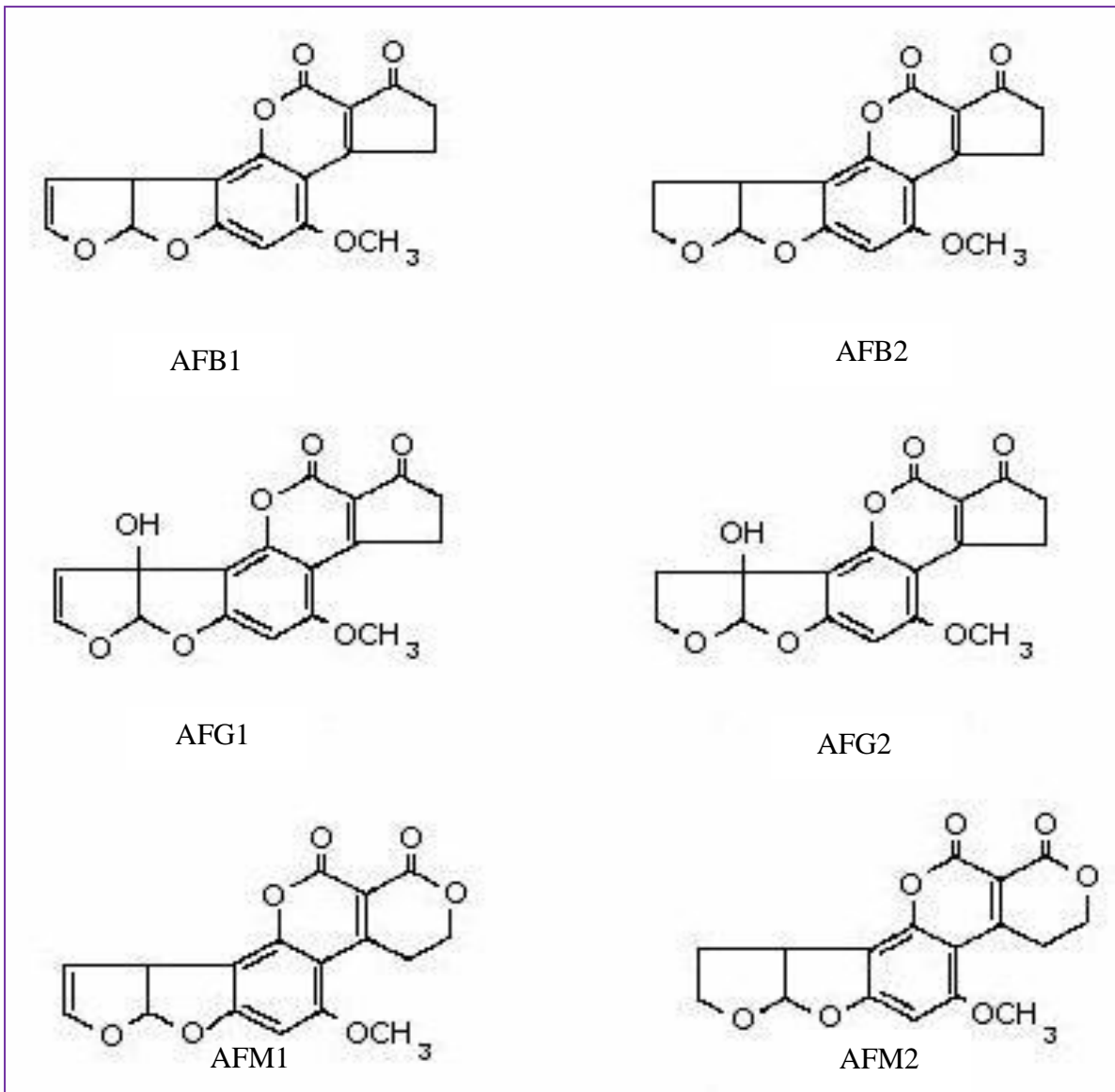


Figure 02. Structures chimiques des 4 AFs (B1, B2, G1, G2, M1, et M2) (Zinedine, 2009)

4.2. L'Ochratoxine A (OTA)

Les ochratoxines sont produites aussi bien par *A. ochraceus* et certaines espèces voisines que par des espèces du genre *Penicillium*. Elles ont été détectées dans le maïs, l'orge, le blé, l'avoine, les haricots, les pois moisis et les fruits secs. On les retrouve également sur les graines mal stockées, elles contaminent entre autres les céréales, les boissons (vins, jus de fruits, bière etc.) et par le biais de la chaîne alimentaire la viande de porc et de la volaille (Haumann, 1995).

La production des ochratoxines par les espèces *d'aspergillus* ne paraît possible que dans des conditions de forte humidité et de température élevée (varga *et al.*, 1996), alors que certaines espèces de *Penicillium* sont capables de produire des ochratoxines même à des températures n'excédant pas 5°C (OMS, 1980).

4.2.1. Contamination des aliments par l'ochratoxine A

L'ochratoxine A est détectée dans pratiquement toutes les céréales (maïs, blé, sorgho, riz, seigle, orge et avoine) et a été retrouvée dans de nombreuses autres denrées (graines de soja, haricots, grains de café vert, produits cacaotés, vin, jus de raisins, raisins secs, épices et herbes). On trouve aussi des petites quantités de cette mycotoxine dans les pommes de terre et les lentilles (Baydar *et al.*, 2005). Contrairement aux aflatoxines, retrouvées plus souvent dans des céréales issues des régions chaudes, l'ochratoxine A est retrouvée dans les céréales de toutes les régions car elle peut être produite par l'*Aspergillus ochraceus* dans les régions chaudes et par le *Penicillium* dans les climats tempérés. L'ochratoxine A entre dans la chaîne alimentaire de l'homme soit par consommation directe de produits contaminés comme les céréales et ses dérivés (pain et produits à base de farine de céréales), raisin et ses produits (jus de raisin), cacao et café, fruits, etc, soit par voie indirecte lors de la consommation de produits issus d'animaux nourris avec des grains contaminés (abats et viandes, lait). Le passage de l'ochratoxine A dans le lait de vache est possible mais en quantité infime; en effet, les ruminants seraient capables de dégrader l'ochratoxine A grâce à leur microflore digestive, une faible quantité d'OTA est transférée dans le lait. (Azzoune, 2010).

4.2.2. Les effets toxiques d'ochratoxine A

L'OTA provoque des lésions rénales importantes chez les animaux lors des intoxications chroniques tandis que les intoxications aiguës se caractérisent par des hémorragies et des diarrhées. L'OTA a été trouvée fréquemment à de hautes concentrations dans des échantillons de sang obtenus chez des personnes, vivant dans l'hémisphère Nord en particulier dans des pays du Balkan et affectées par une maladie connue sous le nom de la néphropathie endémique du Balkan (Pfohl-Leszkiewicz *et al.*, 2002).

5. Bioconversion des mycotoxines chez le ruminant

Une fois ingérée, les mycotoxines sont transformées d'abord dans le rumen puis dans d'autres organes comme le foie. Il en résulte une modification de la structure et de la toxicité des toxines fongiques qui confère généralement aux ruminants une plus grande résistance aux effets néfastes de la plupart des mycotoxines par rapport aux animaux monogastriques (AFSSA, 2009).

5.1. Dans le rumen

Outre l'effet de dilution dans le rumen des bovins due à une forte production de sécrétions salivaires, la flore microbienne joue un rôle détoxifiant en dégradant certaines mycotoxines (Upadhaya *et al.*, 2010). Par exemple :

- Les aflatoxines sont généralement peu dégradées dans le rumen des bovins (<10% pour des doses de 1 à 10µg/ml). La formation d'aflatoxicol (dérivé hydroxylé de l'aflatoxine B1) qui est de toxicité élevée a été montrée. En effet, 10µg/ml d'AFB1 inhibe de nombreuses bactéries ruminales. De ce fait, il semblerait que cette toxine perturbe le fonctionnement et la croissance de la flore du rumen (Auerbach *et al.*, 1998).
- L'OTA est dégradée dans le rumen en phénylalanine et en ochratoxine alpha non toxique. Cependant elle peut également être estérifiée en ochratoxine C de toxicité similaire (Yiannikouris et Jouany, 2002).

5.2. Dans l'intestin, le foie et les reins

L'épithélium intestinal, le foie et les reins sont des organes où ont lieu d'importantes biotransformations et notamment des mycotoxines (Guerre *et al.*, 2000).

Selon (Galtier, ,1999) ces transformations se font en deux phases : La première phase fait intervenir des réactions de réduction, d'oxydation et d'hydrolyse, et La deuxième phase comporte les réactions de conjugaison des molécules formées durant la première phase.

Les aflatoxines B1 peuvent être hydrolysées partiellement par des hydrolases du foie ou des enzymes intestinales en monoester et aminopentol qui peuvent alors être excrétés dans les fèces mais aussi en aflatoxine M1 qui peut être excrétée par voie lactée (Galtier, 1999) (Figure 03).

L'OTA est bioconvertie en hydroxy- ochratoxine A (OH-OTA) qui aurait des propriétés immunosuppressives identiques à l'OTA.

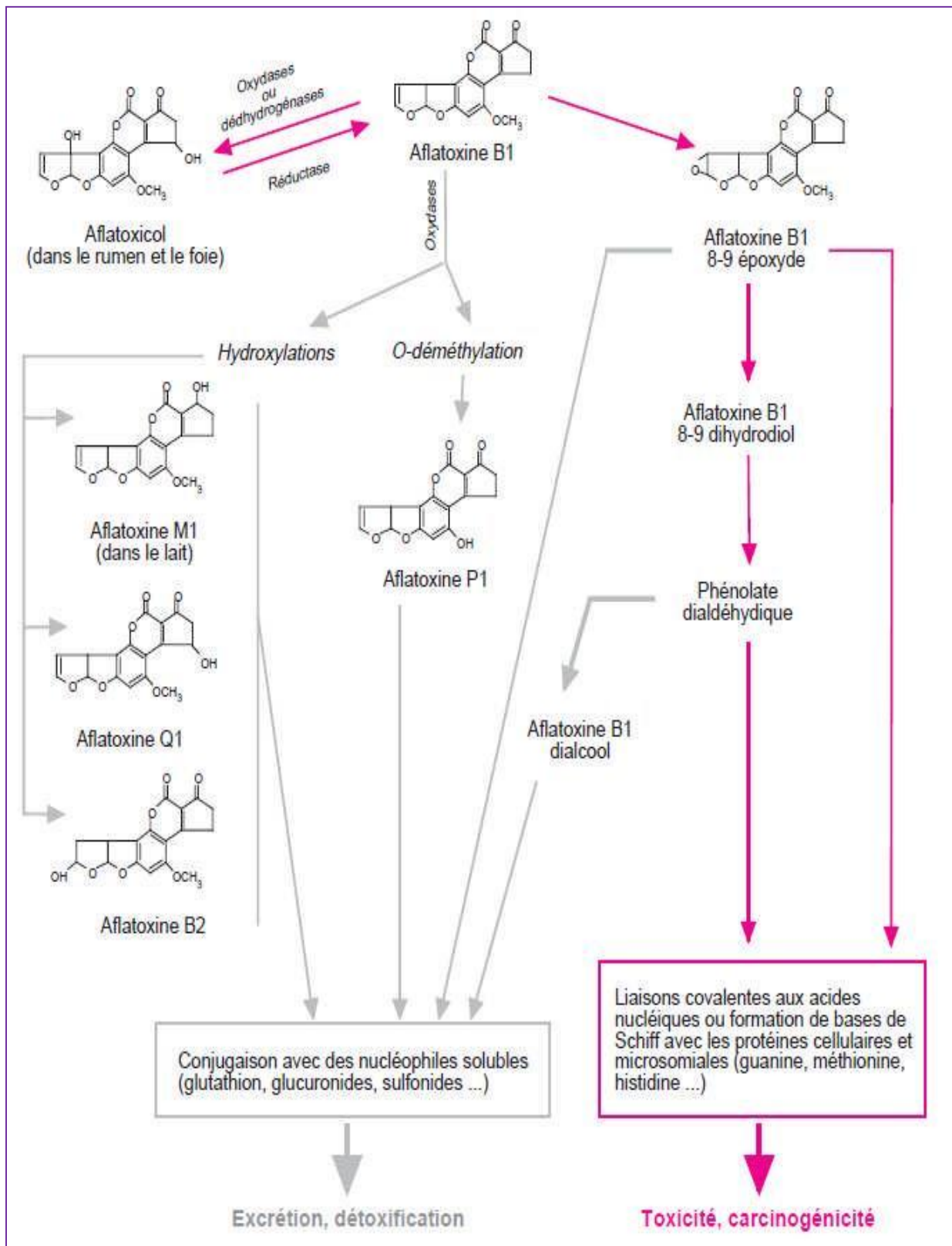


Figure 03: Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie (d'après Yiannikouris et Jouany, 2002)

6. Voies d'élimination des mycotoxines et transfert dans les productions animales

6.1. Excrétion urinaire et fécale

L'AFB1 et l'OTA sont principalement excrétées dans les urines et les fèces. Bien que leur métabolisation soit différente, l'excrétion fécale semble aussi efficace et peut représenter jusqu'à 53% des doses reçues d'AFB1 et d'OTA (Boudra, 2011). L'excrétion urinaire est également une voie importante d'élimination qui peut représenter 30% des doses d'AFB1 et 70% des doses d'OTA ingérées selon les conditions expérimentales (Hohler *et al.*, 1999).

6.2. Excrétion dans le lait

Chez le ruminant laitier, le lait représente une voie mineure d'excrétion des mycotoxines (Boudra, 2011). Seules les mycotoxines stables, non hydrolysables, passeront la barrière digestive et seront susceptibles de subir une excrétion lactée, éventuellement après biotransformation hépatique (Guerre *et al.*, 2000). Les Aflatoxines totales sont transférées faiblement depuis l'aliment jusque à le lait à un taux de 0,3 et 2,2%. Cependant, l'aflatoxine M1, un métabolite de l'aflatoxine B1 dont le pouvoir toxique est équivalent à l'AFB1, a la particularité d'être excrétée de façon non négligeable dans le lait (la quantité d'AFM1 représente 1 à 2 % de la quantité d'AFB1 ingérée) (Boudra *et al.*, 2007). Les taux excrétés peuvent atteindre 6% de la dose ingérée chez la vache à haute production laitière (Veldman *et al.*, 1992). La présence d'OTA et de son métabolite l'ochratoxine alpha ont été mis en évidence dans le lait de vache, de chèvre et de brebis exposées à l'aliment contaminé.

6.2.1. La stabilité dans les produits laitiers

L'AFM1 est stable dans le lait et durant les différents processus de transformation du lait. La stabilité de l'AFM1 aux traitements thermiques est excellente, la pasteurisation ou la réfrigération des laits crus n'ayant quasiment aucun effet sur les teneurs initiales en AFM1. De même, la déshydratation du lait cru est à l'origine d'une "concentration" de l'AFM1 dans le lait en poudre d'un facteur 10, en fait ceci correspond à la "perte" de la phase aqueuse qui représente environ 90 % du lait. Au cours de l'écémage, 10 % de la teneur en AFM1 passe dans la crème, le reste passe dans le lait écrémé (Guerre *et al.*, 2000). L'OTA a également été montré stable à des températures allant jusque 200°C (Boudra, 2011).

6.3. Dans les viandes

La viande est généralement peu propice à l'accumulation des toxines fongiques. Les viandes ne sont donc pas des vecteurs importants de mycotoxines (Smith et Moss, 1985). Les animaux consommateurs d'aliments contaminés contribuent même à réduire la quantité des mycotoxines dans la chaîne alimentaire, à l'exception de l'ochratoxine A qui s'accumule dans les tissus et organes du porc. Cette toxine pose un problème sanitaire dans les pays du nord et de l'est de l'Europe où la viande de porc est pratiquement la seule viande consommée (Berthier *et al.*, 2008).

6.4. Effets des mycotoxines sur la santé des ruminants

Même si la plupart des mycotoxines sont dégradées dans le système digestif des ruminants, des effets néfastes dus aux toxines fongiques sont parfois observés dans les élevages. Ces effets biologiques dépendent de différents facteurs (Yiannikouris *et al.*, 2002)

- La dose de mycotoxines ingérée.
- Le nombre de toxines présentes puisque il existe des synergies entre différents types de mycotoxines.
- La durée d'exposition aux mycotoxines puisque les toxines fongiques sont responsables entre autres de troubles chroniques.
- L'état de santé de l'animal qui les ingère. En effet, les bioconversions qui protègent les ruminants d'une partie des effets toxiques des toxines fongiques dépendent de la bonne santé de la flore ruminale en particulier, ce qui implique que l'animal doit être en bon état général. Les toxines fongiques passent dans le sang au niveau de la muqueuse gastro-intestinale et cause plusieurs maladies (Tableau 02).

Tableau 02. Répercussion possibles des différentes mycotoxines chez les ruminants (Guerre *et al.*, 2000).

Mycotoxines	Ruminants
Aflatoxine	Lésion du foie, congestions, hémorragies Encéphalopathies et œdème Mort
Ochratoxine A	Domage rénaux, anorexie, affaiblissement Rarement observées chez les ruminants car elles sont dégradées dans le rumen. Immunotoxiques et cancérigènes
Patuline	Cancérigène et mutagène Hyperesthésie, incoordination des organes moteurs Troubles de l'ingestion et de la digestion
Fumonisines	Lésions profondes du foie, du tractus gastro-intestinal, du système nerveux
Trichotécènes	Perte de poids, hémorragies, gastro-entérite T-2 et DON : Inhibent la synthèse protéique, mort cellulaire

7. L'exposition de l'homme

La présence d'aflatoxines et d'ochratoxines dans le lait pose un problème d'hygiène alimentaire. La consommation régulière de lait ou de produits laitiers contaminés est un facteur aggravant le risque de contamination pour une large population d'individus, notamment les individus les plus sensibles aux effets des mycotoxines. La présence d'aflatoxines et d'ochratoxines dans le lait utilisé en substitution au lait maternel, les yoghourts et les fromages démontrent le potentiel d'exposition des nourrissons et des enfants en croissance (Meucci *et al.*, 2010).

II. Réglementation et Prévention

1. Réglementation des aflatoxines et l'ochratoxine A dans l'alimentation animale

Les aflatoxines potentiellement présentes dans les denrées alimentaires, bien que l'AFB1 soit de loin le composé le plus toxique, et le plus fréquent, la présence des autres aflatoxines dans les denrées alimentaires ne peut pas être négligée, et leurs teneurs respectives varient d'une denrée à l'autre ; c'est pourquoi le règlement (1831/2003/CE) prévoit, pour des raisons de sécurité, de limiter à la fois la teneur en AFB1 et la teneur en aflatoxines totales (B1+B2+G1+G2) dans les denrées alimentaires. De même, bien que l'aflatoxine M1 soit un produit de métabolisation de l'AFB1, présent dans le lait des animaux ayant consommé des aliments contaminés par l'AFB1, et bien que cette aflatoxine M1 soit une substance cancérigène génotoxique moins dangereuse que l'AFB1, il est impératif de limiter sa présence dans le lait et les produits laitiers qui sont consommés par les êtres humains, et notamment par les enfants en bas âge.

2. Les conséquences économiques

La contamination des aliments pour animaux par les mycotoxines occasionnent des coûts économiques directs et indirects pour la filière d'élevage. Les pertes directes sont dues à l'altération de l'aliment par les moisissures. Le développement fongique peut conduire à la destruction de la récolte lorsque le végétal est fortement attaqué et que le grain et les fourrages sont rendus inconsommables. Dans d'autres cas, la croissance des moisissures se traduit par une altération sensorielle et nutritionnelle des récoltes (diminution des teneurs en matière sèche, matière azotée et glucides) responsable d'un refus ou d'une diminution de l'ingestion par l'animal. Dans ces situations, la ration contaminée ne couvre pas les besoins énergétiques de l'organisme (Boudra, 2011).

3. Décontamination des produits laitiers

Les adsorbants non spécifiques (résines, aluminosilicates, charbons) semblent les plus efficaces dans une décontamination des aliments. Ils ne sont toutefois pas efficaces à 100 %, des différences importantes entre mycotoxines étant observées, principalement en raison de la diversité des propriétés physiques et chimiques de ces composés (Hagler, 2005). Enfin, les adsorbants spécifiques (immunoaffinité) sont certes très efficaces mais également très spécifiques, d'une famille de composés voire d'une mycotoxine, et par là inadaptés à une décontamination globale des aliments (Guerre *et al.*, 2000).

4. Traitements limitant les effets des mycotoxines

4.1. Méthodes physiques

Des méthodes telles que le tri et l'élimination des grains contaminés, le lavage par de l'eau ou du carbonate de sodium afin de réduire la concentration des toxines de *Fusarium* sp. Dans le maïs, l'inactivation thermique à haute température, l'irradiation par UV, rayons X ou micro-ondes, ont pu être utilisées, L'ajout à la ration d'adsorbants capables de fixer les mycotoxines permet de réduire leur biodisponibilité dans l'organisme animal et de limiter les risques liés à la présence de résidus dans les produits animaux destinés à la consommation humaine (Scott, 1998).

4.2. Méthodes chimiques

Une variété d'agents chimiques tels que les acides, les bases (ammoniaque, soude), des agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, ozone), des agents réducteurs (bisulfites), des agents chlorés, du formaldéhyde sont utilisés pour dégrader ou biotransformer les mycotoxines et plus particulièrement les aflatoxines (Scott, 1998). En ce qui concerne les tourteaux destinés à l'alimentation animale, les processus de détoxification par l'ammoniaque associée ou non au formol permettent d'éliminer une partie des aflatoxines (AFSSA, 2009).

III : L'ALIMENTATION DU BETAIL EN ALGERIE

1. Le secteur de l'élevage en Algérie

Selon (Nedjraoui, 2001), l'élevage, en Algérie, concerne principalement les ovins, les caprins, les bovins et les camelins où les régions steppiques et présahariennes détiennent 80% de l'effectif total constitué essentiellement par le cheptel ovin.

2. Les ressources fourragères

La contamination des fourrages par les moisissures est inévitable. Un grand nombre et une grande variété de microorganismes sont présents dans les fourrages verts fraîchement récoltés. Cependant, la majeure partie des contaminants toxigènes est apportée durant les processus de récolte, de séchage, de manutention et de stockage. Une partie seulement de ces contaminants est capable de se développer dans les conditions de stockage (Boudra, 2011).

3. Importation d'aliment du bétail

Les importations des aliments du bétail sont en grande partie destinées aux producteurs de volailles ; la part destinée à la fabrication du concentré pour les bovins laitiers est moins importante et souvent ce sont les éleveurs eux-mêmes qui procèdent au broyage et au mélange des grains. Les prix de ces intrants alimentaires ont augmenté au cours de ces dernières années ; les experts de l'aliment du bétail prédisent même des insuffisances pour les exportations du tourteau de soja et du maïs pour les années à venir, en raison de certains effets conjoncturels, entre autre le développement des biocarburants.

Les quantités des matières importées, ainsi que les sommes versées par l'état ont augmenté de 2000 à 2007 (Kali *et al.*, 2011).

4. La qualité de l'alimentation du bétail

L'industrie des aliments pour animaux, est un fournisseur important pour les éleveurs. Dans l'élevage intensif, la part des aliments dans les coûts totaux de production sont assez élevés, allant de 40% à 60%. En conséquence, le prix et la qualité sont très importants. Selon (Hartog, 2003), La qualité de l'alimentation du bétail comprend les aspects suivants:

- La qualité nutritionnelle: il s'agit de la valeur nutritive du produit, exprimée en énergie disponible, les acides aminés et les composants essentiels comme les vitamines, les oligo-éléments.
- La qualité émotionnelle, qui est relié à l'éthique et l'éthologie. La sécurité pour les

animaux, l'environnement (lié à l'excrétion dans le fumier) et les consommateurs de produits d'origine animale, et ça par l'absence à des niveaux inacceptables de substances indésirables et de germes pathogènes dans les produits qui peuvent causer des problèmes de santé pour l'homme.

IV. LES CHAMPIGNONS MYCOTOXINOGENÈS

1. Définition

Le règne des champignons renferme 65000 à 100 000 espèces différentes et les moisissures constituent 20 000 espèces. La plupart des moisissures sont des saprophytes, mais certaines peuvent être photogènes pour les végétaux et les animaux (Riba, 2008). Les moisissures peuvent devenir visibles, lorsque leur développement est important. Ce sont de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères, capables de se développer sur des substrats nutritifs variés et tout particulièrement sur les denrées alimentaires, il s'agit d'organismes hétérotrophes.

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et parfois parasites, caractérisés par la nature chimique de paroi cellulaire riche en chitine, la reproduction par spores sexuées ou asexuées et l'absence de la chlorophylle.

2. Classification des champignons

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

« phylum »: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota et Basidiomycota.

- *Chytridiomycota* Produisant des spores mobiles uni-flagellées.
- *Zygomycota* à spores non flagellées et à thalle siphonné.
- *Ascomycota* à spores non flagellées, à thalle septé et formant en général 8 ascospores à l'intérieur de chaque asque.
- *Basidiomycota* 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. Identification des champignons

L'identification des espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments est basée sur la comparaison des critères d'ordre morphologique, physiologique et écologique, après leur culture sur différents milieux appropriés (Guarro *et al.*, 1999). Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères culturaux 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 (Tabuc, 2007).

V. LES CHAMPIGNONS PRODUCTEURS D'AFLOATOXINE ET D'OCHRATOXINE A

1. Le genre *Aspergillus*

1.1. Définition

C'est un genre appartenant à la classe des Ascomycètes (Ordre des Eurotiales, famille des Trichocomaceae). Le mycélium, hyalin ou coloré, portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965).

Les *Aspergillus* sont répandus dans la nature et ont une répartition géographique très large, mais ils sont plus souvent associés aux régions à climats chaudes (Pitt et Hocking, 1997). ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales, les épices, etc. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). Plusieurs espèces du genre *Aspergillus* sont capables de coloniser de nombreux produits d'origine végétale et de produire des mycotoxines (Scheidegger et Payne, 2003). Parmi les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines (AFs), les ochratoxines (OTA) et la patuline, ont une incidence économique et sanitaire. Ces mycotoxines ont été identifiées la première fois chez *A. flavus*, *A. ochraceus* et *A. clavatus*, respectivement (Smith et Moss, 1985). Actuellement ces toxines peuvent aussi être produites par plusieurs autres espèces. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont consignées dans le tableau 03.

Tableau 03. 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 sydowii</i>	sterigmatocystine, griséofulvine
<i>Aspergillus terreus</i>	citréoviridine, citrinine, gliotoxine, patuline, terréine, acide terréique, terréonine, territrem, terramide A
<i>Aspergillus vericolor</i>	Stérigmatocystine
<i>Aspergillus wentii</i>	acide kojique

1.2. Les caractères morphologiques d'identification du genre *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 sclérotés (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. Ces dernières 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 04) (Raper et Fennell, 1965). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir (Tabuc, 2007).

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

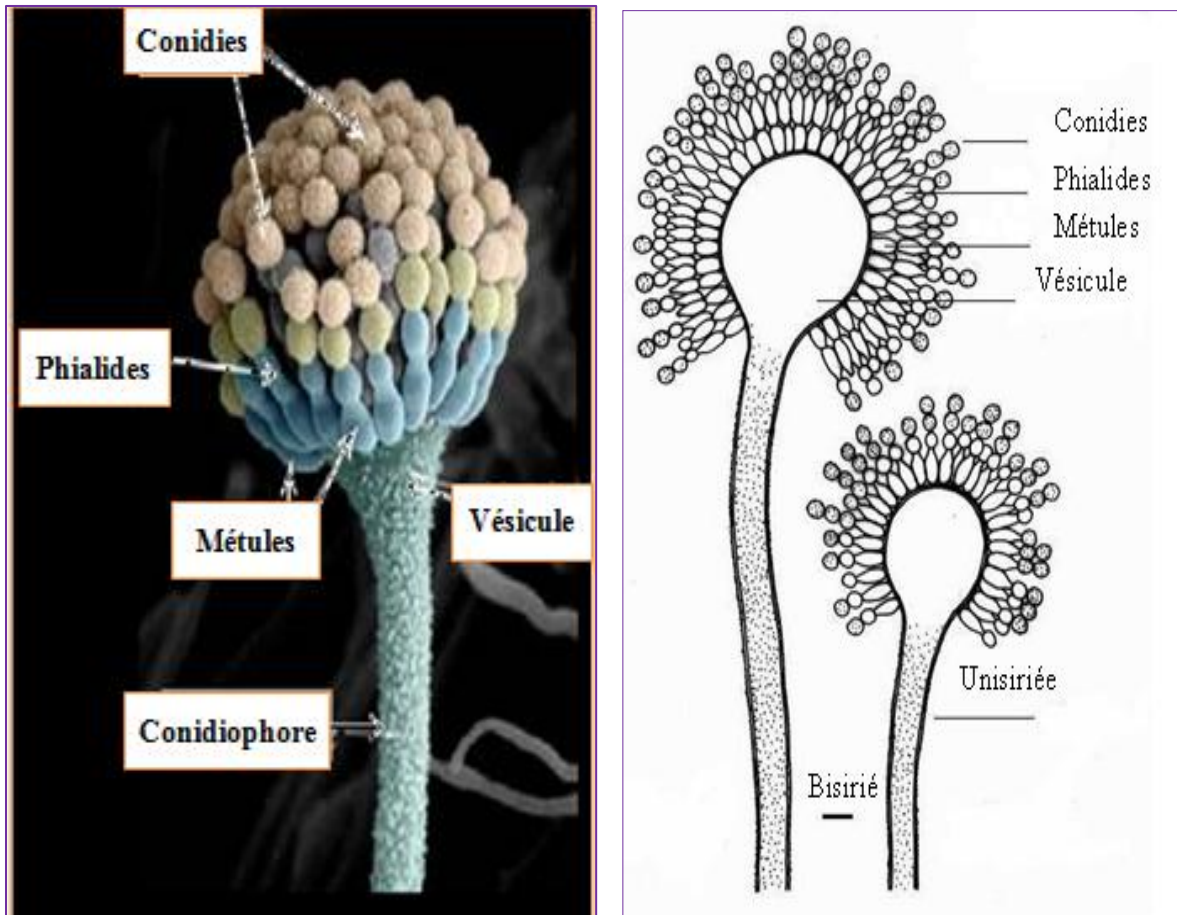


Figure 04. Caractères micro-morphologiques du genre *Aspergillus*
(www.thegourdreserve.com/mold/into.shtml).

1.3. Systématique des espèces d'*Aspergillus*

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

La classification du genre *Aspergillus* est actuellement organisée en sous genres et en 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'ADN (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*

Ces deux espèces 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). *Aspergillus flavus* se caractérise par un thalle vert jaune à vert olive, floconneux, plus dense vers le centre, lâche en périphérie, un revers orange caractéristique est observé. Les têtes aspergillaires ont une vésicule hémisphérique, *A. flavus* est divisé en deux groupes non distincts morphologiquement. Le groupe I comprend les types « L » et « S » producteur d'aflatoxine B et le groupe II comprend uniquement le type « S » capable de produire les AFs B et G. Ces auteurs ont suggéré que les isolats de type « S » (groupe II) méritent d'être considérés comme une nouvelle espèce (Geiser *et al.*, 2000). D'après Hua Sui-Sheng (2002), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le type « L » comprend des isolats producteurs et non producteurs d'aflatoxine.

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

1.3.2. *Aspergillus* section *Circumdati*

Ce groupe est particulièrement bien connu pour sa production de l'ochratoxine A (Van der Merwe *et al.*, 1965). Les espèces d'*Aspergillus* section *Circumdati* possèdent des conidies de couleur jaunes à ocres et des sclérotés de couleur brun clair à brun foncé, et produisent au moins un des métabolites suivants: ochratoxines, acide pénicillique, xanthomegnines ou malléine (Samson *et al.*, 2006).

➤ *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 d'*A. ochraceus* sont poudreuses ou granuleuses, blanches au début, puis jaunes ou ocre-jaunes à chamois. Le revers de colonies est incolore ou 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 schématique, 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
-------------	-----------------	---------------------------	------------------------------	-----------------------------------	-------------------

Etude bibliographique

				(%)	
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	Arino, 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	55-62	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>	89	49,4	Bankole, 2004	
Venezuela	<i>A. flavus</i>	Nd	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		<i>A. ochraceus</i>	85	93,6	Trucksses, 1999
Lituanie	seigle	<i>Aspergillus</i> spp.	22	6,3-6,8	Baliukoniene, 2003
Corée	riz	<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.

I. MATERIEL

1. L'aliment de la vache laitière

Dans cette étude nous avons travaillé sur des échantillons de l'alimentation de la vache laitière, matière première tels que le (Maïs, orge, Tourteaux de soja et son de blé) et Aliment composé (farine et granulé), prélevés au niveau des unités de fabrication de l'Office national de l'Aliment de Bétail (ONAB)- Blida, unités d'Aliment de Bétail (UAB)-Alger et Sarl diam Grain (SDG) – Blida, ainsi que d'autres échantillons commercialisés ont été collectés au niveau des marchés des différentes régions d'Algérie.

Les produits qui rentrent dans la composition de l'aliment sont en majorité importés. L'Office National d'Aliment de Bétail (ONAB) étant l'unique importateur étatique à l'échelle Nationale et assure l'approvisionnement en matière première de toutes les Unités d'Aliment de Bétail, relevant des Groupe Avicoles Centre, Est et Ouest. La matière première est acheminés en vrac vers les divers Unités d'Aliment de Bétail. Cette matière première est stockée dans des silos, puis transformée en produits finis tels que l'Aliment pour la vache laitière. La fabrication des divers produits se fait lors de la réception des commandes afin de satisfaire les besoins des divers clients. Ces produits finis sont commercialisés dans des sacs en carton de 50 kg (Figure 05).



Figure 05. Le stockage d'aliment composé farine dans des sacs en carton au niveau d'UAB d' Alger (à gauche) préparés pour la commercialisation, et Tourteaux de soja en vrac à SDG de Blida (à droite).

2. Les milieux de cultures

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

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

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

3. Souches de références

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

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'AF B et G produite par *Aspergillus parasiticus* et l'OTA produite par *A. ochraceus* (souches appartenant au LBSM).

II. MÉTHODES

1. Collecte des échantillons et méthode de prélèvements

La collecte des échantillons a été réalisée durant la période allant du début du mois d'Avril à Mai de l'année 2014, au niveau des unités de fabrication de l'Office national de l'Aliment de Bétail (ONAB)- Blida, unités d'Aliment de Bétail (UAB)-Alger et Sarl diam Grain (SDG) – Blida, ainsi que d'autres échantillons commercialisés ont été collectés au niveau des marchés des différentes régions d'Algérie. Les échantillons étaient prélevés de chaque ingrédient selon la disponibilité, à partir des différents établissements, ces derniers concernés par notre étude sont représentés dans le (Tableau05), Le prélèvement des échantillons s'est effectué à l'aide d'une sonde utilisée à cet effet pour atténuer les risques de contamination, ou la modification du degré d'humidité (figure 06).

Nous avons prélevé trois à cinq échantillons primaires (sous échantillons) au moment où les aliments sont passés par les processus de fabrication ou d'une livraison complète, et ça à partir de la surface et des couches profondes du compartiment de stockage mais aussi prélevé certains échantillons sur les côtés ou les rebords du compartiment (endroits différents), qui sont plus propices à l'apparition de moisissures (Tarr, 2003). Les échantillons prélevés sont bien mélangé, 1kg d'échantillon est retiré et conservé dans un lieu sec et frais. Tous les échantillons sont conservés dans des sacs en plastique à double épaisseur, et sont mis dans des sacs étiquetés et acheminés au laboratoire de biologie de système microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.



Figure 06. Méthode de prélèvement à l'aide d'une sonde, des échantillons mis dans des sacs étiquetés et acheminés au laboratoire (LBSM).

2. La région étudiée

Les établissements concernés par notre étude sont représentés par des unités de Fabrication d'alimentation animale, située au niveau des wilayas d'Alger et Blida. Ces unités utilisent des broyeurs et des mélangeurs pour fabriquer le produit fini, qui est remplie dans des grands sacs en carton de 50 Kg et livré vers les vendeurs d'alimentation animal compris la vache Laitières.

- ❑ Les unités de fabrication utilisent des broyeurs et des mélangeurs pour fabriquer le produit fini, qui est soit sous forme de farine (moulu) (Figure 07), soit granulé (Figure 08).
- ❑ Les établissements d'entreposage stockent la matière première dans des silos (maïs et orge) (Figure 09), ou en vrac (tourteaux de soja et son de blé).

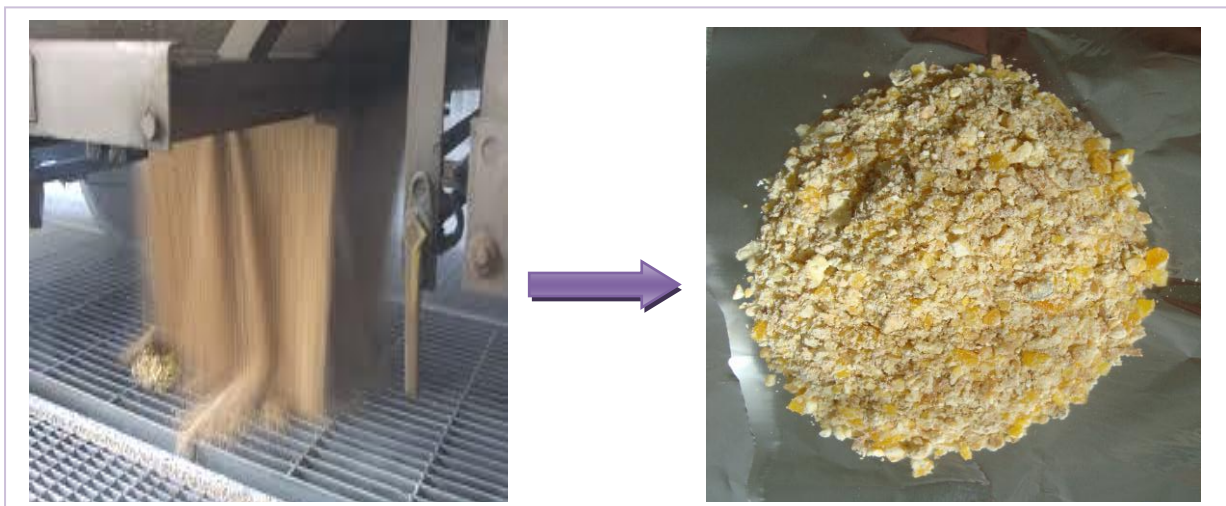


Figure 07. Fabrication de produit fini, sous forme de farine (moulu).



Figure 08. Fabrication de produit fini, sous forme granulé.

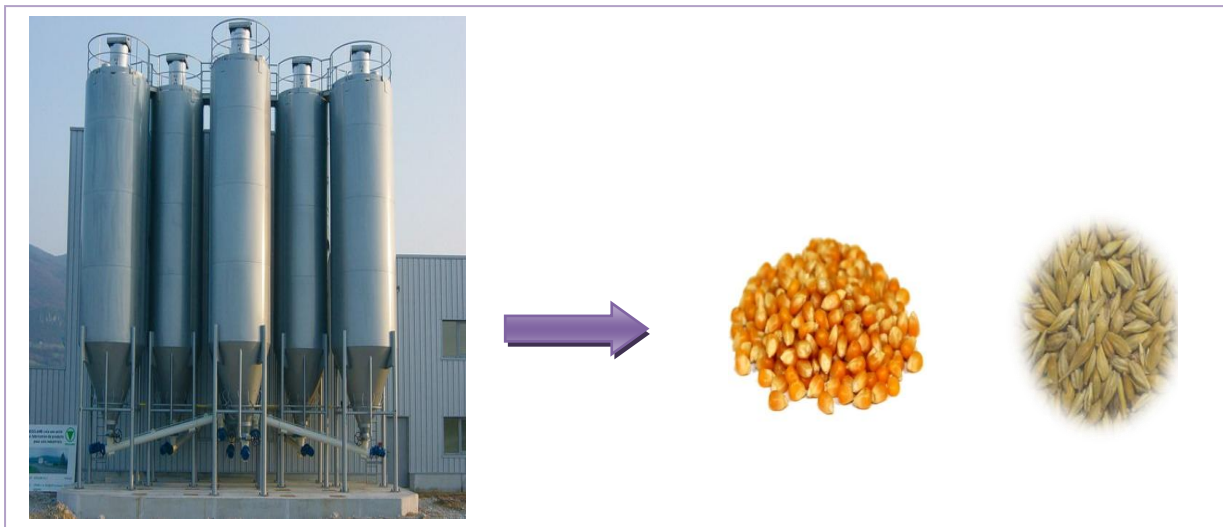


Figure 09. Stockage de matière première dans des silos (maïs et orge).

3. Nature des prélèvements effectués

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

3.1. La matière première

La matière première est constituée par le maïs, orge, tourteaux de soja et son de blé) pour le maïs importé des différents pays (amériques, brésil, argentine et mexique) et locale (alger), orge importé (amérique) et local (alger), tourteau de soja (importé) et son de blé local (Figure 10). Un ensemble d'échantillons était prélevé de chaque ingrédient, à partir des différentes unités de fabrication et à des périodes différentes (tableau 05).

3.2. L'aliment composé (Farine et granulé)

Ce sont des mélanges alimentaires pour animaux, produits à partir de matières premières et additifs divers. Ces mélanges sont élaborés en fonction des besoins spécifiques de l'animal cible. Ils sont fabriqués par des professionnels sous forme de farine ou granulés (Figure 10)



Matières Première (Maïs, orge, Tourteaux de soja et sont de blé)



Aliment composé (Farine et Granulé)

Figure 10 : Représentation des échantillons (Matière première et l'aliment composé).

Tableau 05. Dates des prélèvements, poids, nombre et origine des échantillons de la matière première et d'aliment composé prélevées.

Origine	Echantillon		Nombre d'échantillons	Dates des prélèvements	Poids (Kg)
Unité de fabrication (ONAB, BLIDA)	Maïs		1	09/04/2014	1
	Orge		1	15/04/2014	
	Tourteau de soja		2	09/05/2014	
Unité de fabrication (UAB, ALGER)	Maïs		4	25/05/2014	1
	Orge		2	26/05/2014	
	Tourteau de soja		6	28/05/2014	
	Son de blé		2	18/05/2014	
	Aliment composé	Farine	2	02 /05/2014	
		granulé	5		
Unité de fabrication Sarl Diam Grain (SDG, BLIDA)	Maïs		2	01/04/2014	1
	Tourteau de soja		3	9/04/2014	
				16/04/2014	
Commercialise BLIDA	Maïs		9	01/04/2014	1
	Orge		5	12/04/2014	
	Tourteau de soja		5	18/05/2014	
	Sont de blé		1	20/05/2014	
	Aliment composé	Farine	4	24/05/2014	
		granulé	1	28/05/2014	
Nombre total d'échantillons : 55					

4. Analyses physico-chimiques

4.1. Détermination du taux d'humidité relative

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

4.2. Détermination du pH

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

➤ Mode opératoire

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

5. Isolements et dénombrement de la flore fongique

L'isolement et le dénombrement de la flore fongique associée à l'alimentation de vache laitière a été réalisé en appliquant deux techniques de détection :

5.1. La méthode de dilution (indirecte)

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

Mettre 10g de chaque échantillon broyées dans un flacon de 250 ml contenant 90 ml d'eau distillée stérile additionnée de tween 80 à raison de 50 ul de tween par 5 ml d'eau (pour la désperstion des spores) et homogénéiser par agitation durant 15 min. Les dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3}) sont réalisées à partir de la solution mère qui présente la dilution 10^{-1} . Cent microlitres de chaque dilution sont étalé sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu DRBC (King *et al.*, 1979). Les boites sont incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours à l'obscurité (Figure11). Deux répétitions sont réalisées par dilution.

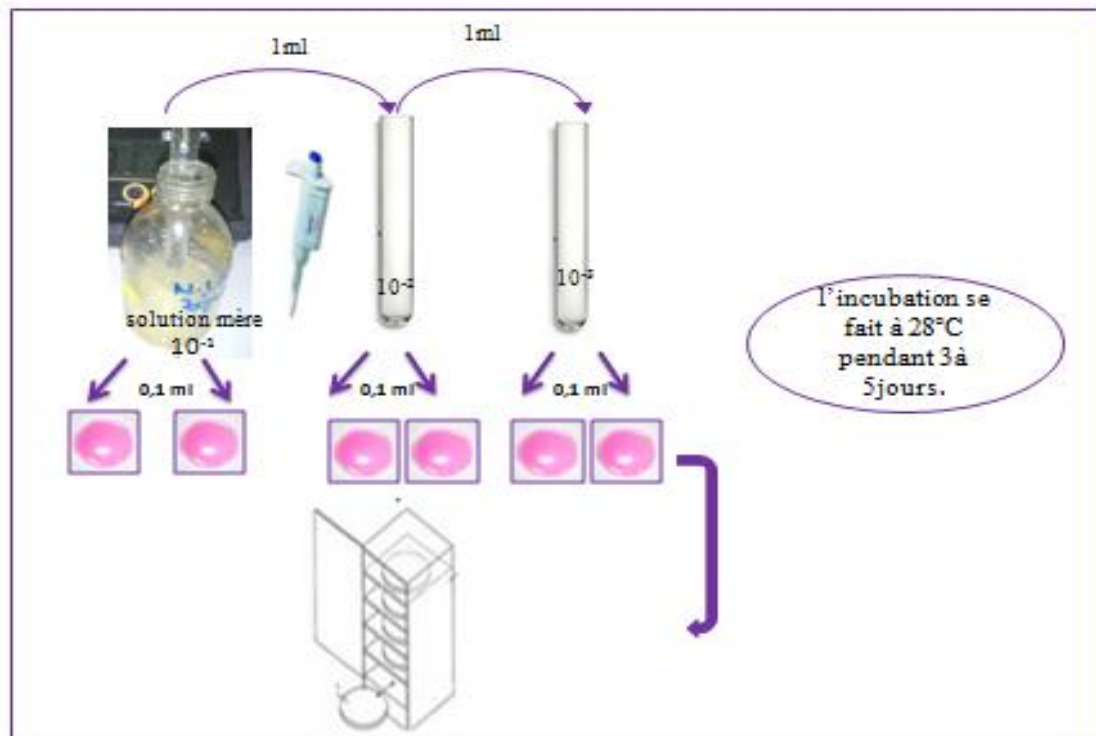


Figure 11. Technique de dénombrement par étalement en surface.

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

5.2. Méthode des grains (Direct Plating)

Elle consiste à ensemercer les grains de maïs ou d'orge directement sur milieu d'isolement (DRBC). À raison de 10 grains par boîte (10 graines / boîtes) après désinfection superficielle, en utilisant l'hypochlorite de sodium (NaClO₃) afin d'éviter la contamination éventuelle par le milieu extérieur (poussières d'autres sources). 30 grains de chaque échantillon, pris au hasard, sont introduits dans l'eau de javel à 0,5% pendant 1 min, ensuite lavés avec de l'eau distillée stérile trois fois de suite. Après ensemencement les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3 à 5 jours à l'obscurité (Figure12).

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

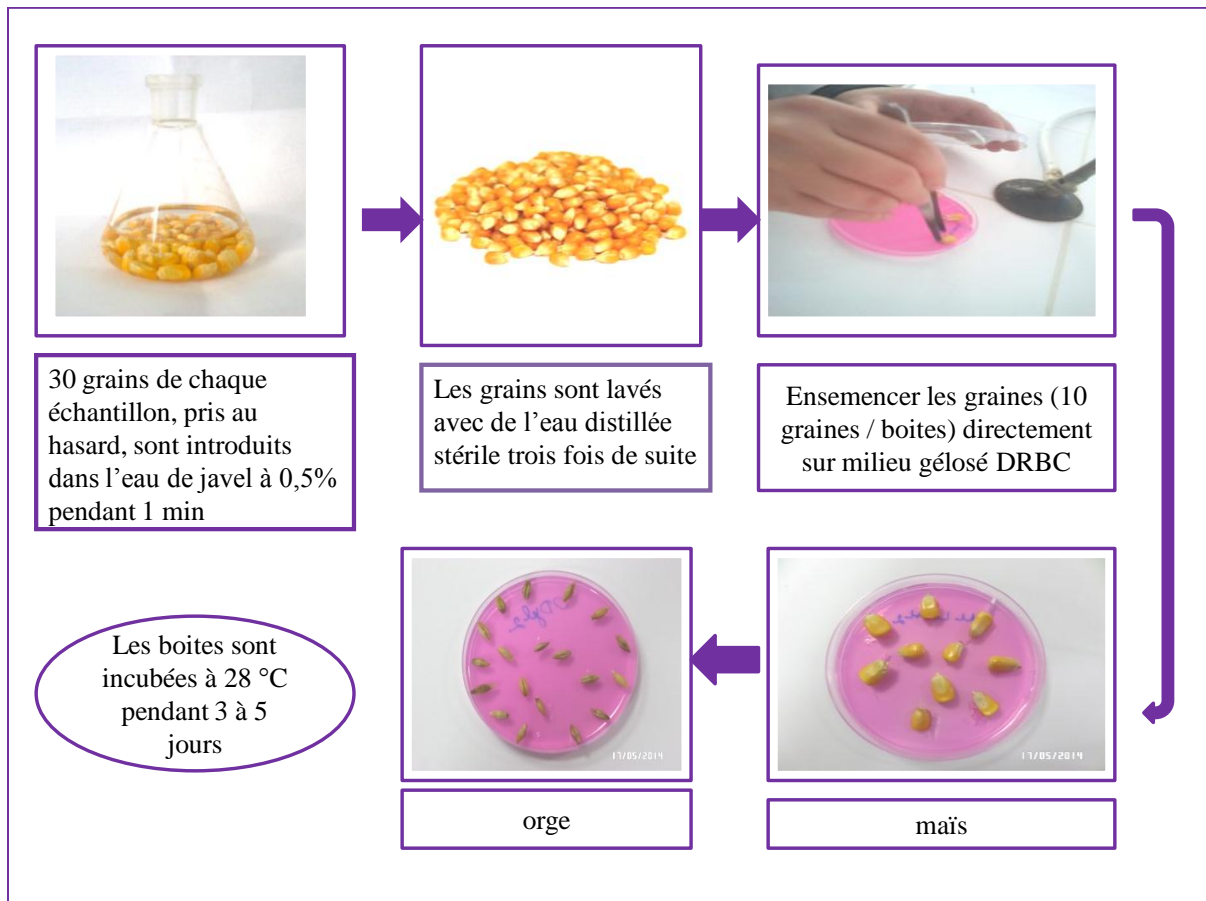


Figure 12. Méthode d'ensemencement direct des grains sur le milieu DRBC (Maïs et Orge).

6. Identification morphologique des isolats fongiques

6.1. 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.

6.2. Identification microscopique

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

6.2.1. Préparation microscopique ordinaire

On utilise une aiguille d'inoculation pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. Puis déposées

sur une lame « mouillées » avec une goutte d'eau puis on pose une lamelle de couverture. On procède ensuite à l'examen au microscope photonique (X100, X400).

6.2.2. Préparation microscopique à l'aide d'un ruban adhésif transparent

Une technique astucieuse peut parfois être utilisée. Elle consiste à effectuer le prélèvement à l'aide d'un morceau de ruban adhésif transparent que l'on plaque légèrement à la surface de la culture et au bord de la colonie, puis que l'on colle sur une lame de microscope, l'observation microscopique se fait au grossissement (X100 et X400).

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

6.3. Repiquage des souches d'*Aspergillus* sp.

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

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

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

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

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

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

7.1. Détection de la fluorescence d'aflatoxine sur milieu de culture

Le milieu favorable pour la détection de la fluorescence des aflatoxines est la gélose à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), additionné de 0,3% de β -cyclodextrine qui permet d'améliorer nettement l'intensité de la fluorescence. L'ensemencement des souches fongiques sur CAM se fait par point centrale (une souche par boîte). La méthode consiste à cultiver les isolats sur milieu CYA, favorable à la production d'OTA, pendant 7 jours à 28°C.

Dans le milieu CAM, les aflatoxines, combinées aux matières grasses de la noix de coco, donnent une fluorescence visible sous lumière U.V. (365 nm) surtout sur le revers de la colonie (Davis *et al.*, 1987). En effet, après 48 à 72 h d'incubation à 28°C, les isolats producteurs d'aflatoxines B et G développent autour de la colonie une fluorescence bleue et verte respectivement, visibles sous la lumière U.V. (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour.

7.2. Extraction d'aflatoxines et d'ochratoxine A

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

- Après 7 jours d'incubation, quatre rondelles (6mm de diamètre) de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte-pièce du centre vers la périphérie de la boîte de pétrie, les carottes découpées sont pesées puis introduites dans des tubes Eppendorf de 2 ml ;
- l'extraction des 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.

7.3. Détection et confirmation de la production d'AFs et d'OTA par CCM

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

La méthode de CCM consiste à déposer un spot de 10 à 15 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 1,5 cm du bord. Dans chaque plaque 10 à 11 échantillons sont déposés, espacés de 1,5cm. La séparation est effectuée, dans une cuve en verre fermée (20 x 20 cm), par le contact de la plaque avec la phase mobile. Le solvant de développement est le chloroforme-acétone (90:10 v/v) pour les aflatoxines et toluène- acétate d'éthyle-acide formique à 90% (50:40:10, v/v/v) pour l'ochratoxines A.

7.3.1. Préparation des plaques

Les plaques de gel de silice sont préparées par un mélange vigoureux de 25 g de gel de silice (Kieselgel 60 GF254) dans 70 ml d'eau distillée. La pâte obtenue est étalée immédiatement d'une manière uniforme sur des plaques en verre propre (20x20cm) à l'aide de l'étaleur de Desaga réglé pour obtenir une couche fine de 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques sont séchées à 40°C pendant une nuit et régénérées à 105°C pendant 1h juste avant utilisation (Figure13).

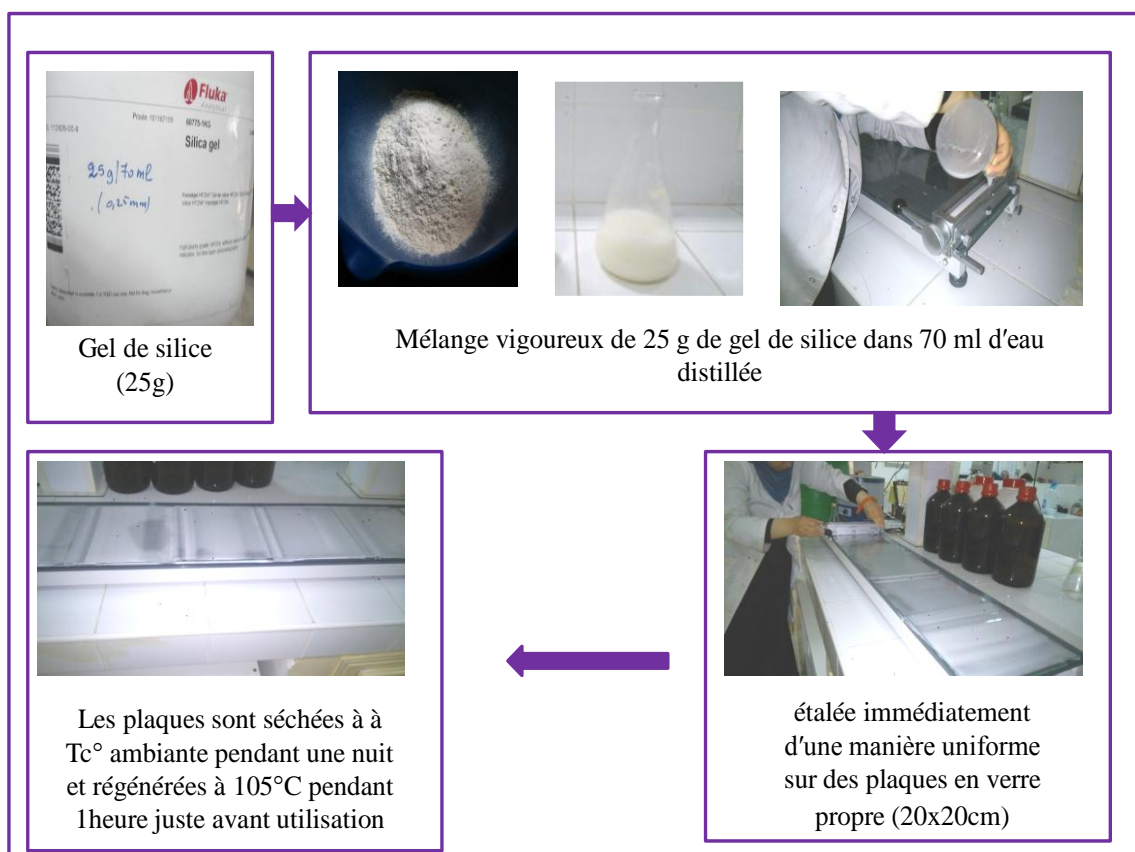


Figure 13. Les étapes de préparation les plaque CCM dans laboratoire.

7.3.2. Dépôt des extraits et analyse

- A l'aide d'une règle, tracer des points éloignés de 2 cm au bord de la plaque, et espacés entre eux de 1,5cm (11 points par plaque).
- Aspirer par une micro-seringue 15 μ l de l'extrait à analyser et le déposer soigneusement sur le point tracé sur la plaque de CCM, en évitant d'abîmer la surface de la plaque. Pour éviter d'avoir de grosses taches sur la plaque, le volume à déposer est spoté délicatement à petites gouttes puis séchées à l'aide d'un séchoir.
- Un témoin contenant une solution standard (AF ou OTA) est déposé sur chaque plaque.
- Saturer la cuve de la CCM, en déposant une feuille de papier imbibée par la phase mobile sur la paroi de cette cuve.
- Déposer les plaques verticalement dans la cuve qui contient la phase mobile de la séparation. Le solvant migre jusqu'à ce qu'il atteigne la ligne limite du bord supérieur. Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher à température ambiante pendant 15 à 20 minutes.
- Pour la détection des aflatoxines et d'ochratoxine A, placer les plaques sous lumière UV (365 nm). Les AFs B sont caractérisés par une tache bleue et les AFs G par une tache verte.

I. RESULTATS

1. Analyses physicochimiques

1.1. Humidité relative

Nos résultats montrent que tous les échantillons de matière première (maïs, orge, tourteaux de soja, son de blé et aliment composé (farine et granulé) sont peu hydratés, les valeurs moyennes de l'humidité relative étaient généralement entre 8,94 % et 11,84%, (Tableau 06).

Tableau 06. Taux de l'humidité relative et nombre des échantillons analysés.

Produits	Nombre d'échantillons	Le Moyen d'Humidité Relative
Maïs	16	8,94
Orge	9	9,67
Tourteaux de soja	15	10,5
Son de blé	3	11,83
Aliment composé (Farine)	6	10,33
Aliment composé (granulé)	6	11,84

1.2. Le pH

Les résultats du pH des différents échantillons analysés (maïs, orge, tourteaux de soja, son de blé et aliment composé), indiquent que l'ensemble des échantillons sont légèrement acide avec des valeurs comprises dans l'intervalle de 5,89 et 6,55 (Tableau 07).

Tableau 07. Le pH de différents échantillons de matière première et aliment composé.

Produits	Nombre d'échantillons	Le Moyen de pH
Maïs locale	4	6,20
Maïs importé	12	6,19
Orge Locale	5	5,98
Orge importé	4	5,89
Tourteaux de soja	15	6,55
Son de blé	3	6,47
VL. Farine	6	6,23
VL. granulé	6	6,19

2. Analyse de la flore fongique des échantillons de la matière première et d'aliment composé

Cette étude a été conduite dans le but d'isoler et d'identifier la microflore fongique qui contamine la matière première (maïs, orge, tourteaux de soja et son de blé), et d'aliment composé (farine et granulé). Et de rechercher les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A (en particulier les champignons appartenant au genre *Aspergillus*). Après 5 jours d'incubation, nous avons observé des colonies différentes, identifiées selon les critères d'identifications macroscopiques et microscopiques.

2.1. Distribution des genres fongiques dans les échantillons de matière première et d'aliment composé analysés

Nous avons analysé 55 échantillons (43 échantillons de matière première et 12 échantillons d'aliment composé) durant Avril, Mai 2014) conservés au niveau de L'Office National d'Aliment de Bétail (ONAB) Blida, Unité d'aliment Bétail (UAB) Alger, Sarl Diam grain (SDG) Blida et autre échantillons commercialisé de Blida. Après l'identification et le dénombrement des champignons, tous les résultats de l'analyse fongique sont consignés dans les tableaux 08 et 09. .

Les méthodes utilisées dans cette étude sont la méthode de dilution qui donne les résultats en unité formant de colonie par gramme (UFC/g) appliquer pour le tourteaux de soja , son de blé et aliment composé (farine et granulé), et la méthode des grains (direct Plating) qui consiste à ensemencer directement les grains sur le milieu DRBC pour les échantillons de maïs et d'orge, qui donne les résultats par pourcentage (%). Ces méthodes démontrent qu'il y'a une variabilité considérable dans les résultats données.

2.1.1. Résultats de la méthode de dilution

Les résultats de l'analyse des différents échantillons de matières premières (tourteau de soja, son de blé) et d'aliment composé (farine, granulé) sont obtenus par l'utilisation de la méthode de dilution. La Densité de la flore fongique totale varie entre $3,73 \cdot 10^4$ et $6,27 \cdot 10^3$ et la densité moyenne est de $16,43 \cdot 10^3$ ufc/g. les échantillons les plus contaminés sont l'aliment farine et son de blé dont les densités varient entre $3,73 \cdot 10^4$ et $1,33 \cdot 10^4$ ufc/g (Tableau10), et montrent une dominance relative du genre *Aspergillus* dans les échantillons de tourteau de soja, son de blé et aliment granulé avec un taux de 56,5%, 41,6% et 48,3% respectivement suivie de l'aliment farine avec un taux de 16,8% (tableau 08).

Le genre *Penicillium* a enregistré un taux de contamination très faible dans les échantillons de tourteau de soja , son de blé et aliment composé farine et granulé avec un taux de 10,3%, 8,6% , 16,1% et 9,6% respectivement, Le genre *Fusarium* est dominant dans les échantillons de l'aliment composé farine avec un taux de 49,3% uniquement, et pour les échantillons de tourteau de soja ,son de blé et l'aliment granule le taux enregistré est 8,8% , 9,6% et 10,1% respectivement (tableau 08).

Ainsi les taux de contamination enregistrés pour les autre champignons dans les échantillons de tourteau de soja, son de blé, aliment farine et granulé sont 24,4%, 40,2%, 17,8% et 32% respectivement (tableau 08).

Tableau 08. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés dans la matière première et l'aliment composé par la méthode dilution.

Les produits		FFT (UFC /g)	<i>Aspergillus</i> (%)	<i>Penicillium</i> (%)	<i>Fusarium</i> (%)	Autres (%)
Matières premières	Tourteau de soja	$6,27. 10^3$ $\pm 67222,92$	56,5	10,3	8,8	24,4
	Son de blé	$1,33. 10^4$ $\pm 8751,84$	41,6	8,6	9,6	40,2
Aliment composé	VL. Farine	$3,73. 10^4$ $\pm 5501,21$	16,8	16,1	49,3	17,8
	VL .granulé	$8,88. 10^3$ $\pm 11967,66$	48,3	9,6	10,1	32

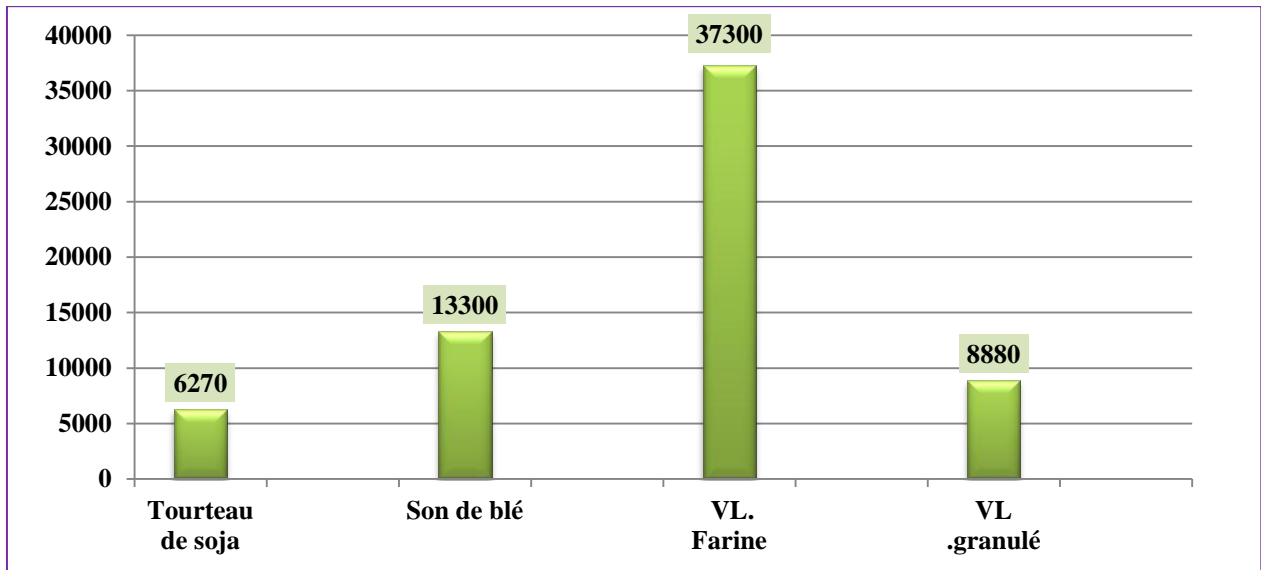


Figure 14. Densité de la flore fongiques totale (UFC /g) des différents échantillons de matières première et l'aliment composé.

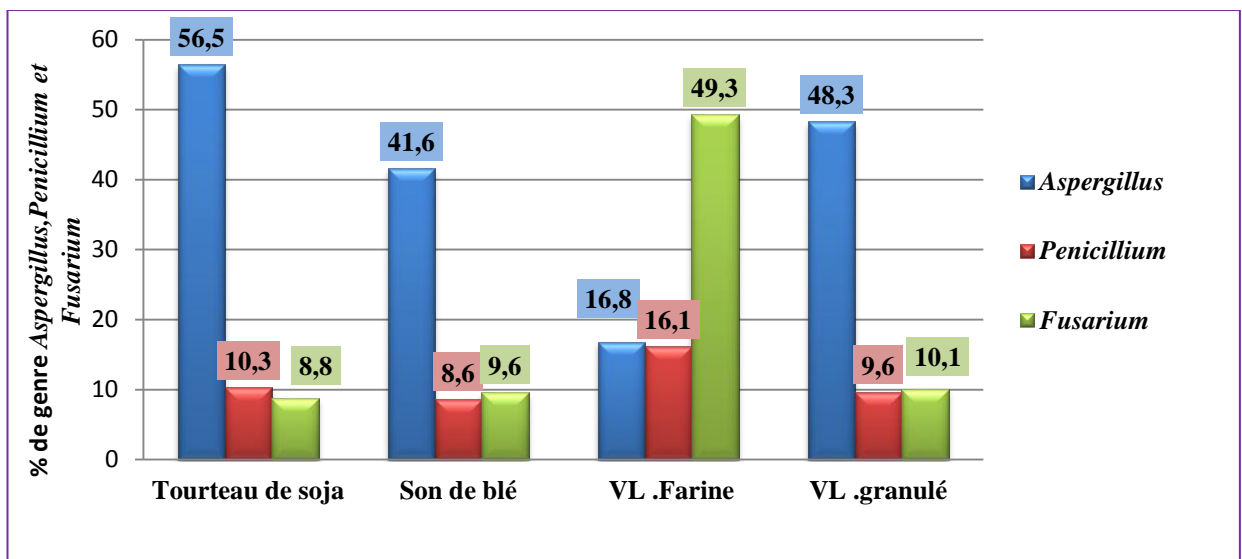


Figure 15. Fréquence des différents genres d'Aspergillus, Penicillium et Fusarium dans les échantillons de la matière première et l'aliments composés analysés .

2.1.2. Résultats de la méthode directe

Les résultats de l'analyse des différents échantillons de matière premières (maïs et orge) montrent que le taux de contamination obtenue par cette méthode est de 85,3% et 82,4% pour le maïs local et importé ce qui est très élevé , suivi par un taux de 61,4% et 56,8% pour l'orge local et importé respectivement, avec une codominance du genre *Aspergillus* 83,9% et 86,6 % dans le maïs local et importé dans l'orge local et importé le pourcentage est de 61,4% et 56,8% respectivement. Le genre *Penicillium* enregistre une fréquence très faible de 2,7 % ,1% et 23,5% dans les échantillons de maïs local , maïs importé et orge importé uniquement et respectivement, le genre *Fusarium* ; est présent dans tous les échantillons de maïs local et importé, et orge local et importé analysés avec un taux 5% , 5,8% et 3,8% , 8,5% respectivement. Nous avons remarqué aussi la présence de *Mucor* et des autres champignons dans ces échantillons (tableau 09).

Tableau 09. Distribution de la flore fongique et la fréquence des principaux genres isolés dans la matière première par la méthode directe.

Les produits	Taux de contamination (%)	<i>Aspergillus</i> (%)	<i>Penicillium</i> (%)	<i>Fusarium</i> (%)	<i>Mucore</i> (%)	<i>Autre</i> (%)
Maïs local	85,3	83,9	2,7	5	5,7	2,7
Maïs importé	82,4	86,6	1	5,8	1	5,6
Orge local	61,4	61,1	/	3,8	14	21,1
Orge importé	56,8	64	23,5	8.5	/	4

/ = absence

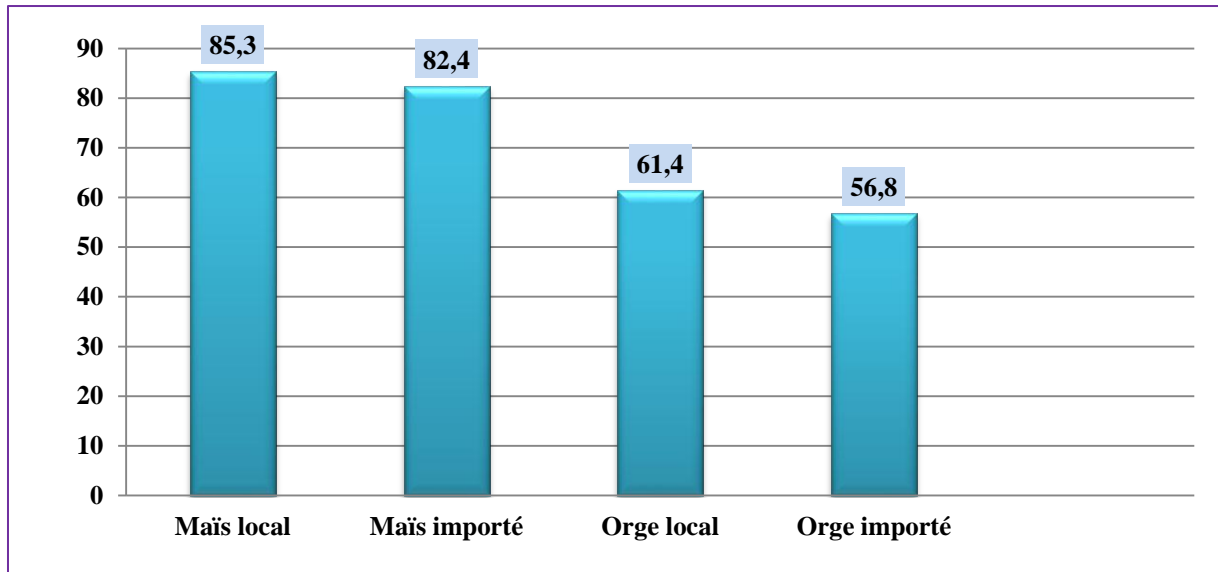


Figure 16. Taux de contamination des différents échantillons de matières première (maïs et orge).

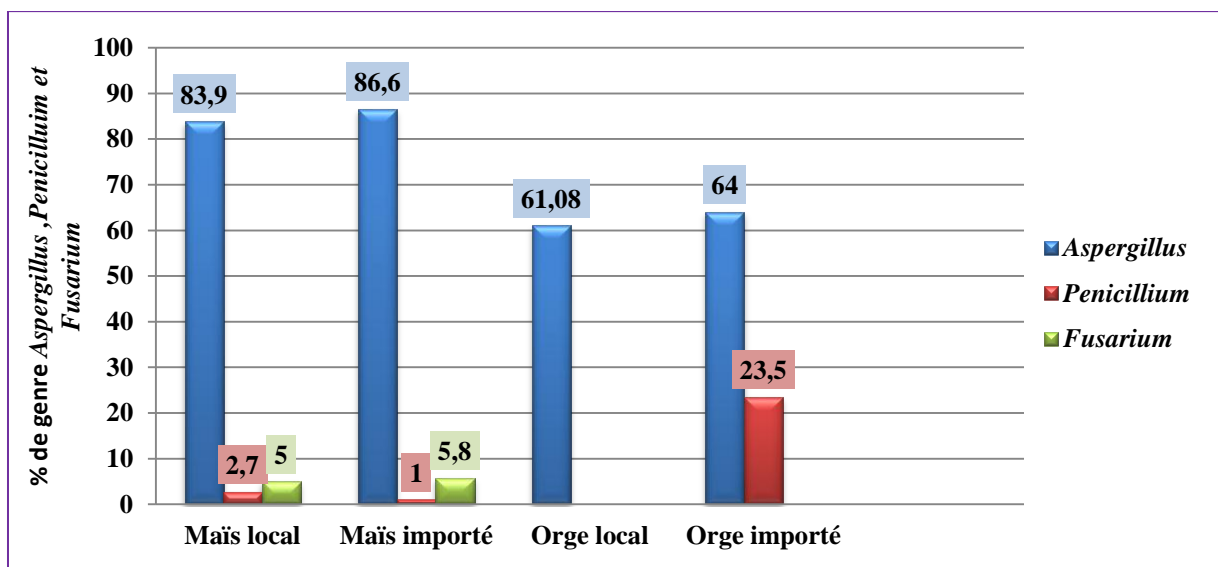


Figure 17. Fréquence des différents genres d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* dans les échantillons de la matière première analysés (maïs et orge).

3. Distribution des sections d'*Aspergillus* dans les échantillons de matière première et aliment composé analysés par les deux méthodes

3.1. Résultats de la méthode de dilution

Parmi les sections d'*Aspergillus* identifiées, *Aspergillus* section *Flavi*, est la plus dominante dans les échantillons de matière première et l'aliment composé, et à un degré moindre *Aspergillus* section *Nigri*, *Clavati*, *Candidi*, *Fumigati* et *Terrie* (figure 18).

Nous rappelons que les échantillons de matières premières (Tourteau de soja et son de blé) et l'aliment composé (farine et granulé) sont contaminés par le genre *Aspergillus* selon la méthode de dilution.

- *Aspergillus* section *Flavi* est isolée à partir de la majorité des échantillons de matières premières et d'aliment composé analysés. nous avons noté une contamination totale par cette section pour les échantillons de tourteau de soja, son de blé, aliment farine et granulé et avec un taux de 47,1%, 30,7%, 13,5% et 13% respectivement (figure 18).

Les autres sections présentes un taux de contamination très faible (figure 18).

- *Aspergillus* section *Nigri* ; cette section présente une faible contamination dans les échantillons de tourteau de soja et aliment composé farine qui sont contaminé avec un taux de 2% et 0,3% uniquement et respectivement.
- *Aspergillus* section *Clavati*; cette section est présente dans les échantillons de tourteau de soja uniquement avec un taux de 6,5%.
- *Aspergillus* section *Candidi*; cette section est présente dans tout les échantillons avec une faible contamination dans les échantillons de tourteaux de soja, son de blé, aliment composé farine et granulé avec un taux de 0,9%, 2,6%, 2,2% et 12,1% respectivement.
- *Aspergillus* section *Fumigati* ; avec une faible contamination dans les échantillons de son de blé, aliment composé farine et granulé avec un taux. 8,3%, 0,8 et 14% uniquement et respectivement.
- *Aspergillus* section *terrie* ; cette section présente une faible contamination dans les échantillons de l'aliment composé granulé avec un taux de 9,2%.

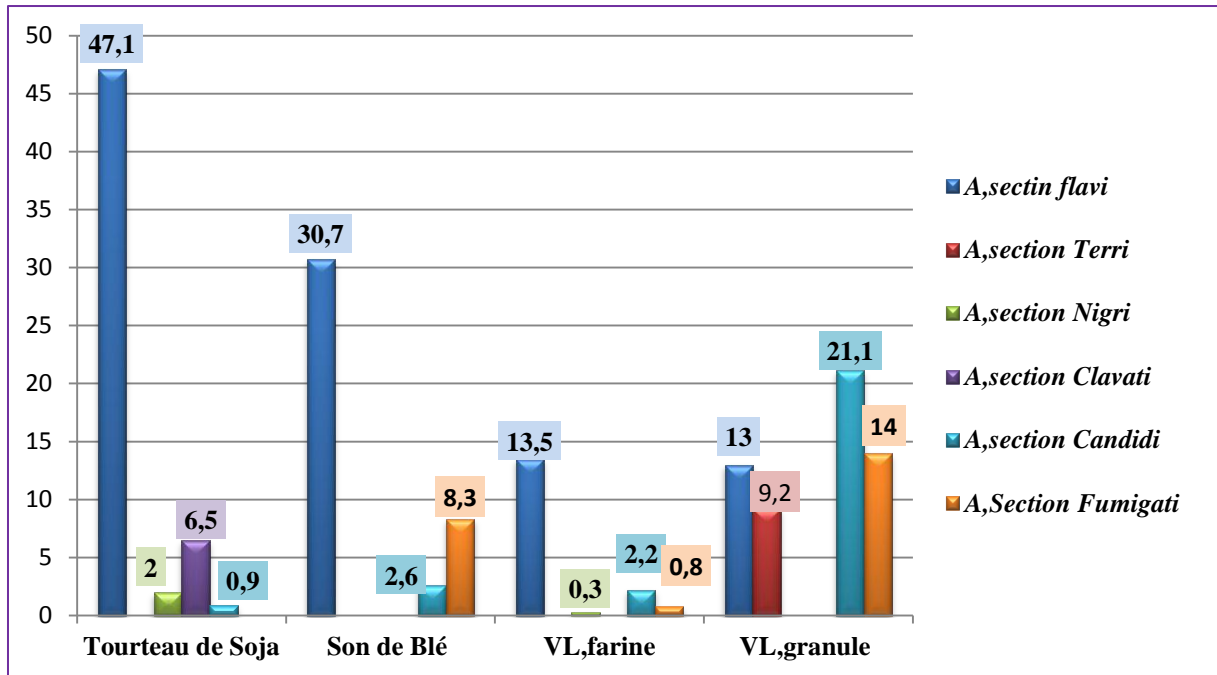


Figure 18. Fréquence des différentes sections d'*Aspergillus* dans les échantillons de la matière première (tourteau de soja et son de blé) et l'aliment composé analysés (farine et granulé).

3.2. Résultats de la méthode directe

Parmi les sections d'*Aspergillus* identifiées, *Aspergillus* section *Flavi*, est la plus dominante dans les échantillons de maïs et d'orge, à un degré moindre *Aspergillus* section *Nigri*, *Clavati* et *Fumigati* (figure19).

- *Aspergillus* section *Flavi* est isolée à partir de la majorité des échantillons de matières première analysé. Nous avons noté une forte contamination par cette section pour les échantillons de maïs local et maïs importé avec un taux de 61,7% et 51,9%, suivi par un taux de 50,8% et 64% pour L'orge locale et importé respectivement.
- *Aspergillus* section *Nigri* est la deuxième section avec des fréquences faibles dans les échantillons de maïs local, maïs importé et orge local avec un taux de 5,4 %, 2,6% et 3,24 % uniquement et respectivement.
- *Aspergillus* section *Clavati* ; cette section a montré une fréquence faibles dans les échantillons de maïs importé uniquement, avec un taux de 7,4%
- *Aspergillus* section *Fumigati* ; cette section présente des fréquences faibles à moyennes dans les échantillons de maïs local, importé et orge local uniquement qui sont contaminé avec un taux de 16,8%, 24,7 % et 7,03% respectivement.

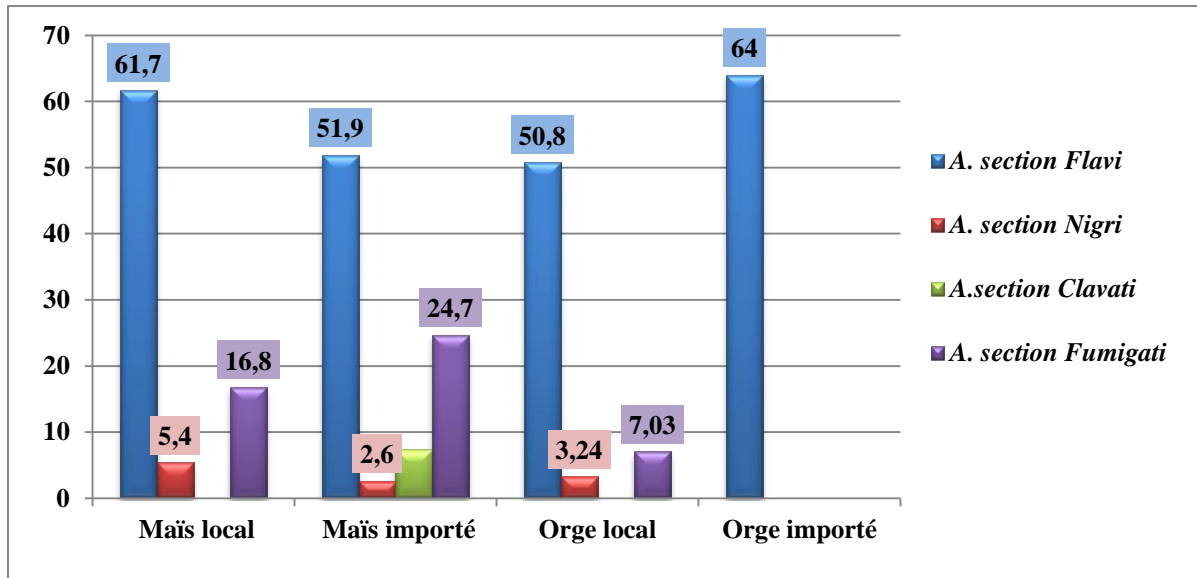


Figure19. Fréquence de différentes sections d'*Aspergillus* dans les échantillons de la matière première (maïs et orge).

4. Reconnaissance des genres et des sections

4.1. Reconnaissance des genres

Les principaux genres fongiques identifiés au cours de cette étude sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ils ont été identifiés selon les caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et de la texture de la colonie, sur le milieu d'isolement (DRBC), ainsi que les structures micro-morphologiques permet généralement de faire la distinction entre les principaux genres.

➤ Le genre *Aspergillus*

Les champignons de ce genre se caractérisent par des colonies mycéliennes poudreuses qui atteignent 2 à 3 cm de diamètre après 5-7 jours d'incubation sur milieu DRBC. Les teintes diffèrent selon les sections (figure20). Les conidiophores sont érigés, renflés à leur extrémité en une tête sphérique ou ovoïde. Suivant l'espèce, une ou deux rangées de stérigmates prend naissance sur les têtes (unisérié ou bisérié) (figure21).

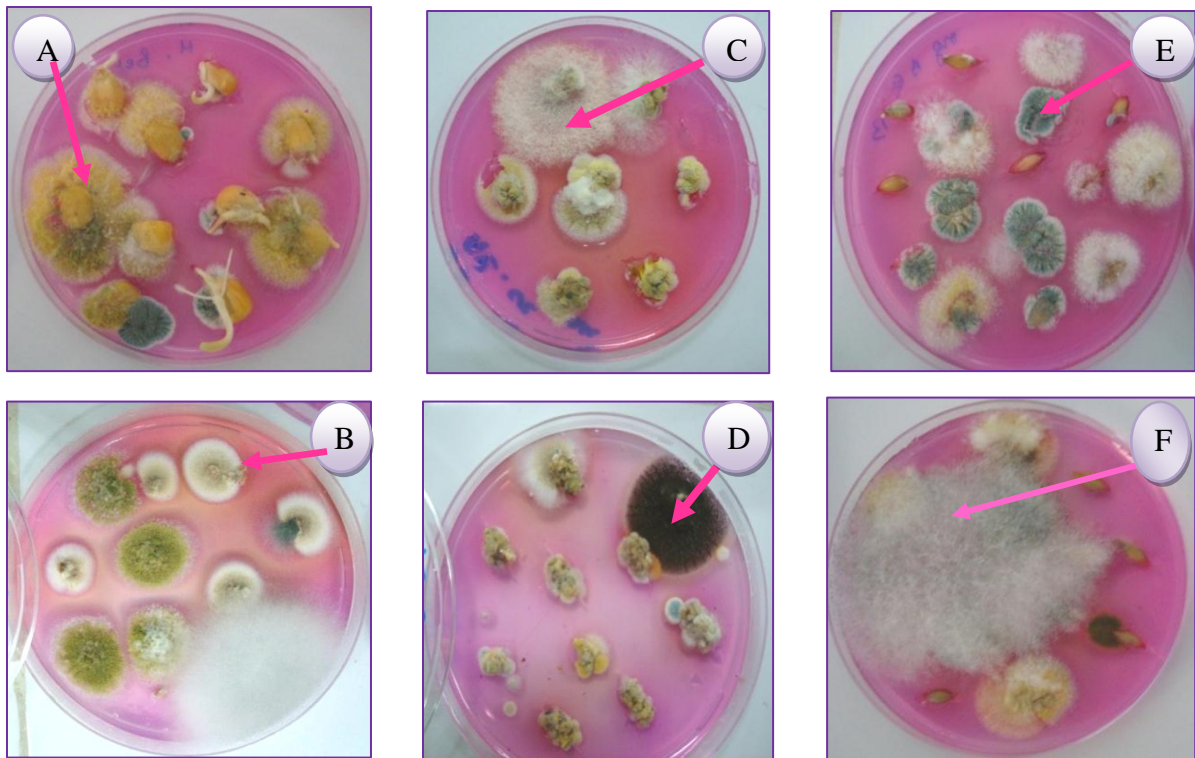
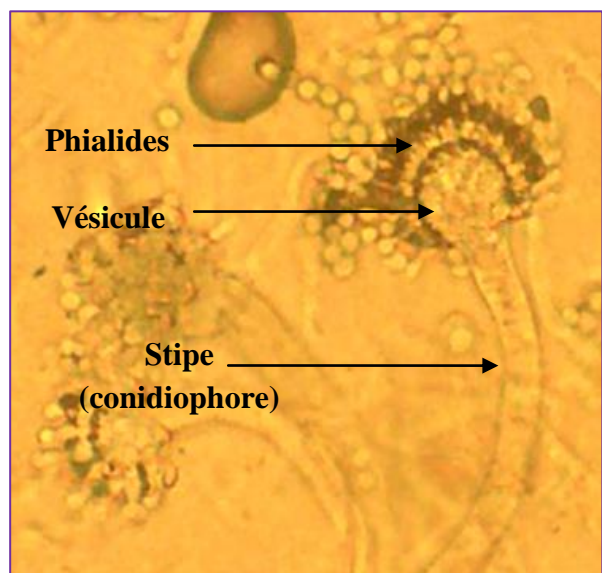


Figure 20. Aspect macroscopique des différents genres poussant sur milieu DRBC après 5 à 7 jours d'incubation à 28°C. A= *Aspergillus* section *Flavi*, B= *Aspergillus* section *Terrie* , C= Le genre *Fusarium*, D = *Aspergillus* section *Nigri*, E=Le genre *Penicillium* F=*Mucor*



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

Aspect microscopique (GX400).

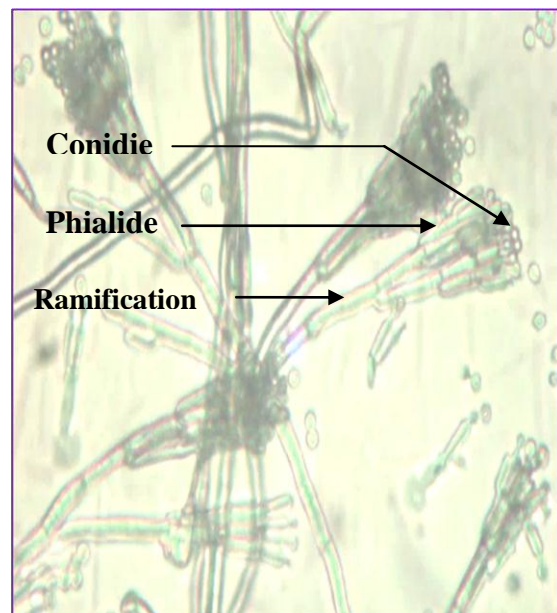
Figure 21. Aspect macro et microscopique du genre *Aspergillus* sp.

➤ Le genre *Penicillium*

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



Aspect macroscopique



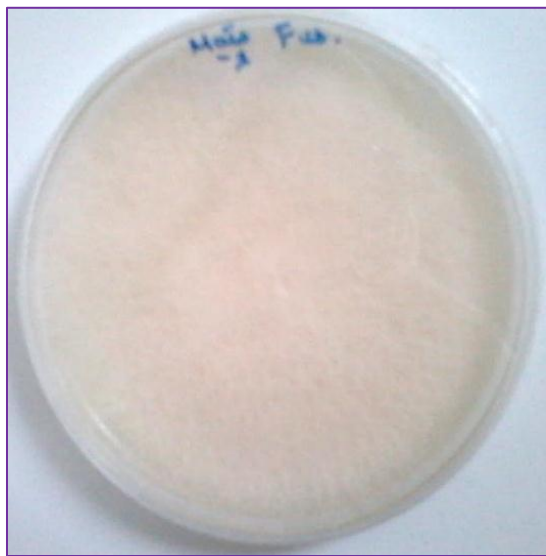
Aspect microscopique (G X400).

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

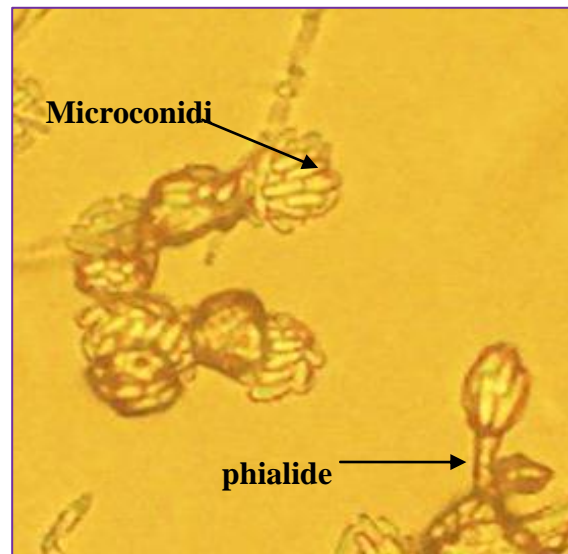
Figure 22. Aspect macro et microscopique du genre *Penicillium sp.*

➤ **Le genre *Fusarium***

Sur le milieu CYA, ce genre forme des colonies blanches a un diamètre de 4cm ou plus, envahit souvent toute la surface de la boîte de Pétri. Elle est plate, duveteuse, avec des phialides plus ou mois allongées. et produisent des microconidies ou macroconidies fusiformes cloisonnées (le nom de *Fusarium* vient du latin « *fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau) (figure 23).



Aspect macroscopique



Aspect microscopique (GX400).

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

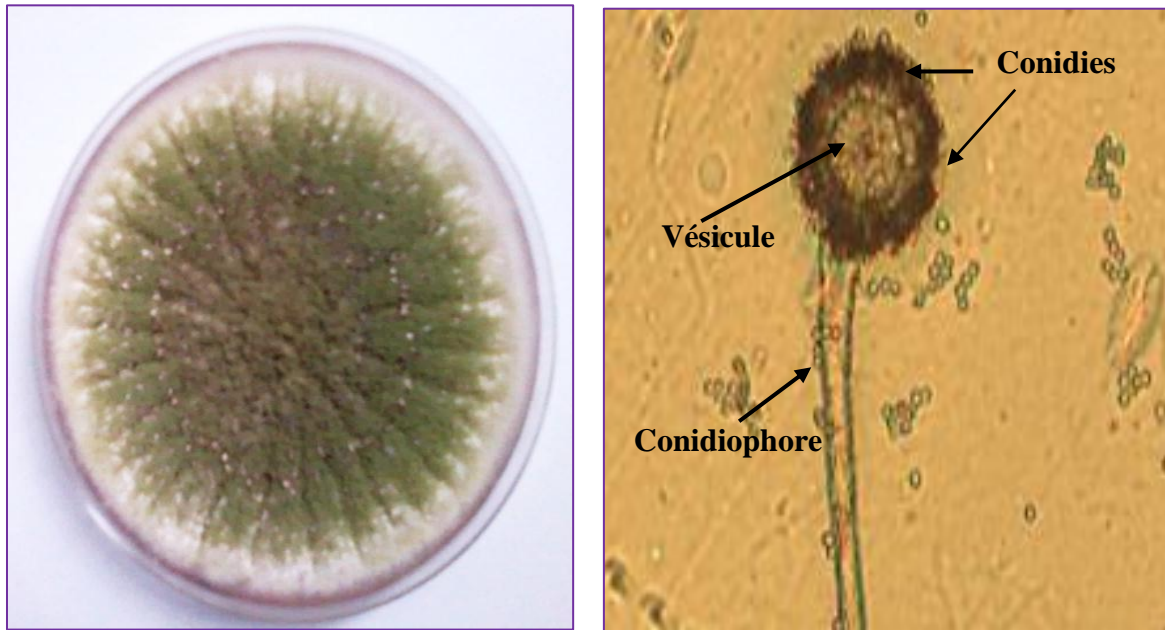
Figure 23. Aspect macroscopique et microscopique du genre *Fusarium sp.*

4.2. Reconnaissance des sections du genre *Aspergillus*

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

➤ *Aspergillus section Flavi*

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



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

Aspect microscopique (GX400).

Figure 24. Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus section Flavi*.

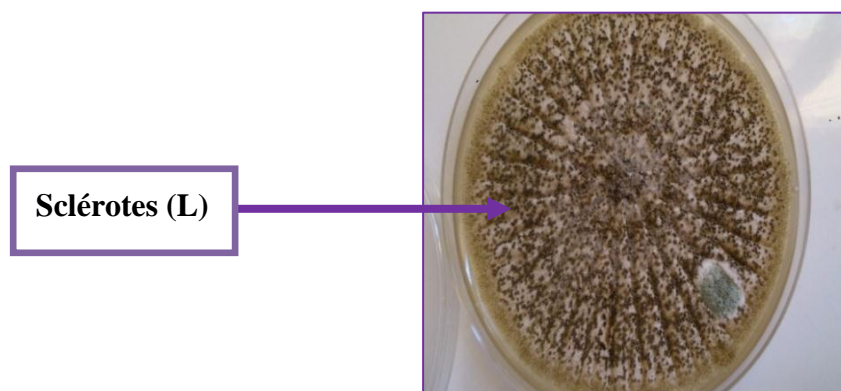


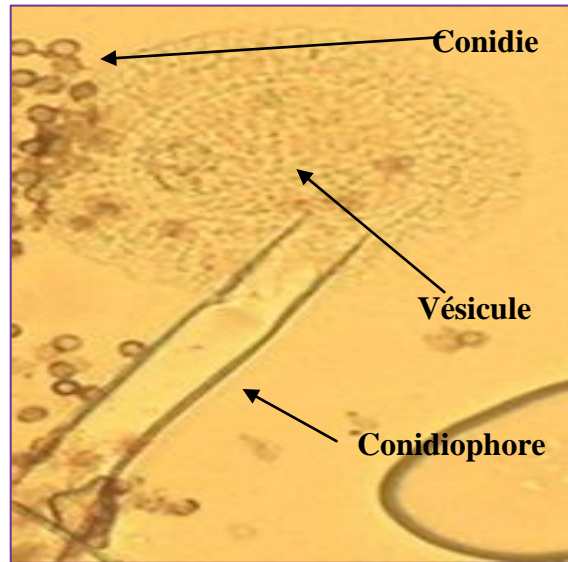
Figure 25. Aspect macroscopique des sclérotes de type « L » d'*Aspergillus section Flavi* sur milieu CYA à 28°C.

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

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



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

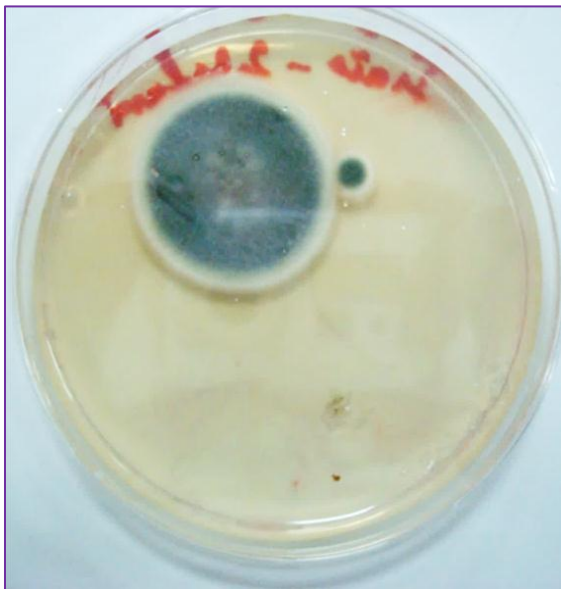


Aspect microscopique (G X40).

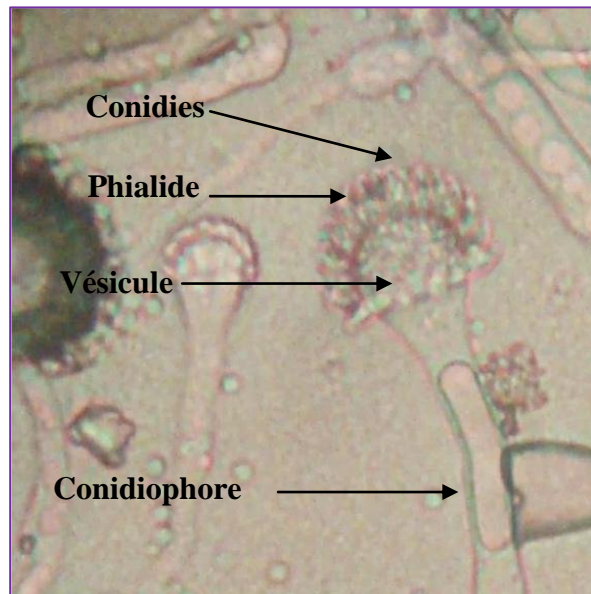
Figure 26. Aspect macroscopique d'*Aspergillus section Nigri*.

➤ *Aspergillus section Fumigati*

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



Aspect macroscopique



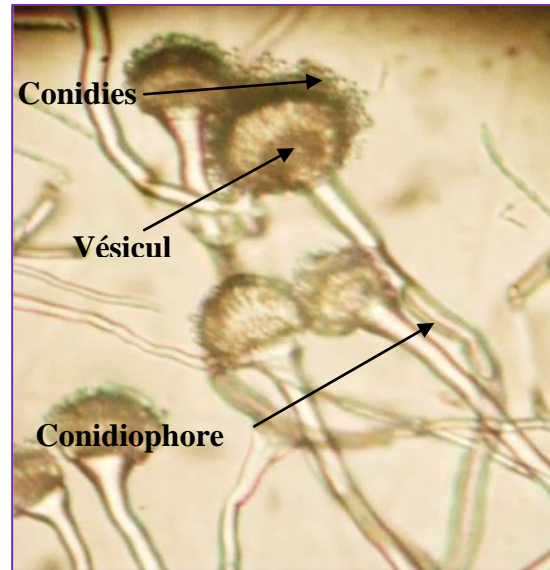
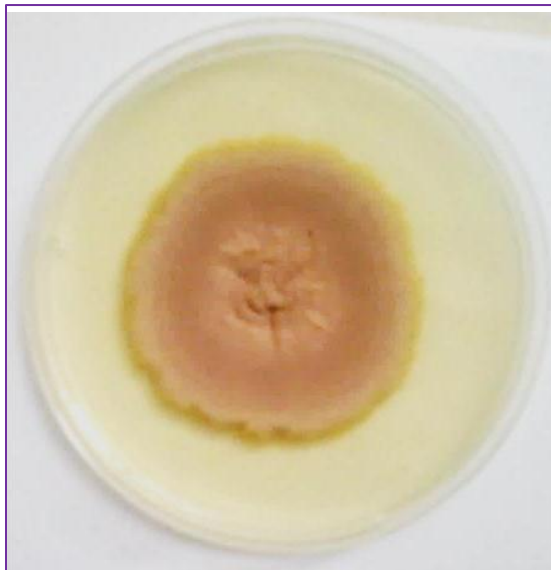
Aspect microscopique (G X40).

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

Figure 27. Aspect macro et microscopique d'*Aspergillus section Fumigati* .

➤ *Aspergillus section Terrei*

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



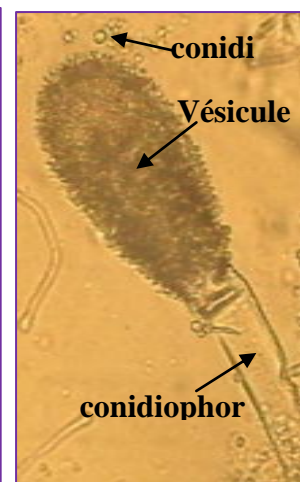
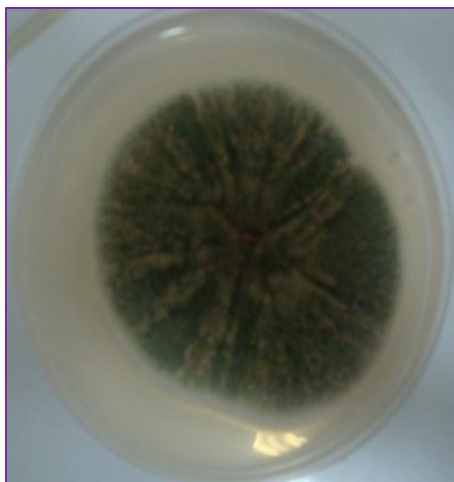
Aspect macroscopique
après 7 jours d'incubation sur milieu CYA à 28C°.

Aspect microscopique (G X400).

Figure 28. Aspect macro et microscopique d'*Aspergillus* section *Terrei*.

➤ *A. section clavati*

Sur le milieu CYA, la colonie à un diamètre de 4cm Bleu vert (Figure 29) L'aspect microscopique des espèces appartenant à cette section ont des têtes conidiennes claviformes dressées.



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

Aspect microscopique (G X400).

Figure 29. Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus* section *clavati*.

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

Au cours de cette étude le pouvoir producteur d'aflatoxine de 204 souches appartenant à la section *Flavi* sélectionnées aléatoirement sur les boîtes d'isolement de matière première (9 isolats de maïs local et 70 importé, 30 isolats de l'orge local et 10 importé, 48 isolats de tourteau de soja et 4 isolats de son de blé) et aliment composé (20 isolats d'aliment farine et 13 isolats d'aliment granulé).

Le criblage des souches aflatoxinogènes est basé sur la mise en évidence de la fluorescence sous U.V à 356 nm sur un milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et par chromatographie sur couche mince (CCM), figure 36 et 37 respectivement. Ces tests ont montré la fréquence des isolats producteurs d'aflatoxine qui est de 28% (57 /204) En effet des isolats provenant des échantillons de son de blé sont producteurs d'aflatoxines et représentent un taux de 75% (3 /4), suivie de ceux isolés des échantillons de orge importé avec une fréquence de 60% (6 /10), et pour le maïs local sont producteurs d'aflatoxines un taux de 55,5%, et l'aliment farine représentent un taux de 50%, suivie de ceux isolés des échantillons de maïs importé, l'aliment granulé, tourteau de soja et orge local sont producteurs d'aflatoxines et représentent un taux de 25,7% , 23%, 16,7%, et 13,3% respectivement (figure 30),(Tableau 10).

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 IV.

Tableau 10. Les isolats aflatoxinogènes appartenant au genre *Aspergillus* section *Flavi*.

produits	Nombre d'isolats testés	Nombres d'isolats aflatoxinogènes	Intensité de la Fluorescence			Moyenne des Isolats aflatoxinogènes (%) par CCM
			+++	++	+	
Maïs importé	70	18	7	1	10	25,7
Maïs local	9	5	0	2	3	55,5
Orge importé	10	6	1	2	3	60
Orge local	30	4	1	1	2	13,3
Tourteaux de soja	48	8	2	3	3	16,7
Son de blé	4	3	1	1	1	75
Vache farine	20	10	1	3	6	50
Vache granulé	13	03	1	1	1	23
Nombre total	204	57	14	14	29	
Pourcentage (%)	100	28	24,6	24,6	50,9	

+++ : Fluorescence très intense (fortement producteur); ++ : fluorescence intense (moyennement producteur); + : fluorescence faible (faiblement producteur);

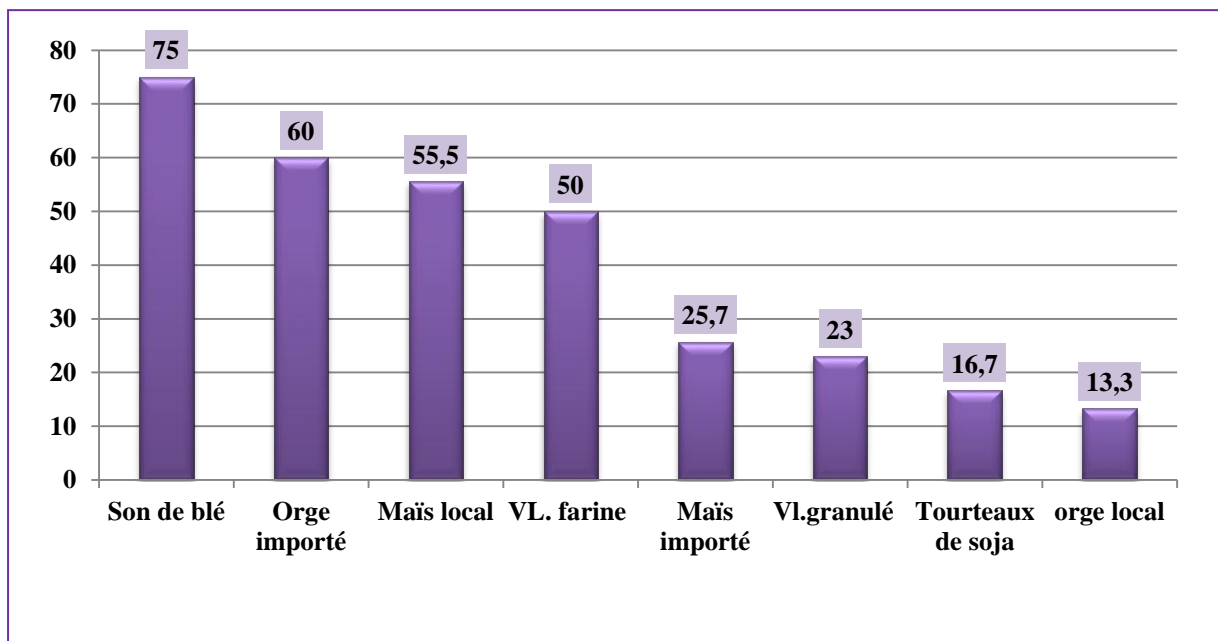


Figure 30. Répartition des isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* en fonction de l'intensité de fluorescence.

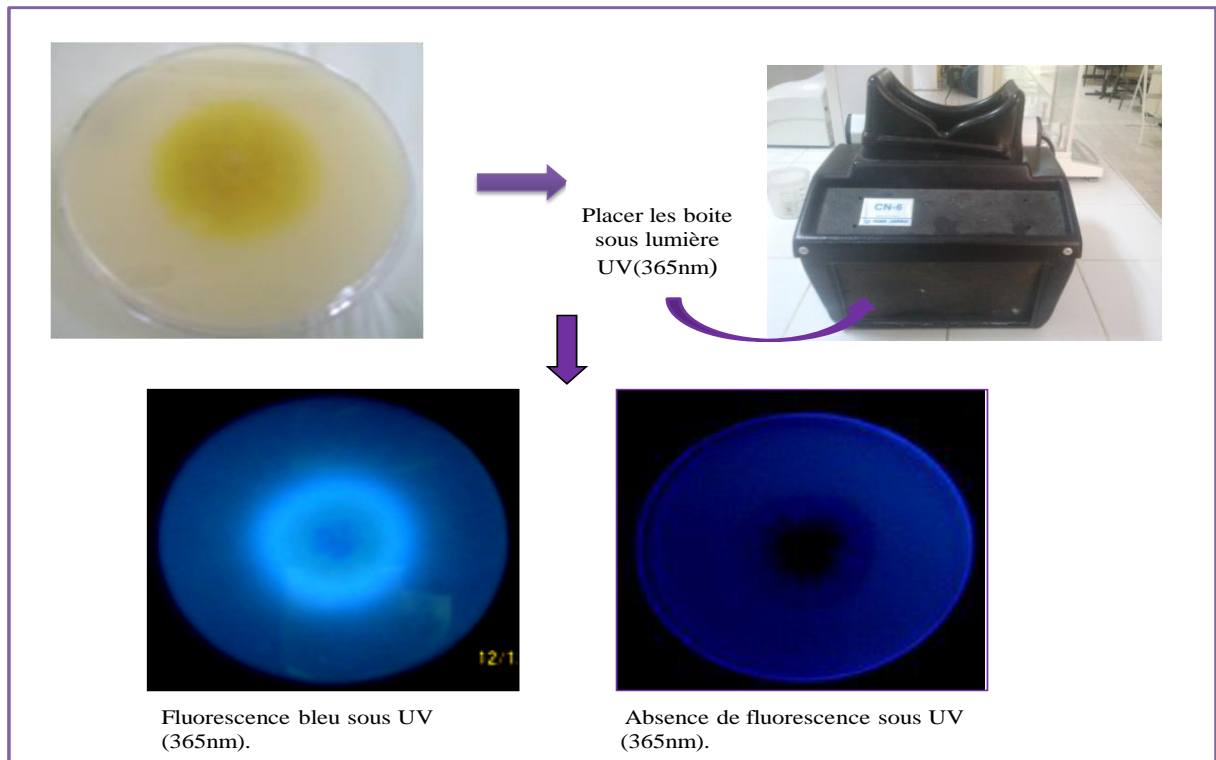


Figure 31. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus* section *Flavi* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).



Figure 32. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V.(365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus section Flavi* sur CCM .

A=M. Amérique, B=M. Brésil, C=M. argentin, D= M. M.Brézil2, E=M.argentine2 ,F=Mais Mexique ,G=M. Brésil, AFB: aflatoxine B, AFG: aflatoxine G, M= Maïs.

Les résultats que nous avons acquis il s'avère que l'intensité de la production d'aflatoxine vari d'un échantillon a un autre. La détection sur le milieu CAM montre une forte fréquence des isolats faiblement (+) d'aflatoxine B, avec un taux de 14,33 % (43 /300 isolats), ainsi les isolats moyennement producteurs (++) et fortement producteurs (+++) représentent un taux de 2,66% (8/300) et 1,66% (5/300) 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 24,6% et les isolats moyennement producteurs (++) ont une proportion 24,6% ainsi les isolats qui ont une fluorescence faible (+) ont révélé une fréquence de 50,9%. 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* .

6. 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, pour un total de 118 isolats appartenant au genre *Aspergillus* issus des échantillons matière première et d'aliment composé. Les isolats appartiennent à 5 sections : 6 isolats de section *Terrei*, 31 isolats de section *Nigri*, 25 isolats de section *Fumigati*, 23 isolats de section *Clavati* et 33 isolats de section *Candidi*. Les extraits au méthanol de ces souches est analysés par CCM à 365nm sous U.V.

Les résultats de CCM montrent que les isolats appartenant aux sections : *Terrei* (1 sur 6 isolats), *Nigri* (11 sur 31 isolats), *Fumigati* (6 sur 25 isolat) et *Clavati* (8 sur 23 isolats) sont producteurs d'OTA, mais avec une faible densité, à l'exception de certains isolat appartenant à la section *candidi* qui n'o produit pas l'OTA.

La fréquence de tous les isolats producteurs d'OTA est de 30,6% (26/85).

La détection sur chromatographie à couche mince (CCM) montre que les isolats ochratoxinogènes ont une faible à très faible intensité de fluorescence, (figure 39) les résultats de la production d'ochratoxine A sont illustré dans le (tableau11).

➤ A. section *fumigati*.

La fréquence des isolats producteurs d'OTA dans cette section est de 24% (6/25) le taux d'isolats ochratoxinogènes est plus élevé dans les échantillons de maïs local avec une fréquence de 33,3% (2/6) et les isolats de maïs importé et aliment composé granulé qui ont révélé une proportion de 25%(3/12) et 14,3%(1/7) respectivement (tableau11).

➤ A. section *Niger*

La fréquence des isolats producteurs d'OTA dans cette section est de 35,5%(11/31) enregistré Le taux d'isolats ochratoxinogènes est plus élevé dans les échantillons de maïs importé 58,3%(7/12) et pour les échantillons d'aliment farine et tourteau de soja le taux est de 37,5 (3/8) et 9,1%(1/11) respectivement (tableau11).

➤ **A. section *Terrei***

La fréquence des isolats producteurs d'OTA dans cette section 16,7% (1/6) montrent que tous les isolats sont négatifs à l'exception d'un isolat dans l'aliment composé granulé qui est producteur d'OTA, mais avec une faible densité (tableau13).

➤ **A. section *Clavati***

La fréquence des isolats producteurs d'OTA dans cette section est de 34,8%(8/23) Le taux d'isolats ochratoxinogènes est plus élevé dans les échantillons de maïs importé 34,8% et le tourteau de soja 9,1%, qui sont producteurs d'OTA, mais avec une faible densité (tableau11).

Tableau 11. La Distribution des isolats ochratoxinogènes appartenant a section *fumigat Nigri*, *Terrie* et *Clavati*.

Type des isolats	Les produits	Nombre d'isolats testés	Nombre d'isolats ochratoxinogènes révélées par CCM	Pourcentage (%) des isolats ochratoxinogènes
A.section <i>fumigati</i> .	maïs importé, maïs local, VL .granulé	25	6	24
A. section <i>Nigri</i>	Maïs importé, VL.Farine, tourteau de soja	31	11	35,5
A. section <i>Terrei</i>	VL. granulé	6	1	16,6
A. section <i>Clavati</i>	maïs importé, tourteau de soja	23	8	34,8
Total		85	26	
Pourcentage(%)		72,02	30,6	

A ; *Aspergillus*

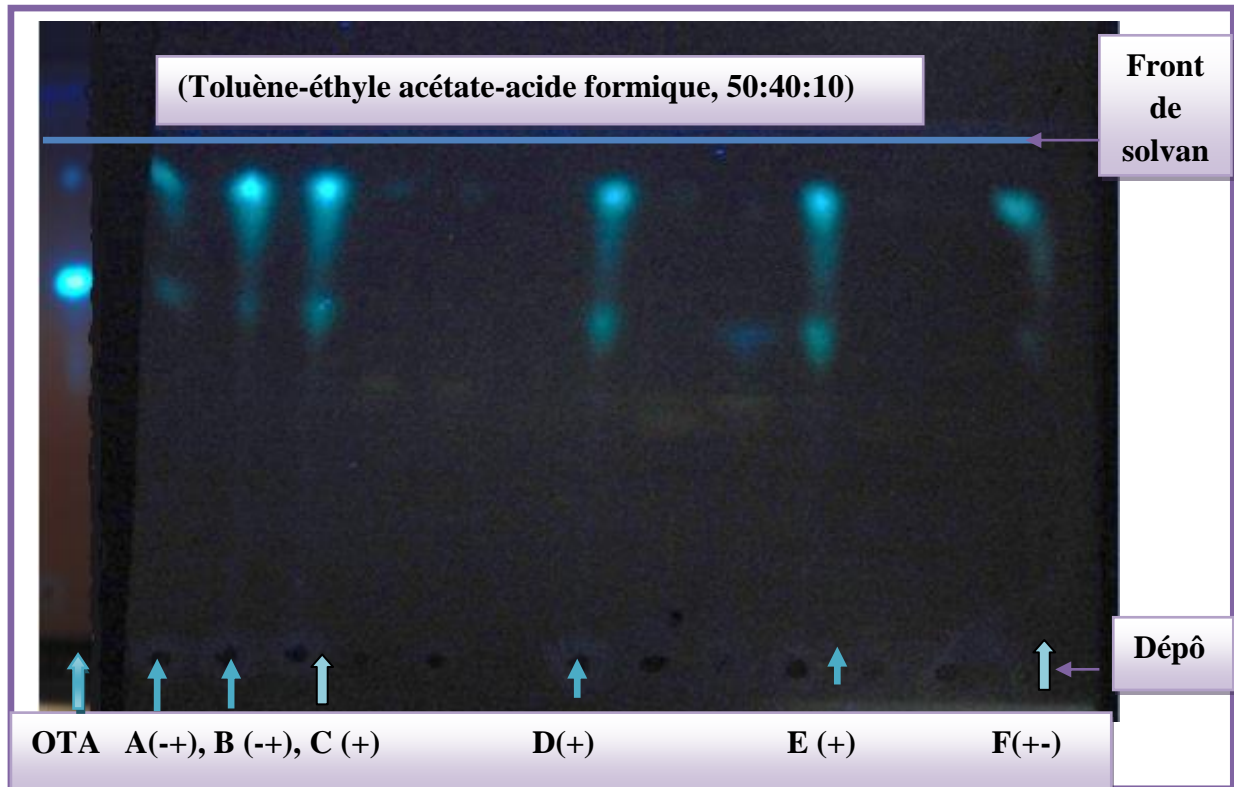


Figure 33. Mise en évidence par fluorescence bleue vert sous lumière U.V.(365 nm) de la production des *ochratoxine A* sur CCM.

A= M. argentine 4, B=M local 2, C=M. Argentine, D=M. local1, E=M.amérique 2,
F=M .amérique, OTA=L'Ochratoxine A M= Maïs

Discussion

Les moisissures sont des champignons filamenteux qui se développent sur une large gamme de produits entrant dans la ration alimentaire des ruminants (Ruppel *et al.*, 2004). Certaines souches de ces moisissures, sont capables d'excréter des mycotoxines (Yiannikouris et Jouany, 2002 ;Bennett et Klich, 2003). Les facteurs physiques essentiels qui influencent la croissance et la production de mycotoxine sont la température, l'activité d'eau et le pH (Mitchell *et al.*,2004). La disponibilité en eau a une influence déterminante sur le développement du champignon ainsi que sur sa production de mycotoxines, notamment dans les denrées peu hydratées comme les céréales, Les différences de comportement des espèces fongiques selon la disponibilité en eau ont conduit à distinguer des espèces hygrophiles, mésophiles et xérophiles. (Cahagnier *et al.*, 1998).

Nos résultats montrent que tous les échantillons de matière première (maïs, orge, tourteaux de soja, son de blé) et l'aliment composé (farine et granulé) sont peu hydratés, les valeurs de l'humidité relative étaient généralement faible à moyenne et varie entre 8,94% et 11,84%. Mais les taux de l'humidité dans les fractions de l'alimentation ne sont pas homogènes, dont il y a des zones qui sont avec des taux de l'humidité bien élevés par rapport a d'autres, et le mélange des sous échantillons fait homogénéiser les rapports, Ainsi que les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage (Castegnaro et Pfohl, 2002). Selon (Alborch et ces collaborateurs ,2011), les souches d'*Aspergillus Niger* et *Aspergillus carbonarius* ont pu produire de l'OTA sur les grains de maïs à partir de la cinquième journée d'incubation sur une large plage de températures et disponibilités en eau. Certaines moisissures xérophiles (*A. flavus* ou *P. restrictis*) peuvent se développer dans les denrées dont l'*aw* est faible. Généralement, les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont des contaminants typiques des céréales au stockage tandis que les espèces de *Fusarium* préfèrent le milieu dont l'*aw* est plus élevée (Pardo *et al.*, 2004). Néanmoins, les champignons de champs exigent typiquement une haute teneur en humidité dans le substrat (22-25 %) par rapport aux champignons de stockage (13-18 %) (Samson *et al.*, 2006).

Le pH peut avoir un effet critique pour la croissance fongique et la production de mycotoxine (Reboux, 2006). Le pH de nos échantillons était légèrement acide avec des valeurs comprises dans l'intervalle de (5,89 et 6,55). Selon Balzer (2003) la majorité des

moisissures se développent dans un pH compris entre 4 et 8, avec une croissance optimale entre 5 et 6 certaines tolèrent cependant des pH beaucoup plus acides ou très alcalin. En raison de leur acidité de nombreux aliments sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne (Tabuc, 2007). Ainsi que l'OTA se forme préférentiellement sur les aliments acides (Cuero et Smith, 1987).

L'objectif de ce travail est d'étudier les champignons du genre *Aspergillus* producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans l'alimentation de vache laitière. Pour cela, nous avons analysé 55 échantillons, 43 de Matière premier et 12 d'aliment composé (farine et granulé), dans les Unité de fabrication (ONAB, UAB, SDG, et autres échantillons commercialisés) de Blida et Alger. 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, les espèces de moisissures les plus fréquentes retrouvées dans les aliments appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.

Nos résultats obtenus par la méthode de dilution montrent que la fréquence de contamination par *Aspergillus* dans les échantillons (tourteau de soja, son de blé, aliment composé farine et granulé) est moyennement (40,8%) par rapport au *Fusarium* (19,45 %) suivi des genre *Penicillium* (11,15%) rajouter les par apport a (Gadi, 2011). La dominance du genre *Aspergillus* dans les denrées stockées dans les régions à climat chaud est très connue (Pitt et Hocking, 1997). *Aspergillus* est un champignon ubiquitaire capable de coloniser divers substrats et possède une grande capacité de sporulation (Gourama *et Bullerman*, 1995) et il est 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 Pitt*, 2003). Le genre *Fusarium*, est révélé au niveau de l'aliment composé qui contient déjà les grains de maïs broyées. Ce genre est un contaminant du maïs, mais aussi d'autres cultures dont le blé, le mil et le sorgho ainsi que les fruits secs (Gadi, 2011). Les espèces de *Fusarium* se développent, de préférence, sous des climats moins chauds et plus humides et se situent dans des aw extrêmes par rapport aux

autres genres Ainsi, la plupart des enquêtes menées dans ces régions ont mis en évidence la prédominance des espèces fongiques du genre *Aspergillus* et *Fusarium* (Bouti *et al.*, 2014). 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), Le genre *Fusarium* comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines : les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines (Pitt, 1988). Selon (Tabuc, 2007) Le maïs était plus contaminé que le son ou les tourteaux de soja, La flore fongique du son s'est révélée plus élevée et plus diversifiée que celle de son de blé , duquel les spores des moisissures sont concentrées sur la partie externe (l'enveloppe) et par conséquent, l'élimination des enveloppes des grains de blé par brossage abrasif réduit le taux de contamination d'environ 87% (Laca *et al.*, 2006). Deux genres majoritaires, La flore fongique du son s'est révélée plus faible, *Aspergillus* et *Penicillium* sont révélés dans les tourteaux de soja avec une absence totale du genre *Fusarium*. Par ailleurs, les mycotoxines dans les oléagineux, graines ou tourteaux, sont largement détruites lors de l'extraction des huiles et des traitements industriels (Yiannikouris *et Jouany*, 2002).

La flore fongique du son de blé et d'autres matières premières s'est révélée plus élevée et plus diversifiée que celle de l'aliment composé qui peuvent être contaminé par les spores qui étaient initialement présentes dans les céréales ou dans les autres ingrédients (oléagineux) qui entrent dans leur composition. La matière première peut aussi être contaminés au cours du processus de fabrication ou pendant le stockage. Les espèces de moisissures les plus fréquemment retrouvées dans les aliments composés appartiennent aux mêmes genres que ceux contaminant les céréales : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, ce dernier est très élève dans l'aliment composé farine qui contient déjà une proportion élevée du maïs broyées. Les études disponibles concernant l'évaluation du niveau de contamination fongique des aliments pour animaux concernent en général les aliments composés pour animaux monogastriques (volailles, porcs...) qui sont plus sensibles à l'action des mycotoxines que les ruminants (Tabuc, 2007).

Le taux de la flore fongique dans l'aliment granulé par la méthode de dilution est faible, la température élevée au cours du processus de granulation élimine la majorité de la flore fongiques (Tabuc,2007) ,(Bouti *et al.*,2014). Malgré un processus technologique permettant souvent la réduction de la contamination Fongique, le dosage de l'AFs et l'OTA est nécessaire car ces mycotoxines sont thermostable et les moisissures peuvent proliférer et

produire des mycotoxines avant ou après la récolte, pendant le stockage, le transport, ou la transformation des matières premières et des aliments.

Tandis que, les résultats obtenus par la méthode des grains montrent la dominance de genre *Aspergillus* (73,9 %) suivi par *Penicillium* (6,8%) et le genre *Fusarium* (5,77%) dans les échantillons de maïs et orge ce qui confirme les résultats de (Bouti *et al.* , 2014). Ainsi, les *Aspergillus* sont souvent retrouvés dans les céréales issus des régions chaudes, parfois à des fréquences très élevées. (82.3%) dans les échantillons d'orge en Espagne (Medina *et al.*, 2006). 76,4%, 78% et 82,3% dans les échantillons de maïs produits au Ghana (Kpodo *et al.*, 2000), en Argentine (Etcheverry *et al.*, 1999) et au Venezuela (Medina et Martinez, 2000) ont été trouvés contaminés par des *Aspergillus*. Bien qu'un début de contamination soit possible au champ, la contamination par *Aspergillus flavus* aura Principalement lieu au cours du stockage, si les conditions sont chaudes et humides (Miller, 1995). Une grande hétérogénéité a été observée dans la densité de la flore fongique au sein des échantillons de même origine et de même catégorie. Cette fluctuation n'est pas liée à un paramètre particulier. En effet, la qualité du grain après récolte est influencé par une large variété de facteurs biotiques (microflore, insectes, acariens et rongeurs) et abiotiques (températures, humidité, activité de l'eau, etc.). La méthode directe est la méthode préférée pour détecter, évaluer et isoler des mycètes des nourritures particulières telles que les grains et des noix. Dans cette méthode, les grains sont placées directement sur le milieu. 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). Généralement les conditions de stockage des ingrédients première sont mauvaises, et souvent les grains de maïs sont déposés directement sur la terre sans protection contre les agents de détérioration et d'infection, selon (Castegnaro et Pfohl, 2002).

En outre, la dominance d'*Aspergillus* section *Flavi* (par la méthode de dilution et par la méthode des grains par rapport aux autres sections d'*Aspergillus* identifiées dans la matière première et l'aliment composé 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.

Dans cette étude, nos résultats relatifs à la production d'aflatoxine révèlent la présence d'aflatoxines de type B 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 d'*A. parasiticus* et *A. nomius* dans tout les échantillons de vache laitière analysé. Selon Matmoura (2008), *Aspergillus parasiticus* est rencontré 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 matières première et d'aliment composé analysé est enregistré par une forte fréquence dans les échantillons de son de blé et orge importé et maïs local suivie des échantillons de l'aliment farine , maïs importé, l'aliment granulé ,tourteaux de soja et orge local qui ont des taux de production d'aflatoxine B très faible. L'analyse de pouvoir producteur montre que (28%) des isolats d'*A.flavus* testées sont productrice d'aflatoxines B et que les échantillons d'orge importé présente un taux plus élève d'aflatoxine B par apport l'orge local ce qui encourage sa culture en Algérie.

Les céréales s'avèrent la matière alimentaire la plus contaminée par l'OTA (El Khoury, 2007), celui-ci explique les résultats relatifs à la production d'OTA de nos échantillons. En effet une faible fréquence est enregistrée dans le maïs local et importé, 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). Et présent dans l'aliment composé farine et granulé, mais avec une faible fréquence. L'ochratoxine A, se retrouve dans l'aliment composé pour les animaux, conséquence d'utilisation de matières premières contaminés ou de mauvaises conditions de stockage.

Les mycotoxines sont définies comme des substances d'origine fongique capables à faibles concentrations d'induire un effet toxique (Reboux, 2006). Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités chroniques et aiguës allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, ainsi que sur l'appareil digestif chez l'homme ou l'animal. 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 la matière première et aliment composé au niveau de l'Office National de l'Aliment de Bétail (ONAB) de Blida, de l'Unité d'Aliment de Bétail (UAB) d'Alger (Kouba) et Sarl Diam Grains (SDG) de Blida et autres échantillons commercialisés de Blida.

L'évaluation du niveau de contamination par les champignons toxigènes est important, car elle permet de fournir des informations aussi bien sur la qualité des produits alimentaires que d'éventuelle présence de mycotoxines. Beaucoup d'intérêt est accordé à la détection et à la quantification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* responsables de la contamination par les AFs dans les céréales et d'autres graines et fruits secs (Passone et al., 2010).

Les résultats analytiques de la flore fongique obtenus par les méthodes directes et indirectes utilisées pour l'isolement et le dénombrement des champignons montrent que la majorité des échantillons sont contaminés principalement par les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ceci affirme le statut de flore de stockage et de champ de ces trois genres fongiques. La méthode de dilution démontre une moyenne de contamination par le genre *Aspergillus* (40,8%) et *Fusarium* (19,45%) suivi par le genre *Penicillium* (11,15%), nous avons également noté que *Aspergillus* sections *Flavi* a un taux de (26,07%) du genre *Aspergillus*, et à un degré moindre en *Aspergillus* section *Fumigati* (5,77%), *Candidi* (4,45%), *Terrei* (2,3 %), *Clavati* (1,62%) et *Nigri* (0,5%) , tandis que, la méthode des grains confirme la dominance du genre *Aspergillus* (73,9 %), suivi par le genre *Penicillium* (6,8%) et *Fusarium* (5,77%). *Aspergillus* section *Flavi* a été isolé ainsi par cette méthode avec une fréquence très élevée de 57,1 % suivi par la section *Fumigati* (48,53%) puis *Clavati* (1,85%) et *Nigri* (2,81%).

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 et la détection par CCM, a permis de montrer que près de 28% des isolats appartenant à *Aspergillus* section *Flavi* produisent l' aflatoxines B, et les résultats relatifs à la production d'ochratoxine A par CCM ont montré que près de 30,6 % des isolats appartenant au genre *Aspergillus* section *Terrie*, *Nigri*, *Fumigati* et *clavati* produisent cette mycotoxine mais a faible concentration.

En Algérie, beaucoup d'éléments restent à découvrir dans cet axe. La présence des mycotoxines dans l'alimentation animale mérite la réalisation de sérieuses études. Ceci est d'autant plus important que les mycotoxines présentant une grande importance sanitaire et économique chez les ruminants et le risque de passer à l'homme.

Il est possible de réduire le niveau de contamination des aliments par les mycotoxines en appliquant des règles de bonnes pratiques de culture et en respectant des règles sanitaires simples au moment de la récolte, du stockage et de la transformation des aliments.

Puisque peu de traitements permettent de décontaminer les aliments, il est fortement recommandé d'utiliser des adsorbants pour limiter les effets délétères des mycotoxines sur les animaux et leur transfert dans les produits animaux destinés à la consommation de l'homme.

En fin nous espérons que nous avons abordé le sujet de notre note de certains de ses aspects, et nous l'avons expliqué plus de ce qui semblait en elle, et ouvert la voie à des études et d'autres recherches scientifiques

- ✓ Dosage des Aflatoxine et d'ochratoxine A dans la matière première et l'aliment composé farine et granulé.
- ✓ Dosage d'aflatoxine M1 dans le lait.
- ✓ Dosage des mycotoxines fusariennes dans la matière première et l'aliment composé farine et granulé.
- ✓ Contrôle application des isolats.

- **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.

- **AFSSA (Association Française de Santé et Sécurité Alimentaire). 2009.** - Evaluation de risque liées à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humain et animale, coordination rédactionnelle : Jean Marc Fremy, coordination éditoriale : Carole Thomann ; 46, 47.

- **Alborch. L., M.R. Bragulat., M.L. Abarca., F.J. Cabañes.2011.**- Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels, *International Journal of Food Microbiology.*, FOOD-05491; No of Pages 5.

- **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, 1995.** - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods 973.37 et 975.38 (16th ed., pp. 31–32). Arlington, Virginia, USA.

- **A.O.A.C, 2000.** - Association of Official Analytical Chemists.17th end, 2000 Chapter 49, subchapter 1 Mycotoxins/subchapter 2 Aflatoxins.

- **Arino, A.; Juan, T.; Estopanan, G.et Gonzales-Cabo, J.F. 2007.** - Natural Occurrence of *Fusarium* Species, Fumonisin Production by Toxigenic Strains, and Concentrations of Fumonisins B1 and B2 in Conventional and Organic Maize Grown in Spain, *J. Food Prot.*, 70 (1), 151-156.

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

- **Asao, T., Büchi,G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., et Wogan, G.N. (1965).** -Structures of aflatoxins B and G1. *Journal of American Chemical Society*,87, 822-826.

- **Auerbach, H., R.F.M. Maas., H.J.M. Pop Den Camp., A. Pol., J. Finkgremmels.1998.** - Biodegradation of aflatoxin B1 by bovine rumen microorganisms in vitro and its effects on rumen fermentation, *Revue de Médecine Vétérinaire.*, 149: p. 573.

- **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.

- **Baliukoniene, V.; Bakutis, B. et Stankevicius ,H. 2003.** - Mycological and Mycotoxicological evaluation of grain, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 10, 223–227.

- **Balzer Alexander. 2003.** Les trichotecenes : nature et origine. Thèse docteur vétérinaire, université Toulouse.

- **Bankole, S.A.; Mabekoje, O.O. 2004.** - Occurrence of aflatoxin and fumonsin in preharvest maize from south-western Nigeria, *Food Addit. Contam.*, 21 (3), 251-255.

- **Baydar T., Engin A.B., Girgin G., Aydin S. et Sahim G. 2005.-** Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medical*, 12, 193–197.

- **Bennett J.W. et Klich M. (2003).-** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, 16,497–516.

- **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.

- **Berthier, J., G. Valla. 2008.** -Moisissures-Mycotoxines et aliments : du risque a la prévention., 23-34-5587.

- **Boudra, H., J. Barnouin, S. Dragacci., D.P. Morgavi.2007.-** Aflatoxin M1 and ochratoxinA in raw bulk milk from french dairy herds, *Journal of Dairy Science.*, 90: p. 3197-3201.

- **Boudra, H.2011.** -Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : Evaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. These docteur d'universite, Université Blaise Pascal, N°D. U. : 2141.
- **Bouti K.; Riba A., Mokrane S. ; Sabaou N. ; 2014.** -Etude de la contamination par les champignons producteurs d'aflatoxines dans la filiere alimentation animale en Algerie. Impact sur la sante humaine et animale.
- **Bullerman, L.B. Bianchini, A. 2007.** - Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.*, 119, 140-146.
- **Cahagnier, B., S. Dragacc., C. Frayssinet., J. M. Frémy., G. L. Hennebert., L. Lesage-meessen., J. L. Multon., D. Richard-Molard., and M. F. Roquebert.1998.** -Moisissures des aliments peu hydrates. Lavoisier Tec&Doc. France. 218p.
- **Calvo, A.M.; Bok, J.; Brooks, W. et Keller, N.P. 2004.** - *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 4733–4739.
- **Castegnaro, M. et Pfohl-Leszkovicz, A. 2002.** - Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, *dans la sécurité alimentaire du consommateur*.
- **Chapeland-Leclerc, F. ; Papon, N. ; Noël, T. et Villard, J. 2005.** - Moisissures et risques alimentaires (mycotoxines). *Revue Française des laboratoires*, 373.
- **Cole, R.J., et Cox, R.H. (1981).**- Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New York. Commission Regulation (E.C.) (2002). - Commission Regulation N° 472/2002 of 12 march 2002. Official Journal of European Communities, L75 (18), 16/03/2002.
- **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 Puplishers, Dordrecht, The Netherlands.

- **Cuero, R. G., et Smith, J. E. 1987.**- Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains, *Transactions of the British Mycological Society.*, 2, 221-226.

- **Dao Huy Phong. 2005.** -caractérisation de certains gènes polycétones synthase chez *Aspergillus ochraceus* nr1 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide pénicillique. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse.

- **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.

- **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.

- **Dunkel, F.V. 1988.** - The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. *Int. food Microbiol*, 7, 227-244.

- **El Khoury, A. 2007.** - Champignons Mycotoxigènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Spécialité : Génie des procédés et de l'environnement. P200.

- **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.
- **Gadi, A.2011.** -Identification des Espèces de Moisissures Toxinogène dans l’Alimentation du Bétail et Détection des Aflatoxines et l’Ochratoxine A. Diplôme de magister en Maîtrise de la qualité microbiologique et du développement microbie.
- **Galtier P.1999.** -Biotransformation and fate of mycotoxins, J. Toxicol.-Toxin Reviews., 18, 295-312.
- **Gao, J. ; Liu, Z. et Yu, J. 2007.** - Identification of *Aspergillus* section *Flavi* in maize in northeastern China. *Mycopathologia*, 11, 91–95.
- **Geiser, D.M., Dorner, J.W., Horn, B.W. et Taylor, J.W. 2000.** - The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 31,169–179.
- **Ghiasian ,S.A.; Kord-Bacheh ,P.; Rezayat, S.M.; Maghsood, A.H. et Taherkhani H. 2004.** - Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000, *Mycopathologia*, 158 (1), 113-121.
- **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.
- **Gremmels J. Fink.2008.** -The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows., doi:10.1016/j.tvjl.12.034.
- **Guarro, J.; Gené, J. et Stehigel A.M. 1999.** - Developments in fungal taxonomy. *Clinical and Microbiological Review*, 12 (3), 454–500.
- **Guerre. P., J.-D. Bailly., G. Benard., V. Burgat. 2000.** -Excrétion lactée des mycotoxines : quels risques pour le consommateur ?, *Revue Méd., Vét.*,151, 1, 7-22

- **Hagler, W.A. 2005.** - Mycotoxins : A review of dairy concerns. in Mid-south Ruminant Nutrition Conference

- **Hartog Johan den.2003.** -Feed for Food: HACCP in the animal feed industry, Food Control., 14 (2003) 95–99.

- **Haumann BF 1995.** - Eradicating mycotoxins in foods and feeds. INFORM, 6 (3): 248-257.

- 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.

- **Hohler, D., K. H. Sudekum., S. Wolfram., A. A. Frohlich., R. R. Marquardt. 1999.**
-Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep, *J. Anim. Sci.*,77(5):1217-1223.

- **Horn, B.W. et Dorner, J.W. 1998.** - Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanutgrowing regions of the United States. *Mycologia*, **90** 767–776.

- **Hua Sui-Sheng, T.2002.-** Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast,Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonis In:and 16th Aflatox Elimination Workshops. October 13–15, 2003 Savannah, Georgia USA.

- **Hussein, H.S., et Brasel, J.M.2001.** - Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167 (2),101–134.

- **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.
- **Jaqu et, J., Lafont, J., et Lafont, P. 1982.** -Sur la contamination du lait par les aflatoxines. *Revue laitière française*, 42 : 63-67.

- **Kali Sofia., Benidir Mohamed., Ait Kaci Karim., Belkheir Boussad., Benyoucef MT.2011.** - Situation de la filière lait en Algérie: Approche analytique d'amont en aval, *Livestock Research for Rural Development.*, 23 (8) 2011.

- **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.

- **Kpodo, K.; Thrane, U. et Hald, B. 2000.** - Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their co.occurrence with aflatoxins, *Int. J. Food Microbiol.*, 61 (33), 147-157.

- **Krysinska-Traczyk, 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.

- Laca A., Mousia Z., Diaz M., Webb C., Pandiella S.S.2006.** Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering* 72, 332-338.

- **Lacey, J. (1986).** - Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vlegaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.

- **Mantle, 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.

- **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.

- **Meucci, V., E. Razzuoli., G. Soldani., and F. Massart. 2010.** - Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy, *Food Addit. Contam. Part A-Chem.*, 27(1):64-71.

- **Miller, D. M., et Wilson, D. M. 1994.** - Veterinary diseases related to aflatoxins. In: Eaton, D. L., Groopman, J. D., eds. *The Toxicology. Of Aflatoxins*. San Diego, CA, Academic Press, pp. 347–364.
- **Miller, J.D. et Trenholm, H.L. 1994.** - Mycotoxins in grain, compounds other than aflatoxin. Eagan press, St Paul, Minnesota, USA.

- **Miller, J. D. 1995.** - Fungi and mycotoxins in grain : Implication for stored products research, *J. Stored Prod. Res.*, 31(1), 1-6.

- **Mitchell D., Parra R., Aldred D. et Magan N. 2004.** - Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 439–445.

- **Morin, O. (1994).** - *Aspergillus et aspergilloses*: biologie, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.

- **Narbonne, J.-F., 1999** - Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France : Section de l'alimentation et de la nutrition, ed. TEC et DOC.

- **Nedjraoui, D. 2001**-profil fourrager. Ministère de l'agriculture et du développement rural de l'Algérie. p 36. <http://www.fao.org/AG/AGP/agpc/doc/counprof/Algeria/Algerie.htm>, consulté le 24/12/2011.

- **Nguyen, M.T., 2007**-Identification des espèces de moisissures, 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.

- **OMS (1980) Mycotoxines**. -Critères d'hygiène de l'environnement 11. publications. De l'OMS. Genève. pp142.

- **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.

- **ONO, E.Y.; Sugiura, Y.; Homechin, 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 Panama, Brazil, *Mycopathologia*, 147 (3), 139-148.

- **Pardo, E., S. Marin, V. Sanchis, A. J. Ramos .2004** - Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated 140 barley grain as influenced by temperature and water activity, *Inter. J. Food Microbiol.* 95(1):79-88.

- **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., Kim, E.K., Shon, D.H. et Kim, Y.B. 2002**. - Natural co-occurrence of Aflatoxin B1, Fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Additives and Contaminants*, 19,1073-1080.

- **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.

- **Passone, M.A., Rosso, L.C., Ciancio, A., et Etcheverry, M. 2010.** - Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavispp.* in stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*,138, 276–281.

- **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-Leszkowicz, A. 1999.** - Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion de risque, p 4, 5.

- **Pfohl-Leszkowicz A, Petkova-Bocharova T,Chernozemsky IN et Castegnaro M. 2002** Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumors : a review on etiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Add Contam*, 19 (3): 282-302.

- **Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997.** - *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.

- **Pitt John I. et Hocking Ailsa D. 2009.** -*Fungi and Food Spoilage*. Third edition, Springer Dordrecht Heidelberg London New York.

- **Pitt, J.L. 1988.** -Laboratory guide to common *Penicillium* species. Academic Press, London.

- **Raper, K.; Fennell, D.J. 1965.** - *The genus *Aspergillus**”, Williams and Wilkins editors, Baltimore.

- **Reboux, G. 2006.** Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds, *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique.*, 46, 208–212.

- **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.
- **Ruppel P.1., Delfosse Ph., Hornick J.-L.2004.** - La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne, *Ann. Méd. Vét.*, 148, 141-146.
- **Samson, R.A., Houbraken, J.A., Kuijpers, A.F.A., Frank, M.J. et Frisvad, J.C. 2004.** - New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50,45–61.
- **Samson, R.A.; Hong, S.B. et Frisvad, J.C. 2006.** - Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, **44**, 133–148.
- Scheidegger K.A. et Payne G.A. 2003.**-Unlocking the secrets behind secondary metabolism, A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, 22, 427–463.
- Scott P.M.1998.**- Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins, *Revue Méd.Vét.*, 149, 543-548.
- **Sinha, R.N. 1961.** - Insects and mites associated with hot spots in farm stored grain. *Can. Entomol*, 93, 609-621.
- **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.
- **Smith J.E. et Moss M.O. 1985.** - *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*, John Wiley et Son, Chichester.
- **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.

- **Tarr Braian.2003.**- Les moisissures et les mycotoxines - précautions à observer en cas de présence de blé contaminé par des moisissures et des mycotoxines dans l'alimentation des ruminants, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales, site page <http://omafra.gov.on.ca/french/livestock/dairy/herd/food/mico1.htm>, consulté le 5-5-2012.
- **Terao, K., et Ueno, Y. 1978.**-Morphological and functional damage to cells and tissues in : Uraguchi, K and Yamazaki, M., eds. Toxicology. Biochemistry and Pathology of mycotoxins. John Wiley & Sons, (New York), 189-197.
- **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 coffe, *J.A.O.A.C.*, 82 (1), 85-89.
- **Upadhaya., Santi Devi., M. A. Park., Jong K. Ha. 2010.** - Mycotoxins and Their Biotransformation in the Rumen: A Review, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23(9):1250-1260.
- **Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., de Scott B. et Theron J.J. 1965.** - Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. *Nature*, **205**, 1112– 1113.
- **Varga, J., Kevei, E., Rimyu, E., Teren, J., Kazakiewicz, Z. 1996.** *Ochratoxin* production by* *Aspergillus* species, *Appl. Environ. Microb.*, 62, 4461-4464.
- **Varga, J.; Rigo, K.; Toth, B.; Teren, J. et Kozakiewicz, Z. 2003.** - Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, **41**, 29–36.
- Veldman, A., J. A. C. Meijs., G. J. Borggreve., and J. J. Heeresvandertol. 1992.** Carry-over of aflatoxin from cows food to milk, *Anim Prod .*, 55:163-168.
- **Wilson, D.M. ; Mubatanhema, W. et Jurjevic Z. 2002.** - Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns, *Advances Experimental and Medical Biology*, **504**, 3–17.

- **Wogan, G.N. 2000.** - Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Seminars in Cancer Biology*, 10(3), 201–210.
- **World Rice Statistics .2005.** - IRRI, Los Baños, Philippines, [http:// www.irri.org/science/ricestat/](http://www.irri.org/science/ricestat/)
- Yiannikouris, A. et Jouany, J.P. 2002.** - Mycotoxins in feeds and their fate in animals, a review. *Animal Research*, 51, 81–99.
- Yiannikouris .A., J-P. Jouany.2002.** - Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal, *INRA Prod. Anim.*, 15 (1), 3-16
- Zain. Mohamed E.2010.** - Impact of mycotoxins on humans and animals, *Journal of Saudi Chemical Society.*, doi:10.1016/j.jscs.06.006.
- Zinedine, A., (2009).** -Détermination des mycotoxines dans les aliments commercialisés au Maroc et étude sur les bactéries lactiques et leur pouvoir de conservation et de biotransformation. Diplôme d’habilitation à Diriger des Recherches. INRA, Toulouse, France.

ANNEXE I

Compositions des milieux de cultures utilisés

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

Glucose.....	10 g
Peptone	5g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0, 5 g
Rose Bengale.....	25 mg
Dichloran (2, 6 dichloro-4-nitroaniline).....	2 mg
Chloramphénicol.....	100 mg
Agar	15 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)

Pomme de terre	200 g
Agar	15 g
Glucose	20 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)

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 CYA (Czapek Yeast extract Agar)

Saccharose	30 g
Extrait de levure ...	5 g
Czapek concentré	10 ml
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH final= 6,2 ± 0,2	

-Solution Czapek concentré

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	5 g
Fe SO ₄ , 7H ₂ O	0, 1 g
Zn SO ₄ , 7H ₂ O	0, 1 g
Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0, 05 g
Eau distillée	100 ml

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

ANNEXE II

Les appareils utilisés dans cette étude sont :

- Mixeur
- Agitateur (Yellow, line)
- PH-mètre (HANNA, instruments)
- Humidimètre (Experia 60)
- 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, acétate d'éthyle, acide formique à 90 %.



Figure 34. Représentation schématique Les appareils utilisés dans Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.

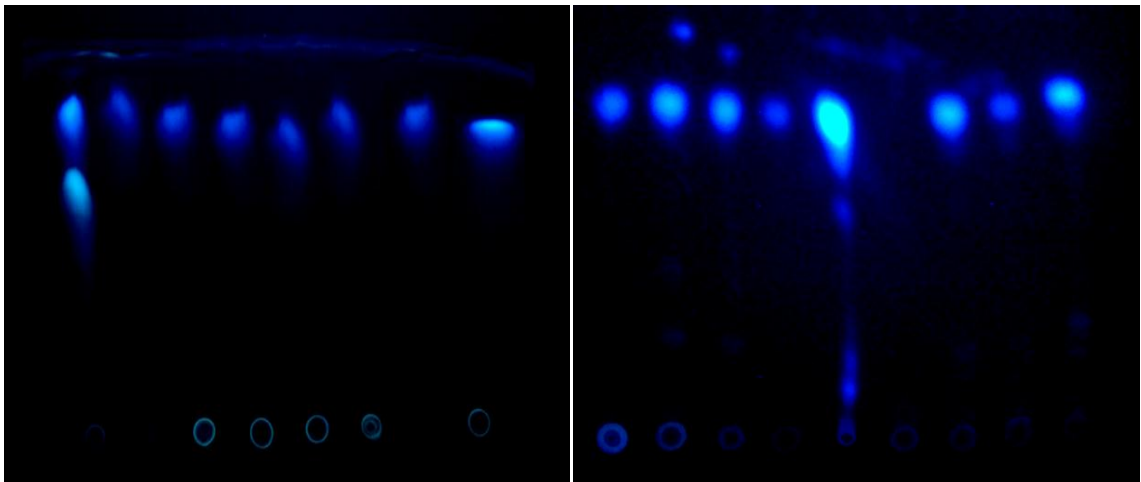
ANNEXE III

Tableau 12. Résultat du pH des différents échantillons de matière première et l'aliment composé.

Tourteau de soja	PH
TSarg	6,67
TSamer1	6,43
TSamer2	6,43
TSbrs1	6,68
TSbrs2	6,67
TSE1	6,60
TSE2	6,53
TSE3	6,57
TSE4	6,59
TSE5	6,59
TSH	6,51
TSCa	6,56
TSmex	6,53
TSK(onab)	6,42
Aliment composé farin	PH
VLf(onab)	6,33
VLf(UAB)	5,98
VLfK3	6,40
VLfK4	6,02
VLfK5	6,34
VLfK6	6,34
Aliment composé granulé	PH
Vlg1	627
Vlg2	612
Vlg3	601
Vlg4	597
Vlg5	608
Vlg6	670
Son de blé	PH
SDK1	6,51
SDK2	6,54
SDB	6,30

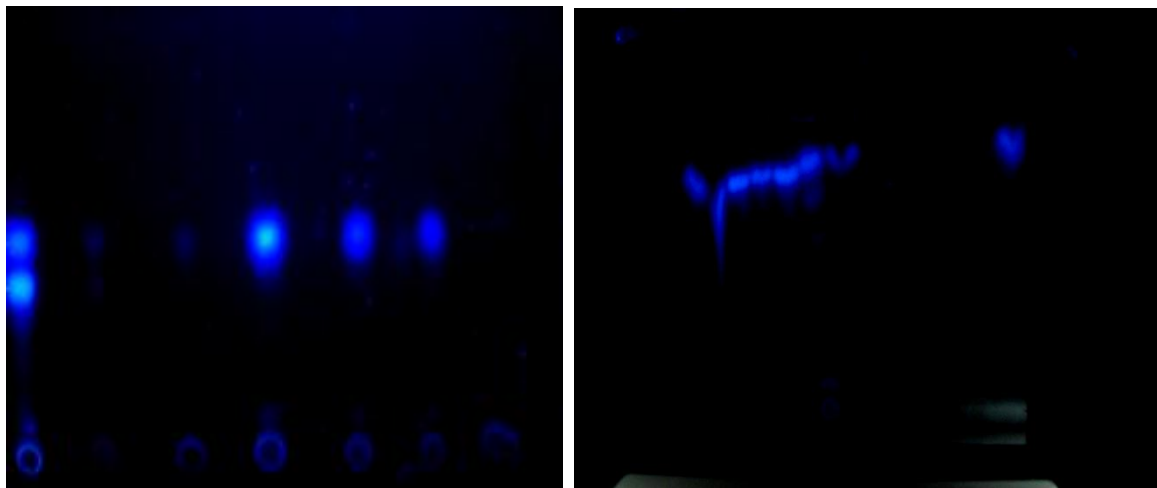
Mais local	PH
MIB	6,30
MLdj	6,15
Mlb	6,22
MLS	6,20
Orge importation	PH
Orge imp	5,82
Orge(onab)	6,03
Orge amer	5,70
Orge Ib	6,02
Orge local	PH
OLH	5,99
OLK	6,12
OLdj	6,15
OLtesm	5,71
OLsah	5,94
Mais Importation	PH
Marg 1	6,27
Marg2	6,31
Marg3	6,40
Mmix	5,92
ME1	6,15
ME2	6,20
ME3	6,13
Mamer1	6,33
Mamer2	6,27
Marg3	6,35
Mbresil	6,10
Mcanda	5,90

ANNEXE IV



Plaque 1

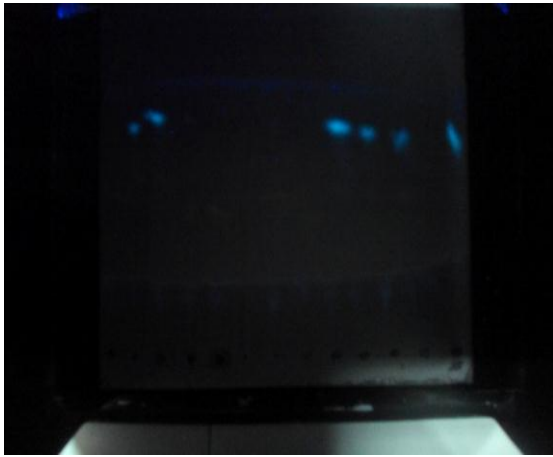
Plaque 2



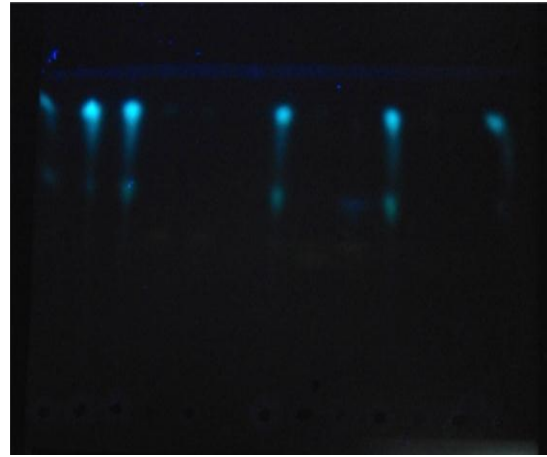
Plaque 3

Plaque 4

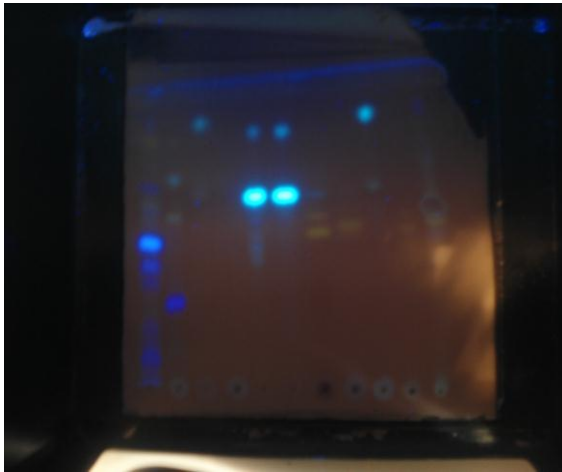
Figure 35. Résultats de la chromatographie sur couche mince des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes



Plaque 1



Plaque 2



Plaque 3



Plaque 4

Figure 36. Résultats de la chromatographie sur couche mince des isolats Ochratoxinogènes de section (*Nigri*, *Terri* et *Fumigati*)