

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique

Université Blida 1



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire (MTA)

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Master**

Thème

**Isolement et identification des espèces d'*Aspergillus*
section *Flavi* aflatoxinogènes contaminant les
amandes commercialisées en Algérie**

Présenté par

M. ABDELLAOUI Mahmoud

M. GUELLAL Chafik

Devant le jury :

Mme MEKLAT A	MCB	(FSNV)	Présidente
Mme DEBIB A	MCB	(FSNV)	Examinatrice
Mme MATMOURA A	MCA	(FSNV)	Promotrice

Promotion 2015/2016

REMERCIEMENTS

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

*Nous voudrions signifier notre gratitude au Professeur **Mme HOUMANI Zahia** du Laboratoire de Recherche des Plantes Médicinales et Aromatiques (**LRPMA**) Université Blida -1- qui nous a accueillis dans son laboratoire et mis à notre disposition le matériel nécessaire à la réalisation de nos expériences et aussi de nous avoir énormément encouragé.*

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

Nous remercions également :

***Mme BENBAIBECHE H**, professeur à l'USD qui nous a fait l'honneur de présider notre Jury et accepté d'apprécier ce travail. Nous lui somme très reconnaissant pour ses judicieuses suggestions.*

***Mme AMMAR A.** Maître de conférences A à l'Université Blida1 d'avoir accepté d'examiner notre mémoire et de faire partie de notre*

jury de soutenance.

*A toute l'équipe du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse à l'**E.N.S de Kouba**, et du Laboratoire de Recherche des Plantes Médicinales et Aromatiques (**LRPMA**) Université Blida -1- pour leur aide précieuse. Enfin, nous tenons à remercier vivement et exprimer notre reconnaissance et notre profond respect à tous les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

A tous ceux qui nous ont soutenus, nous dirons merci

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents, que dieu les garde pour moi, qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leur encouragement et les énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voire réussir.

*À mon frère **Oussama** et toutes mes soeurs. Toute la famille **ABDELLAOUI** sans exception.*

À tous mes amies sans exception. Les étudiants de Microbiologie et Toxicologie Alimentaire En IAA 2015- 2016.

A tous ceux que j'aime...

À mes chers professeurs et maîtres du primaire jusqu'aux études supérieurs.

Mahmoud

Résumer

L'objectif de ce travail est l'isolement et identification d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes dans quelques échantillons d'amandes commercialisés en Algérie. Un total de 12 échantillons d'amandes de 4 variétés (amandes décortiquées locales, amandes non décortiquées locales, amandes décortiquées importées des Etats- Unis, et amandes blanchies importées des Etats- Unis) a été collecté au niveau des marchés les plus fréquentés de 3 régions d'Algérie (Blida, Médéa, Tipaza). La démarche générale qui a été adoptée consiste l'étude statistique sur la consommation d'amandes importées, et locales par la population algérienne.

Les résultats d'analyse fongique ont montré que le taux de contamination d'amandes locales est plus élevé ($715,5.10^4$ cfu/g) (86%) que celui de la variété importée ($116,8.10^4$ cfu/g) (14%). Le taux de contamination le plus élevé (396.10^4 cfu/g) (47,6%) a été enregistré chez la variété d'amandes décortiquées locales. La méthode des grains désinfectés s'avère plus intéressante et permet de détecter le pourcentage de contamination interne (profonds). Les taux de contamination profonde ne dépassent pas 2% dans tous les échantillons analysés. Les principaux genres fongiques dominants isolés sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Ils ont été retrouvés dans toutes les variétés analysées avec des taux de (52,7 %) (47,3%) respectivement de la flore totale identifiée. Les principales espèces isolées appartiennent aux sections *Flavi*, et *Nigri* du genre *Aspergillus*, ces deux dernières étant les plus dominantes avec 56,1%, et 43,4%, respectivement du total d'*Aspergillus*. La production d'AFs des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes pour 61 isolats a été réalisé sur milieu CAM. La production est ensuite confirmée par CCM. Les résultats obtenus sur milieu CAM et CCM ont révélé un taux de 11,5% et 39,3% (24 isolats) respectivement. L'ensemble des résultats relatifs à l'étude des caractères morphologiques et chimiotypiques des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes indique que cette section est dominée par l'espèce *A. flavus* typique (91.7%), un isolat (4,2%) d'*A. parasiticus* a été isolé, et la présence d'un isolat (4,2%) d'*A.flavus* atypique, s'il produit de CPA.

Mots clés : aflatoxines, amandes locales et importées, *Aspergillus* section *Flavi*, Algérie.

Abstract

The objective of this research is the isolation and identification the aflatoxinogenic *Aspergillus* section *Flavi* basing on some samples of almonds commercialized in Algeria. A total of 12 samples of 4 varieties of almonds (local shelled almonds, local unshelled almonds, shelled almonds and blanched almonds both imported from the United States) were drawn from popular markets in three regions of Algeria (Blida, Medea, Tipaza). The general approach that has been adopted is the statistical study of imported and local almonds consumption by Algerians .The obtained results of fungal analysis showed that the contamination rate of local almonds variety is higher (715,5.10⁴cfu/g) (86%) than the imported one (116,8.10⁴cfu/g) (14%). The highest rate of contamination (396.10⁴cfu/g) (47.6%) was recorded in the local shelled almonds variety. The method disinfected grains is more interesting and can detect the percentage of internal contamination (deep). Internal contamination rates do not exceed 2% in all analyzed samples. The most fungal genera isolated were *Aspergillus* and *Penicillium*. They were found in all analyzed varieties with a frequency and abundance of (52.7%) and (47.3%) respectively of the total flora identified. The main isolated species which belong to *Flavi* sections, and *Nigri* sections of the *Aspergillus* genus, were the most dominant ones with 56.1% and 43.4% respectively of the total of *Aspergillus*. The screening of 61 isolates of the *Aspergillus* section *Flavi* was determined on Coconut Agar Medium (CAM). The production was then confirmed by thin layer chromatography (TLC). The results obtained from CAM and TLC showed a rate of 11.5% and 39.3% (24 isolates) respectively. The study of morphological features and chemotype of the aflatoxinogenic *Aspergillus* section *Flavi* populations isolates indicates that this section is dominated by the species *A. flavus* typical (91.7%), one isolate (4.2%) *A. parasiticus* was isolated, and the presence of an isolate (4.2%) of *A. flavus* atypical, if it produces the CPA.

Key words: aflatoxins, local almonds, imported almonds, *Aspergillus* section *Flavi*, Algeria.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة عزلات *Aspergillus* مجموعة *Flavi* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين الملوثات لبعض عينات اللوز المسوقة في الجزائر. تم جمع 12 عينة من 4 أصناف من اللوز (اللوز المقشر المحلي ، اللوز غير المقشر المحلي ، اللوز المقشر المستورد من الولايات المتحدة الأمريكية ، و اللوز الأبيض المستورد من الولايات المتحدة الأمريكية) من الأسواق الأكثر شعبية في 3 مناطق مختلفة من الجزائر (البلدية، المدينة، تيبازة). أوضحت نتائج تحليل الفلورة الفطرية أن نسبة التلوث صنف اللوز المحلي أعلى (715,5.104cfu/g) (86%) منها في اللوز المستورد (14%) (116,8.10⁴ cfu/g). وسجلت أعلى نسبة تلوث في صنف اللوز منزوع القشر المحلي (47,6%) (396.104cfu/g) . طريقة الحبوب المطهرة أثبتت نتائج مهمة وأتاحت الفرصة لتحديد نسبة التلوث الداخلي للحبوب. كشفت النتائج أن نسبة التلوث الداخلي العميق لحبوب اللوز لا تتجاوز 2% في جميع العينات التي تم تحليلها.

أهم الأجناس الفطرية المعزولة هما جنس *Aspergillus* و *Penicillium* . وقد تم العثور عليها في جميع أصناف اللوز التي تم تحليلها بنسب سيطرة وهي (52,7%) (47,3%) على التوالي من المجموع الكلي للفلورة الفطرية. عزلات *Aspergillus* مجموعة *Flavi* و *Aspergillus* مجموعة *Nigri* تمثل 56,1% و 43,4% على التوالي من جنس *Aspergillus* مع ملاحظة وجود سيطرة للنوعين.

فحص كشف إنتاج سموم الأفلاتوكسين من طرف 61 عزلة *Aspergillus* مجموعة *Flavi* عن طريق الكشف على وسط خلاصة جوز الهند CAM. ثم تم تأكيد الإنتاج عن طريق تقنية الكروماتوغرافيا على الطبقة الرقيقة CCM. وكشفت النتائج التي تم الحصول عليها على وسط CAM و بتقنية CCM أن نسبة العزلات المنتجة لسموم الأفلاتوكسين هي 11,5% و 39,3% (عزلة 24) على التوالي. نتائج دراسة الصفات المورفولوجية والكيميونمطية لعزلات *Aspergillus* مجموعة *Flavi* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين أن هذه المجموعة يسيطر عليها نوع *A. flavus* نموذجي بنسبة (91,7%). وجود عزلة واحدة (4,2%) من نوع *A. parasiticus* ، وعزلة واحدة (4,2%) من نوع *A. flavus* غير نموذجي ، إذا كانت غير منتجة لحمض CPA .

الكلمات المفتاحية : الأفلاتوكسين, اللوز المحلي و المستورد, *Aspergillus* مجموعة *Flavi*, الجزائر .

Liste des abréviations

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

Listes de figures

Figure 01.(A): Les zygomycètes, (B): Les ascomycètes, (C): les basidiomycètes.....	17
Figure 02. Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	21
Figure 03.Photo des espèces <i>Aspergillus parasiticus</i> (a),et <i>A. flavus</i> (b)sur milieux standards d'identification au 7ème jour, milieu CYA : Czapek yeast extract agar, 37°C ; milieu G25N : 25% glycerol nitrate agar, 25°C ; milieu MEA : Malt extract agar, 25°C ; (M) aspect microscopique.	26
Figure 04.Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1.....	28
Figure 05. Schéma représentatif de la technique des suspensions-dilutions.....	37
Figure 06. Représentation schématique d'un chromatogramme sur couche mince.....	44
Figure07.la Production d'amandes en Algérie dans la période (2003 – 2013)	46
Figure 08.l'importation d'amandes en Algérie dans la période (2003 – 2013).....	48
Figure 09. Consommation d'amandes en Algérie dans la période (2003 – 2013)	50
Figure 10.(%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A) de chaque variété d'amandes analysées.	52
Figure 11.Colonies des moisissures moussants sur milieu DRBC après 5 jours d'incubation à 28°C.....	52
Figure 12. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A) d'amandes importées, et locales analysées.	53
Figure 13. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A), et profonde (méthode B) de chaque variété d'amandes analysées.	54
Figure14. (%) Taux de contamination externe et profonde d'amandes en fonction des régions de prélèvement.....	55
Figure15. (%) Taux de contamination externe et profonde de chaque échantillon analysé.	57

Figure 16. Fréquence du genre <i>Aspergillus</i>, et <i>Penicillium</i> dans les différentes variétés d'amandes analysées.	58
Figure 17. Fréquence du genre <i>Aspergillus</i> dans les échantillons des amandes analysées.....	59
Figure 18. La dominance des isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.	59
Figure 19. La dominance des isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.	60
Figure 20. Fréquence du genre <i>Penicillium</i> dans les échantillons d'amandes analysées.....	60
Figure 21. La dominance de <i>Penicillium ssp.</i> poussants sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.	61
Figure 22. Fréquence d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> et d'<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> dans les différentes variétés d'amandes analysées par rapport au total d'<i>Aspergillus</i>.....	62
Figure 23. Fréquence d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> et d'<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> dans les échantillons d'amandes analysés par rapport au total d'<i>Aspergillus</i>.....	63
Figure 24. (%) Taux de production d'AFs par les isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> déterminée par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM, et sur CCM.....	65
Figure 25. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).....	65
Figure 26. Images sous UV 365 nm montrant la fluorescence bleue de la production des d'aflatoxines produites par les isolats aflatoxinogènes sur CCM.	66
Figure 27. Fréquence (%) des isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> producteurs d'AFs en fonction de type d'échantillon.	68
Figure 28. Les différents types d'isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> dans les échantillons d'amandes analysées.	69

Figure 29. Aspect macroscopique d'*Aspergillus* section *Flavi* sur milieu CYA au 7^{ème} jour. (A, B) : *Aspergillus flavus*; (C) : *Aspergillus parasiticus*.69

Figure 30. Aspect microscopique (Grx100) d'*Aspergillus flavus* (photo original).....70

Figure 31. Présentation de deux types d'isolats producteurs des sclérotés de type « S » et « L » « S » (sclérote <400 µm) , « L » (sclérote >400 µm)......71

Listes des tableaux

Tableau 01. Principales mycotoxines et les moisissures productrices retrouvées en alimentation humaine et/ou animale.....	5
Tableau 02.Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différents étapes de la chaine alimentaire.....	9
Tableau 03.Organes cibles des mycotoxines.....	13
Tableau 04. Teneurs maximales en mycotoxines exprimées en µg/kg autorités par les pays de l'Union Européenne.....	15
Tableau 05 . Production d'AFs B et G, de CPA et d'autres métabolites par les espèces d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>.....	24
Tableau 06.Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines.....	29
Tableau 07. Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale.....	31
Tableau 08. Liste des échantillons analysés.....	35
Tableau 09. Aspect macroscopique et microscopique des principales espèces fongique.....	40
Tableau 10. Quantités d'amandes locales en (Qin) dans la période (2003 – 2013) en Algérie.....	46
Tableau 11 . Quantités d'amandes importées en (Qin) en Algérie dans la période 2003à 2013.....	47
Tableau 12. Quantités d'amandes importées en fonction de pays exportateurs en (Qin) dans la période (2003 – 2013) en Algérie.....	49
Tableau 13.Distribution de la flore fongique totale obtenus par la méthode A, et B dans les différentes variétés d'amandes analysées commercialisés en Algérie.....	51

Tableau 14. Distribution de la flore fongique totale externe, profonde et fréquences d'<i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>,et <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> dans les différents échantillons d'amandes analysées commercialisés en Algérie.....	56
Tableau 15. Répartition des 24 isolats aflatoxinogènes d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en fonction de l'intensité de fluorescence sur CCM	67
Tableau 16. Répartition des 24 isolats producteurs d'AFs d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> en différents groupes (morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB, d'AFG et de sclérotés.....	73
Tableau 17. Caractéristiques des 24 isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> aflatoxinogènes issus d'amandes analysées.....	74

TABLE DE MATIERE

LISTE DES ABREVIATIONS

INDEX DES TABLEAUX ET DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE.....1

Partie I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I :GENERALITE SUR LES MOISSURES ET LES MYCOTOXINESI.1.

Les moisissures.....2

I.2. Mycotoxines.....4

 I.2.1. Définition.....4

 I.2.2. Nature chimique des mycotoxines.....5

I.3. Les moisissures et mycotoxines dans la chaîne alimentaire.....6

I.4. Toxinogènese.....7

 I.4.1. Champignons toxinogènes.....7

 I.4.2. Facteurs influençants la toxinogénèse.....7

 I.4.2. 1. Facteurs intrinsèques.....7

 I.4.2. 2. Facteurs environnementaux.....8

 I.4.2. 2. 1. Facteurs physiques.....9

 I.4.2. 2. 2.Facteurs chimique.....11

 I.4.2. 2. 3.Facteurs biologiques.....12

I.5. Impacts Sanitaire Et Economique13

I.6. Réglementation des mycotoxines.....14

Chapitre II : Les champignons producteurs d'aflatoxines

II.1. Classification des champignons.....16

II.2. Identification des moisissures.....16

II.3. Le Genre Aspergillus.....19

 II.3.1. Définition.....19

 II.3.2. Les caractères morphologiques d'identification du genre Aspergillus.....19

 II.3.2.1. Description macroscopique d'Aspergillus.....20

 II.3.2.2. Description microscopique d'Aspergillus.....20

II.3.3. Systématique des espèces d'Aspergillus.....21

II.3.4. Aspergillus section Flavi.....	22
II.3.5. Les espèces de la section Flavi et leurs mycotoxines.....	22
II.3.5. 1. Aspergillus flavus.....	25
II.3.5. 2. Aspergillus parasiticus.....	26

Chapitre III : Les aflatoxines

III.1. Origine.....	27
III.2. Structures et propriétés physico-chimiques.....	27
III.3. Contamination en AFs des denrées alimentaires.....	29
III.4. Les facteurs influençant la teneur en AFs dans les denrées alimentaires.....	29
III.5. Profil toxicologique des aflatoxines.....	30
III.6. Réglementation des aflatoxines	30

Partie II

MATERIEL ET METHODES

IV.1. Matériel

IV.1.1 Les échantillons d'amandes.....	32
IV.1.2. Milieux de culture.....	32
IV.1.3. Souches de références.....	32
IV.1.4. Appareillage, produits chimiques et standards analytiques.....	33

IV.2. Méthodes

IV.2.1 Collections des échantillons.....	33
IV.2.2 Préparation des échantillons.....	34
IV.3. Isolement et identification de la flore fongique.....	36
IV.3.2. Méthode A pour isoler la flore fongique externe et interne.....	36
IV.3.3. Méthode B pour isoler la flore fongique interne (profonde)	38
IV.3.4. Identification morphologique des isolats fongiques.....	38
IV.3.4.1 Identification macroscopique.....	38
IV.3.4.2 Identification microscopique.....	39
IV.3.4.3 Repiquage des souches d'Aspergillus sp et quelques Penicillium sp	41
IV.4. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines.....	41
IV.5. Préparation des plaques.....	42
IV.6. Analyse quantitative par estimation visuelle.....	44

Partie III

Résultats et Discussion

V.1. Résultats

V.1.1. La commercialisation d'amandes.....	45
V.1.1.1. La production d'amandes dans le monde.....	45
V.1.1.2. La Situation commerciale d'amandes en Algérie.....	45
V.1.1.2.1. La Production d'amandes en Algérie.....	45
V.1.1.2.2. L'importation d'amandes en Algérie.....	47
V.1.1.2.3. consommation d'amandes en Algérie.....	50
V.1.2. Analyse de la flore fongique totale et les principaux genres	
V.1.2.1. Evaluation de la mycoflore dans des différentes variétés des amandes.....	50
V.1.2.2. Evaluation de la mycoflore dans des différents échantillons des amandes.....	55
V.1.2.3. Reconnaissance les principaux genres.....	57
V.1.2.4. Distribution des isolats d'Aspergillus section Flavi et d'Aspergillus section Nigri	
V.1.3. Etude du pouvoir producteur d'AFs par les isolats d'Aspergillus section Favi....	61
V.1.3.1. Production d'AFs sur milieu CAM et par CCM.....	63
V.1.3.2. Souches aflatoxinogènes isolées d'amandes.....	66
V.1.4. Caractérisation des Aspergillus section Flavi.....	68
V.1.4.1. Distribution des espèces d'Aspergillus section Flavi dans les amandes analysé.....	68
V.1.4.2. Distribution des espèces d'Aspergillus section Flavi aflatoxinogènes.....	71
V.2. Discussion.....	76
Conclusion et perspectives.....	84

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES I

ANNEXES II

Introduction

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Fusarium* (AFSSA, 2006). La contamination inévitable des produits alimentaires par les mycotoxines constitue une cause importante de maladies d'origine alimentaire et un problème actuellement évoqué qui porte sincèrement sur la qualité et la sécurité sanitaire des aliments (O.M.S. 2002). De plus, la bonne stabilité thermique des mycotoxines fait d'elles généralement les plus résistantes que les moisissures qui les ont synthétisées. Leur résistance ainsi à un stockage prolongé qu'aux températures mises en œuvre pendant la préparation des aliments indique que les moyens de détoxification ne sont pas encore très efficaces (Tantaoui-Elaraki et al., 1983).

Le problème des mycotoxines a pris une importance considérable dans les années 60 lorsque la découverte des aflatoxines a révélé que certaines moisissures sont capables de synthétiser des substances toxiques responsables de pathologies chez l'homme. Les AFs sont importants considérablement sur le plan sanitaire et agro économique en raison de leurs effets hautement toxiques et de leur fréquence élevée. En effet, ces substances présentent des propriétés cancérigènes, mutagènes, hépatotoxiques, tératogènes et immunotoxiques. Parmi toutes les mycotoxines, l'aflatoxine B1 produit par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* est la forme la plus toxique pour les mammifères (Tabuc, 2007). Les espèces impliquées dans la production d'AFs appartiennent essentiellement à *Aspergillus* section *Flavi*. D'après Steyn (1998), les aflatoxines sont sécrétées par des souches d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius*.

L'Algérie est un pays surplombant la Méditerranée, caractérisé par un climat chaud et humide favorisant la croissance des moisissures et la production des mycotoxines dans les zones côtières abritant environ 70% de la population totale. Les amandes s'altèrent rapidement s'elles sont stockées dans des conditions défavorables au niveau des marchés populaires. Plusieurs phénomènes en sont les causes (insectes, microorganismes, oxydation, etc.). Parmi les microorganismes, les moisissures représentent le groupe le plus diversifié qui peut causer des pertes importantes en réduisant la qualité et/ou la quantité des amandes stockées (Terrain et Graallet 2003). La problématique repose sur une supposition si les conditions particulières laissent supposer que les amandes peuvent présenter un risque de contamination par les mycotoxines.

La population algérienne consomme de grandes quantités des amandes sèches directement ou sous forme d'ingrédients dans des préparations traditionnelles. Ainsi que

l'huile d'amande extraite est depuis l'Antiquité très utilisée pour ses propriétés cosmétiques, mais peu d'informations sur leur qualité sont disponibles.

L'objectif de ce travail est donc d'analyser la flore fongique contaminant les différentes variétés des amandes commercialisées en Algérie, d'isolement et caractérisation morphologique des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*, et de leur déterminer le pouvoir producteur d'aflatoxines

Ce travail de mémoire est présenté comme suit :

Dans les 3 premiers chapitres intitulé « revue bibliographique », nous donnons l'état actuel des connaissances sur les mycotoxines et en particulier les AFs et les espèces productrices qui font l'objet de notre étude. Le chapitre I, est consacré aux généralités sur les moisissures et les mycotoxines. Dans le chapitre II, l'accent est mis sur les champignons producteurs d'AFs du point de vue systématique. Enfin dans la dernière chapitre III des détails sur les AFs sont également données.

Le chapitre IV est consacré au matériel et méthodes utilisés dans cette étude. La démarche globale consiste à isoler et dénombrer les moisissures contaminant les amandes. La caractérisation chimio-morphologique des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* isolées, et leur capacité de production *in vitro* des aflatoxines par une analyse chromatographique sont ensuite déterminées.

Dans le chapitre V nous présentons les principaux résultats obtenus et leur discussion. L'étude est achevée par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I Généralité sur les moisissures

I. Généralités sur les moisissures et les mycotoxines

I.1. Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques, filamenteux, et ubiquitaires (**Pitt et al., 2000**). Ils peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important. Ce sont des espèces saprophytes tirant leurs apports nutritionnels des matières organiques (**Leyral, et Vierling., 2007**). Ils sont caractérisés par la nature chimique de leur paroi cellulaire riche en chitine, la reproduction par spores sexuées ou asexuées, la présence de glycogène, comme source de réserve, et l'absence de la chlorophylle.

Le règne des champignons renfermerait 65000 à 100 000 espèces différentes et les moisissures constituent 20 000 espèces. La plupart des moisissures sont des saprophytes, mais certaines peuvent être photogènes pour les végétaux et les animaux (**Riba, 2008**). Ces microorganismes eucaryotes appartiennent en majorité à trois classes : zygomycètes, ascomycètes, basidiomycètes et deutéromycètes (**Berthier, et Valla, 2001**).

Ces microorganismes microscopiques sont très utiles à l'homme et présentent des intérêts considérables dans les différents domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé, etc.). Ainsi, dans les milieux naturels les moisissures contribuent, avec d'autres microorganismes, à la biodégradation et au recyclage des matières organiques. Certains de ces microorganismes sont utilisés dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de divers produits (enzymes, acides etc.) (**Perry et al., 2004**). Parmi les enzymes produites on peut citer les protéases et les pectinases produites par *Aspergillus niger*, les acides organiques comme l'acide citrique et l'acide gluconique synthétisés par des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*. D'autres sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire, l'amélioration des qualités organoleptiques de certains produits alimentaires comme *Penicillium roqueforti*, et *P. camemberti* pour l'affinage des fromages. Enfin, dans le domaine pharmaceutique, les moisissures sont utilisées surtout pour la production d'antibiotiques comme production de pénicilline par *Penicillium chrysogenum*, et de céphalosporine par *Cephalosporium acremonium*) (**Carlile, et Watkinson, 1997 ; Kiffer et Morelet, 1997 ; Perry et al., 2004**). Environ 22% des antibiotiques identifiés et 40% des enzymes produites industriellement sont élaborées par les champignons filamenteux (**Berdy, 1995; Strohl, 1997**).

Outre que les moisissures sont bénéfiques, elles constituent un agent de détérioration très important. Leur développement indésirable sur les aliments peut entraîner de nombreux problèmes tel que la modification de l'aspect des produits alimentaires, altération de qualités

organoleptiques (odeur et flaveur), réduction qualitative et quantitative de la valeur alimentaire, une baisse de rendement des récoltes et des pertes économiques dues au rejet des produits contaminés (**Pitt et al., 2000**). Sur le plan sanitaire les moisissures jouent une cause pour différentes affections de la peau (mycose) et des problèmes d'allergie. En plus, certaines espèces présentent un risque sanitaire beaucoup plus grave puisqu'elles sont capables de produire des mycotoxines dont les effets sur la santé sont nombreux et de gravités avérées.

I.2. Mycotoxines

I.2.1. Définition

Le terme mycotoxine vient du grec "*mycos*" qui signifie champignons et du latin "*toxicum*" qui signifie poison. Il désigne des métabolites secondaires de faible poids moléculaires toxiques, sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, naturellement présentes dans l'air ambiant, le sol et sur les cultures (**Yiannikouris et Jouany, 2002**). Les mycotoxines sont synthétisées pendant la phase diophase après les stades de multiplication et de croissance. Elles ne jouent pas de rôle évident dans l'économie du microorganisme. Les mycotoxines sont considérées comme faisant partie des contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la santé publique, la sécurité alimentaire et l'économie de nombreux pays (**Steyn, 1995; Pitt, et al., 2000**). Parmi la centaine de mycotoxines identifiées à l'heure actuelle, trentaine sont véritablement importantes pour la santé humaine et animale à cause de leur fréquence ou de leur toxicité (Bennett et Klich, 2003). Les principales mycotoxines et les moisissures retrouvées en alimentation humaine et/ou animale sont résumées dans le **tableau1**

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

Mycotoxine	Moisissure	Denrées
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. bombycis</i> , <i>A. pseudotamarii</i> et <i>A. ochraceoroseus</i> .	Arachides, céréales, graines de coton, épices et fruits.
Ochratoxines A, B, C	<i>Aspergillus ochraceus</i> et <i>Penicillium viridicatum</i> .	Légumes, céréales et graines de café.
Zéaralénone	<i>Fusariumgraminearum</i> et <i>F. Sporotrichoïdes</i>	Maïs, blé, orge, etc.
Fumonisines.	<i>Fusariummoniliforme</i> .	Maïs et autres céréales.
Trichothécènes (Toxine T-2)	<i>Fusarium</i> spp.	Maïs et blé.
Alcaloïde de l'ergot.	<i>Claviceps purpurea</i> et <i>C. paspali</i> .	Blé et dérivés et seigle.
Patuline.	<i>Aspergillus</i> spp. et <i>Penicillium</i> spp	Fruits (pommes, prunes, pêches, poires, abricots).

I.2.2. Nature chimique des mycotoxines

Les mycotoxines possèdent des structures chimiques leur conférant une bonne stabilité et de ce fait, les procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation et irradiation) ne peuvent pas les détruire totalement (**Park et al., 2002**). Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, salframine, gliotoxine, roquefortine, sporidesmine, Fumitremorgines), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine A, patuline, citrinine, acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine). Les propriétés chimiques et biologiques des mycotoxines et leurs effets toxiques sont variables. De point de vue toxicité seules quelques mycotoxines attirent l'attention des chercheurs. Ce sont les AFs, les ochratoxines (OTA), la fumonisine B1(FB1), la zéaralénone (ZEA), et lestrichothécènes (désoxynivalénol (DON), toxines T-2, et HT2). (**Turner, 1971 ; Turner et Albridge, 1983 ; Steyn, 1980**).

I.3. Les moisissures et mycotoxines dans la chaîne alimentaire

Les mycotoxines sont produites sur une large variété de denrées alimentaires avant, pendant et après récolte. Elles affectent de nombreux produits agricoles, dont les céréales, les fruits secs, les noix, les grains de café, raisin et les graines oléagineuses (**tableau1**)(**D’Mello et McDonald, 1997; Scudamore et Livesey, 1998**), qui sont des substrats très sensibles à la contamination par les moisissures et à la production de mycotoxines. La production des mycotoxines peut survenir au champ, pré et post-récolte, lors du transport, pendant le stockage ou au cours de transformation. lorsque le temps de la consommation des aliments est durable et le voyage à longue distance nécessitent de plus en plus de stockage (**Chapeland-Leclerc et al., 2005**) d’où le développement des moisissures à la surface et dans les produits destinés à l'alimentation.

L’entrée des mycotoxines dans la chaîne alimentaire de l’homme s’effectue soit par des denrées consommées directement (arachides, pistaches, amandes...) soit indirectement par des produits dérivés (par ex. farine de céréales) à partir desquels sont élaborés des aliments finis (par ex. produits issus de la panification, de la biscuiterie, céréales pour petit-déjeuner). Comme s’elles sont peu métabolisées par les organismes vivants, les mycotoxines pourront également se transmettre par des produits d’origine animale (lait, produits laitiers, abats, charcuterie etc.) si l’animal a consommé une nourriture elle-même contaminée par des mycotoxines.

Les mycotoxines sont peu volatiles. Elles se retrouvent dans le mycélium et les spores (**D’Mello et McDonald, 1997**) et peuvent diffuser dans le substratum et contaminer les produits agricoles. Les mycotoxines sont aussi adsorbées dans les poussières et sont transportées sous forme d’aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organiques. En milieu agricole, industriel et même en milieu intérieur, l’inhalation de spores et de fragments fongiques peut entraîner ou aggraver des réactions immunologiques et allergiques, avoir des effets toxiques ou causer des infections (**Miller, 1992; Jarvis et Miller, 2005**), leur transport est favorisé par une ambiance chaude et humide (**Leyral., et Vierling., 2007**).Le contact cutané direct avec des spores constitue une autre voie de contamination.

Il faut souligner que l’absence de la moisissure dans la denrée ne signifie pas forcément l’absence de la mycotoxine. En effet, celle-ci peut aussi être présente alors que l’agent responsable a disparu, soit du fait de l’évolution de la mycoflore, soit du fait de traitements technologiques conduisant à la disparition de la moisissure toxigène (**Mitchell et al., 2004**). Inversement, la présence de champignons producteurs de mycotoxines sur une denrée alimentaire ne signifie pas toujours qu’une mycotoxine est produite et une denrée peut

contenir une mycotoxine alors que le champignon n'est plus présent. Toutefois, il n'existe pas de relation directe entre espèce fongique et mycotoxine. En effet, une molécule peut-être produite par plusieurs espèces fongiques et, au sein d'une espèce toxigène, toutes les souches n'ont pas forcément la capacité à produire la (les) mycotoxine(s) (**Castegnaro et Pfohl-Leszkovicz, 2002**).

I.4. Toxinogénèse

La contamination des produits par les mycotoxines se réalise lorsqu'un ensemble de conditions environnementales au champ, ainsi que des procédés mal maîtrisés de récolte, de stockage, et de transformation sont réunies. Le type et la quantité de mycotoxine dépendent des espèces fongiques qui les produisent (**Lacey, 1986**). Elles diffèrent dans leur caractère morphologique, génétique et dans leurs places écologiques (**Cast, 2003**).

I.4.1. Champignons toxigènes

Les champignons toxigènes peuvent être classés en deux groupes principaux (**Christensen, 1974**):

- Les champignons de champs qui contaminent les produits agricoles avant ou pendant la récolte, principalement *Fusarium* et *Alternaria* mais aussi des *Aspergillus* dans le cas des raisins.
- Les champignons de stockage (par exemple les *Penicillium* et *Aspergillus*) qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage.

I.4.2. Facteurs influençant la toxinogénèse

La sécrétion de métabolites toxiques par les moisissures dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (liés à la souche fongique), extrinsèques (conditions de l'environnement).

I.4.2. 1. Facteurs intrinsèques

Le potentiel génétique est un facteur important. Au sein du même genre, on peut distinguer des espèces connues pour être toxigènes et d'autres non. Au sein d'une même espèce toxigène, la capacité de production n'est pas présente chez toutes les souches. Par exemple, toutes les souches d'*Aspergillus parasiticus* produisent les aflatoxines par contre chez *Aspergillus flavus* la production est variable selon les souches. Par ailleurs un champignon peut produire plusieurs mycotoxines à la fois. Par exemple la production d'AFs

et de CPA par *A. flavus*. En plus, une même mycotoxine peut être produite par des espèces différentes voire même par deux genres différents (ex. l'ochratoxine A produite par *Aspergillus* et *Penicillium*) (Mitchell *et al.*, 2004).

I.4.2. 2. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux affectant la production de mycotoxine sont d'origine physique, chimique ou biologique (Mitchell *et al.*, 2004). Cependant, ces facteurs agissent rarement d'une façon indépendante (Lacey, 1986), en effet leurs interactions sont habituellement plus importantes que l'effet d'un facteur simple. Le **tableau 2** présente quelques facteurs environnementaux qui peuvent influencer la production de mycotoxine à différentes étapes de la production (Hesseltine, 1976).

Tableau 2. Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines à différents étapes de la chaîne alimentaire

Facteurs	Au champ	A la récolte	Pendant le stockage
Physiques			
-Humidité	+	+	+
- Rapidité de séchage	-	+	+
-Ré humidification	-	+	+
-Humidité relative	+	+	+
-Température	+	+	+
-Damage mécanique	+	+	+
-mélanges de grains	-	+	+
- temps	+		
Chimiques			
- Composition gazeuse	-	-	+
- Traitements agricoles	-	-	+
-Nature de substrat	+	-	+
-Nutrition minérale	+	-	+
-Traitement chimique	-	-	+
Biologiques			
-Stress de plante	+	-	+
-Vecteurs invertébrés	+	-	+
-Infection fongique	+	-	+
-Différences entre les variétés des plantes	+	-	+
-Différences entre les souches fongiques	+	-	+
-charge en spores	+	+	+
-système microbiologique	+	-	+

+ : Présence, - : Absence

I.4.2. 2. 1. Facteurs physiques

Les facteurs physiques essentiels influençant la production des mycotoxines sont :

- **La température**

La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est généralement proche de la température optimale de croissance. La plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant entre 25 °C et 35 °C (El khoury, 2007). D'autre part, certaines

espèces de champignons sont psychrophiles ou psychrotolérants, et sont capables de se développer à des températures relativement basses comme les espèces du genre *Penicillium* dont l'intervalle de température varie de 4°C à 31°C avec un optimum vers 12°C (El khoury, 2007). Les aflatoxines peuvent être synthétisées entre 12-42°C avec un optimum entre 24-28°C (Reisset *al.*, 1998). *Aspergillus flavus* et *A. niger* peuvent se développer entre 8 et 45 °C (Pitt et Hocking, 1997). A 5°C, *Aspergillus* ne peut produire ni les aflatoxines, ni l'OTA, alors que *Penicillium* et *Fusarium* sont capables de produire les mycotoxines (Northolt et Bullerman, 1982; Weidenbörner 1998).

- **Activité en eau (a_w)**

La teneur en eau libre dans un substrat appelée activité de l'eau (a_w) est un paramètre dont l'influence est déterminante sur le développement des moisissures et sur la production de mycotoxines. La plupart des moisissures préfèrent un (a_w) compris entre 0.85 et 0.99 pour leur développement. L' a_w optimale nécessaire à la toxigenèse est généralement supérieure à celle qui est nécessaire pour la croissance fongique et la germination des spores. Par exemple, la formation des aflatoxines par *A. flavus* nécessite une valeur d' a_w comprise entre 0,83 et 0,87 mais la croissance du micro-organisme producteur peut avoir lieu à des valeurs d' a_w plus basses. *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une a_w de 0,85 ; par contre la production d'OTA n'est possible que lorsque a_w est ≥ 0.85 (Cairns – Fuller *et al.*, 2005). Certaines moisissures xérophiles (*Aspergillus flavus* ou *A. xérophilus*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, charcuterie sèches à des a_w allant de 0.65–0.75. Certains facteurs, tels que la pression osmotique, le substrat et la température, en réduisant l'humidité relative, peuvent conditionner l' a_w dans le milieu. Quelle que soit la nature de l'aliment, aucun micro-organisme ne peut se développer lorsque l' a_w est inférieure à 0,6, donc les produits alimentaires ayant une $a_w \leq 0,6$ ne sont généralement pas altérés (El khoury, 2007). En effet, les champignons de champs exigent typiquement d'une haute teneur en humidité dans le substrat (22-25 %) par rapport aux champignons de stockage (13-18 %) (Samson *et al.*, 2005).

- **Influence du pH**

Comme pour la température et l' a_w , la gamme de pH permettant la toxigenèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 2,5 à 9,9 avec un optimum de 4,5 à 6,5 et la production des mycotoxines a lieu aux voisinages des pH optimum de croissance (Weidenbörner, 1998).

La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 5,5 à 9 avec une a_w entre 0,85 à 0,98, à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C (**Reboux, 2006**).

I.4.2. 2. Facteurs chimique

Les facteurs chimiques essentiels qui influencent la production des mycotoxines sont :

- **Nature de substrat**

La toxinogénèse dépend beaucoup plus étroitement que de la denrée sur laquelle les moisissures se développent. En effet, les céréales, et les oléagineux, plus riches en glucides, et en lipides sont généralement plus favorables à la production de mycotoxines que les substrats à forte teneur en protéines (**Le Bars, 1998**). Ainsi, la biogénèse des AFs, de l'OTA, de la stérigmatocystine, et de l'acide pénicillique, est favorisée. Tout d'abord par la présence de glucides dans le substrat, puis de lipides et enfin la présence de protides qui ont une moindre influence (**Lacey, 1989**). La production d'AFs par *Aspergillus flavus* est favorisée par certains sucres : le glucose, le mannose, le fructose et le saccharose. En outre, *A. parasiticus* ne produit pas d'AFs dans un milieu peptoné riche en sel (**Barrios, Gonzalez, et Tomasini, 1996**). Ainsi, l'acide phytique diminue la synthèse d'AFs par *A. parasiticus* et *A. flavus* alors que la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *A. ochraceus* (**Pfohl – Leszkowicz, 2001**). Ainsi les progrès de la chémotaxonomie ont permis de démontrer que pour une même espèce les profils des substances produites sont différents si on prélève le champignon sur le substrat naturel ou à partir d'une culture en boîte de Pétri. L'exemple le plus parlant concerne *Penicillium roquefortii* est incapable de produire une toxine sur le fromage de Roquefort, alors qu'in vitro il est en mesure de sécréter un métabolite très toxique (**Chapeland et al., 2005 ; Reboux, 2006**).

- **Composition gazeuse**

Généralement la production des mycotoxines est plus sensible à la variation de la composition de l'air qu'à la croissance fongique. Ainsi, une concentration en oxygène inférieure à 1% et des concentrations élevées de CO₂ empêchent l'élaboration de mycotoxines (**Cairns–Fuller, et al., 2005; Keller, et al., 1997**). Une teneur de 40% en CO₂ et 1% en O₂ réduit de 65% la croissance d'*A. flavus* et une inhibition totale de la production d'aflatoxine B₁. Ainsi, la production d'aflatoxine B₁ dans l'arachide est modérément réduite pour des taux d'O₂ entre 5 et 21%, par contre elle est inhibée lorsque la proportion en O₂ est inférieure à 1%. L'augmentation de la teneur en CO₂ (20%) et une réduction en O₂, provoque une chute importante de la production d'AFs. De même, la production de la patuline et d'acide pénicillique est réduite à de basses concentrations d'oxygène sans affecter la croissance du champignon producteur.

- **Traitements agricoles**

Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans le champ. Il peut s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte (**Lipps et Deep, 1991**), l'emploi des fongicides (**Moss t Frank, 1985**), et les différences géographiques (**Langseth et al., 1995**). En outre la culture biologique peut poser un risque pour la production accrue de mycotoxine comme cela a été proposé par **Edwards (2003)**.

I.4.2. 2. 3. Facteurs biologiques

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

Les échantillons envahis par une seule espèce présentent généralement une imprégnation toxique bien plus importante que les échantillons ayant une mycoflore complexe. Par contre, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part par la compétition de substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine. Ainsi, la quantité d'aflatoxine B1 produite est réduite quand une souche d'*A. flavus* est introduite dans une culture en même temps qu'une souche d'*A. parasiticus* (**Pfohl – Leszkowicz, 2001**). La culture simultanée d'*A. parasiticus* et d'*A. flavus* ne modifie pas la production d'AFs par ce dernier, alors que la présence des espèces de *Penicillium* diminuent la production de cette mycotoxine (**Mislivec et al., 1988**). Dans le même esprit, la production d'AFs par *A. flavus* est inhibée par la présence d'*A. niger* (**Horn et Wicklow, 1983**). **Bouraima et al. (1993)** ont rapporté une compétition entre *A. flavus* et *A. ochraceus*. La présence de ces deux champignons conduits essentiellement vers la production de l'aflatoxine, les ochratoxines sont très peu produites ou totalement absentes. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que dans la biogénèse des aflatoxines, *A. flavus* utilise la phénylalanine du support sur lequel il se développe. Lorsqu'il est plus abondant, il détournerait à son profit toute la phénylalanine ; l'OTA, un analogue de la phénylalanine ne pourrait alors être produit.

I.5. Impacts Sanitaire Et Economique :

La contamination des aliments par des mycotoxines peut provoquer un certain nombre de maladies. Il peut y avoir un effet spécifique toxique sur un organe bien déterminé, cependant la plupart provoquent des lésions graves d'un seul tissu ou de plusieurs tissus. Les organes et tissus cibles sont très divers : foie, reins, peau, système immunitaire, système nerveux, glandes endocrines, etc. D'autres effets tels les gastro-entérites, les hémorragies et les paralysies peuvent également apparaître. **Le tableau3 :**

représente certains organes cibles des mycotoxines (**Dragacci et al., 2005**).

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

- Les mycotoxines mutagènes ;
- Les mycotoxines cancérogènes ;
- Les mycotoxines tératogènes

D'autres effets tels les gastro-entérites, les hémorragies et les paralysies peuvent également apparaître. **Le tableau3 :**

Tableau3. Organes cibles des mycotoxines (**Dragacci et al., 2005**).

Mycotoxines	Foie	reins	Système nerveux	Glande endocrines	peau	Système immunitaire
Aflatoxines	+	+	+	+	-	-
Ochratoxines	+	+	+	-	-	+
Trichothécènes	-	-	+	-	+	+
Trémorgens	-		+	-	-	-
Acide cyclopiazonique	+	+	+	-	-	-
zéaralénone	-	+	-	+	-	-

+ : Présence, - : Absence

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

- La perte de la qualité marchande des produits agricoles ;

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

I.6. Réglementation des mycotoxines:

Plusieurs pays ont établi ou proposé des limites réglementaires concernant les mycotoxines dans les aliments. Depuis 1974, certains pays de l'UE ont arrêté des taux limites d'aflatoxines. En mars 1999, en collaboration avec l'OMS, La FAO a parrainé la 3ème conférence mondiale sur les mycotoxines. La conférence a été organisée pour sensibiliser les décideurs aux risques sanitaires et aux effets économiques potentiels de la contamination des denrées alimentaires et des produits d'alimentation animale, et de promouvoir l'harmonisation des réglementations et les procédures de contrôle et pour recommander des stratégies permettant d'évaluer, de prévenir et de lutter contre la contamination par les mycotoxines. Les pays de l'Union européenne ont édité un règlement CE 98 pour limiter la présence des mycotoxines dans l'alimentation humaine. Ce règlement a été révisé plusieurs fois et chaque année la commission européenne publie ces réglementations d'une manière régulière, le dernier portant le N° CE1881/2006 date du 19 décembre 2006. le tableau 4 représente les teneurs maximales en mycotoxines exprimées en µg/kg autorités par les pays de l'Union Européenne.

Tableau4. Teneurs maximales en mycotoxines exprimées en µg/kg autorités par les pays de l'Union Européenne (**Règlement 1881/2006/CE**).

Mycotoxine	Limites maximales européennes(µg/kg	Matrice alimentaire
AFB1	2	Céréales et dérivés
AFT*	4	Céréales et dérivés
AFM1	0,05 0.025	Lait et dérivés Lait pour nourrissons
AFB1	5	Epices
AFT*	10	Epices
OTA	2 5 3 10 10 0.5	Vins et boissons Céréales Dérivés de céréales Raisins secs Café soluble instantané Dérivés de céréales pour nourrissons
ZEA	100 200 50 20	Céréales Maïs brut Pain Dérivés de céréales pour nourrissons
Fumonisines	2000 1000 200	Maïs brut Farine de maïs Dérivés de maïs pour nourrissons

AFT* : la somme des 4 AFs (B1+B2+G1+G2).

Chapitre II Les champignons producteurs d'aflatoxines

II. Les champignons producteurs d'aflatoxines

II.1. Classification des champignons

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

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

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

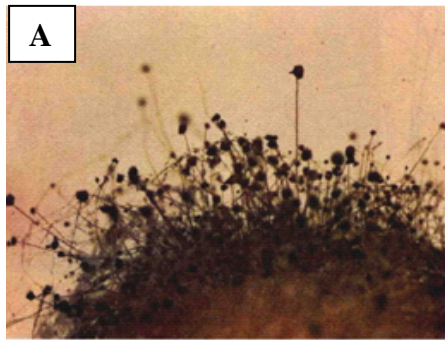
Les *Deuteromycota* ou deutéromycètes "Champignons imparfaits" se reproduisent uniquement par voie végétative ne sont plus reconnus en tant que division autonome.

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

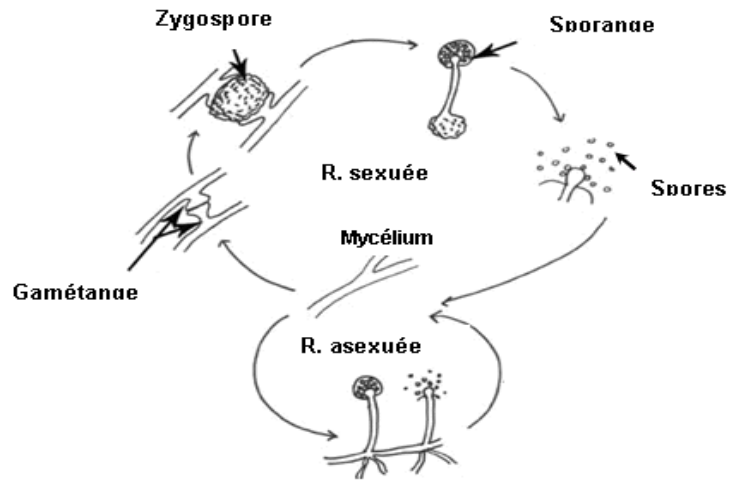
- soit les données biochimiques ou moléculaires permettent d'attribuer ces champignons imparfaits à l'un ou l'autre de ces groupes ;
- soit on les conserve provisoirement dans un ensemble artificiel (sans valeur hiérarchique dans la systématique) dénommé "ensemble des champignons mitotiques".

II.2. Identification des moisissures

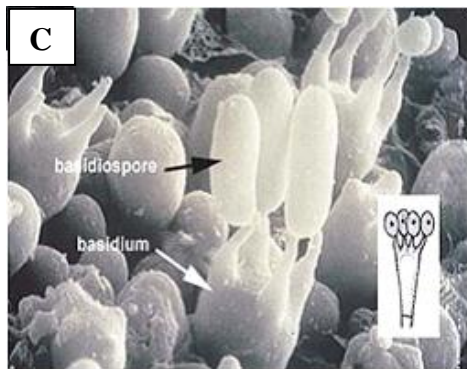
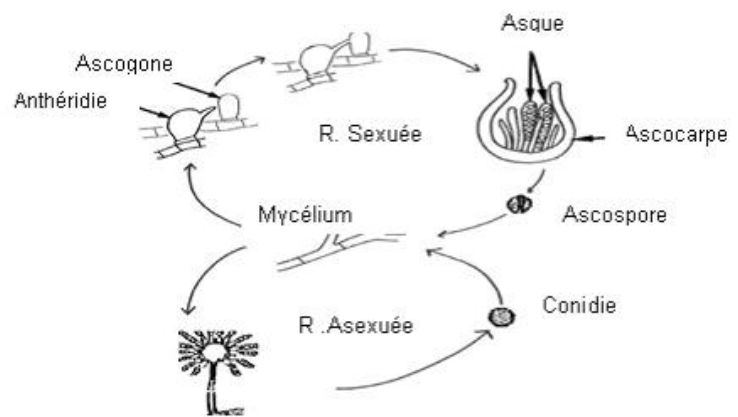
L'identification des espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments est basée sur la comparaison des critères d'ordre morphologique (Caractères macroscopiques, et microscopiques), chimiotaxonomie, et écologique, après leur culture sur différents milieux appropriés (**Guarro et al., 1999**).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



Mucor



Aspergillus sp



Melanogaster sp

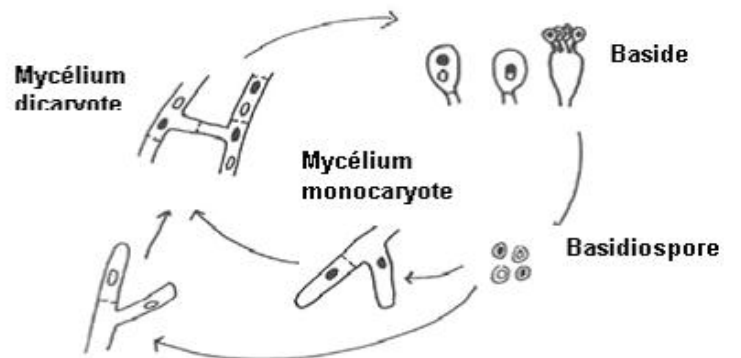


Figure 01. (A): Les zygomycètes, (B): Les ascomycètes, (C): les basidiomycètes (Azzoune 2009)

II.2.1. Caractères morphologiques

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

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

II.2.2. Caractères chimiques

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

II.2.3. Caractères moléculaires

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

II.3. Le Genre *Aspergillus*

II.3.1. Définition

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

Les mycotoxines produites par ce genre fongique, seules les aflatoxines (AFs), les ochratoxines (OTA) et la patuline. Ces mycotoxines ont été identifiées la première fois chez *A. flavus*, *A. ochraceus* et *A. clavatus*, respectivement (**Smith et Moss, 1985**). Actuellement ces toxines peuvent aussi être produites par plusieurs autres espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Seule une partie de ces champignons mycotoxinogènes peut présenter un risque, car les autres n'en produisent que de très faibles quantités de toxines ou bien elles sont rarement rencontrées dans l'alimentation (**Pitt, 2000**).

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

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

II.3.2.1. Description macroscopique d'*Aspergillus*

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

a)- L'aspect de la colonie : la couleur de la partie aérienne est le premier critère de base qui permet de distinguer les espèces du genre *Aspergillus*. Les *Aspergillus* présentent une

croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-30°C ; les espèces thermotolérant (*A.fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C (**Badillet et al., 1987 ; Morin, 1994**). La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : gris-vert pour *Aspergillus* section *Fumigati*, vert-jaune pour *Aspergillus* section *Flavi*, brun cannelle pour *Aspergillus* section *Terrei*, jaune à ocre pour *Aspergillus* section *Circumdati*, noir pour *Aspergillus* section *Nigri* et blanche pour *Aspergillus* section *Candidi*

b)- La texture de la colonie qui peut être floconneuse, veloutée, etc. Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses.

c)- Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette, et Bussieras, 1993). Il peut parfois être caractérisé une espèce.

d)- La production des sclérotés : certaines espèces d'*Aspergillus* ont la capacité de former des amas mycéliens compacts, souvent durs, globuleux, ellipsoïdaux ou allongés, appelés sclérotés, qui aident le champignon à survivre dans des conditions hostiles (**Wicklow et Shotwell, 1983**). Les sclérotés ont de forme, de taille, et de couleur caractérisée.

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

II.3.2.2. Description microscopique d'*Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (**Figure 2**) (**Raper et Fennell, 1965**). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir. L'ensemble vésicule + métules + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*.

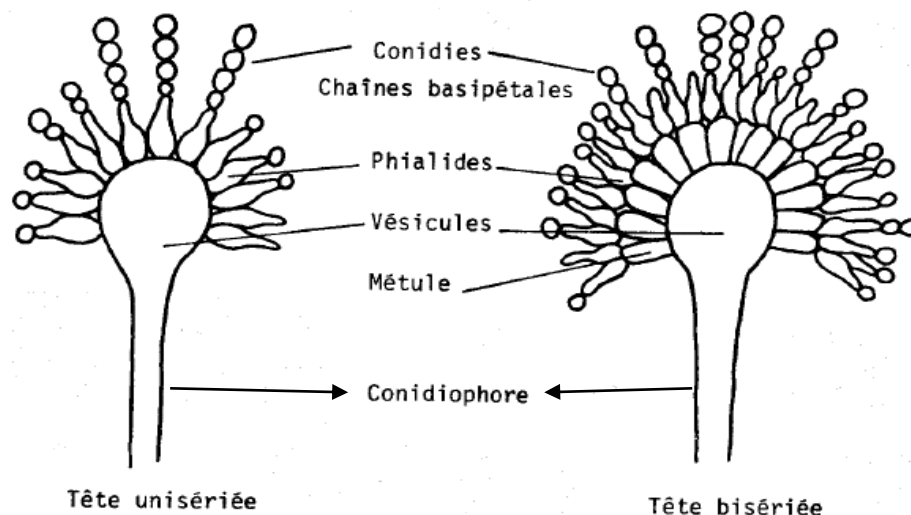


Figure 2. Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Azzoune 2009)

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

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

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

Les résultats ont montré que des espèces phylogéniquement éloignées peuvent produire les mêmes mycotoxines (Varga et al. 2003, Samson et al., 2006). En effet, dans les conditions de laboratoire, les AFs, l'OTA et la patuline sont produites par des espèces appartenant à des sections différentes. Sur la base de ces observations, il est permis de penser

que le pouvoir producteur de mycotoxines serait perdu ou acquis plusieurs fois au cours de l'évolution.

II.3.4. *Aspergillus* section *Flavi* :

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

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

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

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

La taxonomie des espèces de la section *Flavi* est compliquée de part la grande similarité qui existe entre elles et en vue l'instabilité des différents caractères morphologiques qui caractérisent chacune d'elle. Donc, morphologiquement, il est très difficile de distinguer entre les différentes espèces appartenant à la section *Flavi*, c'est pourquoi la taxonomie de ce

genre est actuellement basée sur une approche polyphasique (**Frisvad, et al.,2004**). et sur les caractères moléculaires (séquençage de la région ITS1-ITS2, et β - tubilines). Ainsi, la caractérisation de certaines espèces nécessite l'étude des conditions de croissance, et du profil métabolique cité plus haut, Dans les derniers travaux réalisés par **Pildain et al. (2008)**, 12 métabolites ont été étudiés pour distinguer entre les différentes espèces du genre *Aspergillus* section *Flavi*. Ces métabolites sont: AFB1, AFG1, CPA, acide aspergillique, asperfurane, parasiticolides, chrysogine, aflavarines, paspalinine, aflatrems, nominine et l'acide Kojique (**Tableau 05**).

Tableau 05. Production d'AFs B et G, de CPA et d'autres métabolites par les espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (D'après Pildain et al., 2008).

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

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

L'analyse des séquences ITS des isolats a montré qu'*Aspergillus* section *Flavi* forme 3 clades (*A. alliaceus*, *A. flavus*, et *A. tamarii*) qui peuvent être distingués par la couleur des colonies et leur composition en ubiquinones (Rigó et al., 2002; Samson et al., 2006). On peut distinguer morphologiquement deux catégories d'isolats d'*A. flavus*. La première catégorie produit des grands sclérotés, de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400 µm. La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de type « S » (Small), de diamètre inférieur à 400 µm (Cotty, 1989). Selon Geiser et al. (1998, 2000), et Vaamonde et al. (2003), *A. flavus* est divisé en deux groupes non distincts morphologiquement.

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

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

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

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

II.3.5. 1. *Aspergillus flavus*

Etant donné sa dominance et son importance dans la production d'aflatoxines, nous décrivons ci-après les caractères d'*A. flavus*. Cette espèce se caractérise par un thalle vert jaune à vert olive, floconneux, plus dense vers le centre, lâche en périphérie. Des colonies granuleuses sur Malt Agar (MA) montrant un revers incolore à beige clair, fertile sur toute la surface alors que sur milieu Agar (AFPA), un revers orange caractéristique est observé. Les têtes aspergillaires ont une vésicule hémisphérique (25 à 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 (6-10 µm x 4-5.5 µm) 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. Morphologiquement, on peut distinguer deux catégories d'isolats. La première

catégorie produit les sclérotés, de type « L » et la seconde catégorie produit les sclérotés de type « S ».

II.3.5. 2. *Aspergillus parasiticus*

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

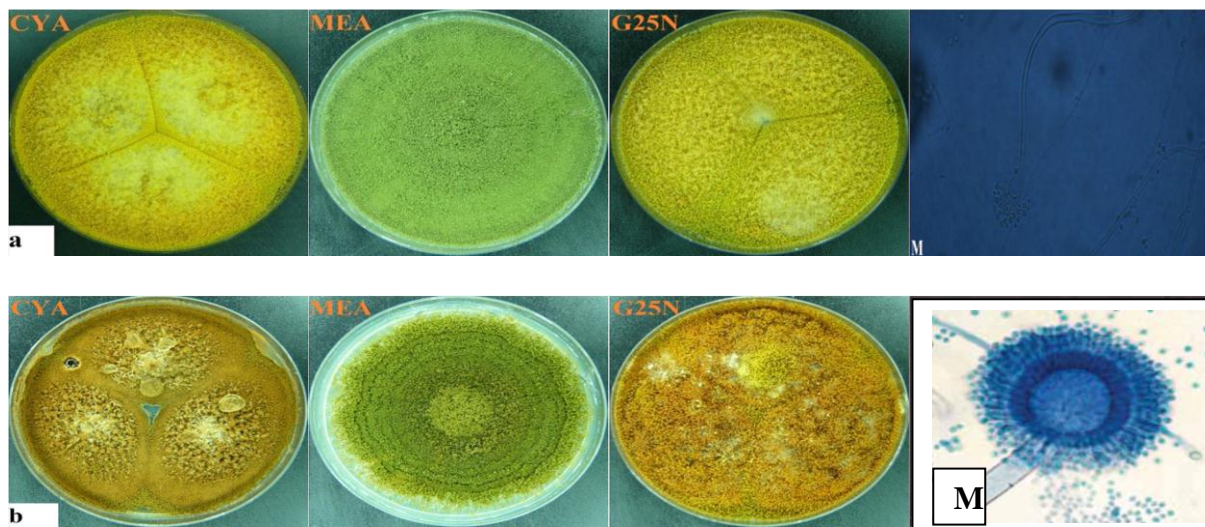


Figure 03. Photo des espèces : (a) *Aspergillus parasiticus*, et (b) *A. flavus* sur les milieux standards d'identification au 7ème jour, milieu CYA : Czapek yeast extract agar, 37°C ; milieu G25N : 25% glycerol nitrate agar, 25°C ; milieu MEA : Malt extract agar, 25°C ; (M) aspect microscopique d'*Aspergillus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

Chapitre III Les aflatoxines

III. Les aflatoxines

III.1. Origine

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

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

III.2. Structures et propriétés physico-chimiques

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

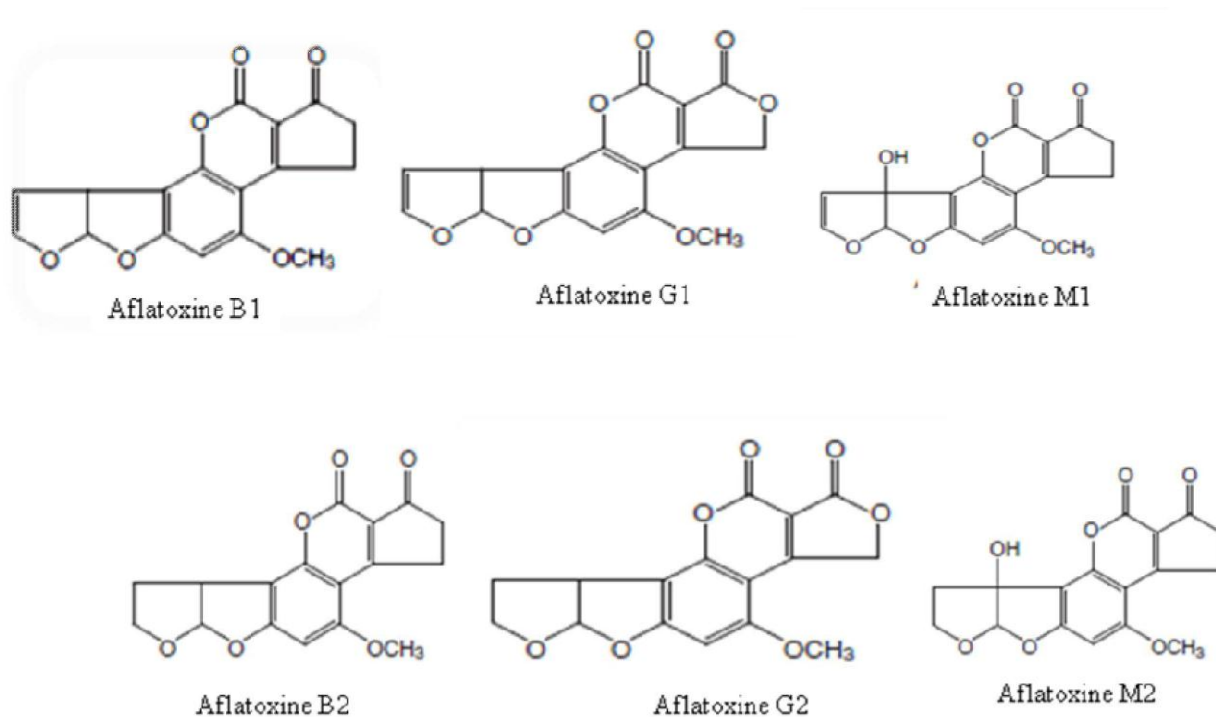


Figure4 .Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2 (**Duttonetal., 1985**).

Les AFs sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), leur stabilité est très variée : dans l'eau elles sont généralement peu solubles (10–20 mg /L) présentant une instabilité totale dans les solvants non polaires (Cole et Cox, 1981). Par contre elles sont très solubles dans les solvants organiques de polarité moyenne (CHCl₃, CH₃OH, DMSO) (**Cole et Cox, 1981**).

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous la lumière ultra-violette. La fluorescence intense des AFs, une fois exposées à des longueurs d'ondes ($\lambda = 365$ nm) de la lumière ultra-violette (U.V.), a pour avantage de détecter ces composés à des niveaux extrêmement bas (de l'ordre du nanogramme). L'aflatoxine de type B (AFB=AF <Bleue>) donne une fluorescence bleue, l'aflatoxine de type G (AFG=AF <green>), donne une fluorescence verte et l'aflatoxine M1 donne une fluorescence bleu-violette, cette fluorescence fournit la base pour pratiquement toutes les méthodes physico-chimiques de leur détection et leur quantification.

Les AFs se trouvent instables sous la lumière ultraviolette en présence d'oxygène avec des pH extrêmes (pH<3 ou pH>10). Par oxydation le cycle lactone des AFs devient sensible à une hydrolyse alcaline, mais en cas de neutralisation, il peut se reformer. (Cole et Cox, 1981). Les AFs sont aussi dégradés par l'ammoniaque (NH₄OH) et l'hypochlorite de sodium

(NaOCl). Lors de cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B1 qui est directement génotoxique (Cole et Cox, 1981). Les propriétés physico-chimiques des principales AFs sont récapitulées dans le **tableau6**.

Tableau6. Propriétés physico-chimiques des principales aflatoxines .

Aflatoxine	Formule brute	Masse molaire	Point de fusion	Absorption maximale a la lumière UV dans le méthanol	
				Coefficient d'extinction molaire à 265 nm	à 360- 362 nm
B1	$C_{17}H_{12}O_6$	312,3	268– 269	12 400	21800
B2	$C_{17}H_{14}O_6$	314,3	286– 289	12 100	24000
G1	$C_{17}H_{12}O_7$	328,3	244– 246	9 600	17700
G2	$C_{17}H_{14}O_7$	330,3	237– 240	8 200	17100
M1	$C_{17}H_{12}O_7$	328,3	299	14 150	21250
M2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	293	12 100 (264 nm)	22900(375nm)
Aflatoxicol	$C_{17}H_{14}O_6$	314	230– 234	10 800 (261 nm)	14100 (325 nm)

III.3. Contamination en AFs des denrées alimentaires

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

III.4. Les facteurs influençant la teneur en AFs dans les denrées alimentaires

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

- une activité en eau ($a_w > 0,83$) ;
- une température comprise entre 25 et 40 °C. ;
- la présence d'oxygène ;
- le développement du champignon sur des plantes stressées ;
- la présence d'insectes et de graines abîmées ;

- le stockage en milieu chaud et humide. (Zinedine, 2009).

III.5. Profil toxicologique des aflatoxines

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

- **hépatotoxiques** : Chez l'homme, les risques liés à la consommation d'AFs ont été bien étudiée et l'Agence Internationale de Recherches sur Le Cancer (AIRC) a classé l'AFB1 comme agent cancérogène du foie (Wogan, 2000).
- **Tératogènes** : les aflatoxines sont tératogènes à une dose de 4mg/kg de poids corporel. Durant la gestation, elle conduit à une forte proportion de malformations, voire à des avortements. (Arora et al., 1981).
- **Immunotoxicité** : les études ont démontré que des doses relativement importantes en aflatoxine (0,3 - 6 mg / kg de poids corporel), provoquent une dépression de la réponse immunitaire. L'AFB1 supprime l'activité du complément C4 et diminue la production des interleukines. Elle provoque aussi une hypoplasie du thymus (Pier et al., 1980). Une exposition à de faibles doses chroniques d'AFB1 augmente la sensibilité de l'individu aux infections (Jakab et al., 1994).
- **Génotoxicité et Mutagénicité** : L'adduction des aflatoxines au niveau cellulaire se fait, soit à l'ADN d'origine animale ou humaine, soit à des oligonucléotides. Le site privilégié d'adduction est la guanine (Kumagai et al., 1995). D'autres études effectuées sur le rat ont montré également que l'aflatoxine se lie à l'albumine plasmatique (Wild et al., 1986).

III.6. Réglementation des aflatoxines

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

produits alimentaire à large consommations et d'origine de l'importation c'est pour cela qu'ils ont fixées les teneurs maximales de l'aflatoxine B1 de 20 µg/Kg dans les arachides et les amandes car ils sont la base de fabrication de beaucoup de gâteaux traditionnelles et de confiseries utilisés par les familles algérienne aux différents occasions des cérémonies et fêtes religieuse. Les limites maximales tolérées d'aflatoxines dans les produits d'alimentations humaine et animale en Algérie (FAO, 2004) sont données dans le **tableau7**.

Tableau 7. Limites réglementaires algériennes des AFs dans les produits d'alimentations humaine et animale (données de 2003), (F.A.O, 2004)^a.

Produits	Somme des Mycotoxines	Limite (µg/kg)	Méthode d'échantillonnage	Méthode d'analyse
Produits d'alimentation humaine				
Arachides, fruits à coque, céréales	Aflatoxine B1	10	Non officielle	Officielle (DZ ₁) ^b
	AFs B1, B2, G1 et G2	20		
Produits d'alimentation animale				
Aliments pour bétail	Aflatoxine B1	20	Non officielle	Officielle (DZ ₂) ^c

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

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

Chapitre IV Matériel et méthodes

IV.1. Matériel

Le matériel utilisé au cours de cette étude est divisé en trois (03) catégories :

IV.1.1 Les échantillons d'amandes

Les denrées alimentaires ayant fait l'objet d'analyse fongique et aflatoxinogène sont : les amandes décortiquées importées, décortiquées locales, et non décortiquées locales commercialisées en Algérie. Les variétés d'amandes commercialisées dans le marché local sont :

- Amandes décortiquées (sans la coque) importées d'Etats-Unis (amandes de Californie) ;
- Amandes décortiquées (sans la coque) blanchies importées (amandes de Californie);
- Amandes décortiquées (sans la coque) locales;
- Amandes non décortiquées (avec la coque). locales

IV.1.2. Milieux de culture

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

- Milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar) (**Raper et Fennell, 1965**) (pour la conservation des isolats).
 - Milieu DRBC (Dichloran, Rose Bengal, Chloramphénicol) (**King et al., 1979**) (pour les isolements).
 - Milieu CYA (Czapek, Yeast, Agar) (**Pitt et Hocking, 1997**) (pour l'identification et la production des sclérotés et PCA).
 - Milieu CAM (Coconut Agar Medium) (**Davis et al., 1987**) (pour la production d'AF).

NB: La composition de ces milieux de cultures est donnée en annexe I.

IV.1.3. Souches de références

Les études du pouvoir producteur d'aflatoxines des isolats a nécessité l'utilisation des 2 souches de références : *Aspergillus flavus* NRRL 3251^T et *A. parasiticus* CBS 100926^T, fournies par le laboratoire de recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse (LPBVB) de Kouba Alger.

IV.1.4. Appareillage, produits chimiques et standards analytiques

Les appareils, les produits chimiques et les standards analytiques utilisés dans cette étude sont donnés en annexe II.

IV.2. Méthodes

IV.2.1 Collections des échantillons

Au cours de cette étude, un total de 12 échantillons d'amandes décortiquées et non décortiquées importées et locales ont été collectés au niveau des marchés de (03) régions en Algérie (Blida, Médéa, et Tipaza). Chaque échantillon est constitué de 1Kg d'amandes collectées. Les échantillons ont été prélevés aléatoirement durant la période allant du début de Février au mois de Mars de l'année 2016.

Avant toute analyse, il convient de prélever un échantillon représentatif du produit à analyser. En général, sur les produits secs, granuleux et pulvérulents, la microflore est toujours répartie de façon très hétérogène (**Dunoyer, 1989**).

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

- Prises d'échantillons avec des instruments stériles (une sonde) à cet effet pour atténuer les risques de contamination ;
- Mise de l'échantillon dans des récipients ou sachets stériles ;
- Respect des règles d'hygiène générale pour la personne effectuant le prélèvement ;
- Rapidité de l'acheminement des échantillons dans l'attente de leurs analyses ;
- Conservation des échantillons dans un endroit frais et sec (8 à 15°C) mais jamais à des températures négatives (**Dunoyer, 1989**) (**Sutra et al 1998**).
- Les échantillons doivent être prélevés rigoureusement au hasard, en évitant les prélèvements systématiques, il faut prélever à partir de la surface, des couches profondes, et sur les cotés du compartiment de stockage.

Chaque échantillon prélevé dont la taille de 1 kg a été acheminé immédiatement au laboratoire dans des sachets en papier fermés, et étiquetés. Le **tableau 08** représente les différentes variétés d'échantillons, code, provenance, date de prélèvement, poids, lot, et nombre de chaque échantillon.

IV.2.2 Préparation des échantillons

L'échantillon reçu par le laboratoire doit être utilisé dans sa totalité pour l'homogénéisation optimale. L'échantillon doit être broyé finement, et soigneusement aussi il doit être mélangé pour avoir un échantillon représentatif. Les échantillons d'amandes non décortiquées ont été décortiqués. Il convient d'éviter autant que possible la lumière du jour au cours de l'opération, car l'aflatoxine se décompose progressivement sous l'influence de la lumière ultraviolette.

Tableau 08. Liste des échantillons analysés.

les variété d'amandes	Code	Provenance	Date de prélèvement	Pois	Lot	NE ^a
Amandes décortiquées importées d'Etats- Unis	A	Marché de la ville de Blida	31/01/2016	1kg	Sachet en plastique dans un carton de 25 kg	3
	B	Marché de la ville de Médéa	08/02/2016	1kg		
	C	Marché de la ville de Tipaza	08/02/2016	1kg		
Amandes décortiquées blanchies importées d'Etats-Unis	D	Marché de ville de Médéa	08/02/2016	1kg	Sachet en plastique dans un carton de 25 kg	3
	E	Marché de la ville de Blida	23/02/2016	1kg		
	F	Marché de la ville de Tipaza	23/02/2016	1kg		
Amandes locales décortiquées	G	Marché de la ville de Médéa	08/02/2016	1kg	Récipient en plastique de 10 kg	3
	H	Marché de la ville de Blida	21/02/2016	1kg		
	I	Marché de la ville de Tipaza	28/02/2016	1kg		
Amandes non décortiquées locales	J	Marché de ville de Médéa	28/02/2016	1kg	Récipient en plastique 10 kg	3
	K	Marché de la ville de Blida	06/03/2016	1kg		
	L	Marché de la ville de Tipaza	08/03/2016	1kg		
Nombre total d'échantillons collectés						12

NE_a : Nombre d'échantillons collectés de chaque type

IV.3. Isolement et identification de la flore fongique

IV.3.1. Isolement et dénombrement de la flore fongique

Les isolements des moisissures dans les échantillons ont été réalisés selon la technique des suspension-dilutions et ensemencement sur milieu gélosé DRBC. La composition de milieu gélosé DRBC est donnée en annexe I. Ce milieu permet d'inhiber la croissance des champignons envahissant tel que les mucors et les rizopus, et de réduire la taille de mycélium de façon à mettre en évidence la majorité des champignons contaminants le produit analysé (**Riba, 2008**). L'isolement des moisissures affectants les grains d'amandes, se fait par deux méthodes, méthode A pour isoler la flore fongique externe et interne, et la méthode B pour isoler la flore fongique interne.

IV.3.2. Méthode A pour isoler la flore fongique externe et interne

Cette méthode permet d'isoler la flore fongique se trouvant à l'intérieur, et à l'extérieur des grains. 10 g pour chaque échantillon de grains finement broyés sont mis dans un erlenmeyer stérile de 250ml contenant 90 ml d'eau stérile additionnés de Tween 80 à 0,005% (50 ul de tween par 5ml d'eau) et homogénéisé par agitation durant 15 min. Des dilutions décimales (10^{-2} , et 10^{-3}) sont réalisées à partir de la solution mère (10^{-1}). Un volume de 100ul de chaque dilution est ensemencé dans une boîte de Pétri contenant le milieu DRBC. (Figure 05). (**King et al., 1979**). Trois boîtes sont ensemencées pour chaque dilution.

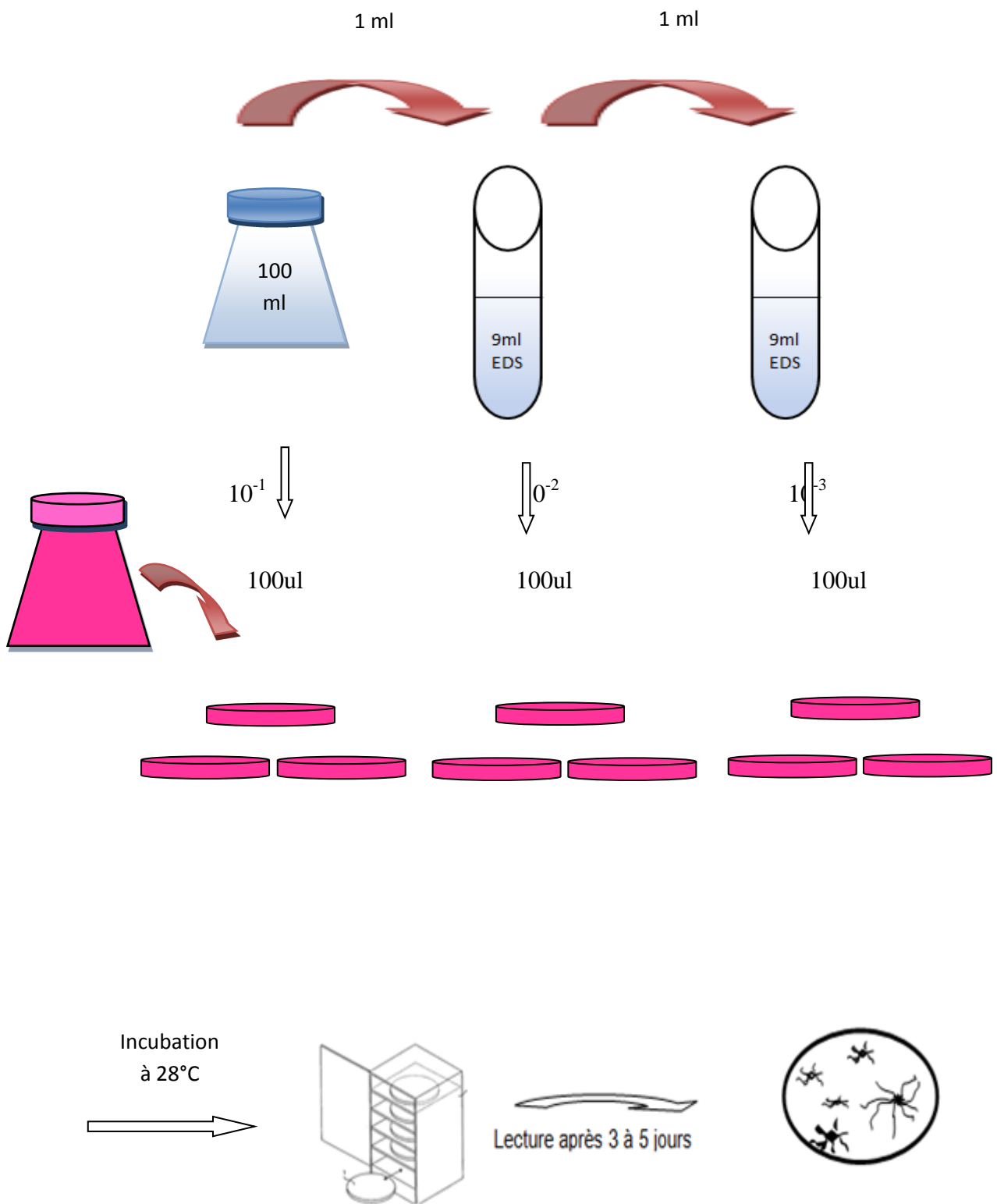


Figure 05: schéma représentatif de la technique des suspension-dilutions.

IV.3.3. Méthode B pour isoler la flore fongique interne (profonde)

Parallèlement à la détermination de la flore fongique externe et interne, nous avons analysé la flore fongique interne (contamination profonde). 10 g pour chaque échantillon de grains ont été désinfectés superficiellement trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (0,4%) pendant une minute à température ambiante, puis rincer plusieurs fois à l'eau distillée stérile, séchés à l'aide d'une compresse stérile (**Adjou, et Soumanou, 2013**). la technique des suspension-dilutions est réalisée selon les mêmes étapes que précédemment. Pour les 2 méthodes A, et B, l'incubation a lieu à 28 °C pendant 5 à 7 jours à l'obscurité. La numération est effectuée en choisissant les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 10 et 100 environ. Le nombre de moisissures est exprimé en colonies en formant une unité par gramme d'échantillon (cfu/g). Les moisissures qui se sont développées sur les différents milieux de culture ont été purifiées par repiquages répétés dans des tubes à essai contenant le milieu PDA (Potato, Dextrose, Agar) (**Raper et Fennell, 1965**) dont la composition est donnée en annexe I. Après incubation de 7 à 10 jours à 28 °C, les isolats sont conservés à + 4 °C pour les analyser ultérieures. Les cultures pures de moisissures ont été examinées macroscopiquement et microscopiquement

IV.3.4. Identification morphologique des isolats fongiques

La découverte des principaux genres et espèces fongiques tient par l'observation des caractères macromorphologiques et micromorphologiques. L'étude des caractères macro et micromorphologiques des moisissures isolées est effectuée sur milieux gélosé (CYA) (**Pitt et Hocking, 1997**). Identification macro et microscopique a été réalisée à l'aide du schéma taxonomique en utilisant la méthode décrite par **Singh et al. (1991)**, **Filtenborg et al. (1995)** et **Tabuc (2007)**

IV.3.4.1 Identification macroscopique

L'observation des colonies des champignons qui se sont développés se fait tout d'abord à l'oeil nue puis à la loupe binoculaire dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus* section *Flavi*. Parmi les champignons en croissance, les moisissures de genre *Aspergillus* section *Flavi* sont repérées visuellement à la surface de la gélose par leurs formes et leurs couleurs, et leurs textures caractérisées.

La production de sclérotés par les *Aspergillus* section *Flavi* est un caractère taxonomique important pour distinguer certaines espèces de cette section. La production de sclérotés 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 examiner sur milieu gélosé (CYA) à 28 °C à l'abri de la lumière. La production des sclérotas est suivie périodiquement pendant 3 semaines. Le diamètre des sclérotas est mesuré en déposant ces derniers sur un morceau de papier millimétré placé dans un couvercle d'une boîte de Pétri puis observés à l'aide d'une loupe binoculaire. Les isolats de morphotype « L » produisent des sclérotas de taille supérieure à 400 µm, généralement entre 500 µm et 800 µm. Par contre les isolats de morphotype « S » produisent des sclérotas de taille inférieure à 400µm, allant de 200 à 300 µm.

IV.3.4.2 Identification microscopique

L'observation microscopique se base sur l'aspect des vésicules, des métula, des phialides, le mode de groupement des conidies (spores), le mode de conidiogénèse, l'agencement des cellules conidiogènes, l'ornementation et la couleur des conidies. Cela se fait par deux méthodes :

- **Préparation microscopique**


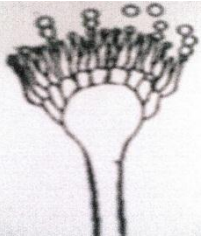
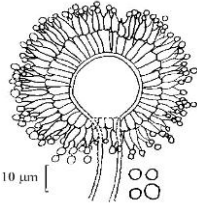
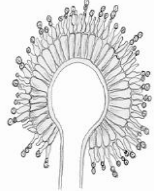
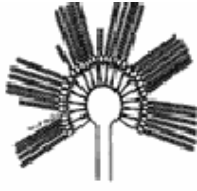


On utilise une aiguille d'inoculation pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. Puis déposées sur une lame « mouillées » avec une goutte d'eau puis on pose une lamelle de couverture. On procède ensuite à l'examen au microscope.

- **Préparation microscopique à l'aide d'un ruban adhésif transparent**

Une technique astucieuse peut parfois être utilisée. Elle consiste à effectuer le prélèvement à l'aide d'un morceau de ruban adhésif transparent que l'on plaque légèrement à la surface de la culture, puis que l'on colle sur une lame de microscope, l'observation microscopique se fait au grossissement x10 et x 40, Les renseignements retenus lors de l'observation macroscopique et microscopique sont notés pour arriver à une confirmation de leur identité (**Botton et al., 1985). Tableau 09.**

Tableau 09. Aspect macroscopique et microscopique des principales espèces fongiques

	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium sp</i>	<i>Mucor sp</i>
--	------------------------------	----------------------------	------------------------------	---------------------------	--------------------------	-----------------------	-----------------

Schéma							Absence de rhizoïdes 
Aspect macroscopique	velouté avec ou sans touffes blanches de mycélium aérien couleur Gris-bleuâtre	Beige à Cannelle Revers jaune à brun sale thalle velouté ou parfois floconneux	Aspect poudreux Vert jaune sombre	Surface poudreuse irrégulière Couleur jaune verdâtre thalle à revers incolore	granuleuse à broussailleuse couleur brun foncé noirâtre	Aspect velouté, blanche au début puis de couleur très variable, le plus souvent bleu vert Revers jaunes à oranges	Cotonneux Blanc gris clair puis foncé le port des hyphes est élevé Revers incolore
Aspect microscopique	Conidiophores Lisses, hyalins	Conidiophores Lisses, hyalins	Conidiophores Lisses, hyalins	Conidiophores hyalins, verruqueux et renflés en vésicule	Lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure	Conidiophores ramifiés, aspect en "pinceaux" phialides divergents à l'extrémité des ramifications	Thalle siphonné, pas de stolons et rhizoïdes Sporocystographores ramifiés

IV.3.4.3 Repiquage des souches d'*Aspergillus* sp et quelques *Penicillium* sp :

Le repiquage consiste à transférer aseptiquement la souche identifiée comme *Aspergillus* section *Flavi* sur un milieu PDA.

Après le repiquage, les cultures sont maintenues dans des tubes de PDA gélosé en pente, pendant 2 à 3 semaines à une température de 28°C, les isolats sont conservés à 4°C pour favoriser leurs viabilités et limiter les possibilités de variation.

IV.4. Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines

Les AFs possèdent une fluorescence propre qui permet de les détecter généralement dans l'U.V. lointain (365 nm). A cette longueur d'onde, elles sont fluorescentes : couleur bleue pour les AFB, verte pour les AFG et bleu-mauve pour l'aflatoxine M1.

Le screening des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs est réalisé par détection de la fluorescence à 365 nm sur milieu de culture à base de noix de coco CAM (Coconut Agar Medium), selon la technique décrite par **Davis et al.(1987)** et **Fente et al. (2001)**. La production d'AFs est ensuite confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM) selon **Calvo et al. (2004)**

IV.4.1 Détection de la fluorescence sur milieu de culture

Les souches fongiques sont ensemencées par le point central (1 souche par boîte) sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), favorable à la production d'AFs (**Fente et al., 2001**) additionné de 0,3% de β -cyclodextrine qui permet d'améliorer nettement l'intensité de la fluorescence. La β -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.

IV.4.2 Extraction des AFs du milieu de culture

En vue d'une confirmation de la production des AFs par la chromatographie sur couche mince (CCM), les cultures des isolats sur milieu CAM ont subi une extraction au chloroforme (ou le méthanol) selon la méthode décrite par **Calvo et al. (2004)**. Six rondelles de 10 mm de diamètre de milieu colonisé par le mycélium sont découpées à l'aide d'un emporte pièce du centre vers la périphérie de la boîte de pétri (60 mm de diamètre), les carottes découpées sont pesées puis introduites dans des tubes Eppendorf de 2 ml, l'extraction des aflatoxine est réalisée par l'addition de 1 ml de méthanol, toute en écrasant les morceaux de gélose afin de faciliter l'extraction. Après incubation pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours/min puis le surnageant est aspiré à l'aide d'une microseringue puis injecté dans un autre tube Eppendorf, le filtrat est conservé à l'abri de la lumière et à une température de +4 °C pour une analyse ultérieure.

IV.5.3 Détection et confirmation de la production d'AFs par CCM

Les extraits précédemment obtenus, sont analysés par la chromatographie sur couche mince (CCM). La méthode utilisée pour la détection des AFs par CCM est celle décrite par **l'A.O.A.C (Official Methods of Analysis) (2000)**. Elle est très utilisée pour la révélation des aflatoxines. C'est la méthode chromatographique de séparation la plus simple.

Elle consiste à déposer un aliquote de 10 à 15 µl de l'extrait à analyser sur les plaques (20 x 20 cm, 0,25 mm d'épaisseur) de gel de silice-60 254F (Merck). A cet effet, les spots (aliquotes) sont déposés à 2cm du bord. Dans chaque plaque 8 à 9 échantillons sont spotés, distancés de 2 cm. 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. Les solvants de développement sont le chloroforme et l'acétone (95:5 v/v).

IV.6. Préparation des plaques

Déposer 25g de gel de silice-60 254F (Merck) dans une fiole conique. Ajouter 60 ml d'eau, boucher et agiter énergiquement. Etaler à l'aide d'un étaloir régler la suspension sur les plaques de manière à obtenir une couche mince 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.

IV.6.1. Dépôt des extraits à analyser

- Tracer une ligne droite sur une plaque du deux cotés sur la même plaque de CCM
- A l'aide d'une seringue, déposer un aliquote de 10 à 15 μl sur la plaque de CCM à 2 cm du bord inférieur soigneusement en évitant d'abîmer la surface de la plaque. Ces précautions sont importantes pour l'obtention d'une bonne qualité de séparation des AFs. Sur une même plaque plusieurs échantillons peuvent être spotés avec des intervalles de 1,5 à 2cm.
- Un volume, de 15 μl d'une solution standard de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'AFB1 est spoté au même temps que les extraits des échantillons analysés, et un extrait d'aflatoxine G1, obtenu à partir d'*A. parasiticus* CBS 100926 a été utilisé comme témoin.
- 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 sèchechoir.
- 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 chloroforme/acétone (95 :5 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.
- Les AFs sont détectées en plaçant les plaques sous lumière U.V. (365 nm).

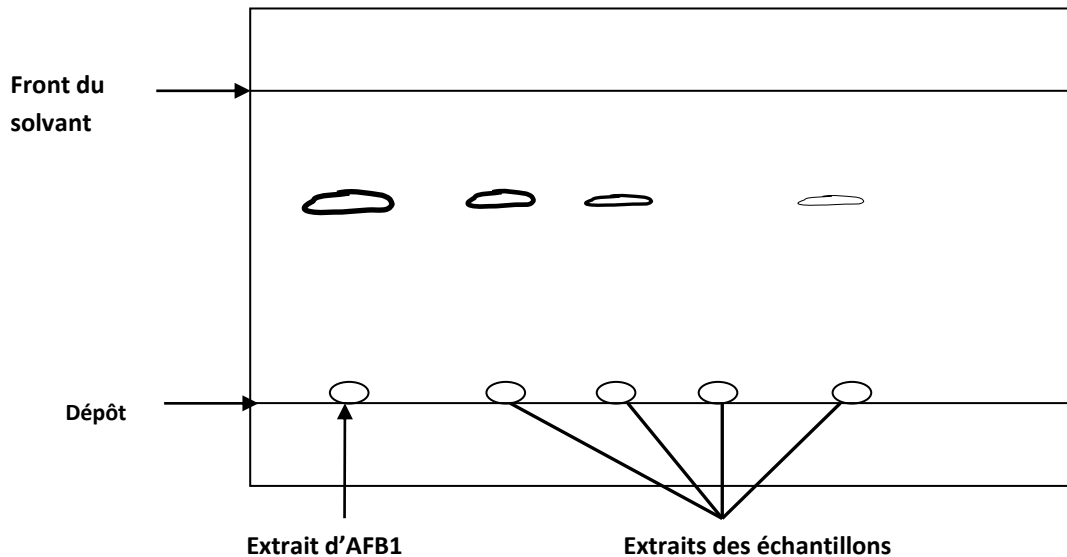


Figure 06. Représentation schématique d'un chromatogramme sur couche mince.

IV.6.2. Détection des aflatoxines sur CCM

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

IV.6.3. Analyse quantitative par estimation visuelle

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

Chapitre V Résultats Discussion

V.1. Résultats

V.1.1. La commercialisation d'amandes

V.1.1.1. La production d'amandes dans le monde

En 2004 on produisait 1,6 millions de tonnes d'amandes dans le monde. La production mondiale d'amandes augmente annuellement de 3%. Etats-Unis (Californie) est le premier producteur mondial avec 49 % de la production mondiale d'amandes, l'Espagne est le second producteur d'amandes (12%), l'Italie a égalité avec la Syrie: (7%) pour chaque pays. L'Iran occupe la 5ème place (avec 6%) Parmi les autres producteurs, on mentionne pour les pays méditerranéens : le Maroc (4%), la Tunisie (3%), la Grèce (3%), l'Algérie (3%) et la Turquie (3%). La production dans ces pays est généralement absorbée par leur consommation intérieure (FAO, 2004).

V.1.1.2. La Situation commerciale d'amandes en Algérie

V.1.1.2.1. La Production d'amandes en Algérie

La production d'amandes fraîches et sèches en Algérie est estimée plus de 5 millions quintaux entre l'année 2003 et 2013. Malgré le recul enregistré en 2007 (6,5%), et la légère baisse en 2011 (9,6%), la production d'amandes a doublé dans la période (2003 à 2013), elle a progressé régulièrement passant de 332340 quintaux avec un pourcentage de (6,3%) en 2003 à 635452 quintaux avec un pourcentage de (12%) en 2013. Ces chiffres sont publiés par le ministère de l'agriculture Algérien en 2014 présenter dans le tableau 10 Quantités d'amandes locales en (Qin) dans la période (2003 – 2013) en Algérie et figure 07 la Production d'amandes en Algérie dans la période (2003 – 2013).

Tableau 10. Quantités d'amandes locales en (Qin) dans la période (2003 – 2013) en Algérie
(Ministère d'Agriculture Algérien, 2014)

Année	Quantités d'amandes locales (Qin)
2003	332340
2004	379850
2005	453785
2006	536725
2007	341097
2008	395211
2009	473931
2010	569730
2011	506210
2012	664876
2013	635452
Total	5289207

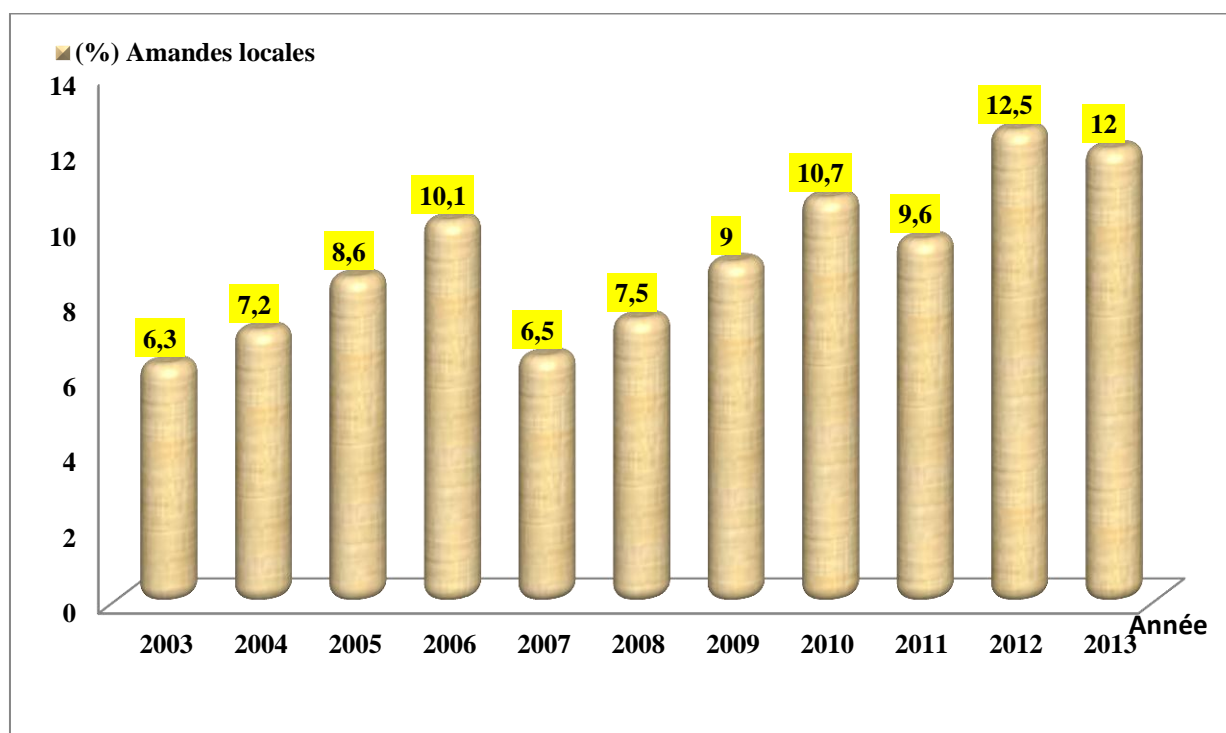


Figure 07.la Production d'amandes en Algérie dans la période (2003 – 2013)

V.1.1.2.2. L'importation d'amandes en Algérie

L'Algérie n'arrive pas à satisfaire la demande locale de consommation d'amandes, pour cette raison, elle importe ce produit. Selon le centre de l'informatique et des statistiques de Douane Algérien (CNIS), les importations d'amandes ont atteint plus de 600 000 quintaux entre l'année 2003 et 2013. Ces importations constituées exclusivement d'amandes sèches décortiquées, et non décortiquées. Les résultats montrent qu'après une période de perturbation entre 2003 (3,5%), et 2007 (5%), les quantités globales importées n'ont cessé d'augmenter à partir de 2007 jusqu'à 2013 (13,3%), La quantité la plus élevée a été enregistrée en 2010 (19,5%), néanmoins on constate une baisse durant l'année 2011(10,6%), et une reprise à partir de 2012 (14%). En dix ans, les importations d'amandes ont tout simplement doublé 2 fois de volume, elles passent de 21955 quintaux (3,5%) durant l'année 2003 à 85415 quintaux (13,3%) durant l'année 2013. Les Quantités d'amande décortiquées, et non décortiquées importées représentent (89,7%), et (10,3%) respectivement. Les résultats sont consignés dans le tableau 11 et la figure 08 .

Tableau 11 . Quantités d'amandes importées en (Qin) en Algérie dans la période 2003à 2013 (CNIS, 2014)

Année	Quantités d'amandes non décortiquées (Qin)	Quantités d'amandes décortiquées (Qin)	Quantités d'amandes importées globales (Qin)
2003	353	21602	21955
2004	13	32983	32996
2005	68	16050	16118
2006	0,3	33785,7	33786
2007	235	32403	32638
2008	1120	52071	53191
2009	633	83393	84026
2010	62093	62626	124719
2011	516	67436	67952
2012	1478	88490	89968
2013	190	85225	85415
Total	66699,3	576064,7	642764
	10,3%	89,7%	100%

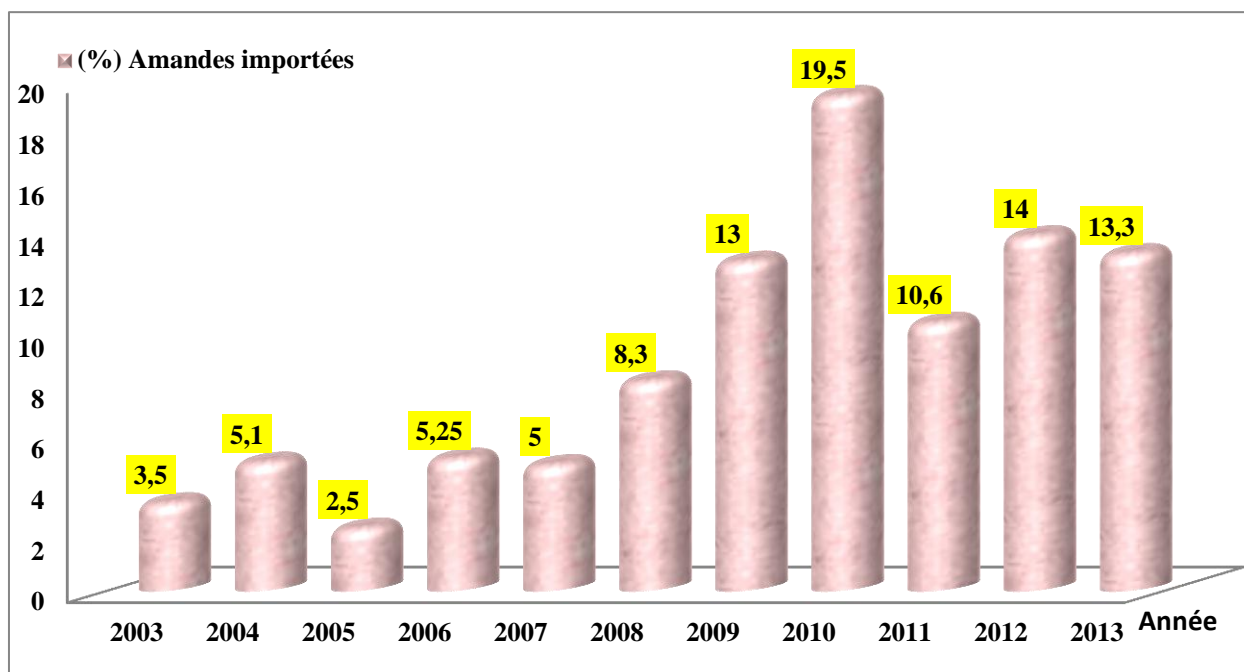


Figure 08. L'importation d'amandes en Algérie dans la période (2003 – 2013)

En outre, pour l'ensemble de la période de 2003 à 2013, l'Algérie a importé 542150 quintaux d'amandes des Etats-Unis qui représentent 93,5 % de toutes les amandes importées.

Les Etats-Unis est le premier pays fournisseur traditionnel d'amandes à l'Algérie. Ce pays dépasse ainsi très largement l'Espagne, dans la même période l'Espagne a exporté 16950 quintaux (2,9%) d'amandes vers l'Algérie, Les importations d'amandes en provenance d'autres pays ne dépassent pas 4%. Tableau 12

Tableau 12. Quantités d’amandes importées en fonction de pays exportateurs en (Qin) dans la période (2003 – 2013) en Algérie

Pays exportateur	Quantités d’amandes importées en (Qin)
Etats-Unis d'amerique	542150
Chine	438
Iran	224
Espagne	16950
Italie	3684
El salvador	177
Emirats arabes unis	1322
France	1097
Pays-bas	150
Turquie	4416
Moldavie	286
Bresil	96
Koweit	195
Syrie	162
Australie	4530
Inde	56
Suisse	68
Canada	1878
Maroc	1080
Malaisie	408

V.1.1.2.3. consommation d'amandes en Algérie

Même à un rythme ralenti, la consommation nationale d'amandes continue à progresser quel que soit la source d'approvisionnements (locaux ou importées). L'Algérie a consommé 5,9 millions de quintaux entre 2003 et 2013, durant cette période la consommation a doublé passant de 354295 quintaux avec un pourcentage de (6%) en 2003 à 720867 quintaux avec un pourcentage de (12%) en 2013. Les amandes importées, et locales consommées représentent (10,8%), et (89,2%) respectivement, donc une importance relative par rapport aux autres arachides, c'est ce qui justifie le choix de notre produit pour l'analyser. (Figure 09).

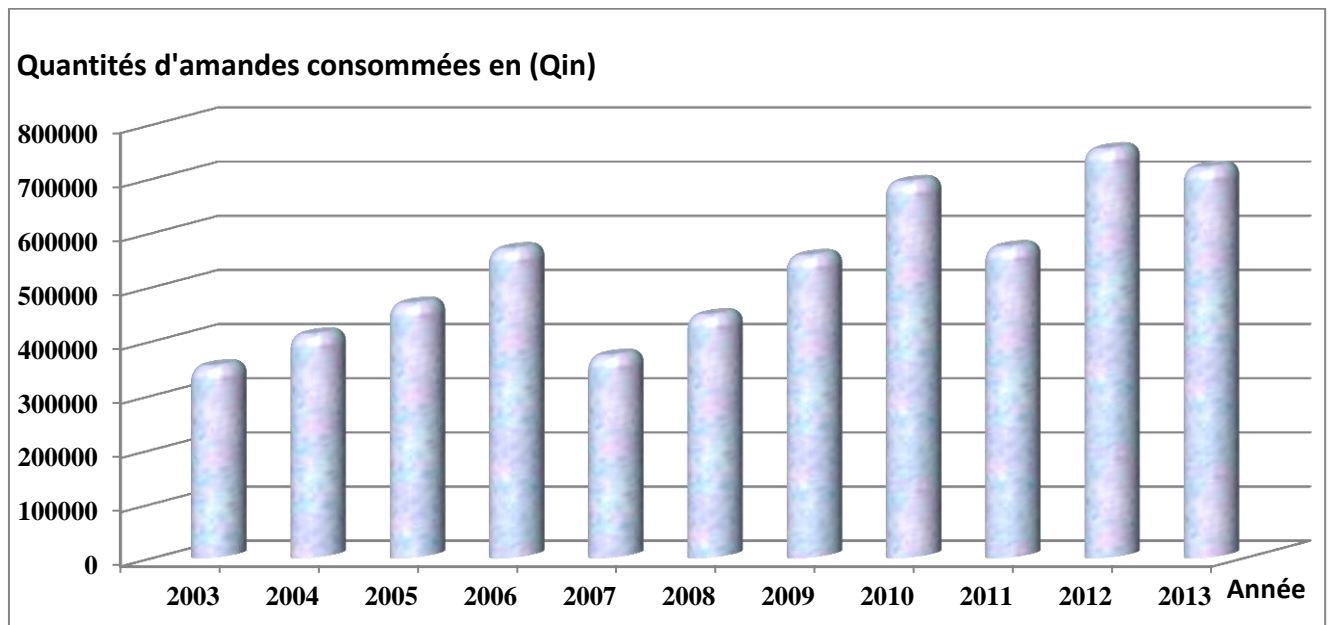


Figure 09. Consommation d'amandes en Algérie dans la période (2003 – 2013)

V.1.2. Analyse de la flore fongique totale et les principaux genres

V.1.2.1. Evaluation de la mycoflore dans des différentes variétés des amandes

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

Globalement, malgré l'apparence saine des quatre variétés des amandes analysées, et l'absence d'odeur moisi, l'étude de la qualité microbiologique a révélé la présence des

moisissures avec une nette dominance de cette dernière. Cette analyse fongique d'amandes locales et importées montre qu'un taux de contamination total diffère d'une variété à une autre. Les amandes locales présentent un taux de contamination considérablement élevé par rapport aux amandes importées, sachant que les amandes importées sont vendues emballées par des sachets en plastique dans des cartons, par contre les amandes locales sont vendues dans des récipients ouverts en plastique.

Le taux de contamination externe et profonde est compris entre $2,6.10^4$ et 396.10^4 cfu/g de produit. La variété d'amandes décortiquées locales s'avère la plus contaminée (396.10^4 cfu/g) (47,6%) par rapport aux autres variétés. Les amandes non décortiquées locales ont montrés également un taux de contamination élevé ($319,5.10^4$ cfu/g) (38,4%) malgré qu'elles sont protégées par la coque, cela peut expliquer par la durée du stockage qui peut aller jusqu'à un 1 an et plus, car les consommateurs préfèrent d'acheter les amandes importées.

La variété d'amandes décortiquées importées des Etats- Unis présente un taux accè un peu élevé (114.10^4 cfu/g) (13,7%), et la variété d'amandes décortiquées blanchies importées d'Etats- Unis s'est classée en troisième rang d'une contamination très faible ($2,6.10^4$ cfu/g) (0,3%) par rapport aux autres variétés. On remarque aussi que le taux de contamination de la variété d'amandes décortiquées importées des Etats- Unis est plus élevé 40 fois que celui de la variété d'amandes décortiquées blanchies importées des Etats- Unis. Les résultats sont consignés dans(**le tableau13**) et la (**figure 10**)

Tableau 13. Distribution de la flore fongique totale obtenus par la méthode A, et B dans les différentes variétés d'amandes analysées commercialisés en Algérie.

Les variétés des échantillons	Flore fongique totale (cfu/g) par la méthode A (grains désinfectés)	Flore fongique totale (cfu/g) par la méthode B (grains non désinfectés)
Amandes décortiquées importées des Etats-Unis	114.10^4	$0,048.10^4$
Amandes décortiquées blanchies importées des Etats- Unis	$2,6.10^4$	$0,035.10^4$
Amandes décortiquées locales	396.10^4	$0,035.10^4$
Amandes non décortiquées locales	$319,5.10^4$	$0,009.10^4$
Totale	832.10^4	$0,127.10^4$

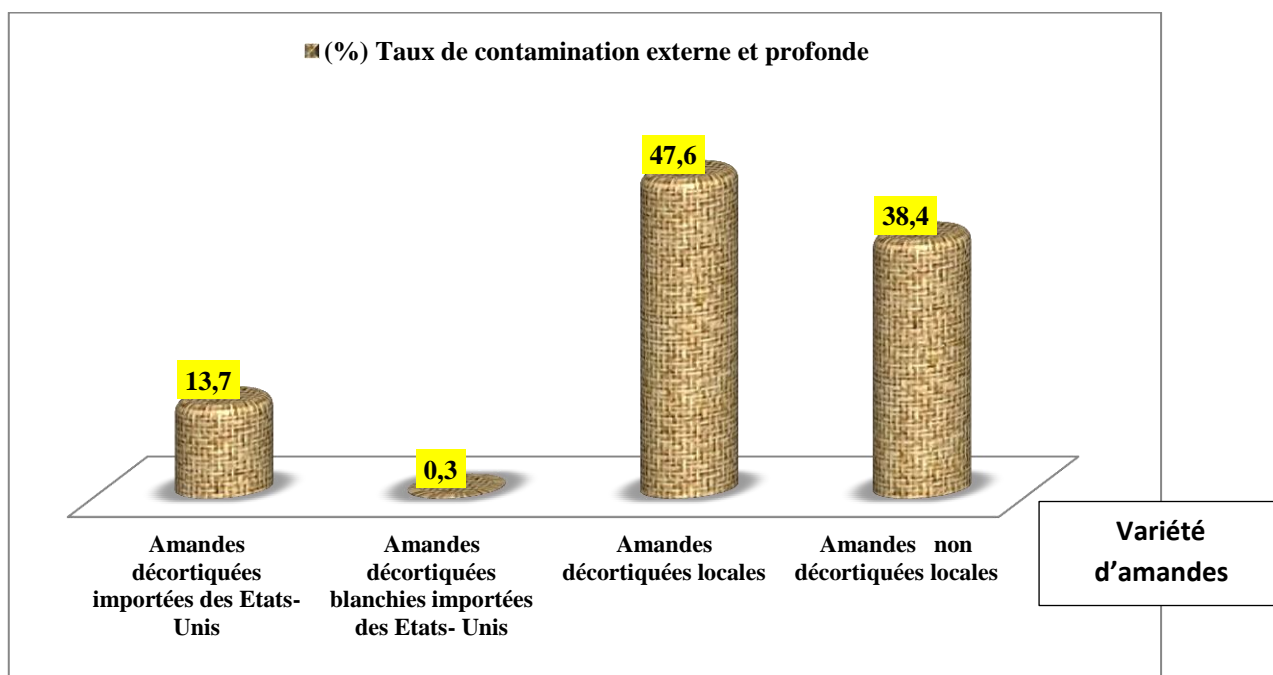


Figure 10. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A) de chaque variété d'amandes analysées.

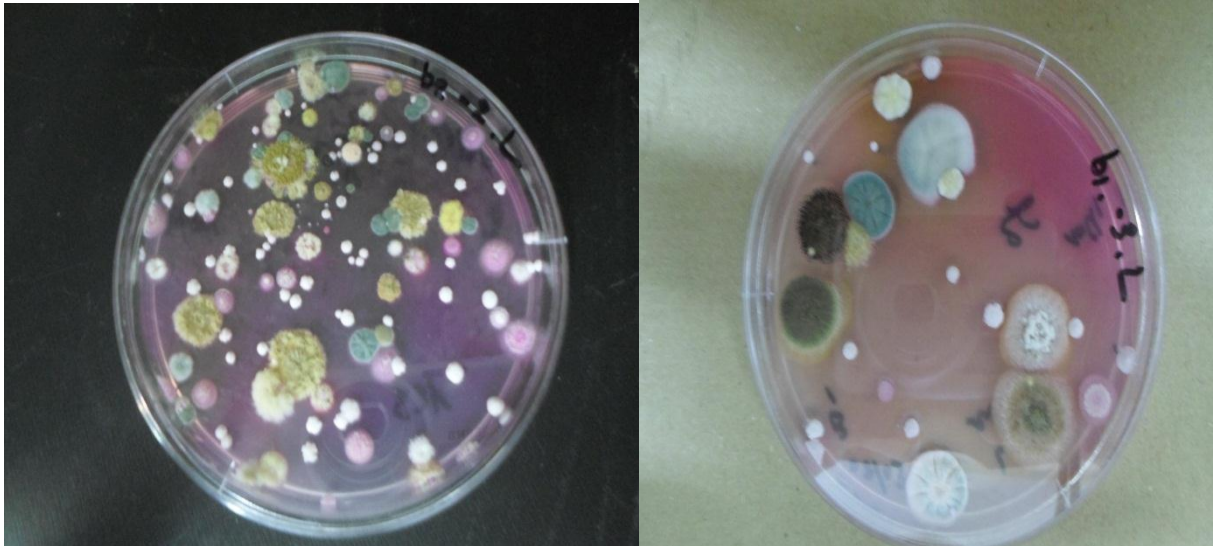


Figure 11. Colonies des moisissures poussant sur milieu DRBC après 5 jours d'incubation à 28°C

Il ressort aussi de (**tableau 13**), et de (**figure 12**), que la mycoflore totale d'amandes locales est plus élevée que celle de la variété importée. Elle est respectivement de $715,5 \cdot 10^4$ (86%), et $116,8 \cdot 10^4$ cfu/g (14%). Le taux de contamination fongique dans les amandes locales est plus élevé 6 fois que celui des amandes importées des Etats-Unis.

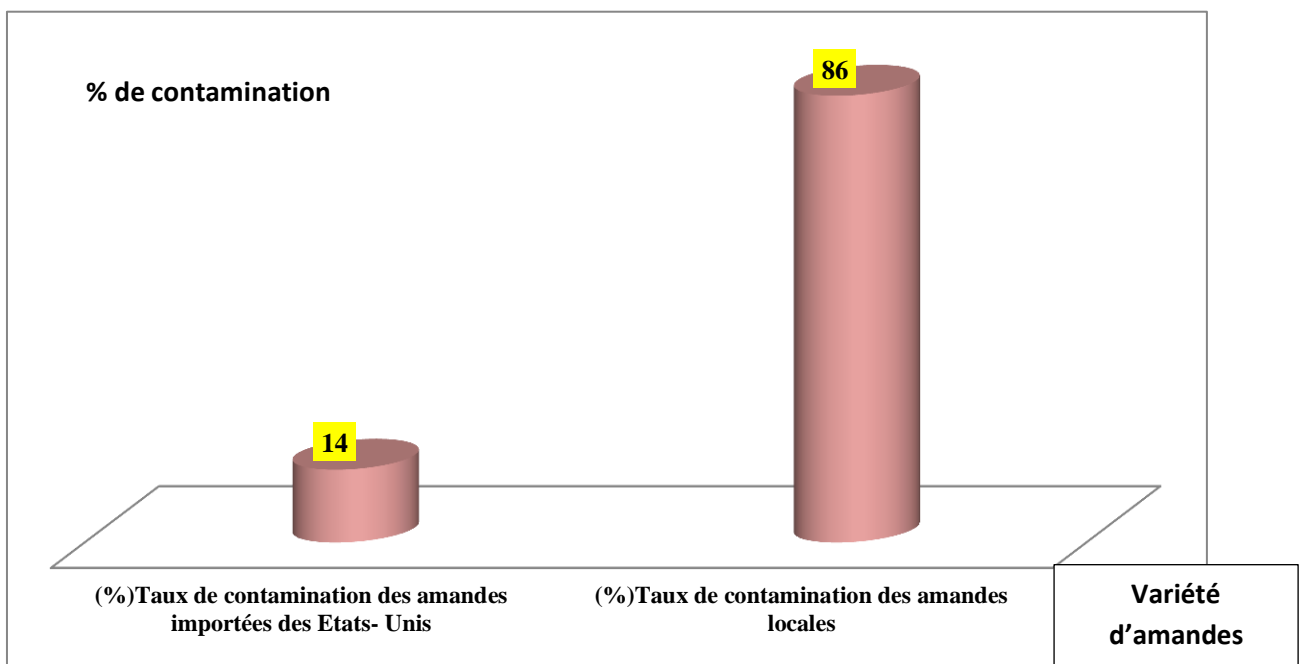


Figure 12. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A) d'amandes importées, et locales analysées.

La comparaison effectuée entre la flore fongique révélées par la méthode A, et par la méthode B de chaque variété d'amandes analysée permet de conclure que la flore fongique profonde dénombrée sur milieu DRBC révélée par la méthode B est très inférieure en la comparant avec la flore fongique externe et profonde révélée par la méthode A dans tous les échantillons analysés. La densité de la flore fongique par cette méthode est comprise entre $0,009.10^4$ et $0,048.10^4$ cfu/g de produit. Donc le nombre de cfu/g révélé dans les échantillons analysés par la méthode (B) est inférieur à 10^3 cfu/g. Les taux de contamination profonde ne dépassent pas 2% ce qui explique que la désinfection par la solution d'hypochlorite de sodium (0,4%) des grains d'amandes a fait éliminer totalement et approximativement de la mycoflore externe. (Figure 13)

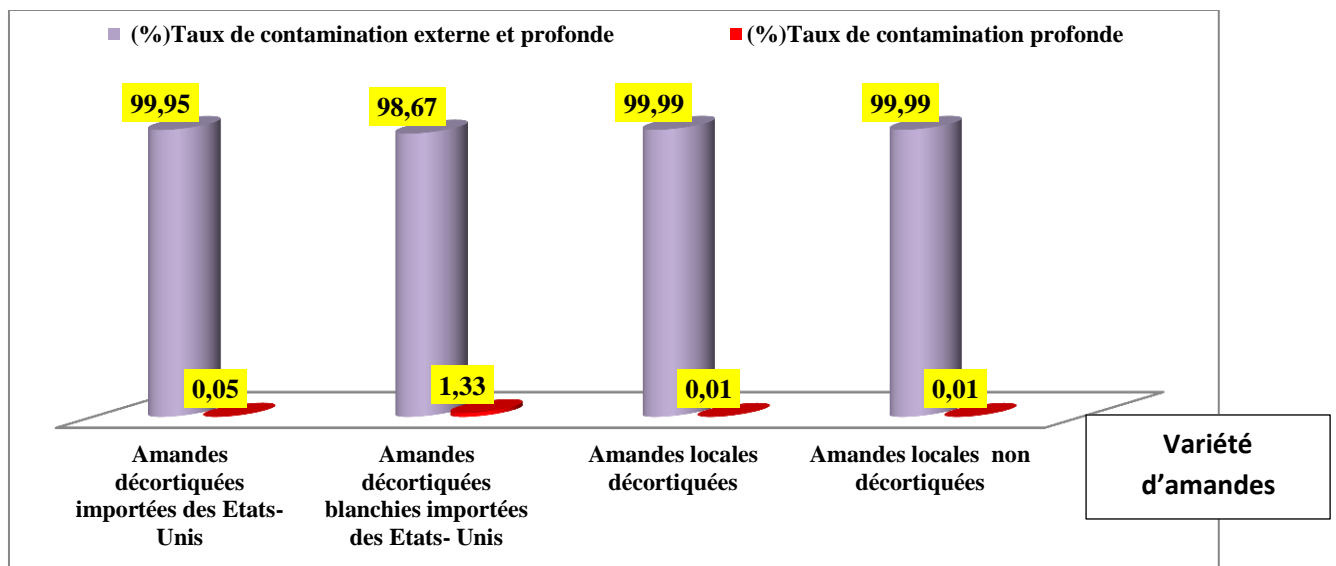


Figure 13. (%) Taux de contamination externe et profonde (méthode A), et profonde (méthode B) de chaque variété d'amandes analysées.

D'ailleurs, Les résultats obtenus n'ont pas montré des différences entre les différentes régions concernées par l'étude. Cependant nous remarquons que la plus forte contamination a été notée dans les échantillons collectés de Tipaza (38%), dont le taux d'humidité est plus élevé, suivie par les échantillons collectés de Médéa (33%), et les échantillons collectés de Blida (29%). Cette différence est vraisemblablement liée aux différences taux d'humidités de ces régions. (Figure14)

Ainsi une différence de densité fongique a été notée au sein des échantillons issus de la même région. Ceci signifie que la provenance de nos échantillons ne peut pas être le seul facteur impliqué dans ce type de contamination. En effet la durée et les conditions de stockage dans les différents points de vente issus de la même région peuvent varier. Les moisissures sont sensibles aux variations de la température et à l'humidité relative moyenne, ces deux facteurs jouent un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des champignons. Une variation même légère au niveau de l'humidité peut avoir des conséquences notables sur la densité de la flore fongique totale

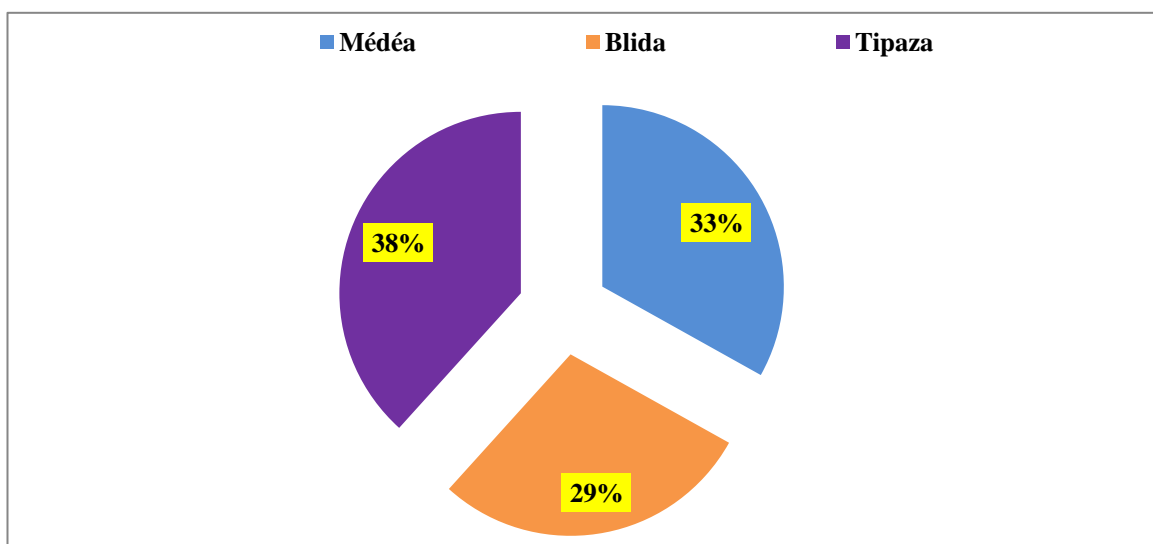


Figure14. (%) Taux de contamination externe et profonde d'amandes en fonction des régions de prélèvement.

V.1.2.2. Evaluation de la mycoflore dans des différents échantillons des amandes

Le taux de contamination externe et profonde varie considérablement d'un échantillon à un autre. Il oscille entre $0,8.10^4$ et $186,5.10^4$ cfu/g de produit. Les plus fortes densités ont été enregistrées dans l'échantillon (G) amandes décortiquées locales collectées de Médéa ($186,5.10^4$ cfu/g) (22,4%), échantillon (L) amandes non décortiquées locales collectées de Tipaza ($138,5.10^4$ cfu/g) (16,6%), l'échantillon (K) amandes non décortiquées locales collectées de Blida ($136,5.10^4$ cfu/g) (16,3%), et l'échantillon (I) amandes décortiquées locales collectées de Tipaza ($123,5.10^4$ cfu/g) (14,8%). L'échantillon (H) amandes décortiquées locales collectées de Blida, et l'échantillon (J) amandes non décortiquées locales collectées de Médéa ont des densités moyennes de 86.10^4 (10,3%), et $44,5.10^4$ cfu/g (5,3%) respectivement. Dans les échantillons A, B, et C amandes décortiquées importées des Etats-

Unis collectées de Blida, Médéa, et Tipaza respectivement la densité varie entre 15.10^4 cfu/g (1,8%), et 55.10^4 cfu/g (6,6%). Les échantillons d'amandes décortiquées blanchies importées d'Etats- Unis D, E, et, F présentent les densités les plus faibles, ne dépassent pas les 10^4 cfu/g (0,1%), cela peut expliquer que ces échantillons sont préparés par des traitements thermiques qui tuent les moisissures ou ils réduisent l'humidité relative qui influence sur la prolifération des moisissures. **Tableau 14.**

Tableau 14. Distribution de la flore fongique totale externe, profonde et fréquences d'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Aspergillus* section *Flavi*, et *Aspergillus* section *Nigri* dans les différents échantillons d'amandes analysées commercialisés en Algérie.

Les différentes variétés des Echantillons		Flore fongique totale (cfu/g)	<i>Penicillium</i> (cfu/g)	<i>Aspergillus</i> (cfu/g)	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> (cfu/g)*	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (cfu/g)*
Amandes décortiquées	A	15.10 ⁴	0,5.10 ⁴	14,5.10 ⁴	0,5.10 ⁴	14.10 ⁴
importées des Etats- Unis	B	44.10 ⁴	10 ⁴	43.10 ⁴	0,5.10 ⁴	42,5.10 ⁴
	C	55.10 ⁴	0,5.10 ⁴	54,5.10 ⁴	0,5.10 ⁴	54.10 ⁴
Amandes décortiquées	D	0,9.10 ⁴	00	0,9.10 ⁴	0,1.10 ⁴	0,8.10 ⁴
blanchies importées	E	0,8.10 ⁴	0,6.10 ⁴	0,2.10 ⁴	0,1.10 ⁴	0,1.10 ⁴
des Etats-Unis	F	0,9.10 ⁴	0,7.10 ⁴	0,2.10 ⁴	0,1.10 ⁴	0,1.10 ⁴
Amandes	G	186,5.10 ⁴	00	186,5.10 ⁴	151.10 ⁴	35,5.10 ⁴
Décortiquées	H	86.10 ⁴	84.10 ⁴	2.10 ⁴	00	00
Locales	I	123,5.10 ⁴	110.10 ⁴	13,5.10 ⁴	7,5.10 ⁴	6.10 ⁴
Amandes	J	44,5.10 ⁴	30.10 ⁴	14,5.10 ⁴	6.10 ⁴	8,5.10 ⁴
non	K	136,5.10 ⁴	61,5.10 ⁴	75.10 ⁴	61.10 ⁴	14.10 ⁴

décortiquées locales	L	138,5.10 ⁴	105.10 ⁴	33,5.10 ⁴	19,5.10 ⁴	14.10 ⁴
Totale		832.10⁴	393,3.10⁴	438,8.10⁴	246,3.10⁴	190,5.10⁴

* par rapport au total d'*Aspergillus*

Cependant, une hétérogénéité a été observée dans la densité de la flore fongique au sein des échantillons d'amandes locales de même origine et de même catégorie. Cette fluctuation est liée précisément aux conditions, et durée de stockage. **Figure15**

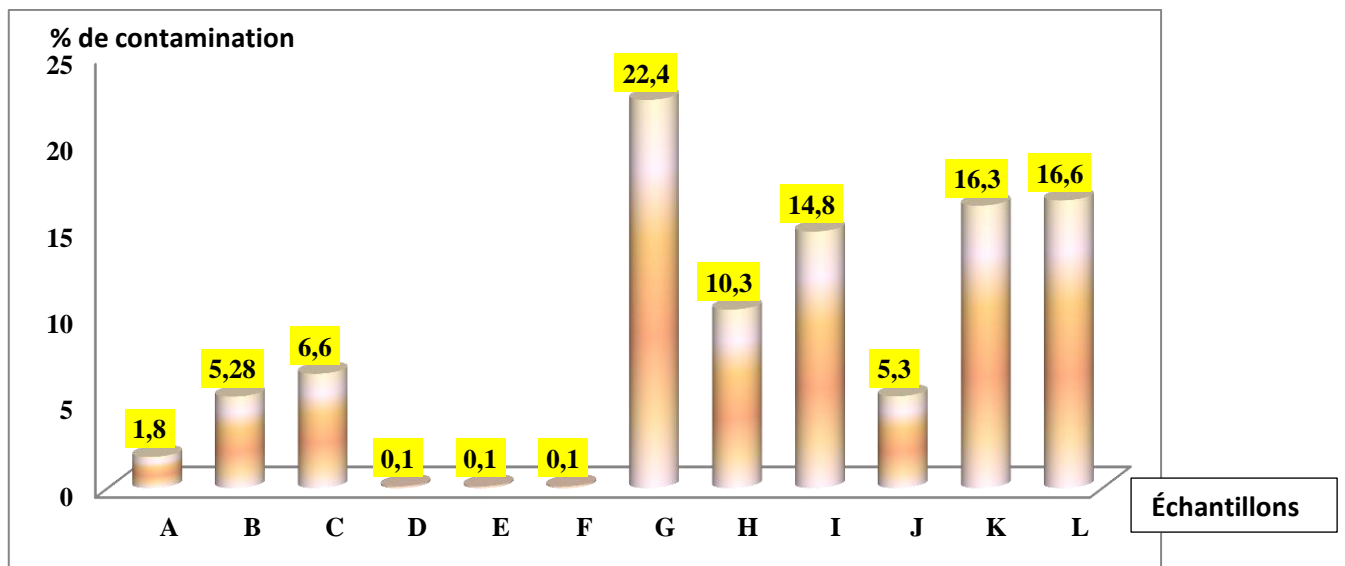


Figure15. (%) Taux de contamination externe et profonde de chaque échantillon analysé.

-A, B, et C sont les échantillons des amandes décortiquées importées des Etats- Unis collectées de Blida, Médéa, et Tipaza respectivement. D, E, et F sont les échantillons d'amandes décortiquées blanchies importées des Etats- Unis collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. G, H et, I sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. J, K, et, L sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement

V.1.2.3. Reconnaissance les principaux genres

Les résultats de l'analyse fongique des 12 échantillons d'amandes analysées obtenus montrent que les genres dominants sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Ils ont été identifiés selon les caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et la texture de la colonie, sur le milieu (DRBC), ainsi que les structures micromorphologiques permettent généralement de faire la distinction entre ces deux genres. Ces deux genres fongiques représentent respectivement 52,7 et 47,3% de la flore fongique totale. La quasi-totalité des échantillons sont contaminés par ces deux types de champignons, ce qui fait que la mycoflore de stockage est la plus abondante par rapport la mycoflore de champ (*Alternaria*, *Cladosporium* et *Fusarium*) dans les amandes. Nos résultats confirment le statut de la flore de stockage de ces deux genres qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage.

Les résultats relatifs illustrés sur(**la figure16**) témoignent la dominance du genre *Aspergillus* dans les amandes décortiquées importées des Etats- Unis (98,3%). Le taux de contamination par le *Penicillium* est plus élevé chez la variété d'amandes non décortiquées locales (61,5%) pour celui d'*Aspergillu* (38,5%). Par contre les taux d'*Aspergillu*, et de *Penicillium* chez la variété d'amandes décortiquées blanchies importées des Etats-Unis, et chez la variété d'amandes décortiquées locales sont égaux (50%, et 50%), et (51%, et 49%) respectivement.

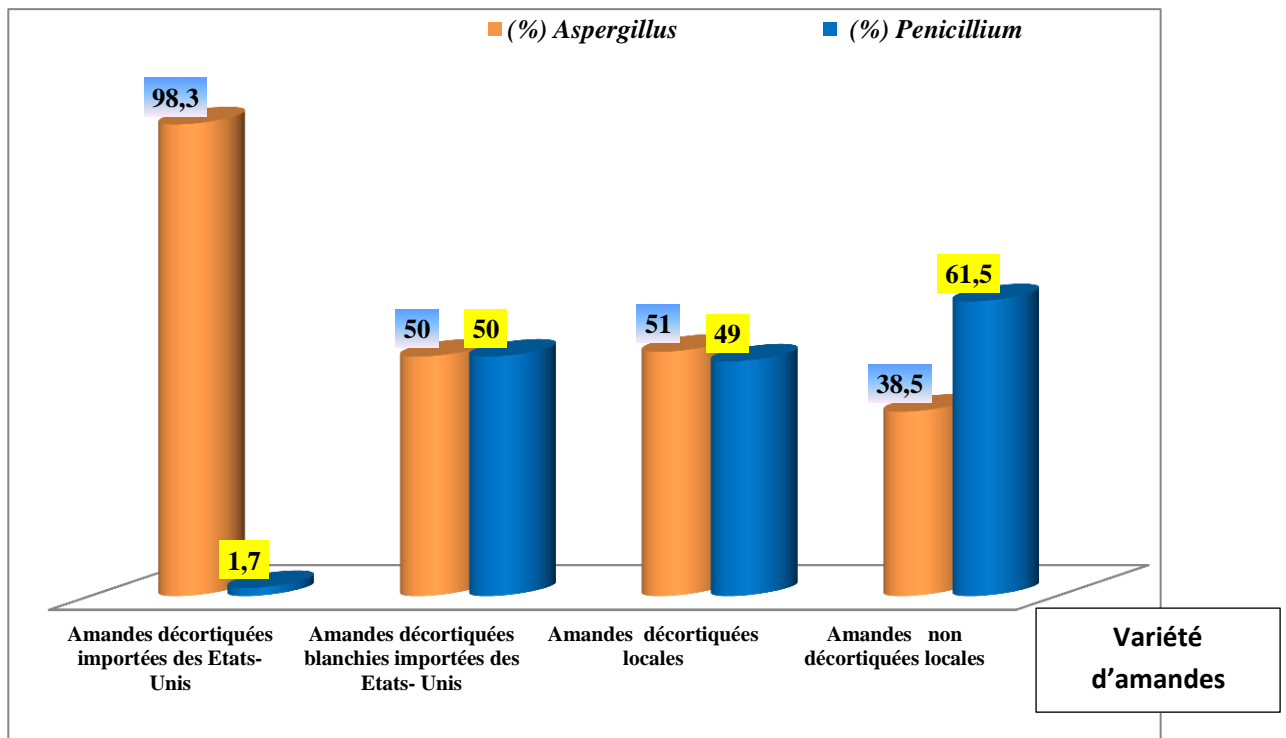


Figure 16. Fréquence du genre *Aspergillus*, et *Penicillium* dans les différentes variétés d'amandes analysées.

La figure démontre la dominance de genre *Aspergillus* dans 5 échantillons analysés, dont 4 échantillons sont d'amandes importées, un échantillon est local. *Aspergillus* a été isolé dans tous les échantillons avec des taux allant de 2,3 à 100% soit une moyenne de (52,7 %). Ce genre est dominant à 100% dans les échantillons D, et G. Les fréquences de ce genre fongique dans les échantillons A, B, et C sont très élevés 96,7%, 97,7%, et 99% respectivement. Dans l'échantillon K le taux d'*Aspergillus* est de 55%. Les échantillons J, E, L, F, et I présentent des taux respectifs en *Aspergillus* de 32,5%, 25%, 24,2%, 22,2%, et 11%. L'échantillons H présente le taux de contamination le plus faible par *Aspergillus* (2,3%). figure 17. La figure 18.19 montre la dominance des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.

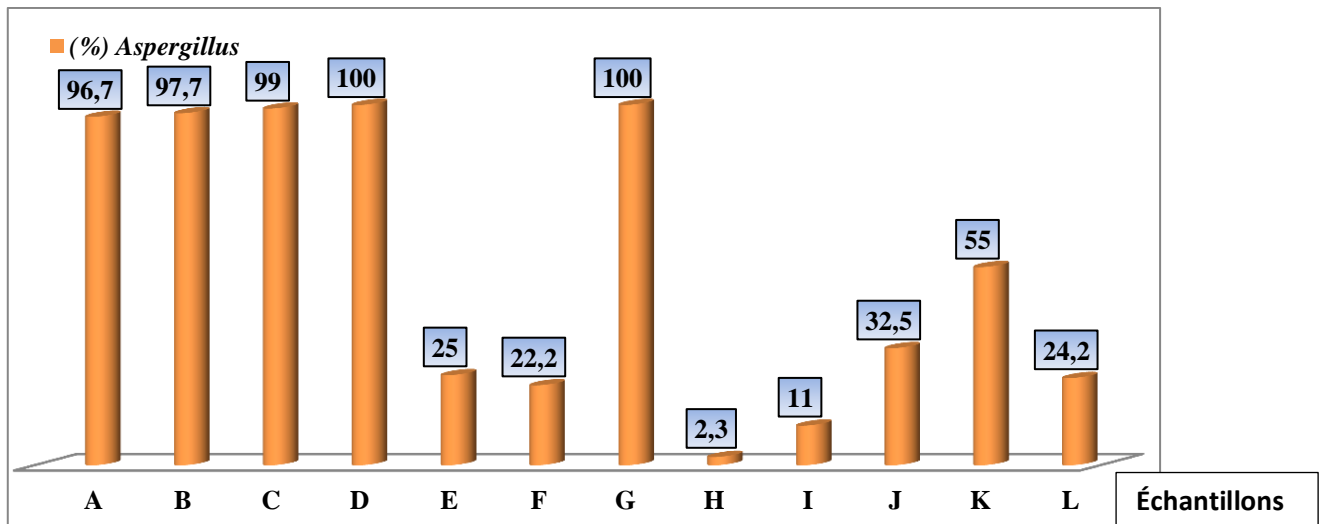


Figure17. Fréquence du genre *Aspergillus* dans les échantillons des amandes analysées

-A, B, et C sont les échantillons des amandes décortiquées importées des Etats- Unis collectées de Blida, Médéa, et Tipaza respectivement. D, E, et F sont les échantillons d'amandes décortiquées blanchies importées des Etats- Unis collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. G, H et, I sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. J, K, et, L sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement

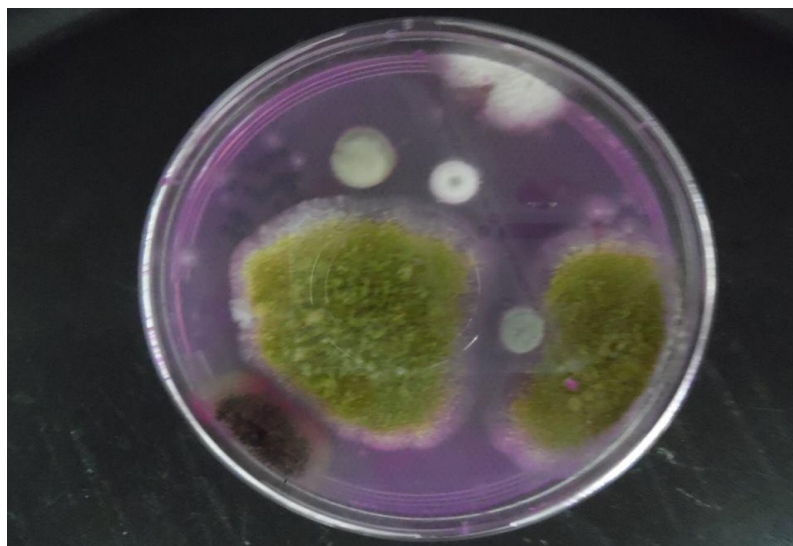


Figure 18. La dominance des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.

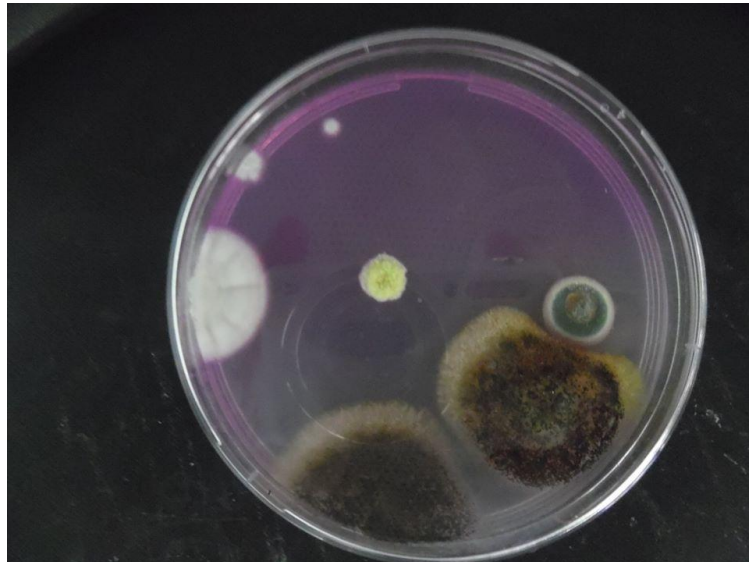


Figure 19. La dominance des isolats d'*Aspergillus* section *Nigri* poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.

Le genre *Penicillium* a été aussi isolé à des proportions très variables allant de 0 à 100%, soit une moyenne de (47,3%). Ce genre est dominant dans 6 échantillons. Il est dominant surtout dans les échantillons H (97,7%), I (89%), F (77,8%), L (75,8%), E (75%), J (67,4%), dans l'échantillon K, *Penicillium* représente 45% de la flore fongique totale. Les échantillons A, B, et C sont les moins contaminés par *Penicillium* avec des pourcentages 3,3%, 2,3%, et 1% respectivement. Aucun champignon de genre *Penicillium* n'a été isolé dans les échantillons A, D, et G. (**Figure 20**).

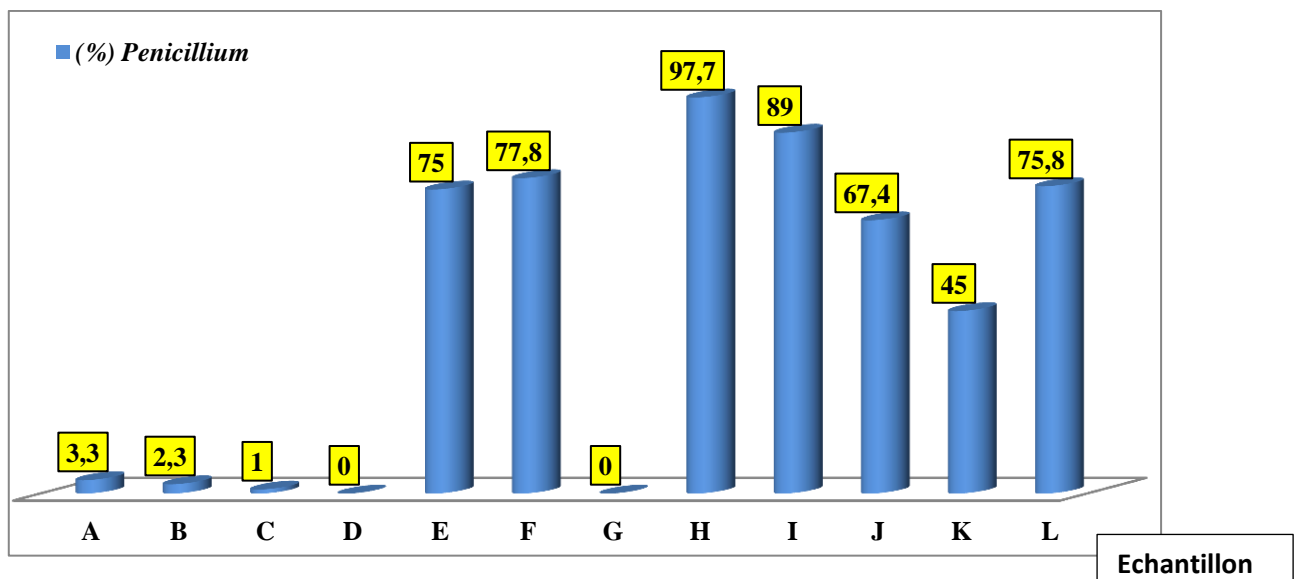


Figure 20. Fréquence du genre *Penicillium* dans les échantillons d'amandes analysées

-A, B, et C sont les échantillons des amandes décortiquées importées des Etats- Unis collectées de Blida, Médéa, et Tipaza respectivement. D, E, et F sont les échantillons

d'amandes décortiquées blanchies importées des Etats- Unis collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. G, H et, I sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. J, K, et, L sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement



Figure 21. La dominance de *Penicillium ssp.* poussant sur milieu DRBC après 7 jours d'incubation à 28°C.

V.1.2.4. Distribution des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri*

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

Parmi les espèces d'*Aspergillus*, *Aspergillus* section *Flavi* et *Aspergillus* section *Nigri*, sont les plus dominantes dans la majorité des échantillons analysés. Ces deux sections ont été isolées dans 11 échantillons (sauf l'échantillon H), ce qui correspond à un taux de contamination de 56,1 et 43,4% du nombre total d'*Aspergillus* respectivement.

La plus forte incidence d'*Aspergillus* section *Flavi* est enregistrée dans les amandes décortiquées, et non décortiquées locales avec des taux de 78,5, et 70,3% respectivement du total d'*Aspergillus*. Dans les amandes décortiquées importées des Etats- Unis cette section représente (23%). Un taux relativement faible est enregistré dans les amandes décortiquées importées des Etats- Unis (1,4%).

Cependant, *Aspergillus* section *Nigri* a été isolée à des teneurs très élevées dans les amandes décortiquées importées des Etats- Unis (98,6%), et dans les amandes décortiquées blanchies importées des Etats-Unis (77%). chez la variété d'amandes décortiquées, et non décortiquées locales sa fréquence est de 20,5, et 29,7% respectivement (**figure22**).

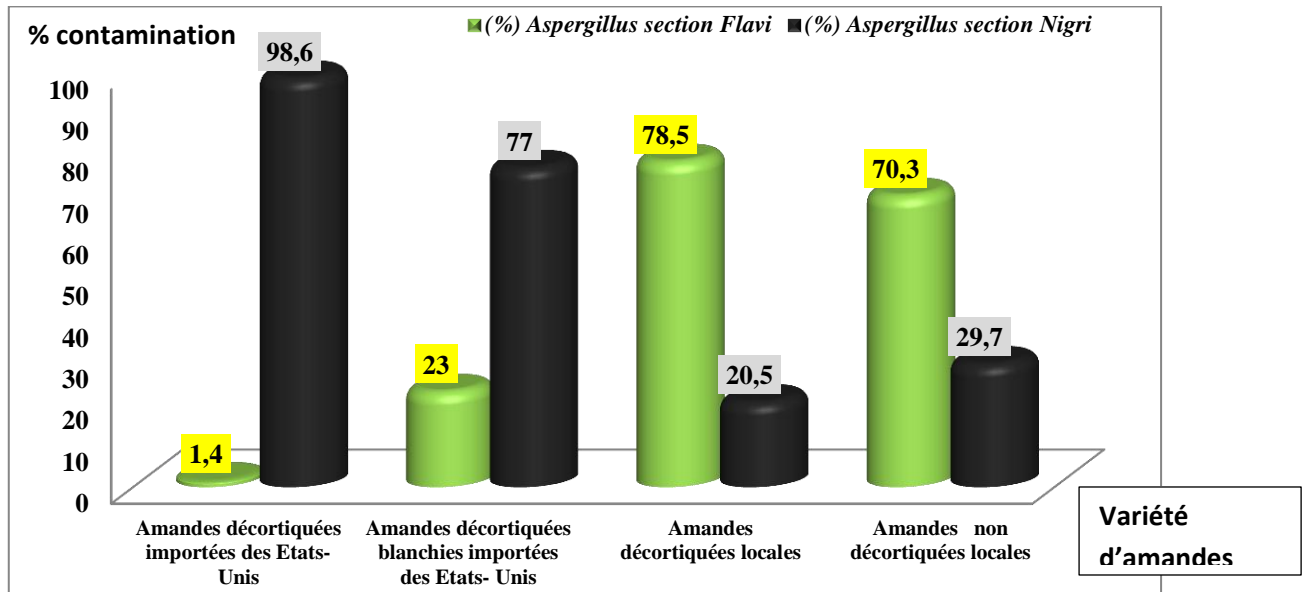


Figure 22. Fréquence d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* dans les différentes variétés d'amandes analysées par rapport au total d'*Aspergillus*

Les proportions d'*Aspergillus* section *Flavi* par rapport du nombre total d'*Aspergillus* varient entre 0 et 81,3%. Les échantillons K (81,3%), et G (81%) sont les plus contaminés par les isolats de cette section, suivie par les échantillons L (58,2%), et I (55,6%). Dans les échantillons E, F, et J cette section représente la moitié et moins de la moitié du total d'*Aspergillus* 50%, 50% et 41,4% respectivement. Cependant un taux relativement faible est enregistré dans l'échantillon D (11,1%), et un niveau très faible a été observé dans les échantillons A (3,4%), B (1%), et C (0,9%). Il faut souligner l'absence totale des isolats de cette section dans l'échantillon H. (**Figure23**)

En outre, les *Aspergillus* sont représentés par *Aspergillus* section *Nigri* à des teneurs très élevées dans les échantillons A (96,6%), B (99%) C (99,1%), et D (88,9%), suivies d'échantillon J (58,6%). La fréquence des isolats de cette section dans les échantillons E, F, I, et L varié de 50%, à 41,8%. La plus faible incidence d'*Aspergillus* section *Nigri* est enregistrée dans les échantillons G et K avec des taux de 19%, et 18,7% respectivement. (**Figure23**)

Les espèces d'*Aspergillus* section *terrei*, *Aspergillus* section *Circumdati* et *Aspergillus* section *Fumigati* sont faiblement représentées. En effet, leur pourcentage ne dépasse pas 1%.

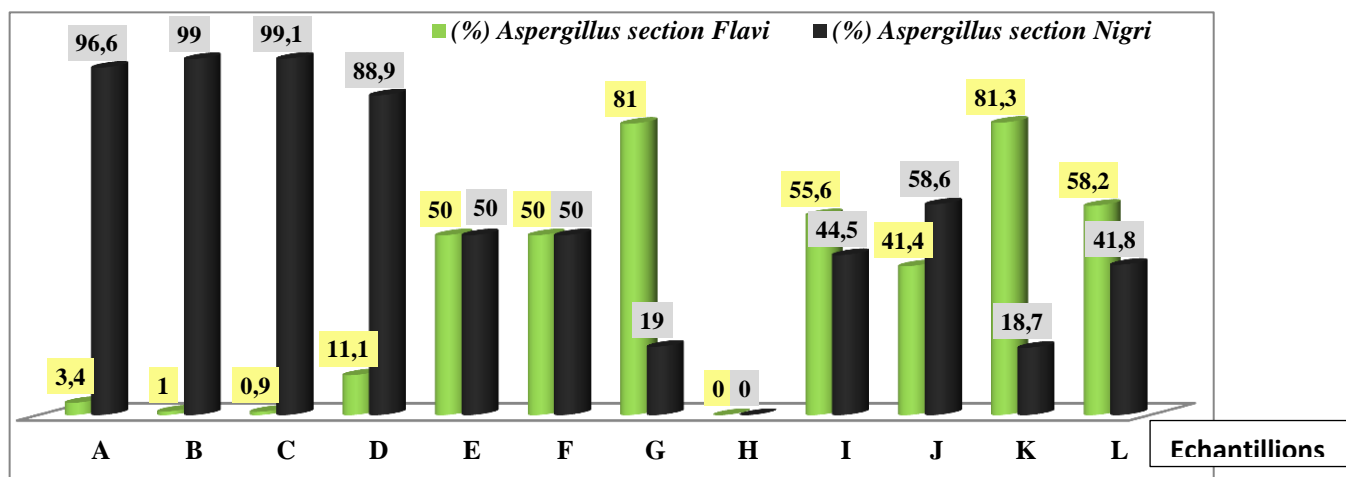


Figure 23. Fréquence d'*Aspergillus* section *Flavi* et d'*Aspergillus* section *Nigri* dans les échantillons d'amandes analysés par rapport au total d'*Aspergillus*

-A, B, et C sont les échantillons des amandes décortiquées importées des Etats- Unis collectées de Blida, Médéa, et Tipaza respectivement. D, E, et F sont les échantillons d'amandes décortiquées blanchies importées des Etats- Unis collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. G, H et I sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. J, K, et L sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement.

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

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

Au cours de cette étude, 61 souches d'*Aspergillus* section *Flavi* isolées des échantillons ont fait l'objet d'une identification morphologique et de l'étude du pouvoir producteur d'aflatoxines.

Le criblage des isolats aflatoxinogènes a été réalisé sur la mise en évidence de la fluorescence bleue sous U.V à 365 nm sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM). Le pouvoir producteur des isolats ayant donné une fluorescence bleue et un revers du milieu CAM jaune orangé. La production d'AFs est ensuite confirmée par la chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant un standard d'AFB1, et l'extrait de la souche de référence

A.parasiticus qui produit les deux types d'aflatoxines B et G. L'analyse de CCM a été réalisée au laboratoire **de recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse (LPBVB)** à l'E.N .S. Kouba (Alger).

Les résultats ont révélé un taux de production de 11,5 et 39,3%, respectivement sur milieu CAM et sur CCM. L'analyse par CCM des différents extraits obtenus indique un taux de production plus élevé (**Figure 24**). 17 isolats faiblement producteurs s'avèrent être de faux négatifs sur CAM. Ce qui démontre que la chromatographie sur couche mince (CCM) est plus performante que la détection par cette méthode simple de screening CCM.

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

L'analyse par CCM nous a permis de détecter une production d'aflatoxines chez les souches faiblement productrices. Cette différence indique que la détection de la production d'aflatoxines sur 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 la méthode CCM est nécessaire afin d'apporter des résultats supplémentaires. La fluorescence des AFs sur milieu CAM est illustrée sur la(**Figure 25**) et par CCM sur la (**Figure 25**)

Le résultat concernant le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes doit prendre en compte le seuil limite de détection. Car ce pourcentage a été déterminé sur la base de la mise en évidence de la fluorescence sur CAM et CCM. Ce pourcentage peut être revu à la hausse avec si les isolats sont analysés par HPLC avec un seuil de détection plus sensible. Riba et *al.* (2010) ont montré que le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes calculé sur milieu CAM et par HPLC est de 30, et 72%, respectivement.

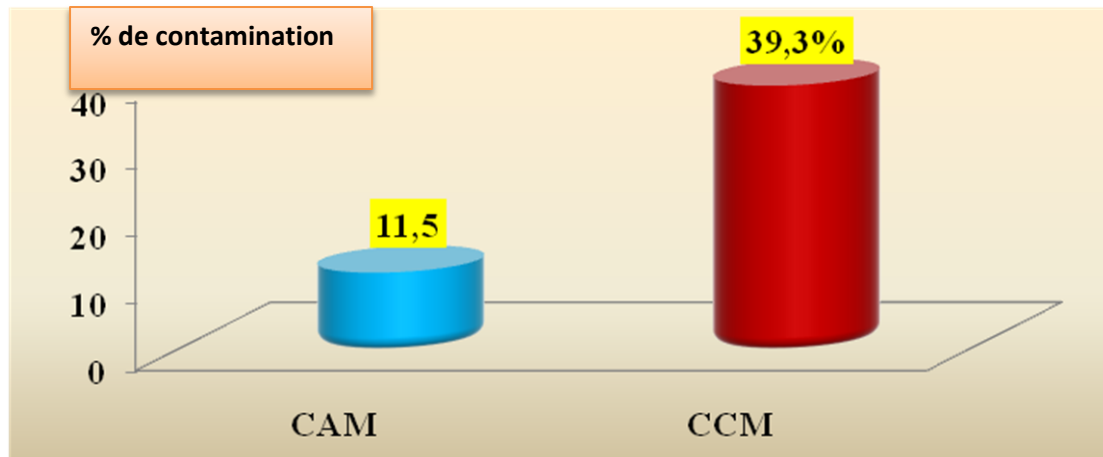
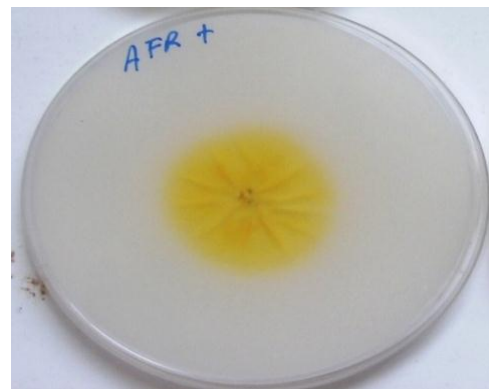
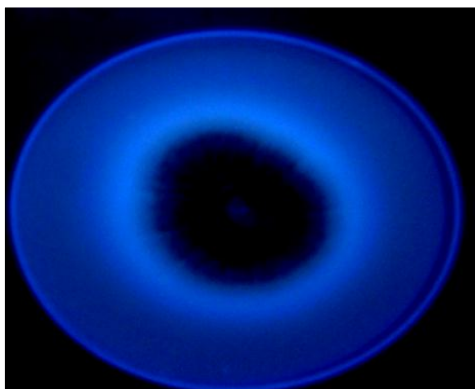
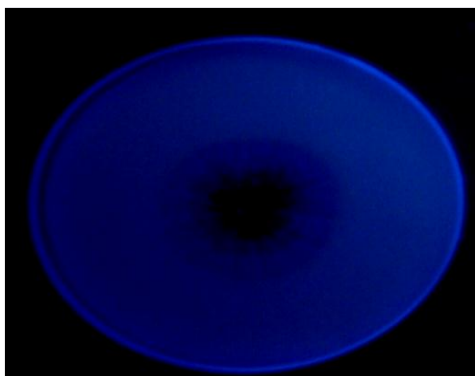


Figure 24. (%) Taux de production d'AFs par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* déterminée par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM, et sur CCM



A: Fluorescence bleue sous UV (365 nm) **B :** Revers jaune orangé

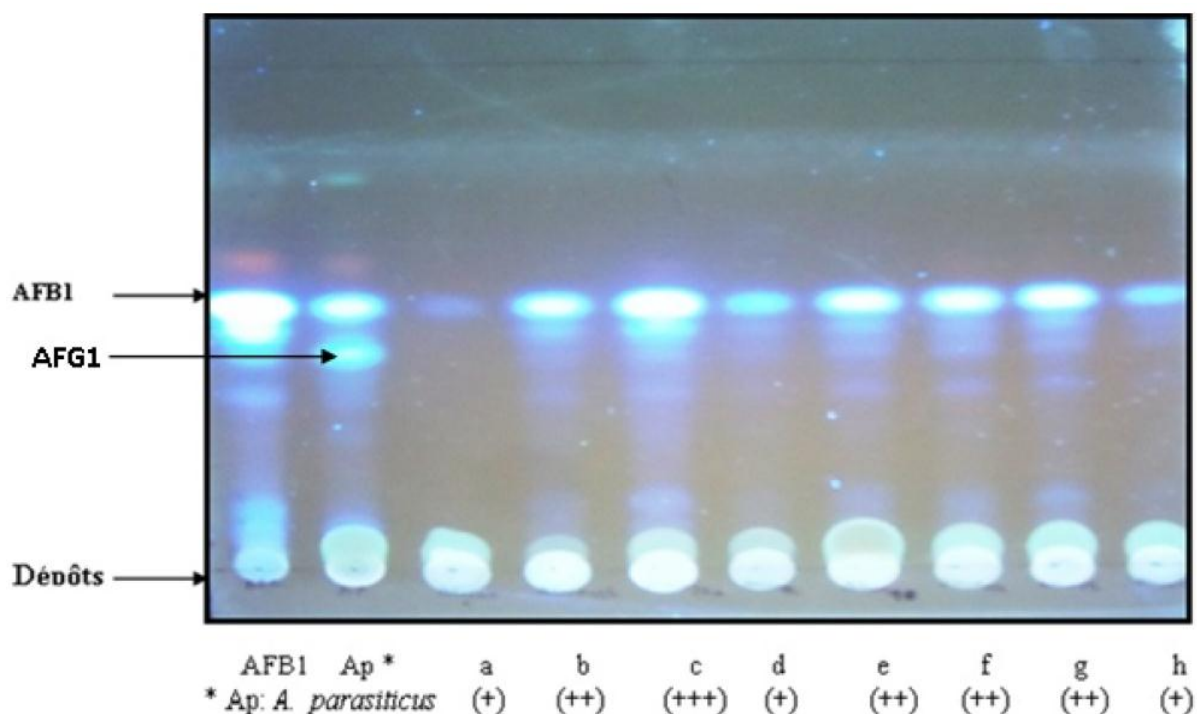
Isolat producteur d'AFs



C: Absence de fluorescence sous UV (365nm) **D :** Revers beige

Isolat non producteur d'AFs

Figure 25. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production des AFs par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM).



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

Figure 26. Images sous UV 365 nm montrant la fluorescence bleue de la production des d'aflatoxines produites par les isolats aflatoxinogènes sur CCM.

V.1.3.2. Souches aflatoxinogènes isolées d'amandes

L'estimation de la quantité d'aflatoxine (par CCM) dans les extraits des 24 isolats a montré des quantités d'AFB1 très variables. Ainsi, les isolats aflatoxinogènes peuvent être divisés en fonction de l'intensité de la fluorescence en trois catégories: 70,8% des isolats sont faiblement producteurs, les isolats moyennement producteurs représentent 8,3% et les isolats fortement producteurs (20,8%).

Les résultats consignés dans le **tableau15** montrent que les amandes non décortiquées locales sont les plus contaminées par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs (37,5%) suivies les amandes décortiquées importées des Etats- Unis, et les amandes

décortiquées blanchies importées des Etats- Unis (25%). Les amandes décortiquées locales sont moins contaminés par les isolats aflatoxinogènes (12,5%).

Tableau 15. Répartition des 24 isolats aflatoxinogènes d'*Aspergillus* section *Flavi* en fonction de l'intensité de fluorescence sur CCM.

Les variantes des échantillons	Nombres totaux d'isolats testés	Nombres d'isolats aflatoxinogènes	Intensité			Moyenne des Isolats aflatoxinogènes (%)
			+++	++	+	
Amandes décortiquées importées des Etats- Unis	10	6	3	1	2	25
Amandes décortiquées blanchies importées des Etats- Unis	11	6	1	0	5	25
Amandes décortiquées locales	15	3	0	0	3	12,5
Amandes non décortiquées locales	25	9	1	1	7	37,5
Totale	61	24	5	2	17	100%
		39,3%	20,8%	8,3%	70,8%	

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

Nous remarquons que l'échantillon K est le plus contaminé par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs (20,9%) suivie des échantillons D, C, E, et L avec un pourcentage de 12,5% et l'échantillons G (8,4%). Les échantillons B, F, et J, sont moins contaminés par les isolats aflatoxinogènes avec un pourcentage égale de 4,1%. Il faut noter l'absence des isolats aflatoxinogènes dans l'échantillon I. (**Figure27**)

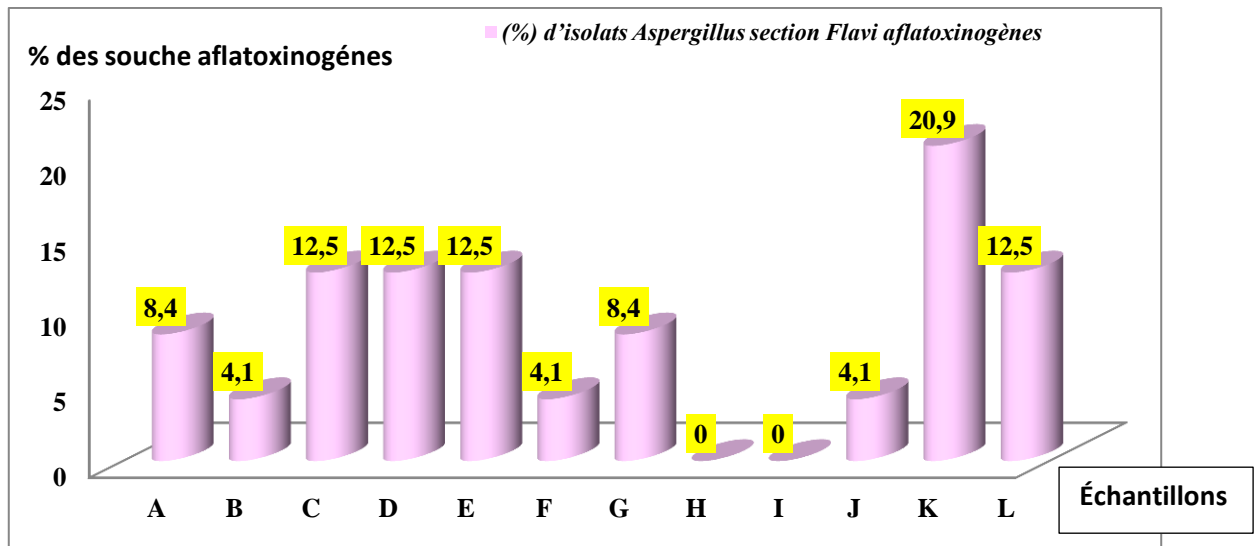


Figure 27. Fréquence (%) des isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* producteurs d'AFs en fonction de type d'échantillon.

-A, B, et C sont les échantillons des amandes décortiquées importées des Etats- Unis collectées de Blida, Médéa, et Tipaza respectivement. D, E, et F sont les échantillons d'amandes décortiquées blanchies importées des Etats- Unis collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. G, H et I sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement. J, K, et L sont les échantillons d'amandes décortiquées locales collectées de Médéa, Blida, et Tipaza respectivement

V.1.4. Caractérisation des *Aspergillus* section *Flavi*

Au cours de cette étude, 61 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* ont fait l'objet d'une identification. La caractérisation des espèces de cette section repose sur une taxonomie polyphasique à savoir l'étude des caractères morphologiques, des caractères moléculaires, la production de certains métabolites signalés dans la partie bibliographique⁵ et la production de sclérotés. Dans le cadre de ce travail nous n'avons pas pu faire l'analyse de tous ces métabolites et nous nous sommes limités aux productions d'AFs, et des sclérotés, en plus des caractères morphologiques. Ceci ne nous permet évidemment pas de faire une délimitation très précise de nos isolats.

V.1.4.1. Distribution des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* dans les amandes analysées

Parmi 61 isolats, on trouve 53 isolats présentait les caractères du groupe d'*Aspergillus flavus*. Ce groupe est formé de 50 isolats (82%) ne produisent pas de sclérotés, un isolat (1,6%) produit les sclérotés de type « S » (<400 µm), et 2 isolats (3,4%)

produisent les sclérotés de type « L » (>400 µm). Nous reviendrons plus loin sur la taxonomie de ces isolats d'une manière plus détaillée. 7 isolats (11,5%) présentaient des conidies rugueuses et un mycélium d'aspect poudreux et de couleur verte olive tirant sur le brun (vert kaki) caractéristique d'*A. tamarii*. En plus, ces isolats ne poussent pas à 42 °C, caractère qui les distingue également des autres espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* (Ehrlich et al., 2007). Ils sont ainsi rattachés à cette espèce. Un isolat sur les 61 (1,6%) ayant la couleur vert-foncée, produisant l'AFB1, et l'AFG1 est rattaché à *Aspergillus parasiticus*. Les principaux résultats sont présentés dans(**la Figure 28.29.30.31**).

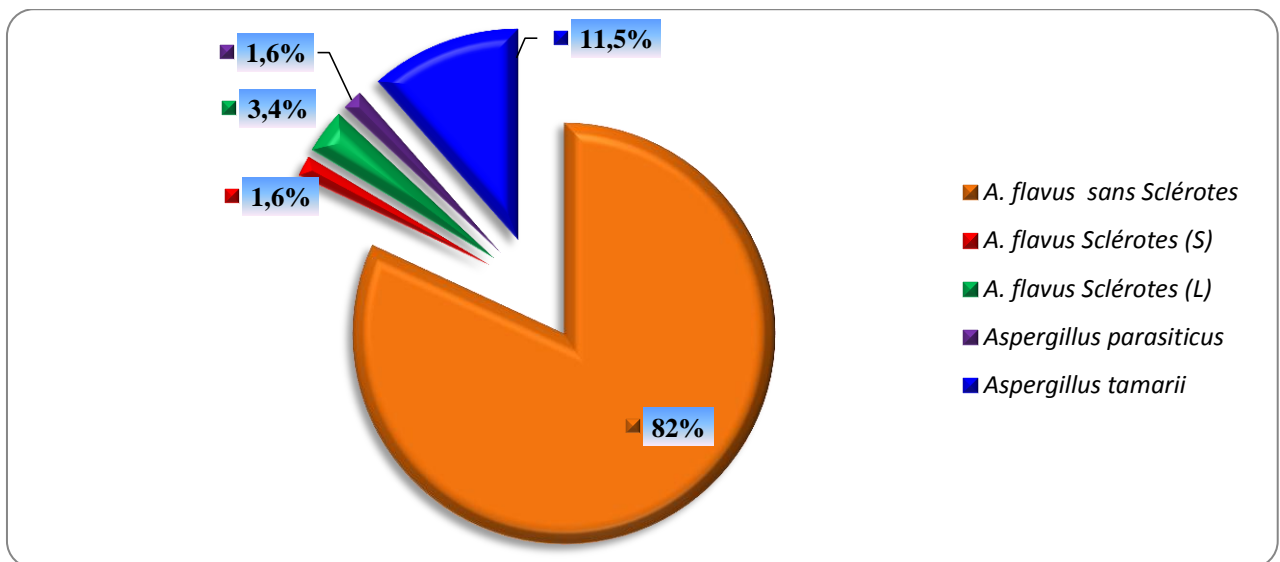


Figure 28. Les différents types d'isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* dans les échantillons d'amandes analysées.

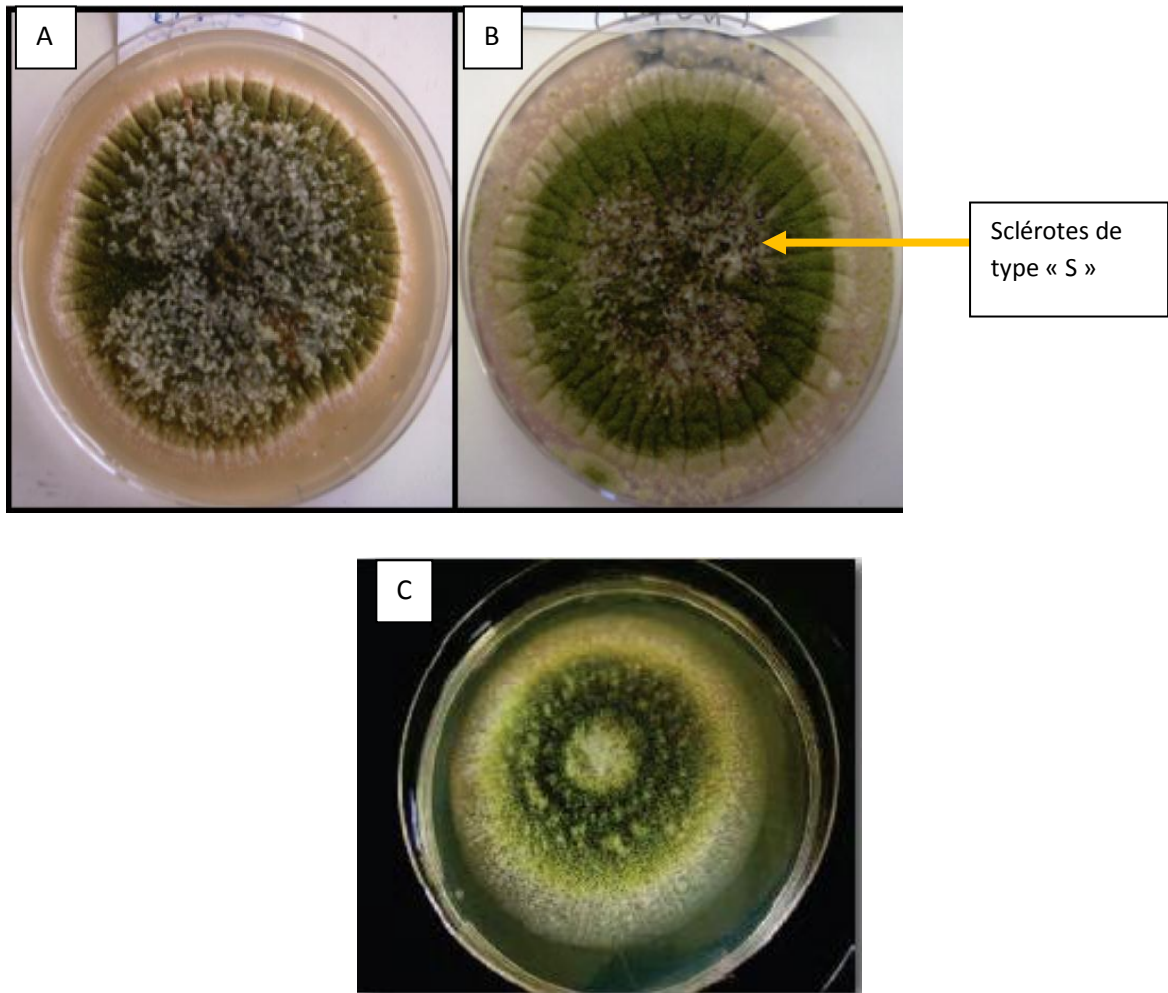


Figure 29. Aspect macroscopique d'*Aspergillus* section *Flavi* sur milieu CYA au 7^{ème} jour.
(A, B) : *Aspergillus flavus*; (C) : *Aspergillus parasiticus*.

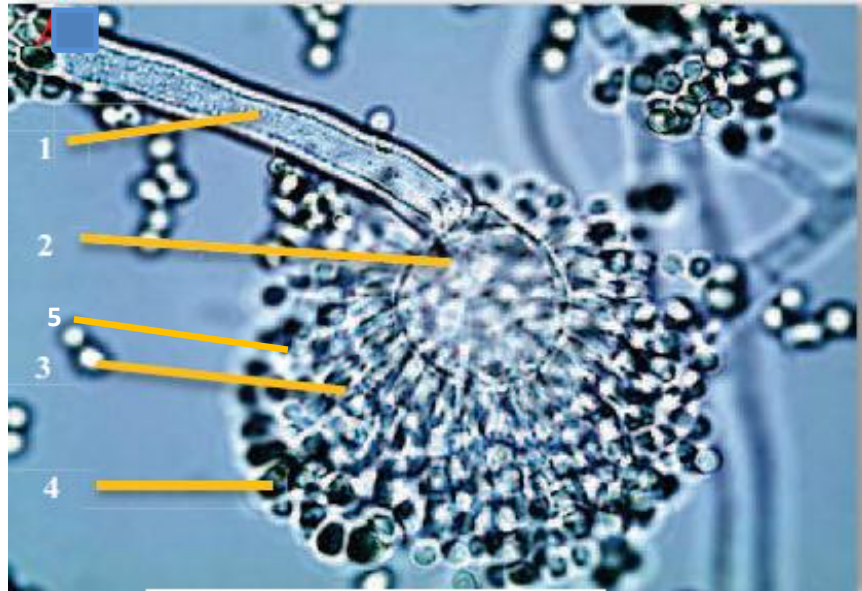


Figure 30. Aspect microscopique (Grx100) d'*Aspergillus flavus* (photo original)
 (1) : Conodiophore (stipe), (2) : Vésicule, (3) : Métule, (4) : conidies, (5) : Phialide.

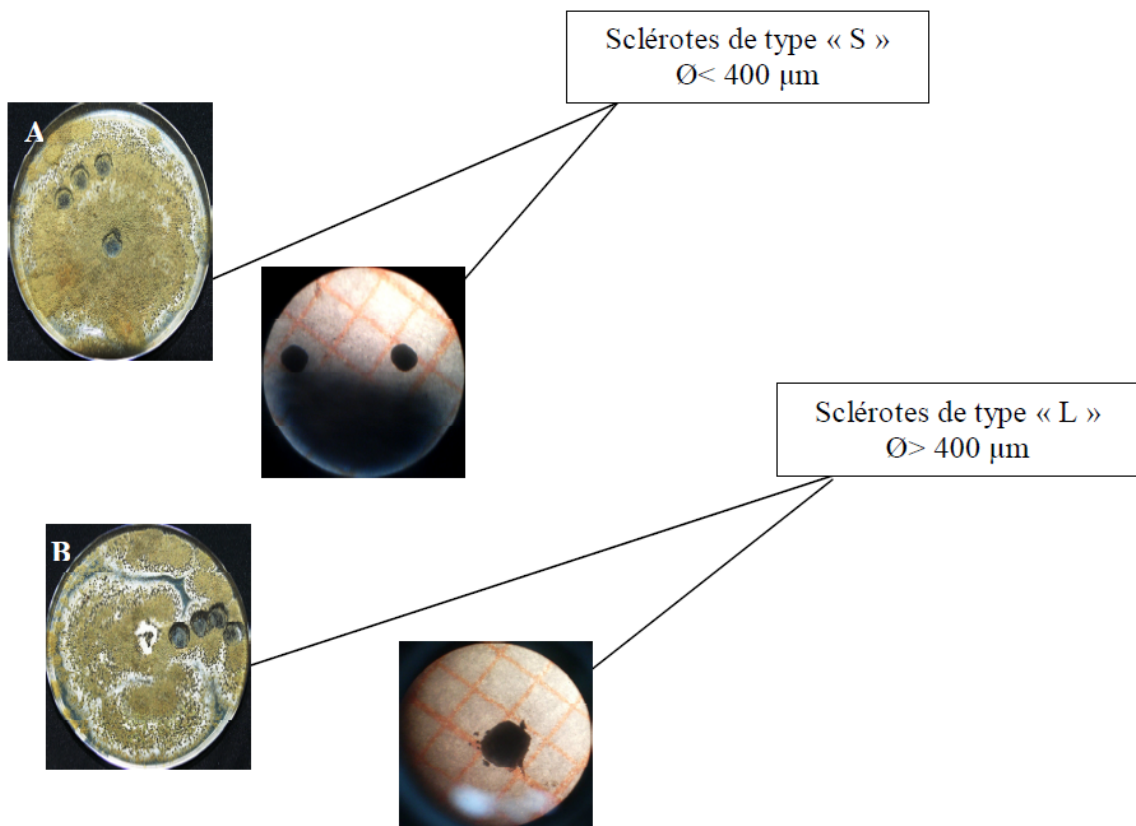


Figure 31. Présentation de deux types d'isolats producteurs des sclérotés de type « S » et « L »

« S » (sclérote $< 400 \mu\text{m}$) , « L » (sclérote $> 400 \mu\text{m}$).

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

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

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

Les isolats du groupe I, II, III, et IV appartiendraient vraisemblablement à *A. flavus* typique.

- Le groupe V représente les isolats ayant la capacité de produire l'AFB, le CPA et les sclérotés de type « S ». Ces isolats pourraient appartenir au groupe atypique d'*A. flavus*.

Ces cinq groupes présentent les chimio-morphotypes d'*A. flavus*.

- Le groupe VI (le type II d'*A. flavus*) , inclue les isolats produisant les aflatoxines de type B et G, le CPA, et les sclérotés de type « S ». Ces isolats sont rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus*.
- Le groupe VII produit les deux types d'aflatoxines B et G, mais pas de CPA et de sclérotés. Ce type d'isolats peut être assimilé à *A. parasiticus* ou à *A. nomius*. Cette dernière, morphologiquement est très proche d'*A. flavus*, et elle est fréquente dans le sol et parasite les insectes (**Kurtzman et al., 1987; Peterson et al., 2000**).

Parmi les 24 isolats aflatoxinogènes, 22 isolats (91,7%) sont rattachés à *A. flavus* typique, produisent l'AFB, mais pas l'AFG, et de sclérotés. Ces isolats peuvent appartenir au groupe I (producteurs de CPA) ou au groupe IV (non producteurs de CPA). Un seul isolat (4,2%) appartient au groupe V s'il produit de CPA. le groupe VII représente 4,2% des isolats aflatoxinogènes testés. La caractérisation des 24 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes en fonction de la production d'AFB, AFG, de CPA et de sclérotés sont récapitulés dans **le tableau 16**.

Tableau 16. Répartition des 24 isolats producteurs d'AFs d'*Aspergillus* section *Flavi* en différents groupes (morpho-chimiotypes) selon la production, d'AFB, d'AFG et de sclérotés.

Groupe	AFB	AFG	CPA	L ^a	S ^a	Nombre d'isolats	Pourcentage (%) ^b
I	+	-	+	-	-	22	91,7
II	+	-	+	+	-	-	-
III	+	-	-	+	-	-	-
IV*	+	-	-	-	-	*	*
V	+	-	+	-	+	1	4,2
VI	+	+	+	-	+	-	-
VII	+	+	-	-	-	1	4,2
Total (%)	91,7	4,2	NT	-	4,2	24	100%

^a Pourcentage par rapport à 24 isolats testés. AFB: aflatoxine B1 ; AFG : aflatoxine G1 ; CPA : acide cyclopiazonique ; - : absence ; NT: non testée ; * : les isolats du groupe IV sont regroupés avec les isolats du groupe I le type II d'*A. flavus* correspond soit à *A. minisclerotigenes* soit à *A. parvisclerotigenus*, selon la dernière classification proposée par Pildain et al. (2008).

Tableau 17. Caractéristiques des 24 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes issus d'amandes analysées.

N°	Souches	Fluorescence Sur CAM	CCM		Sclérotés	Espèce probable
			AFB1	AFG1		
1	AF1	+	++	-	-	<i>A. flavus</i> typique
2	AF5	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
3	BF2	-	+	-	S	<i>A. flavus</i> atypique
4	CF2	++	+++	-	-	<i>A. flavus</i> typique
5	CF3	++	+++	-	-	<i>A. flavus</i> typique
6	CF4	+++	+++	-	-	<i>A. flavus</i> typique
7	DF2	+	+++	-	-	<i>A. flavus</i> typique
8	DF3	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
9	EF1	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
10	EF3	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
11	EF4	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
12	FF1	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
13	GF2	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
14	GF3	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
15	JF3	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
16	KF2	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique

17	KF4	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
18	KF5	+	+++	+	-	<i>A. parasiticus</i> ou <i>A. nomius</i>
19	KF6	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
20	KF12	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
21	KF14	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
22	LF1	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique
23	LF3	-	+	-	-	<i>A. flavus</i> typique.
24	LF5	+	++	-	-	<i>A. flavus</i> typique.

+ : Présence ; - : Absence

V.2. Discussion

Les résultats de l'analyse fongique ont montré une forte contamination des échantillons d'amandes analysées par les moisissures. Plusieurs travaux ont également signalé qu'un grand nombre de champignons peuvent être isolés des arachides et de fruits secs comme les amandes (**Hedayati et al., 2007**). Les fruits secs notamment les amandes et les graines oléagineuses constituent un substrat propice au développement des moisissures (**Groopman et Donahue, 1988**). Ce sont les conditions humides et chaudes des pays africains, sud asiatiques et sud-américains qui favorisent le plus la croissance des moisissures toxigènes. En effet, Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquistes qui s'épanouissent dans des atmosphères humides (>85%) et peu ventilées (**Jarvis, 2002**). **Shelton et al, (2002)** ont mis en évidence des variations saisonnières dans la densité fongique parmi les espèces d'*Aspergillus*. Les espèces du genre *Penicillium* se développent à des températures basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées (**D'Mello et Macdonald, 1998**). Par contre le genre *Aspergillus* est rencontré beaucoup plus dans les pays caractérisés par un climat chaud comme l'Algérie

La répartition des agents fongiques isolés dans toutes les parties de la graine fait apparaître une certaine hétérogénéité de contamination. La mycoflore externe est plus abondante que la mycoflore interne (profonde), ces résultats sont confirmés par **Weidenborner (2001) et Jianqiang et al 1999** qui a montré une différence assez nette entre

le taux de contamination des grains non désinfectés (mycoflore externe) et celui des grains désinfectés (mycoflore profonde).

Dans cette étude nous avons révélé une très forte contamination d'amandes locales (84%), et une faible contamination d'amandes importées des Etats- Unis (14%). **Hanak et al, 2002** rapportent que les conditions de conservations mal contrôlées, et la durée de stockage ont une grande influence sur le développement de la flore fongique et la contamination en mycotoxines.

En outre, les amandes blanchies importées sont faiblement contaminées (0,3%) par rapport aux amandes décortiquées importées (13,7%), s'expliquerait probablement par leur conditionnement et leur traitement particulier. Plusieurs traitements thermiques sont appliqués pour la fabrication des amandes blanchies. Ils subissent un épluchage, un lavage, et un séchage avant l'emballage.

Dans notre travail on a constaté que la plus forte contamination a été notée dans les échantillons collectés de Tipaza (38%), qui est une ville côtière, ce résultat est en accord avec les travaux de nombreux auteurs notamment **Cahagnier et Richard-Molard, (1998)** qui ont révélé que l'humidité et la température sont les principaux facteurs physiques ayant une influence considérable sur la croissance et la production des mycotoxines.

L'inventaire réalisé et le calcul de la fréquence de l'abondance de chaque agent fongique, révèlent que la mycoflore est dominée par les genres *Aspergillus* et *Penicillium* pour la totalité des échantillons d'amandes analysées. Ces deux genres fongiques représentent 52,7 et 47,3%, des résultats similaires ont été trouvés par plusieurs auteurs (**Weidenbörner, 2000 ; Magan et Aldred, 2005**). Les amandes décortiquées importées des Etats- Unis sont beaucoup plus contaminées par le genre *Aspergillus* (98,3%) que *Penicillium*. Par contre Le taux de contamination par le *Penicillium* est plus élevé chez la variété d'amandes non décortiquées locales (61,5%). La prévalence de *Penicillium* dans les amandes n'a pas été signalée dans la bibliographie. Elle peut toutefois s'expliquer par une forte installation de ce genre fongique aux dépens des autres moisissures lors de l'épluchage et le stockage.

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

contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage. Ce qui suppose que les amandes analysées étaient contaminées au cours de concassage de la coque, ou bien au cours de leur stockage.

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

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

Cette étude a démontré la prédominance d'*Aspergillus* section *Flavi*, et d'*Aspergillus* section *Nigri*, avec des taux de 56,1 et 43,4% du nombre total d'*Aspergillus* respectivement. La plupart des échantillons d'amandes sont contaminés par les espèces de la section *Flavi*. Toutefois leurs fréquences est moins importante dans les amandes importées. Dans les amandes décortiquées, et non décortiquées locales nous retrouvons pratiquement autant de *Flavi* (78,5, et 70,3%) que des *Nigri*.

Nos résultats ont également montré une très forte contamination des amandes décortiquées importées (98,6%), et des amandes décortiquées blanchies importées des Etats-Unis (77%) par *Aspergillus* section *Nigri*. Les isolats d'*Aspergillus* section *Nigri* peuvent constituer une source d'ochratoxine A dans ces denrées. Selon les études menées dans les régions à climat chaud, les espèces de cette section et de la section *Flavi* sont les plus fréquemment isolées dans les graines de céréales et d'autres graines d'arachides et de fruits secs (**Riba et al., 2008, 2010; Abarca et al., 2001; Magnoli et al., 2003**).

La nature de la microflore dans les graines dépend des conditions environnementales, de récolte, de manutention et de stockage. Les différences observées entre nos résultats avec ceux rapportés par certains auteurs peuvent être attribuées au fait que la mycoflore n'a pas été analysée de la même manière. Dans notre cas, nous n'avons pas pris les résultats de l'analyse des grains désinfectés. Donc, la flore fongique comprend la mycoflore endogène et superficielle. Par contre, dans la bibliographie on parle souvent des graines préalablement désinfectées. Cependant, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie et qui signalent la dominance d'*A. flavus* dans les arachides et les fruits secs (**Pitt et al., 1993**). *Aspergillus flavus* est très répandue dans les climats chauds et occupe des niches écologiques très diverses (**Wilson et al., 2002**). Cette espèce vit dans le sol à l'état saprophyte mais est capable de provoquer le pourrissement des grains (**Horn et Dorner, 1998**).

Sur la base des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques, nous avons identifié 61 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi*, 53 isolats présentaient les caractères du groupe d'*Aspergillus flavus* typique, 7 isolats *A. tamari*, Un isolat rattaché à *A. parasiticus* a été isolé d'un échantillon d'amandes non décortiquées locales provenant de Blida. **Bayman et al. (2002)** rapportent l'identification de 93% *A. flavus* et 7% *A. tamarii* dans les amandes californiennes recueillis sur le terrain et achetées en magasin. Dans les amandes achetées en magasin à partir de l'Arabie Saoudite, *A. flavus* constituait 98% de la population *Flavi*, le reste est *A. tamarii* (**Abdel-Gawad, et Zohri, 1993**).

La présence d'*Aspergillus flavus*, avec des taux élevés a retenu particulièrement notre attention. En effet **Giorni et al (2007)** expliquaient que l'abondance relative de différents champignons varie entre les années, avec une incidence plus importante d'*Aspergillus flavus* en année sèche et chaude comparée aux années froides et pluvieuses. Alors que **Pietri et al (2004)** attribuaient cette situation à la nature du substrat. *Aspergillus flavus* est l'espèce la plus commune, se produisant dans la plupart des denrées dans les pays tropicaux (**Molyneux et al., 2007**). **Purcell et al. 1980** ont démontré que les isolats *A. flavus* ont été le plus fréquemment dans les amandes noyaux et coques collectés dans les régions chaudes. *Aspergillus parasiticus* est rencontré plutôt dans les arachides, mais est rarement rencontrée dans les autres denrées. Elle est plus limitée géographiquement par rapport à *A. flavus*, mais elle produit les AFs de type B et G, et pratiquement tous les isolats connus sont toxigènes (**Frisvad et al., 2007**).

Le résultat concernant le pourcentage d'isolats aflatoxinogènes calculé sur milieu CAM et par CCM est de (11.5% et 39.3%) respectivement. Nos résultats montrent que sur 61 isolats seulement 24 isolats producteurs d'AFs, 5 isolats sont fortement producteurs, 2 sont isolats moyennement producteurs, et 17 isolats sont faiblement producteurs. En effet, on peut rencontrer une large gamme d'isolats allant de très fortement producteurs au non producteurs d'AFs (**Pitt, et al., 1993; Horn et al., 1996**). **Abarca et al, (1988)** ont montré que l'absence de fluorescence ne signifie pas forcément l'absence de production d'aflatoxine. De même certains travaux ont indiqué que la fluorescence des isolats sur milieu CAM n'est pas toujours un signe de production d'aflatoxines (**Giorni et al., 2007; Scherm et al., 2005**).

Dans l'analyse de la mycoflore, malgré la présence de toute une gamme d'agents fongiques dans tous les échantillons examinés, on a remarqué que l'échantillon I (amandes décortiquées locales provenant de Tipaza) est indemne d'isolats aflatoxinogènes, et dans l'échantillon G (amandes décortiquées locales provenant de Médéa) (81%) isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* étudiés, (8,4%) seulement d'entre eux produit les AFs, malgré il est fortement contaminés par les isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* mais il est moins contaminés par les isolats aflatoxinogènes. Ces données sont en accord avec les conclusions d'observations rapportées par de nombreux auteurs notamment (**Chapeland-Leclerc F, 2005 et Pholf-Leskowicz, 1999**) qui ont montré que la présence d'agent fongiques ne signifie pas nécessairement la production des mycotoxines et que la production de ces dernières est conditionnée par la présence d'un champignon bien spécifique. Ainsi les conditions permettant la toxinogénèse sont plus étroites que celles autorisant la croissance fongique (**Pholf-Leskowicz, 2002**).

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

En Espagne une étude sur les *Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes, a montré la présence d'aflatoxines dans 38 échantillons d'amandes provenant du marché de détail (**Jimenez M et al , 1991**). En 1986 et 1987, et à l'aide de la méthode CCM, AFB1 et AFB2 ont été détectées dans un échantillon d'amande (**Jimenez M et al , 1991**). **The Almond Board of California, (2002)** ont trouvé sur les 9 719 échantillons d'amandes fraîches et semi-transformées analysées avec la méthode CLHR durant la période 1993-1999 aux Etats-Unis, 8 736 échantillons n'étaient pas contaminés, 611 échantillons sont de faible producteurs d'aflatoxines, 333 échantillons moyennement producteurs d'aflatoxines et 39 échantillons sont de fortement producteurs d'aflatoxines. Les échantillons prélevés sur des amandes endommagées (par exemple éraflées, entières ou brisées, non classées, blanchies) ont affiché la présence la plus forte teneur en aflatoxines. **Riba et al (2013)** dans une enquête sur les *Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes, et les aflatoxines contaminant de noix échantillonnées en Algérie ont montré que parmi les 420 souches, 220 (52,4%) étaient aflatoxigènes. L'incidence des souches aflatoxigènes était de (44%) pour les amandes décortiquées. **Bottalico et Logrieco, 2001** ont également rapporté de faibles quantités d'AFs dans les amandes décortiquées en Italie. Par ailleurs, **Jimenez et Mateo (2001)** soulignent une fréquence élevée (76%) d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* dans les amandes en Espagne.

Sur 24 isolats aflatoxinogènes, 22 isolats (91,7%) produisent l'AFB, mais pas l'AFG, et de sclérotés. Cette catégorie d'isolats appartiendrait vraisemblablement à *A. flavus* typique (groupe I producteurs de CPA) ou (groupe IV non producteurs de CPA). (**Samson et al., 2004**). Un isolat (4,2%) appartient au groupe V (groupe d'*A. flavus* atypique), s'il produit de CPA, et un seul isolat de groupe VII (4,2%). Ce type d'isolats peut être assimilé à *A. parasiticus* ou à *A. nomius*.

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

productrices des deux types d'AFs (AFB et AFG). Les isolats produisant l'AFB, l'AFG et le CPA sont rattachés à *A. minisclerotigenes* ou à *A. parvisclerotigenus* sont rares.

Dans une étude sur les *Aspergillus* section *Flavi* des sols de culture de maïs en Iran, **Mehdi et al. (2006)** soulignent, comme nous, une dominance d'*A. flavus* et une forte proportion d'isolats ne produisant pas les AFs, le CPA, et les sclérotés (groupe I). **Giorni et al. (2007)** trouvent que 70% des souches d'*A. flavus* isolées du maïs d'Italie sont aflatoxinogènes et la moitié produit également le CPA. Selon **Paula Rodrigues et al (2009)** dans une étude sur l'approche polyphasique des souches d'*Aspergillus* section *Flavi* aflatoxinogènes et non aflatoxinogènes isolées à partir des amandes portugaises, tous les isolats *A. parasiticus* ont montré une production d'aflatoxines, ils ont tous produit AFB et AFG, et aucune production de CPA était détecté, la majorité (77%) était non aflatoxinogènes, alors que 2 isolats (15%) étaient producteurs de CPA et d'AFB, et un isolat (8%) a produit les 3 groupes de mycotoxines (CPA, AFB, et AFG). **Arianne Costa Baquião et al 2013** ont trouvé que 92,7% (167/180) isolats d'*Aspergillus Flavi* étudiés 68% (123/180) d'entre eux produit les AFs, et 47,7% (86/180) de CPA. Parmi les 136 souches de *A. flavus*, 122 (89,7%) étaient producteurs de mycotoxines; 36 (26,5%) produit seulement les AFs, 43 (31,6%) produit que le CPA, 43 (31,6%) produit les Afs, et le CPA, et 14 (10,3%) ne produisent pas les mycotoxines. CPA a été produit par 75% (43/57) isolats d'*A. flavus* non aflatoxigènes. Tous les isolats *A. nomius* et *A. parasiticus* produit AFB et AFG.

Nos résultats montrent que parmi les 61 isolats, 2 isolats (3,4%) d'entre eux non producteurs d'AFs, produisent des sclérotés de type « L », et un isolat (1,6%) produit des sclérotés de type « S ». Cet isolat est fortement producteur d'AFB1 révélée sur CCM. Le type « S », signalé pour la première fois par **Hesseltine et al. (1970)** est rarement rencontré (**Vaamonde et al., 2003; Barros et al., 2005; Giorni, 2007**). Selon **Carwell et Cotty (2002)**, les isolats de type « S » sont rencontrés fréquemment dans des régions à températures élevées et à faible pluviométrie. Ces auteurs pensent que la production de sclérotés de type « S » est une forme de survie aux fluctuations climatiques. **Saito et Tsuruta (1993)** ont classé auparavant le type « S » comme une variété d'*A. flavus*, qui produit uniquement l'aflatoxine B. **Frisvad et al. (2005)**, l'ont considéré comme une nouvelle espèce dont certains isolats produisent les AFs B et G. Les derniers travaux sur la taxonomie des *Aspergillus* section *Flavi* rattachent ce type d'isolat soit à espèces *A. minisclerotium* soit à *A. parvisclerotigenus* qui diffèrent en elles du point de vue métabolites produits (**Pildain et al., 2008**). Il faut signaler aussi que l'incidence des isolats aflatoxinogènes est aussi liée à la nature du substrat (**Horn,**

2003). Par exemple, le nombre d'isolats aflatoxinogènes est plus élevé dans les arachides (69%) que dans le blé (13%) (Vaamonde et al., 2003). Des résultats ont montré que 54 isolats (30%) des 180 isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* produisent des sclérotés après incubation sur l'agar, les sclérotés étaient tous de type « L », et aucune isolat d'*A. parasiticus* produit les sclérotés (Arianne Costa Baquião et al 2013). En outre, des différences dans la capacité de production des AFs peuvent être associées à la taille des sclérotés (Cotty, 1989; Criseo et al., 2001). D'après Hua Sui-Sheng (2002), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le morphotype « L », le plus fréquent, comprend des producteurs et des non producteurs. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie.

En ce qui concerne la contamination des amandes par les isolats aflatoxinogènes, les résultats ont révélé des concentrations assez importantes des isolats producteurs d'AFs dans les amandes non décortiquées locales (37,5%). La contamination par les AFs des arachides et d'autres fruits à coque a été rapportée par plusieurs auteurs de différents pays (Logrieco et al. 2003 ; Juan et al. 2008 ; Haydar et al. 1990 ; Pittet, 1998 ; Pitt et Hocking, 1997...).

D'après Schade et al. (1975) sur 74 échantillons d'amandes de Californie non triés, non décortiquées, 10 (14%) ont été contaminés par les aflatoxines avec des niveaux très bas (en dessous de 20 parties par milliard [ppb]) à 90 % des échantillons contaminés. Schatzki (1996) a rapporté que 80% des 1547 échantillons d'amandes avec différents types de traitement ont été contaminés, mais à des niveaux très bas. Plus récemment, Luttfullah et Hussain (2011) rapportent que 3 sur 10 ont bombardé des échantillons d'amande recueillies auprès des marchés de détail au Pakistan ont été contaminés par des aflatoxines. Dans une étude menée par (Riba et al 2013) AFB1 seulement a été détectée dans les amandes, avec de faible concentration. Bottalico et Logrieco, 2001 ont également rapporté de faibles quantités d'AFs dans les amandes décortiquées en Italie. Par ailleurs, Jimenez et Mateo (2001) ont trouvé un seul échantillon d'amandes de l'Espagne contaminé par l'AFB1 (95 ng/kg) et l'AFB2 (15 ng/kg). Ainsi, l'incidence des aflatoxines dans les amandes varie beaucoup avec la catégorie de produit fini. La forte incidence apparente cerneaux dés est probablement due principalement à la distribution plus uniforme de l'aflatoxine se produisant dans ce produit (en raison de sa petite taille des particules) que celle qui se produit dans les autres produits. Exigences de taille de l'échantillon pour l'aflatoxine de surveillance dans les amandes sont discutées (Schade et al. 1975)

Conclusion

Conclusion et perspectives

Ce modeste travail s'ajoute à beaucoup des travaux réalisés en Algérie sur les mycotoxines contaminants les différentes denrées alimentaires Food et Feed, tel que les céréales : blé dure et blé tendre, maïs,... par M. Sabaou (Ecole Normale Supérieure de Kouba), M. Bouznade (ENSA El Hararch), M. Guermouche (la Fac Central d'Alger), M. Moussaoui (Université de Béchar). Ces travaux nous permettent de fournir des informations sur la qualité des produits alimentaires, et de confirmer la présence des mycotoxines en fortes concentrations, qui a fait augmenter nos contraintes et soucis vis-à-vis de ces métabolites secondaires. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier les espèces aflatoxinogènes dans les amandes commercialisées en Algérie.

Les résultats obtenus montrent que les amandes décortiquées locales sont fortement contaminées (47,6%) par les moisissures dont les genres *Aspergillus* (52,7 %) et *Penicillium* (47,3%) sont les plus dominants. La densité des moisissures dans la variété d'amandes décortiquées blanchies importées d'Etats-Unis est insignifiante (0,3%). Nous avons également noté la dominance du genre *Aspergillus* dont les espèces appartenant aux sections *Flavi* (56,1%) et *Nigri* (43,4%), dans tous les échantillons analysés. Les résultats de la production des AFs ont montré que 39,3% (24 /61) isolats appartenant à *Aspergillus* section *Flavi* produisent les aflatoxines. Ces isolats ont été classés en sept groupes différents dont la majorité présentait les caractères d'*A. flavus* typique (91,7%).

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

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

Sur le plan de la sécurité sanitaire des aliments, notre travail est une contribution à une

analyse des risques liés à la contamination par les AFs des amandes. Il convient de noter que l'étude ne représente pas une large gamme de situations. Il serait intéressant, en perspective, d'effectuer les travaux suivants:

- Étendre l'étude sur un grand nombre d'échantillons ;
- Étudier d'une manière approfondie l'écologie des champignons toxigènes et l'influence des conditions de stockage (température, humidité) sur la toxigenèse;
- Appliquer les techniques moléculaires afin d'identifier d'une manière plus précise les isolats toxigènes;
- Évaluer le dosage d'AFs, par HPLC dans les échantillons, et de tous les extraits afin de déterminer d'une manière plus précise le potentiel aflatoxinogène des souches isolées ;
- Enfin il est indispensable d'élargir l'étude sur d'autres matrices alimentaires et d'autres régions d'Algérie, et sur d'autres champignons toxigènes, afin de disposer d'avantage de renseignements sur ce type de contamination.

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

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

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

- Vente des aliments comme les amandes dans des bacs opaques et qui se ferment hermétiquement cette technique réduit le contact direct entre les épices et l'humidité de l'air, ce qui évite la contamination par les mycotoxines, malgré la présence des spores de moisissure et aussi d'éviter la destruction des huiles essentielles par la lumière. Ces derniers ont un rôle fongicide et bactéricide très important.
- Il est impératif de veiller au respect de règles d'hygiène telles les conditions de récolte, d'emballage, d'entreposage, de stockage et du suivi tout au long de la chaîne alimentaire. A cet effet, des laboratoires spécialisés doivent être mis en place sur tout le territoire du pays.
- Puisque peu de traitements permettent de décontaminer les aliments, il est fortement recommandé de multiplier les contrôles microbiologiques et toxicologiques des denrées alimentaires

susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines.

➤ Recommander l'établissement d'une réglementation fixant la quantité maximale des mycotoxines tolérées dans chaque produit alimentaire locale et importé, ainsi que la sensibilisation de la population algérienne sur le danger de ces mycotoxines.

Reference bibliographique

1. **A.F.S.S.A (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2006).**- Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, 181p.
2. **Abarca, M.L., Accensi, F., Bragulat, M.R., Cabañ es, F.J. (2001).** Current importance of ochratoxin A-producing *Aspergillus* spp. *Journal of food protection*, 64, 903-906.
3. **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 Science and Technology*, 16 (5), 437–449.
4. **Abdel-Gawad, K.M., et Zohri, A.A. (1993)** -Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia*. 124, 55-64.
5. **Adjou.S, Soumanou .M, 2013.**Efficacité des extraits de plantes dans la lutte contre les moisissures toxigènes isolées de l’arachide en post-récolte au Bénin. *Journal of Applied Biosciences* 70:5555– 5566.
6. **Alexopoulos, C.J., Mims C.W., et Blackwell, M. (1996).** - *Introductory Mycology*. 4th ed. New York, John Wiley and Sons, Inc.
7. **Ariane Costa Baquião’, Maitê Martins Melo de Oliveira, Tatiana Alves Reis, Patricia Zorzete, Danielle Diniz Atayde, Benedito Correa,2013**Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Brazil nuts **1127–1132**
8. **ARORA, R.G., FROLEN, H. & NILSSON, A., 1981.** Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. *Acta Vet Scand* **22**, 638-641.
9. **Asao, T., Büchi,G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. (1963).**Aflatoxins B and G. *Journal of American Chemical Society*. 85, 1706.
10. **Asao, T., Büchi,G., Abdel-kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. 1965.**Structures of aflatoxins B and G1. *Journal of American Chemical Society*. **87**, 822-826.
11. **Ayerst, G. 1969.** The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi, *Journal of Stored Products Res.* **5**,127-141
- 12.
13. **Badillet G., de Briève C., Guého E., (1987),** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris.

- 14. Barrios–Gonzalez, J. et Tomasini, A. (1996).** - Production of aflatoxins in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55, 424–430.
- 15. Barros, G., Torres, A. et Sofia Chulze, S. (2005).** - *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina’s peanut–growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. *Journal of Science Food and Agriculture*, 85, 2349–2353.
- 16. Bayman P., Baker, J.L., Doster M.A., Michailides T.J. et Mahoney, N.E. (2002).**- Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2326–2329.
- 17. Bennett J.W. et Klich M. (2003).**- Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review*, 16, 497–516.
- 18. Berdy, J. (1995).** Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? In *Proceedings of the 9th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, part I*, pp. 3–23. New York: Allerton.
- 19. Berthier, J. et G. Valla (2001)**- Moisissures-Mycotoxines et aliments : du risque a la prévention. Université Claude Bernard Lyon I. <http://handy.univ-lyon1.fr/service/cours/mycot/mycot.html>.
- 20. Blumenthal CZ. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei* (2004) ;:** justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol Pharmacol*. 39:214–228
- 21. Bottalico A, Logrieco A. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in Italy. In: Logrieco A, 2001**editor. *Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Plants, Food and Feeds in Europe*. European Commission, COST Action 835, EUR 19695;. pp. 69–104
- 22. Botton, B ., Breton, A ., Fevre, M ., Gauthier, S ., Guy,PH ., Larpent,J.P ., Reymond, Sanglier J.J ., Vayssier,Y., Veau,P. (1985).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2e Ed. Masson (Paris). P: 442
- 23. Bouraima, Y., Ayi-Fanou, L., Kora, I., Sanni, A., Creppy, EE, 1993.** Mise evidence la contamination des cereals par les aflatoxines et l’ochratoxine A au Benin. In Creppy, EE.,Castegnaro, M., Dirheimer (Eds). *Human ochratoxicosis and its pathologies*. 231, 101-110.
- 24. Bradburn N., Coker R. D. & Blunden G., 1994.** The Aetiology of Turkey X Disease. *Phytochemistry*, 35 (3) : 817.

25. **C.A.S.T** (Council for Agricultural Sciences .and Technology) (2003) Mycotoxins risks in plants, Animal, and Human Systems. Task force report. 139, ISBN N 1-887383-22-0, pp 200, Ames IOWA ,USA
26. **Cahagnier B., Dragacci S., Frayssinet C., Fremy J.M., Hennebert G.L., Lesage–Meessen L., Multon J. F., Richard–Molard D. et Roquebert M.F.** (1998).- Moisissures des aliments peu hydratés. Ed. Tec et Doc. Lavoisier, Paris, France. 218p
27. **Cahagnier B., Richard-Molard D.**, (1998), Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158
28. **Cairns-Fuller, V., Aldred, D., et Magan, N.,** (2005). - Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of General Applied Microbiology*, 99, 1215-1221.
29. **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.
30. **Cardwell, K.F., et Cotty, P.J.** (2002). - Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* among field soils from the four agroecological zones of the Republic of Benin West Africa. *Plant Diseases*, 86, 434–439.
31. **Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A.**, (2002), Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc
32. **centre de l'informatique et des statistiques de Douane Algérien (CNIS) 2014**
33. **Chapeland-Leclerc, F., Papon, N., Noël T., et Villard, J.** (2005). - Moisissures et risques alimentaires (mycotoxiques). *Revue. Française. Laboratoires*, 373, 61–6.
34. **Chermette R., Bussieras J.**, (1993), *Parasitologie vétérinaire. Mycologie*, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort
35. **Chetatha, M,** 2013. Contribution à l'étude mycologique et mycotoxicologique du café commercialisé dans la région de Laghouat **du diplôme de Magister** en sciences biologiques Option: Maitrise de la qualité microbiologique et du développement microbien. Soutenue 24/09/2013 à Université de Béchar, Algérie.
36. **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.

- 37. Christensen, C.M., Mirocha, C.J. et Meronuck, R.A. (1977).**- Molds Mycotoxins and Mycotoxicoses. Agricultural Experiment Station Miscellaneous Report 142. University of Minnesota, St. Paul, MN.
- 38. Christensen,CM(1974)** – Storage of cereal grains and their products ,American Association of Cereal chimists,St Paul,Minnesota,USA .
- 39. Cole, R.J., et Cox, R.H. (1981).** - Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press, New composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain, *Journal of General Applied Microbiology*, 99, 1215-1221.
- 40. Cotty P. J. (1989).**- Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology*. **79**, 808–814.
- 41. Criseo, G., Bagnara, A., et Bisignano, G. (2001).** - Differentiation of aflatoxin–producing and non–producing strains of *Aspergillus flavus* group. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 291–295.
- 42. D’Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C. 1998.** Fungal toxins as disease elicitors. In J. Rose, ed. *Environmental toxicology: current developments*, pp. 253-289. Amsterdam, the Netherlands, Gordon and Breach Science Publishers.
- 43. 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.
- 44. Domsch, K.H., Gams, W., et Anderson, T.-H. (1980).** - "Compendium of Soil Fungi".Academic Press (London).
- 45. 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.
- 46. Dragacci S., Grosso F. & Fremy J., 2005.** *Analyse et détection des mycotoxines.* Editions TI Sciences et Techniques, 3330p.
- 47. Dunoyer, C., 1989.** *Principes de la microbiologie en industries céréalière, Industries des céréales*, pp. 13-16.
- 48. Dutton, M. F., Ehrlich, K., et Bennett, J. W. (1985).** - Biosynthetic relationship among aflatoxins B1, B2, M1 and M2. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1392–1398.
- 49. Edwards, S.G. (2003).** - *Fusarium mycotoxins in UK wheat. Aspects of Applied Biology*, 68,35-42.

- 50. El khoury, A. (2007).** Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1(AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Diplôme de Docteur en sciences de la vie. 200p. Option : Génie des procédés et de l'environnement. Soutenu le 3/07/2007 à l'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- 51. El-nezami HS, Nicoletti G, Neal GE, Donohue DC et Ahokas J (1995).** -Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem Toxicol*, 33:173-179.
- 52. FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004).** – Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition paper 81. FAO,Rome.
- 53. 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.
- 54. Filtenborg O., Frisvad J.C., Thrane U., (1996),** Moulds in food spoilage, *Int. J. Food*
- 55. 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.
- 56. Frisvad J.C., Skouboe P, Samson R.A. (2004).**- A new efficient producer of aflatoxin B1,sterigmatocystin and 3–O–methylsterigmatocystin: *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 442–453.
- 57. Frisvad, J. C., Thrane, U., et Samson, R. A. (2007).** -Mycotoxin producers. In J. Dijksterhuis et R. A. Samson (Eds.), *Food mycology. a multifaceted approach to fungi and Food* (pp. 135–159). Boca Raton: CRC Press.
- 58. Frisvad, J.C., Skouboe, P. et Samson, R.A. (2005).** - Taxonomic comparison of three
- 59. Galvano F, Galofaro F et Galvano G (1996).** -Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products : a worldwide review. *Journal of Food Protection*, 59: 1079-1090.
- 60. Gams ,W.,Christensen,M .,Onions A .H.S.,Pitt,J.I.et Samson,R.A.(1985).** – Infrageneric taxonomy of *Aspergillus*.In : *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, R. A.Samson,Pitt,J.I.(eds),Plenum Press ,New York,pp. 55-61
- 61. Geiser D.M., Dorner J.W., Horn B.W. et Taylor J.W. (2000).**- The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 169–179.

- 62. Geiser D.M., Frisvad J.C. et Taylor J.W. (1998).**- Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial beta-tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia*, **90**, 831– 845.
- 63. 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
- 64. Gourama H. et Bullerman L.B. (1995).**- *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*,
- 65. Groopman, J.D. and Donahue, K.F. (1988)** Aflatoxin, a human carcinogen: determination in foods and biological samples by monoclonal antibody affinity chromatography. *J AOAC Int* **71**, 861–867
- 66. GROOPMAN, J.D., 1994.** Respiratory aflatoxicosis : suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **125**, 198-205.
- 67. GROOPMAN, J.D., 1994.** Respiratory aflatoxicosis : suppression of pulmonary and
- 68. Guarro J., Gené J. et Stchigel A.M. (1999).**- Developments in fungal taxonomy. *Clinical and Microbiological Review*, **12** (3), 454–500.
- 69. Hanak.E, Boutrif.E, Fabre.P, Pineiro. M, 2002.** Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l'atelier international, CIRAD-FAO. Cédérom du CIRAD, Montpellier, France
- 70. Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. et Pegler D.N. (1995).**- Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 8th ed. Cambridge, CAB International Mycological Institute, Egham, United Kingdom.
- 71. Haydar, M., Benelli, L., et Brera, C. (1990).** - Occurrence of aflatoxins in Syrian foods and foodstuffs: A preliminary study. *Food Chemistry*, **37**, 261–268
- 72. Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., et Denning, D. W. (2007).** *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **153**, 1677-1692.
- 73. Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith, M., Ellis, J. J., Vandegraft, E. et Shannon, G.(1970).**- Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series. Pages 202–210 In: *Toxic Micro-organisms*. M. Herzberg, ed. U. S. Gov. Print. Office, Washington, D.C.
- 74. Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L., Morrison C.J., (2005),** Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, **43** (1), 129-137

- 75. Hocking A.D. et Pitt J.I. (2003).**- Mycotoxigenic fungi, In: Hocking, A.D. (Ed.), Foodborne microorganisms of public health significance, 6th Ed. Australian Institute, Sydney.
- 76. Horn B.W. et Dorner J.W. (1998).**- Soil populations of *Aspergillus* species from section Flavi along a transect through peanutgrowing regions of the United States. *Mycologia*, 90, 767–776.
- 77. 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
- 78. Horn, B.W., et Wicklow, D.T., (1983).** Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*, *Can. J. Microbiol.*, 29, 1087-1091.
- 79. Hua Sui Sheng T. (2002).**- Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin and 16th Aflatoxin Elimination Workshops. October 13–15, 2003 Savannah, Georgia USA. intergeneric transcribed spacer regions and the 5.8S rRNA gene. *Journal of General Applied Microbiology*, 48, 9–16.
- 80. JAKAB, G.J., HMIELSKI, R.R., ZARBA, A., HEMENWAY, D.R. & Jaquet, J., Lafont, J., et Lafont, P. (1982).** -Sur la contamination du lait par les aflatoxines. *Revue laitière française*, 42 : 63-67
- 81. Jarvis B.B. et Miller J.D. (2005).**- Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 67–372.
- 82. Jianqiang, L., Xili, L. Feng, W. and Muhai, Z., 1999.** Microscopy and scanning electron microscopy of black embryo of wheat seed and the seed borne fungi. *Acta phytopathologica sinica* 29(1) 22-26.
- 83. Jimenez M., Mateo R., Querol A., Huerta T., Hernandez E. (1991).**- Mycotoxins and
- 84. Juan, C., Zinedine, A., Moltó , J. C., Idrissi, L., et Mañ es, J. (2008).** - Aflatoxins levels indried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control*, 19, 849–853.
- 85. Keller, S.E., Sullivan, T.M., et Chirtel, S. (1997).** Factors affeting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Indust. Microbiology, Biotechnology*, 19, 305-309.
- 86. Kiffer, E. & Morelet, M. (1997)** Les deutéromycètes. Institut National
- 87. King, A.D., Hocking, A.D., et Pitt, J.I. (1979).** - Dichloran–rose bengal medium forenumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 37,959–964.

- 88. KUMAGAI, S., BINTVIHOK, A., KONO, M., IWAKI, M., SUGITA-KONISHI, Y., ITO, Y. & KATO, M., 1995.** In vitro aflatoxin B1-DNA binding by microsomes and its modulation by cytosol : comparison of various mammalian and avian livers in relation to species differences in susceptibility. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **36**, 365-374.
- 89. Kurtzman C.P., Horn, B.W. et Hesseltine, C.W. (1987).** - *Aspergillus nomius*, a new
- 90. Lacey J. (1989).**- Prevention of Mold growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. eds. *Mycotoxins and phycotoxins* 88. Elsevier, Amsterdam, pp 161–168.
- 91. Lacey, J. (1986).** - Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vleggaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.
- 92. Langseth, W., Hoie, R., et Gullord, M. (1995).** -The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985-1990. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B: Soil and Plant Science*, 45, 63-67.
- 93. Le Bars, J., Le Bars P., (1998).** -Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing. *Revue de Medicine Veterinaire*, 149, 493-500.
- 94. Leyral, G., Vierling, E., 2007.** *microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires*, 4ème éd,-Rueil –Malmaison : Doin ; Bordeaux : CRDP d’Aquitaine, (Biosciences et techniques : Sciences des aliments).
- 95. Lipps, P.E., Deep, I.W. (1991).** -Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Disease*, 75, 828-833.
- 96. Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., et Perrone, G. (2003).** - Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645–667.
- 97. Magan, N. et Aldred, D. (2005).** - Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, S1, 10–16.
- 98. Magnoli, C., Violante, M., Combina, M., Palacio, G. et Dalcerro, A. (2003).** - Mycoflora and ochratoxin–producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 179–184.
- 99. Mantle P.G. (2002).**- Risk assessment and the importance of ochratoxins. *International*
- 100. Mehdi Razzaghi-Abyaneh¹, Masoomeh Shams-Ghahfarokhi², Abdolamir Allameh², Amirmohammad Kazeroon-Shiri³, Shahrokh Ranjbar-Bahadori³, Hasan Mirzahoseini⁴ & Mohammad-Bagher Rezaee⁵.(2006)** A survey on distribution of

Aspergillus section Flavi in corn field soils in Iran: Population patterns based on aflatoxins, cyclopiazonic acid and sclerotia production

101. Microbiol., 33(1), 85-102
102. **Miller, J. D., (1992),** "Fungi as contaminants in indoor air", Atmospheric Environment, v 26A, n 12, p 2163-2172.
103. **Ministère d'Agriculture Algérien, 2014**
104. **Mislivec, P.B., Trucksses, M.W., et Stoloff, L. (1988).** -Effect of other toxigenic mold species on aflatoxin production by Aspergillus flavus in sterile broth shake culture, Journal of Food Protection, 51, 449-451.
105. **Mitchell D., Parra R., Aldred D. et Magan N. (2004).**- Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius strains from grapes in Europe and Israel. Journal of Applied Microbiology, **97**, 439–445.
106. **Molyneux, R. J., Mahoney, N., Kim, J. H., et Campbell, B. C. (2007).** -Mycotoxins in edible tree nuts. International Journal of Food Microbiology, 119, 72–78.
107. **Morin O. (1994),** Aspergillus et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir.(Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10
108. **Moss, M.O., et Frank, J.M. (1985).** -Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by Fusarium sporotrichioides. Transactions of the British Mycological Society, 84,585-590.
109. **Multon J. L., 1982.-** Conservation et Stockage des grains et graines et produits dérivés céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Ed. Lavoisier, Paris, 576 p.
110. **N. Azzoune, S. Mokrane, A. Riba, N. Bouras, C. Verheecke, N. Sabaou and F. Mathieu 2014.** Contamination of common spices by aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. Accepted in: Quality Assurance and Safety of Crops & Foods.
111. **Northolt M. D. et Bullerman L .B. (1982).**- Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions. Journal of Food Protection, **45**, 519–26.
112. **Novas M. V. et Cabral D. (2002).**- Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in Aspergillus flavus from peanut in Argentina. Plant Diseases, 86, 215–219.
113. **O.M.S (Organisation Mondiale pour la Santé) (2002).**- Evaluation de certaines mycotoxines dans les aliments. Rapport de la cinquante–sixième réunion du Comité

mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires, Série de rapports techniques de l'OMS no 906, Organisation mondiale de la santé (OMS), Genève, Suisse.

114. **Olutiola, P.O.** (1976). Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. *Trans Br Mycol Soc.* **67**, 265–268.
115. **Park, J.W., Kim, E.K., Shon, D.H. et Kim, Y.B.** (2002).- Natural co-occurrence of Aflatoxin B1, Fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Additives and Contaminants*, **19**, 1073–1080.
116. **Paula Rodrigues , Armando Venâncio , Zofia Kozakiewicz , Nelson Lima (2009)** A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds *International Journal of Food Microbiology* 129 (2009) 187–193.
117. **Perry, J. J., Staley J. T., and S. Lory.** (2004). *Microbiologie*. Dunod. France.
118. **Peterson S.W.** (2006), Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* species, *Rev. Iberoam Micol.*, 23(3), 134-8.
119. **Peterson, S.W.** (2000). - In: R.A. Samson, J.I. Pitt (Eds.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, Harwood Academic, The Netherlands pp. 163–178.
120. **Pfohl-leszkowicz, A. (1999a)**.- Ecotoxicogénèse In : *Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque*.- Chapitre 2, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 17-30.
121. **Pfohl-Leszkowicz, A. (2001)**. -Définition et origines des mycotoxines in : *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*, Ed. Tec & Doc, 3-14
122. **Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. & Castegnaro, M. (2002)**. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food additives and Contaminants*, Vol. 19, No. 3, (2002), pp.282-302, ISSN 0265-203X
123. **PIER, A.C., RICHARD, J.L. & CYSEWSKI, S.J., 1980**. The implications of mycotoxins in animal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc* **176**, 719-725.
124. **Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G., 2004**. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. *Food Additives and Contaminants* 21, 479–487.
125. **Pildain M.B., Frisvad J. C., Vaamonde G., Cabral, J. Varga D. and Robert A. Samson.(2008)**-Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 725-735

126. **Pildain M.B., Vaamonde, G. et Cabral D. (2004).**- Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin
127. **Pitt J.I., Basílico J.C., Abarca M.L et Lopez C. (2000).**- Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, **38**, 41–46.
128. **Pitt J.I., Hocking, A.D. (1997).**- *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and
129. **Pitt, J I and Miscamble, B F (1995)** Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Jornal of Food Protection*, **58**, 86-90
130. **Pitt, J.I.et Hocking, A.D. (2006).** Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia*. 162:233-43.
131. Professionnal, London
132. **Purcell, S. L., Phillips, D., and Mackey, B. E. 1980.** Distribution of *Aspergillus flavus* and other fungi in several almond-growing areas of California. *Phytopathology* 70:926-929
133. **Raper K. et Fennell D.J. (1965).**- The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore
134. **Reboux, G. (2006).** -Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46, 208–212.
135. **Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeaupuis J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K. et Yamaguchi H. (1998).**- *Molecular Diagnosis and Epidemiology of Fungal Infections*, **36**, 249–257.
136. **Riba A. (2008).** Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines A dans la filière blé en Algérie, thèse de doctorat
137. **Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi A. et Sabaou, N. (2010).** *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology* , 48 , 2772–2777.
138. **Riba, A., Matmoura A, Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi A. et Sabaou, N. (2013).** Investigations on aflatoxigenic fungi and aflatoxins contamination in some nuts sampled in Algeria. *African Journal of Microbiology Research* pp. 4974-4980, ISSN 1996-0808
139. **Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi A., et Sabaou N. (2008).** -Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat, *International Journal of Food Microbiology*, **122**, pp. 85–92.

140. **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.
141. **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.
142. **Rojas, T.R., Sampayo C.A.F., Vazquez B.I., 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.
143. **Saito, M. et Tsuruta, O. (1993).**- A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proc of the Japanese Association of Mycotoxicology Mycotoxicology*, 37, 31–36.
144. **Samson R.A., Hong S.B. et Frisvad J.C. (2006).**- Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, 133–148.
145. **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.
146. **Schade, J. E.; McCreevy, K.; King, A. D.; Mackey, B.; Fuller,G.** Incidence of Aflatoxin in California Almonds. *Appl.Microbiol.* **1975**, 29, 48-53.
147. **Schatzki, T. F.** Distribution of Aflatoxin in Almonds. *J. Agric.Food Chem.* **1996**, 44, 3595-3597.
148. **Scheidegger K.A. et Payne G.A. (2003).**- Unlocking the secrets behind secondary metabolism,A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*, **22**, 427–463.
149. **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.
150. **Shelton, A. M., J.-Z. Zhao, and R. T. Roush. 2002.** Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 845Ð 881.

151. **Singh, K., Frivsvad, J.C., Thrane, U. and Mathur, S.B. (1991)** An Illustrated Manual on identification of Some seed-borne *Aspergillus*, *Fusaria*, *Penicillia* and their mycotoxins. Copenhagen : Jord-brugsforlaget.
152. **Smith J.E. et Moss M.O. (1985).**- Mycotoxins. Formation, analysis and significance, John Wiley et Son, Chichester.
153. sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin In: *Aspergillus rambellii* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 28, 442–453.
154. **Steyn, P. 1980.** Breeding and food of the Bateleur in Zimbabwe (Rhodesia). Ostrich 51: 168-178.
155. **Steyn, P.S., 1998.** The biosynthesis of mycotoxins. Rev Med Vet **149(6)**, 469-478.
156. **Steyn, P. 1995.** Black Sparrowhawks breeding in Free State. *Mirafara* 12:12.
157. **Strachan T. & Read A. P., 1999.** Human Molecular Genetics 2. Taylor and Francis Books. 674p.
158. **Strohl, W. R. (1997).** Industrial antibiotics: today and the future. In WR (ed). Bio/technology of antibiotics, 2nd edn. Marcel Dekker. New York. 1-47.
159. **Sutra, L., Frederich, M., et Jouve, J.L., 1998.** Manuel de Bactériologie Alimentaire. Polytechnica, Paris, pp.15-20.
160. **Tabuc C, 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse et Université de Bucarest.
161. **Tantaoui-Elaraki A., Le Tutour B. & Aboussalim A., 1983.** Conséquence de la contamination des olives par des *Aspergillus* toxigènes sur la qualité et la quantité de l'huile de pression. Revue française des corps gras, 30 (11-12) : 473-476.
162. **Terrain C., et Graallet H., 2003.** Séchage des grains en organisme stockeur: guide pratique. Ed : ARVALIS, Institut du végétal et FFCA.
163. **The Almond Board of California, 2002:** Results of aflatoxin tests on raw and semi-processed almonds between 1993-2000. ABC Surveillance Data. pp 1-3.
164. **TIA3 avril 2013**
165. **Turner, W. B. (1971).** -Fungal metabolites. Academic Press Inc., London
166. **Turner, W.B., et Albridge, D.C. (1983).** -Fungal metabolites. Academic Press Inc., London
167. **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.

- 168. 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.
- 169. Varga, J., Kocsubé, S., Tó th, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson,R.A. (2007).** -*Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world–wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1925–1932.
- 170. Vargas E.A., Preis R.A., Castro L. et Silva C.M., (2001).**- Co–occurrence of aflatoxins B1, B2,G1, G2, zearalenone and fumonisin B1 in Brazilian corn. *Food Additive and Contaminants*,**18**,981–986.
- 171. VINING, L. C. 1990.** Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbial.* **44**: 395-427
- 172. Weidenbö rner, M., Wieczorek, C., Appel, S., K u n z , B . (2 0 0 0).**- W h o l e w h e a t a n d w h i t e w h e a t f l o u r " t h e m y c o b i o t a a n d p o t e n t i a l m y c o t o x i n s . *Food M i c r o b i o l o g y*, **17** ,103-107 .
- 173. Weidenbörner M. (1998)** - *Lebensmittel-Mykologie* B.Behr's Verlag GmbH und Co.1 ISBN 3-86022-457-3.
- 174. Weidenborner, M., 2001.** Pine nuts: The mycobiota and potential mycotoxins. *Canadian journal of microbiology* **47(5)**:460-464.
- 175. Wicklow D.T., et Shotwell O.L. (1983)**- Intrafungal distribution of aflatoxin among conidia and selerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology*, **29**, 1–5.
- 176. Wicklow, D.T., Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Adams, G.L., 1980.** Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* **70**, 761-764.
- 177. WILD, C.P., GARNER, R.C., MONTESANO, R. & TURSI, F., 1986.** Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats.
- 178. Wilson, D.M., Mubatanhema, W. et Jurjevic ,Z. (2002).** - Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns, *Advances Experimental and Medical Biology*, **504**, 3–17.*Carcinogenesis* **6**, 853-858.
- 179. Wogan, G. N. (2000).** - Impacts of chemicals on liver cancer risk. *Seminars in Cancer Biology*,**10** (3), 201–210.

- 180. York. Commission Regulation (E.C.) (2002).** - Commission Regulation N° 472/2002 of 12 march 2002. Official Journal of European Communities, L75 (18), 16/03/2002.
- 181. Zinedine, A., (2009).** -Détermination des mycotoxines dans les aliments commercialisés au Maroc et étude sur les bactéries lactiques et leur pouvoir de conservation et de biotransformation.Diplôme d'habilitation à Diriger des Recherches. INRA, Toulouse, France.
- 182. Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnac, F. R., Angelini, S., et al.(2006).** Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco.Food Control, **17**, 868–874

ANNEXES

Annexe I

Composition des milieux de cultures utilisés

Milieu d'isolement DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicole Agar)

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

pH final 5,6±0.2

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

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

Milieu PDA (Pomme de Terre,Dextrose,Agar)

Pomme de terre.....	200g
Agar.....	15g

Glucose20g

Eau dis.....1000ml

pH final 5,6±0.2

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

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

Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar)

Saccharose.....30g

Extrait de l.....5g

Czapek concentré.....10ml

K₂HPO₄.....1g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000ml

pH final 5,6±0.2

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

ANNEXE II

1. Les appareils utilisés dans cette étude sont :

- Agitateur (Yellow,line)
- Agitateur magnétique
- Autoclave
- Balance de précision
- Bec benzen
- Centrifugeuse (SIGMA)
- Contour de colonies (FUNKE GERBER)
- la cuve
- Distillateur
- Etuve (Memmert)
- La Hotte
- Micro-onde
- Micro-seringue

- Micropipette (1ml, 0.1ml)
- Microscope optique (MOTIC,type 102M)
- plaques de gel de silice-60 (plaque de CCM)
- Réfrigérateur (LG)
- UV radiation (254 nm; 365 nm)

2. Les solvants :

Acide chlorhydrique (HCl) à 4%,

Le méthanol (CH₃OH),

Éthanol (C₂H₅OH),

Acétonitrile (C₂H₃N),

Chloroforme (CHCl₃).