

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude

en vue de l'obtention du diplôme de Master en
SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE
Option: Microbiologie et Toxicologie Alimentaire
Thème

Identification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* Aflatoxinogènes isolés à partir de divers aliments de bétail

Soutenu le 02 /07/2016

Réalisé par :

M^{elle} DJABALI Fatma Zohra & M^{elle} FEDGHOUCHE Nawal

Devant le jury composé de:

M ^{me} DEFFAIRI. D	M.A.A université de Blida 1	Présidente
M ^{me} BELMESKINE. H	M.C.B université de Blida 1	Examinatrice
M ^{me} MEKLAT. A	M.C.A université de Blida 1	Promotrice
M ^{me} BOUTI. K	M.A.A E.N.S KOUBA	Co-promotrice

Année universitaire 2015- 2016

Avant-propos

Nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir données la force et la patience pour achever ce travail et nos parents pour tout ce qu'ils ont fait pour nous.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de biologie des systèmes microbiens (LBSM) de l'École normale supérieure de Kouba d'Alger sous la direction scientifique de Monsieur le professeur **Sabaou N** qui nous a accueillis dans son laboratoire, de nous avoir donné la chance d'accomplir ce mémoire et mis à notre disposition le matériel nécessaire à la réalisation de nos expériences.

Nous tenons à remercier respectivement tous ceux qui nous ont aidées, soutenues; et encouragées pour la réalisation de ce modeste travail.

Nos premiers remerciements vont à notre promotrice madame **Meklat A.**; maître de conférences A à l'université de Blida 1 pour avoir accepté de nous encadrer, de nous suivre tout au long de la réalisation de ce mémoire et de nous avoir initié à la recherche. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude, notre reconnaissance et nos remerciements les plus vifs.

Madame **Bouti K.**; maître assistante A à l'ENS de Kouba, pour nous avoir suivi de très près tout au long de notre partie expérimentale et durant la rédaction de ce mémoire et qui nous a appris les méthodes d'analyse de laboratoire nécessaires pour ce travail, son aide précieuse, ses encouragements, son soutien, son esprit scientifique de haut niveau et sa gentillesse, il serait impossible d'oublier.

Nous adressons nos remerciements à:

Mme **DEFFAIRI D.**; maître assistante A à l'Université de Blida 1, qui nous a fait l'honneur de présider nos jury.

Mme **BELMESKINE H.**; maître de conférence B à l'Université de Blida 1 pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

C'est avec reconnaissance et un grand plaisir que je remercie madame **Azzoune N**, pour sa précieuse aide, ses conseils et ses encouragements.

Madame **Ait Mimoune N**, nous la remercions pour ses conseils précieux et ses critiques qui nous ont aidés au sein de laboratoire.

Madame **Zebiri S**, maître de conférences à l'ENS de Kouba pour sa gentillesse et sa collaboration.

Nous souhaiterions également remercier tous les membres du laboratoire pour leurs aides, leurs encouragements et l'ambiance amicale qu'ils ont su créer: en particulier mesdames **Kaci S**, **Chaweche F**, **Bouznada Kh**, messieurs **Mokrane S**, **Dif** et **Lahoume**.

Dédicace

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

Mon père « Rachid »

Ma mère « Khadija »

Sources de mon bonheur, qui m'ont beaucoup donné pour être ce que je suis, j'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mes frères Mourad, Adel et Walid pour leurs soutiens.

A mes sœurs Sajia, Hamida et Hanene pour leurs encouragements et aides.

L'étoile de la famille Manar ainsi pour le bien aimé Mohammed amine que j'aime plus que tout le monde.

A mes tantes Gamra et Rabia avec toute mon affection.

A mes belles sœurs Halima et Ibtisseme pour leurs encouragements et leurs conseils précieux.

A mon intime et binôme Djabali Zahra .

A ma chère amie Nadia.

A tout ceux que j'aime

NAWAL

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réalisée ce modeste travail que je dédié exceptionnellement à mes très chers parents :

Ma très chère mère « Farida »

Mon très cher père « Mohamed ou Rabah »

Qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance.

A mes frères Moussabe et Khaled pour leurs soutiens.

A mes sœurs Kawther, Selma, Khadija et Khawla pour leurs encouragements et aides.

A la fleur de la famille Racha.

A mes belles sœurs Sara et Sara et beau frère Rachid.

A ma très chère amie et binôme Fedghouche Nawal.

A tout ceux que j'aime.

Zahra

LISTE DES ABREVIATIONS

AFs: Aflatoxines.

AFB: Aflatoxine B.

AFB₁: Aflatoxine B1.

AFG: Aflatoxine.

AFG₁: Aflatoxine G.

AFM: Aflatoxine M.

AFSSA: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

ADNr: Acide désoxyribonucléique ribosomale.

FB: Fumonisines.

ZEN: Zéaralénone.

DON: Deoxynivalénol.

ITS: Internal Transcribed Spacer (Intercalaire transcrite interne).

C.I.R.C: Centre International pour la Recherche sur le Cancer.

LBSM: Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens.

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Pays-Bas)

GN 25: 25% Glycerol Nitrate Agar.

CY20S: CYA with 20% sucrose agar.

Aw : Activity of water (Activité de l'eau).

CAM: Coconut Agar Medium.

CCM: Chromatographie sur couche mince.

CE: Commission Européenne.

CPA: Cyclopiazonic Acid (acide cyclopiazonique).

CYA: Czapeck Yeast Extract Agar (Czapek Levure Extrait Agar).

FAO: Food and Agriculture Organization (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture).

MEA: Malt Extract Agar (Extrait de malt Agar).

NRRL: Northern Regional Research Laboratory (Laboratoire de recherche régional du Nord).

OTA: Ochratoxine A.

PDA: Potato Dextrose Agar.

rpm : rotation par minute.

UV: Ultra-Violet.

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

r: Coefficient de corrélation.

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 01. Production d'aflatoxines B, G et d'acide cyclopiazonique par les principales espèces d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (Varga <i>et al.</i> , 2003).....	9
Tableau 02. Espèces d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i> et leurs métabolites (Frisvad <i>et al.</i> , 2004).....	10
Tableau 03. Mycotoxines et champignons responsables de leur production (AFSSA, 2009).....	13
Tableau 04. Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines (Dutton <i>et al.</i> , 1985).....	15
Tableau 05. Teneurs maximales en aflatoxines exprimées en µg/kg dans l'Union Européenne (règlement 1881/2006/CE).....	18
Tableau 06. Les souches sélectionnée à partir du l'aliment du bétail.....	23
Tableau 07. Répartition des 170 isolats selon la production des extrolites.....	38
Tableau 08. Caractères cultureux de phénotype I d' <i>Aspergillus flavus</i>	41
Tableau 09. Caractère microscopique de phénotype I d' <i>Aspergillus flavus</i>	41
Tableau 10. Caractères cultureux de phénotype II d' <i>Aspergillus flavus</i>	43
Tableau 11. Caractère microscopique de phénotype II d' <i>Aspergillus flavus</i>	43
Tableau 12. Caractères cultureux de phénotype III d' <i>Aspergillus flavus</i>	44
Tableau 13. Caractère microscopique de phénotype III d' <i>Aspergillus flavus</i>	45
Tableau 14. Caractères cultureux de phénotype IV d' <i>Aspergillus tamaraii</i>	46
Tableau 15. Caractère microscopique de phénotype IV d' <i>Aspergillus tamaraii</i>	46
Tableau 16. Caractères cultureux de phénotype V d' <i>Aspergillus pseudotamaraii</i>	46
Tableau 17. Caractère microscopique de phénotype V d' <i>Aspergillus pseudotamaraii</i>	47
Tableau 18. Caractères cultureux de phénotype VI d' <i>Aspergillus parasiticus</i>	48
Tableau 19. Caractère microscopique de phénotype VI d' <i>Aspergillus parasiticus</i>	48

INDEX DES FIGURES

Figure 01. Caractères micro morphologiques du genre <i>Aspergillus</i>	7
Figure 02. Structure des aflatoxines (Quillien, 2002).....	14
Figure 03. Structure chimique de l'acide cyclopiazonique.....	19
Figure 04. Structure chimique de l'ochratoxine A (OTA).....	20
Figure 05. Formule de l'acide kojique.....	20
Figure 06. Représentation schématique de la procédure expérimentale de l'extraction d'aflatoxine.....	26
Figure 07. Schéma de culture des isolats fongiques (souche 1 et 2) Destinés à leur identification.....	29
Figure 08. Technique pour mesurer des diamètres de colonie par la lumière transmise (pitt et Hocking 2009).....	30
Figure 09. Technique de micro culture	31
Figure 10. Obtention des sclérotas.....	32
Figure 11. 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)....	36
Figure 12. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V (365 nm) de la production des AFs par <i>Aspergillus</i> section <i>Flavis</i> sur CCM.....	36
Figure 13. Fréquence des isolats aflatoxinogènes d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> déterminée par visualisation de la fluorescence des AFBs par CCM.....	37
Figure 14. Des sclérotas type large observé sous microscope GX10 chez les isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	38
Figure 15. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype I d' <i>Aspergillus flavus</i>	40
Figure 16. <i>Aspergillus alliaceus</i> sur milieu CYA après 7 jours incubation à 28°C.....	40
Figure 17. <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu AFPA après 7 jours d'incubation à 28 °C.....	41

Figure 18. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype II d' <i>Aspergillus flavus</i> ...	42
Figure 19. Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus oryza</i>	43
Figure 20. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype III d' <i>Aspergillus flavus</i> ...	44
Figure 21. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype IV d' <i>Aspergillus tamarii</i> .	45
Figure 22. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype VI d' <i>Aspergillus parasiticus</i>	47

Résumé

La section *Flavi* est l'une des sections les plus significatives dans le genre *Aspergillus*. La taxonomie de cette section dépend actuellement de variables approches, nécessitant des traits phénotypiques et moléculaires. Ce travail vise à identifier les isolats d'*Aspergillus* de la section *Flavi* à partir de différents échantillons d'alimentation du bétail (aliment composé et la matière première: maïs, tourteaux de soja, son de blé) collectés dans divers région de l'Algérie ; en utilisant diverses méthodes phénotypiques.

Dans cette étude cinq milieux différents ont été utilisés (MEA, GN25, CY20s et AFPA à 25°C et CYA à trois température différentes 25°C, 37 et 42 °C) pour l'identification des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* basée sur les caractères culturaux (macroscopiques): vitesse de croissance, couleur de colonie, couleur de l'envers de colonie, etc., les caractères microscopiques : hyphes cloisonnés ou non, conidies (forme, couleur), tête aspergillaire (unisériée, bisériée), forme de vésicule et la production des extrolites tel que les aflatoxines (B₁, B₂, G₁ et G₂), l'acide cyclopiazonique (CPA), l'ochratoxine A et l'acide aspergillique. Les résultats de l'analyse macro et micro morphologique ainsi que la production des métabolites secondaire révèlent la présence des espèces d'*A. flavus* (60%), suivi par *A. tamarii* (15,29%), *A. oryzae* (9,41%), *A. sojae* (7,64%), *A. pseudotamarii* (4,11%) *A. parasiticus* (1,76%) et *A. nomius* (1,76%) ; Le potentiel toxigène de ces différentes souches fongiques a été caractérisé sur milieu CAM pour les *Aspergillus* section *Flavi*. La détection de la production des mycotoxines a été réalisée par CCM.

Les résultats obtenus montrent que pour les 170 isolats d'*Aspergillus* appartenant à la section *Flavi*, 131 (77%) ont été identifiés comme étant des *A. flavus*, (60%) sont révélés aflatoxinogènes avec production de CPA. Certains de ces espèces (19,41%) produisent des sclérotés de type « L ». Les souches non aflatoxinogènes comme *A. sojae* (7,64%) ne produit aucune mycotoxine mais *A. oryzae* (9,41%) produit uniquement le CPA. Six isolats sont rattachés à *A. parasiticus*, ces dernières sont hautement aflatoxinogènes et ne produisent le CPA, 3 isolats produit l'aflatoxine B (1,76%), alors que le 3 autres produisent l'aflatoxine B et G (1,76%). Les isolats d'*Aspergillus tamarii* (15,29%) ont la capacité de produire le CPA mais pas l'aflatoxine B ni les sclérotés alors que les espèces d'*Aspergillus pseudotamarii* (4,11%) produit le CPA et l'aflatoxine B mais pas les sclérotés.

Mots-clés: *Aspergillus* section *Flavi*, aflatoxine, aliment de bétail, moisissures aflatoxinogène

Abstract

The *Flavi* section is one of the most significant sections in the *Aspergillus* kind. The taxonomy of this section currently depends on variable approaches, requiring phenotypical and molecular features. This work aims at identifying the isolates of *Aspergillus* of the *Flavi* section starting from various animal feed samples (made up food and the raw material: corn, oil cakes soya bean, its of corn) collected in various area of Algeria; by using various phenotypical methods.

In this study five deferent mediums were used (MEA, GN25, CY20s and AFPA with 25°C and CYA with three different temperature 25°C, 37 and 42 °C) for the identification of the species of *Aspergillus Flavi* section based on the farming characters (macroscopic): speed of growth, color of colony, color of the back of colony, etc, microscopic characters: hyphas partitioned or not, conidies (form, color), head aspergillaire (uniserial, biserial), the shape of vesicle and the production of the extrolites such as aflatoxines (B₁, B₂, G₁ and G₂), the acid cyclopiazonic (CPA), the ochratoxine A and the acid aspergillic.

The results of the macro and micro morphological analysis as well as the secondary production of the metabolites reveals the presence of the species of *A. flavus* (60%), followed by *A. tamari* (15,29%), *A. oryzae* (9,41%), *A. soya* (7,64%), *A. pseudotamarii* (4,11%) *A. parasiticus* (1,76%) and *A. nomius* (1,76%); The potential toxin gene of these various fungic stocks was characterized on CAM medium for *Aspergillus Flavi* section. The detection of the production of the mycotoxins was carried out by CCM. The results obtained show that for the 170 isolates of *Aspergillus* pertaining to the *Flavi* section, 131 (77%) was identified as being *A. flavus*, (60%) aflatoxinogenes with production of CPA are revealed. Some of these species (19, 41%) produce sclérotés of the type "L". The stocks not aflatoxinogenes like *A. soya* (7,64%), does not produce any mycotoxin but *A. oryza* (9,41%) only produced the CPA. Six isolates are attached to *A. parasiticus*, these last are highly aflatoxinogenes and do not produce the CPA, 3 isolates produces aflatoxine B (1,76%), whereas the 3 others produce aflatoxine B and G (1,76%). The isolates of *Aspergillus tamarii* (15.29%) have the capacity to produce the CPA but not aflatoxine B or the sclérotés whereas the species of *Aspergillus pseudotamarii* (4,11%) produced the CPA and aflatoxine B but not the sclérotés.

Key words: *Aspergillus Flavi* section, aflatoxine, food of cattle, moulds aflatoxinogene

المخلص

يهدف هذا البحث إلى توصيف و تصنيف عزلات *Aspergillus* من فئة *Flavi* من مختلف عينات علف الماشية (خليط العلف و المكونات الأولى: الذرة، فول الصويا و نخالة القمح) التي جمعت من مختلف المناطق الجزائرية باستعمال عدة طرق للأنماط الظاهرية. في هذا البحث خمسة أوساط مختلفة استعملت لهذا الغرض (MEGA، GN25، CY20s و AFPA) في درجة حرارة 25 درجة مئوية و وسط CYA في ثلاث درجات حرارة مختلفة (25، 37 و 42 درجة مئوية) لتوصيف نوع *Aspergillus* فئة *Flavi* و ذلك اعتمادا على الخصائص المورفولوجية للمستعمرة (سرعة النمو، لون المستعمرة و لون خلفية المستعمرة)، بالإضافة إلى الخصائص المجهرية (مسليوم مقسم أو أنبوبي، الأبواغ الكونيدية: لونها و نمطها، الرأس الكونيدي: وحيد أو ثنائي السلسلة، شكل الحويصلة و إنتاج السموم مثل سم الأفلاتوكسين (G₂،G₁، B₂،B₁)، إنتاج CPA، حمض الأسبرجيليك و الأوكراتوكسين أ. أظهرت نتائج التحليل الميكرو و الماكرومورفولوجي، إنتاج السموم و نواتج الأيض الثانوي وجود نوع *A. flavus* بنسبة 60% يليها *A. tamarisii* بنسبة 15,29%، *A. oryzae* بنسبة 9,41%، *A. sojae* بنسبة 7,64%، *A. pseudotamarisii* بنسبة 4,11%، *A. parasiticus* بنسبة 1,76% و *A. noninus* بنسبة 1,76%.

تمت دراسة القدرة السمية للفطريات على وسط CAM بالنسبة للفطريات *Aspergillus* فئة *Flavi*.

تم الكشف عن إنتاج السموم الفطرية و طبيعتها بواسطة الفصل الكروماتوجرافي على طبقة رقيقة.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أنه لأجل 170 فطر معزول من *Aspergillus* فئة *Flavi*: 131 (77%) وصفت على أنها *Aspergillus flavus*، 60% قادرة على إنتاج سم الأفلاتوكسين و CPA، من ضمن هذا النوع 19,41% ينتج السكليروت حجم كبير. الفطريات الغير منتجة للأفلاتوكسين مثل *A. sojae* (7,64%) ليست لها القدرة على إنتاج أي سم فطري بينما *A. oryzae* (9,41%) تنتج CPA فقط.

سنة عزلات ضمت إلى *A. parasiticus*، هذه الأخيرة تعتبر منتجة للأفلاتوكسين بنسبة كبيرة و لكنها لا تنتج CPA، ثلاث عزلات (1,76%) تنتج الأفلاتوكسين ب، و ثلاث عزلات (1,76%) تنتج الأفلاتوكسين ب و ج.

عزلات *A. tamaris* (15,29%) لها القدرة على إنتاج CPA و لكنها لا تنتج سم الأفلاتوكسين B و السكليروت، بينما نوع *A. pseudotamaris* (4,11%) ينتج CPA و الأفلاتوكسين ب بدون سكليروت.

هذه الأنواع دليل على تلوث المواد الغذائية و هي تعتبر ملوثات التخزين

الكلمات المفتاحية : *Aspergillus* فئة *Flavi*، أفلاتوكسين، غذاء الماشية، العفن الأفلاتوكسيني.

Table des matières

Introduction.....	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Les champignons.....	4
1. Généralité.....	4
2. Classification des champignons.....	4
2.1. Critères d'identification des moisissures.....	5
3. Les moisissures toxigènes.....	5
4. Le genre <i>Aspergillus</i>	6
4.1. Identification du genre <i>Aspergillus</i>	6
4.1.1. Caractères culturels généraux.....	6
4.1.2. Morphologie microscopique.....	7
5. <i>Aspergillus</i> de la section <i>Flavi</i>	8
II. Les métabolites secondaires.....	13
1. Les mycotoxines.....	13
2. Les principales mycotoxines.....	13
2.1. Les aflatoxines.....	14
2.1.1. Structure et propriétés physico chimique.....	14
2.1.2. Effets toxiques des aflatoxines.....	15
3. Réglementations.....	17
3.1. Limites mondiales relatives aux aflatoxines.....	27

4. L'acide cyclopiazonique (CPA).....	19
5. Ochratoxine A (OTA).....	19
5.1. Propriétés physico-chimiques.....	20
6. L'acide kojique.....	20
7. Les sclérotés.....	21

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL.....	23
1. Souches de références.....	23
2. Les isolats de champignons.....	23
II. MÉTHODES.....	25
1. Repiquage des souches isolées.....	25
2. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines.....	25
2.1. Détection de la fluorescence sur milieu de culture.....	25
2.2. Détection et confirmation de la production d'aflatoxine par chromatographie.....	26
2.2.1. Extraction des aflatoxines du milieu de culture.....	26
2.2.2. Détection des aflatoxines par Chromatographie sur couche mince.....	27
3. Production d'acide cyclopiazonique (CPA).....	28
3.1. Culture et extraction de CPA.....	28
3.2. Détection de l'acide cyclopiazonique par CCM.....	28
4. Caractérisation morphologique des isolats.....	28
4.1. Préparation de l'inoculum.....	28

4.2. Méthodes d'ensemencement.....	29
5. Examen des cultures.....	29
5.1. Diamètres de colonie et caractère culturaux.....	29
5.2. Caractères morphologiques.....	30
5.2.1. Prélèvement direct avec ruban Adhésif.....	30
5.2.2. Préparation de la microculture.....	31
6. Milieu de montage et colorants.....	31
7. Production de sclérotés.....	31
8. Conservation des souches fongiques isolées.....	32
RESULTATS ET DISCUSSION.....	33
I. RESULTATS	
1. Identification des isolats.....	34
2. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par les isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	34
3. Production de l'acide cyclopiazonique (CPA).....	37
4. Production des sclérotés.....	37
5. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A.....	38
6. Détermination des espèces selon le chimio-morphotype.....	38
II. Discussion.....	50
CONCLUSION.....	54
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	57
ANNEXES	

INTRODUCTION

Aspergillus section *Flavi* est l'un des genres les plus importants des micromycètes, avec beaucoup d'espèces ayant le grand impact sur divers champs d'intérêt : en tant que microbes pathogènes de l'être humain, l'animal et de plante, comme agents de détérioration des produits alimentaires ou comme producteurs de bioactif et/ou métabolites secondaires toxiques. En plus, certains des micro-organismes les plus importants utilisés dans des fermentations de nourriture et dans des bioprocédés industriels font partie de ce genre. À l'intérieur de ce genre, la section *Flavi* est considérée comme un problème majeur pour l'industrie alimentaire pendant les cinq dernières décennies, comme elle comporte des espèces responsables de la production d'un groupe de composés fortement toxigènes : les aflatoxines (AFs) (Rodrigues *et al.*, 2011).

La taxonomie d'*Aspergillus* section *Flavi* est complexe et en constante évolution (Geiser *et al.*, 2007). La systématique classique d'*Aspergillus* section *Flavi* est basée principalement sur des différences morphologique et caractéristiques culturaux (Raper et Fennell 1965 ; Samson 1979 ; Klich et Pitt 1988 ; Kozakiewicz 1989). Cette approche a ses limites à cause de la diversité morphologique au sein des mêmes taxa (dans la même espèce. et entre les espèces). La taxonomie d'*Aspergillus* a beaucoup évolué, elle est devenue polyphasique en prenant en considération les caractéristiques biochimiques, écologiques et moléculaires. Cette nouvelle approche en particulier l'étude moléculaires a permis de décrire de nouvelles espèces et de revoir la position taxonomiques des autres espèces de ce genre (Horn, D.1997 ; Li *et al.*, 1998 ; Peterson 2000, 2008 ; Ito *et al.*, 2001 ; Peterson *et al.*, 2001 ; Rigo *et al.*, 2002 ; Frisvad *et al.*, 2005 ; Pildain *et al.*, 2008).

Sur la base de la méthode conventionnelle de la classification, *Aspergillus* section *Flavi* inclut six espèces économiquement importantes qui sont très étroitement liées morphologiquement et phylogénétiquement : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus Sojae* et *Aspergillus tamarii*. Ces espèces partagent plusieurs caractères mais elles diffèrent dans leur capacité de produire les AFs. En effet, les espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* sont habituellement divisées en deux groupes. Le premiers groupe comporte les isolats à usage domestique, à savoir *A. oryzae*, *A. sojae* et *A. tamarii*, et elles sont non aflatoxinogènes et sont employés couramment dans le procédé de fermentation et sources d'enzymes dans les pays asiatiques. Le deuxième groupe contient les espèces aflatoxinogènes, qui incluent *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, qui constituent un problème majeur pour la santé animale et humaine à cause de leur capacité à se développer dans le champs et dans les aliments.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la vérification de la qualité de l'aliment de bétail dans certaines régions en Algérie. Pour cela nous nous sommes fixé comme objectifs l'étude de la capacité de la production des aflatoxines des isolats appartenant au genre *Aspergillus* section *Flavi* et l'identification et la détermination des principales espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* isolée à partir de différents échantillons d'aliment du bétail.

Ce travail est divisé en trois parties. Dans la première partie nous évoquerons les généralités sur les moisissures, et particulièrement le genre *Aspergillus* de la section *Flavi* et leurs critères d'identification.

Dans la deuxième partie, nous décrivons Les critères d'identification des espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* qui sont basés sur l'étude morphologique et le profil des mycotoxines produites (aflatoxines, l'acide cyclopiazonique, l'ochratoxine...).

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

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les champignons

1. Généralité

Les champignons, ou les mycètes, sont des organismes eucaryotes uni-ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Les moisissures de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser des substrats très divers (végétaux, papier, cuir, murs...). Il s'agit d'organismes hétérotrophes et ubiquitaires (Tabuc, 2007).

Une caractéristique majeure des champignons est leur mode de reproduction; ils produisent un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de contamination considérable. Les spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui représentent le principal critère de leur classification (Tabuc, 2007).

2. Classification des champignons

Les champignons présentent une très grande variété taxonomique du fait de l'organisation complexe de l'appareil végétatif et de leur mode de reproduction. La classification de Kwon Chung et Bennett (1992) modifiée par de Hoog et Guarro (1995) est la plus utilisée actuellement, elle est basée sur la morphologie des spores produites au cours des cycles de reproduction sexuée. Elle distingue les quatre divisions suivantes :

- Les Zygomycètes: espèces qui produisent des spores non flagellées, et qui sont contenues à l'intérieur d'une cellule renflée. Champignons dits inférieurs.
- Les Ascomycètes: espèces qui produisent des spores qui sont regroupées à l'intérieur de sacs (les asques). Champignons dits supérieurs.
- Les Basidiomycètes: espèces dont les spores sont portées par les basides. Champignons dits supérieurs.
- Les Hyphomycètes: espèces qui constituent un groupe hétérogène qu'on ne connaît pas actuellement, pour la plupart la forme de reproduction sexuée. (Cahagnier *et al.*, 1998 ; Kiffer & Morelet, 1997).

On estime à plus de 100 000 le nombre d'espèces fongiques, plus de 1000 d'entre elles pouvant contaminer les aliments (Castegnaro & Pfohl-Leskowicz, 2002). Toutefois, les Ascomycètes regroupent un grand nombre d'espèces pathogènes pour l'homme et les animaux (champignons filamenteux comme les *Aspergillus*) (Sutton *et al.*, 1998 ; Botton *et al.*, 1990). Ce groupe est d'une grande importance économique, certaines espèces sont souvent retrouvées comme des parasites redoutables des végétaux (l'ergot du seigle parasité

par *Claviceps purpurea*), d'autres peuvent entraîner des altérations aux denrées alimentaires et élaborer des toxines.

2.1. Critères d'identification des moisissures

L'identification de très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique. Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux 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, qui reste la base de l'identification (Botton *et al.*, 1990).

3. Les moisissures toxigènes

Deux groupes de champignons (ou moisissures) toxigènes (producteurs de mycotoxines) peuvent être distingués. Le premier type est constitué de champignons envahissant leur substrat et produisant la mycotoxine sur plantes sénescents ou stressées : il sera question de toxines de champs. L'autre groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après récolte ; on les qualifiera de toxines de stockage. Ainsi, des champignons du sol ou des débris de plantes peuvent disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage si les conditions le permettent.

Des moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant qu'il y a des éléments nutritifs, de l'humidité (activité en eau A_w supérieure à 0,6), d'où la grande variété des substrats alimentaires contaminés. Les aliments contaminés par les mycotoxines peuvent être classés en deux grands groupes : les aliments et produits d'origine végétale, et ceux d'origine animale. Parmi les produits et aliments d'origine végétale, les céréales et leurs produits dérivés présentent le plus grand facteur de risque compte tenu de la fréquence de contamination et de leur consommation importante. Les autres produits d'origine végétale sont les fruits et légumes secs (graines oléagineuses, haricots et raisins secs), les épices, le café et le cacao et les jus et produits de fermentation (jus de pomme, de raisin, bière, vin et cidre). Parmi les produits et aliments d'origine animale, le lait, les œufs, les viandes, les abats et tout ce qui en dérive doivent retenir l'attention.

4. Le genre *Aspergillus*

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes ou section morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990 ; Roquebert, 1998). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines.

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002); ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994).

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines. Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Botton *et al.*, 1990).

4.1. Identification du genre *Aspergillus*

4.1.1. Caractères culturels généraux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22 - 25°C; les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37 - 40°C est parfois jusqu'à 57°C (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994).

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces: gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993).

4.1.2. Morphologie microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur la quelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petits structures insérés sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (Figure 1) (Badillet *et al.*, 1987 ; Raper et Fennell, 1965). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir.

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

Pour certaines espèces, des formations sexuées apparaissent parfois en culture. Il s'agit de cléistotèces qui contiennent des asques arrondis renfermant chacun 8 ascospores.

Les « hüllecells » ou les cellules en noisette, sont des formations arrondies, réfringentes à paroi épaisse qui accompagnent souvent les formes sexuées, mais que l'on peut également observer isolément, indépendamment de la reproduction sexuée.

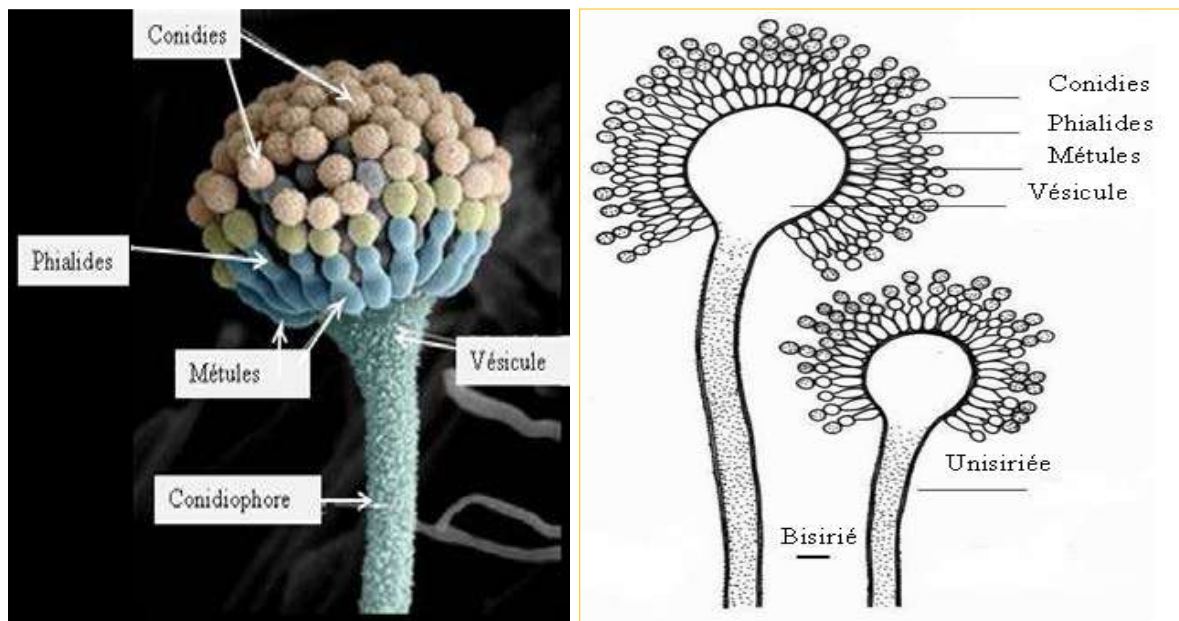


Figure 01. Caractères micro morphologiques du genre *Aspergillus*.

(www.thegourdreserve.com/mold/into.shtml).

5. *Aspergillus* de la section *Flavi*

Les membres d'*Aspergillus* section *Flavi* (groupe d'*A. flavus*) occupent des niches écologiques très diverses. Les espèces de cette section peuvent être présentes dans la nature soit comme des saprophytes dans le sol ou comme des parasites des plantes, des insectes et des animaux (Horn & Dorner, 1998). 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 & Moss, 1985). De plus, ce sont les espèces les plus fréquentes. 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.

De très nombreuses études ont été menées sur ce groupe (Samson & Pitt, 2000). D'après Samson *et al.* (2006), il y'a 18 espèces appartenant à la section *Flavi*. Ces espèces développent des couleurs allant du jaune-vert à brun.

Les critères d'identification des espèces de la section *Flavi* sont actuellement basés sur la morphologie, le profil des mycotoxines produites et l'analyse des séquences de l'ADNr (Samson *et al.*, 2006 ; Varga *et al.* 2003; Ito *et al.*, 2001). L'analyse des séquences ITS des isolats a montré qu'*Aspergillus* section *Flavi* forme 3 clades : (*A. alliaceus*, *A. flavus* et *A. tamarii*) qui peuvent être distingués par la couleur des colonies et leur composition en ubiquinones (Samson *et al.*, 2006 ; Rigó *et al.*, 2002). *A. flavus* est une espèce génétiquement très complexe et a été subdivisée en deux catégories, selon les caractères morphologique et génétique, et le profil de production des mycotoxines.

Morphologiquement, on peut distinguer deux catégories d'isolats. La première catégorie produit des sclérotés grandes, de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400 µm. La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de type « S » (Small), de diamètre inférieur à 400 µm (Cotty, 1989). Selon (Geiser *et al.* 1998, 2000 ; Vaamonde *et al.* 2003), *A. flavus* est divisé en deux groupes non distincts morphologiquement. Le groupe I comprend les types « L » et « S » producteur d'aflatoxine B et le groupe II comprend uniquement le type « S » capable de produire les aflatoxines B et G. Ces auteurs ont suggéré que les isolats de type « S » (groupe II) méritent d'être considérés comme une espèce à part (Geiser *et al.*, 2000). D'après Hua Sui-Sheng (2002), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le type « L » comprend des producteurs et des non producteurs.

La production d'aflatoxines durant le métabolisme secondaire est sans doute le caractère le plus important pour *Aspergillus* section *Flavi*. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*,

et *A.nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987) sont les espèces productrices d'aflatoxines les plus communes. *Aspergillus flavus* produit généralement les aflatoxines de type B₁ et B₂ et l'acide cyclopiazonique (CPA), mais la production de ces toxines est extrêmement variable (Horn & Dorner, 2002). Par contre, *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent les quatre types d'aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ mais pas le CPA comme le montre (le tableau 1) (Varga *et al.*, 2003 ; Horn *et al.*, 1996 ; Dorner *et al.*, 1984).

Tableau 01. Production d'aflatoxines B, G et d'acide cyclopiazonique par les principales espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (Varga *et al.*, 2003).

Espèce	AFB	AFG	Acide cyclopiazonique
<i>A. flavus</i> groupe I	+	-	±
<i>A. flavus</i> groupe II	+	±	+
<i>A. oryzae</i>	-	-	±
<i>A. parasiticus</i>	+	+	-
<i>A. sojae</i>	-	-	-
<i>A. nomius</i>	+	+	-
<i>A. bombycis</i>	+	+	-
<i>A. tamarii</i>	-	-	+
<i>A. caelatus</i>	-	-	-
<i>A. pseudotamarii</i>	+	-	+

Généralement, *A. parasiticus* est fortement productrice d'aflatoxines, et des isolats non producteurs d'aflatoxines G sont rares chez cette espèce (Tran-Dinh *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 1996). Récemment la production d'aflatoxines par *A. pseudotamarii* a été rapportée (Chang *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2001). Actuellement, la liste des espèces aflatoxinogènes de la section *Flavi* comprend: *A. arachidicola*, *A. bombycis*, *A. flavus*, *A. minisclerotium*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii* et *A. toxicarius* (tableau 02). Les autres espèces productrices d'aflatoxine B₁ classées à l'extérieur de la section *Flavi* sont: *A. Ochraceoroseus*, *A. rambelli* (*Aspergillus* section *Ochraceorosei*), *Emericellaa stellata* et *E. venezuelensis* (*Aspergillus* section *Nidulantes*) (Frisvad *et al.*, 2005).

Il est donc vraisemblable que l'aflatoxine peut être produite par d'autres espèces d'*Aspergillus*. *A. nomius*, morphologiquement très proche d'*A. flavus*, produit les aflatoxines B et G et est fréquente dans le sol et parasite les insectes (Kurtzman *et al.*, 1987; Peterson, 2000). *A. pseudotamarii* a été isolée au Japon, au Brésil (Ito *et al.*, 2001), dans les sols des forêts d'Afrique (Klich *et al.*, 2000) et tout récemment dans les sols de Thaïlande (Ehrlich *et al.*, 2007). A la différence d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus*, les autres espèces aflatoxinogènes n'ont pas d'impact majeur en agroalimentaire.

Tableau 2. Espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* et leurs métabolites (Frisvad *et al.*, 2004).

Espèces	Acide kojique	AFBs	AFGs	CPA	Acide aspergillique	OTA
<i>Aspergillus arachidicola</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Aspergillus avenaceus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus bombycis</i>	+	+	+	-	+/-	-
<i>Aspergillus caelatus</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+/-	-	+	+	-
<i>Aspergillus lanosus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus leporis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus minisclerotium</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Aspergillus nomius</i>	+	+	+	-	+	-

Suit du tableau 2 :

Espèces	Acide kojique	AFBs	AFGs	CPA	Acide aspergillique	OTA
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	+	+	+/-	+	+	-
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Aspergillus sojae</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus tamarii</i>	+	-	-	+/-	-	-
<i>Aspergillus toxicarius</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Petromyces albertensis a</i>	+	-	-	-	-	+
<i>Petromyces alliaceus b</i>	+	-	-	-	-	+

a: Forme sexuée d'*Aspergillus albertensis*. b: Forme sexuée d'*Aspergillus alliaceus*.

+ : producteur. - : non producteur. +/- : production variable suivant les souches.

CPA : acide cyclopiazonique.

a. *Aspergillus flavus*

Cette espèce se caractérise par un thalle vert jaune à vert olive, floconneux, plus dense vers le centre, lâche en périphérie. Des colonies granuleuses sur Malt Extract Agar (MEA) montrant un revers incolore à beige clair, fertile sur toute la surface alors que sur milieu *Aspergillus flavus parasiticus* Agar (AFPA), un revers orange caractéristique est observé. Les têtes aspergillaires ont une vésicule hémisphérique (25 à 60 µm de diamètre). Ces têtes sont uni ou bisériées, selon leur degré de maturation radiées, de couleur vert jaune à vert olive. La vésicule est sphérique entièrement recouverte ou au trois quart, donnant des phialides verdâtres, de dimensions (6-10µm x 4-5.5µm) à disposition radiaire ou en colonne.

Les conidies gris pâle sont subsphériques à ellipsoïdales, échinulées et mesurent 3 à 4,5 µm de diamètre. Les conidiophores sont longs (jusqu'à 1mm de longueur) et les plus âgés

sont rugueux. Les sclérotés sont souvent produits chez les isolats jeunes, de taille et de forme variables, souvent brunes à noires.

Les mycotoxines produites par cette espèce sont l'AFB₁, l'AFB₂, l'acide aspergillique, l'acide kojique, l'acide cyclopiazonic (CPA) et l'acide 3-nitropiopianique (Pitt et Hocking, 1997).

b. Aspergillus parasiticus

Cette espèce se caractérise par un thalle vert jaune sombre, floconneux et des colonies granuleuses et denses et un revers incolore à beige clair sur Malt Extract Agar (MEA). Le conidiophore de taille de 250-500 µm 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 7-11 µm portant des conidies sphériques de 4-6 µm de diamètre à disposition radiaire ce qui la diffère parfois d'*A. flavus* caractérisée par des conidies plus petites. Les sclérotés occasionnellement produits chez les isolats jeunes, sphériques de 400-800 µm de diamètre sont souvent blanches au début et deviennent noires avec le temps.

Les mycotoxines produites par cette espèce sont les AFB₁, AFB₂, AFG₁ et AFG₂ (Pitt et Hocking, 1997)

c. Aspergillus oryzae

Ce champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22 - 25°C, elle forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord de couleur blanche, puis jaune, et enfin vert-jaunâtre à vert olive. Le revers peut être incolore ou jaunâtre.

Cette espèce peut souvent être confondue avec *A. flavus*. Les têtes unisériées ou bisériées (les deux aspects pouvant cohabiter sur une même souche) sont radiées, jaunâtre au début puis jaune verdâtre à vert-olive, puis évoluent vers des tons bruns.

Les conidiophores, hyalins sont souvent longs (2,5 - 5 mm), plus ou moins verruqueux suivant les souches. Les vésicules sont sub-globuleuses à paroi mince, mesurent 40 - 75 µm de diamètre. Les phialides (8 - 15 x 3 - 5 µm) sont insérées directement sur la vésicule ou portées par des métules. Les conidies d'abord piriformes à elliptiques deviennent sub-globuleuses à globuleuses, de taille très variable, lisses ou finement verruqueuses (Tabuc, 2007).

d. Aspergillus nomius

Cette espèce est étroitement liée à *A. flavus* (Kurtzman *et al.*, 1986a). En l'absence des sclérotés, les deux espèces sont morphologiquement indifférentiable.

Les différences importantes sont qu'*A. nomius* produit tous les deux aflatoxines B et G avec des quantités plus élevées qu'*A. flavus* (Ehrlich et autres, 2007), et les sclérotés ont une forme de balle, non sphérique comme ceux d'*A. flavus*.

II. Les métabolites secondaires

1. Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés mais seule une trentaine possède de réelles propriétés toxiques préoccupantes. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales mais aussi les fruits, noix, amandes, grains, fourrages ainsi que les aliments composés et manufacturés issus de ces filières destinés à l'alimentation humaine et animale (AFSSA, 2009).

2. Les principales mycotoxines

Les principales mycotoxines peuvent être produites par 5 genres de champignons: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria*. Compte tenu de leurs propriétés toxiques chez l'homme et l'animal et de leur fréquence de contamination des matières premières et des aliments, les mycotoxines les plus importantes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone.

Tableau 03. Mycotoxines et champignons responsables de leur production (AFSSA, 2009).

Champignons	Toxines
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxine Stérigmatocytine Ochratoxine A
<i>Penicillium</i>	Patuline, Citrinine, Pénitrem A, Acide cyclopiazonique, ochratoxine A

Suite du tableau 03 :

Champignons	Toxines
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes (DON, NIV, Toxine T-2, DAS) Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Moniliformine
<i>Alternaria</i>	Alternariol Acide Ténuazonique
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'Ergot

2.1. Les aflatoxines

Les aflatoxines sont produites par des *Aspergillus* se développant entre autres sur les céréales et les oléagineux dans des atmosphères chaudes et humides (Castegnaro&Pfohl-Leszkowicz, 2002).

2.1.1. Structure et propriétés physico chimique

Les aflatoxines sont caractérisées au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (Aflatoxine B) ou des lactones hexatoniques (Aflatoxine G). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur les noyaux.

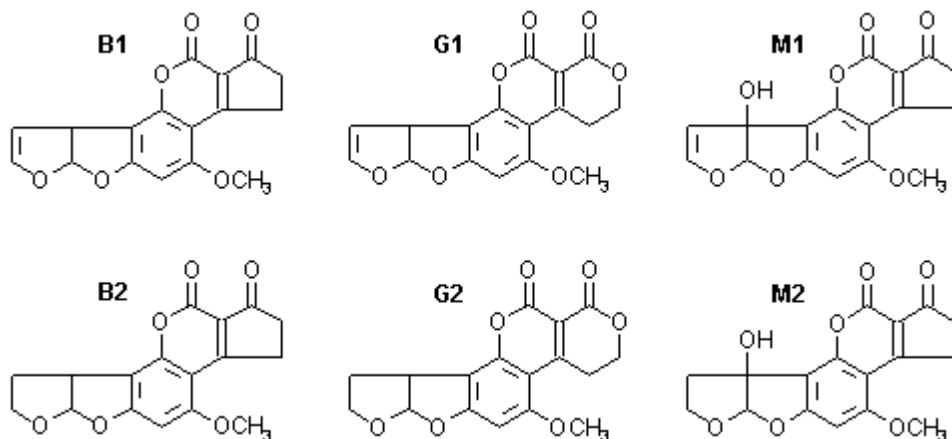


Figure 02. Structure des aflatoxines (Quillien, 2002).

Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau (10-20 mg/litre), insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires à polaires (chloroforme et méthanol). La fluorescence intense des aflatoxines, une fois exposées à des longueurs d'ondes ($\lambda = 365$ nm) de la lumière ultraviolette (UV), a pour avantage de détecter ces composés à des niveaux extrêmement bas (de l'ordre du nanogramme). L'aflatoxine de type B (AFB = AF "bleue") donne une fluorescence bleue et l'aflatoxine de type G (AFG = AF "Green"), donne une fluorescence verte. Cette fluorescence fournit la base pour pratiquement toutes les méthodes physico-chimiques de leur détection et leur quantification. Les propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 04. Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines (Dutton *et al.*, 1985).

Aflatoxine	Formule brute	Masse Molaire	Point de fusion	Absorption maximale à la lumière UV dans le méthanol coefficient d'extinction molaire	
				A 265 nm	A 360–362nm
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,3	268–269	12 400	21 800
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,3	286–289	12 100	24 000
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	244–246	9 600	17 700
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3	237–240	8 200	17 100
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3	299	14 150	21250 (357 nm)
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12100 (264nm)	22900 (357 nm)
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230–234	10800 (261nm)	14100 (325 nm)

2.1.2. Effets toxiques des aflatoxines

Les aflatoxines comptent parmi les substances naturelles ayant un potentiel cancérigène et mutagène le plus élevé. Concernant la toxicité chronique, des études épidémiologiques réalisées dans le monde ont clairement établi l'implication de l'AFB₁ dans l'étiologie du cancer primaire du foie chez l'homme (Wogan, 2000). Ils ont montré aussi que

les risques liés au développement du cancer du foie sont 30 fois plus élevés chez les individus ayant des antécédents d'hépatites B (Henry & Bosch, 2001). Cette situation est souvent rencontrée dans les pays en voie de développement, pour lesquels il n'existe pas de législation régulant les concentrations d'aflatoxines dans l'alimentation, et dans lesquels la vaccination contre l'hépatite B n'est pas appliquée de façon systématique pour des raisons économiques et/ou politiques.

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

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

En effet, les effets des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique de l'animal, le mode d'administration, la composition de l'alimentation. L'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 & Cox, 1981).

Ingérée en grande quantité, l'aflatoxine peut être responsable de toxicités aiguës. Elle se caractérise généralement par la mort rapide des animaux. Ils présentent alors un foie décoloré et augmenté de volume (hépatotoxicité), les reins présentent des signes de glomérulonéphrite et les poumons sont congestionnés. Les aflatoxines sont tératogènes (Arora *et al.*, 1981). L'effet tératogène est bien décrit chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de développement, une microcéphalie, une anophthalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (Vesely *et al.*, 1983). L'exposition chronique aux aflatoxines est responsable du cancer chez diverses espèces animales. En effet, l'AFB₁, mais également le mélange des quatre aflatoxines (B₁, B₂, G₁ et G₂) induisent des tumeurs hépatiques chez le canard, la truite, le saumon et le singe (AFSSA, 2006). Toutefois, la

propriété toxique majeure de l'AFB₁ est son pouvoir cancérigène. En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez les hommes et les animaux. Le Centre international de la recherche sur le cancer a classé les aflatoxines (mélanges naturels des quatre aflatoxines) dans le groupe 1 (cancérogène humain) et l'AFM₁ dans le groupe 2B (cancérogène humain probable) (Autrup *et al.*, 1991) (CIRC, 1993 a).

3. Réglementations

Les données existantes sur la présence des mycotoxines dans divers aliments et les estimations de l'apport alimentaire de mycotoxines dans divers pays indiquent clairement que ces contaminants se trouvent en quantités très variables dans les produits agro-alimentaires susceptibles d'être contaminés et montrent que dans le monde entier les populations sont exposées à ces substances, bien qu'à des degrés différents. Les limites fixées par différents pays pour la teneur en mycotoxines, en particulier en aflatoxines dans les aliments contribuent sans aucun doute à réduire l'exposition du consommateur (Karine Joubrane, 2011).

3.1. Limites mondiales relatives aux aflatoxines

Dans le cadre du règlement 1831/2003/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et de la directive 2002/32 (et ses modifications) sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux, des teneurs maximales fixées pour les aflatoxines sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 05. Teneurs maximales en aflatoxines exprimées en µg/kg dans l'Union Européenne (Règlement 1881/2006/CE).

Alimentation	Toxine	Matrice	Teneur maximale En µg/kg
Humaine	Aflatoxine B ₁	Arachides (cacahuètes) + autres graines + fruits secs	de 2, 5 ou 8 selon le produit et son stade de transformation
		Céréales	2 ou 5 selon le produit et son stade de transformation
		Certaines épices	5
		Préparations à base de céréales et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge	0,1
	Aflatoxines B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	Arachides (cacahuètes) +autres graines + fruits secs	de 4, 10 ou 15 selon le produit et son stade de transformation
		Céréales	4 ou 10 selon le produit et son stade de transformation
		Certaines épices	10
	Aflatoxine M ₁	Lait (adultes)	0,05
		Préparations pour nourrissons Et enfants en bas âge	0,03
	Animale	Aflatoxine B ₁	Matières premières des aliments pour animaux
Aliments complets/complémentaires			de 5 à 20 selon les espèces animales

4. L'acide cyclopiazonique (CPA)

L'acide cyclopiazonique (CPA) est une mycotoxine produite par différentes espèces d'*Aspergillus*, notamment *Aspergillus flavus* et *A. tamarii*, et de *Penicillium*, notamment *Penicillium camembertii* et *P. cyclopium*. Elle peut être produite avec d'autres mycotoxines comme les aflatoxines (produites par *A. flavus*), ou la camembertine (produite par *P. camemberti* et *P. cyclopium*).

Bien que l'acide cyclopiazonique ait été identifié dans de nombreux aliments (céréales, légumineuses, viande, lait, fromages ...) très peu de mycotoxicoses animales lui sont attribuées en raison de sa faible toxicité et de sa faible teneur dans les denrées contaminées. Cependant, il faut noter qu'en raison de sa présence conjointe avec les aflatoxines, son implication réelle peut être sous-estimée.

Cette hypothèse a notamment été avancée pour expliquer les symptômes observés au cours des cas de la maladie « Turkey X disease » qui se sont produits en Angleterre au début des années 1960 (Cole, 1986). Par ailleurs, un seul cas de mycotoxicose humaine a été associé à cette toxine (AFSSA, 2006).

L'acide cyclopiazonique ($\text{CH}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$) est un acide indole tétramique de poids moléculaire 336 g/mol.

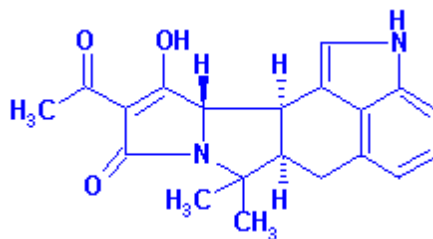


Figure 03. Structure chimique de l'acide cyclopiazonique

5. Ochratoxine A (OTA)

Cette mycotoxine est produite par différentes espèces de *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. viridicatum*...) et d'*Aspergillus* (*A. westerdijkiae*...). Elle fait partie de la famille des ochratoxines qui compte une dizaine de molécules connues. L'espèce *A. westerdijkiae* produit l'OTA à une température optimale de 28°C alors que *P. viridicatum* par exemple, produit la mycotoxine entre 4 et 30°C. De ce fait, l'OTA est une toxine fongique que l'on retrouve dans les céréales des régions chaudes ou tempérées (Varga *et al.*, 1996).

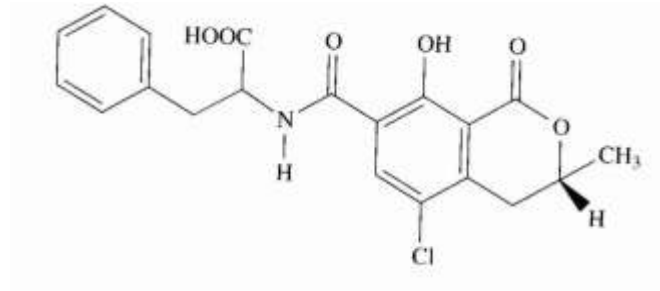


Figure 04. Structure chimique de l'ochratoxine A (OTA).

5.1. Propriétés physico-chimiques

L'OTA a été isolée pour la première fois à partir d'*Aspergillus ochraceus* en 1965 et a été identifiée dans les conditions naturelles, aux USA, en 1969, dans un échantillon de maïs. La formule brute de l'ochratoxine A est $C_{20}H_{18}ClNO_6$.

L'OTA, de masse moléculaire de 403,8 g/mol est un acide organique faible. A pH acide ou neutre, elle est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau. A pH alcalin, elle devient soluble et stable en solution aqueuse. En raison de sa structure, l'OTA se révèle stable au stockage et résiste généralement aux procédés de transformation industriels.

6. L'acide kojique

Obtenu par un procédé de fermentation à l'aide de la souche *Aspergillus oryzae*, l'acide kojique est un bioactif largement utilisé dans les soins éclaircissants. Cette molécule pose actuellement des problèmes d'ordre toxicologique (puisqu'elle s'avère mutagène) ; le Japon a déjà interdit son emploi (Pharm, Nantes, 1999).

La formule de l'acide kojique est ($C_6H_6O_4$; 5-hydroxy-2-(hydroxyméthyl)-4-pyrone)

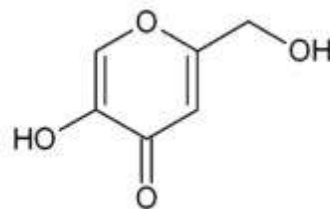


Figure 05. Formule de l'acide kojique

7. Les sclérotes

Les sclérotes sont des structures produites régulièrement par quelques espèces, variant en couleurs, la taille et la forme, se composant des cellules à parois épaisses. Ces organes de résistance permettant la survie du champignon dans les conditions défavorables. Les hyphes qui se trouvent en contact du milieu extérieur sont protégés contre les rayons UV grâce à leur coloration par des anthocyanes (Samson *et al.*, 2014).

MATERIEL ET MÉTHODES

I. Matériel

1. Souches de références

Les études du pouvoir producteur d'aflatoxines des isolats a nécessité l'utilisation d'une souche de référence: *Aspergillus flavus* NRLL62477, fournie par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'ENS de Kouba.

2. Les isolats de champignons

Un total de 170 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* qui ont été isolés à partir de divers aliment du bétail au niveau de laboratoire LBSM.

Tableau 06. Les souches sélectionnées à partir du l'aliment du bétail

Les souches	La matrice	La région
F ₁₂ , F ₁₃ , F ₁₄ , F ₁₅ , F ₁₆ , F ₁₇	Maïs, son de blé	Blida
F ₁ , F ₁₁ , T ₁	Aliment ponte	Blida
F ₅ , F ₆ , F ₇	Aliment croissance	Blida
F ₃	Granulé finition	Merabouli (Tizi)
A ₁ / F ₈ / m ₁₀ , m ₁₁ , m ₁₃	Tourteaux de soja	Tipaza (Sidi Rached)
A ₁₂ , A ₁₄ , A ₅ , A ₆ , A / F ₁ , F ₁₈ , F ₁₉ , F ₂₀ , F ₂₁ , F ₂₂ , F ₂₃ , F ₂₄ , F ₂₅ / m ₉	Soja	Soumaa (Blida)
F ₄	Aliment farine finition	Khemis khechna (bumerdes)
F ₂₆ , F ₂₇ , F ₂₈ , F ₂₉ , F ₃₀ , F ₃₁ , F ₃₂ , F ₃₄ , F ₃₅ , F ₃₆	Son de blé	Tipaza (Sidi Rached)
F ₄₆ , N ₁	Aliment ponte	Httatba
F ₄₀ , F ₄₁ , F ₄₂ , F ₄₃ , F ₄₄ , F ₄₅	Tourteaux de soja	Httatba
F ₃₇ , F ₃₈ , F ₃₉	Aliment granulé finition	Bejaia
F ₅₄ , F ₅₅ , F ₅₆ , F ₅₇ / O ₁ , O ₂ , O ₃ / O ₁ '	Aliment croissance	Httatba
F ₅₃	Son de blé	Guerouaw
F ₅₂	Maïs en poudre	Tipaza (Sidi Rached)
F ₄₇ , F ₄₈ , F ₄₉ , F ₅₀ , F ₅₁	Aliment croissance	Httatba
F ₆₃ , F ₆₄ , F ₆₅ , F ₆₆ , F ₆₇ , F ₆₈ , F ₆₉ , F ₇₀ , F ₇₁	Son de blé	Guerouaw

Suite du tableau 06 :

Les souches	La matrice	La région
F ₆₂	Granulé de dinde	Guerouaw
F ₅₈ , F ₅₉ , F ₆₀ , F ₆₁	Aliment ponte reproduction	Httatba
F ₇₂ , F ₇₃ , F ₇₄ , F ₇₅ , F ₇₆ , F ₇₇ , F ₇₈ , F ₇₉ , F ₈₀ , F ₈₁ , F ₈₂ , F ₈₄ , F ₈₅ , F ₈₆	Tourteaux de Soja	Httatba
T ₇	Maïs	Tipaza
F ₈₇ , F ₈₈ /m ₅	Tourteaux de soja	Guerouaw
F ₈₉ , F ₉₀ , F ₉₁ / m ₁ , m ₂ , m ₃ , m ₄	Granulé de dinde	Guerouaw
F ₉₆ , F ₉₈ , F ₉₉ , F ₁₀₀	Aliment farine démarrage	Bejaia
F ₉₃ , F ₉₄ , F ₉₅	Aliment ponte	Httatba
F ₉₂	Finition farine	Tipaza (Sidi Rached)
A ₃	Aliment granulé finition	Bejaia
M ₆ , M ₇ , S ₇ , S ₁₁ , S ₁₇ , S ₁₃ , S ₁₀ , C ₁₁	Maïs en poudre	Soumaa (Blida)
PRS	Poulet finition farine	Sétif
CCBG1	Croissance chaire	Bejaia
F ₁₀ , F ₁₀₆	Aliment farine démarrage	Bejaia
Mbres	Maïs	Sétif
JB ₉	Jaune bovin	Kouba
SBK ₄	Son de blé	Kouba
Poussin	Poussin	Bejaia
BN ₂	Boivin nekhela	Chleff
PBs	Poulet finition farine	Sétif
FDN ₃	Finition dinde nekhela	Chleff
K ₁₁ , K ₁₅	Maïs	Boudouaou
K ₃₆ , K ₃₇ , K _{37'} , K ₄₈ , K ₅₀ , K ₅₄ , K ₅₆ , K ₇₁ , K _{X175} , K ₈₆ , K ₈₈ , K ₈₉ , K ₉₃ , K ₉₆ , K ₁₀₂ , K ₁₀₃ , K ₁₀₄ , K ₁₀₈ , K ₁₀₉ , K ₁₁₂ , K ₁₁₅ , K ₁₁₈ , K ₁₁₉ , K ₁₂₈ , K ₁₄₉ , K ₁₅₁ , K ₁₅₃ , K ₂₀₀ , K _{X281} , K ₂₄₆	Maïs	Khmisse elkhashna

II. MÉTHODES

Le tri des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* par apport à l'ensemble (300) fournis par le laboratoire. L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'œil nu puis à la loupe binoculaire dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus*, d'un *Penicillium*, ou d'un autre genre en fonction de l'aspect morphologique.

1. Repiquage des souches isolées

Les souches ont été ensemencées sur le milieu Czapek à l'extrait de levure (CYA), puis repiquées sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA). L'incubation a eu lieu à 28 °C pendant 5 jours (Pane *et al.*, 2011).

2. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines

Le criblage des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'aflatoxines est réalisé par détection de la fluorescence à 365 nm et par chromatographie sur couche mince (CCM) selon Calvo *et al.*, (2004).

2.1. Détection de la fluorescence sur milieu de culture

Les souches fongiques sont ensemencées par point central (1 souche par boîte) sur le milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM) (Davis *et al.*, 1987), favorable à la production d'aflatoxines (Fente *et al.*, 2001), additionné de 0,3% de β 3 cyclodextrine qui permet d'améliorer nettement l'intensité de la fluorescence. La β 3-cyclodextrine et ses dérivés méthylés ont été utilisés par de nombreux auteurs (Franco *et al.*, 1998; Chiavaro *et al.*, 2001; Criseo *et al.*, 2001; Fente *et al.*, 2001 et Rojas *et al.*, 2005) pour la détection des souches aflatoxinogènes. 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.

2.2. Détection et confirmation de la production d'aflatoxine par chromatographie

2.2.1. Extraction des aflatoxines du milieu de culture

En vue d'une confirmation de la production des aflatoxines par CCM, les cultures des isolats sur milieu CAM ont subi une extraction au méthanol selon la méthode décrite par Calvo *et al.* (2004). Trois carottes de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte pièce du centre vers la périphérie de la colonie, les carottes découpées sont pesées puis introduites dans des tubes eppendorf de 2 ml. L'extraction des aflatoxines est réalisée par l'addition d'un volume du méthanol est additionné à fin d'avoir un rapport de 1g /ml, 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 15 minutes à 12000 r.p.m puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une micropipette puis transféré dans un autre tube eppendorf. Les extraits sont conservés à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C pour une analyse ultérieure (Figure 6).

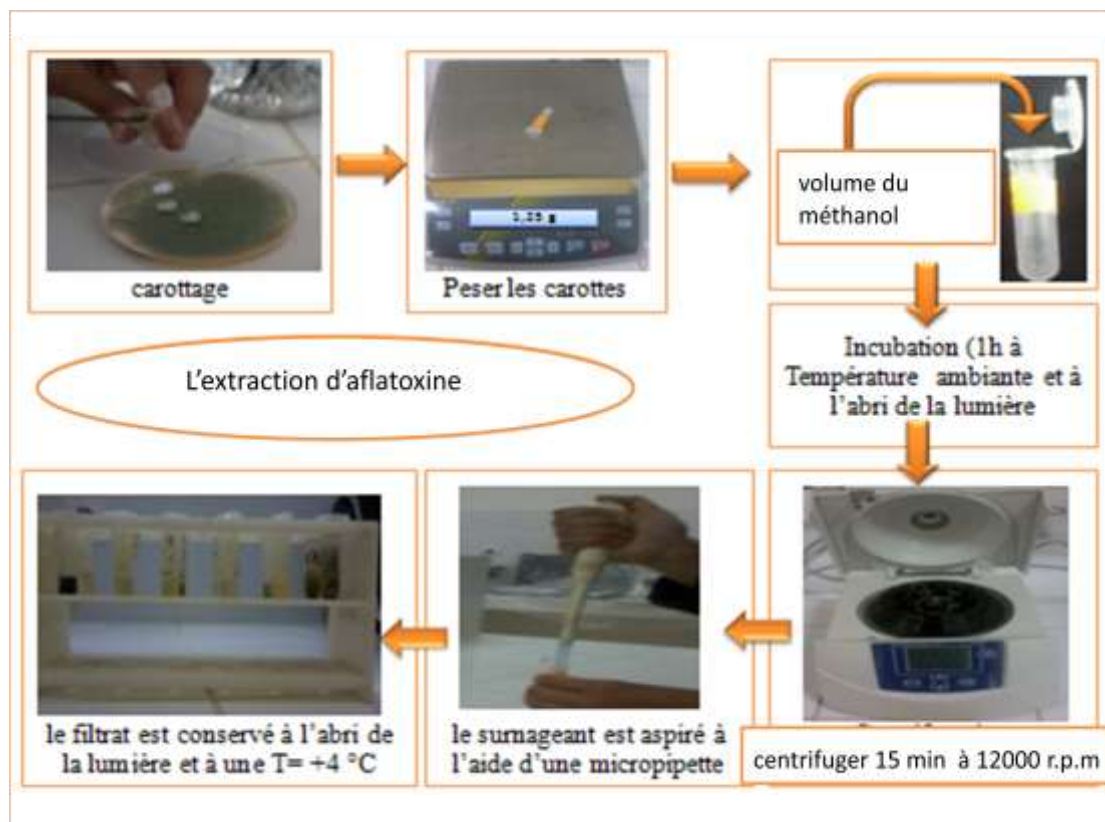


Figure 06. Représentation schématique de la procédure expérimentale de l'extraction d'aflatoxine.

2.2.2. Détection des aflatoxines par Chromatographie sur couche mince

Cette technique est très utilisée pour la révélation des aflatoxines. C'est la méthode chromatographique de séparation la plus simple. Les extraits sont spotés à raison de 25 μ l par spots. Les plaques de gel de silice ont été utilisées.

La séparation ou développement est effectuée dans une cuve en verre fermée (20 x 20 cm), par le contact de la plaque avec la phase mobile contenant un composé toluène / acétate d'éthyle / acide formique (90%) (5:4:1, v/v/v) et (chloroforme / acétone 90 :10: v/v).

a. Préparation des plaques

21g de gel de silice G-60 sont mélangé avec 50 ml d'eau distiller, boucher et agiter énergiquement. Etaler à l'aide d'un étaloir réglé d'une manière à obtenir une couche uniforme de gel de silice de 0,25 mm d'épaisseur. Laisser sécher à l'air. Au moment de l'utilisation activer les plaques en les plaçant pendant une heure dans un four à 110°C.

b. Dépôt des extraits à analyser

- ✓ A l'aide d'une micro seringue, déposer un aliquote de 20 μ l sur la plaque de CCM à 2 cm du bord inférieur. Sur la même plaque plusieurs échantillons peuvent être spotés avec des intervalles de 1,5 à 2 cm.
- ✓ Des standards, d'AFB₁ et d'AFG₁ sont spotés au même temps que les échantillons.
- ✓ 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 sec cheveu.
- ✓ Saturer la phase mobile pour éviter l'évaporation du solvant en utilisant une feuille de papier imbibée de la phase mobile sur la paroi de la cuve.
- ✓ Déposer la plaque verticalement dans la cuve à chromatographie qui contient la phase mobile composée de toluène / acétate d'éthyle / 90 % d'acide formique (5:4:1, v/v/v) ; 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 minutes sous une Sorbonne.

L'observation des plaques sous UV (à 365nm) permet de visualiser l'aflatoxine B sous forme d'une tache bleue avec un Rf = 0,42, l'aflatoxine G tache verte avec un Rf= 0,34. La

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

3. Production d'acide cyclopiazonique (CPA)

3.1. Culture et extraction de CPA

La production de l'acide cyclopiazonique (CPA) est réalisée sur milieu CYA selon la méthode décrite par Pildain *et al.* (2004) après 14 jours d'incubation, l'extraction de CPA est effectuée avec la même méthode utilisée pour l'extraction des aflatoxine.

3.2. Détection de l'acide cyclopiazonique par CCM

Un volume de 20 µl d'une solution standard de CPA et de chaque extrait à analyser, sont spotés sur des plaques de gel de silice. Le système de solvant de développement utilisé est l'acétate d'éthyle/ 2-propanol/ hydroxyde d'ammonium (40: 30: 20) (V :V :V) (Fernandez Pinto *et al.*, 2001). Après migration, le CPA est visualisé sous la lumière du jour après pulvérisation des plaques par le réactif d'Ehrlich (1 g de 4-diméthyle aminobenzaldéhyde dans 75 ml d'éthanol et 25 ml d'HCL concentré). (fernández pinto *et al.*, 2001). Le CPA est détecté sous forme de tache violette avec un Rf de 0,6.

4. Caractérisation morphologique des isolats

4.1. Préparation de l'inoculum

La suspension de spores de chaque souche d'*Aspergillus* section *Flavi* est obtenue à partir d'une culture sur milieu PDA incubée pendant 7 jours à 28°C. À l'aide d'une anse de platine stérile, la surface de la gélose est légèrement gratté puis mettre les spores dans des tubes eppendorf de 2ml contenant une solution d'agar stérile à 0,2 % et Tween 80 à 0,05 %. Et conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure.

Les boîtes de Pétri contenant les milieux de cultures différents sontensemencées en déposant 1 µl de la suspension de spore en trois points par boîte.

4.2. Méthodes d'ensemencement

La technique de Pitt est choisie (Pitt *et al.*, 1997)

- Les Cinq milieux utilisés pour l'identification sont MEA (Malt Extract Agar) et G25N (25% Glycérol Nitrate Agar), CY20S (CYA with 20% sucrose agar), AFAP à 25°C et CYA (Czapek Yeast Extract Agar) à 25, 37 et 42 °C.

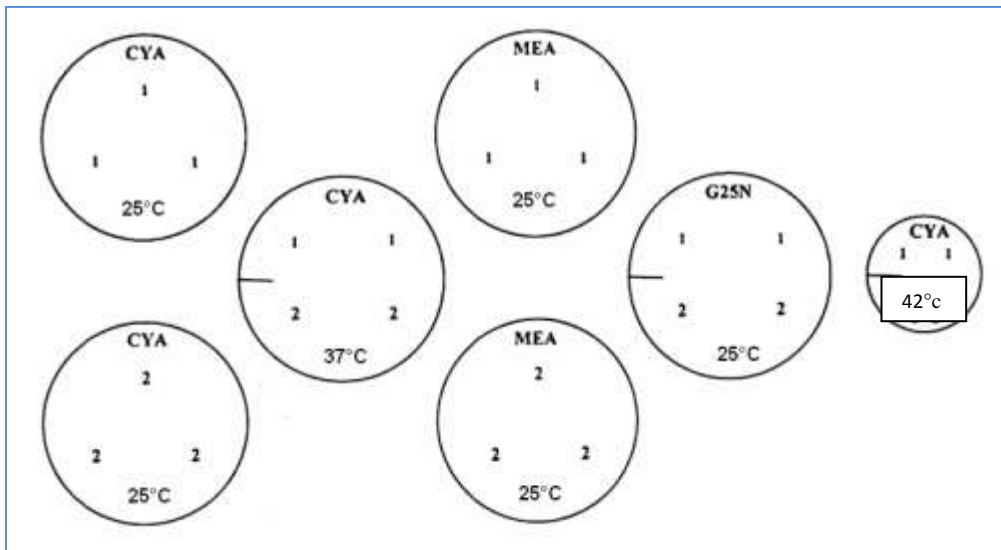


Figure 07. Schéma de culture des isolats fongiques (souche 1 et 2) Destinés à leur identification.

Généralement les boîtes de Pétri (90-100 Millimètres de diamètre) sont utilisées sauf lorsque l'incubation a lieu à 42°C on utilise alors des boîtes plus petites, de 50-60 millimètres de diamètre (Figure 07). La durée de culture est de 7 jours.

Les boîtes incubées à 37°C et 42°C doivent être enfermées dans des boîtes en plastique pour empêcher l'évaporation, donc l'assèchement du milieu (Pitt et Hocking, 2009).

5. Examen des cultures

Pour toutes les cultures obtenues après 7 jours, l'identification est fondée sur la technique de Pitt selon les caractéristiques suivantes (Pitt *et al.*, 1997).

5.1. Diamètres de colonie et caractère culturaux

On mesure les diamètres des colonies macroscopiques en millimètres sur le fond de la boîte.

La procédure d'identification des moisissures implique l'étude des caractères suivants :

-vitesse de croissance ;

- texture de thalle (laineux ; velouté....) ;
- couleur de thalle (pigmentation de mycélium ; couleur des conidies) ;
- couleur de revers de la culture et présence d'un pigment diffusible ;
- Exsudat (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien) (Diba *et al.*, 2007).



Figure 08. Technique pour mesurer des diamètres de colonie par la lumière transmise (pitt et Hocking 2009).

5.2. Caractères morphologiques

La croissance ou la germination microscopique à 28°C est exécuté avec un microscope de marque motic avec le champ, le contraste de phase et le système optique lumineux de DIC. Un appareil-photo d'Axio cam ERc5s a été monté sur le microscope pour la photomicrographie avec logiciel ZEIN. En microscopie à faible grossissement (10 - 40x), en utilisant deux techniques :

5.2.1. Prélèvement direct avec ruban Adhésif

Un morceau de ruban adhésif transparent d'environ 3 cm est appliqué délicatement sur la colonie à l'aide d'une pince, pour assurer une bonne adhésion on passe la pousse sur le ruban adhésif de manière à obtenir l'empreinte de la colonie. Le ruban est ensuite placé sur une lame en verre qui sera utilisée pour une observation microscopique.

Cette technique permet aux spores et au mycélium d'adhérer à la surface du scotch ce qui nous permet de les identifier directement au microscope photonique. Dans le cas d'une lecture directe au microscope, les spores de morphologie caractéristique peuvent être identifiées sans équivoque (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Stachybotrys*...), alors que les spores de faibles diamètres et présentant des ornements sommaires ne peuvent être différenciées (*Penicillium*, *Aspergillus*).

5.2.2. Préparation de la microculture

Décrite par Haris (Haris C, 1989), la technique de micro-culture consiste à inoculer les spores des moisissures sur une lame menée de petit carré de milieu MEA et les recouvrir par une lamelle. L'ensemble est conditionné dans une boîte de Pétrie en verre et humide puis incubé à $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 3 à 5 jours. Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$ (figure 9).

6. Milieu de montage et colorants

Le matériel fongique est observé en milieu liquide, entre lame et lamelle. L'eau convient généralement très bien au montage des préparations, mais provoque un gonflement des structures et modifie leurs dimensions et s'évapore rapidement. L'alcool est plus satisfaisant mais aussi très volatil. Le lactophénol d'Amann donne de très bons résultats. Il ne provoque ni contraction, ni gonflement des cellules ; peu volatil, il permet une bonne conservation des préparations.



Figure 09. Technique de micro culture

7. Production de sclérotés

La production des sclérotés par les *Aspergillus* section *Flavi* (caractère taxonomique important) est réalisée selon la méthode utilisée par de nombreux auteurs (Novas et Cabral, 2002; Pildain et al., 2004; Abbas et al., 2006). Elle consiste à cultiver les isolats à tester sur milieu gélosé Czapek Yeast agar (CYA) à 30°C pendant 21 jours à l'abri de la lumière. Une fois produits sur la surface du milieu de culture, les sclérotés sont obtenus en versant 10 ml

d'eau distillée par boîte de Pétri. Après grattage de la surface de la culture et filtration de son contenu, un rinçage à l'eau du robinet est effectué. Les sclérotes sont récupérés et séchés à l'air libre puis examinés au microscope photonique motic (GX10). Afin d'établir leurs morphotypes, les sclérotes ont été déposés sur une lame et lamelle puis observer sous microscope optique leur diamètre à été estimé. Le morphotype « L » produit des sclérotes de taille comprise généralement entre 500 μm et 800 μm . Par contre le morphotype « S » produit des sclérotes de taille inférieure, allant de 200 à 300 μm (figure10).

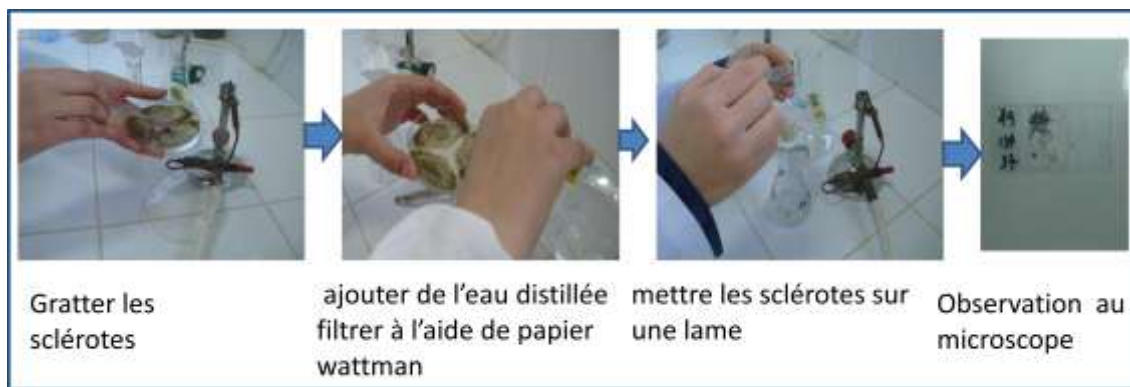


Figure 10. Obtention des sclérotes

8. Conservation des souches fongiques isolées

La conservation des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* est faite dans une solution de glycérol à 30 % (agar 0,5 g/l et Tween 80 0,5 g/l), qui est stockée à -20°C.

La méthode de conservation des souches la plus communément utilisée la plus simple, consiste à repiquer les souches en tube sur gélose inclinée de PDA (Botton *et al.*, 1990), les cultures sont maintenues pendant 7 jours à 28°C, puis elles sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Botton *et al.*, 1990).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats

Cette étude a été réalisée dans le but d'identifier la microflore fongique qui contamine divers aliments du bétail. Au cours de notre analyse mycologique, nous nous sommes intéressés à la recherche et l'identification des espèces *d'Aspergillus* section *Flavi*, étant réputées d'être les principaux producteurs de mycotoxines, en particulier, de l'aflatoxine, l'acide cyclopiazonique, l'ochratoxine A (OTA) ainsi que l'acide aspergillique.

Dans un premier temps, une sélection des souches *d'Aspergillus* section *Flavi* a été réalisée parmi les 300 souches isolées auparavant (Zahi et Brahmi, 2016), en se basant sur des critères morphologiques et la production des aflatoxines et d'OTA. Par la suite, 170 souches ont été choisies pour une étude ultérieure, qui consiste à analyser leur capacité à produire l'acide cyclopyazonique (CPA), l'acide aspergillique et de confirmer leur capacité à produire les aflatoxines (AFs) et l'ochratoxine A (OTA). Enfin une étude macro et micromorphologique a été effectuée.

1. Identification des isolats

Les principales espèces fongiques identifiées au cours de cette étude sont les espèces *d'Aspergillus* section *Flavi*. L'identification de différentes espèces de moisissures passe par leur description morphologique, macroscopique et microscopique. L'étude macroscopique prend en compte les caractéristiques du thalle (couleur, texture). Par contre au niveau micromorphologique les caractéristiques étudiées sont celles des cellules conidiogènes (phialides et métules), des conidies (taille, ornementation externe et couleur). Cinq milieux de culture différents ont été utilisés (MEA, GN25, CY20s et AFPA à 25°C et CYA à trois température différentes 25°C, 37 et 42 °C).

Les principales espèces ou groupes d'espèces isolées de ce genre sont: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarii*, *A. alliaceus*, *A. oryzae* et *A. sojae*. Les espèces de la section *Flavi* présentent des têtes conidiennes de couleur jaune-vert à brun, assez peu étendues et denses, avec des sclérotés brun foncé ou jaune. Au microscope : têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, réparties en plusieurs chaînes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé, conidiophores hyalins verruqueux, vésicules sub-globuleuses, conidies globuleuses rondes et rugueuses.

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

Nous avons étudié le pouvoir producteur d'aflatoxine de 170 souches appartenant à la section *Flavi* isolées des échantillons du divers aliment du bétail (maïs, tourteaux de soja, son du blé, aliment farine). Le screening des souches aflatoxinogènes par la fluorescence sous

U.V sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) a révélé un taux de production de 67,64% et la CCM a révélé un taux légèrement supérieur qui est 68,82%.

La détection de la production d'aflatoxines par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM est aussi performante que la détection par CCM. En effet, les deux méthodes ont révélé des pourcentages de production assez proches. Seuls 6 isolats faiblement producteurs s'avèrent être de faux négatifs sur milieu CAM. On note que la majorité des isolats produisent l'aflatoxine B, et certains produisent l'aflatoxine B et G (résultat montré par le test de CCM). On a noté que toutes les souches ayant montré une fluorescence sur milieu CAM se sont avérés aflatoxinogènes sur CCM et l'intensité de ce dernier est liée à la concentration des mycotoxines produites par la souche. Ainsi, lorsqu'un isolat est hautement producteur, une fluorescence des aflatoxines est visible après trois jours d'incubation, alors qu'un isolat faiblement producteur n'émet une fluorescence qu'après 6 - 7 jours d'incubation. L'analyse par CCM nous a permis de détecter une production d'aflatoxines chez 6 souches faiblement productrices.

Cette différence indique que la détection de la production d'aflatoxines sur milieux CAM n'est efficace que lorsqu'on a affaire à des isolats qui produisent une quantité d'aflatoxine plus ou moins élevée. Dans le cas contraire le passage par des méthodes chromatographiques comme la CCM est nécessaire afin d'apporter des résultats supplémentaires. En effet (Abarca *et al*, 1988) ont montré que l'absence de fluorescence ne signifie pas forcément l'absence de production d'aflatoxine.

La production des mycotoxines par les champignons est une conséquence combinée de la propriété génétique de la souche et de son environnement (Blumenthal, 2004), et dans une seule et même espèce, des différences de niveaux de production peuvent être observées (Vining, 1990).

La fluorescence des aflatoxines sur milieu de culture est illustrée par la (figure 11).

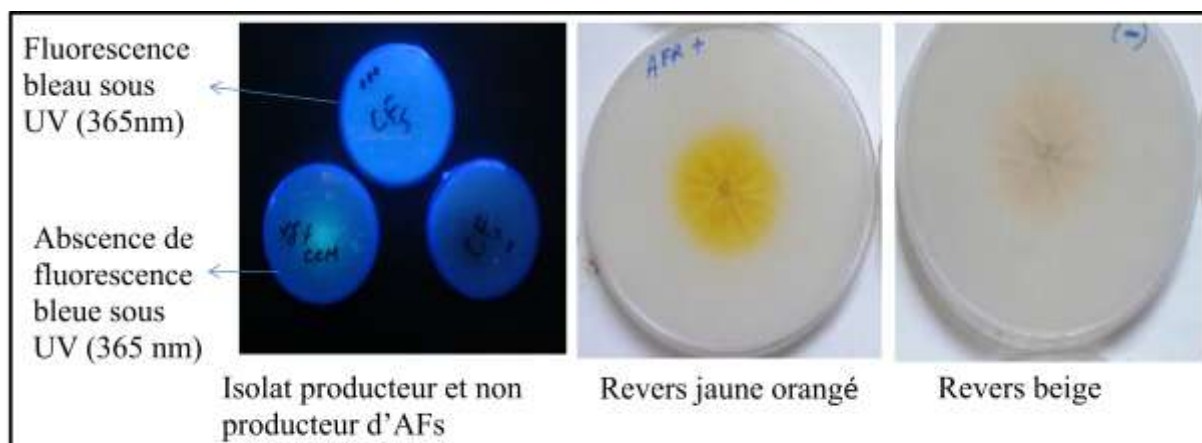


Figure 11. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus* section *Flavi* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).

La détection par chromatographie sur couche mince (CCM) a démontré une forte fréquence des isolats fortement producteurs d'AFBs (+++) avec un taux de 28,23 % et les isolats moyennement producteurs (++) représentent un taux de 21,76 %, ainsi les isolats faiblement (+) et très faiblement producteurs (\pm) d'aflatoxine B représentent un taux de 14,11% et 3,52% respectivement, le reste des isolats (32 ,35%) sont négatifs, la révélation sur CCM est illustrée par la (figure 12).

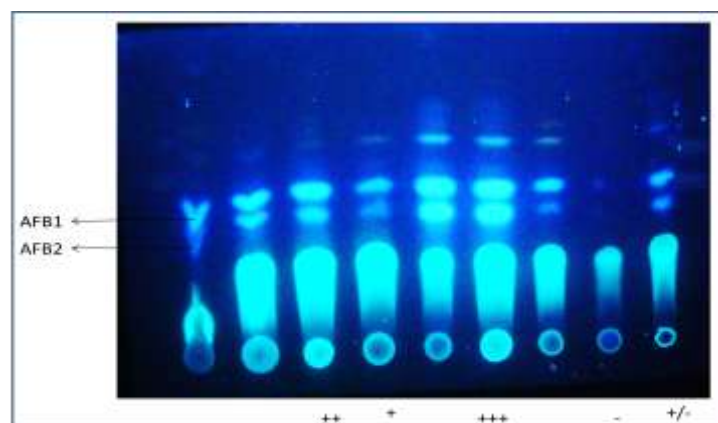


Figure 12. Mise en évidence par fluorescence bleue sous lumière U.V (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus* section *Flavis* sur CCM.

Ces résultats montrent que le test de CCM est très sensible par rapport à la détection des aflatoxines sur le milieu CAM. Les résultats de la production d'aflatoxines (B_1 et B_2) par les isolats de la section *Flavi* et leurs intensités de la fluorescence sont montrés dans la figure 13.

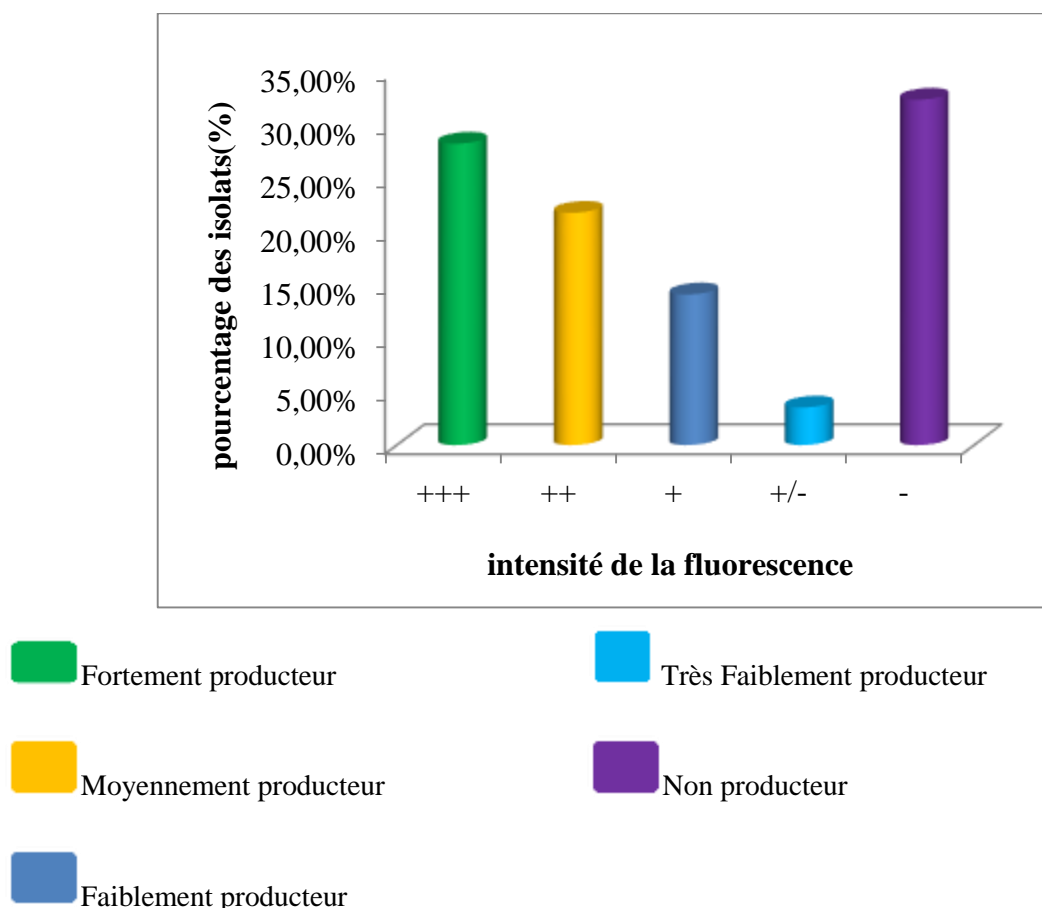


Figure 13. Fréquence des isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* déterminée par visualisation de la fluorescence des AFBs par CCM.

3. Production de l'acide cyclopiazonique (CPA)

En vue d'une caractérisation chimio-taxonomique, les 170 isolats ont été analysés pour leur pouvoir producteur de CPA, cette dernière est produite par quatre espèces d'*Aspergillus* aflatoxinogènes qui sont: *A. flavus*, *A. pseudotamarii*, *A. minisclerotigenus* et *A. parvisclerotigenus*. Les résultats ont révélé que 151 isolats (88,82%) sur 170 isolats produisent le CPA, et 19 isolats (11,17%) sont négatifs.

4. Production des sclérotés

Sur les 170 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* isolés du divers aliment du bétail, 115 se sont révélés producteurs des AFs. Parmi ces isolats producteurs : 33 isolats (28,44%) producteurs de sclérotés de type « L » (>400 µm) (figure14).

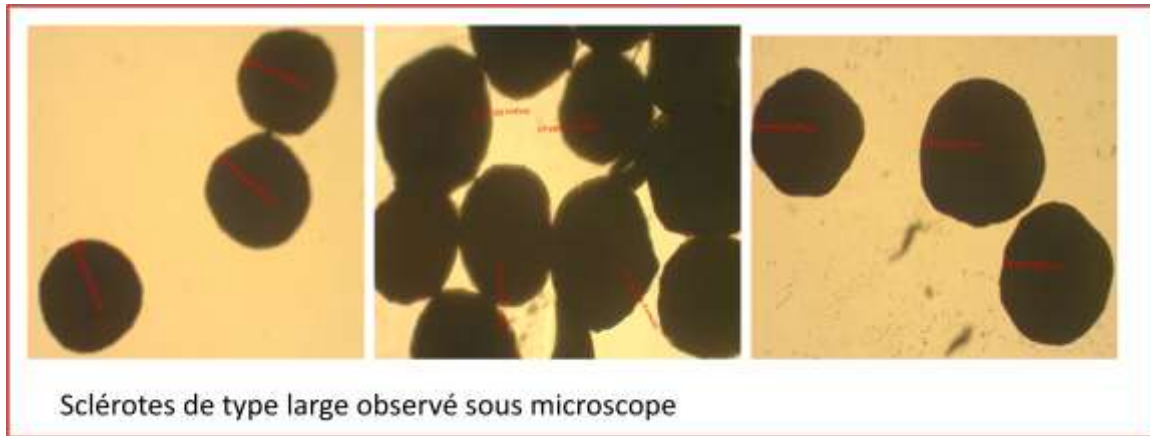


Figure 14. Des sclérotés type large observé sous microscope GX10 chez les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*.

5. Etude du pouvoir producteur d'ochratoxine A

Les résultats obtenus montrent qu'une seule souche testée sur milieu CYA présente un pouvoir ochratoxinogène détectable sur CCM. La seule espèce de la section *Flavi* d'*Aspergillus* qui produit ce type de mycotoxine est *Aspergillus alliaceus*.

6. Détermination des espèces selon le chimio-morphotype

Les 170 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* étudiés ont montré une diversité de point de vue morphologique et chimiotypique. Ces isolats ont été classés dans 3 morphotype et 7 groupes (phénotypes) en fonction de leur profil toxigénique (production d'aflatoxine de CPA, d'OTA) la capacité à produire l'acide aspergillique et les sclérotés (Rodrigues et *al.*, 2011) (Tableau 7). Chaque groupe contient plusieurs espèces qui partagent certains de ces caractères.

Tableau 7. Répartition des 170 isolats selon le chimio-morphotype.

Morphotype	Groupe (phéno-type)	Chemotype			Acide aspergillique	sclérotés	Nombre d'isolats	%
		AFB	AFG	CPA				
<i>A. flavus</i>	I	-	-	-	Orange	8(+) et 5(-)	13	7,64
	II	-	-	+	Orange, crème	12(+) et 4(-)	16	9,41
	III	+	-	+	Orange	33(+) et 69(-)	102	60

Suite de tableau 7

Morphotype	Groupe (phéno- type)	Chemotype			Acide aspergillique	sclérotés	Nombre d'isolats	%
		AFB	AFG	CPA				
<i>A. tamarii</i>	IV	-	-	+	Marron foncée	-	26	15,29
	V	+	-	+	Marron	-	7	4,11
<i>A. parasiticus</i>	VI	+	-	-	Orange	-	3	1,76
	VII	+	+	-	Orange	-	3	1,76

+ = présence et - = absence

- ✓ **Le morphotype d'*A. flavus*** contient 131 isolats soit (77 %) est caractérisé par des colonies ayant des couleurs vert jaunâtre et ne produit pas l'AFG.

Le phénotype I est constitué de 13 isolats (7,64%) ayant la morphologie présentée dans la figure 15. Ces souches ne produisent ni le CPA ni les aflatoxines. Elles partagent des caractères macromorphologiques mentionnés dans le (tableau 8). L'ensemble des souches ont montré des conidies lisses ; de couleur vert foncé, avec des diamètres entre 3 et 5 µm et des sclérotés en cas de présence avec un diamètre supérieur à 400 µm (type L) (tableau 9).

Sur les 13 isolats, 8 produisent les sclérotés, ce qui représente 4,70 % du total des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* analysées. Parmi ces isolats, une souche produit l'ochratoxine A, ce qui nous permis de la rattacher à *A. alliaceus* (Frisvad *et al.*, 2004), (Figure 16).



a: Aspect macroscopique

b: Aspect microscopique (G X40).

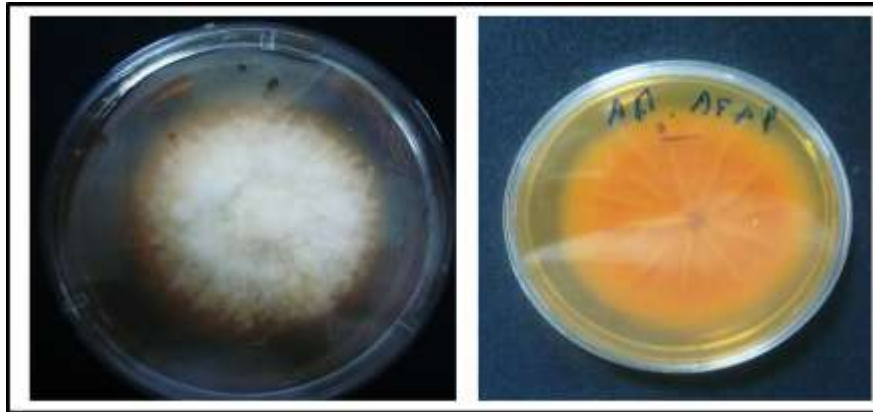
Figure 15. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype I d'*Aspergillus flavus* sur milieu MEA après 7 jours d'incubation à 25°C.



Figure 16. *Aspergillus alliaceus* sur milieu CYA après 7 jours incubation à 25°C.

Les 7 autres isolats peuvent être rattachés aux espèces *A. avenaceus* et *A. leporis* qui ne peuvent pas être séparées par les caractéristiques étudiées. Les espèces *A. caelatus* et *P. albertensis* sont proche de ces isolats sauf que la première présente un revers marron sur milieu AFPA et la deuxième a la capacité de produire l'OTA, ce qui est différent de nos isolats.

Le reste des isolats de ce groupe (5/13; 2,94%) ne produisent pas des sclérotés. Ces souches se distinguent par des colonies de couleur vert blanchâtre avec l'apparition de couleur orange sur milieu AFPA (Figure17). D'après les caractères morphologique et physiologique, ces souches seraient rattachées à *Aspergillus sojae* (Frisvad *et al.*, 2004).



a : Surface

b : réver

Figure 17. *Aspergillus flavus* sur milieu AFPA après 7 jours d’incubation à 28 °C.

Tableau 8. Caractères cultureux de phénotype I d’*Aspergillus flavus*.

Groupes	Nombres d’isolats	Milieu x	Température (°C)	Diamètre (mm)	Surface	Revers
<i>Aspergillus flavus</i> I	13	CYA	25	49 - 51	Blanche	Beige claire
		CYA	37	44 - 66	Verte foncée au périphérique et des touffes blanches au centre	Beige jaunâtre
		CYA	42	31- 37	Verte olive, bordure blanc sale radiée et touffe au milieu (poudreuse)	Beige foncé

Tableau 9. Caractère microscopique de phénotype I d’*Aspergillus flavus*.

souches	milieu	texture de conidie	sériation	Couleur de conidie	Diamètre de conidie (µm)	diamètre de vésicule (µm)	sclérote diamètre (µm)
Souche représentative de phénotype I	CYA	Lisse	Unisérié	Vert foncée	3,04 - 4,95	25 - 33	400-1000

Le phénotype II est constitué de 16 isolats (9,41 %) qui se caractérise par une couleur vert claire à vert foncé (figure 18) avec parfois présence d’exsudat et un revers beige, le diamètre des colonies varie entre 25 et 58 mm (tableau 10). Ces souches produisent le CPA mais pas les aflatoxines. Les conidies sont lisses ; de couleur vert foncé, avec des diamètres entre 3 et 4µm (tableau 11).

Sur les 16 isolats, 12 produisent des sclérotés de type L qui varie entre 500 - 800 μm (tableau 11), ce qui représente 7 % du total des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* analysées. D'après ces caractères morphologique et physiologique, ces souches seraient rattachées à *Aspergillus flavus* sous réserve d'être complété par une étude moléculaire qui permet de mieux statuer la position taxonomique de ces isolats.

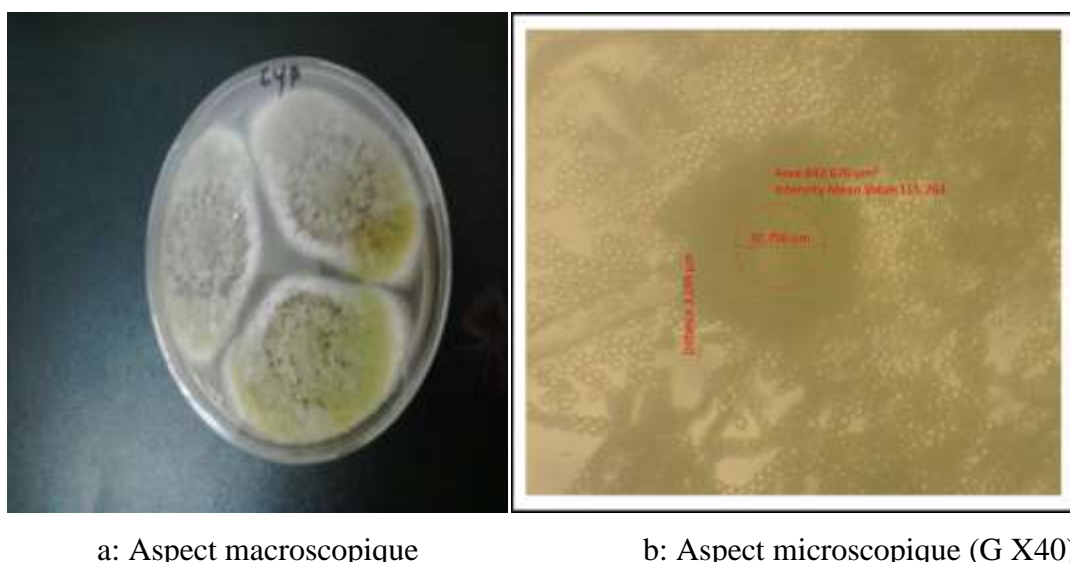


Figure 18. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype II d'*Aspergillus flavus* sur milieu CYA après 7 jours incubation à 25°C.

Le reste des isolats de ce groupe (4/16; 2,35%) ne produisent pas des sclérotés. Ces souches forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord de couleur blanche, puis jaune, à vert-jaunâtre. Le revers peut être incolore ou jaunâtre (Figure 19) avec l'apparition de couleur crème sur milieu AFPA. Ce qui nous permis de rattachées ces souches à *Aspergillus oryzae* (Frisvad *et al.*, 2004).

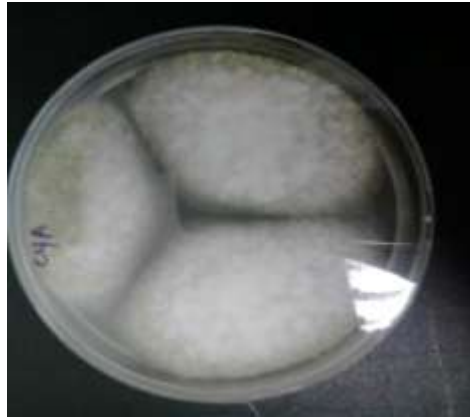


Figure 19. Aspect macroscopique d'*Aspergillus oryzae* sur milieu CYA après 7 jours incubation à 25°C.

Tableau 10. Caractères cultureux de phénotype II d'*Aspergillus flavus*

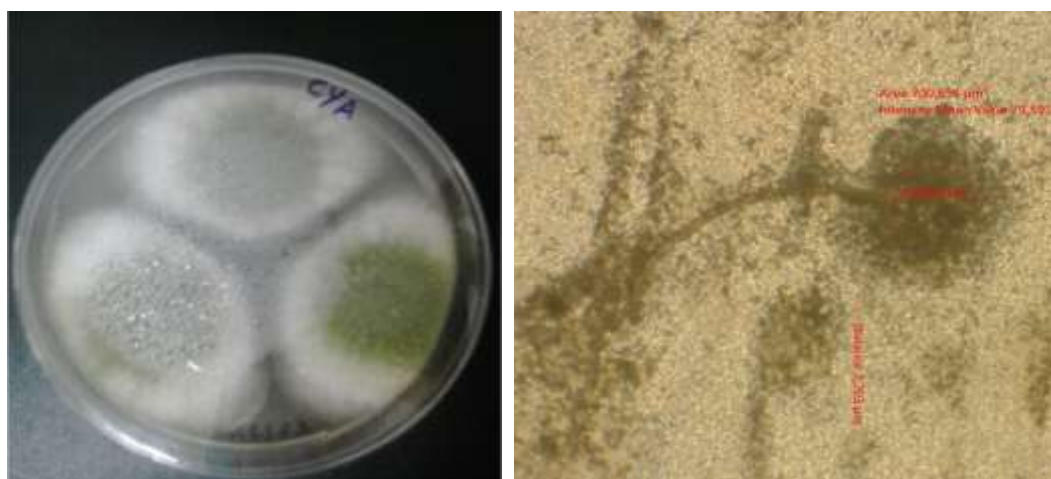
Groupes	Nombres d'isolats	milieux	température (°C)	Diamètre (mm)	Surface	Revers
<i>Aspergillus flavus</i> phénotype II	16	CYA	25	41 - 52	Vert grisâtre au centre, blanc et vert à la périphérie + exsudat	Beige claire verdâtre plein de sclérotés
		CYA	42	25 - 35	Touffe blanche avec des rayures	Crème

Tableau 11. Caractère microscopique de phénotype II d'*Aspergillus flavus*

Souches	Milieu	Texture de conidie	Sériation	Couleur de conidie	Diamètre de conidie (µm)	Diamètre de vésicule (µm)	Sclérote diamètre (µm)
Souche représentative de phénotype II	MEA	Lisse	Bisériées	Vert foncée	3,21 - 4,12	33 - 35	Absents

Le phénotype III est constitué de 102 isolats (60%) qui se caractérise par un thalle vert jaune à vert olive, floconneux, dense vers le centre et lâche en périphérie (figure 20a). Sur milieu Malt Agar (MEA), les *A. flavus* forment des colonies granuleuses montrant un revers beige jaunâtre à beige verdâtre (tableau12). Sur milieu *Aspergillus flavus parasiticus* Agar (AFPA), un revers

orange caractéristique est observé. Les têtes aspergillaires ont une vésicule sphérique (18 à 51µm de diamètre), uni ou bisériées, donnant des phialides verdâtres à disposition radiaire (figure 20b). Les conidies sont lisses ou rugueuses (échinulées) et mesurent 2,95 à 4,75µm de diamètre. Les sclérotés sont parfois produites, sur les 102 isolats, 33 produisent les sclérotés de type L, ce qui représente 19,41%, souvent brunes à noires. Le reste des isolats de ce groupe (69/102;40,58 %) ne produisent pas des sclérotés, (tableau13). Ces souches produisent le CPA et les aflatoxines.



a: Aspect macroscopique

b: Aspect microscopique (G X40)

Figure 20. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype III d'*Aspergillus flavus* sur milieu CYA après 7 jours d'incubation à 37°C.

D'après ces caractères morphologique et physiologique, ces souches sont rattachées à *Aspergillus flavus* (samson, 2004).

Tableau 12. Caractères cultureux de phénotype III d'*Aspergillus flavus*

Groupes	Nombres d'isolats	Milieux	Température (°C)	Diamètre (mm)	Surface	Revers
<i>Aspergillus flavus</i> phénotype III	102	CYA	25	49 - 55	Verte avec petites touffes blanches + exsudat	Beige verdâtre
		CYA	42	20 - 40	Vert olive grisâtre blanc sale des radiées	Marron avec des rieurs bien séchés

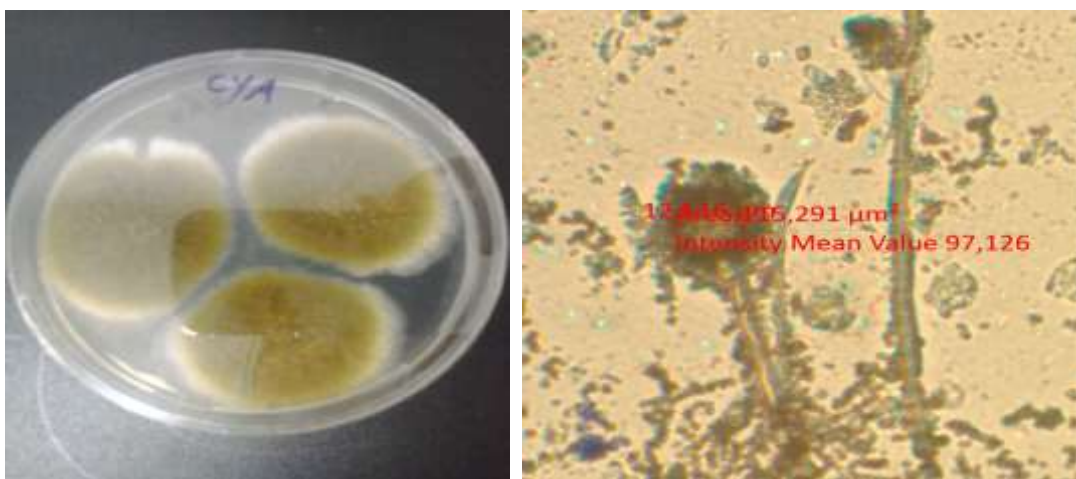
Tableau 13. Caractère microscopique de phénotype III d'*Aspergillus flavus*

Souches	Milieu	Texture de conidie	Sériation	Couleur de conidie	Diamètre de conidie (µm)	Diamètre de vésicule (µm)	Sclérote diamètre (µm)
Souche représentative de phénotype III	CYA	Rugueuses /lisse	Unisérié / bisérié	Vert foncée	2,91 -3,95	18 - 51	400-700

Le morphotype d'A. tamarii constitué de 33 isolats (19,41%) est caractérisé par des conidies rugueuses, un mycélium d'aspect poudreux et de couleur vert olive tirant sur le brun (vert kaki) caractéristique d'*A. tamarii* et *A. pseudotamarii*. En plus, ces isolats ne poussent pas à 42 C°, caractère qui les distingue également des autres espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (Ehrlich et al., 2007).

Le phénotype IV est constitué de 26 isolats (15,29 %) ayant la morphologie présentée dans la (figure 21). Ces souches produisant le CPA mais pas l'aflatoxine de type B. Elles partagent des caractères macromorphologiques mentionnés dans le (tableau14).

L'ensemble des souches ont montré des conidies échinulées ; de couleur marron foncée, avec des diamètres entre 5 et 6 µm (tableau15).



a: Aspect macroscopique

b: Aspect microscopique (G X40).

Figure 21. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype IV d'*Aspergillus tamarii* sur milieu CYA après 7 jours incubation à 25°C.

Tous les isolats ne produisent pas des sclérotés. Ces souches se distinguent par des colonies de couleur marron foncée (Figure 21) avec l'apparition de couleur marron foncée sur milieu

AFPA avec une texture granuleuse et par leur incapacité à croître à 42°C. D'après les caractères morphologique et physiologique, ces souches seraient rattachées à *A. tamaraii* (Pitt et Hocking, 1997).

Tableau 14. Caractères cultureux de phénotype IV d'*Aspergillus tamaraii*.

Groupes	Nombres d'isolats	Milieu x	Température (°C)	Diamètre (mm)	Revers	Surface
<i>Aspergillus tamaraii</i> phénotype IV	25	CYA	37	48	Vert olive marron	Verte foncée olive

Tableau 15. Caractère microscopique de phénotype IV d'*Aspergillus tamaraii*.

Souches	Milieu	Texture de conidie	Sériation	Couleur de conidie	Diamètre de conidie (µm)	Diamètre de vésicule (µm)	Sclérote diamètre (µm)
Souche représentative phénotype IV	CYA	Echinulées	Unisériées	Marron foncée	5,28	58,92	Absente

Le phénotype V est constitué de 7 isolats (411%) qui ont les caractéristiques morphologique et physiologique proche d'*A. tamaraii*. Ces souches produisent l'aflatoxine de type B et le CPA et seraient rattachées à *A. pseudotamaraii* (Pitt et Hocking, 1997), elles partagent des caractères macromorphologiques mentionnés dans le (tableau16). L'ensemble des souches ont montré des conidies rugueuses; de couleur marron, avec des diamètres entre 6 et 7µm (tableau17).

Tous les isolats ne produisent pas des sclérotés. Ces souches se distinguent par des colonies de couleur marron avec l'apparition de couleur marron sur milieu AFPA avec une texture granuleuse et par leur incapacité à croître à 42°C.

Tableau 16. Caractères cultureux de phénotype V d'*Aspergillus pseudotamaraii*

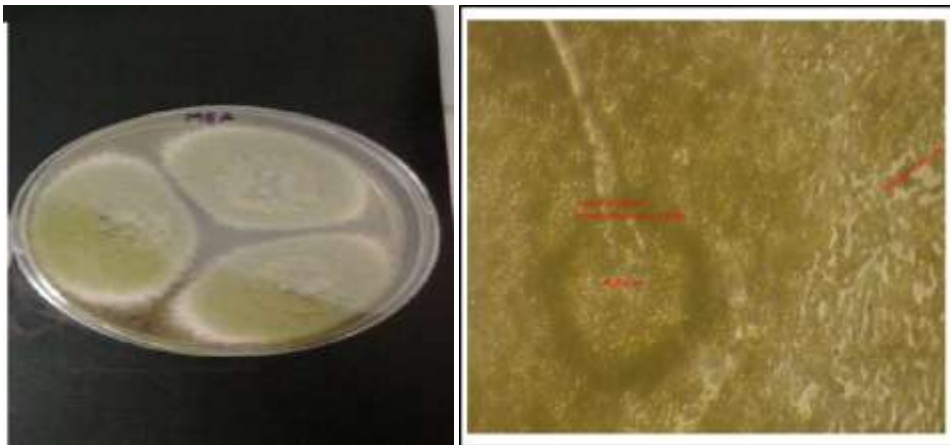
Groupes	Nombres d'isolats	Milieux	Température (°C)	Diamètre (mm)	Surface	Revers
<i>Aspergillus pseudotamaraii</i> phénotype V	7	CYA	25	39	Marron	Marron
		CYA	37	53	Marron	Marron

Tableau 17. Caractère microscopique de phénotype V d'*Aspergillus pseudotamarii*

Souches	Milieu	Texture de conidie	Seriation	Couleur de conidie	Diamètre de conidie (µm)	Diamètre de vésicule (µm)	Sclérote diamètre (µm)
Souche représentative de phénotype V	CYA	Rugueuses	Bisériées	Marron foncée	6,66	51,904	Absente

Le morphotype d'*A. parasiticus* renferme 6 isolats sur les 170 (3,52%) ayant la couleur vert foncée avec absence de sclérotés et qui n'ont pas la capacité de produire le CPA, 3 produisent les 4 AFs, et les 3 autres produisent l'AFB seulement.

Le phénotype VI est constitué de 3 isolats (1,76%) qui se caractérise par un thalle vert jaune sombre, floconneux et des colonies granuleuses et denses (figure 22). Ces souches produisent l'aflatoxines B et ne produisent pas l'aflatoxines G. Le diamètre des colonies varie selon les milieux de culture mentionné dans le tableau 18. L'ensemble des souches ont montré des têtes aspergillaires majoritairement unisériées caractérisées par des vésicules sphériques de 20-46 µm de diamètre, portant des conidies rugueuses de couleur vert foncé, avec des diamètres entre de 4-5µm ce qui la diffère parfois d'*A. flavus* caractérisée par des conidies plus petites ces isolats ne produisent pas les sclérotés (tableau 19).



a: Aspect macroscopique

b: Aspect microscopique (G X40).

Figure 22. Aspect macroscopique et microscopique de phénotype VI d'*Aspergillus parasiticus* sur milieu MEA après 7 jours d'incubation à 25°C.

Ces souches se distinguent par des colonies de couleur verte foncée (Figure 22) avec l'apparition de couleur orange sur milieu AFPA. D'après ces caractères morphologique et physiologique, ces souches seraient rattachées à *A. parasiticus*.

Tableau 18. Caractères cultureux de phénotype VI d'*Aspergillus parasiticus*

Groupes	Nombres d'isolats	Milieu x	Température (°C)	Diamètre (mm)	Revers	Surface
<i>A. parasiticus</i> phénotype VI	3	CYA	37	45 - 57	Beige verdâtre	Vert
		CYA	42	25 - 34	Beige verdâtre	Vert une touffe grisâtre radiée bien série, bordure jaunâtre

Tableau 19. Caractère microscopique de phénotype VI d'*Aspergillus parasiticus*

Souches	Milieu	Texture de conidie	Sériation	Couleur de conidie	Diamètre de conidie (µm)	Diamètre de vésicule (µm)	Sclérote diamètre (µm)
Souche représentative de phénotype VI	CYA	Rugueuses	Unisériées	Vert foncée	3,68-4,72	20-23	Absente

Le phénotype VII est constitué de 3 isolats (1,76%). Ces souches produisent l'aflatoxine B et G mais ne produisent pas le CPA ni les sclérotines, avec l'apparition de couleur orange sur milieu AFPA. Ces souches sont caractérisées par leur incapacité à croître à 42°C, d'après ces caractères morphologique et physiologique, ces souches sont rattachées à *A. nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987; Peterson *et al.*, 2000).

II. Discussion

Notre travail nous a permis de répartir nos souches de champignons selon les chimiomorphotypes identifiés en 7 groupes distincts qui sont ceux des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi*.

Parmi ces groupes d'isolats, le groupe III est le plus fréquent et représente plus de la moitié des *Aspergillus Flavi* testés. La dominance de cette catégorie d'*A. flavus* a été évoquée par (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2006) lors d'une étude sur les *Aspergillus Flavi* contaminant les sols des cultures de maïs en Iran. D'après de nombreux auteurs, Les différences dans la distribution géographique du groupe d'*A. flavus* est le résultat d'une pression de sélection exercée par une multitude de facteurs environnementaux (Horn *et al.*, 1996; Pildain *et al.*, 2004). Ainsi, la température, les conditions culturelles, la lumière du jour, les précédents

culturaux, l'incidence des insectes et la pluviométrie peuvent influencer les populations d'*A. flavus* (Orum *et al.*, 1997). Ces facteurs et d'autres microclimats peuvent être différents d'une région à l'autre (Cotty, 1999).

Presque la majorité des isolats aflatoxinogènes (110 isolats) produisent le CPA avec présence ou non de sclérotés de type « L ». Selon (Samson *et al.*, 2004), cette catégorie d'isolats appartiendrait vraisemblablement à *A. flavus* (groupe III). Nos résultats ont révélé que le pouvoir producteur d'AFs varié considérablement d'un isolat à l'autre. Il est connu qu'*A. flavus* produit généralement les aflatoxines de type B et l'acide cyclopiazonique (CPA), mais cette production est extrêmement variable (Richard *et al.*, 1992; Horn et Dorner, 1999). En effet, on peut rencontrer une large gamme d'isolats allant de très fortement producteurs au non producteurs d'AFs (Horn *et al.*, 1996). De nombreux auteurs soulignent une corrélation positive entre la production d'AFs de type B et la production de CPA. Ainsi, Pildain *et al.* (2008) soulignent que le CPA est produit non seulement chez les souches productrices d'aflatoxine B comme *A. flavus* et occasionnellement chez *A. pseudotamarii* mais aussi chez *A. minisclerotigenes* et *A. parvisclerotigenus* productrices des deux types d'AFs (AFB et AFG).

Aspergillus flavus, *A. parasiticus* et *A. nomius* sont les espèces productrices d'aflatoxines les plus communes. Ces deux dernières espèces produisent les aflatoxines B et G (Dorner *et al.*, 1984; Kurtzman *et al.*, 1987; Horn *et al.*, 1996; Klich, 2007). Trois de nos isolats produisent l'aflatoxine de type G ce qui suggère la présence d'*A. parasiticus* parmi ceux-ci. D'après (Ehrlich *et al.*, 2007), *A. nomius*, *A. tamarii* et *A. pseudotamarii* ne poussent pas à 42°C. Nos isolats ne poussent pas à cette température ce qui suggère la présence d'*A. tamarii*, d'*A. pseudotamarii* et *A. nomius* producteur et non producteur d'aflatoxines dans les échantillons analysés. Ces résultats laissent penser que les populations aflatoxinogènes contaminant le maïs sont dominées par *A. flavus*. Selon de nombreux auteurs (Giorni *et al.*, 2007; Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2006) les espèces productrices d'aflatoxines (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. parvisclerotigenus*, *A. bombycis* et *A. pseudotamarii*) sont très proches du point de vue phénotypique et phylogénique et la variation de leur pouvoir aflatoxinogène est le résultat de leur interaction avec leur environnement (activité de l'eau, humidité, température...). D'autre part Cary et Ehrlich (2006) ont indiqué que l'absence de production d'aflatoxine chez certains isolats d'*Aspergillus flavus* peut être expliquée par l'instabilité de la voie de biosynthèse des aflatoxine chez ces moisissures.

Nos résultats indiquent que tous les échantillons analysés sont susceptibles d'être contaminé par les *Aspergillus* section *Flavi*.

On a aussi remarqué que tous les *Aspergillus flavus* aflatoxinogènes produisent le CPA. D'après Samson *et al.*, (2004) ces souches appartiendraient au groupe des *A. flavus*. Cette co-production de ces deux mycotoxines (AFB, CPA) a été observée par de nombreux auteurs (Martins et Martins, 1999; Heperkan et Karbancioglu-Güler, 2009). D'autre part 13 de nos isolats ne produisent pas l'AFB, l'AFG et le CPA simultanément, avec la production des sclérotés de type L. Ce profil est généralement lié à la production de sclérotés de types S, qui sont observés chez les espèces d'*A. minisclerotigenes* (Pildain *et al.*, 2008). On peut donc conclure que cette espèce n'est pas présente dans nos échantillons. Ce phénotype a été déjà isolé à partir des arachides par (Barros *et al.*, 2006) et (Pildain *et al.*, 2004).

L'une des caractéristiques distinctives des *Aspergillus flavus* est la production de sclérotés. En fonction de la taille des sclérotés les *Aspergillus flavus* sont subdivisés en deux morphotypes, (les isolats type S et type L). Les isolats L produisent des sclérotés de diamètre supérieur à 400 µm, alors que les isolats type S forment des sclérotés de diamètre inférieur à 400 µm. Les isolats appartenant au type L produisent l'AFB uniquement et les types S peuvent produire l'aflatoxine B et G (Chang *et al.*, 2001; Novas et Cabral, 2002).

Plusieurs auteurs ont tenté d'établir un lien entre le pouvoir aflatoxinogène et la production de sclérotés, mais les données publiées jusqu'à présent restent contradictoires. Certains auteurs ont constaté l'existence d'une relation entre la production élevée d'aflatoxine et la présence de petits sclérotés (type S) (Chang *et al.*, 2001; Novas et Cabral, 2002; Pildain *et al.*, 2004), tandis que d'autres ont indiqué l'absence de cette corrélation (Giorni *et al.*, 2007; Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2006).

Dans notre travail, l'ensemble des *Aspergillus flavus* aflatoxinogènes isolés ont montré un potentiel de production de mycotoxines très variable. 64,69 % des isolats d'*Aspergillus flavus* avaient un pouvoir producteur très élevé malgré l'absence de sclérote S. Parallèlement 19,41% de nos isolats aflatoxinogènes producteurs de sclérotés ont été classés comme isolats moyennement producteurs. Ceci prouve une absence de corrélation entre la présence de sclérote et la production d'aflatoxine. D'après Klich (2007), la présence de sclérotés en soi ne semble pas être liée à la production d'aflatoxine, cependant la présence de petits sclérotés semble corrélée avec la production élevée d'aflatoxine. Dans notre cas aucune conclusion ne peut être tirée quant à la présence de sclérotés de type S puisque aucun de ce type d'isolats n'a été retrouvé parmi nos échantillons.

La distribution de ces deux types de sclérote peut être liée aux facteurs environnementaux. Au Kenya par exemple Probst *et al.* (2005) ont observé une dominance des isolats type S alors que

d'autres études effectuées aux USA par (Horn et Dorner, 1998) montrent que le type L est le morphotype le plus dominant. En Algérie les travaux de Riba *et al.* (2010) ont révélé la dominance des isolats type L, nos résultats corroborent avec ces derniers, puisque les isolats d'*Aspergillus flavus* ont produits des sclérotes de type L uniquement, et aucune souches n'a produit de sclérote type S.

CONCLUSION

Conclusion

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 des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* responsables de la contamination par les AFs des divers aliments de bétail. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier les espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* de point de vue taxonomique et production des aflatoxines dans les divers aliments de bétail.

Les isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* ont montré une grande diversité du point de vue morphologique et chimiotypique. Ces isolats sont classés en trois morphotype différents, le morphotype *A. flavus* (77%), suivi par le morphotype d'*Aspergillus tamarii* (17,05%) et le morphotype *A. parasiticus* (3,52%) ce qui montre une diversité dans les *Apergillus* qui contaminent l'aliment de bétail. Cette diversité a été remarquée aussi au niveau des phénotypes identifié dans chaque morphotype.

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

Nos résultats ont montré que les AFs ont été détectés dans les échantillons d'origine et de sources différentes. Mais il est généralement admis que plus le taux initial de la contamination par des espèces toxigènes est important, plus les risques d'imprégnations toxiques sont élevés.

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

- Dosage par HPLC de tous les extraits afin de déterminer d'une manière plus précise le potentiel aflatoxinogène et ochratoxinogènes des souches isolées en vu de compléter la caractérisation morphologique
- Compléter l'identification morphologique et chimique par une identification moléculaire ;

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

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- **Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Bruguera, M. T. et Cabañes, F.J. 1988.** - Comparison of some screening methods for aflatoxigenic moulds. *Mycopathologia* 104, 75–79.
- **Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Bruns H. A. et Abel, C.A. 2006.** - Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Sci Technol* 16(5):437–449.
- **AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) 2006.** - Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique. <http://www.afssa.fr>
- **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.
http://www.inbpinnov.com/media/mycotoxines_afssa_075603600_1217_21092010.pdf.
- **Arora, R. G., Frolen, H. et Nilsson, Z. A. 1981.** -Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. Influence of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone, *Acta Vet. Scand.* 22: 524-534
- **Atoui, A. K. 2006.** - approche de la mycotoxinogenese chez aspergillus ochraceus et aspergillus carbonarius: etudes moleculaire et physiologique .spécialité: microbiologie & biocatalyse industrielles P.45
- **Autrup, J. L., Schmidt, J., Seremet, T. and Autrup, H. 1991.** - Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B1 adducts to serum albumin. *Scand. J. Work Environ. Health* 17 : 436-440
- **Badillet, G., de Briève C., Guého E., 1987.** - Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris
- **Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1972.** - Illustrated genera of Imperfect fungi. Ed. Burgess publishing company, Minnesota: 62-197.
- **Barros, G. G., Torres, A. M., Rodriguez, M. I., Chulze, S. N. 2006.** - Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 145–152.

- **Binder, E. M., L. M. Tan, L. J. Chin, J. Handl, et J. Richard. 2007.** -Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137(3- 4):265-282
- **Blakeslee, A. 1915.-** Lindner's roll tube method of separation cultures. *Phytopathology* 5: 68–69.
- **Blumenthal, C. Z. 2004.** - Production of toxic metabolites *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul. Toxicol. Pharmacol* 39, 214–228.
- **Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y., Veau, P. 1990.-** Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2^{ème} édition. Masson. Paris. pp. 16-41; 110; 364.
- **Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y., Veau, P. 1990.** - Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris, 512p.
- **Boudra, H. 2009.** - Mycotoxins : an insidiously menacing factor for the quality of forages and the performances of the ruminants. *Fourrages* (199):265-280.
- **Cahagnier, B. and Richard-Molard, D., 1998.** - Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158
- **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, 4733-4
- **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
- **Cary, J.W., et Ehrlich, K. C. 2006.-** Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia* 162: 167-177.
- **Castegnaro, M., Pfohl-Leskowicz A. 2002.** - Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. Moll. & Moll. (Eds). La sécurité alimentaire du consommateur. Lavoisier, Tec & doc.
- **CAST (Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA) 2003.** - Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems, Task force report No. 139/January 2003.

- **CDC (Centers for Disease Control and Prevention) 2004 .** -Outbreak of aflatoxin poisoning—Eastern and Central Provinces, Kenya. *MMWR* 53, 790–793. Available from, <http://www.cdc.gov/nceh/hsb/chemicals/mmwr-aflatoxin.pdf>.
- **Chang, P. K., Bennett, J.W., Cotty, P. J. 2001 .-** Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 153, 41–48.
- **Chang, P. K, Ehrlich, K. C. and Hua, S. S. T 2006.** - Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *International Journal of Food Microbiology* 108: 172–177
- **Chermette R., Bussieras J., 1993.** - Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort
- **Chiavaro, E., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gambarelli, E., Dossena, A. et Marchelli, R. J. 2001.-** New reversed—phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal of Chromatography*, A7, 31-40.
- **Cole, R. J., B. B. Jarvis, et M. A. Schweikert. 2003.** - Second hanbook of secondary fungal metabolites. New York.
- **Cole, R. J. et Cox R. H. 1981.** - Handbook of Toxic Fungal Metabolites, New York, Academic Press
- **Cole, R. J. et Cox R. H. 1986.** - Handbook of Toxic Fungal Metabolites, New York, Academic Press
- **Cotty, P. J. 1989.** - Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. 79, 808–814.
- **Cotty P. J. et Cardwell K. F. 1999.** - Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2264-2266.
- **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.
- **Dorner, J.W. 1983.** - Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus tamarii* Kita. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1435–1437.
- **Dorner, J.W., Cole R. J. et Diener U. L. 1984.-** The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. *Mycopathologia*, 87, 13–15.

- **Dutton, M. F., Ehrlich, K., and Bennett, J. W. 1985.** - Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 1392–1398
- **Ehrlich, K. C., Kobbeman, K., Montalbano, B. G. and Cotty, P. J. 2007.** -Aflatoxin producing *Aspergillus species* from Thailand. *Intern. J. of Food Microbiol.* 114 : 153-159
- **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.
- **Fernandez Pinto, V., Patriarca, A., Locani, O., Vaamonde, G. 2001.**- Natural co-occurrence of a Xatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Additive and Contaminants*, 18, 1017-1020.
- **Franco, C. M., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Cepeda, A., Mahuzier, G. et Prognon, P. 1998.**- Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q1, M1 and P1, fluorescence and chromatographic studies. *Journal of Chromatography, A* 815, 21-29.
- **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.
- **Frisvad, J.C., Skouboe, P. and Samson, R. A. 2005.** - Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3 Omethylsterigmatocyst. In: *Aspergillus rambellii* sp. Nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 442–453
- **Geiser, D. M., Frisvad, J. C. and Taylor, J. W. 1998.** - Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial beta–tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia* 90: 831– 845
- **Geiser, D. M., Dorner, J. W., Horn, B. W. et Taylor, J. W. 2000.** - The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 31: 169–179
- **Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J. et Samson, R. A. 2007.** - The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 59, 1–10.
- **Giorni, P., Magan N., Pietri A., Bertuzzi T., Battilani P. 2007.** - Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 330–338.

- **Haris, C., 1989.** - Introduction to modern microbiology. Blackwell scientific publication, 179 p.
- **Henry, S. H. and Bosch, F. X. 2001.** - Foodborne disease and mycotoxin epidemiology, in Foodborne Disease Handbook, 2nd ed., Hui, Y.H., Smith, R.A. & Spoerke, Jr., D.G., Eds., Marcel Dekker, New York
- **Heperkan, D., Karbancioglu-Güler, F. 2009 .-** Determination of *Aspergillus* section *Flavi* and their aflatoxin and cyclopiazonic acid production patterns in naturally dried figs. In M. Appell, D. F. Kendra, & M. W. Trucksess (Eds.), Mycotoxin prevention and control in agriculture. ACS Symposium Series, Vol. 1031 (pp.77e90), Washington, DC.
- **Hoog F. and Guarro J. 1995.** Medical mycology, London
- **Horn, B. W., Greene, R. L., Sobolev, V.S., Dorner, J. W., Powell, J. H. et Layton, R.C. 1996.** - Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. Mycologia 88(4): 574–587
- **Horn, B. 1997.** - *Aspergillus caelatus*, a new species in section *Flavi*. Mycotaxon 56, 185–191.
- **Horn, B. W., Dorner, J. W. 1998.-** Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanut-growing regions of the United States. Mycologia 90, 767–776.
- **Horn B. W. et Dorner J. W. 1999.** - Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1444–1449.
- **Horn, B. W. et Dorner, J. W. 2002.** -Effect of competition and adverse culture conditions on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* through successive generations. Mycologia 94: 741–751
- **Hua Sui Sheng T. 2002 .** -Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin: and 16th Aflatoxin Elimination Workshops. October 13–15, 2003 Savannah, Georgia USA
- **IARC/CIRC (b) 1993.** - Centre International de Recherche contre le Cancer. OTA Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. WHO, Lyon Vol. 56: 489–521

- **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
- **Karine, J. 2011.** - Evaluation du risque lié aux Champignons Pathogènes producteurs d’Ochratoxine A et d’Aflatoxine B1 au niveau de la production du Blé au Liban
- **Klich, M. A. et Pitt, J. L. 1988.** - Differentiation of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans Br Mycol Soc* 91, 99–108.
- **Klich, M., Mullaney, E. J., Daly, C. B. et Cary J.W. 2000.** - Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 605–609
- **Klich MA (2002).** Identification of common *Aspergillus* species. Centraal bureau voor Schimmel cultures, Utrecht.739.
- **Klich, M. A. 2007.**- Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, 48,71–80.
- **Kornerup, A. & Wanscher, J. H. 1978.** - Methuen Handbook of Colour, 3rd edn. London: Eyre Methuen. 731, 725–735
- **Kornerup, A. & Wanscher, J. H. 1978.** - Methuen Handbook of Colour, 3rd edn. London: Eyre Methuen. 733, 725–735
- **Kozakiewicz, Z. 1989.** - *Aspergillus* Species on Stored Products. Wallingford: CAB International.
- **Kurtzman, C. P., Horn, B.W. and Hesseltine, C. W. 1987.** - *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 147–158
- **Kwon Chung, K. J. et Bennett, J. E. 1992 .** -Medical mycology, Lea and Febiger, London
- **Li, D. M., Horie, Y., Wang, Y. et Li, R. 1998.** - Three new *Aspergillus* species isolated from clinical sources as a causal agent of human aspergillosis. *Mycoscience* 39, 299–305.
- **Manabe, M., Shinshi, E., Goto, T., Misawa, Y. et Tanaka, K. 1984.** -Studies on the fluorescent compound in fermented foods. VI. HPLC analytical system for kojic acid. *Shokuhin Sogo Kenkyusho Kenkyo Hokoku (Rep.Food Res. Inst.)* 46: 337–341.
- **Mari´a B. Pildain, Jens C. Frisvad, Graciela Vaamonde, Daniel Cabral,1 Janos Varga,and Robert A. Samson 2008.** -Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts 58, 725–735

- **Martins, M. L., Martins, H. M. 1999.**- Natural and in vitro co-production of cyclopiazonic acid and aflatoxins. *Journal of Food Protection* 62, 292–294.
- **Morin O., 1994.** - *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10
- **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.
- **Niderkorn, V., D. P. Morgavi, E. Pujos, A. Tissandier, et H. Boudra. 2007.** - Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food Addit. Contam. Part A Chem.* 24(4):406-415.
- **Niderkorn V., B. H., Morgavi, D. P. 2007.** -Les fusariotoxines : comment limiter leur présence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants? *Fourrages* 189:111-183.
- **Novas, M. V., Cabral, D. 2002 .**- Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus* from peanut in Argentina. *Plant Disease* 86, 215–219.
- **Orum, T. V., Bigelow, D. M., Nelson, M. R., Howell, D. R. et Cotty, P. J. 1997.** - Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Yuma County, Arizona, soils. *Plant Diseases*, 81,911–916.
- **Peterson S. W. 2000.- In: Samson, R. A. Pitt, J. I. (Eds.),** Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, Harwood Academic, The Netherlands pp. 163–178.
- **Peterson, S.W. 2008.** - Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100, 205–226.
- **Pfohl-Leszkowicz, A. et Castegnaro, M. 2002 .** -Rôles des mycotoxines dans le développement de certains cancers. Dans *Toxines et recherches biomédicales*, collection SFET, Goudey–Perrière, F., Bon Cassian, Puisseux-Dao,S. & Sauviat M–P (eds) Elsevier, pp 143–152
- **Pharm, Nantes Barbarit 1999.** - les dépigmentants : des corticoïdes à l'acide kojique. These Doct. Pharm,
- **Pildain, M. B., Vaamonde, G. et Cabral D. 2004.** - Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin :

- mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology*, **93**, 31-40.
- **Pildain, Maria, B., Jens, Frisvad, C., Graciela Vaamonde, Daniel Cabral, Janos Varga, Robert A. Samson. 2008.** - Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 725–735.
 - **Pitt, JI. 1979.**- The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc, London.
 - **Pitt, J. I., Hocking, A. D., et Glenn, D. R. 1983.**- An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A.*
 - **Pitt, J. I. and Miscamble, B.F. 1995.** - Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Prot.* 58: 86–90.
 - **Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1997 .** -Fungi and Food spoilage, 2nd edn. Blackie Academic and Professional, London.
 - **Pitt, J. I. et Hocking, A. D. 1997.**- Fungi and Food Spoilage, 2nd ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
 - **Pitt, J. I., Hocking, A. D. & Glenn, D. R. 1997.** - An improved medium for detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J Appl Bacteriol* 54, 109–114.
 - **Pitt, J. I.; Hocking, A. D. 2009.** - Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic and Professional, London.

 - **Pohland, a.e., s. Nesheim, et Friedman, l., 1992 .** -*Ochratoxin A, a review*. *Pure and Applied Chemistry*, **64**: p. 1029-1046.

 - **Probst, C., Njapau, H., Cotty, P.J. 2005.**- The S strain of *Aspergillus flavus* is associated with the highly contaminated maize that resulted in deadly aflatoxicoses in Kenya during 2004. *Book of Abstracts of the World Mycotoxin Forum, the 3rd Conference, The Netherlands.*
 - **Quillien J-F., 2002.** - Les mycotoxines. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Centre de Réseaux pour l'Innovation en Agriculture et Agroalimentaire (CRIAA), Paris, France, 1-24.
 - **Raper, K., Fennell D. J., 1965.** - The genus *Aspergillus*”, Williams and Wilkins editors, Baltimore.

- **Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., Kazeroon-Shiri, A., Ranjbar-Bahadori, S., Mirzahoseini, H., Rezaee, M. B. 2006.**- A survey on distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in corn field soils in Iran: population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production. *Mycopathologia* 161, 183–192.
- **Riba Amar, Nouredine Bouras, Salim Mokrane, Florence Mathieu, Ahmed Lebrihi, Nasserline Sabaou. 2010.**- *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology* 48. 2772–2777.
- **Richard J. L., Bhatnagar D., Peterson S. et Sandor G. 1992.** - Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia*, 120, 183–188.
- **Rigó, K. Varga, J., Toth, B., Téren, J., Mesterhazy, A. et Kozakiewicz Z. 2002.** - Evolutionary relationships within *Aspergillus* section *Flavi* based on sequences on the intergeneric transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *Journal of General Applied Microbiology* 48: 9–16
- **Rodrigues, P., C. Santos¹, A. Vena¹ et Lima¹, N. 2011.**- Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches
- **Rojas, T. R ., Sampayo C.A.F., Vazquez , Bi, Franco C. M. et Cepeda A. (2005).**- Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrine. *Food Control*, **16**, 445-450.
- **Roquebert M. F, 1998.** - Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d’observation ; Identification”, in “*Moisissures des aliments peu hydratés*”, Ed. Tec & Doc, 39-95
- **Samson, R. A. 1979.** - A compilation of the *Aspergilli* described since 1965. *Stud Mycol* 18. The Netherlands: CBS.
- **Samson R. A. et Pitt JI (eds) 2000.** -Integration of Modern Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*, 510 pp. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, the Netherlands.
- **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. and Frisvad, J. C. 2006.** - Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44: 133–148
- **Samson, R. A. Visagie, J., Houbraeken, S. B., Hong. 2014.** -Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*, 154,141–173.
- **Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A., Migheli, Q. 2005 .** -Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse-transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology* 98, 201–210.
- **Smith, J. E. et Moss, M. O. 1985.** - *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*, John Wiley et Son, Chichester
- **Sutton, D. A., Fothergill, A. W. et Rinaldi M. G., 1998.** - *Guide to clinically significant fungi*, Baltimore, Williams and Wilkins
- **Tabuc, C. 2007.** - Flor fongique de différents substrats et condition optimale de production des mycotoxines. Spécialité : Pathologie, Mycologie, Génétique et Nutrition, p 12, 14, 16,26, 32,66.
- **Tran-Dinh, N., Pitt, J. I. et Carter, D. A. 1999.** -Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research* 103: 1485–1490
- **Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernandez Pinto, V., Comerio, R. et Degrossi, C. 2003.** - Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 88: 79–84
- **Varga, J., Kevei, e., Rimyu, e., Teren, j. et Kazakiewicz, Z. 1996.** -*Ochratoxin production by Aspergillus species*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: p. 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.
- **Varga, J., Due, M., Frisvad, J.C, Samson, R.A. 2011.** - Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi* 67: 57–80.
- **Vesely, D., Vesela, D. et Jelinek, R. 1983.** - Comparative assessment of the aflatoxin B1, B2, G1, G2 and M1 embryotoxicity in the chick embryo, *Toxico. Letters* 15 : 297-302

- **Vining, L. C. 1990.** - Function of secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* 44, 395-427.
- **Wogan, G. N. 2000.** - Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Seminars in Cancer Biology*, 10(3), 201–210
- **Yiannikouris, A., J. Francois, L. Poughon, C. G. Dussap, G. Bertin, G. Jeminet, and J. P. Jouany. 2004b** . -Adsorption of Zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Prot.* 67(6):1195-1200.

ANNEXES

ANNEXE I

1. Produits chimiques

Les solvants: acétonitrile (C_2H_3N), chloroforme ($CHCl_3$), acide chlorhydrique (HCl) à 37%, le méthanol (CH_3OH), éthanol (C_2H_5OH), propanol-2 (C_3H_7OH), acétate d'éthyle, acétone, hydroxyde d'ammonium, toluène, acide formique à 90 %, réactif d'Ehrlich ,

2. Les appareils

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

Tableau 01. Les appareils utilisés.

Appareil	Marque
Agitateur	Yellow, line
Autoclave	/
Micro-onde	KINWOOD
Balance	KERN, ABJ
UV radiation	CN-6, vilber lourmat
Centrifugeuse	SIGMA
Micro-seringue	HAMILTON (THE MEASURE OF EXCELLENCE)
- Agitateur orbital	Heidolph unimax 2010.
- Bain-marie	(Bioblock Scientific, Polystat I ref. 33194 220 V).
Lampe UV (254 nm; 365 nm	/
- Microscope optique	(Motic)
- Etuves (Héraeus).	Memmert
- Balance de précision	(OSI, M-220 D, Dmver Instrument).
- Mixeur	(Type 418, Braun, Spain).
-Micropipette	/

ANNEXE II

3. Milieux de culture

- Les milieux de cultures utilisés pour la production des aflatoxines et de l'acide cyclopiazonique (CPA), l'ochratoxine A sont les suivants:

Milieu à base d'extrait de noix de coco gélosé (Coconut Agar Medium) (Davis *et al.*, 1987)

Cent grammes (100 g) de la noix de coco déchiquetée sont homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée portée à ébullition. Le mélange est filtrée à l'aide du tissu en mousseline. Le pH final est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 2N. Le filtrat est additionné de 20 g d'agar puis complété à 1000 ml par l'eau distillée. 3g de 13-cyclodextrine 03-cyd) sont ajoutés à un litre de milieu

Czapek Yeast Autolysate agar (CYA) (Pitt, 1979)

Czapek concentrate	10 ml
Sucrose	30 g
Yeast extract (Difco)	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
CuSO ₄ /5H ₂ O	0,005 g
ZnSO ₄ /7H ₂ O.....	0,01 g
Agar	20 g
dH ₂ O.....	1000 ml

Le milieu CYA est utilisé aussi pour l'identification morphologique.

- Milieu utilisé pour la conservation :

Milieu PDA (Potatoes Dextrose agar) (Raper et Fennell, 1965)

Pomme de terre (macération 500 ml de filtrat).....	200 g
Sucrose.....	10 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

- Les milieux de cultures utilisés pour l'identification morphologique de principales espèces fongiques sont :

CYA with 20% sucrose agar (CY20s) (Klich, 2002)

Czapek concentrate	10 ml
Sucrose	200 g
Yeast extract (Difco).....	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
CuSO ₄ /5H ₂ O.....	0,005 g
ZnSO ₄ /7H ₂ O.....	0,01 g
Agar.....	20 g
dH ₂ O	1000 ml

Blakeslee's Malt extract agar (MEAbI, Blakeslee 1915)

Malt extract (Oxoid)	20 g
Peptone (Oxoid)	1 g
Glucose	20 g
CuSO ₄ /5H ₂ O	0,005 g
ZnSO ₄ /7H ₂ O.....	0,01 g
Agar	20 g
dH ₂ O	1000 ml

Malt Extract Agar (MEA) (Atoui)

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose.....	20 g
Peptone.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	qsp : 1L

Milieu G25N (25 % Glycérol Nitrate Agar)

KH ₂ PO ₄	0,75 g
Czapek Concentre.....	7,5 ml
Extrait de levure.....	3,7 g
glycerol	250 g
Agar	12 g
Eau distillée.....	750 ml

Milieu AFPA (Milieu Selectif pour *A. flavus* et *A. parasiticus*) (Pitt *et al.*, 1983)

Extrait de levure	20 g
Peptone.....	10 g
Citrate ferrique ammoniacal	0, 5 g
chloramphenicol	0, 1 g
Dichloran solution ethaolique à	0, 2% 1 ml
Agar	15 g
Eau distillée	1000ml

➤ Pour l'observation microscopique en utilisant :

Lactophenol

Phénol pur cristallisé	20 g
Acide lactique.....	20 ml
Glycérol pur	20 ml
Eau distillée	40 ml

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

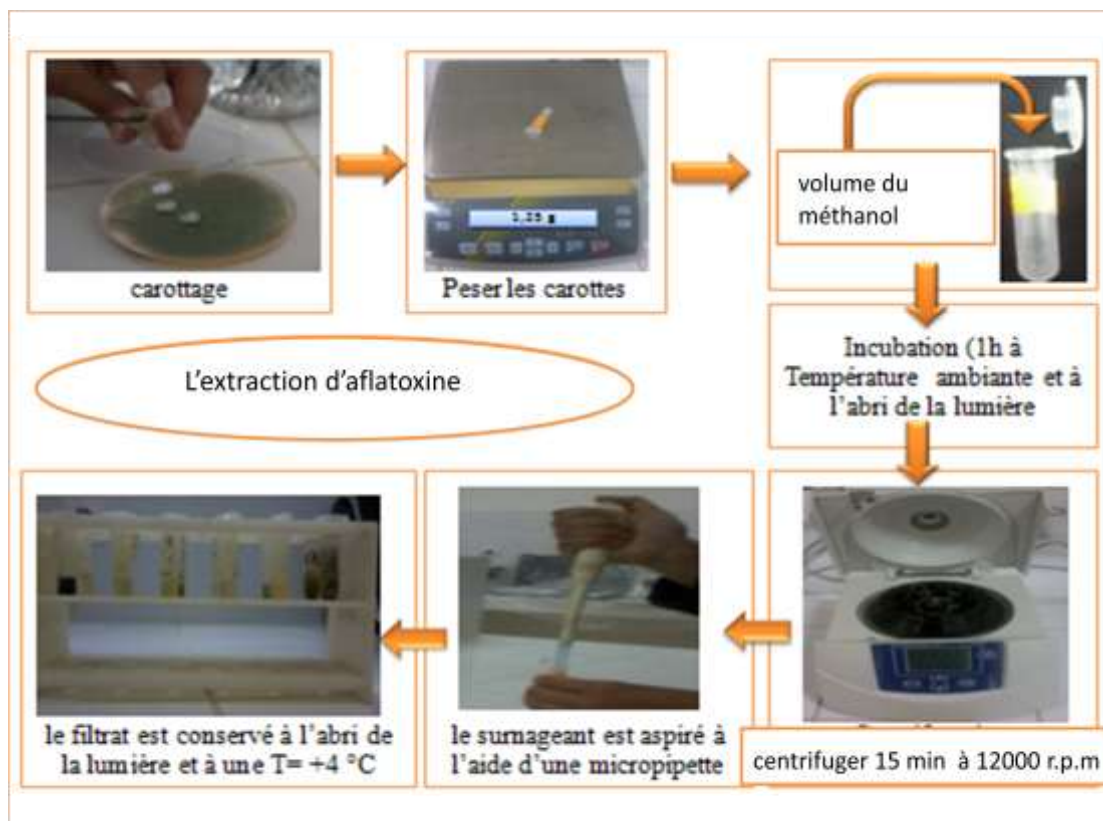


Figure 01. Représentation schématique de la procédure expérimentale de l'extraction d'aflatoxine.

